

**Transkriptomweite Einblicke in den
Rrm4-vermittelten mRNA-Transport
in *Ustilago maydis***

Inaugural-Dissertation

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

vorgelegt von

Carl Haag
aus Hamburg

Düsseldorf, September 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. Heiner Schaal

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

Carl Haag

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht in:

Koepke, J., Kaffarnik, F., Haag, C., Zarnack, K., Luscombe, N. M., König, J., Ule, J., Kellner, R., Begerow, D. and Feldbrugge, M. (2011). The RNA-binding protein Rrm4 is essential for efficient secretion of endochitinase Cts1. *Mol Cell Proteomics* **10**, M111 011213.

Weitere wissenschaftliche Beiträge:

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

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

Für Judith & Carlotta

In Gedenken an Olaf

„See you starseide!“

Zusammenfassung

Die räumliche und zeitliche Modulation der Proteinexpression auf der posttranskriptionellen Ebene ist ein wichtiger regulatorischer Aspekt von Entwicklungsprozessen. Die Etablierung der Polaritätsachsen wird beispielsweise anhand von mRNA-Lokalisierung und dem hierdurch ermöglichten Aufbau asymmetrischer Morphogengradienten gesteuert. Eine Voraussetzung für die erfolgreiche Infektion von Wirtspflanzen durch den pathogenen Pilz *Ustilago maydis* ist der morphologische Wechsel von hefeartigem hin zu filamentösem, unipolarem Wachstum. Das RNA-bindende Protein Rrm4 ist die Hauptkomponente des Mikrotubuli-abhängigen mRNA-Transports und der Verlust von *rrm4* äußert sich in einer verminderten Virulenz, reduziertem filamentösem Wachstum, sowie dem Polaritätsverlust in Filamenten. Im Vorfeld dieser Arbeit wurde eine begrenzte Anzahl transportierter mRNAs identifiziert, jedoch blieben ein Bindemotiv und somit grundlegende Prinzipien des Rrm4-vermittelten mRNA-Transports weiterhin unklar. Ziel dieser Arbeit war es daher, gebundene Transkripte auf der transkriptomweiten Ebene mittels *in vivo* UV-Quervernetzung zu identifizieren. Zu diesem Zweck wurden umfangreiche HITS-CLIP Analysen der existierenden CLIP-Banken durchgeführt und die iCLIP-Methode am Beispiel von Rrm4 in *U. maydis* etabliert.

Die in dieser Arbeit erhaltenen transkriptomweiten Einblicke zeigten, dass Rrm4 Ziel-mRNAs primär in der 3'UTR bindet. Zudem konnte anhand der iCLIP-Methode das für die Interaktion mit Rrm4 erforderliche Tetranukleotid UAUG als Bindemotiv identifiziert werden. Darüber hinaus zeigten die Daten, dass Rrm4 eine große Anzahl an mRNAs bindet. Anhand der beiden CLIP-basierten Ansätze wurden bis zu 1.100 potentieller Ziel-mRNAs identifiziert, wovon 400 mRNAs in beiden Ansätzen überlappten. Die identifizierten mRNAs kodieren für eine Vielzahl funktionell diverser Proteine, darunter Polaritätsfaktoren, mitochondrielle Proteine und auch mit Membrantransport-assoziierte Faktoren. Dies zeigt, dass der Rrm4-vermittelte mRNA-Transport eine globale Rolle in *U. maydis* Filamenten einnimmt und Rrm4 an einer Vielzahl von Prozessen beteiligt zu sein scheint. Die Charakterisierung einiger der in dieser Arbeit neu identifizierten Ziel-mRNAs zeigte, dass Komponenten der ESCRT-Maschinerie das unipolare Wachstum in *U. maydis* beeinflussen. Des Weiteren zeigte die Deletion von *ips1*, dass diese Inositolphosphatsynthase für filamentöses Wachstum und Endozytose wichtig ist. Zudem erweist sich die unkonventionelle Sekretion der Chitinase Cts1 von ESCRT-assoziierten Faktoren als auch von der Inositolphosphatsynthase Ips1 abhängig, was auf eine Verbindung zu Endosomen und dem Membrantransport hindeutet. Der endosomale Membrantransport scheint somit möglicherweise ein durch Rrm4-regulierter Prozess zu sein. Insgesamt implizieren die in dieser Arbeit gewonnenen Daten, dass der Rrm4-vermittelte mRNA-Transport bei der (a)symmetrischen Verteilung von Transkripten bzw. Proteinen während des filamentösen Wachstums von zentraler Bedeutung ist.

Summary

The spatial and temporal modulation of protein expression is a crucial aspect of developmental processes. For example, the establishment of the axis of polarity is regulated by mRNA-localization, which allows the formation of asymmetric gradients of morphogens. A prerequisite for infection of host plants by the pathogenic fungus *Ustilago maydis* is the morphological switch from yeast-like to unipolar filamentous growth. The RNA-binding protein Rrm4 is the key factor of microtubule-dependent mRNA-transport and loss of *rrm4* results in reduced virulence, impaired filamentous growth and loss of polarity in filaments. Previously, a limited number of target mRNAs were identified, but a binding motif and therefore basic principles of Rrm4-mediated mRNA-transport still remained unknown. Therefore, the aim of this thesis was the transcriptome-wide identification of bound transcripts via *in vivo* UV-crosslinking. For this purpose, a comprehensive HITS-CLIP analysis of existing CLIP-libraries was performed and the iCLIP-method was established in *U. maydis* using Rrm4 as proof of principle.

The transcriptome-wide insights gained in this thesis demonstrated that Rrm4 binds mRNAs primarily in their 3'UTR. In addition, using the iCLIP-method the tetranucleotide UAUG was identified, which was required for the interaction with Rrm4. Furthermore, the data show that Rrm4 binds a large number of mRNAs. Both approaches identified up to 1,100 mRNAs, of which 400 mRNAs overlapped in both approaches. The identified candidates encoded for a multitude of functionally diverse proteins, such as polarity factors, mitochondrial proteins as well as factors associated with membrane transport. This shows that Rrm4-mediated mRNA-transport plays a global role in *U. maydis* filaments and Rrm4 appears to be involved in a multitude of processes. The characterization of several novel target mRNAs revealed that components of the ESCRT-machinery are involved in the regulation of polar growth. In addition, the deletion of *ips1* showed that this inositol-phosphate synthase is important for filamentous growth and endocytosis. Furthermore, the dependence of the unconventional secretion of the chitinase Cts1 on ESCRT-associated factors and the inositol-phosphate synthase *Ips1* suggested a connection to endosomes and membrane transport. Thus, one of the functions of Rrm4 appears to involve the regulation of endosomal membrane transport.

In summary, the data imply that during filamentation Rrm4 is of central importance regarding the symmetrical and asymmetrical distribution of transcripts and proteins throughout the cytoplasm.

Abkürzungen und Fachbegriffe

3-AT	3-Aminotriazol	OD	Optische Dichte
°C	Grad Celsius	ORF	<i>open reading frame</i>
AK	Antikörper	PAR-CLIP	<i>photoactivatable- ribonucleoside-enhanced CLIP</i>
Amp	Ampicillin	PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
ARE	AU-reiches Element	PNK	Polynukleotidkinase
AS	Aminosäure(n)	QE	Quervernetzungsereignis
ATP	Adenosintriphosphat	QS	Quervernetzungsstelle
bp	Basenpaar(e)	RBD	RNA-bindende Domäne
BSA	Bovines Serumalbumin	RBP	RNA-bindendes Protein
C-terminal	Carboxyterminal	RFU	<i>relative fluorescence unit(s)</i>
CLIP	<i>in vivo UV-crosslinking immunoprecipitation</i>	RIP	RNA-Immunopräzipitation
iCLIP	<i>individual nucleotide resolution CLIP</i>	RNA	<i>ribonucleic acid</i> (Ribonukleinsäure)
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i> (Desoxyribonukleinsäure)	rRNA	ribosomale RNA
DIC	differential interference contrast (Differentialinterferenzkontrast)	Rpm	<i>rounds per minute</i>
DIGE	<i>differential gel electrophoresis</i>	RRM	<i>RNA recognition motif</i>
ELAV	<i>(embryonic lethal, abnormal vision)</i>	RT	Raumtemperatur
ESCRT	<i>Endosomal sorting complex required for transport</i>	RT	Reverse Transkriptase
Gfp	<i>(enhanced) green fluorescent protein</i>	s	Sekunde
HITS-CLIP	<i>high throughput sequencing CLIP</i>	ss	<i>single stranded</i> (einzelsträngig)
kDa	Kilodalton	SELEX	<i>systematic evolution of ligands by exponential enrichment</i>
KH	hnRNP K-homology	TAP	<i>Tandem affinity purification</i>
l	Liter	TEV	<i>Tobacco etch virus</i>
LE	Lokalisationselement	U	<i>Unit(s)</i>
min	Minute	UTR	<i>untranslated region</i>
ml	Milliliter	UV	Ultraviolett
MLLE	Mademoiselle-Domäne	v/v	Volumenprozent
mM	Mikromolar	w/v	Gewichtsprozent
µl	Mikroliter		
µm	Mikrometer		
mRNA	<i>messenger RNA</i> (Boten-RNA)		
mRNP	<i>messenger</i> Ribonukleoproteine		
MSRDB	MIPS <i>Sporisorium reilianum</i> DataBase		
MUMDB	MIPS <i>Ustilago maydis</i> DataBase		
ncRNA	<i>non-coding RNA</i>		
N-terminal	Aminoterminal		
Nt	Nukleotid		

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	II
Summary	III
Inhaltsverzeichnis	V
1. Einleitung	1
1.1 Die Funktion von RNA-bindenden Proteinen in der posttranskriptionellen Regulation	1
1.2 RBPs und mRNA-Lokalisation	2
1.3 Posttranskriptionelle Regulation der pathogenen Entwicklung von <i>Ustilago maydis</i>	5
1.4 Mikrotubuli-abhängiger mRNA-Transport in <i>U. maydis</i>	7
1.5 Die Identifizierung gebundener RNA-Moleküle durch <i>in vivo</i> UV-Quervernetzungsexperimente.....	8
1.6 Zielsetzung dieser Arbeit.....	10
2. Ergebnisse	12
2.1 Identifizierung neuer Ziel-mRNAs von Rrm4 anhand der Hochdurchsatzsequenzierung existierender CLIP-Banken	12
2.2 Charakterisierung von potentiellen Bindestellen anhand der HITS-CLIP-Daten	15
2.3 Die Etablierung der iCLIP-Methode in <i>U. maydis</i>	17
2.4 Identifizierung potentieller Bindestellen von Rrm4.....	20
2.5 Verteilung der potentiellen Bindestellen von Rrm4 innerhalb identifizierter mRNAs	23
2.6 Identifizierung des Tetranukleotids UAUG als potentielles Bindemotiv von Rrm4.....	25
2.7 Die Interaktion von UAUG und Rrm4 im Hefe-Drei-Hybrid-System.....	27
2.8 Die transkriptomweite Identifizierung neuer Ziel-mRNAs von Rrm4.....	30
2.9 ESCRT-assoziierte Proteine sind an der Regulation des unipolaren Wachstums beteiligt .	36
2.10 Die subzelluläre Lokalisation der ESCRT-Komponenten ist unabhängig von Rrm4	39
2.11 Die <i>myo</i> -Inositolphosphatsynthase <i>Ips1</i> ist essentiell für das filamentöse Wachstum.....	45
2.12 Die Sekretion der Chitinase <i>Cts1</i> weist auf eine mögliche Verbindung zu Membrantransport hin.....	47
3. Diskussion	49
3.1 Transkriptomweiter Einblick in den Rrm4-vermittelten mRNA-Transport	49
3.3 Spezifische Funktionen des Rrm4-vermittelten mRNA-Transports	53
3.3.1 Neue Ziel-mRNAs des Rrm4-vermittelten mRNA-Transports	53
3.3.2 Ribosomale Proteine und Ubiquitin-abhängiger Prozesse.....	54
3.3.3 Lokalisation von Organell-spezifischen Proteinen.....	56
3.3.4 Polaritätsfaktoren.....	57
3.4 Regulation des unipolaren Wachstums durch Membrantransport.....	58
3.5 Rrm4 bindet primär die 3'UTR von mRNAs	61
3.6 Das Motiv UAUG wird durch RRM3 gebunden.....	62
3.7 Modellvorstellung für den Rrm4-vermittelten mRNA-Transport.....	66

3.8	Ausblick	68
4.	Material und Methoden	70
4.1	Materialien und Bezugsquellen	70
4.1.1	Chemikalien, Medien, Enzyme und Kits	70
4.1.2	Oligonukleotide	73
4.1.3	Plasmide und cDNA-Banken	75
4.1.4	Stämme	80
4.1.5	Zentrifugen	81
4.2	Mikrobiologische, zellbiologische und genetische Methoden	82
4.2.1	Arbeiten mit <i>E. coli</i>	82
4.2.2	Arbeiten mit <i>S. cerevisiae</i>	82
4.2.3	Arbeiten mit <i>U. maydis</i>	83
4.3	Molekularbiologische Methoden	87
4.3.1	Die Isolierung von Nukleinsäuren	87
4.3.2	Modifikation und Analyse von Nukleinsäuren <i>in vitro</i>	87
4.3.3	Transfer und Nachweis von Nukleinsäuren	91
4.3.4	Sequenz- und Strukturanalysen	93
4.4	Biochemische Methoden	93
4.4.1	Proteinbiochemische Methoden	93
4.4.2	iCLIP (individual nucleotide resolution CLIP)	96
4.5	Bioinformatische Analysen	102
4.5.1	Verwendete Programme	102
4.5.2	Analysen der HITS-CLIP und iCLIP-Daten	103
4.5.3	Analyse der iCLIP-Daten	104
5.	Literaturverzeichnis	107
6.	Ergänzende Daten	123
7.	Anhang	124
7.1	Identifizierung von rRNA innerhalb der HITS-CLIP- und iCLIP-Daten	124
Danksagung		127
Lebenslauf		128

1. Einleitung

1.1 Die Funktion von RNA-bindenden Proteinen in der posttranskriptionellen Regulation

Die Koordination der Genexpression ist für Organismen essentiell um Synthese, Lokalisation und Abbau zellulärer Makromoleküle auf der räumlichen und zeitlichen Ebene regulieren zu können. Die Regulation der Genexpression kann dabei neben der transkriptionellen auch auf ko- und posttranskriptioneller Ebene erfolgen. So wird z.B. die zelluläre Proteinmenge in Säugetierzellen größtenteils auf der Ebene der Translation reguliert (Schwanhauser *et al.*, 2011). Fehlerhafte ko- und posttranskriptionelle Regulationsprozesse können schwerwiegende Konsequenzen für den Organismus haben. Im Menschen kann sich dies in Erbkrankheiten, Neuropathien, muskulärer Atrophie oder gar Krebs äußern (Lukong *et al.*, 2008; Cooper *et al.*, 2009).

Die verantwortlichen Schlüsselfaktoren der posttranskriptionellen Regulation sind RNA-bindende Proteine (RBPs). RBPs sind eine heterologe Gruppe von Proteinen, welche sowohl in Pro- als auch Eukaryoten vorkommen (Mansfield und Keene, 2009). Eukaryotische Organismen besitzen eine Vielzahl an RBPs. So kodieren laut bioinformatischer Vorhersagen beispielsweise 10% der Protein-kodierenden Gene der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* für RNA-bindende Proteine. Im Falle des Fadenwurms *Caenorhabditis elegans* und der Taufliege *Drosophila melanogaster* sind circa 2% der kodierten Proteine als „RNA-bindend“ annotiert (Glisovic *et al.*, 2008; Imig *et al.*, 2012).

Charakteristisch für RBPs ist das Vorhandensein von RNA-bindenden Domänen (RBDs). Es existiert eine Vielzahl unterschiedlicher RBDs, von denen jedoch bislang nur ein geringer Anteil detailliert untersucht wurde (Müller-McNicoll und Neugebauer, 2013). Häufig vorkommende und ausführlich charakterisierte RBDs sind die RRM (*RNA recognition motif*)-Domäne, die KH (*hnRNP K-homology*)-Domäne und die Pumilio-Homologie-Domäne (Clery *et al.*, 2008; Valverde *et al.*, 2008; Auweter *et al.*, 2006). In den letzten Jahren wurde eine Vielzahl neuartiger RBPs identifiziert, die unter anderem auch bislang unbekannte RBDs enthielten (Castello *et al.*, 2012; Baltz *et al.*, 2012; Scherrer *et al.*, 2010; Tsvetanova *et al.*, 2010). Interessanterweise stellte sich heraus, dass sich unter den neu identifizierten RBPs ebenfalls Enzyme befanden, welche folglich in Zellen eine duale Funktion einzunehmen scheinen (Scherrer *et al.*, 2010 ; Tsvetanova *et al.*, 2010). Viele RBPs weisen hinsichtlich ihrer Domänenarchitektur einen modularen Aufbau auf. Diese Modularität ermöglicht die innerhalb von RBPs beobachtete funktionelle Diversität, da neben mehreren RBDs viele dieser Proteine noch zusätzliche akzessorische Domänen besitzen (Glisovic *et al.*, 2008 ; Müller-McNicoll und Neugebauer, 2013).

In eukaryotischen Zellen liegen mRNA-Moleküle stets zusammen mit RBPs als *messenger* Ribonukleoproteine (mRNPs) verpackt vor, wodurch eine breite Interaktionsfläche für weitere

trans-wirkende Faktoren geschaffen wird (Müller-McNicoll und Neugebauer, 2013). Die Interaktion zwischen RBP und mRNA erfolgt dabei über *cis*-wirkende regulatorische Elemente der mRNA. Aufgrund der stetigen Assoziation mit mRNAs werden durch RBPs alle Schritte im Lebenszyklus eines mRNA-Moleküls reguliert. Im Zellkern sind RBPs an Prozessen wie Transkription, Bildung der 5' Kappe, Spleißen, Prozessierung der 3' Enden und Kernexport der mRNAs beteiligt (Rougemaille *et al.*, 2008 ; Müller-McNicoll und Neugebauer, 2013). Nach dem Transport der mRNA in das Zytoplasma üben RBPs auch direkten Einfluss auf die Lokalisation, Translation und den Abbau der gebundenen mRNA-Moleküle aus (Glisovic *et al.*, 2008 ; Halbeisen *et al.*, 2008 ; Kong und Lasko, 2012 ; Müller-McNicoll und Neugebauer, 2013). Die Genexpression in Organismen kann somit durch RBPs auf sehr vielfältige Weise moduliert werden.

1.2 RBPs und mRNA-Lokalisation

Die Etablierung der Zellpolarität während der Entwicklung und Differenzierung von Organismen ist ein kritischer Prozess, da hierdurch maßgeblich der Ablauf weiterer Entwicklungsprozesse, wie z.B. Zellteilung oder Zelltypdifferenzierung, gesteuert werden. Eine Voraussetzung für die Polarisierung von Zellen ist die Etablierung einer intrazellulären Asymmetrie (Thompson, 2013). Hierbei spielen mRNA-Lokalisationsprozesse bei der Etablierung asymmetrischer Gradienten von Morphogenen eine wichtige Rolle (Martin und Ephrussi, 2009 ; Medioni *et al.*, 2012). So weisen z.B. während der Embryogenese von *D. melanogaster* die mRNAs von 70% der mehr als 3.000 exprimierten Gene eine distinkte subzelluläre Lokalisation auf (Lecuyer *et al.*, 2007). Die Lokalisation von mRNAs bietet Zellen mehrere Vorteile. Zum einen wird es Zellen hierdurch ermöglicht, die Synthese bestimmter Proteine räumlich zu begrenzen und zum anderen wird zusätzlich eine schnelle Antwort auf sich ändernde Umweltbedingungen gewährleistet. Des Weiteren erscheint die lokale Proteinsynthese anhand der vielfachen Translation lokalisierter mRNA ökonomischer als der gezielte Transport mehrerer Proteine (Doyle und Kiebler, 2011 ; Medioni *et al.*, 2012). Die subzelluläre Lokalisation von mRNAs kann auf drei verschiedenen Wegen gewährleistet werden: (1) durch selektive und lokale Stabilisierung gebundener mRNAs, (2) durch lokale Verankerung diffundierender mRNAs und (3) durch gerichteten mRNA-Transport (Medioni *et al.*, 2012). Lokalisationsprozesse basieren hierbei auf der Interaktion zwischen RBPs und *cis*-wirkenden Lokalisationselementen (LE), den sogenannten „zipcodes“ (Postleitzahlen) innerhalb der mRNA (Jambhekar und Derisi, 2007 ; Martin und Ephrussi, 2009). Viele dieser LEs liegen in der 3' untranslatierten Region (UTR) lokalisierter mRNAs, sind aber nicht ausschließlich auf diese Region begrenzt (Jambhekar und Derisi, 2007 ; Martin und Ephrussi, 2009).

Die Lokalisation der mRNA des Hitzeschock-Proteins Hsp38 in *D. melanogaster* am

posterioren Pol des Embryos basiert beispielsweise auf selektiver Stabilisierung (Bashirullah *et al.*, 2001). Der Abbau der *hsp38* mRNA findet dabei im gesamten Zytoplasma mit Ausnahme des posterioren Polplasmas statt (Martin und Ephrussi, 2009). Das RBP Smaug, ein Hauptregulator der maternalen mRNA-Destabilisierung nach Eizellaktivierung, initiiert den Abbau der *hsp38* mRNA durch Rekrutierung des CCR4/Not-Deadenlyasekomplexes (Semotok *et al.*, 2005 ; Tadros *et al.*, 2007). Der Abbau und die Stabilisierung der *hsp38* mRNA werden dabei durch regulatorische Elemente in der 3'UTR der mRNA vermittelt (Bashirullah *et al.*, 1999 ; Martin und Ephrussi, 2009).

Die Lokalisation der *nanos*, *gcl* (*germ cell-less*) und *Cyclin B* mRNA im Polplasma von *D. melanogaster* Embryos erfolgt dagegen durch lokale Verankerung der diffundierenden mRNAs (St Johnston, 2005). Die lokale Verankerung der *nanos* mRNA erfordert dabei ein intaktes Aktin-Zytoskelett (Forrest und Gavis, 2003).

Der überwiegende Anteil lokalisierter Transkripte wird jedoch aktiv entlang des Zytoskeletts transportiert (Medioni *et al.*, 2012). Aktiver mRNA-Transport wurde bislang in Neuronen (Doyle und Kiebler, 2011), während der Embryonalentwicklung von Tieren, in Pflanzen und in Pilzen untersucht (Crofts *et al.*, 2005 ; Heym und Niessing, 2012 ; Medioni *et al.*, 2012 ; Vollmeister *et al.*, 2012b). Der aktive mRNA-Transport basiert dabei auf mehreren Schritten. (1) Transportierte mRNAs werden über Lokalisationselemente spezifisch durch RBPs gebunden und (2) werden zusammen mit diesen in mRNPs (*messenger* Ribonukleoproteinpartikel) verpackt. (3) Anschließend findet der spezifische Transport der mRNPs durch Motorproteine entlang des Zytoskeletts statt. (4) Nach Erreichen des Zielorts werden mRNAs entladen und translatiert.

Ein gut untersuchtes Beispiel des mRNA-Transports ist die Aktin-abhängige Lokalisation der *ASH1* mRNA in Tochterzellen während der mitotischen Zellteilung in *S. cerevisiae*. Dies führt in den Tochterzellen zu einer lokalen Translation von Ash1p, dem Inhibitor des Paarungstypwechsels. Durch die Ash1p-vermittelte Inhibition der HO-Endonuklease wird in Tochterzellen der Wechsel des Paarungstyps verhindert (Heym und Niessing, 2012). Im Zellkern der Mutterzelle wird die *ASH1* mRNA durch das RBP She2p gebunden. Nach dem Export aus dem Zellkern interagiert der She2p-*ASH1* mRNA-Komplex im Zytoplasma mit dem Motorprotein enthaltenden Myo4p-She3p-Subkomplex (Kruse *et al.*, 2002). Das Typ V Myosin Myo4p ist für den Transport entlang des Aktinzytoskeletts verantwortlich (Kruse *et al.*, 2002 ; Heym und Niessing, 2012). Die Interaktion zwischen She2p und Myo4p wird durch das Adapterprotein She3p vermittelt (Heym und Niessing, 2012). Interessanterweise wird die *ASH1* mRNA durch She2p und She3p synergistisch gebunden (Müller *et al.*, 2011). Neben She2p wird die *ASH1* mRNA zusätzlich durch weitere Faktoren wie Puf6p und Khd1p gebunden, welche die Repression der Translation während des Transports regulieren (Irie *et al.*, 2002 ; Gu *et al.*, 2004).

Gerichteter mRNA-Transport findet auch entlang des polarisierten Mikrotubulizytoskeletts statt. Hierbei wird der Transport in Richtung der Mikrotubuli-Minus-Enden durch Dyneine und zum Plus-Ende durch Kinesine vermittelt (St Johnston, 2005). In *D. melanogaster* ist während der Embryogenese die Lokalisation der *gurken* mRNA, welche für ein TGF α -ähnliches (*transforming growth factor α*) Protein kodiert, für die Ausbildung der dorso-ventralen Polaritätsachse des Embryos erforderlich. Die Lokalisation der *gurken* mRNA in den dorso-anterioren Bereich der Oozyte wird hierbei durch Dynein vermittelt (Martin und Ephrussi, 2009 ; Medioni *et al.*, 2012). Ein weiteres, gut untersuchtes Beispiel ist die durch Dynein vermittelte apikale Lokalisation von *pair-rule* mRNAs, wie *hairy* oder *runts*, in der frühen Embryogenese von *D. melanogaster*. Die korrekte Lokalisation dieser mRNAs ist für die Segmentierung des Embryos erforderlich (St Johnston, 2005 ; Martin und Ephrussi, 2009 ; Medioni *et al.*, 2012). Als Adapter zwischen den jeweiligen LEs und dem Motorprotein Dynein wurden zwei Proteine, Bicaudal-D (BicD) und Egalitarian (EGL), identifiziert (St Johnston, 2005 ; Dienstbier *et al.*, 2009 ; Martin und Ephrussi, 2009). Ein Beispiel für zum Plusende gerichteten mRNA-Transport ist die Kinesin-1-abhängige Lokalisation der *oskar* mRNA entlang eines schwach polarisierten Mikrotubulizytoskeletts am posterioren Pol der Oozyte in *D. melanogaster* (Zimyanin *et al.*, 2008). Dieser Vorgang wird durch das RBP Staufen vermittelt und ist für die Festlegung der anterior-posterioren Polaritätsachse des Embryos essentiell (St Johnston, 2005).

Der Transport von mRNA spielt in mehrzelligen Organismen auch eine wichtige Rolle in der Entwicklung des zentralen Nervensystems, der Plastizität von Synapsen, sowie bei Lern- und Erinnerungsprozessen (Doyle und Kiebler, 2011 ; Medioni *et al.*, 2012). Ein Beispiel ist die dendritische Lokalisation der *CAMK2A* mRNA, welche die CaMKII α -Untereinheit der Ca²⁺/Calmodulin-Kinase II kodiert (Doyle und Kiebler, 2011). Deren Lokalisation in Dendriten wird durch das RNA-bindende Protein FMRP (*fragile-x mental retardation protein*) vermittelt, welches mit Motorkomplexen des Mikrotubulizytoskeletts interagiert und bidirektional entlang von Mikrotubuli transportiert wird (Dichtenberg *et al.*, 2008 ; Bianco *et al.*, 2010 ; Doyle und Kiebler, 2011). Beispielsweise wird in *D. melanogaster* der Transport des FMRP-Homologs dFMR durch zytoplasmatisches Dynein und Kinesin-1 vermittelt (Ling *et al.*, 2004). mRNA-Lokalisation stellt somit einen konservierten regulatorischen Prozess dar, der sowohl in einzelligen als auch mehrzelligen Organismen eine essentielle Rolle einnimmt.

1.3 Posttranskriptionelle Regulation der pathogenen Entwicklung von *Ustilago maydis*

Der Modellorganismus *Ustilago maydis* ist ein fakultativ biotropher, phytopathogener Basidiomycet, welcher spezifisch Mais und dessen Urform Teosinte infiziert (Abb. 1 A; Bölker, 2001). Neben der Pflanzenpathogenität dient dieser Pilz als wichtiger Modellorganismus für zellbiologische Fragestellungen (Steinberg und Perez-Martin, 2008 ; Dean *et al.*, 2012 ; Vollmeister *et al.*, 2012a).

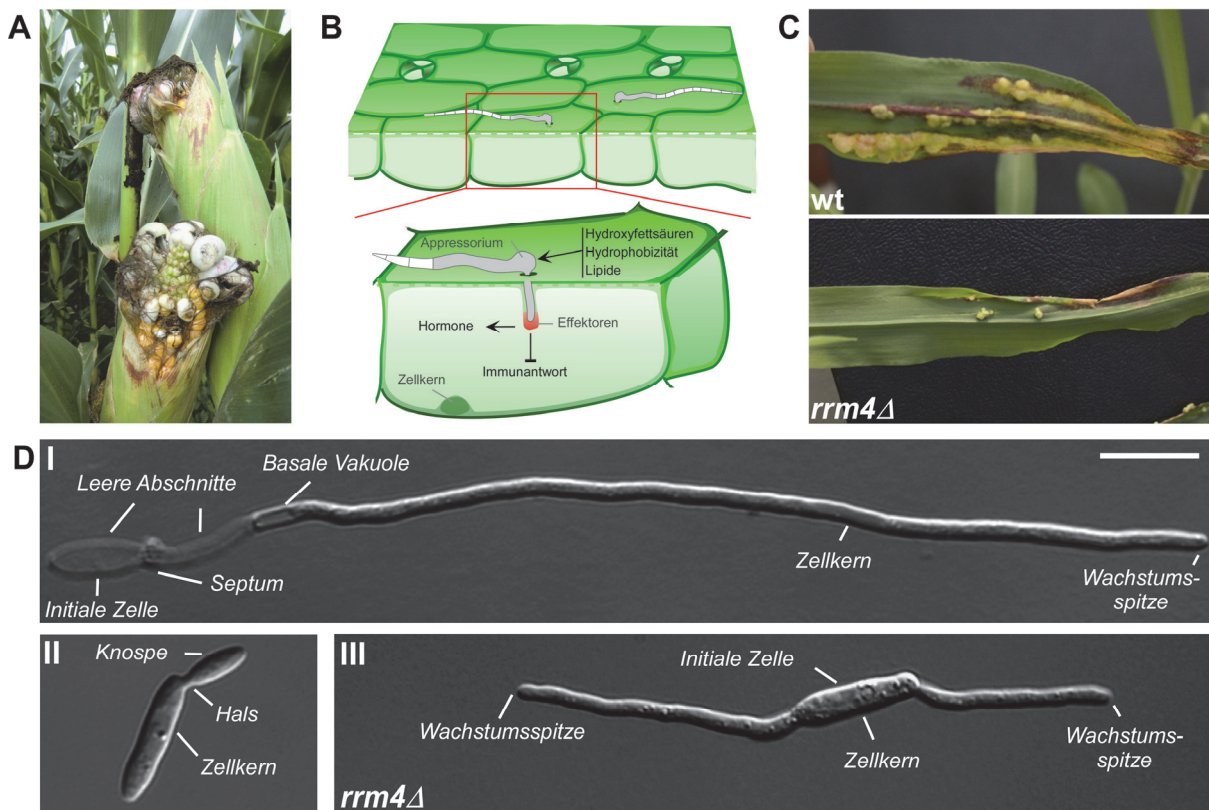


Abbildung 1: Das RBP Rrm4 als posttranskriptioneller Regulator der pathogenen Entwicklung von *U. maydis*

(A) Infizierter Maiskolben mit charakteristischen Krankheitssymptomen. *U. maydis* induziert die Bildung von Pflanzengallen (Tumoren), in denen die Bildung melanisierter Sporen stattfindet. (B) Schematische Darstellung der Infektion durch *U. maydis* Filamente auf der Blattoberfläche. Die Ausbildung von Appressorien nach Wahrnehmung spezifischer Pflanzensignale ermöglicht das Eindringen von Filamenten in die Pflanze. Die biotrophe Interaktionsfläche zwischen Wirtspflanze und Parasit wird durch die Sekretion von Effektoren etabliert. Unter anderem werden hierdurch die hormonelle Signaltransduktion beeinflusst und die Immunantwort der Wirtspflanze effizient unterdrückt. (C) Die Deletion von *rrm4* äußert sich in einer verminderten Virulenz. Abgebildet sind Blätter von infizierten Maissprößlingen. (D) *U. maydis* wechselt im Laufe seines Lebenszyklus zwischen hefeartigem und filamentösem Wachstum (I) Unipolar auswachsendes Filament des Laborstamms AB33. Filamente wachsen durch Spitzenerweiterung unipolar aus und ziehen am basalen Ende Septen ein, was zur Ausbildung von leeren Abschnitten führt. (II) Sporide des Laborstamms AB33. Die Zellen vermehren sich hefeartig durch Knospung. (III) Die Deletion von *rrm4* in AB33 resultiert in einer erhöhten Rate bipolar auswachsender Filamente. Die Abbildung ist modifiziert nach: (B und D): Vollmeister *et al.*, 2012a; (C): Becht *et al.*, 2005.

Die pathogene Entwicklung dieses Pilzes ist eng mit dessen sexueller Reproduktion und einem damit verbundenen dimorphen Wechsel zwischen hefeartigem und filamentösem Wachstum verknüpft (Brefort *et al.*, 2009 ; Vollmeister *et al.*, 2012a). Außerhalb der Pflanze

existiert der Pilz in Form von apathogenen haploiden Zellen, den Sporidien, welche sich hefeartig durch Knospung vermehren. Die infektiöse Form wird durch die Fusion kompatibler Paarungspartner auf der Pflanzenoberfläche induziert und resultiert in der Bildung dikaryotischer, unipolar auswachsender Filamente (Brefort *et al.*, 2009 ; Vollmeister *et al.*, 2012a). Die Penetration der Pflanzenoberfläche erfolgt, nach Wahrnehmung pflanzlicher Signale wie Hydrophobizität, Lipiden und Hydroxyfettsäuren, durch Ausbildung einer spezialisierten Struktur, dem Appressorium (Abb. 1 B, Klose *et al.*, 2004 ; Brefort *et al.*, 2009 ; Mendoza-Mendoza *et al.*, 2009 ; Vollmeister *et al.*, 2012a). Anhand der Sekretion einer großen Anzahl von Effektoren können infiltrierende Filamente im Wirtsgewebe effektiv eine biotrophe Interaktionsfläche zwischen Parasit und Wirt aufbauen (Brefort *et al.*, 2009 ; Djamei und Kahmann, 2012 ; Vollmeister *et al.*, 2012a). Diese komplexe biotrophe Interaktion ist gekennzeichnet durch die frühe Unterdrückung der Immunantwort des Wirtes sowie der metabolischen Umprogrammierung des infizierten Gewebes (Doehlemann *et al.*, 2008 ; Djamei *et al.*, 2011 ; Vollmeister *et al.*, 2012a).

In den letzten Jahren wurde gezeigt, dass die Regulation der pathogenen Entwicklung von *U. maydis* auch auf posttranskriptioneller Ebene stattfindet (Vollmeister und Feldbrügge, 2010). Der Verlust der RNA-bindenden Proteine Rrm4 und Khd4 führt zu einer verminderten Virulenz des Pilzes (Abb. 1 C; Becht *et al.*, 2005 ; Vollmeister *et al.*, 2009). Darüber hinaus weisen *khd4*-Deletionsstämme während des sporidialen Wachstums eine gestörte Zellmorphologie sowie einen Zytokinesedefekt auf, wobei die Rolle des kodierten Proteins noch unbekannt ist (Becht *et al.*, 2005 ; Becht *et al.*, 2006 ; Vollmeister *et al.*, 2009). Die Deletion von *rrm4* hingegen äußert sich in einem Verlust des unipolaren Wachstums in Filamenten (Abb. 1 D-III; Becht *et al.*, 2005).

Der morphologische Wechsel zwischen hefeartigem und filamentösem Wachstum kann in einem genetisch modifizierten Stamm paarungsunabhängig induziert werden. Der für die Induktion des filamentösen Wachstums benötigte heterodimere b-Transkriptionsfaktor steht im Laborstamm AB33 unter der Kontrolle des P_{nar} Promotors. Dieser Promotor wird durch Ammonium reprimiert und in Anwesenheit von Nitrat induziert, was die Induktion des filamentösen Wachstums durch einen Wechsel der Stickstoffquelle ermöglicht (Brachmann *et al.*, 2001). Die Deletion von *rrm4* in AB33 äußert sich in einer gestörten Etablierung der Zellpolarität, was sich anhand der erhöhten Rate bipolar auswachsender Filamente zeigt (Abb. 1 D-III; Becht *et al.*, 2006). Es gibt zunehmend Hinweise darauf, dass auch in weiteren pathogenen Pilzen Pathogenität auf posttranskriptioneller Ebene durch RBPs reguliert wird. So werden z.B. Virulenz und Entwicklung des Reispathogen *Magnaporthe oryzae* durch die Deletion des RNA-bindenden Proteins RBP35 gestört. Das Protein konnte als neue Hilfskomponente der Polyadenylierungsmaschinerie in filamentösen Pilzen identifiziert werden (Franceschetti *et al.*, 2011). In dem Pathogen *Fusarium graminearum* wiederum

wurden Hunderte von Genen identifiziert, deren Transkripte alternativ gespleißt werden (Zhao *et al.*, 2013).

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

Rrm4 wurde in einer bioinformatischen Analyse aufgrund seiner Domänenarchitektur als RBP identifiziert. Als ELAV-ähnliches (*embryonic lethal, abnormal vision*) Protein besitzt Rrm4 drei N-terminale RRM-Domänen. Zusätzlich weist Rrm4 eine C-terminale MLLLE-Domäne auf (**Mademoiselle**, ehemals als PABC-Domäne, *poly A-binding protein c-terminal domain*, bekannt; Becht *et al.*, 2005 ; Clery *et al.*, 2008 ; Kozlov *et al.*, 2010). Innerhalb von Sporidien und Filamenten lokalisiert Rrm4 in mRNPs, welche bidirektional entlang des Mikrotubulizytoskeletts transportiert werden (Abb. 2 A; Becht *et al.*, 2006). Der Transport von mRNAs durch Rrm4 wurde anhand der Kolokalisation des Poly(A)-bindenden Proteins Pab1 mit diesem RBP nachgewiesen. Darüber hinaus impliziert die Rrm4-abhängige Lokalisation von Pab1 in den bidirektional transportierten mRNPs Rrm4 als Schlüsselfaktor des Mikrotubuli-abhängigen mRNA-Transports in *U. maydis* (König *et al.*, 2009). Der Transport von Rrm4 wird hierbei durch die Motorproteine Kinesin-3 und Dynein vermittelt. Interessanterweise erfolgt dabei der Transport von Rrm4-positiven mRNPs mit Hilfe von Endosomen. Dies zeigt sich durch die *in vivo* Kolokalisation von Rrm4 mit den endosomalen Proteinen, dem t-SNARE Protein Yup1 sowie der kleinen GTPase Rab5a. Zudem erweist sich der Rrm4-Transport als abhängig von funktionellen Yup1-positiven Endosomen (Baumann *et al.*, 2012).

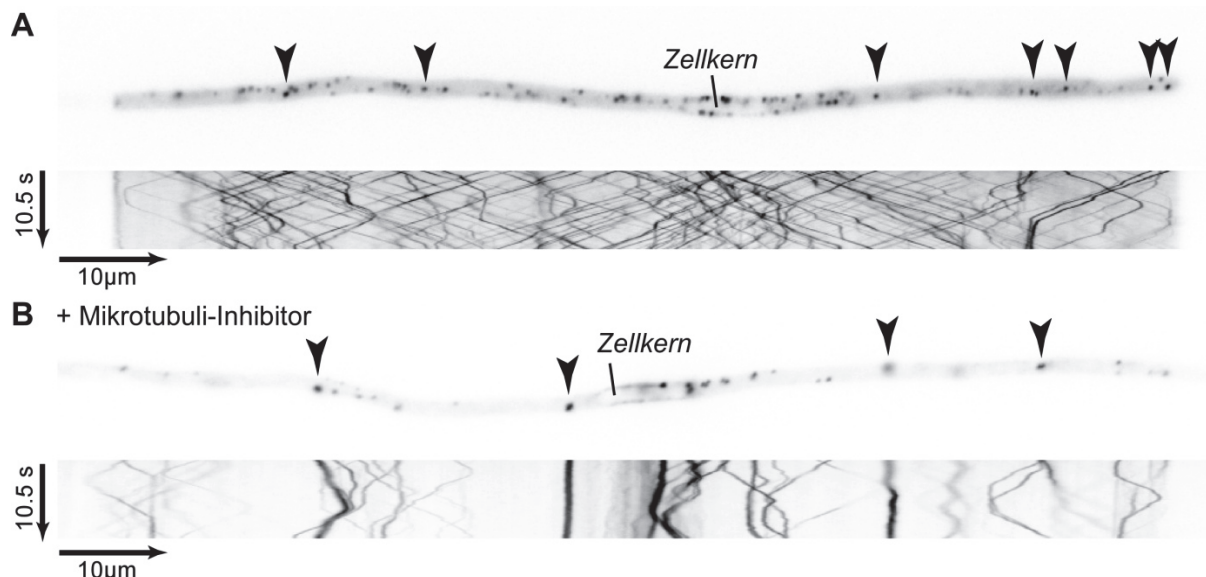


Abbildung 2: Mikrotubuli-abhängiger Transport von Rrm4

(A) Das Fusionsprotein Rrm4G akkumuliert in Partikeln die bidirektional transportiert werden. Die Bewegung von Rrm4G-Partikeln ist in Form eines Kymographen abgebildet. Schwarze Pfeilköpfe markieren einzelne Rrm4G-Partikel. (B) Die Zugabe des Mikrotubuli-Inhibitors Benomyl verhindert den bidirektionalen Transport von Rrm4G-Partikel. Die schwarzen Pfeilköpfe markieren einzelne Rrm4G-Partikel (aus Vollmeister *et al.*, 2012).

CLIP (*in vivo* UV-crosslinking and immunoprecipitation; UV-Quervernetzung und Immunopräzipitation)-Experimente zeigten die RNA-Bindung von Rrm4 und identifizierten insgesamt 55 potentielle Ziel-mRNAs (siehe unten; Becht *et al.*, 2006 ; König *et al.*, 2009). Die identifizierten mRNAs kodieren für Proteine, welche unter anderem an der Proteinsynthese, der Endozytose und der Funktion von Mitochondrien beteiligt sind. Die Interaktion von Rrm4 mit zwei identifizierten Ziel-mRNAs *ubi1* und *rho3*, welche für das natürliche Fusionsprotein Ubiquitin-Rpl40 und die GTPase Rho3 kodieren, konnte anhand von FISH (*fluorescence in situ hybridization*) und Echtzeit-RNA-Visualisierungsexperimenten bestätigt werden. Die Anzahl der in den FISH-Experimenten beobachteten *ubi1* und *rho3* mRNA-enthaltenden Partikel, sowie deren Prozessivität erwiesen sich dabei als Rrm4-abhängig. Als mögliches Bindemotiv wurden CA-reiche Sequenzen identifiziert, welche auch in den beiden mRNAs vorkommen. Die *ubi1* 3'UTR ist zudem in der Lage, den Rrm4-abhängigen mRNA-Transport einer nicht transportierten mRNA zu vermitteln (Brachmann *et al.*, 2004b ; König *et al.*, 2009).

Auf Proteom-Ebene wurden in DIGE (*difference gel electrophoresis*)-Experimenten weitere potentiell durch Rrm4 regulierte Proteine identifiziert, darunter einige mitochondrielle Proteine und die Chitinase Cts1 (Koepeke *et al.*, 2011). Bisher konnte jedoch nicht geklärt werden, ob bei diesen Proteinen die Rrm4-abhängige mRNA-Lokalisation eine Rolle für die Proteinlokalisierung und/oder -funktion spielt. Interessanterweise ist der Mikrotubuli-abhängige Transport von Rrm4 an der unkonventionellen Sekretion von Cts1 beteiligt (Koepeke *et al.*, 2011 ; Stock *et al.*, 2012). Die Sekretion von Cts1 wird durch die Deletion von *rrm4* in *U. maydis*-Filamenten beeinträchtigt (Koepeke *et al.*, 2011). Der genaue Mechanismus der Regulation der Zellpolarität und Pathogenität durch den Rrm4-abhängigen mRNA-Transport konnte in den bisherigen Studien nicht geklärt werden. Insbesondere der Umfang der bisher durchgeführten CLIP-Experimente ist zu gering, um einen transkriptomweiten Überblick über gebundene mRNAs zu verschaffen und deren Bindestellen detailliert aufzulösen.

1.5 Die Identifizierung gebundener RNA-Moleküle durch *in vivo* UV-Quervernetzungsexperimente

Durch Proteine gebundene RNA-Moleküle können, anhand von RNA-Immunopräzipitationsexperimenten (RIP), isoliert und identifiziert werden. In der CLIP-Methode wird zusätzlich UV-Strahlung als quervernetzende Agens eingesetzt, um gebundene RNA-Moleküle kovalent an Proteine quervernetzen (Ule *et al.*, 2003 ; Ule *et al.*, 2005). Diese Methode beruht auf der natürlichen Photoreaktivierbarkeit von Basen, insbesondere Pyrimidinen und spezifischen Aminosäuren, wie Cystein, Lysin, Phenylalanin, Tryptophan und Tyrosin, bei einer Wellenlänge von 254 nm (Greenberg, 1979 ; Hockensmith *et al.*, 1986 ; Ule *et al.*, 2005). Im Vergleich zu einer chemischen Quervernetzung durch

Formaldehyd oder ähnliche Substanzen, werden durch UV-Bestrahlung nur direkt gebundene RNA-Moleküle kovalent an Proteine gebunden (Greenberg, 1979 ; Ule *et al.*, 2005). Quervernetzte RNA-Moleküle können anschließend aus aufgereinigten Protein-RNA Komplexen isoliert werden (Ule *et al.*, 2003; Ule *et al.*, 2005). Anhand der CLIP-Methode war es beispielsweise möglich, durch den Spleißfaktor Nova regulierte RNA-Netzwerke im Gehirn zu identifizieren. Die Experimente bestätigten die Interaktion von Nova mit dem Motiv YCAY (Y steht für eine beliebige Pyrimidinbase) und die Nova-abhängige Regulation des alternativen Spleißens für einige der identifizierten Kandidaten (Ule *et al.*, 2003). Aufgrund von experimentellen Beschränkungen, wie dem Sequenzieren einzelner Klone mittels Sanger-Sequenzierung, konnten jedoch keine gesättigten Analysen durchgeführt werden, so dass eine transkriptomweite Identifizierung gebundener RNA-Moleküle nicht möglich war. Anhand der Implementierung neuer Sequenziermethoden (*next-generation sequencing*) ist es nun jedoch durch Methoden wie HITS-CLIP (*high-throughput sequencing* CLIP, CLIP-seq; Licatalosi *et al.*, 2008 ; Yeo *et al.*, 2009), PAR-CLIP, (*photoactivatable-ribonucleoside-enhanced* CLIP; Hafner *et al.*, 2010) oder iCLIP (*individual nucleotide resolution* CLIP; König *et al.*, 2010) möglich, gebundene RNA-Moleküle transkriptomweit zu identifizieren.

Neben der umfangreichen Identifizierung gebundener mRNAs ermöglichen es die neuen CLIP-basierten Methoden zudem die Bindestellen hochauflösend darzustellen (König *et al.*, 2011). Die iCLIP-Methode ist in der Lage die RNA-Bindung auf der Ebene einzelner Nukleotide zu analysieren (König *et al.*, 2010 ; Sugimoto *et al.*, 2012). In CLIP-Experimenten terminiert während der reversen Transkription, aufgrund von kovalent verknüpften Polypeptidresten des quervernetzten RBPs die Reverse Transkriptase, häufig vorzeitig an Quervernetzungsstellen (König *et al.*, 2010). Dies führt dazu, dass der Großteil der revers transkribierten, einzelsträngigen cDNA-Moleküle an der Position der Quervernetzungen endet (Sugimoto *et al.*, 2012). Im Gegensatz zu CLIP ermöglicht iCLIP durch eine Anwendung des Prinzips der Selbstzirkularisierung einzelsträngiger cDNA die Aufreinigung dieser verkürzten cDNA-Moleküle. Da die Mehrzahl der isolierten Sequenzen den vorzeitig terminierten cDNA-Molekülen entspricht, können Bindestellen durch Quantifizierung der aufgereinigten Sequenzen hochauflösend auf der Ebene einzelner Nukleotide dargestellt werden. Dies wird durch die zufällige Kodierung der isolierten cDNA-Sequenzen anhand eines Barcode-enthaltenden Adapters ermöglicht (Abb. 3; König *et al.*, 2010; König *et al.*, 2011). Mittels dieser Methode wurde die Beteiligung des RBP hnRNP C an Spleißprozessen in menschlichen Zellen untersucht. Anhand der hoch auflösenden Daten wurden U-reiche Bindestellen für hnRNP C identifiziert, die zudem in definierten Abständen von ~165 und 300 Nukleotiden (nt) zueinander lagen und mit zuvor beschriebenen Modellen der hnRNP C-Partikelbildung übereinstimmten (König *et al.*, 2010).

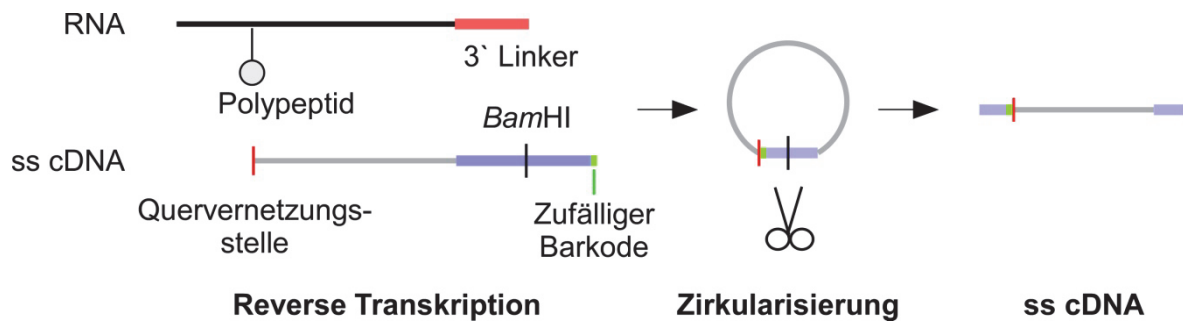


Abbildung 3: Identifizierung von Quervernetzungsstellen durch iCLIP

Bei UV-Quervernetzungsexperimenten terminiert die Reverse Transkriptase aufgrund von Polypeptidresten an der Stelle der Quervernetzung. Im Vergleich zur CLIP-Methode, kann die iCLIP-Methode diese verkürzten einzelsträngigen (ss: *single stranded*) cDNA-Moleküle, durch die Anwendung des Prinzips der Selbstzirkularisierung, aufreinigen. Der Großteil der aufgereinigten Moleküle kartiert an Quervernetzungsstellen (roter Strich). Der Einsatz eines zufällig kodierten Adapters (Adapter: blauer Balken; zufälliger Barcode: grüner Balken) ermöglicht die spätere Quantifizierung der aufgereinigten cDNA-Moleküle. Innerhalb des Adapters liegt eine Schnittstelle eines Restriktionsenzym (Schere), wodurch zirkularisierte cDNA-Moleküle wieder linearisiert und an beiden Enden durch Adaptersequenzen flankiert werden. Dies erlaubt die anschließende Amplifikation mittels der Polymerasekettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR). Zudem stellen die ersten Nukleotide der zu amplifizierenden cDNA-Moleküle der zufällige Barcode und das quervernetzte Nukleotid dar. Die Abbildung ist modifiziert nach König *et al.*, 2010).

1.6 Zielsetzung dieser Arbeit

Bislang wurde noch nicht geklärt, wie der Rrm4-vermittelte mRNA-Transport an der Regulation der Zellpolarität und der pathogenen Entwicklung von *U. maydis* beteiligt ist. Eine geringe Anzahl gebundener Transkripte konnte bislang identifiziert werden, aber der bisher durchgeführte CLIP-Ansatz war nicht gesättigt und konnte, experimentell bedingt, nicht transkriptomweit durchgeführt werden (König *et al.*, 2009). Eine Identifizierung aller durch Rrm4-gebundenen mRNAs war somit nicht möglich. Es konnte zudem auch keine direkte Verbindung zwischen Deletionsphänotyp und der Funktion der kodierten Proteine hergestellt werden, so dass die Rolle des Rrm4-vermittelten mRNA-Transports weiterhin unklar bleibt.

Ziel dieser Arbeit war es daher, die Rolle des Rrm4-vermittelten mRNA-Transports in *U. maydis* erstmals auf der transkriptomweiten Ebene zu untersuchen. Zu diesem Zweck sollten transkriptomweit gebundene Ziel-mRNAs von Rrm4 durch zwei unterschiedliche Ansätze identifiziert werden. Zum einen wurden die König *et al.*, (2009) generierten CLIP-Banken mittels Hochdurchsatzsequenzierungsverfahren erneut sequenziert. Zum anderen wurde die verbesserte iCLIP-Methodik in *U. maydis* etabliert und auf Rrm4 angewandt. Anhand der Daten beider Ansätze sollte das Bindeverhalten von Rrm4 sowie die Funktion des Rrm4-vermittelten mRNA-Transports näher analysiert werden. Zu diesem Zweck wurde die RNA/Protein-Interaktion im Detail untersucht und neu identifizierte Kandidaten charakterisiert, um Aufschluss über deren Beteiligung am polaren Wachstum und der

pathogenen Entwicklung in *U. maydis* zu bekommen. Diese Studien sollten es ermöglichen, einen transkriptomweiten Einblick in den Rrm4-vermittelten mRNA-Transport zu bekommen und könnten daher zur Aufklärung dessen Rolle während des filamentösen Wachstums beitragen.

2. Ergebnisse

2.1 Identifizierung neuer Ziel-mRNAs von Rrm4 anhand der Hochdurchsatzsequenzierung existierender CLIP-Banken

Für Rrm4 konnten anhand der CLIP-Methode potentielle Ziel-mRNAs identifiziert werden. Die bisherige Untersuchung der zwei unabhängig voneinander generierten CLIP-Banken war jedoch nicht sättigend, da diese auf der konventionellen Klonierung beider Banken in Vektoren und der anschließenden Sequenzierung einzelner Klone beruhte (Ule *et al.*, 2005 ; König *et al.*, 2009). Eine umfassende Analyse der CLIP-Banken war aufgrund dessen nicht möglich, so dass für Rrm4 bislang nur eine geringe Anzahl an potentiellen Ziel-mRNAs identifiziert werden konnte.

Um einen umfassenderen Überblick über die durch Rrm4 gebundenen Transkripte zu erhalten wurden daher die beiden CLIP-Banken anhand der inzwischen zugänglichen Hochdurchsatzsequenzierungsverfahren im Rahmen dieser Arbeit erneut analysiert. Die Hochdurchsatzsequenzierung erfolgte dabei mithilfe von Kollaborationspartnern (Julian König und Jernej Ule am MRC Laboratory of Molecular Biology, Cambridge, UK). Die experimentelle Vorgehensweise ist schematisch in Abbildung 4 A dargestellt. In die cDNA-Moleküle der beiden CLIP-Banken wurden vor der Sequenzierung mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) die für die Sequenzierung notwendigen Adaptersequenzen integriert, welche im Rahmen der bioinformatischen Auswertung anschließend wieder entfernt wurden (Abb. 4 A, Schritt 1). Die amplifizierten cDNA-Moleküle wurden mittels Illumina-Sequenzierung im Hochdurchsatzverfahren sequenziert und lieferten für die beiden CLIP-Experimente 1 und 2 jeweils 1.290.949 bzw. 7.594.055 Sequenzen. Die bioinformatische Auswertung der erhaltenen Sequenzen erfolgte in Zusammenarbeit mit weiteren Kollaborationspartnern (K. Zarnack und N. Luscombe am EMBL European Bioinformatics Institute, Hinxton, Cambridge, UK). Vor der Kartierung der Sequenzen beider CLIP-Banken wurden alle Adapterregionen der 50 nt langen Sequenzen entfernt, so dass letztlich 24 nt große Sequenzfragmente im *U. maydis*-Genom unter Anwendung des Programms *bowtie* kartiert wurden (Abb. 4 A, Schritt 2; <http://bowtie-bio.sourceforge.net>; Langmead *et al.*, 2009;). Die gewählten Parameter ermöglichten es nur Sequenzen, welche höchstens eine Fehlpaarung und genomweit nur einen Treffer aufwiesen, kartiert zu werden. Anhand dieser Parameter konnten für CLIP-Experiment 1 und 2 jeweils 616.664 bzw. 5.585.696 Sequenzen erfolgreich im *U. maydis*-Genom kartiert werden (Tab. 1). Die somit identifizierten genomischen Regionen wurden als CLIP-Tags bezeichnet (Abb. 4 A, Schritt 2). Für Experiment 1 und 2 konnten auf diese Weise jeweils 1.565 bzw. 1.521 CLIP-Tags identifiziert werden. Die Datensätze der beiden Experimente wurden vereint, wodurch letztlich genomweit insgesamt 2.551 unterschiedliche CLIP-Tags

gefunden wurden.

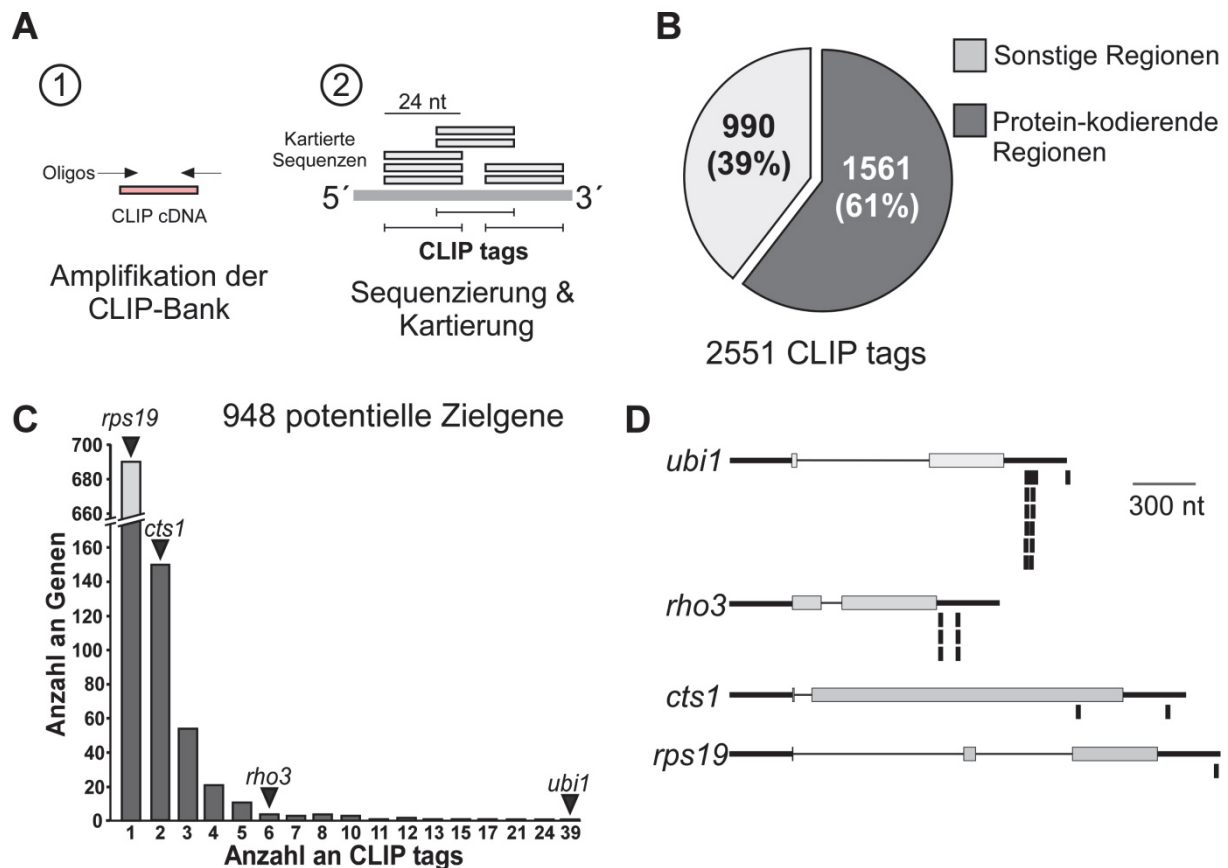


Abbildung 4: Identifizierung neuer Ziel-mRNAs durch HITS-CLIP

(A) Schematische Darstellung der HITS-CLIP Analyse. (1) Die für die Hochdurchsatzsequenzierung benötigten Adaptersequenzen wurden mittels PCR in cDNA-Moleküle der beiden CLIP-Banken eingefügt. (2) Vor dem Kartieren wurden diese Adaptersequenzen wieder entfernt, so dass letztlich genomweit 24 nt lange Sequenzen kartiert werden konnten. Kartierte Sequenzen durften dabei maximal eine Fehlpaarung und nur einen Treffer im Genom aufweisen. Die identifizierten Loci wurden als CLIP-Tags bezeichnet. (B) Verteilung der identifizierten CLIP-Tags auf Protein-kodierende und nicht Protein-kodierende Regionen. Als Protein-kodierende Regionen wurden die annotierten ORFs, sowie die mit jeweils 300 nt manuell definierten 5' und 3'UTRs von mRNAs bezeichnet. Unter „sonstige Regionen“ wurden die übrigen Regionen im Genom zusammengefasst. (C) Verteilung der identifizierten Gene auf die Anzahl an CLIP-Tags pro mRNA. Zuvor identifizierte Kandidaten sind durch schwarze Pfeilköpfe markiert: CLIP-Experimente: *ubi1* und *rho3* (König *et al.*, 2009); DIGE-Analyse: *rps19* und *cts1* (Koepeke *et al.*, 2011). (D) Maßstabsgetreue Darstellung der Position von CLIP-Tags innerhalb der *ubi1*, *rho3*, *cts1* und *rps19* mRNAs. Exons sind als graue Kästen, Introns als dünne Linien und UTRs als dicke Linien abgebildet. CLIP-Tags werden durch schwarze Kästen dargestellt. Im Falle der *ubi1* mRNA sind aus Platzgründen 28 CLIP-Tags als breiter Kasten zusammengefasst. Die mRNAs sind jeweils von links nach rechts in 5'-3' Richtung abgebildet.

Um quervernetzte Sequenzen identifizieren zu können, wurden die CLIP-Tags mit der Genomsequenz von *U. maydis* (MUMDB, *Munich Information Center for Protein Sequences Ustilago maydis data base*; <http://mips.helmholtz-muenchen.de/genre/proj/ustilago>) abgeglichen. Zur Berücksichtigung von nicht translatierten Regionen (UTRs: *untranslated regions*) der mRNAs wurden alle annotierten offenen Leserahmen (ORFs) der Genomsequenz um 300 nt in 5' und 3'-Richtung erweitert. Der experimentell ermittelte Median der 5' und 3'UTR Länge beträgt in beiden Fällen jeweils 114 nt (Vollmeister *et al.*,

2009), so dass der Großteil der UTRs durch die definierte Länge von 300 nt abgedeckt sein sollte. Von den identifizierten CLIP-Tags lagen 61% in Regionen, die als mRNA transkribierte Bereiche annotiert sind, während 39% auf als „sonstige Regionen“ bezeichnete Sequenzbereiche entfielen (Abb. 4 B). Als „sonstige Regionen“ wurden intergenische Bereiche und nicht-kodierende RNAs (*non-coding* RNAs, ncRNAs) zusammengefasst. Rund 4% der CLIP-Tags lagen beispielsweise in Regionen, welche aufgrund von Sequenzvergleichen ribosomaler RNA (rRNA) zugeordnet werden konnten (siehe Anhang, S. 119). Es erscheint daher möglich, dass Rrm4 mit ncRNAs interagiert, was allerdings aufgrund fehlender Annotationen im *U. maydis*-Genom nicht näher untersucht werden konnte. Insgesamt aber bestätigte diese Analyse, dass Rrm4 größtenteils mRNA bindet.

Die Auswertung der in mRNAs liegenden CLIP-Tags ergab, dass insgesamt 948 mRNAs mindestens einen CLIP-Tag besaßen. Dreiviertel dieser Kandidaten besaßen nur einen CLIP-Tag, während lediglich 262 mRNAs mehr als einen CLIP-Tag besaßen (Abb. 4 C). Innerhalb der potentiellen Ziel-mRNAs wurden 46 der 55 im Vorfeld identifizierten Ziel-mRNAs wiedergefunden (König *et al.*, 2009). Unter diesen 46 mRNAs befanden sich die zuvor charakterisierten *ubi1* und *rho3* mRNAs, welche für ein natürliches Fusionsprotein des ribosomalen Proteins Rpl40 und Ubiquitin sowie der GTPase Rho3 kodieren (König *et al.*, 2009). Die *ubi1* mRNA besaß 39 CLIP-Tags, während sechs CLIP-Tags innerhalb der *rho3* mRNA lagen. Die Überlappung der CLIP-Tags der *ubi1* mRNA deutete auf zwei potentielle Bindestellen in der 3' UTR der mRNA hin. Zwei Bindestellen schienen ebenfalls in der 3'UTR der *rho3* mRNA vorzuliegen (Abb. 4 D). Zudem wurden in dieser Analyse Ziel-mRNAs identifiziert, welche zuvor auf Proteomebene in DIGE-Experimenten mit Rrm4 in Verbindung gebracht wurden. Die mRNA der Chitinase Cts1 besaß insgesamt zwei CLIP-Tags, wovon ein CLIP-Tag jeweils im ORF und in der 3'UTR lag. Ein weiterer potentieller, von Rrm4 regulierter Kandidat war das ribosomale Protein Rps19, dessen mRNA einen einzigen CLIP-Tag in der 3'UTR besaß (Abb. 4 D; Koepke *et al.*, 2011).

Zusammenfassend zeigen diese Daten, dass Rrm4 eine sehr große Anzahl an Ziel-mRNAs bindet. Ferner verdeutlichen sie, dass mit Hilfe des Hochdurchsatzsequenzierungsverfahrens eine detaillierte Analyse des Rrm4-vermittelten mRNA-Transports ermöglicht wird, diese aber allerdings nicht gesättigt ist.

2.2 Charakterisierung von potentiellen Bindestellen anhand der HITS-CLIP-Daten

Die bisherigen Daten deuten an, dass Rrm4 die 3'UTR von mRNAs bindet (König *et al.*, 2009). Um festzustellen, ob eine Anreicherung von CLIP-Tags innerhalb einer spezifischen Transkriptregion vorlag, wurde die Verteilung der CLIP-Tags auf die drei Regionen einer mRNA (5'UTR, ORF und 3'UTR) untersucht. CLIP-Tags, welche zwei Regionen überlappten, wurden in diesem Fall doppelt gezählt. Von den insgesamt 1.561 in mRNAs liegenden CLIP-Tags lagen 160 in der 5'UTR (10%), 705 im ORF (42%) und 790 in der 3'UTR (48%) (Abb. 5 A). Von den in den ORFs liegenden CLIP-Tags überschritten sich insgesamt nur 41 CLIP-Tags mit Introns. Da durch *bowtie* nur kontinuierliche Sequenzen im Referenzgenom kartiert wurden, konnten Exon/Exon-Übergänge in dieser Analyse nicht identifiziert werden. Anhand der Normalisierung der Anzahl an CLIP-Tags auf die Gesamtgröße der Regionen zeigte sich jedoch, dass im Vergleich zu der 5'UTR und dem ORF eine deutliche Anreicherung von CLIP-Tags in der 3'UTR vorlag (Abb. 5 B). Um durch unspezifische Interaktionen verursachte Artefakte innerhalb der Daten zu eliminieren, wurde zusätzlich auf die Mindestanzahl an CLIP-Tags pro Ziel-mRNA gefiltert. Die Verteilung von CLIP-Tags innerhalb von mRNAs, welche mindestens zwei bzw. drei CLIP-Tags besaßen, zeigte eine zu der Verteilung von CLIP-Tags innerhalb aller 948 mRNAs vergleichbare Tendenz. CLIP-Tags waren in beiden Fällen in der 3'UTR angereichert, wobei mit steigender Mindestanzahl eine Abnahme an CLIP-Tags im ORF beobachtet wurde (Abb. 5 A und B). Diese Ergebnisse implizieren, dass Rrm4 Transkripte hauptsächlich in der 3'UTR bindet.

Zur Identifizierung eines möglichen Bindemotivs wurden die Sequenzen aller durch CLIP-Tags ermittelten Bindestellen mit Hilfe des Programms MEME (*Multiple Em for Motif elicitation*, <http://meme.nbcr.net/meme/>; Bailey *et al.*, 2009) auf das Vorhandensein konservierter Motive untersucht (Abb. 5 C und D). Aufgrund der geringen Auflösung der Bindestellen, wurden die Sequenzen aller CLIP-Tags um jeweils 100 nt stromauf- und abwärts erweitert. Um eine Überrepräsentierung überlappender CLIP-Tags zu vermeiden, wurden sich überschneidende CLIP-Tags anschließend jeweils in einer einzelnen Sequenz vereint. Die Suche nach einem Bindemotiv erfolgte zunächst unter der Bedingung, dass ein Bindemotiv in allen analysierten Sequenzen vorkommen muss. Unter Berücksichtigung dieses Kriteriums lieferte die MEME-Analyse der 1.170 potentiellen Bindestellen lediglich ein sehr schwaches, kaum konserviertes und aufgrund des hohen E-Wertes statistisch nicht signifikantes CA-angereichertes Bindemotiv (Abb. 5 C). Mit steigender Mindestanzahl an CLIP-Tags stieg die statistische Signifikanz der ermittelten Motive, aber deren Konserviertheitsgrad blieb weiterhin gering. MEME identifizierte innerhalb der Bindestellen von mRNAs mit mindestens drei CLIP-Tags ein sehr schwaches, kaum konserviertes, CA-angereichertes Bindemotiv (Abb. 5 D).

Der geringe Konservierungsgrad der Bindemotive deutete an, dass nur ein geringer Anteil der Bindestellen CA-reiche Sequenzen enthielt. Innerhalb aller potentiellen Ziel-mRNAs identifizierte MEME in 14% (169 von 1.170) der Bindestellen ein stark konserviertes CA-reiches Motiv. Mit steigender Mindestanzahl an CLIP-Tags pro Transkript war jedoch ein Anstieg des prozentualen Anteils an CA-enhaltenen Bindestellen zu beobachten. Bei einer Mindestanzahl von zwei CLIP-Tags pro mRNA wiesen 22% (79 von 350) der potentiellen Bindestellen CA-reiche Sequenzen auf. Im Falle der Mindestanzahl von drei CLIP-Tags pro mRNAs stieg der prozentuale Anteil von CA-enhaltenen Sequenzen auf 24% (18 von 151 potentiellen Bindestellen). Diese Ergebnisse bestätigen die Annahme, dass nur ein geringer Anteil der identifizierten Bindestellen CA-reiche Sequenzen enthält.

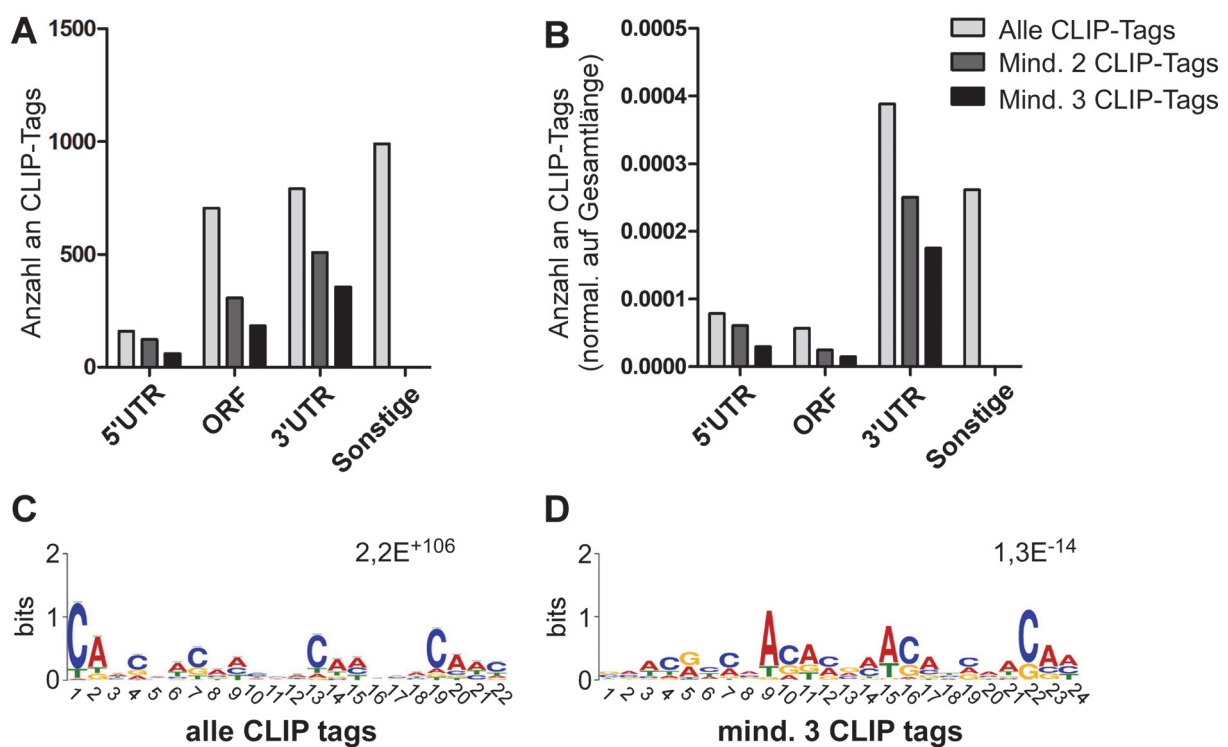


Abbildung 5: Charakterisierung der durch HITS-CLIP identifizierten Bindestellen

(A) Verteilung von CLIP-Tags auf 5'UTR, ORF, 3'UTR sowie „sonstige Regionen“. Abgebildet ist die Gesamtanzahl an CLIP-Tags innerhalb der jeweiligen Regionen für alle Ziel-mRNAs, sowie die auf die Mindestanzahl an CLIP-Tags gefilterten Transkripte (B) Normalisierung der in (A) abgebildeten Verteilung auf die Gesamtlänge der jeweiligen Region (Gesamtanzahl CLIP-Tags/Gesamtlänge Region). (C) Sequenzlogo der MEME-Analyse von in allen Ziel-mRNAs liegenden, potentiellen Bindestellen. (D) Sequenzlogo der MEME-Analyse von Bindestellen in Transkripten mit mindestens drei CLIP-Tags. Die Höhe des Balkens pro Position stellt die Konservierung der Position innerhalb des ermittelten Motivs dar, während die relative Größe der Buchstaben die Frequenz des jeweiligen Nukleotids an dieser Position wiedergibt. Der Erwartungswert (E-Wert) dient als Maß für die statistische Signifikanz des ermittelten Motivs und stellt die Anzahl ähnlich wahrscheinlicher Motive innerhalb eines zufällig generierten Datensatzes dar (MEME: <http://meme.ncr.net/meme/>; Bailey *et al.*, 2009).

Insgesamt konnte kein eindeutiges Bindemotiv in dieser Analyse identifiziert werden. Aufgrund der schwachen Konservierung scheinen die zuvor identifizierten CA-reichen Sequenzen nur für einen geringen Teil der potentiellen Bindestellen möglicherweise relevant zu sein.

2.3 Die Etablierung der iCLIP-Methode in *U. maydis*

Die HITS-CLIP Analyse ermöglichte einen umfangreichen Überblick über das Bindevverhalten von Rrm4, allerdings war die Analyse nicht gesättigt. Zudem war eine detaillierte Auflösung von Bindestellen anhand der erhaltenen HITS-CLIP Daten nicht möglich. Aus diesem Grund wurde daher die weiterentwickelte *in vivo* UV-Quervernetzungsmethode iCLIP anhand von Rrm4 in *U. maydis* etabliert (König *et al.*, 2010).

Für die iCLIP-Experimente wurde wie in den durch König *et al.* (2009) durchgeführten CLIP-Experimenten der Stamm AB33rrm4GT verwendet (Becht *et al.*, 2006). Dieser Stamm exprimiert Rrm4GT, ein Rrm4-Gfp-Fusionsprotein mit C-terminalem TAP-Epitop (*tandem affinity purification*: Tandemaffinitätsaufreinigung) unter Kontrolle des nativen Promotors (Abb. 6 A). Rrm4GT wurde anhand dieses Epitops aufgereinigt, welches sich in N- zu C-terminaler Orientierung, aus einem Calmodulin-bindenden Peptid, einer Schnittstelle der TEV (*tobacco etch virus*)-Protease sowie zwei IgG-bindenden Domänen des Protein A aus *Staphylococcus aureus* zusammensetzt (Rigaut *et al.*, 1999). Die spezifische Aufreinigung des TAP-markierten Proteins erfolgte in zwei Schritten, was aufgrund der Abspaltung der Protein A-Domänen mittels der TEV-Protease in einer nachweisbaren Verringerung des Molekulargewichts des aufgereinigten Proteins im Vergleich zum initialen Vollängen-Protein resultiert (Abb. 6 A und B). Im Rahmen der iCLIP-Experimente wurde die kovalente Quervernetzung von RNA an Protein in AB33rrm4GT Filamenten sechs Stunden nach Induktion des filamentösen Wachstums durch UV-Bestrahlung induziert. Quervernetzte Rrm4GT-RNA-Komplexe wurden aufgereinigt und die quervernetzten RNA-Moleküle am 5'-Ende mit radioaktivem Phosphat markiert. Anschließend wurden die isolierten Rrm4GT-RNA-Komplexe mittels SDS-PAGE (SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese) aufgetrennt und auf eine Membran transferiert (Abb. 6 C; siehe Material und Methoden). Aufgrund des durch die Quervernetzung erhöhten Molekulargewichts wurde das charakteristische, diffuse Signal markierter RNA oberhalb des erwarteten Molekulargewichts von Rrm4GT (118 kDa) beobachtet (Abb. 6 C und 7 A; Becht *et al.*, 2006 ; König *et al.*, 2009).

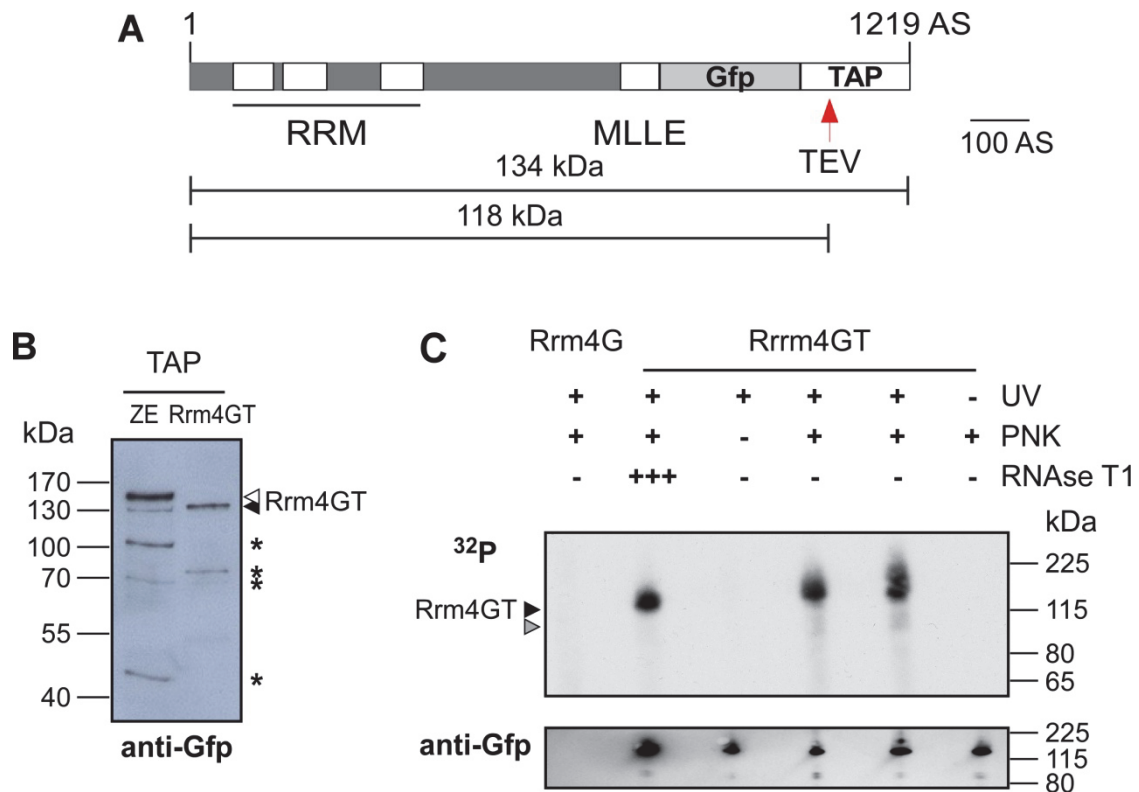


Abbildung 6: *In vivo* UV-Quervernetzung von RNA an Rrm4

(A) Maßstabsgetreue Darstellung von Rrm4GT (Rrm4-Gfp-TAP). Die Position der drei RRM-Domänen, der MLLE-Domäne, des Gfp und des TAP-Epitops innerhalb des Proteins sind entsprechend gekennzeichnet. Die Position der TEV-Schnittstelle wird durch den roten Pfeil markiert. Angegeben ist die Gesamtlänge der Aminosäuresequenz (AS) sowie das Molekulargewicht (kDa) des Vollängen- bzw. des aufgereinigten Proteins. (B) Western-Blot der TAP-Aufreinigung von Rrm4GT. Rrm4GT wurde mittels anti-Gfp-Antikörper detektiert. In der linken Spur wurde Zellextrakt (ZE) und in der rechten Spur aufgereinigtes Rrm4GT aufgetragen. Der weiße Pfeilkopf markiert Vollängen-Rrm4GT, während aufgereinigtes Rrm4GT durch den schwarzen Pfeilkopf markiert wird. Abbaubanden sind durch Sterne gekennzeichnet. (C) *In vivo* UV-Quervernetzung von Rrm4. Die Wellenlänge der eingesetzten UV-Strahlung betrug $\lambda=254$ nm. *Oben*: Autoradiogramm der mit radioaktivem Phosphat markierten RNA (Übernachtbelichtung). Die Quervernetzung von RNA wurde in Abhängigkeit von UV-Strahlung, Polynukleotidkinase (PNK) und RNAse T1 untersucht. RNAse T1 spaltet einzelsträngige RNA spezifisch an Guaninresten (Steyaert, 1997). Der schwarze Pfeilkopf markiert aufgereinigtes Rrm4GT. Durch den grauen Pfeilkopf wird N-terminal verkürztes Rrm4GT gekennzeichnet, welches noch RNA-Bindung im Autoradiogramm aufweist (König, 2008). *Unten*: anti-Gfp Westernblot als Ladekontrolle (jeweils 1/25 der Probe).

Die Quervernetzung von RNA an Rrm4GT wurde anhand von Kontrollexperimenten bestätigt. Das radioaktive Signal erwies sich hierbei als UV-abhängig. Dies zeigte, dass durch UV-Strahlung das radioaktive Signal kovalent an Rrm4 quervernetzt wurde (Abb. 6 C und 7 A). Des Weiteren konnte anhand der Zugabe von RNAse T1 bestätigt werden, dass tatsächlich RNA an Rrm4GT quervernetzt wurde. Nach der Hydrolyse der RNA-Moleküle wiesen die isolierten Protein-RNA-Komplexe ein geringeres Molekulargewicht auf. Hierdurch wurden im Autoradiogramm schärfere Banden beobachtet, welche sich dem Molekulargewicht von Rrm4GT annäherten (Abb. 6 C und 7 A). Darüber hinaus war das radioaktive Signal Nukleotidkinase-abhängig. Hiermit wurde verdeutlicht, dass keine unspezifische

Phosphorylierung von beispielsweise Proteinen vorlag, sondern tatsächlich RNA-Moleküle markiert wurden (Abb. 6 C). Der Einsatz einer höheren UV-Dosis führte zu keiner erhöhten Menge quervernetzter RNA-Moleküle (Abb. 7 A). Um die Rrm4-unabhängige Aufreinigung von RNA-Molekülen auszuschließen, wurde als zusätzliche Kontrolle Rrm4G, einer C-terminalen Fusion von Rrm4 mit Gfp ohne TAP-Epitop (Becht *et al.*, 2006), quervernetzt und aufgereinigt. Erwartungsgemäß wurde hierbei weder Protein noch RNA aufgereinigt (Abb. 6 C, Abb. 7 A und B).

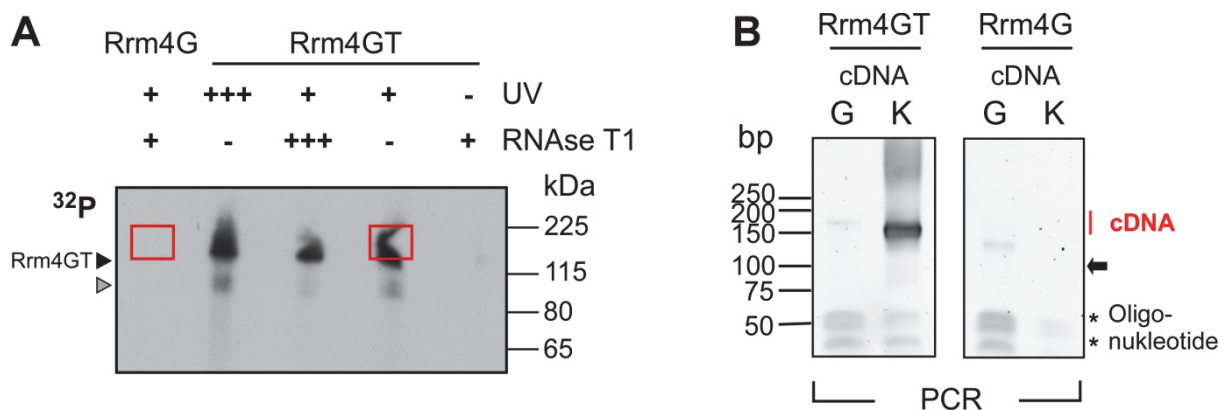


Abbildung 7: Etablierung der iCLIP-Methode anhand von Rrm4 in *U. maydis*

Exemplarische Darstellung von Ergebnissen eines iCLIP-Experiments (Experiment 1). **(A)** ^{32}P -Autoradiogramm der an Rrm4GT UV-quervernetzten RNA. Die roten Kästen markieren die aus der Membran ausgeschnittenen Areale. Als Kontrolle diente Rrm4G. Die Größe von aufgereinigten Rrm4GT wird durch den schwarzen Pfeilkopf markiert. Der graue Pfeilkopf markiert N-terminal verkürztes Rrm4GT, welches noch RNA-Bindung aufzeigt (König, 2008). **(B)** SYBR-Green I gefärbtes Polyacrylamidgel der amplifizierten iCLIP-Bank des in (A) abgebildeten Experiments. *Links*: Rrm4GT. *Rechts*: Rrm4G (Kontrolle). Die cDNA-Moleküle wurden ihrer Größe nach getrennt und separat amplifiziert. In der rechten Spur wurden kleine cDNA-Moleküle mit einer Größe von ~70-100 nt amplifiziert (klein; K), in der linken Spur Moleküle mit einer Größe von ~100-250 nt (groß, G). Amplifizierte cDNA ist rot markiert. Der schwarze Pfeil markiert Oligonukleotid-Dimere und die eingesetzten Oligonukleotide sind durch Sterne gekennzeichnet.

In den Versuchen wurde aufgereinigte RNA anschließend revers transkribiert und die erhaltenen cDNA-Moleküle in kleine (circa 70-100 nt) und große (circa 100-250 nt) Moleküle getrennt. Innerhalb eines Experiments erfolgte die Amplifizierung der beiden cDNA-Populationen separat voneinander. Vor der Sequenzierung wurden beide cDNA-Populationen wieder in einer einzelnen iCLIP-Bank vereint (siehe Material und Methoden). Idealerweise sollten die Moleküle einer iCLIP-Bank eine Mindestgröße von 148 bp aufweisen, da dies nach Abzug aller inserierten Adaptersequenzen einer Insertgröße von 20 nt entspricht. Im Rahmen dieser Arbeit wurden fünf iCLIP-Banken unabhängig voneinander generiert. Für alle fünf Experimente wurden die gleichen Parameter verwendet, welche somit als biologische Replikate gewertet wurden. Die SYBR-Green I-Färbungen der amplifizierten cDNA zeigten, dass in allen fünf Experimenten primär kurze RNA-Moleküle aufgereinigt wurden (Abb. 7 B). Alle Experimente wurden per Hochdurchsatzsequenzierung durch Kollaborationspartner (Julian König und Jernej Ule am MRC Laboratory of Molecular

Biology, Cambridge, UK) sequenziert.

Die iCLIP-Methode konnte somit erfolgreich in *U. maydis* etabliert werden, das schwache Quervernetzungssignal und die geringe Ausbeute größerer RNA-Moleküle deuten aber auf die Notwendigkeit weiterer Optimierungsschritte hin.

2.4 Identifizierung potentieller Bindestellen von Rrm4

Die hochauflösende Darstellung von Bindestellen durch die iCLIP-Methode beruht auf der Quantifizierung der quervernetzten RNA-Sequenzen (Quervernetzungsereignisse, QEs) und der daraus abgeleiteten Identifizierung der quervernetzten Nukleotide (Quervernetzungsstellen, QS; siehe Einleitung 1.5). Die hierfür erforderliche bioinformatische Auswertung der Daten erfolgte in Zusammenarbeit mit Kollaborationspartnern. Die Kartierung der aus den fünf Replikaten gewonnenen Sequenzen im Genom von *U. maydis*, sowie die Ermittlung von QS und QEs erfolgte durch die iCount-Plattform (Tab. 2; <http://icount.biolab.si>). Die Identifizierung und Charakterisierung von Bindestellen hingegen erfolgte in enger Zusammenarbeit mit Kathi Zarnack (European Bioinformatics Institute, Hinxton, Cambridge, UK).

Die in den fünf Replikaten jeweils generierten und zufällig markierten cDNA-Sequenzen wurden im Genom kartiert und durften nur einen Treffer aufweisen (Abb. 8, Schritte 1 und 2). Die kartierten Sequenzen mussten hierbei eine Mindestlänge von 10 nt aufweisen und durften höchstens zwei Fehlpaarungen besitzen. Anschließend wurden die Sequenzen auf PCR-Duplikate hin korrigiert. Als PCR-Duplikat wurden Sequenzen gewertet, welche an derselben genomischen Position einen identischen Barcode aufwiesen (Abb. 8, Schritt 3). Die Entfernung der PCR-Duplikate ermöglichte anschließend die Quantifizierung der kartierten Sequenzen als QEs. Zudem wurden die QS von den kartierten Sequenzen abgeleitet und als Position -1 der Sequenzen festgelegt (Abb. 8, Schritt 3; König *et al.*, 2010). Zur Eliminierung von Falschpositiven und zur Erhöhung der Auflösung der Daten wurden die ermittelten Quervernetzungsstellen in statistisch signifikanten Clustern ($fdr < 0,05$; *false discovery rate*) zusammengefasst (Abb. 8, Schritt 4).

Für Experiment 1 beispielsweise korrespondierten 11,8 Millionen Sequenzen der cDNA-Bank mit 165.777 QEs, welche sich auf 55.542 QS verteilten. Diese Quervernetzungsstellen wurden in 3.610 statistisch signifikanten Clustern zusammengefasst (Tab. 1). Der Vergleich zwischen den einzelnen Replikaten zeigte, dass sich die fünf Experimente stark in ihrem Umfang voneinander unterschieden und Experiment 1 das umfangreichste Replikat darstellte. (Tab. 1).

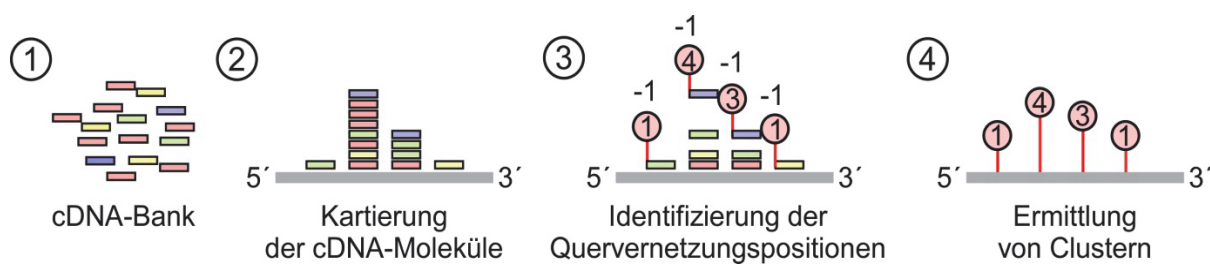


Abbildung 8: Identifizierung von Bindestellen in den iCLIP-Experimenten

Schematische Darstellung der Vorgehensweise zur Ermittlung von Quervernetzungsstellen und Clustern. **(1)** Die zufällig kodierten einzelsträngigen cDNA-Moleküle werden während zur Herstellung einer iCLIP-Bank mittels PCR amplifiziert. Die erhaltene cDNA-Bank wird anschließend per Hochdurchsatzsequenzierungsverfahren sequenziert. **(2)** Die sequenzierten cDNA-Moleküle werden anschließend im Genom kartiert. Kartierte Sequenzen mussten in dieser Analyse eine Mindestlänge von 10 nt und maximal zwei Fehlpaarungen sowie nur einen Treffer im Genom aufweisen. **(3)** Nach der Kartierung werden anhand des zufälligen Barkodes PCR-Artefakte innerhalb der kartierten Sequenzen eliminiert. Dabei werden alle Sequenzen, welche an derselben genomischen Position den gleichen Barcode aufweisen, aus der Analyse entfernt. Die übriggebliebenen Sequenzen werden als Quervernetzungsereignisse quantifiziert. Anhand der kartierten Sequenzen werden die Quervernetzungsstellen jeweils an Position „-1“ der kartierten Sequenzen abgeleitet. **(4)** Um Falschpositive zu eliminieren und zur Erhöhung der Auflösung der Daten werden die identifizierten Quervernetzungsstellen in statistisch signifikante Cluster (Gruppierungen) zusammengefasst (maximale Abstand von Quervernetzungsstellen 15 nt; $fdr < 0,05$).

Tabelle 1: Vergleichende Auswertung der Hochdurchsatzsequenzierung der fünf iCLIP-Replikate

Experiment	Sequenzen	Quervernetzungsereignisse ¹	Quervernetzungsstellen ¹	Cluster ¹
1	11.781.409	165.777	55.542	3.610
2	1.622.676	20.242	9.946	649
3	4.970.545	14.424	6.881	689
4	85.816	1.358	673	41
5	223.081	2.265	1.103	55
Alle Experimente²	-	204.066²	65.551	4.204

¹ vgl. Abb. 8 (iCount: <http://icount.biolab.si>)

² Vereinigter Datensatz aller Quervernetzungsereignisse der fünf Replikate

Für die weitere Auswertung der iCLIP-Daten wurden alle erhaltenen QS der fünf Experimente in einem gemeinsamen Datensatz vereinigt und auf die Bildung statistisch signifikanter Cluster untersucht. Vereint wurden in allen fünf Experimenten genomweit 4.204 Cluster identifiziert (Tab. 1). Hierbei zeigte sich, dass das umfangreichste Replikat Experiment 1, bereits 86% (3.610 von 4.204) der Cluster des vereinigten Datensatzes stellte.

Erwartungsgemäß sollten die ermittelten Cluster potentielle Bindestellen von Rrm4 darstellen. Diesbezüglich ergab die Untersuchung der Verteilung von QEs, dass die Mehrheit aller identifizierten QEs innerhalb der ermittelten Cluster lag (Tab. 2). Im Falle der QS sah hingegen die Verteilung anders aus. Nur ein geringer Anteil aller genomweit identifizierten QS lag innerhalb von Clustern (Tab. 2). Anhand des geringen Anteils an QS innerhalb von Clustern wurde die Eliminierung von Hintergrund und möglichen Falschpositiven durch das Filtern auf Clusterbildung verdeutlicht. Zudem zeigten diese Ergebnisse, dass in den Clustern insbesondere stark gebundene Quervernetzungsstellen zusammen gefasst wurden. Die Verteilung von QEs und QS auf die identifizierten Cluster legte somit nahe, dass es sich bei den Clustern tatsächlich um Bindestellen von Rrm4 handelte.

Tabelle 2: Verteilung von Quervernetzungsereignissen und Quervernetzungsstellen innerhalb der Cluster

Experiment	Quervernetzungen/Cluster	% ¹	Quervernetzungsstellen/Cluster	% ¹
1	123.492	75	21.092	38
2	12.307	61	2.855	29
3	8.308	58	1.955	28
4	938	69	301	45
5	1.495	66	390	35
Alle Experimente²	151.712	74	23.988	37

¹ vgl. Tab. 1

² Vereinigter Datensatz aller Quervernetzungsereignisse der fünf Replikate

Um innerhalb der ermittelten Cluster Bindestellen von Rrm4 zu identifizieren wurden die 4.204 Cluster des vereinigten Datensatzes durch den Abgleich mit den Clustern der fünf Experimente auf Reproduzierbarkeit hin gefiltert. Aufgrund des zum Teil geringen Umfangs der einzelnen Experimente wurden für die Analyse wenig stringente Parameter festgelegt. Reproduzierbare Cluster mussten durch mindestens zwei der fünf Experimente identifiziert werden und eine Mindestanzahl von fünf QEs aufweisen. Anhand dieser Kriterien wurden genomweit 1.969 der 4.204 Cluster als reproduzierbar klassifiziert (Abb. 9 B). Für den Abgleich mit dem *U. maydis*-Genom wurden zur Berücksichtigung der UTRs von mRNAs die annotierten ORFs in 5' und 3'Richtung jeweils um 300 nt erweitert. Insgesamt 78% (1.528 von 1.969) der reproduzierbaren Cluster lagen innerhalb von Protein-kodierenden Regionen. Bei den restlichen 22% der reproduzierbaren Cluster fanden sich auch vier Cluster wieder, die in Regionen lagen, welche aufgrund von Sequenzvergleichen als rRNA-kodierend identifiziert wurden (siehe Anhang). Der Großteil der identifizierten reproduzierbaren Bindestellen lag somit in als mRNA annotierten Regionen.

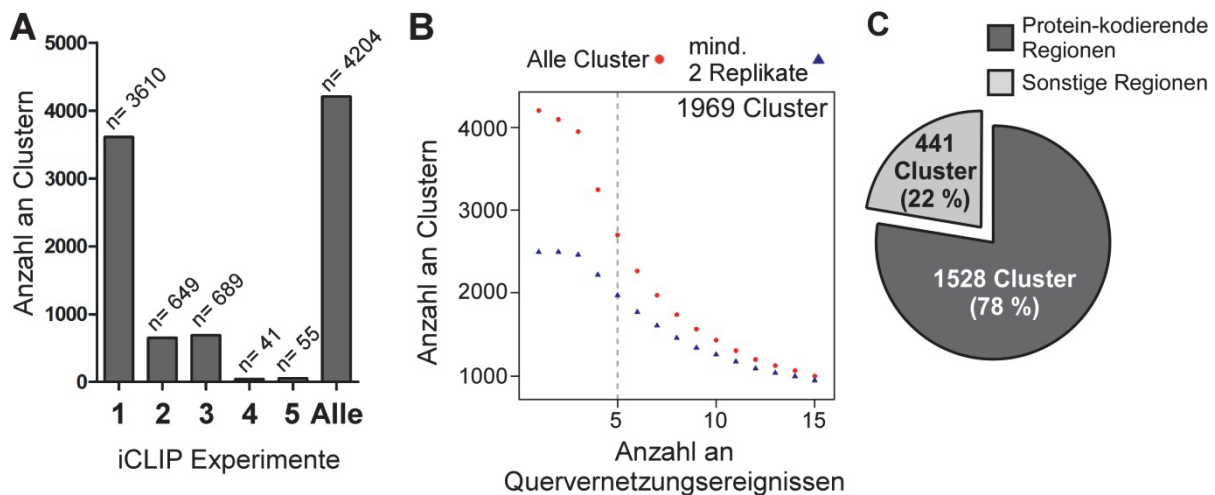


Abbildung 9: Identifizierung potentieller Bindestellen von Rrm4

(A) Anzahl der statistisch signifikanten Cluster innerhalb der einzelnen iCLIP-Experimente sowie dem vereinigten Datensatz. (B) Verteilung der Anzahl an Clustern auf die Anzahl an Quervernetzungsereignisse pro Cluster. Analysiert wurden die Cluster des vereinigten Datensatzes. Gezeigt ist die Verteilung aller Cluster (roter Kreis) sowie der Cluster, welche in mindestens zwei Replikaten identifiziert wurden (blaues Dreieck). Die grau gestrichelte Linie markiert den in dieser Arbeit verwendeten Grenzwert von 5 Quervernetzungsereignissen pro Cluster. Als reproduzierbar gelten Cluster, welche in mindestens zwei Replikaten identifiziert wurden und mindestens fünf Quervernetzungen aufweisen. Insgesamt 1.969 Cluster des vereinigten Datensatzes erfüllten diese Kriterien. (C) Verteilung der reproduzierbaren Cluster auf Protein-kodierende und „sonstige Regionen“. Als „sonstige Regionen“ sind alle Regionen zusammengefasst, welche nicht Protein-kodierenden Genen zugeordnet werden konnten.

2.5 Verteilung der potentiellen Bindestellen von Rrm4 innerhalb identifizierter mRNAs

Die Daten der HITS-CLIP Analyse zeigten, dass die 3'UTR die primäre Binderegion von Rrm4 darstellt (Abb. 5 A + B). Um dies zu überprüfen, wurde die Verteilung der potentiellen Bindestellen innerhalb von Transkripten anhand der 1.528 reproduzierbaren Cluster untersucht. Hierzu wurde deren Verteilung innerhalb der 5'UTR, ORF und 3'UTR potentieller Ziel-mRNAs analysiert. Die Länge der UTRs wurde dabei auf 300 nt festgelegt (vgl. Kapitel 2.2).

Von den insgesamt 1.528 reproduzierbar identifizierten Clustern lagen insgesamt 197 in der 5'UTR, 359 im ORF und 972 in der 3'UTR potentieller Ziel-mRNAs (Abb. 10 A + B). Die nähere Analyse der in ORFs liegenden Bindestellen konnte eine Bindung von intronischen Sequenzen ausschließen. Nur 16 der im ORF liegenden Cluster überlappten mit annotierten Introns, wovon 15 Cluster vollständig innerhalb von intronischen Regionen lagen. Die iCLIP-Daten bestätigen hiermit, die aus den CLIP-Experimenten erhaltenen Ergebnisse, dass Rrm4 nicht an der Prozessierung von prä-mRNA im Zellkern beteiligt ist (vgl. 2.2; König *et al.*, 2009). Da in dieser Analyse nur kontinuierliche Sequenzen kartiert wurden, konnten Exon/Exon-Übergänge in dieser Analyse ebenfalls nicht untersucht werden (vgl. Kapitel 2.2).

Insgesamt ergab die Analyse, dass der größte Anteil (64%) der potentiellen Bindestellen in der 3'UTR von mRNAs lag. Um die Anreicherung von Clustern innerhalb der einzelnen Regionen miteinander vergleichen zu können, wurde die Anzahl an reproduzierbaren Clustern auf die Gesamtlänge der jeweiligen Regionen normalisiert. Die Normalisierung zeigte eindrucksvoll, dass reproduzierbare Cluster primär in der 3'UTR angereichert waren (Abb. 10 C).

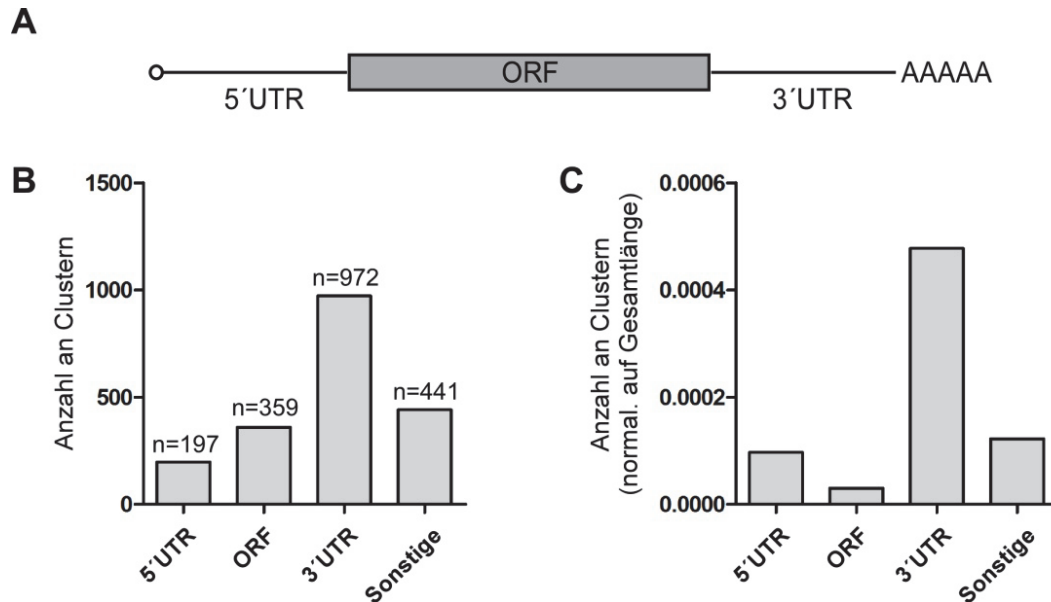


Abbildung 10: Bindestellen von Rrm4 liegen primär in der 3'UTR von mRNAs

(A) Schematische Darstellung einer eukaryotischen mRNA. Die am 5'Ende sitzende Kappe (ungefüllter Kreis) kennzeichnet das 5'Ende der mRNA. Der PolyA-Anhang markiert das 3'Ende der mRNA. Die Länge der UTRs wurde im Rahmen der Analyse jeweils auf 300 nt festgelegt. **(B)** Verteilung der 1.969 reproduzierbaren Cluster auf die 5'UTR, den ORF, die 3'UTR, sowie den als „sonstige Regionen“ zusammengefassten Bereichen. Abgebildet ist die Anzahl an Clustern innerhalb der jeweiligen Region. **(C)** Normalisierung der Anzahl an Clustern auf die Gesamtlänge der jeweiligen Region (Gesamtanzahl an Clustern/Gesamtlänge der Region).

Zudem beschränkten sich die an der Grenze zwischen ORF und 3'UTR liegenden Quervernetzungsstellen auf die 3'UTR, wovon zudem der Großteil innerhalb der ersten 100 nt der UTR lag (Abb. 11). Zusammengefasst zeigten diese Analysen demnach, dass Rrm4 Ziel-mRNAs primär in deren 3'UTR bindet.

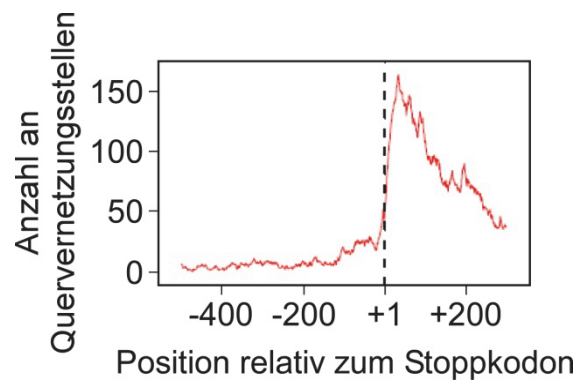


Abbildung 11: Quervernetzungsstellen sind auf die 3'UTR begrenzt

Verteilung von Quervernetzungsstellen innerhalb der 3'UTR von Ziel-mRNAs. Der analysierte Bereich beschränkte sich auf die letzten 500 nt der ORFs, sowie den gesamten 3'UTRs. Die Position +1 stellt das erste Nukleotid der 3'UTR dar. Abgebildet ist die Anzahl an Quervernetzungsstellen pro Position der gesamten 3'UTR. Untersucht wurden die Quervernetzungsstellen des vereinigten Datensatzes aller iCLIP-Replikate.

2.6 Identifizierung des Tetranukleotids UAUG als potentielles Bindemotiv von Rrm4

Ein konserviertes Bindemotiv konnte bislang für Rrm4 nicht ermittelt werden. Als potentielles Bindemotiv wurden CA-reiche Sequenzen identifiziert, jedoch war dieses Motiv innerhalb der ermittelten Bindestellen nicht stark konserviert (Abb. 5 C +D; König *et al.*, 2009). Da die iCLIP-Methode die hochauflösende Darstellung von Bindestellen ermöglicht, wurden daher die reproduzierbaren Clustern auf das Vorhandensein konservierter Bindemotive untersucht. Als Ausgangspunkt für die Identifizierung eines Bindemotivs dienten alle der zuvor identifizierten 1 528 reproduzierbaren Cluster, unabhängig von deren Lage innerhalb der jeweiligen mRNAs. Mögliche Bindemotive sollten anhand der Nukleotidanreicherung innerhalb der Cluster ermittelt werden. Als Referenzpunkt für die Nukleotidanreicherung diente pro Cluster die Quervernetzungsstelle mit der höchsten Anzahl an Quervernetzungsereignissen, das sogenannte "Clustermaximum". Ausgehend von der Position des Clustermaximums wurde die Nukleotidanreicherung innerhalb eines Fensters von jeweils 20 nt stromauf und -abwärts untersucht. Die Analyse ergab, dass in unmittelbarer Nähe zu den Clustermaxima eine starke Anreicherung des Tetranukleotids TATG vorlag (Abb. 12 A). Zusätzlich wurde eine Häufung weiterer Motive in unmittelbarer Nähe zu den Clustermaxima festgestellt (Abb. 12 A). Zudem wurde 10-20 nt stromabwärts der Clustermaxima eine leichte Akkumulation des Tetranukleotids AAAA beobachtet. (Abb. 12 A). Eine starke Anreicherung CA-enhaltener Tetranukleotide, wie sie aufgrund der vorhergegangenen Analyse erwartet wurde, konnte in dieser Analyse nicht festgestellt werden. Die Anreicherung von TATG in unmittelbarer Nähe zu den Clustermaxima implizierte, dass dies ein mögliches Bindemotiv für Rrm4 darstellt.

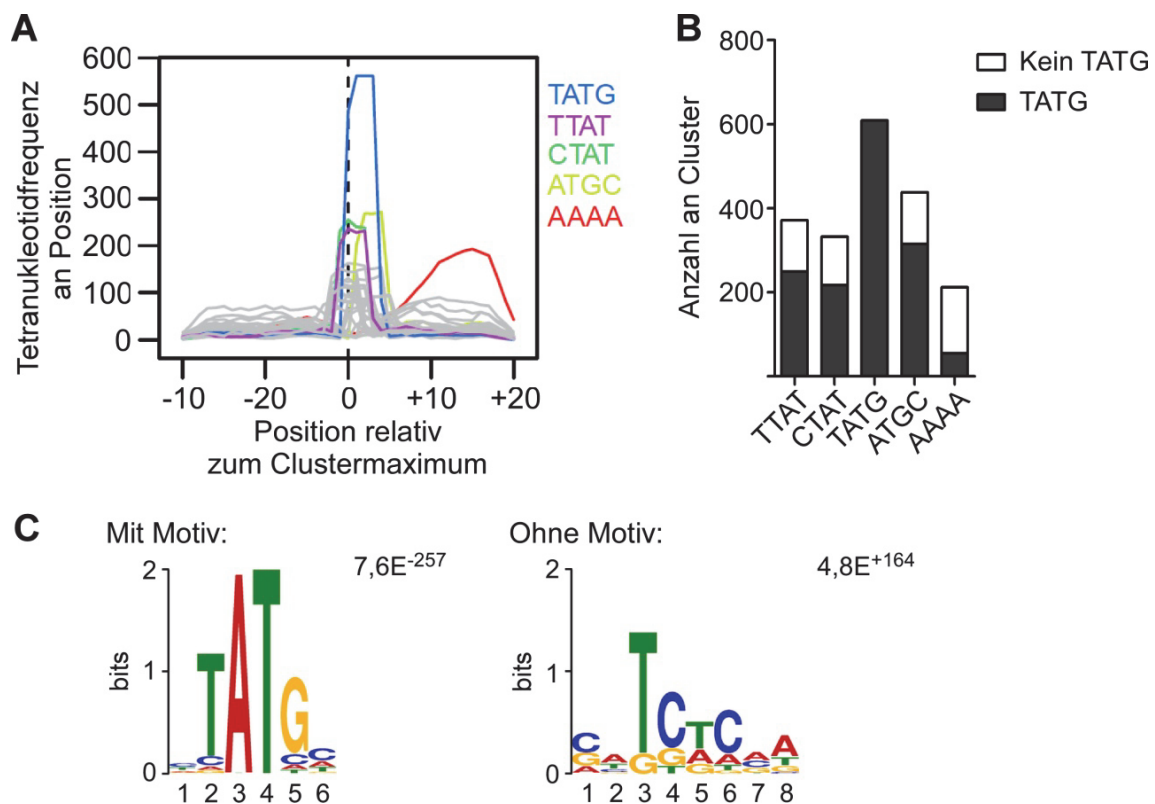


Abbildung 12: Identifizierung des Tetranukleotids TATG (UAUG) als potentielles Bindemotiv von Rrm4

(A) Liniendiagramm der Tetranukleotidanreicherung innerhalb der reproduzierbaren Cluster. Abgebildet ist die Tetranukleotidfrequenz an der jeweiligen Position relativ zur Position der Clustermaxima. Untersucht wurde die Anreicherung aller möglichen Tetranukleotide. Die Tetranukleotide, welche eine starke Anreicherung aufzeigten sind farbig hervorgehoben. In der Analyse wurden nur die 1.528 Cluster einbezogen, welche innerhalb von mRNAs lagen. (B) Anzahl an Clustern, welche die in (A) identifizierten Motive enthalten. Die Anzahl TATG-enthaltener innerhalb dieser Cluster wird durch den schwarzen Balken dargestellt (siehe Text). (C) Sequenzlogos von MEME-Analyse zur Identifizierung eines konservierten Bindemotivs. *Links*: Sequenzlogo der MEME-Analyse auf die 941 TTAT-, CTAT-, TATG- und ATGC-enthaltenen Cluster. *Rechts*: Sequenzlogo der MEME-Analyse auf die 587 Cluster, welche kein TATG, TTAT, CTAT oder ATGC enthalten. (MEME: <http://meme.nbcr.net/meme/>; Bailey *et al.*, 2009)

Insgesamt besaßen 40% (609 von 1.528) der analysierten Cluster mindestens eine Kopie dieses putativen Bindemotivs (Abb. 12 B). Von den weiteren angereicherten Tetranukleotiden enthielten 22% (332 von 1.528 Cluster) mindestens ein TTAT, 24% (371 von 1.528 Cluster) mindestens ein CTAT, 29% (438 von 1.528 Cluster) ATGC und 14% (212 von 1.528) Cluster mindestens ein AAAA (Abb. 12 B). Die neben TATG in direkter Nähe zu den Clustermaxima ermittelten Tetranukleotide deuteten aufgrund von Sequenzähnlichkeiten sowie einer leicht versetzten Anreicherung auf eine mögliche Überschneidung mit TATG hin (Abb. 12 A). In 5'Richtung schienen TTAT und CTAT mit TATG zu überlappen, während in 3'Orientierung eine mögliche Überschneidung zwischen TATG und ATGC vorlag. Unterstützt wurde dies durch die Beobachtung, dass die Mehrheit der reproduzierbaren Cluster, welche TTAT, CTAT oder ATGC besaßen, ebenfalls mindestens ein TATG-Motiv besaß (Abb. 12 B). Im Vergleich dazu besaßen nur 26% der AAAA-enthaltenen Cluster ein TATG. Umgekehrt besaßen von

den 941 reproduzierbaren Clustern, welche mindestens ein TTAT, CTAT, TAGT oder ATGC besaßen, nur 12% (104 von 941 potentiellen Bindestellen) mindestens ein AAAA. Dies deutete an, dass es sich bei TATG- und AAAA-enhaltenen Clustern um zwei distinkte Populationen handelt. Die beobachtete Anreicherung von TATG sowie das Vorhandensein des abgeleiteten Motivs C-T/TATG/C wurde zusätzlich anhand einer MEME-Analyse überprüft. Für die Analyse wurden die Sequenzen aller 941 Cluster, welche TATG oder ein mit TATG möglicherweise überlappendes Motiv enthielten auf das Vorhandensein eines konservierten Motivs mittels MEME untersucht. Die Analyse bestätigte die statistisch signifikante Anreicherung des TATG-Kernmotivs. Eine konservierte Erweiterung des TATG-Motivs in 5' und 3'-Richtung wurde durch MEME jedoch nicht erkannt (Abb. 12 C). Parallel zu diesem Ansatz wurden alle Cluster, welche dieses Motiv nicht enthielten ebenfalls auf das Vorhandensein weiterer Bindemotive untersucht. Diese Analyse detektierte jedoch keine weiteren konservierten Bindemotive (Abb. 12 C).

Insgesamt wurde mittels der durch iCLIP ermöglichten, detaillierten Analyse von Bindestellen mit TATG ein neues potentielles Bindemotiv von Rrm4 identifiziert. Anstelle von TATG lautet die korrekte Sequenz des identifizierten Bindemotivs jedoch UAUG, da RNA im Vergleich zu DNA anstelle der Base Thymin Uracil besitzt.

2.7 Die Interaktion von UAUG und Rrm4 im Hefe-Drei-Hybrid-System

Im Vorfeld durchgeführte SELEX-Experimente identifizierten mehrere Sequenzen, welche durch Rrm4 spezifisch im Hefe-Drei-Hybrid-System gebunden wurden (Sengupta *et al.*, 1999 ; König *et al.*, 2007). Die identifizierten Sequenzen ließen sich hierbei in vier Klassen unterteilen, welche alle laut Sekundärstrukturvorhersagen Haarnadelstrukturen ausbildeten. Von diesen vier Klassen wurden jedoch nur zwei Klassen, A und B, durch Rrm4 im Hefe-Drei-Hybrid-System gebunden (König *et al.*, 2007). Interessanterweise enthielten dabei Sequenzen der Klasse A ein UAUG innerhalb einer ihrer Schleifen. Da die Bindung der Sequenz A1 durch Rrm4 bereits erfolgreich gezeigt wurde (König *et al.*, 2007), sollte anhand des gezielten Austausches dieses Motivs ermittelt werden, ob UAUG für die Bindung durch Rrm4 benötigt wird.

Das Hefe-Drei-Hybrid-System basiert auf der *in vivo* Interaktion zwischen Köder- und Beutehybrid (Sengupta *et al.*, 1999). Die A1-Sequenz diente in diesem Experiment als Köderhybrid und lag als Plasmid bereits kloniert vor (König *et al.*, 2007). Um die Bindung dieses Motivs durch Rrm4 zu untersuchen, wurde das in der Schleife der A1-Sequenz enthaltene UAUGC jeweils in ein AAAAA bzw. UCUCA mutiert (Abb. 13 A; siehe Material und Methoden). Die integrierten Mutationen wurden so gewählt, dass laut Strukturvorhersagen (mfold; <http://mfold.rna.albany.edu>; Zuker, 2003) keine Veränderungen der Sekundärstruktur entstehen sollten. Das verwendete Beutehybrid war ein bereits getestetes Rrm4-

Fusionsprotein, welches N-terminal eine GAL4-Aktivierungsdomäne und C-terminal ein Gfp besaß (König *et al.*, 2007). Die Sequenz A1 diente in diesem Experiment als Positivkontrolle. Um eine Autoaktivierung seitens der A1-Sequenz oder Rrm4 auszuschließen, wurden als zusätzliche Kontrollen der leere Köder- oder Beutehybridvektor eingesetzt. Auf die Anwesenheit des Köder- bzw. Beutehybridvektors wurde anhand der Auxotrophiemarker *URA3* und *LEU2* selektioniert. Die entsprechenden Plasmidpaare wurden in den *S. cerevisiae* Stamm L40-coat transformiert und auf Uracil-Leucin-Mangelmedium selektioniert (SenGupta *et al.*, 1996). Die Analyse der Interaktion erfolgte auf Histidinmangelmedium, da im Falle einer Interaktion zwischen Protein- und RNA-Hybrid die Expression des *HIS3*-Reportergens induziert werden sollte (SenGupta *et al.*, 1996). Einzelne Kolonien wurden in Uracil-Leucin-Mangelmedium angeimpft und als Verdünnungsreihe getropft. Um die basale Expression des *HIS3*-Reportergens zu eliminieren wurde zusätzlich 5 mM 3-Aminotriazol zu den Interaktionsplatten hinzugegeben (SenGupta *et al.*, 1996).

Erwartungsgemäß wurde eine Interaktion zwischen Rrm4 und der Sequenz A1 festgestellt. Dies äußerte sich in Wachstum der transformierten Zellen auf dem Histidinmangelmedium (Abb. 13 C). Dieses Wachstum war auf die spezifische Interaktion zwischen Rrm4 und A1 zurückzuführen, da in den Vektorkontrollen beide Hybride keine Autoaktivierung der *HIS3*-Expression zeigten (Abb. 13 C). Interessanterweise interagierte Rrm4 nicht mit RNAs, welche eine mutierte UAUGC-Sequenz besaßen. Der Austausch von UAUGC durch AAAAA oder durch UCUCA resultierte in beiden Fällen in fehlendem Wachstum auf Histidinmangelmedium (Abb. 13 C). Dies zeigte, dass das identifizierte Motiv in der Tat für die Bindung mit Rrm4 erforderlich ist.

A1 stellt jedoch eine heterologe Sequenz dar. Aus diesem Grund sollte geklärt werden, ob die Interaktion zwischen Rrm4 und UAUG auch auf endogene Bindestellen zutrifft. Die *ubi1* mRNA wurde in den vorherigen CLIP-Experimenten als prominente Ziel-mRNA identifiziert (vgl. 2.2; König *et al.*, 2009). Zudem wurde die Interaktion der *ubi1* 3'UTR mit Rrm4 *in vivo* anhand des λ N-Gfp Reportersystems gezeigt (König *et al.*, 2009). Die HITS-CLIP Analyse als auch die iCLIP-Experimente identifizierten zwei potentielle Bindestellen in der 3'UTR der *ubi1* mRNA, wovon eine ein UAUG enthielt (Abb. 13 B). Im Hefe-Drei-Hybrid-System wurde die Interaktion zwischen Rrm4 und der gesamten 3'UTR (317 nt) sowie der ersten Hälfte der *ubi1* 3'UTR (194 nt), welche den CA-reichen Abschnitt sowie die UAUG-enhaltende Bindestelle besaß, getestet (Abb. 24 B, S. 65). Die entsprechenden genomischen Regionen wurden dazu per PCR amplifiziert und anhand von ClaI und AscI-Restriktionsschnittstellen in den RNA-Hybrid Vektor integriert (siehe Material und Methoden).

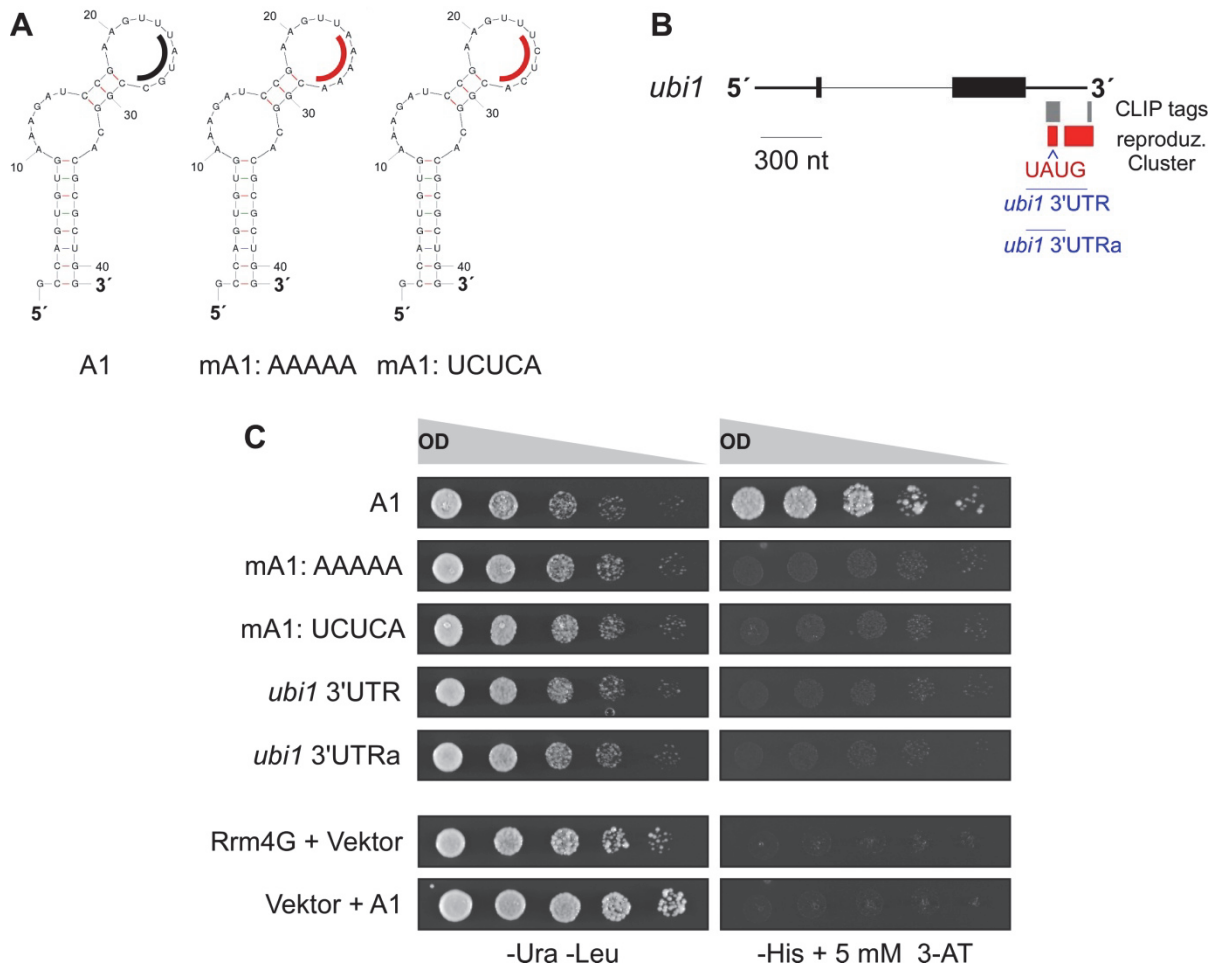


Abbildung 13: UAUG ist für die Interaktion mit Rrm4 erforderlich

(A) Strukturvorhersagen der im Hefe-Drei-Hybrid System getesteten Sequenzen. Abgebildet sind die durch *mfold* vorhergesagten Sekundärstrukturen der SELEX Sequenz A1 sowie der mutierten Sequenzen (König *et al.*, 2007; *mfold*: <http://mfold.rna.albany.edu>; Zuker, 2003). Die Position des UAUGC innerhalb der Sequenzen ist hervorgehoben. Das Ausgangsmotiv UAUGC ist schwarz, die eingefügten Mutationen sind rot markiert. (B) Maßstabsgetreue Darstellung der *ubi1* mRNA. Exons sind als schwarze Balken, Introns als dünne Linien und UTRs als dickere Linien abgebildet. Die in der HITS-CLIP Analyse identifizierten CLIP-Tags sind vereint als graue Balken abgebildet. Die Positionen der reproduzierbaren iCLIP Cluster sind rot markiert. Der UAUG-enthaltene Cluster ist entsprechend markiert. Beide getesteten *ubi1* 3'UTR Sequenzen sind maßstabsgetreu abgebildet. (C) Hefe-Drei-Hybrid-System-Tropfplatten von Verdünnungsreihen auf Selektions- und Interaktionsmedium. Die optische Dichte (OD_{600}) der Ausgangskultur betrug 0,5. Jeder Verdünnungsschritt wurde im Verhältnis 1:5 verdünnt. Anhand des -Ura-Leu-Mangelmediums wird auf die Anwesenheit der transformierten Plasmide selektioniert. Die Analyse der Interaktion zwischen Rrm4 und der jeweiligen RNA-Sequenz erfolgte auf dem -His + 5mM 3-Aminotriazol Mangelmedium. Um Autoaktivierung von Rrm4 oder A1 auszuschließen wurde jeweils ein leerer Köder- bzw. Beutehybridvektor transformiert.

Beide Sequenzen zeigten aufgrund des fehlenden Wachstums der transformierten Zellen auf Histidinmangelmedium keine Interaktion mit Rrm4 (Abb. 13 C). Eine Interaktion zwischen Rrm4 und der *ubi1* 3'UTR konnte somit im Hefe-Drei-Hybrid-System nicht gezeigt werden. Dies könnte jedoch aufgrund der Länge der Sequenzen, auf die Ausbildung störender Sekundärstrukturen (Sengupta *et al.*, 1999) als auch auf das Fehlen akzessorischer Faktoren zurückzuführen sein.

Zusammenfassend kann anhand dieser Experimente gesagt werden, dass das identifizierte Motiv UAUG im Hefe-Drei-Hybrid-System die Interaktion mit Rrm4 vermittelt. Die Bindung endogener Bindestellen innerhalb der *ubi1* 3'UTR durch Rrm4 konnte jedoch nicht gezeigt werden. Aus diesem Grund war es nicht möglich in dieser Arbeit zu zeigen, ob im Falle der *ubi1* 3'UTR CA- UAUG oder CA-reiche Sequenzen für die Interaktion mit Rrm4 benötigt werden.

2.8 Die transkriptomweite Identifizierung neuer Ziel-mRNAs von Rrm4

Die iCLIP-Experimente ermöglichten ebenfalls eine umfassende Identifizierung potentieller Ziel-mRNAs von Rrm4. Anhand des Abgleichs der reproduzierbaren Cluster mit dem annotierten Genom wurden in den iCLIP-Experimenten 1.106 mRNAs als potentiell gebunden identifiziert. Zusammen mit den 948 Kandidaten der HITS-CLIP Analyse zeigte dieses Ergebnis, dass Rrm4 eine sehr große Anzahl an mRNAs bindet. Aufgrund der großen Anzahl potentiell gebundener mRNAs wurden beide Ansätze miteinander verglichen, um festzustellen welche der Kandidaten reproduzierbar in beiden Ansätzen identifiziert werden konnten. Dieser Vergleich ergab, dass von den 948 und 1.106 potentiellen Ziel-mRNAs insgesamt 400 mRNAs in beiden Ansätzen gemeinsam identifiziert wurden (Abb. 14 A). Da diese mRNAs reproduzierbar in beiden Ansätzen gefunden wurden, bestand die Annahme, dass dies möglicherweise auf eine stärkere Bindung der Transkripte zurückzuführen ist. Um dies zu überprüfen wurde die Bindungsstärke der mRNAs näher untersucht. Die mRNA-Bindung wurde in der HITS-CLIP Analyse, im Gegensatz zu den iCLIP-Experimenten, nicht quantitativ erfasst, so dass diesbezüglich die Anzahl an CLIP-Tags pro Transkript als Maß für die Stärke der Bindung gewertet wurde. In den iCLIP-Experimenten hingegen wurde die Anzahl an QEs pro Transkript ausgewertet. Im Falle der HITS-CLIP Analyse wiesen die überlappenden Ziel-mRNAs im Vergleich den nicht überlappenden Ziel-mRNAs Fall der HITS-CLIP Analyse eine statistisch sehr signifikante Anreicherung von mRNAs mit mehr als einem CLIP-Tag auf (Abb. 14 B; 40% vs. 18%; zwei-seitiger Fisher-Test, $p < 0,01$). Im Vergleich, von allen HITS-CLIP Kandidaten besaßen insgesamt 27% der mRNAs mehr als einen CLIP-Tag (Abb. 15 B). In den iCLIP-Experimenten wiesen die mit beiden Ansätzen überlappenden Ziel-mRNAs eine höhere Anzahl an QEs pro Cluster (Median=18) im Vergleich zu allen (Median=13) sowie den nur in iCLIP-identifizierten mRNAs (Median=11) auf (Abb. 14 C). Im Vergleich zu den nur in iCLIP-identifizierten mRNAs erwies sich dieser Unterschied als statistisch sehr signifikant ($p < 0,01$; Wilcoxon-Rangsummentest). Dies zeigt, dass die in beiden Ansätzen gemeinsam identifizierten mRNAs vergleichsweise stärker gebunden werden. Eine Anreicherung von UAUG-enthaltenen Clustern innerhalb der gemeinsam identifizierten mRNAs wurde im Vergleich zu den nur in der iCLIP-Analyse gefundenen Ziel-mRNAs nicht festgestellt (Abb. 14 D). Die stärkere Bindung der Transkripte

ist somit nicht auf eine erhöhte Sequenzspezifität bezüglich des in dieser Arbeit identifizierten Motivs zurückzuführen.

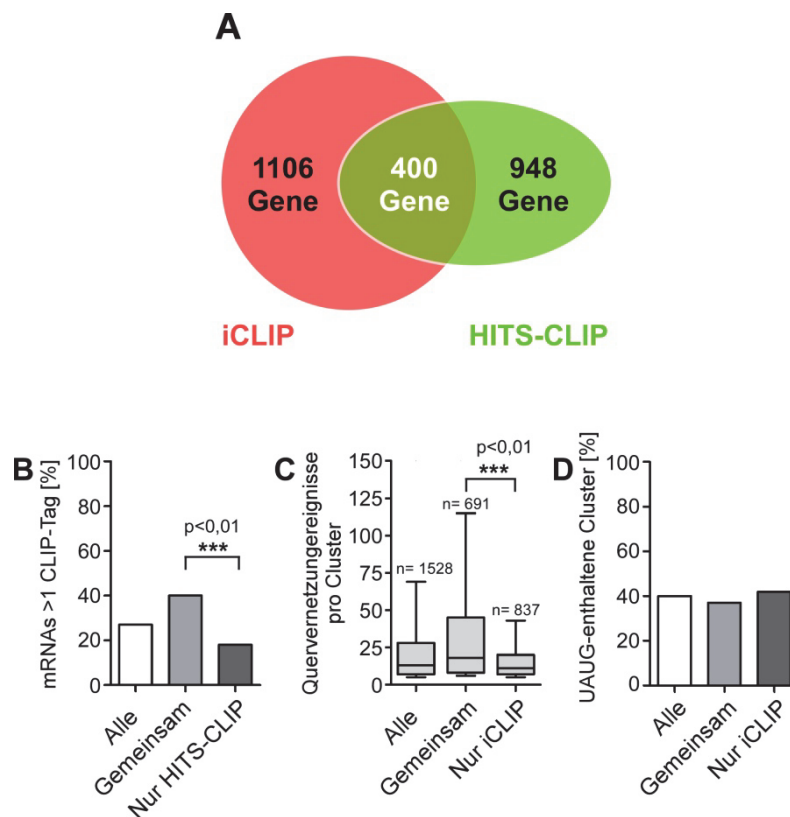


Abbildung 14: Gemeinsam identifizierte Ziel-mRNAs scheinen durch Rrm4 stärker gebunden zu sein

(A) Nicht maßstabsgetreues Mengendiagramm der in den iCLIP und HITS-CLIP Experimenten identifizierten Ziel mRNAs. Die in schwarzer Schrift angegebenen Zahlen geben die Gesamtanzahl der in beiden Ansätzen identifizierten Ziel-mRNAs wieder. Die Anzahl überlappender mRNAs wird durch die weiße Schrift angegeben. **(B)** Vergleich des prozentualen Anteils von mRNAs mit mehr als einem CLIP-Tag, zwischen allen (260 von 948 mRNAs), den in beiden Ansätzen gemeinsam identifizierten (161 von 400 mRNAs) und den nur in HITS-CLIP gefundenen mRNAs (99 von 548 mRNAs). Der Unterschied zwischen den gemeinsam identifizierten mRNAs im Vergleich zu den nur in HITS-CLIP identifizierten mRNAs erweist sich als statistisch sehr signifikant (zwei-seitiger Fisher-Test, $p < 0,01$) **(C)** Boxplots der Anzahl an Quervernetzungsereignissen pro Cluster für alle iCLIP Ziel-mRNAs, den überlappend identifizierten mRNAs und den nur in iCLIP-identifizierten Transkripten. Der Median (für alle: 13; gemeinsam identifizierte mRNAs: 18; nur in iCLIP: 11) ist als schwarze Linie innerhalb der Boxen dargestellt. In den Boxplots sind die 10-Perzentile (untere Linie), die 25-Perzentile (untere Kante der Box), 75-Perzentile (obere Kante der Box) und die 90-Perzentile (oberste Linie) abgebildet. Die unterschiedliche Anzahl an QEs pro Cluster zwischen den gemeinsam und den nur in iCLIP identifizierten mRNAs erweist sich als statistisch sehr signifikant (Wilcoxon-Rangsummentest; $p < 0,01$). Der jeweilige Mittelwert beträgt: für alle mRNAs (40,1), für die gemeinsam identifizierten mRNAs (59,47) und für die nur in iCLIP identifizierten mRNAs (24,24). **(D)** Vergleich des prozentualen Anteils an UAUG-enthaltenen Clustern in allen iCLIP Ziel-mRNAs, den gemeinsam identifizierten mRNAs und den nur in iCLIP identifizierten mRNAs. Der Anteil UAUG-enthaltener Cluster betrug für alle mRNAs 40% (609/1.528 Cluster), für die gemeinsam identifizierten mRNAs 37% (255/691 Cluster) sowie für ausschließlich in iCLIP identifizierten Ziel-mRNAs 42% (354/837 Cluster)

Um die Funktion des Rrm4-vermittelten mRNA-Transports zu ermitteln, wurde die Verteilung der durch Ziel-mRNAs kodierten Proteinen auf die einzelnen funktionellen Kategorien der FunCat-Datenbank untersucht (Ruepp *et al.*, 2004; Munich Information Center for Protein Sequences: <http://mips.helmholtz-muenchen.de/genre/proj/ustilago/>). Die FunCat-Analyse umfasste die HITS-CLIP Kandidaten, die iCLIP-Kandidaten und die in beiden Ansätzen gemeinsam identifizierte Kandidaten. Anhand der FunCat-Analyse wurden im Vergleich zur genomweiten Verteilung Anreicherungen in mehreren funktionellen Kategorien festgestellt (Abb. 15). In allen drei Fällen wurde eine starke, signifikante Anreicherung ($p \leq 0,05$) in den vier Kategorien „Proteinsynthese“, „Energiemetabolismus“, „Zellulärer Transport“ und „Protein mit Bindefunktion oder Kofaktoren“ beobachtet. Diese Analyse verdeutlichte, dass der Rrm4-vermittelte mRNA-Transport an einer Vielzahl von biologischen Prozessen beteiligt zu sein scheint.

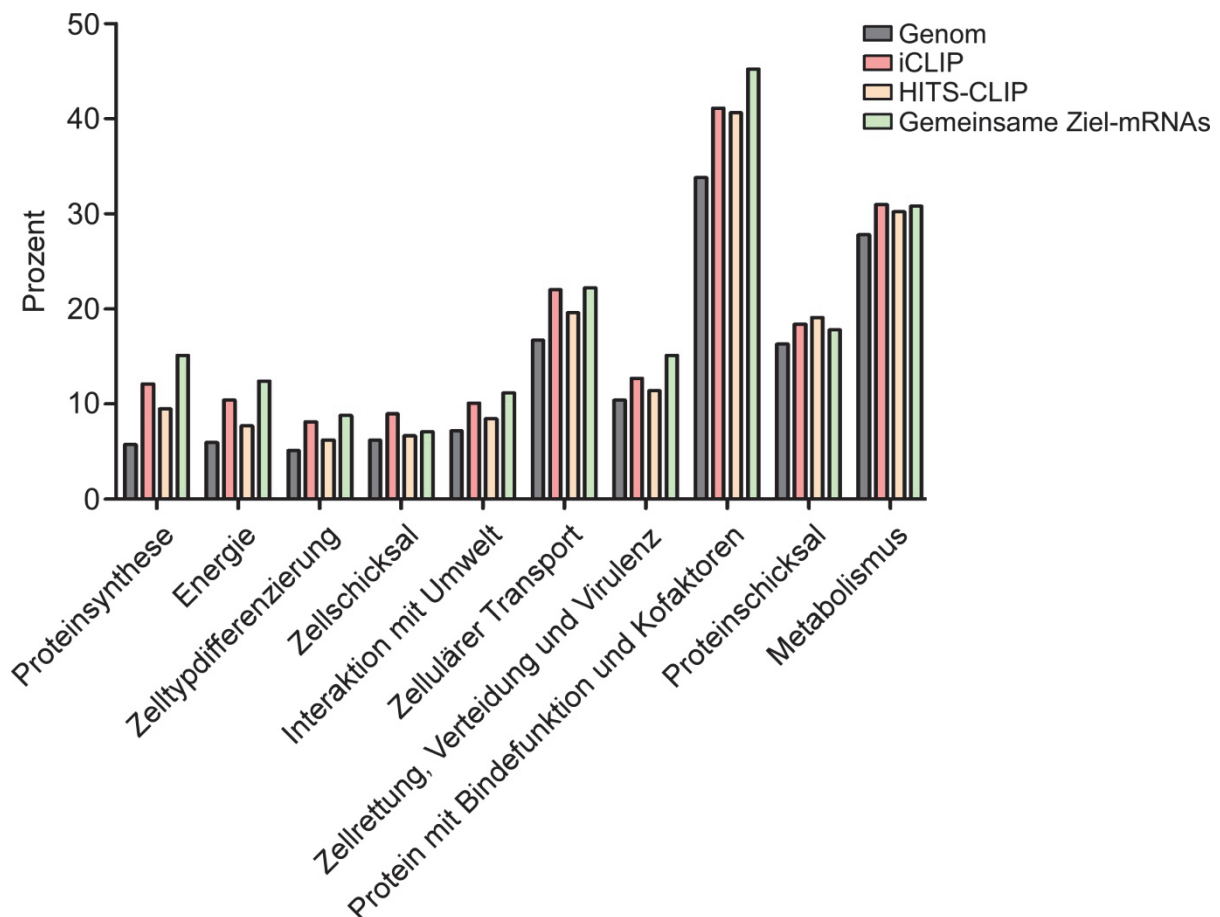


Abbildung 15: Die identifizierten Ziel-mRNAs kodieren für funktionell diverse Proteine

Verteilung der identifizierten mRNAs auf die funktionellen Kategorien der FunCat-Datenbank (FunCat: <http://mips.helmholtz-muenchen.de/proj/funecatDB>; Ruepp *et al.*, 2004). Abgebildet sind nur die Kategorien, welche im Vergleich zu der Verteilung aller annotierten Gene im Genom eine statistisch signifikante Anreicherung aufweisen (hypergeometrische Verteilung, $p < 0,05$). Die Kategorien sind ihrer Anreicherung entsprechend von links nach rechts angeordnet (links: am stärksten, rechts: am schwächsten).

Die beiden Analysen ermöglichten die umfangreiche Identifizierung sowohl alter als auch neuer Kandidaten des Rrm4-vermittelten mRNA-Transports. Unter anderem wurden auch wie in den durch König *et al.* (2009) durchgeführten CLIP-Experimenten für Polaritätsfaktoren, wie z.B. Septine und Rho-GTPasen, kodierende mRNAs gefunden. Von den vier Septinen von *U. maydis* (Cdc3, Cdc10, Cdc11, Cdc12; Pan *et al.*, 2007 ; Alvarez-Tabares und Perez-Martin, 2010) wurden in dem iCLIP-Datensatz alle vier mRNAs identifiziert, während hingegen in der HITS-CLIP-Analyse nur die *cdc12* mRNA gefunden wurde. Im Falle der Rho-GTPasen schien Rrm4 anhand der iCLIP-Experimente die *rho1* mRNA zu binden. Den HITS-CLIP Daten zufolge stellte neben der *rho1* mRNA auch das *rho3* Transkript eine potentielle Ziel-mRNA von Rrm4 dar. Zusätzlich zu Septinen und Rho-GTPasen wurden in beiden Ansätzen ebenfalls für Formine kodierende mRNAs identifiziert. Diese Proteine sind an der Nukleation und Elongation von Aktin, sowie der Stabilisierung von Mikrotubuli beteiligt (Chesarone *et al.*, 2010). *U. maydis* besitzt zwei Formine Drf1 (*Diaphanous-related formin*) und Srf1 (*SepA-related formin*) (Freitag *et al.*, 2011), von denen in den iCLIP-Daten nur die *srf1* mRNA gefunden wurde. Anhand der HITS-CLIP Daten konnten jedoch die Transkripte beider Formine als potentielle Ziel-mRNAs identifiziert werden. Zusätzlich zu Polaritätsfaktoren fanden sich auch an der Proteinsynthese, sowie am Energiemetabolismus beteiligte Faktoren wieder. Bezüglich der Proteinsynthese wurden etliche mRNAs detektiert, die für ribosomale Proteine wie Rpl40, Rps27a, Rpl24 sowie einzelnen Komponenten der Ubiquitin-Konjugationsmaschinerie kodierten. Es wurden ebenfalls die mRNAs etlicher mitochondrialer Proteine gefunden, darunter auch die Untereinheit der Ubiquinol-Cytochrom c-Reduktase Qcr10 der mitochondrialen Atmungskette (König *et al.*, 2009). Zudem wurde in den iCLIP-Experimenten ebenfalls die mRNA der Chitinase Cts1 identifiziert (siehe 1.4 und 2.1).

Tabelle 3: Identifizierung von möglicherweise am Membrantransport beteiligter Kandidaten

Gen	um-Nr ¹	CLIP-Tags	Reproduzierbare Cluster ²	Quervernetzungsereignisse ³	Position von UAUG-enthaltenen Clustern ⁴
<i>vps27</i>	<i>um03862</i>	10	1	39	3'UTR
<i>vps60</i>	<i>um05282</i>	1	2	73	3'UTR
<i>did2</i>	<i>um05607</i>	0	0 ⁵	12 ⁵	ORF ⁶
<i>ips1</i>	<i>um05549</i>	7	5	947	ORF/3'UTR

¹ Zugangsnummer der Gene in der MUMDB (<http://mips.helmholtz-muenchen.de/genre/proj/ustilago>)

² vgl. Abb 9 B

³ Gesamtanzahl der Quervernetzungsereignisse innerhalb aller reproduzierbaren Cluster

⁴ siehe Abb. 16 A

⁵ Die *did2* mRNA weist 11 Quervernetzungsstellen auf

⁶ Drei Quervernetzungsstellen innerhalb der *did2* mRNA

Innerhalb der in dieser Arbeit identifizierten, potentiellen Ziel-mRNAs befanden sich auch Kandidaten, die auf eine mögliche Beteiligung von Rrm4 am Membrantransport hindeuteten. Einige dieser mRNAs kodierten für Komponenten der ESCRT (*endosomal sorting complex required for transport*)-Maschinerie. Die ESCRT-Maschinerie besteht aus vier Komplexen, welche an der Ubiquitin-abhängigen Sortierung von Membranproteinen über Endosomen in Lysosomen bzw. Vakuolen beteiligt sind (Henne *et al.*, 2011 ; Rusten *et al.*, 2012). Da eine Rrm4-abhängige Regulation der ESCRT-Maschinerie noch nicht bekannt war, wurden im weiteren Verlauf dieser Arbeit die mRNAs der ESCRT-0 Komponente Vps27, sowie der ESCRT-III assoziierten Komponenten Vps60 und Did2 untersucht. Von den drei mRNAs wurden *vps27* und *vps60* in beiden Ansätzen identifiziert, während *did2* hingegen nur in den iCLIP-Daten gefunden wurde. Innerhalb der *vps27* mRNA lagen zehn CLIP-Tags, sowie ein reproduzierbarer, in der 3'UTR liegender, UAUG-enhaltener Cluster (Tab. 3 und Abb. 16 A). Die identifizierten CLIP-Tags lagen interessanterweise innerhalb eines CA-reichen Abschnittes des offenen Leserahmens. Die *vps60* mRNA wiederum besaß einen CLIP-Tag und zwei reproduzierbare Cluster, wovon der in der 3'UTR liegende Cluster ebenfalls ein UAUG enthält. Der im ORF liegende Cluster überschneidet sich zudem mit dem einzigen CLIP-Tag der mRNA (Abb. 16 A). Demgegenüber schien die *did2* mRNA nur eine sehr schwache Ziel-mRNA von Rrm4 zu sein. Das Transkript besaß keine CLIP-Tags und es wurden nur elf Quervernetzungsstellen identifiziert, welche nicht als statistisch signifikante Cluster zusammengefasst werden konnten. Drei dieser Quervernetzungsstellen lagen aber innerhalb des ORFs in unmittelbarer Nähe zu einem UAUG (Abb. 16 A, Tab. 3). Ein weiterer, innerhalb der 400 gemeinsam identifizierten Ziel-mRNAs gefundener Kandidat, war *ips1*, welches für eine *myo*-Inositolphosphat synthase kodiert. Dieses Enzym katalysiert die Synthese von Inositol-3-Phosphat, welches ein essentieller Ausgangsstoff der Phospholipidsynthese ist (Michell, 2008 ; Carman und Han, 2011). Innerhalb der *ips1* mRNA wurden sieben CLIP-Tags und fünf Cluster identifiziert. Dabei enthielten je ein im ORF und in der 3'UTR liegender Cluster ein UAUG-Motiv (Abb. 16 A).

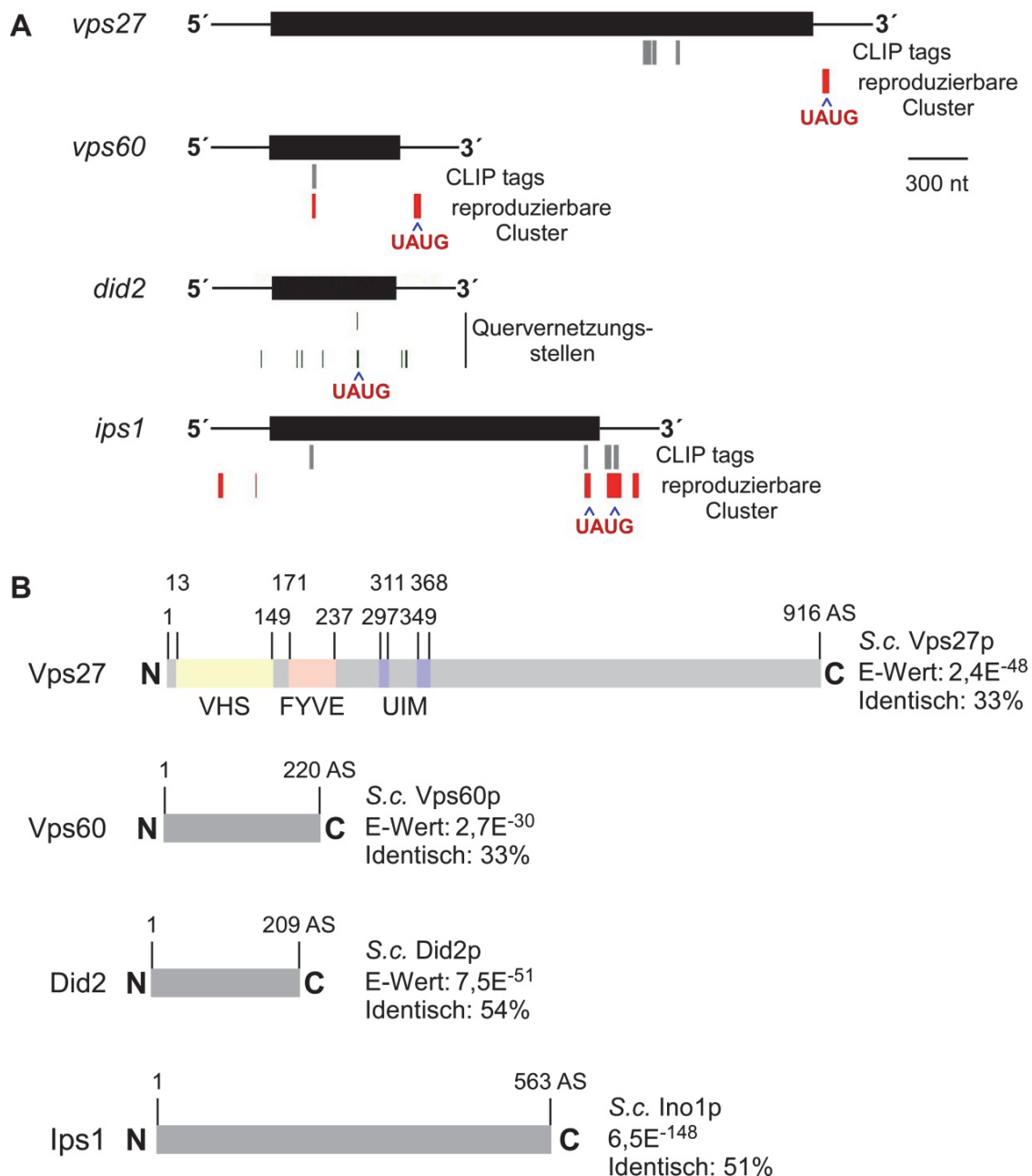


Abbildung 16: Rrm4 bindet mRNAs von mit Membrantransport assoziierten Komponenten

(A) Maßstabsgetreue Darstellungen der *vps27*, *vps60*, *did2* und *ips1* mRNAs. Exons sind als schwarze Balken, UTRs als dickere Linien abgebildet. Die Positionen der durch die Resequenzierung der CLIP Banken identifizierten CLIP-Tags sind als graue Balken vereinigt abgebildet. Die Positionen der reproduzierbaren iCLIP Cluster sind rot dargestellt. Die Positionen der Quervernetzungsstellen innerhalb der *did2* mRNA sind als dunkelgraue Linie abgebildet. Cluster, welche mindestens ein UAUG enthalten sind gesondert gekennzeichnet. (B) Maßstabsgetreue Darstellung der Domänenarchitektur der einzelnen Proteine. Domänen mit Hilfe der SMART-Datenbank identifiziert (<http://smart.embl.heidelberg.de>; Schultz *et al.*, 1998 ; Letunic *et al.*, 2012). Für jedes Protein sind die Gesamtlänge der Aminosäuresequenz, der Erwartungswert der Blast-Analyse des *S. cerevisiae* Homologs im *U. maydis* Genom sowie der prozentuale Anteil identischer Aminosäuren aufgeführt (MUMDB; <http://mips.helmholtz-muenchen.de/genre/proj/ustilago>)

Die in der MUMDB vorliegenden Annotationen wurden anhand von BLAST-Analysen der Aminosäuresequenzen überprüft. Zudem wurde die Domänenarchitektur der vier Proteine mit Hilfe der SMART-Datenbank untersucht (Schultz *et al.*, 1998 ; Letunic *et al.*, 2012). Innerhalb der Aminosäuresequenz von Vps27 konnten eine VHS-Domäne, eine FYVE-Domäne und zwei Ubiquitin-interagierenden Motiven vorhergesagt werden. VHS-Domänen (**Vps27**, **Hrs** und **STAM**) sind charakteristisch für Vps27 sowie weiteren am Membrantransport beteiligten Proteinen, während FYVE-Domänen zu den Phospholipid-bindenden Domänen gehören. Diese Domänen binden spezifisch das vor allem in Endosomen vorkommende Phospholipid PI3P (Phosphatidylinositol-3-phosphat; Lohi und Lehto, 1998 ; Stenmark *et al.*, 2002). Für die anderen drei Proteine konnten mit Hilfe der SMART-Datenbank keine annotierten Domänen vorhergesagt werden (Abb. 16 B).

Diese vier potentiellen Ziel-mRNAs von Rrm4 erwiesen sich als interessante Kandidaten, welche auf eine mögliche Verbindung zwischen Rrm4 und den Membrantransport sowie der Phospholipidsynthese hindeuteten. Es erscheint daher denkbar, dass der Rrm4-vermittelte mRNA-Transport während des filamentösen Wachstums an der lokalen Internalisierung von Membranproteinen sowie der lokalen Phospholipidsynthese beteiligt sein könnte.

2.9 ESCRT-assoziierte Proteine sind an der Regulation des unipolaren Wachstums beteiligt

Da sich die Deletion von *rrm4* in einem Verlust des unipolaren Wachstums während des filamentösen Wachstums äußert, wurde untersucht, ob eine mögliche Beteiligung der drei ESCRT-assoziierten Proteine an der Regulation des polaren Wachstums in Filamenten vorlag. Zu diesem Zweck wurden Deletionsmutanten im genetischen Hintergrund des Laborstamms AB33 hergestellt (Brachmann *et al.*, 2001 ; Brachmann *et al.*, 2004a). Das Gen *vps27* konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht erfolgreich deletiert werden, was auf eine essentielle Funktion des Proteins in *U. maydis* hindeutet. Die beiden Gene *vps60* und *did2* konnten hingegen erfolgreich deletiert werden. Die Deletion von *vps60* führte zu keinen Defekten der Zellmorphologie. Eine Beeinträchtigung des sporidialen und filamentösen Wachstums wurde nicht festgestellt (Abb. 17 A). Die Deletion von *did2* hatte ebenfalls keinen entscheidenden Einfluss auf die Zellmorphologie von Sporidien. Auf Festmedium konnte jedoch im Vergleich zum Ausgangsstamm reduziertes filamentöses Wachstum festgestellt werden. Das gebildete Luftmyzel glich dabei dem des *rrm4*-Deletionsstamms (Abb. 17 B). Die Ergebnisse des Tropftests deuteten somit auf eine Beteiligung von *did2* am filamentösen Wachstum hin.

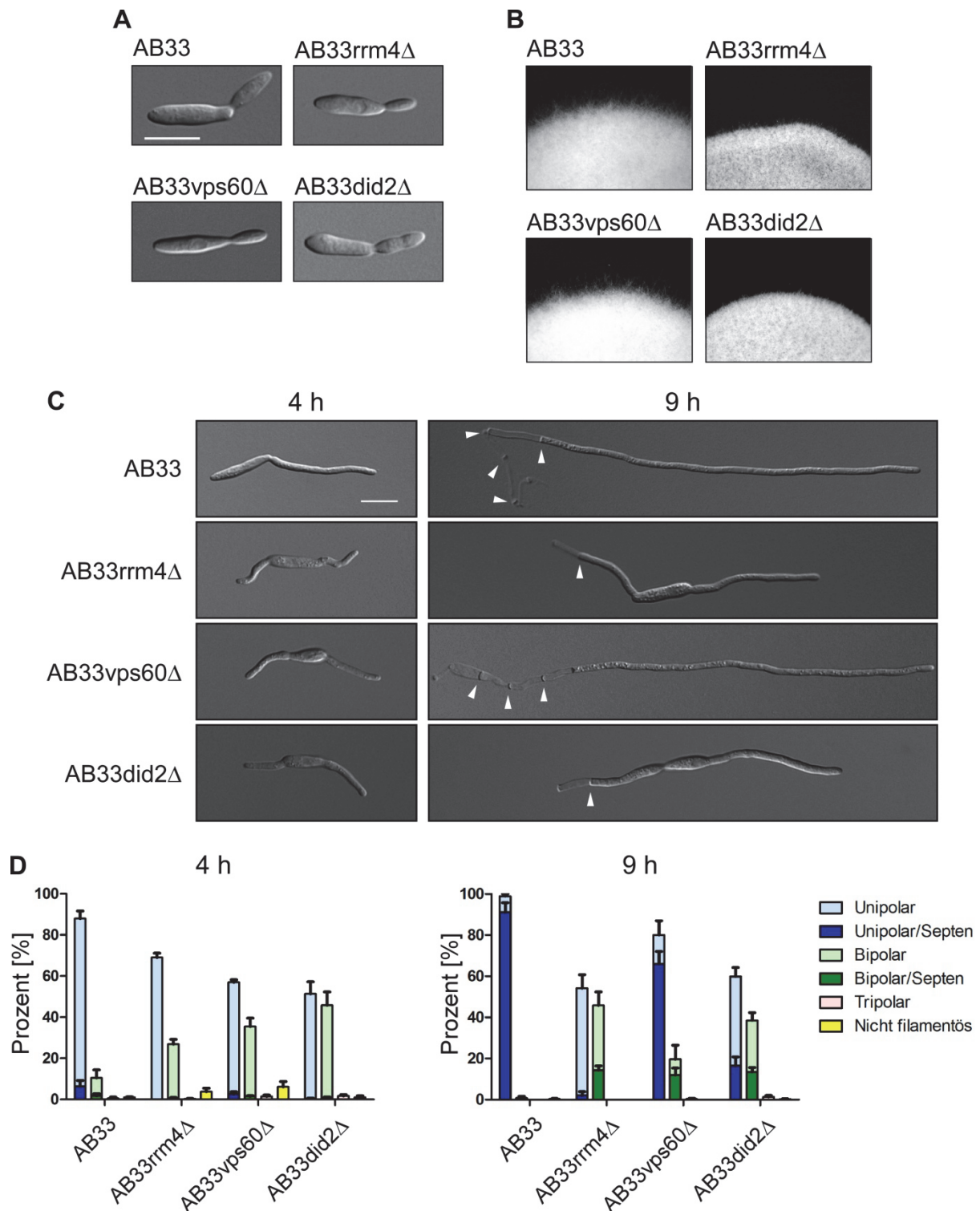


Abbildung 17: *vps60Δ* und *did2Δ* beeinflussen die Zellpolarität von Filamenten

(A) DIC-Aufnahmen von Sporidien. (B) Filamentöses Wachstum auf aktivkohlehaltigem Minimalmedium. Abgebildet ist jeweils der Rand einer Tropfkolonie. (C) DIC-Aufnahmen von Filamenten vier und neun Stunden nach Induktion des filamentösen Wachstums. Eingezogene Septen sind durch weiße Pfeilspitzen markiert. (D) Quantifizierung des unipolaren und bipolaren Wachstums vier und neun Stunden nach Induktion des hyphalen Wachstums. Abgebildet ist jeweils der Mittelwert von drei unabhängigen Experimenten. Die Fehlerbalken stellen den Standardfehler dar. Der in den mikroskopischen Aufnahmen abgebildete Größenmaßstab beträgt jeweils 10 μm .

Um den beobachteten Filamentationsdefekt auf Festmedium zu verifizieren, wurden Filamente in Flüssigmedium vier und neun Stunden nach Induktion des filamentösen Wachstums mikroskopisch untersucht. An beiden Zeitpunkten bildeten Zellen des Stammes AB33 eindeutig unipolar auswachsende Filamente aus. Nach neun Stunden war zudem die Bildung von Septen an den basalen Ende der Filamente deutlich zu erkennen (Abb. 17 C und D). Im Gegensatz hierzu zeigten AB33rrm4 Δ -Zellen sowohl vier Stunden, als auch neun Stunden nach Hypheninduktion verkürztes Längenwachstum und einen höheren Anteil bipolar auswachsender Filamente. Zudem bildeten AB33rrm4 Δ -Filamente neun Stunden nach Induktion nur geringfügig Septen (Abb. 17 C und D). Interessanterweise wuchs ein erheblicher Anteil der AB33vps60 Δ -Filamente vier Stunden nach Induktion des filamentösen Wachstums ebenfalls bipolar aus. Neun Stunden nach Induktion hingegen wuchs der Großteil der analysierten Filamente unipolar aus (Abb. 17 C und D). AB33did2 Δ zeigte sowohl nach vier Stunden als auch nach neun Stunden nach Induktion des filamentösen Wachstums verkürztes Längenwachstum, sowie eine erhöhte Anzahl bipolar ausgewachsener Filamente. Zudem war die Septenbildung in diesem Stamm erheblich reduziert (Abb. 17 C und D). Vereinzelt tripolar und nicht filamentös ausgewachsene Zellen wurden bei allen Stämmen beobachtet, jedoch war die Anzahl an tripolar wachsenden Filamenten bei AB33did2 Δ am höchsten (Abb. 17 D).

Diese Ergebnisse zeigten, dass die untersuchten Komponenten der ESCRT-Maschinerie am unipolaren Wachstum von *U. maydis* beteiligt sein könnten. Aufgrund der ungleichen Deletionsphänotypen scheinen Vps60 und Did2 jedoch unterschiedliche Funktionen auszuüben. Darüber hinaus deutet die phänotypische Ähnlichkeit zwischen *did2 Δ* - und *rrm4 Δ* -Stämmen auf eine funktionelle Verbindung zwischen dem Rrm4-vermittelten mRNA-Transport und dieser ESCRT-Komponente hin.

2.10 Die subzelluläre Lokalisation der ESCRT-Komponenten ist unabhängig von Rrm4

Anhand der Deletionsstudien konnte gezeigt werden, dass die untersuchten ESCRT-Komponenten an der Regulation des unipolaren, filamentösen Wachstums beteiligt sind. Zusammen mit den in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnissen der UV-Quervernetzungsansätze deutete dies auf eine funktionelle Verbindung zwischen dem Rrm4-vermittelten mRNA-Transport und der ESCRT-Maschinerie hin. In diesem Fall wäre es denkbar, dass die korrekte intrazelluläre Lokalisation der Proteine durch Rrm4 vermittelt wird. Um dies zu überprüfen wurde die intrazelluläre Lokalisation der drei ESCRT-Komponenten Vps27, Vps60 und Did2 in Abhängigkeit von Rrm4 untersucht. Die Analyse der Lokalisation der drei Proteine Vps27, Vps60 und Did2 erfolgte anhand von C-terminalen Fusionen mit dem grün fluoreszierenden Protein (Gfp). Alle drei Fusionsproteine (Vps27G, Vps60G und Did2G) wurden dabei im endogenen Lokus unter Kontrolle des nativen Promotors exprimiert. Zu diesem Zweck wurden die jeweiligen Konstrukte in den Laborstamm AB33 eingebracht. Um die Abhängigkeit der Proteinlokalisierung von Rrm4 untersuchen zu können, wurden die Fusionsproteine parallel in *rrm4*-Deletionsstämmen exprimiert.

Vps27G wurde erfolgreich in Zellen exprimiert. Die Zellmorphologie, sowie das sporidiale und filamentöse Wachstum von Zellen des resultierenden Stammes AB33vps27G wurden durch die Gfp-Fusion nicht gestört (Abb. 18 A). Die mikroskopische Analyse ergab, dass Vps27G in Sporidien und Filamenten in distinkten Partikeln lokalisierte, welche sich bidirektional bewegten (Abb. 18 A). In *S. cerevisiae* lokalisiert Vps27 an Endosomen (Katzmann *et al.*, 2003). Um zu überprüfen, ob Vps27G ebenfalls an Endosomen lokalisiert, wurden Kollokalisationsstudien mit dem lipophilen Farbstoff FM4-64 durchgeführt. FM4-64 färbt Plasmamembranen und über deren Internalisierung auch Endosomen und Vakuolen in Zellen an. Somit kann dieser Farbstoff zur Visualisierung endozytotischer Prozesse eingesetzt werden (Vida und Emr, 1995). Eine Kollokalisierung zwischen Vps27G-positiven Partikeln und FM4-64 gefärbten Endosomen konnte 1-2 min nach Zugabe des Farbstoffes beobachtet werden. Dies bestätigte die endosomale Lokalisation von Vps27G. Wider Erwarten erwies sich die Lokalisation von Vps27G als *rrm4*-unabhängig (Abb 18 A und B).

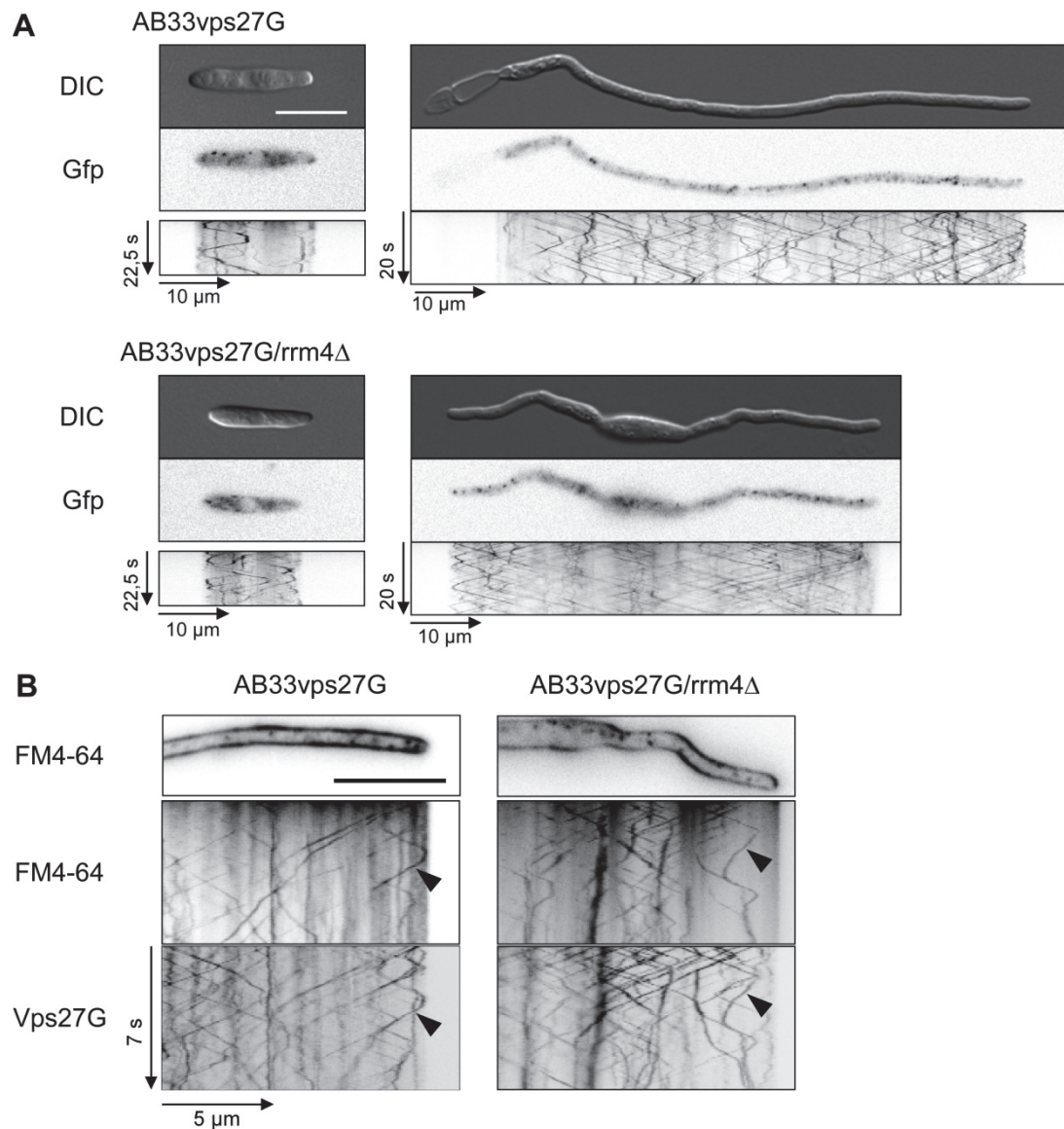


Abbildung 18: Vps27G lokalisiert unabhängig von Rrm4 an FM4-64 positive Endosomen

Mikroskopische Analysen zur intrazellulären Lokalisation von Vps27G. **(A)** DIC- und Gfp-Aufnahmen von Sporidien und Filamenten (sechs Stunden nach Induktion) der Stämme AB33vps27G und AB33vps27G/rrm4 Δ . Die bidirektionale Bewegung der Vps27G-enhaltenen Partikel ist in beiden Stämmen anhand der abgebildeten Kymographen zu erkennen. Der abgebildete Größenmaßstab entspricht 10 μ m. **(B)** Kolokalisationsstudie von Vps27G-enhaltenden Partikeln und FM4-64 gefärbten Endosomen in Filamentenspitzen, sechs Stunden nach Induktion des hyphalen Wachstums. Abgebildet sind mikroskopische Aufnahmen des Gfp- und Fm4-64-Signals. Kolokalisierende Vps27G-Partikel und FM4-64 positive Endosomen sind in den Kymographen beider Stämme durch schwarze Pfeilköpfe gekennzeichnet. Der in den mikroskopischen Aufnahmen abgebildete Größenmaßstab stellt 5 μ m dar.

Vps60G wurde ebenfalls erfolgreich exprimiert und ermöglichte somit die weitere fluoreszenzmikroskopische Analyse. Eine Beeinträchtigung des Wachstums, sowie eine fehlerhafte Morphologie wurden für Zellen und Filamente des Stammes AB33vps60G nicht beobachtet (Abb. 19 A). In Sporidien als auch in Filamenten lokalisierte Vps60G in distinkten punktuellen Strukturen sowie zirkulären, statischen Strukturen, welche möglicherweise Vakuolen darstellten (Abb. 19 A). Um die vakuoläre Lokalisation zu überprüfen, wurde das Lumen von Vakuolen mittels des Farbstoffs Celltracker Blue (CMAC) angefärbt (Stewart und Deacon, 1995 ; Steinberg *et al.*, 1998). Die CMAC-Färbungen zeigten, dass in Sporidien das Vps60G-Signal das Lumen von Vakuolen umschloss. Aufgrund der großen Anzahl an Vakuolen und deren geringen Größe war dies in Filamenten jedoch nicht eindeutig zu erkennen (Abb. 19 B). Ein verändertes Lokalisationsmuster des Proteins wurde in Abwesenheit von *rrm4* nicht festgestellt (Abb. 19 A und B).

Neben *vps27G* und *vps60G* konnte auch *did2G* erfolgreich transformiert werden. Während Sporidien des resultierenden Stammes AB33did2G eine zu AB33 vergleichbare Morphologie aufwiesen, wuchs jedoch ein erheblicher Anteil der induzierten Filamente bipolar aus (Abb. 20 A). Demzufolge erwies sich das Fusionsprotein als nicht funktionell (vgl. Abb. 17 C und D). Für die endosomale Lokalisation des Proteins ist der N-Terminus des Proteins erforderlich und ausreichend, so dass die C-terminale Fusion dennoch Aufschluss über die Lokalisation des Proteins liefern sollte (Nickerson *et al.*, 2006 ; Hervas-Aguilar *et al.*, 2010). In Filamenten lokalisierte Did2G in statischen und bidirektional transportierten Partikeln (Abb. 20 A). Anhand von FM4-64 Färbungen konnte gezeigt werden, dass es sich bei den bidirektional bewegenden Partikeln um Endosomen handelte (Abb. 20 B). Die statischen Partikel hingegen zeigten keine Kolokalisation mit FM4-64, so dass es sich bei diesen Strukturen eventuell um späte Endosomen handeln könnte. Des Weiteren erwies sich die Lokalisation von Did2G als *rrm4*-unabhängig. Zudem war das filamentöse Wachstum dieses Stammes stark gestört und die Internalisierung von FM4-64 erwies sich aufgrund der vergleichsweise stark gefärbten Plasmamembran als vermindert (Abb. 20 B).

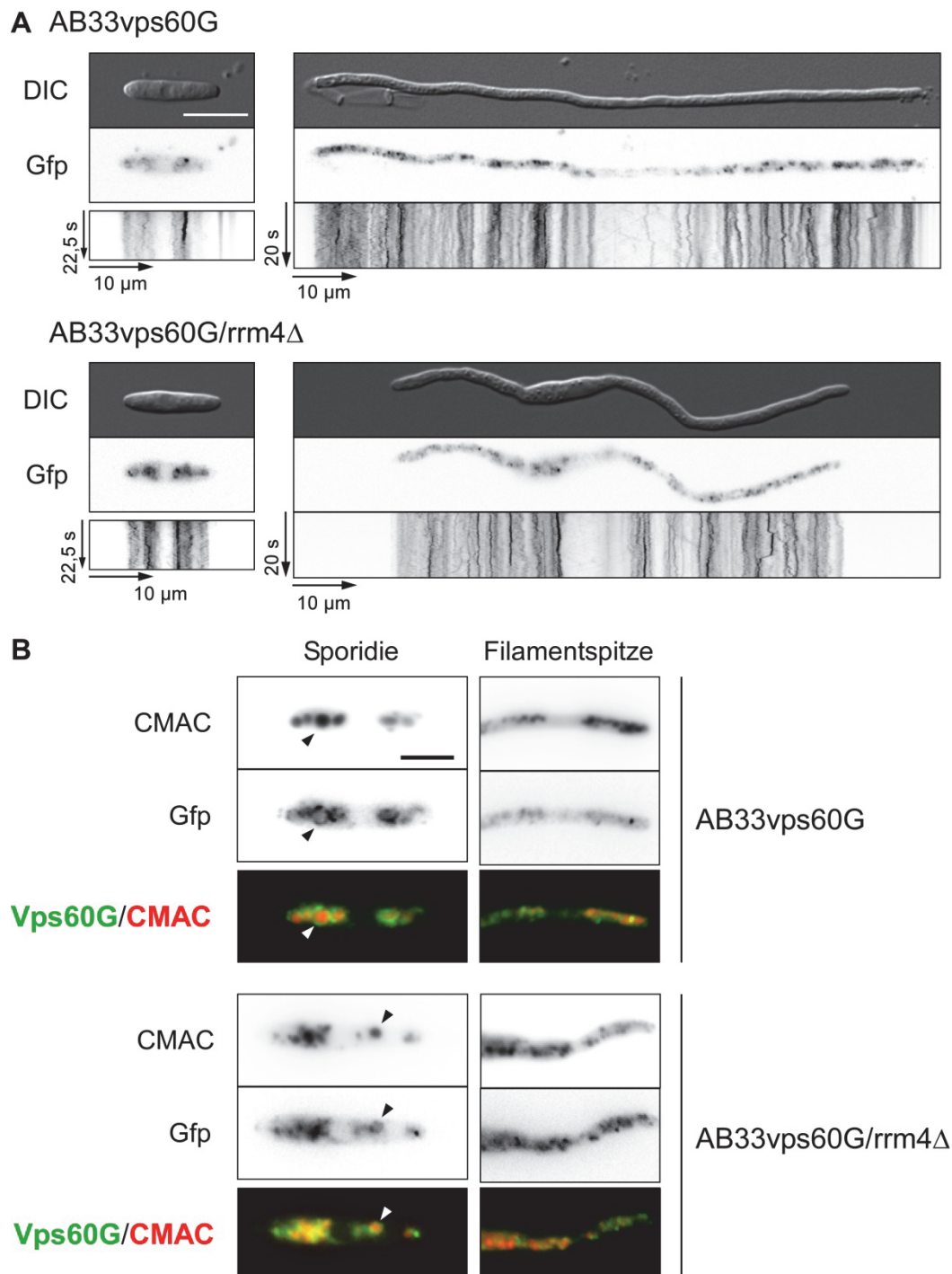


Abbildung 19: Die Lokalisation von Vps60G ist Rrm4-unabhängig (nachfolgende Seite)

Mikroskopische Analysen zur intrazellulären Lokalisation von Vps60G in Sporidien und Filamenten. **(A)** Mikroskopische DIC- und Gfp-Aufnahmen von Sporidien und Filamenten (sechs Stunden nach Induktion des filamentösen Wachstums) der Stämme AB33vps60G und AB33vps60G/rrm4Δ. Die statische Lokalisation von Vps60G ist in den Kymographen der beiden Stämme zu erkennen. Der abgebildete Größenmaßstab entspricht 10 μm. **(B)** Mikroskopische CMAC- und Gfp-Aufnahmen von Sporidien und Filamenten (sechs Stunden nach Induktion des filamentösen Wachstums) der Stämme AB33vps60G und AB33vps60G/rrm4Δ. Das CMAC- und das Gfp-Signal sind als Falschfarben übereinander gelegt. Die Pfeilköpfe markieren kolokalisierende Vps60G- und CMAC-Signale in Sporidien. Der Größenmaßstab entspricht 5 μm.

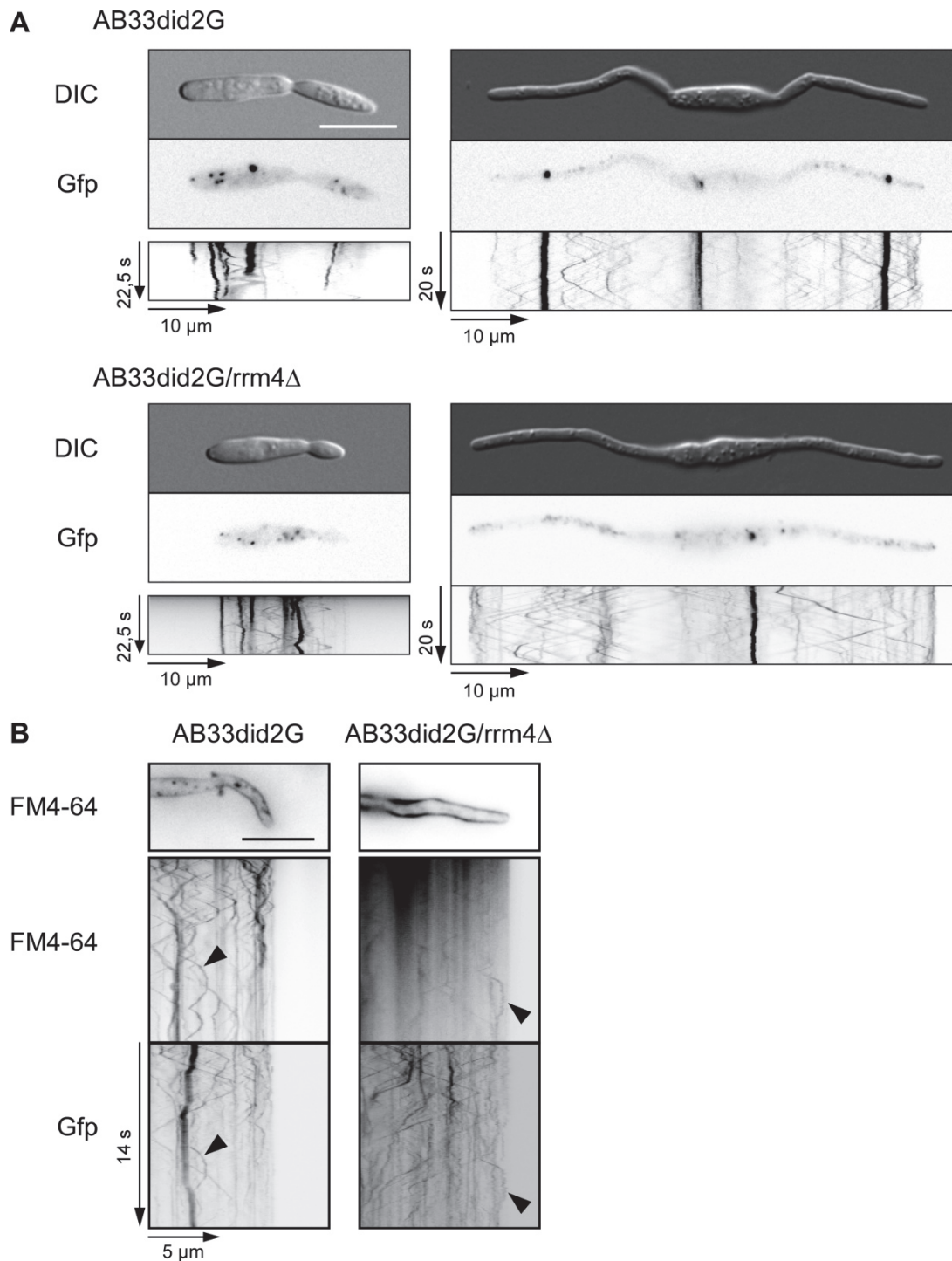


Abbildung 20: Die endosomale Lokalisation von Did2G ist Rrm4 unabhängig
(nachfolgende Seite)

Mikroskopische Analysen der intrazellulären Lokalisation von Did2G. **(A)** DIC und Gfp-Aufnahmen von Zellen und Filamenten (sechs Stunden nach Induktion des filamentösen Wachstums) der Stämme AB33did2G und AB33did2G/*rrm4 Δ . Der Größenmaßstab entspricht 10 μm . **(B)** Kolokalisationsstudie in den Stämmen AB33did2G und AB33did2G/*rrm4 Δ zwischen Did2G und FM4-64 gefärbten Endosomen, Abgebildet sind Aufnahmen des Gfp- und FM4-64 Signale in Filamentspitzen, sechs Stunden nach Induktion des filamentösen Wachstums. Die schwarzen Pfeilköpfe markieren in beiden Stämmen mit FM4-64 positiven Endosomen kolokalisierende**

Die Deletion von *rrm4* hatte ebenfalls keinen Einfluss auf die Proteinmenge der drei untersuchten Kandidaten in Filamenten. Anhand einer Westernanalyse konnte gezeigt werden, dass sich die Deletion von *rrm4* weder negativ noch positiv auf Expression der drei Fusionsproteine ausübte (Abb. 21). Interessanterweise fiel das beobachtete Molekulargewicht von Vps60G und Did2G größer als erwartet aus. Anstelle der vorhergesagten 53 kDa für Vps60G bzw. 50 kDa für Did2G wiesen beide Fusionsproteine eine Größe von ~60 kDa auf. Im Falle von Vps60G wurde eine schwache Bande beobachtet, welche dem vorhergesagten Molekulargewicht von 53 kDa entsprach (Abb. 21). Diese Beobachtung könnte auf eine posttranslationelle Modifikation von Vps60 und Did2 zurückzuführen sein.

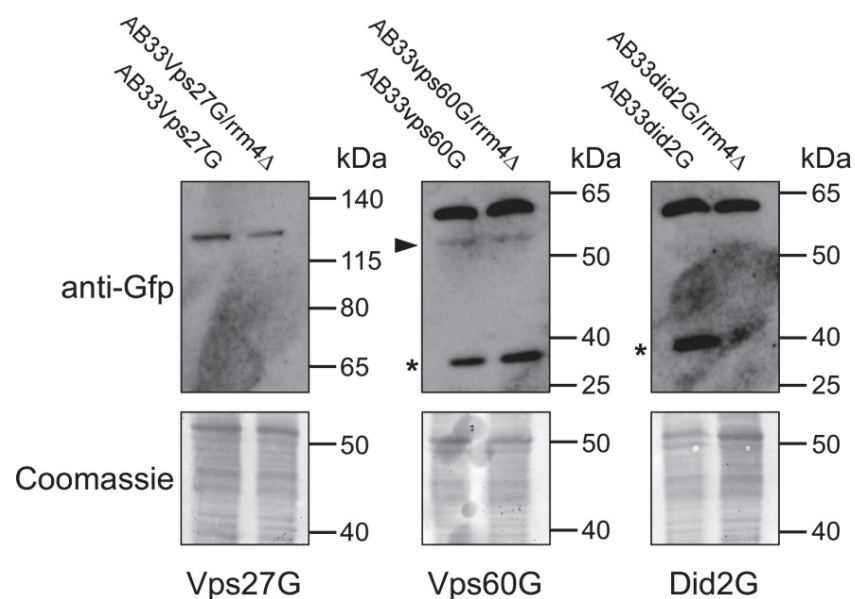


Abbildung 21: Die Deletion von *rrm4* hat keinen Einfluss auf die Gesamtproteinmenge von Vps27G, Vps60G und Did2G

Oben: Nachweis der Expression von Vps27G, Vps60G und Did2G per Gfp-Antikörper aus Gesamtproteinextrakt von Filamenten, sechs Stunden nach Induktion des filamentösen Wachstums. Die theoretischen Größen der Fusionsproteine betragen: Vps27G (126 kDa), Vps60G (53 kDa) und Did2G (50 kDa). Mit einem Stern sind C-terminale Fragmente markiert, welche Gfp (27 kDa) enthalten. Der schwarze Pfeilkopf markiert potentiell unmodifiziertes Vps60. Je Probe wurden 11 µg Gesamtprotein aufgetragen. *Unten:* Coomassiefärbung der Membran als Ladekontrolle.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Deletion von *rrm4* keinen Einfluss auf die Lokalisation und Proteinexpression der drei untersuchten ESCRT-Komponenten hat. Das Fusionsprotein Did2G schien allerdings nicht funktionell zu sein, so dass dessen Lokalisations- und Proteinexpressionsdaten unter Vorbehalt zu betrachten sind. In welchem Umfang und ob Rrm4 Einfluss auf die Funktion der drei untersuchten ESCRT-Komponenten nimmt, konnte im Rahmen dieser Arbeit vorerst nicht geklärt werden.

2.11 Die *myo*-Inositolphosphatsynthase *Ips1* ist essentiell für das filamentöse Wachstum

Die Rolle der *myo*-Inositolphosphatsynthase *Ips1* während des filamentösen Wachstums wurde anhand einer Deletionsstudie untersucht. Die Deletion des *ips1* Gens erfolgte hierbei im Laborstamm AB33. Tropftests auf aktivkohlehaltigem Minimalmedium ergaben, dass das filamentöse Wachstum erheblich durch die Deletion von *ips1* gestört wurde (Abb. 22 A). Der Verlust der homologen Inositol-3-Phosphatsynthase *INO1p* in *S. cerevisiae* äußert sich in einer Inositolauxotrophie, welche durch Zugabe von Inositol komplementiert werden kann (Culbertson und Henry, 1975). Es wurde daher untersucht, ob der Phänotyp des *ips1*-Deletionsstammes ebenfalls durch Zugabe von Inositol komplementiert werden kann. Erwartungsgemäß ließ sich das gestörte filamentöse Wachstum des *ips1*-Deletionsstammes auf aktivkohlehaltigen Minimalmediumplatten durch Zugabe von 100 μ M *myo*-Inositol komplementieren (Abb. 22 A).

Die mikroskopische Analyse ergab, dass Sporidien des Stammes AB33*ips1* Δ keine defekte Zellmorphologie aufwiesen (Abb. 22 B). Im Vergleich zu dem Ausgangstamm AB33 bildeten AB33*ips1* Δ -Sporidien jedoch nach Induktion des filamentösen Wachstums nur sehr kurze Filamente aus (Abb. 22 B). Dies zeigte, dass die *Ips1*-vermittelte Inositolphosphatsynthase essentiell für das filamentöse Wachstum von *U. maydis* ist.

Da Inositol ein wichtiger Bestandteil von Phospholipiden ist, wurde untersucht, ob der beobachtete Defekt des filamentösen Wachstums eventuell auf eine Störung der Membrandynamik und des endosomalen Transports zurückzuführen war. Zu diesem Zweck wurden Filamente der Stämme AB33 und AB33*ips1* Δ mit dem Farbstoff FM4-64 gefärbt. Im Gegensatz zu AB33 konnte keine Internalisierung von FM4-64 ein bis zwei Minuten nach Zugabe des Farbstoffes in Filamenten von AB33*ips1* Δ beobachtet werden. Es war lediglich eine starke Färbung der Plasmamembran zu beobachten (Abb 22 C). Dieses Ergebnis wies darauf hin, dass aufgrund der Deletion von *ips1* die Membraninternalisierung in Filamenten gestört war.

Aufgrund dieser Ergebnisse erwies sich *Ips1* für das filamentöse Wachstum als essentiell und scheint auch den Membrantransport zu beeinflussen. In welchem Umfang der Membrantransport aufgrund der *ips1*-Deletion gestört wird, sollte in Folgeprojekten detaillierter untersucht werden.

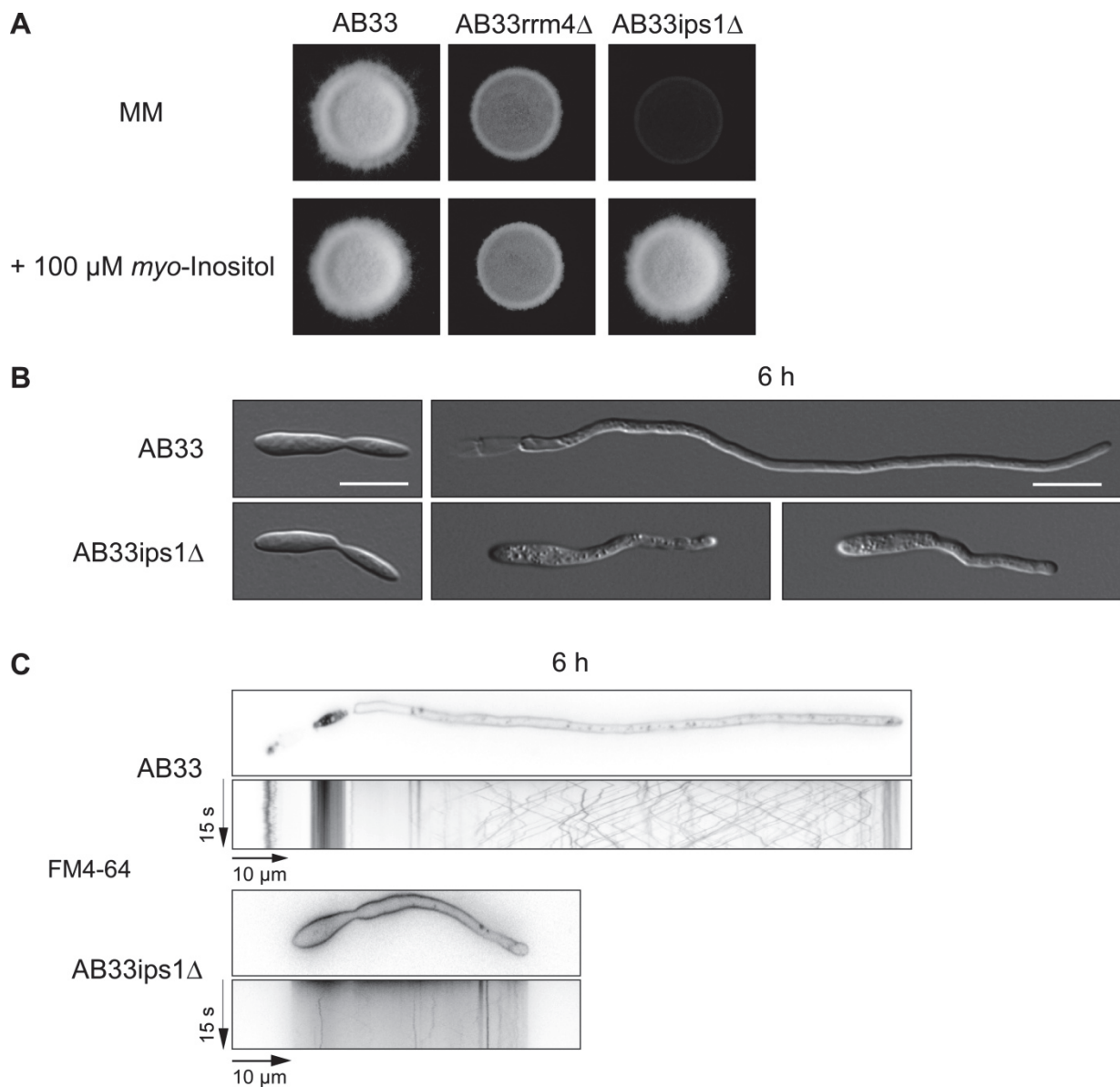


Abbildung 22: *Ips1* wird für das filamentöse Wachstum von *U. maydis* benötigt

(A) Filamentöses Wachstum auf aktivkohlehaltigem Minimalmedium. (B) DIC-Aufnahmen von Sporidien und Filamenten des Stamms AB33MIPS Δ . Filamente wurden sechs Stunden nach Induktion des filamentösen Wachstums mikroskopiert. Der Größenmaßstab entspricht 10 μ m. (C) Internalisierung von FM4-64 in AB33ips1 Δ -Filamenten. Die Färbung wurde sechs Stunden nach Induktion des filamentösen Wachstums durchgeführt. Der eingezeichnete Größenmaßstab entspricht 10 μ m.

2.12 Die Sekretion der Chitinase Cts1 weist auf eine mögliche Verbindung zu Membrantransport hin

Die Deletion von *rrm4* äußert sich in der verringerten Sekretion der Chitinase Cts1 (Koepeke *et al.*, 2011). Cts1 wird dabei nicht konventionell über das endoplasmatische Retikulum und dem Golgi-Apparat, sondern unkonventionell über einen bislang unbekanntem Mechanismus sekretiert (Stock *et al.*, 2012). Da die Deletionen von *vps60*, *did2* und *ips1* das filamentöse Wachstum beeinflussten, wurde zusätzlich untersucht, ob die Sekretion von Cts1 ebenfalls durch die Deletion dieser Gene beeinflusst wird. Hierzu wurde die endochitinolytische Aktivität von Sporidien sowie Filamente sechs Stunden nach Induktion des Hyphenwachstums anhand des spezifischen Substrats 4-Methylumbelliferyl- β -D-N,N',N''-Triacetylchitotriosid (MUC) fluorimetrisch gemessen (Koepeke *et al.*, 2011 ; Stock *et al.*, 2012). Als Kontrollen für die Messung dienten die Stämme AB33 und AB33*rrm4* Δ . Um einen direkten Vergleich innerhalb einer Messreihe zwischen den einzelnen Stämmen zu ermöglichen, wurden die gemessenen relativen Fluoreszenzeinheiten (RFU: *relative fluorescence units*) auf die optische Dichte des jeweiligen Stammes normalisiert. Zudem wurden alle Werte einer Messreihe auf den Ausgangsstamm AB33 normalisiert. Die Messungen ergaben, dass in den Sporidien der untersuchten Stämme keine signifikanten Unterschiede bezüglich der endochitinolytischen Aktivität von Cts1 vorlagen (Abb. 23). Unterschiede wurden hingegen während des filamentösen Wachstums festgestellt. Im Falle von AB33*vps60* Δ wurde eine leichte Steigerung der endochitinolytischen Aktivität im Vergleich zu AB33-Filamenten gemessen. Bei Filamenten der beiden Stämme AB33*did2* Δ und AB33*ips1* Δ hingegen wurde eine deutliche, zu Filamenten des Stammes AB33*rrm4* Δ vergleichbare, Reduktion der endochitinolytischen Aktivität gemessen (Abb. 23). Die bereits anhand der ähnlichen Deletionsphänotypen angedeutete Verbindung zwischen Rrm4 und den untersuchten Kandidaten wurde anhand dieser Ergebnisse zusätzlich unterstützt. Zudem zeigten diese Daten auf eine mögliche Verbindung zwischen der unkonventionellen Sekretion von Cts1 und dem Membrantransport hin.

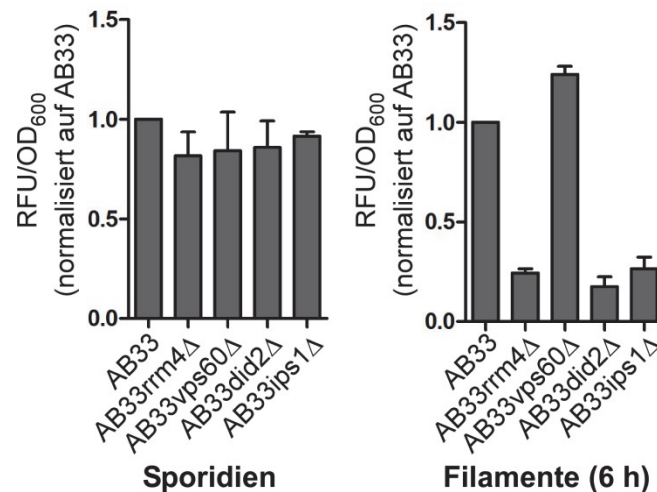


Abbildung 23: Die Cts1-Sekretion während des filamentösen Wachstums ist abhängig vom Membrantransport

Endochitinolytische Aktivitätsmessungen von Sporidien und Filamente (sechs Stunden nach Induktion des filamentösen Wachstums). Die gemessene Fluoreszenz (RFU; *relative fluorescence units*) wurde zunächst auf die optische Dichte der Proben normalisiert. Anschließend wurden die erhaltenen RFU/OD₆₀₀-Werte auf den Ausgangsstamm AB33 normalisiert. Die Messungen wurden dreimal unabhängig voneinander durchgeführt. Abgebildet ist der Mittelwert der Messungen. Der Fehlerbalken stellt den Standardfehler dar.

Die durch die HITS-CLIP und iCLIP-Daten angedeutete Verbindung zwischen Rrm4 und dem Membrantransport wurde anhand der phänotypischen Ähnlichkeiten der Deletionsstämme von *rrm4* und den untersuchten ESCRT-Komponenten *vps60* und *did2* bestätigt. Die Lokalisation der untersuchten ESCRT-Komponenten erwies sich jedoch als Rrm4 unabhängig. Im Falle der Inositolphosphat synthase *Ips1* zeigte die initiale Charakterisierung der *ips1*-Deletion, dass dieses Enzym ebenfalls für filamentöses Wachstum, Membrantransport und Sekretion von Cts1 benötigt wird.

3. Diskussion

RNA-bindende Proteine spielen als ko- und posttranskriptionelle Regulatoren eine wichtige Rolle in Entwicklungsprozessen. So wird zum Beispiel die Etablierung der Zellpolarität durch aktiven mRNA-Transport und dem hierdurch vermittelten Aufbau asymmetrischer Gradienten von Morphogenen gesteuert (St Johnston, 2005 ; Martin und Ephrussi, 2009 ; Medioni *et al.*, 2012). In *U. maydis* ist Rrm4 der Schlüsselfaktor des Mikrotubuli-abhängigen mRNA-Transports und wird für unipolares Wachstum von Filamenten benötigt. Anhand erster CLIP-Experimente wurden zuvor eine kleine Anzahl Ziel-mRNAs identifiziert, jedoch blieb der Umfang der posttranskriptionellen Regulation durch Rrm4 weiterhin unklar (König *et al.*, 2009).

Ziel dieser Arbeit war es die durch Rrm4 gebundenen Transkripte auf der transkriptomweiten Ebene zu identifizieren. Zu diesem Zweck wurden mit der Hochdurchsatzsequenzierung existierender CLIP-Banken (HITS-CLIP) und der iCLIP Methode zwei umfangreiche Ansätze durchgeführt, von denen letztere ein umfassenderes Bild lieferte. Auf diese Weise gelang es zum ersten Mal Bindestellen von Rrm4 im Detail aufzulösen. Dies ermöglichte die Identifizierung eines neuen Bindemotivs, welches im Hefe-Drei-Hybrid-System die Interaktion mit Rrm4 vermittelte. Die beiden CLIP-basierten Ansätze zeigten, dass Rrm4 eine Vielzahl von mRNAs bindet, deren kodierten Proteine diverse Funktionen ausüben. Neben Polaritätsfaktoren wurden beispielsweise die mRNAs einiger Komponenten der ESCRT-Maschinerie identifiziert. Initiale genetische Studien zu diesen Ziel-mRNAs lieferten erste Hinweise, dass die untersuchten ESCRT-Komponenten in *U. maydis* am unipolaren Wachstum von Filamenten sowie der Sekretion der Chitinase Cts1 beteiligt sind. In dieser Arbeit konnten somit neue Komponenten des unipolaren Wachstums identifiziert werden, wobei die exakte Verbindung zu dem Rrm4-vermittelten mRNA-Transport aber noch unklar bleibt.

3.1 Transkriptomweiter Einblick in den Rrm4-vermittelten mRNA-Transport

Das Bindeverhalten von Rrm4 konnte im Rahmen dieser Arbeit anhand der beiden CLIP-basierten Methoden zum ersten Mal ausführlich analysiert werden. Im Vergleich zu den zuvor identifizierten 78 CLIP-Tags wurde in dieser Arbeit eine weitaus größere Anzahl an genomischen Loci identifiziert (vgl. Abb. 4 B und 9 C; König *et al.*, 2009). Von den beiden Ansätzen erwies sich im direkten Vergleich jedoch die iCLIP-Analyse als wesentlich umfangreicher. Dies zeigte sich insbesondere in der Anzahl der identifizierten genomischen Loci (65 551 Quervernetzungsstellen gegenüber 2 551 CLIP-Tags). Obwohl die durchgeführten iCLIP-Experimente sich in ihrem Umfang stark voneinander unterschieden, zeigte sich das Potential der iCLIP-Methode anhand des umfangreichsten Replikats, Experiment 1. Aus diesem Grund sollten weitere iCLIP-Experimente dieser Qualität die

Auflösung der in dieser Arbeit erhaltenen Daten noch steigern können.

In Übereinstimmung mit der Funktion von Rrm4 als Schlüsselfaktor des Mikrotubuli-abhängigen mRNA-Transports bestätigten die in dieser Arbeit gewonnenen Daten, dass Rrm4 primär mRNAs bindet. Der Großteil der in der HITS-CLIP und iCLIP-Analyse gefundenen genomischen Loci lag diesbezüglich innerhalb von mRNAs, wobei in der iCLIP-Analyse ein weitaus größerer Anteil innerhalb Protein-kodierender Regionen lag (78% der reproduzierbaren Cluster im Vergleich zu 61% der CLIP-Tags). Bereits in der ersten Analyse der Rrm4 CLIP-Banken lagen 90% der identifizierten Loci innerhalb von mRNAs (König *et al.*, 2009). Diesbezüglich muss im Falle der Resequenzierung der beiden CLIP-Banken eine potentielle Überrepräsentation von RNA-Artefakten berücksichtigt werden, da experimentell bedingt beide Banken im Rahmen der CLIP-Experimente und Hochdurchsatzsequenzierung in mehreren PCR-Reaktionen amplifiziert wurden (vgl. Ergebnisse 2.1; König *et al.*, 2009). Dies könnte den vergleichsweise großen Anteil von CLIP-Tags des vereinigten Datensatzes (39%) erklären, welche außerhalb von mRNAs liegen.

Im Vergleich zu den 55 zuvor identifizierten Kandidaten (König *et al.*, 2009) konnte in dieser Arbeit eine erheblich größere Anzahl an gebundenen mRNAs identifiziert werden. Mit 948 bzw. 1.106 potentiellen Ziel-mRNAs scheint Rrm4 eine sehr große Anzahl verschiedener mRNAs zu binden. Der Einsatz von Hochdurchsatzsequenzierungsverfahren anstelle der Sanger-Sequenzierung führte zu einer deutlich gesteigerten Sensitivität von CLIP-basierten Methoden, wodurch umfangreiche Analysen des Bindeverhaltens von RBPs auf genomweiter Ebene ermöglicht werden (König *et al.*, 2011). Diesbezüglich ist die große Anzahl der in dieser Arbeit gefundenen potentiellen Ziel-mRNAs vergleichbar mit den Resultaten anderer CLIP-basierter Studien. So umfasste die Anzahl identifizierter Ziel-mRNAs beispielsweise für die humanen RBPs hnRNP C, FMRP, HuR, sowie den murinen Spleißregulatoren SRSF3 und SRSF4 von mehreren hunderten bis hin zu mehreren tausenden Transkripten (König *et al.*, 2010 ; Darnell *et al.*, 2011 ; Lebedeva *et al.*, 2011 ; Mukherjee *et al.*, 2011 ; Ascano *et al.*, 2012). Aufgrund der hohen Sensitivität der neuen CLIP-basierten Methoden können jedoch auch unspezifische Interaktionen detektiert werden. Dies wurde in einer vergleichbaren Studie mit dem RBP HuR deutlich. Der Vergleich von RIP-CHIP (RNA-Immunopräzipitation kombiniert mit Microarrays; Tenenbaum *et al.*, 2000) und PAR-CLIP Experimenten zeigte, dass nur ein sehr geringer Anteil der 7.470 PAR-CLIP-Kandidaten (16%) überlappend durch beide Ansätze identifiziert wurde. Die weitere Analyse dieser überlappenden Kandidaten ergab, dass durch RIP-CHIP eher stabile und spezifische Interaktionen nachgewiesen wurden, während PAR-CLIP hingegen sowohl stabile als auch instabile Interaktionen detektierte (Mukherjee *et al.*, 2011).

Aufgrund der gesteigerten Sensitivität der neuen Methoden besteht die Herausforderung innerhalb der gewonnenen Daten zwischen spezifischen und unspezifischen Interaktionen zu

unterscheiden. In dieser Arbeit ergab der Vergleich der identifizierten Ziel-mRNAs, dass nur ein Teil der Transkripte (400 mRNAs) reproduzierbar in beiden Ansätzen gefunden wurde. Während bislang nur qualitative Aussagen bezüglich gebundener RNA-Moleküle möglich waren, ermöglichen es die neuen CLIP-Methoden, wie z.B. iCLIP, auch quantitative Aussagen bezüglich des Bindeverhaltens zu treffen (König *et al.*, 2010 ; König *et al.*, 2011). Die quantitative Auswertung der iCLIP-Daten deutete an, dass es sich bei diesen mRNAs aufgrund der Vergleichsweise höheren Anzahl an Quervernetzungsstellen pro Cluster möglicherweise um stärker gebundene Kandidaten handelte. Hierbei muss jedoch berücksichtigt werden, dass in CLIP-Experimenten die Anzahl an isolierten Sequenzen durch mehrere Faktoren, wie z.B: Quervernetzungseffizienz, Stabilität oder Expressionsstärke der mRNA, beeinflusst wird. Aus diesem Grund stellt dies kein ideales Maß zur Ermittlung der Bindeaffinität dar (König *et al.*, 2011). Es wurde außerdem auch keine Anreicherung von Motiv-enhaltenen Bindestellen (UAUG-enhaltene Cluster) innerhalb dieser mRNAs festgestellt, was zusätzlich auf spezifische und stabile Interaktionen hingedeutet hätte. Aufgrund dessen scheint es sich daher bei den 400 mRNAs möglicherweise eher um sehr stabile und/oder stark exprimierte Transkripte zu handeln. Aufgrund der Abhängigkeit der Anzahl an isolierten Sequenzen von der Expressionsstärke der Transkripte, ist für einen transkriptomweiten Vergleich von Bindestellen eine zusätzliche Normalisierung der CLIP-Daten erforderlich. Identifizierte Bindestellen können dabei auf die durchschnittliche Anzahl an isolierten Sequenzen pro mRNA oder deren Expressionsstärke normalisiert werden (Kishore *et al.*, 2011 ; König *et al.*, 2011). Diesbezüglich wird jedoch die Normalisierung der gewonnenen Daten auf die Expressionsstärke der mRNAs empfohlen (Kishore *et al.*, 2011). Vergleichbare und unter den gleichen Wachstumsparametern erhaltene Expressionsdaten sind für *U. maydis* bislang noch nicht vorhanden. Eine Methode, um diese zu erhalten, wäre beispielsweise die Durchführung von RNA-Seq Experimenten (Wang *et al.*, 2009). Ein limitierender Faktor der transkriptomweiten Erfassung gebundener RNA-Moleküle in CLIP-basierten Experimenten ist die Herstellung umfangreicher cDNA-Banken aus den isolierten RNA-Sequenzen. Aufgrund der zum Teil sehr geringen Ausgangsmenge an RNA und der aufwendigen Protokolle sind CLIP cDNA-Banken oftmals nicht gesättigt (König *et al.*, 2011). Diesbezüglich erwiesen sich auch beide in dieser Arbeit analysierten Ansätze als nicht gesättigt. Dennoch ermöglichten insbesondere die iCLIP-Experimente anhand der umfangreichen und detaillierten Daten einen ersten transkriptomweiten Einblick in den Rrm4-vermittelten mRNA-Transport in *U. maydis*.

3.2 Die globale Rolle des Rrm4-vermittelten mRNA-Transports

Die große Anzahl an gebundenen mRNAs sowie die funktionelle Vielfalt der kodierten Proteine deuten darauf hin, dass der Rrm4-vermittelte mRNA-Transport scheinbar eine

globale Rolle während des filamentösen Wachstums von *U. maydis* spielt. Die erste Analyse der CLIP-Banken zeigte bereits, dass Rrm4 die mRNAs von Polaritätsfaktoren, an der Proteinsynthese beteiligte Faktoren, sowie mitochondrieller Proteine bindet (König *et al.*, 2009). Eine große Anzahl an gebundenen Ziel-mRNAs kann jedoch nicht immer als Indiz für eine globale Funktion des Proteins gewertet werden. FMRP bindet beispielsweise spezifisch Transkripte von Faktoren der neuronalen und synaptischen Signaltransmission, sowie der durch kleine GTPasen-vermittelten Signaltransduktion. Obwohl FMRP mit einer großen Anzahl an mRNAs in Neuronen interagiert, scheint der FMRP-vermittelte mRNA-Transport eine eher spezifische Funktion auszuüben (Darnell *et al.*, 2011 ; Ascano *et al.*, 2012). Die in dieser Arbeit durchgeführten FunCat-Analysen (Ruepp *et al.*, 2004) zeigten jedoch, dass im Vergleich der Rrm4-vermittelte Transport eine Vielzahl von Prozessen zu regulieren scheint. Die Funktion von Rrm4 scheint sich dabei auf den Transport von mRNA zu beschränken. Aufgrund der sehr geringen Anzahl von intronischen Bindestellen erscheint eine Beteiligung von Rrm4 an der Prozessierung von prä-mRNA sehr unwahrscheinlich. Dies spiegelt sich auch in der der zytoplasmatischen Lokalisation des Proteins wieder (Becht *et al.*, 2006). Des Weiteren deuten DIGE-Experimente an, dass Rrm4 nicht an der Regulation der Translation involviert zu sein scheint. Nur eine sehr kleine Anzahl an Proteinen wurde in *rrm4*-Deletionsstämmen als differentiell exprimiert identifiziert (Koepke *et al.*, 2011). Auch eine Beteiligung von Rrm4 an der Regulation der Stabilität gebundener mRNAs kann ausgeschlossen werden. Untersuchungen der globalen mRNA-Menge in Wildtyp- und *rrm4*-Deletionsstämmen mittels Microarray-Experimente lieferten keinen Hinweis darauf, dass Rrm4 die Stabilität von mRNAs weder positiv noch negativ reguliert (M. Scherer und M. Feldbrügge, persönliche Mitteilung). Diesbezüglich könnten RNA-Seq Experimente zeigen, ob Transkripte in Abwesenheit von *rrm4* differentiell exprimiert werden. Insgesamt scheint Rrm4 aber eine duale Funktion einzunehmen. Neben der spezifischen Lokalisation von Proteinen scheint der Rrm4-vermittelte mRNA-Transport auch, einem „molekularen Mixer“ entsprechend, die Verteilung von mRNAs im Zytoplasma zu gewährleisten. Dementsprechend beeinflusst die Deletion von *rrm4* die zytoplasmatische Verteilung des Poly(A)-bindenden Proteins Pab1 und führt zu einer verstärkten Akkumulation des Proteins im perinukleären Raum von Filamenten (König *et al.*, 2009). Diesbezüglich vermittelt in *S. cerevisiae* der She2p-vermittelte mRNA-Transport neben der asymmetrischen auch die symmetrische Lokalisation von Proteinen (vgl. Einleitung 1.2). Neben der *ASH1* mRNA (siehe Einleitung 1.2; Heym und Niessing, 2012), transportiert She2p noch weitere Transkripte, von denen der Großteil für membrangebundene Proteine kodiert (Shepard *et al.*, 2003). Eine der durch She2p transportierten mRNAs ist die *IST2* mRNA, welche für ein Membranprotein kodiert, das in der Plasmamembran der Mutter- und Tochterzelle lokalisiert (Jüschke *et al.*, 2004). Der Verlust des She2p-vermittelten mRNA-Transports äußert sich in

dem Verlust der Membranlokalisation von Ist2p in Tochterzellen (Jüschke *et al.*, 2004).

3.3 Spezifische Funktionen des Rrm4-vermittelten mRNA-Transports

Die FunCat-Analyse (Ruepp *et al.*, 2004) ergab, dass Rrm4 eine Vielzahl von biologischen Prozessen reguliert. Signifikante Anreicherungen wurden in funktionellen Kategorien wie Proteinsynthese, Energie oder zellulären Transport festgestellt. Bereits die ersten, in den CLIP-Experimenten identifizierten Ziel-mRNAs kodierten neben Polaritätsfaktoren u.a. auch für ribosomale und mitochondrielle Proteine, so dass die zuvor beobachtete Beteiligung von Rrm4 an Proteinsynthese und Energiemetabolismus in dieser Arbeit bestätigt werden konnte (König *et al.*, 2009). Insgesamt deuteten die im Rahmen dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse an, dass die Rrm4-abhängige Regulation der Zellpolarität von mehreren Prozessen abhängig ist und zudem nicht die einzige Funktion von Rrm4 darstellt.

3.3.1 Neue Ziel-mRNAs des Rrm4-vermittelten mRNA-Transports

Anhand der HITS-CLIP- und iCLIP- Analysen wurde eine Vielzahl von mRNAs identifiziert, welche eine Beteiligung des Rrm4-vermittelten mRNA-Transport an weiteren zellulären Prozessen, wie z.B. Sekretion oder Membrantransport (siehe unten) andeuteten. Bezüglich der Proteinsekretion wurde kürzlich gezeigt, dass Rrm4 an der unkonventionellen Sekretion der Chitinase Cts1 beteiligt ist (Stock *et al.*, 2012). Cts1 wurde proteinbiochemisch anhand von DIGE-Experimenten als möglicher Zielkandidat von Rrm4 identifiziert und im Einklang damit wurde sowohl durch die HITS-CLIP Analyse (vgl. Einleitung 1.4, Koepke *et al.*, 2011) als auch in der iCLIP-Analyse eine Bindung der zugehörigen mRNA durch Rrm4 gezeigt. Es ist denkbar, dass Rrm4 die Sekretion weiterer Proteine reguliert. In diesem Fall wäre zu klären, ob es sich dabei ausschließlich um unkonventionell sekretierte Proteine oder auch um konventionell sekretierte Proteine handeln würde. Generell ist die lokale Akkumulation von mRNAs, welche für sekretierte Proteine kodieren, auch in anderen Organismen eine gängige Strategie. In *D. melanogaster* beispielsweise ist die Lokalisation der *gurken* mRNA in den anterioren-dorsalen Bereich durch den BicD-Egl-Komplex für die Sekretion des kodierten Proteins erforderlich (Herpers und Rabouille, 2004 ; St Johnston, 2005 ; Martin und Ephrussi, 2009). Ein weiteres Beispiel ist die Sekretion des Glykoproteins Wingless (Wg) in Epithelzellen des embryonalen Ektoderms und Speicheldrüsen von *D. melanogaster* (Medioni *et al.*, 2012). Die Sekretion des Proteins ist dabei von der apikalen Lokalisation der *wingless* mRNA abhängig (Simmonds *et al.*, 2001). Die in dieser Arbeit hergestellten *did2*- und *ips1*-Deletionsstämme deuten auf eine Verbindung zwischen Cts1-Sekretion und endosomalen Membrantransport hin. Der genaue Regulationsmechanismus ist aber bislang noch unbekannt.

Zudem kodierte eine Vielzahl der identifizierten Ziel-mRNAs für eine Vielzahl bislang unbeschriebener Genprodukte. Welche Funktionen diese Proteine ausüben und welche

weiteren Prozesse Rrm4 reguliert, muss anhand weiterer Studien noch geklärt werden. Die Funktion einzelner Kandidaten sollte dabei in genetischen Studien zunächst anhand von Deletionsmutanten untersucht werden. Im Falle von sekretierten Proteine sollte zusätzlich das Sekretom von Wildtyp- und *rrm4*-Deletionsstämmen z.B. mittels Massenspektroskopie analysiert und mit den in dieser Arbeit identifizierten Ziel-mRNAs abgeglichen werden.

Die Daten der beiden CLIP-basierten Analysen deuten an, dass Rrm4 möglicherweise auch ncRNAs bindet. So konnte beispielsweise die spezifische Bindung von ncRNAs durch SRSF3 und SRSF4 in vergleichbaren UV-Quervernetzungsstudien zusätzlich nachgewiesen werden (Ankö *et al.*, 2012). Aufgrund fehlender Annotationen im *U. maydis* Genom erweist sich die Identifikation ncRNAs jedoch als problematisch. Eine detaillierte und umfangreiche Analyse des Transkriptoms wird jedoch zum Beispiel durch neue Methoden wie RNA-Seq ermöglicht. Neben kodierenden RNAs können somit ncRNAs, als auch bislang nicht annotierte Gene identifiziert werden. Im Phytopathogen *Fusarium graminearum* z.B. ermöglichten RNA-Seq Experimente die Entdeckung neuer transkribierter Bereiche, welche neuen Genen zugeordnet werden konnten (Zhao *et al.*, 2013).

3.3.2 Ribosomale Proteine und Ubiquitin-abhängiger Prozesse

In dieser Arbeit wurden in beiden Ansätzen viele für ribosomale Proteine kodierende mRNAs identifiziert. Neben der *ubi1* (*rpl40*) mRNA wurden unter anderem auch die Transkripte der ribosomalen Proteine Rpl24a und Rps27a identifiziert. Die Transkripte ribosomaler Proteine, wie z.B. die *ubi1* mRNA, wurden bereits in der ersten Analyse der CLIP-Banken als potentielle Ziel-mRNAs von Rrm4 identifiziert (König *et al.*, 2009). Ein möglicher Grund hierfür könnte die starke Expression dieser Gene sein. Unter optimalen Wachstumsbedingungen findet beispielsweise in *S. cerevisiae* eine erhöhte Transkription der Gene ribosomaler Proteine statt (Kraakman *et al.*, 1993).

Ribosomale Proteine sind neben der rRNA integrale Bestandteile von Ribosomen. In Eukaryoten findet die Biogenese von Ribosomen im Nukleolus statt, von dem sie in einem inaktiven Zustand in das Zytoplasma transportiert werden. Die anschließende zytoplasmatische Reifung beinhaltet den Einbau einiger ribosomaler Proteine, sowie die endgültige Prozessierung der rRNA (Lo *et al.*, 2010 ; Panse und Johnson, 2010). Analog zu transportierter mRNA ist es denkbar, dass inaktive Ribosomen vor ihrer Reifung im Zytoplasma transportiert und lokal aktiviert werden (Panse und Johnson, 2010). Diesbezüglich ist das in dieser Arbeit als potentieller Kandidat identifizierte ribosomale Protein Rpl24a an der zytoplasmatischen Reifung von Ribosomen beteiligt. Dieses Protein wird während der zytoplasmatischen Reifung des prä-60S Komplexes in diesen eingebaut (Saveanu *et al.*, 2003 ; Lebreton *et al.*, 2006 ; Panse und Johnson, 2010). Im Falle der *I24a* mRNA wäre es daher denkbar, dass der Rrm4-vermittelte mRNA-Transport die möglicherweise lokal stattfindende, zytoplasmatische Reifung von Ribosomen in Filamenten

reguliert. Darüber hinaus wurden in den letzten Jahren zunehmend extraribosomale Funktionen für ribosomale Proteine beschrieben, darunter auch die Transkript-spezifische Regulation der Translation (Warner und McIntosh, 2009 ; Bhavsar *et al.*, 2010 ; Kong und Lasko, 2012). In der Maus wird das ribosomale Protein Rpl38 für die spezifische Translation von Homöobox mRNAs benötigt (Kondrashov *et al.*, 2011). Ferner erweist sich in *S. cerevisiae* die Translation der *ASH1* mRNA in der Knospungsspitze von einem Set paraloger ribosomaler Proteine abhängig (Komili *et al.*, 2007). Des Weiteren reguliert Rpl40 in *S. cerevisiae* die Translation einer geringen Anzahl von Transkripten, darunter mRNAs von Genen der Stressantwort (Lee *et al.*, 2013). Möglicherweise üben ribosomale Proteine somit auch in *U. maydis* extraribosomale Funktionen aus. Rrm4 könnte dabei für einige ribosomale Proteine die korrekte Lokalisation innerhalb des Zytoplasmas vermitteln.

Ribosomale Proteine stehen auch in Verbindung mit zellulären, Ubiquitin-abhängigen Prozessen. Ubiquitin ist ein kleines, in Eukaryoten hoch konserviertes Protein, welches mit Substratproteinen kovalent verknüpft werden kann und eine Vielzahl von intrazellulären Prozessen wie z.B. den proteasomalen Abbau von Proteinen, den Transport von Membranproteinen, Endozytose, Signaltransduktion oder auch Transkription reguliert (Hochstrasser, 2009). In *S. cerevisiae* sind die beiden ribosomalen Proteine Rpl40 und Rps31 unter Normalbedingungen die Hauptquellen von Ubiquitin (Finley *et al.*, 1989 ; Finley *et al.*, 2012). Der Rrm4-vermittelte mRNA-Transport der Transkripte von *ubi1* (*rpl40*) und *rps27a* könnte somit in *U. maydis* die intrazelluläre Verteilung von Ubiquitin in Filamenten gewährleisten. Ubiquitinierung spielt auch bei polaren Wachstumsprozessen eine Rolle. Die Ubiquitinierung von Proteinen wird durch die E1-E2-E3 Enzymkaskade vermittelt. Ubiquitin wird dabei ATP-abhängig durch Ubiquitin-aktivierende Enzyme (E1) aktiviert und auf Ubiquitin-konjugierende Enzyme (E2) übertragen. Als letzter Schritt katalysieren Ubiquitin-Ligasen (E3) die Ausbildung von Peptidbindungen zwischen dem Substratprotein und aktiviertem Ubiquitin (Finley *et al.*, 2012). Polyubiquitinierung ist das charakteristische Signal für den Proteasom-vermittelten Abbau, während Mono- und Mehrfachubiquitinierung oftmals Proteasom-unabhängige Funktionen wie Lokalisation, Transport oder Proteinbindung vermitteln (Ziv *et al.*, 2011 ; Finley *et al.*, 2012). Die Ubiquitin-vermittelte Endozytose (siehe 3.6) ist z.B. in Neuronen am axonalen Wachstum beteiligt. Hierbei scheint die lokale Funktion von Ubiquitin-Ligasen und Deubiquitierenden Enzymen eine Rolle zu spielen (Schwarz und Patrick, 2012). Anhand der Annotationen im Genom von *U. maydis* wurde die mRNA einer möglichen Ubiquitin-Ligase (*um04518*) nur in den iCLIP Experimenten als durch Rrm4 potentiell gebunden identifiziert. Reproduzierbar wurden hingegen im Rahmen dieser Arbeit die mRNAs vieler Gene identifiziert, die für Ubiquitin-konjugierende Enzyme kodieren. Rrm4 könnte somit an der lokalen Regulation der Ubiquitin-vermittelte Endozytose von Plasmamembranproteinen beteiligt sein. Des Weiteren ist die Internalisierung von

Plasmamembranproteinen durch die ESCRT-Maschinerie Ubiquitin-abhängig und spielt ebenfalls eine Rolle in der Regulation der Polarität (Hegde, 2010 ; Nethe und Hordijk, 2010 ; Piper und Lehner, 2011; Schwarz und Patrick, 2012).

3.3.3 Lokalisation von Organell-spezifischen Proteinen

Die Identifizierung mehrere Ziel-mRNAs, welche für mitochondrielle Proteine kodieren implizierte, dass Rrm4 möglicherweise an der Kompartimentalisierung von Filamenten beteiligt sein könnte. Neben mitochondriellen Proteinen wurden auch die Transkripte weiterer Organell-spezifischer Proteine, wie z.B. vakuoläre Komponenten, in dieser Arbeit identifiziert. Transkripte mitochondrieller Proteine wurden zudem auch in der ersten Analyse der Rrm4 CLIP-Banken gefunden (König *et al.*, 2009). Die Bildung und Aufrechterhaltung von Organellen in eukaryotischen Zellen wird u.a. durch die mRNA-Lokalisation vermittelte lokale Translation von Organell-spezifischen Proteinen gesteuert (Blower, 2013). Ein klassisches Beispiel hierfür ist der kotranslationale Import von Proteinen in das Lumen des endoplasmatischen Retikulums (ER) durch das Signalerkennungspartikel (*signal recognition particle*; SRP). Eine N-terminal gelegene Signalsequenz wird durch das SRP erkannt, woraufhin die Translation gestoppt und der Komplex aus mRNA, Ribosomen und SRP an dem Signalerkennungs-Rezeptor auf der ER-Oberfläche rekrutiert wird (Walter und Blobel, 1981a ; Walter und Blobel, 1981b). Weiterhin werden in *S. cerevisiae* mRNAs aktiv an Mitochondrien und Peroxisomen lokalisiert (Zipor *et al.*, 2009 ; Gadir *et al.*, 2011). Die Lokalisation von mRNAs, die für mitochondrielle Proteine kodieren, wird hierbei durch das RBP Puf3p vermittelt (Gerber *et al.*, 2004). Der Proteinimport in Mitochondrien scheint dabei kotranslational zu erfolgen (Eliyahu *et al.*, 2010 ; Eliyahu *et al.*, 2012). Der Rrm4-vermittelte mRNA-Transport könnte innerhalb von Filamenten ebenfalls die korrekte Verteilung von mRNAs gewährleisten und somit sowohl die Lokalisation als auch die Verteilung von Transkripten steuern. In *U. maydis* sind Mitochondrien innerhalb der Filamente verstreut, so dass durch den Rrm4-vermittelten mRNA-Transport eine gleichmäßige Verteilung von mitochondriellen Proteinen gewährleistet werden könnte. Diesbezüglich wurde in *rrm4*-Deletionsstämmen eine Dysfunktion von Mitochondrien beobachtet, welche sich in einer gesteigerten Superoxid-Produktion äußerte (Koepke, 2010). Die Beteiligung von Rrm4 an der Kompartimentalisierung in Filamenten muss noch näher untersucht werden.

In Neuronen wurde für den bidirektionalen mRNA-Transport das „Sushi-Fließband“ (*sushi belt*)-Modell für den bidirektionalen mRNA-Transport aufgestellt. Analog zu dem Fließband eines Sushi-Restaurants könnten mRNAs innerhalb von Neuronen bidirektional entlang von Mikrotubuli transportiert und bei Bedarf lokal in aktivierten oder „hungrigen“ Synapsen abgeladen werden (Doyle und Kiebler, 2011). Es wäre denkbar, dass auch durch Rrm4 transportierte mRNAs je nach Bedarf lokal im Zytoplasma entladen werden.

3.3.4 Polaritätsfaktoren

Eine Schlüsselfunktion von Rrm4 ist dessen Beteiligung an der Regulation des unipolaren Wachstums. König *et al.* (2009) identifizierten in den CLIP-Experimenten bereits eine kleine Anzahl an Polaritätsfaktoren, darunter das Septin Cdc3 und die Rho-GTPase Rho3. Neben Septinen und Rho-GTPasen wurden in dieser Arbeit zudem auch Formine identifiziert.

U. maydis besitzt zwei Formine, Drf1 (*Diaphanous-related formin*) und Srf1 (*SepA-related formin*) (Freitag *et al.*, 2011). Die Transkripte beider Formine konnten in dieser Arbeit als potentielle Ziel-mRNAs von Rrm4 identifiziert werden. In dem HITS-CLIP Ansatz wurde sowohl die *srf1* mRNA als auch die *drf1* mRNA identifiziert, während in den iCLIP-Experimenten nur die *srf1* mRNA gefunden wurde. Formine sind konservierte Proteine, welche an der Nukleation und Elongation von Aktin, sowie der Stabilisierung von Mikrotubuli beteiligt sind. Unter anderem sind diese Proteine an der Regulation der Zellmorphogenese und Zellteilung beteiligt (Chesarone *et al.*, 2010). Das Formin Drf1 wird in *U. maydis* für die lokale Regulation der Bildung von Aktomyosin-Ringen und dem Einziehen von Septen in Filamenten benötigt (Freitag *et al.*, 2011). Die Aktivität von Forminen wird wiederum durch Rho-GTPasen gesteuert, von denen einige ebenfalls als Kandidaten des Rrm4-vermittelten mRNA-Transports identifiziert wurden (siehe unten; König *et al.*, 2009). Laut HITS-CLIP bindet Rrm4 die mRNA von *rho1* und *rho3*, während in den iCLIP Experimenten nur die *rho1* mRNA identifiziert wurde. Rho-GTPasen sind kleine, zur Familie der Ras-Proteine gehörende, GTP-bindende Proteine, welche in Eukaryoten hoch konserviert sind. Diese Proteine sind wichtige Regulatoren des zellulären Wachstums und der Zellpolarität (Perez und Rincon, 2010). In *S. cerevisiae* wird die Assemblierung von Septinen durch die Rho-GTPase Cdc42, einem zentralem Regulator des polaren Wachstums, gesteuert. *U. maydis* besitzt wie *S. cerevisiae* sechs Rho/Rac-GTPasen, von denen Cdc42 an der Zytokinese und Rac1 am hyphalen Wachstum beteiligt sind (Mahlert *et al.*, 2006 ; Pham *et al.*, 2009). In dieser Arbeit wurden die mRNAs aller vier Septinproteine als Ziel-mRNAs von Rrm4 identifiziert. Septine sind konservierte, GTP-bindende Proteine, welche Heterooligomere ausbilden und sich zu komplexen Strukturen wie Filamenten oder Ringen zusammenlagern können (Bi und Park, 2012). Septine spielen eine wichtige Rolle in der Regulation der Zellpolarität und Zellteilung. Dabei können sie als Gerüst für die lokale Verankerung weiterer Proteine oder als Diffusionsbarriere für die lokale Kompartimentalisierung von Membranlipiden fungieren (Beise und Trimble, 2011 ; Oh und Bi, 2011 ; Bi und Park, 2012). In *U. maydis* spielen Septine eine wichtige Rolle in der Morphogenese und sind auch an der Ausbildung der Polarität in Filamenten beteiligt (Alvarez-Tabares und Perez-Martin, 2010 ; Baumann, 2013). Für die *cdc3* mRNA konnte bereits gezeigt werden, dass die Lokalisation des kodierten Proteins vom Rrm4-vermittelten mRNA-Transport abhängig ist (Baumann, 2013). Inwiefern Rrm4 die korrekte Lokalisation der identifizierten Polaritätsfaktoren reguliert

ist noch unklar. Es wäre aber denkbar, dass durch den Rrm4-vermittelten mRNA-Transport die lokale Translation der Polaritätsfaktoren an oder in unmittelbarer Nähe zu dem apikalen bzw. basalen Pol von Filamenten ermöglicht wird. Es erscheint zudem plausibel, dass Rrm4 die Lokalisation der unterschiedlichen Polaritätsfaktoren gemeinsam reguliert, möglicherweise sogar in Form eines RNA-Operons. Analog zu prokaryotischen Operons, wird in Eukaryoten als RNA-Operon die Regulation funktionell verwandter mRNAs durch ein gemeinsames RBP definiert (Keene, 2007). Ein prominentes Beispiel für ein RNA-Operon ist die Puf3p abhängige Regulation mitochondrieller Proteine in *S. cerevisiae* (siehe oben; Gerber *et al.*, 2004). Ob dies ebenfalls auf die Rrm4-abhängige Regulation der Zellpolarität zutrifft bedarf aber noch weiterer Untersuchungen.

3.4 Regulation des unipolaren Wachstums durch Membrantransport

Die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse deuten auf die Beteiligung des Membrantransports am filamentösen Wachstum hin. Interessanterweise wurde anhand der *vps60*- und *did2*-Deletion eine Verbindung zwischen der ESCRT-vermittelten Endozytose und unipolarem Wachstum festgestellt. Zudem suggeriert die Deletion von *ips1*, dass Störungen der Phospholipidsynthese erheblichen Einfluss auf den Membrantransport und das filamentöse Wachstum haben. Inwiefern beide Prozesse durch Rrm4 reguliert werden ist dabei noch unklar.

Die ESCRT-Maschinerie besteht aus mehreren Komplexen (ESCRTs) und ist an einer Vielzahl von intrazellulären Funktionen wie der Sortierung ubiquitinerter Plasmamembranproteine in Vakuolen/Lysosomen, Sortierung von lysosomalen und vakuolären Proteinen, Zytokinese, der Knospung und Freisetzung von Endosomen, Autophagie und der Freisetzung von Viren beteiligt (Hurley, 2010 ; Rusten *et al.*, 2012). Die ESCRT-Maschinerie setzt sich aus den fünf Komplexen, ESCRT-0, ESCRT-I, ESCRT-II, ESCRT-III und dem Vps4-Komplex zusammen, welche jeweils eine spezifische Funktion ausüben. Je nach biologischem Kontext ist eine Beteiligung aller ESCRT-Komplexe nicht immer erforderlich (Henne *et al.*, 2011). Die Komplexe ESCRT-0, -I und -II sind an der Erkennung und Sortierung ubiquitinerter Proteine beteiligt. Der ESCRT-III Komplex rekrutiert deubiquitinerende Proteine und wird für die Abschnürung von Vesikeln benötigt. (Wollert *et al.*, 2009 ; Henne *et al.*, 2011). Zudem ist die ATPase Vps4 für die Dissoziation der ESCRT-III Untereinheiten von der endosomalen Membran erforderlich. Die Aktivität von Vps4 wird durch vier Proteine reguliert: Vta1, Vps60, Did2 und Ist1 (Hurley, 2010 ; Henne *et al.*, 2011). Vps60 und Did2 rekrutieren Vta1 zu Vps4 und aktivieren den Vps4-Vta1 Komplex (Nickerson *et al.*, 2006 ; Azmi *et al.*, 2008 ; Hurley, 2010 ; Nickerson *et al.*, 2010 ; Henne *et al.*, 2011) während Ist1 eine duale Rolle ausübt und Vps4 sowohl positiv als auch negativ regulieren kann (Dimaano *et al.*, 2008). Untersuchungen zur Funktion von ESCRTs in filamentösen

Pilzen sind bislang spärlich. Anhand der in *S. cerevisiae* und Säugerzellen durchgeführten Studien zur Funktion der ESCRT-Maschinerie wurden aber Unterschiede in der Funktion einzelner ESCRTs zwischen den jeweiligen Organismen festgestellt. Säugetiere besitzen im Vergleich zur Bäckerhefe mehrere Isoformen einzelner ESCRTs, die möglicherweise gewebespezifische Funktionen ausüben (Henne *et al.*, 2011). Es ist somit möglich, dass die Funktion einzelner ESCRT-Komplexe in filamentösen Pilzen ebenfalls von der in anderen Organismen beschriebenen Funktion abweichen kann. Diesbezüglich sind, im Gegensatz zu *S. cerevisiae*, nahezu alle ESCRT-Kernkomponenten des filamentösen Pilzes *Aspergillus nidulans* für das Wachstum erforderlich. Die Deletion von *vps27* in *A. nidulans* induziert schwerwiegende Wachstumsdefekte, was impliziert, dass Vps27 eine wichtige Funktion einnimmt (Calcagno-Pizarelli *et al.*, 2011). Dementsprechend deutet der Misserfolg des in dieser Arbeit unternommenen Versuchs *vps27* in *U. maydis* zu deletieren ebenfalls auf eine wichtige, wenn nicht sogar essentielle Funktion des Proteins in *U. maydis* hin. Die in dieser Arbeit hergestellten *did2*- und *vps60*-Deletionsstämme zeigen des Weiteren verschiedene Phänotypen auf, was auf unterschiedliche Funktionen der beiden Proteine in *U. maydis* schließen lässt. In *S. cerevisiae* scheint die Funktion beider Proteine räumlich und zeitlich voneinander getrennt zu sein. Von beiden Proteinen spielt Did2 beim Abbau des ESCRT-III Komplexes eine größere Rolle als Vps60 (Nickerson *et al.*, 2010). Diesbezüglich nimmt Did2 sehr wahrscheinlich auch in *U. maydis* im Vergleich zu Vps60 eine zentralere Rolle ein. Dies steht im Einklang mit der im Vergleich hohen Rate bipolaren Wachstums von Filamenten des Stammes AB33did2Δ. Die Gfp-Studien der drei untersuchten ESCRT-Komponenten zeigten in Abwesenheit von Rrm4 keine veränderte Lokalisation der Fusionsproteine. Die Lokalisation von Vps27 an Endosomen wurde bereits in *S. cerevisiae* beschrieben (Katzmann *et al.*, 2003). Im Falle von Vps60 und Did2 interferieren in *S. cerevisiae* jedoch C-terminale Gfp-Fusionen mit der Funktion beider Proteine (Nickerson *et al.*, 2010). Auch in *A. nidulans* störte die C-terminale Fusion von Gfp an Did2 die Funktion des Proteins (Hervas-Aguilar *et al.*, 2010). Aufgrund dessen sollten diese Studien mit N-terminalen Proteinfusionen wiederholt werden. Die in dieser Arbeit beobachtete Lokalisation von Vps60G und Did2G stimmte jedoch mit der in der Literatur für *S. cerevisiae* beschriebenen Lokalisation beider Proteine überein. In *S. cerevisiae* lokalisiert Vps60 im Zytoplasma, der vakuolären Membran, aber auch an endosomalen Strukturen (*Saccharomyces* Genome Database: yeastgenome.org; Huh *et al.*, 2003 ; Nickerson *et al.*, 2010). Für Did2 wiederum wurde in *S. cerevisiae* und *A. nidulans* eine Lokalisation an endosomalen Strukturen beschrieben (Hervas-Aguilar *et al.*, 2010 ; Nickerson *et al.*, 2010). Die Lokalisation der untersuchten ESCRT-Komponenten in *U. maydis* stimmte somit mit der in anderen Pilzen beschriebenen Lokalisation überein.

In den letzten Jahren häuften sich Hinweise darauf, dass Polarität auch durch die ESCRT-

vermittelte Endozytose reguliert wird. Die apikal-basale Polarisierung des Epithels in *D. melanogaster* z.B. benötigt funktionelle ESCRTs (Rusten *et al.*, 2012). Des Weiteren wird in menschlichen Fibroblasten die Orientierung des Aktinzytoskeletts und die davon abhängige Polarisierung der Zellen ESCRT-abhängig reguliert. Der Verlust von ESCRT-Komplexen resultiert in der Akkumulation des Plasmamembranrezeptors Integrin und dessen Signalmolekül Src in Endosomen, wodurch die Src-gesteuerte Phosphorylierung der *Myosin regulatory light chain* (MLRC) und die damit verbundene Regulation des Aktinzytoskeletts gestört wird. Als Konsequenz findet eine reduzierte Orientierung des Golgi-Apparats und Verlust der Zellpolarität statt (Lobert und Stenmark, 2012). Die Regulation der Zellpolarität anhand der ESCRT-vermittelten Endozytose könnte dabei auf mehreren Wegen geschehen. (1) Membranproteine werden zunächst unspezifisch in die Plasmamembran inseriert und werden erst durch gezielte Endozytose und endosomalen Transport an die korrekte Position innerhalb der Plasmamembran sortiert. (2) Die lokale Akkumulation von Polaritätsregulatoren wird durch regulierte Endozytose gewährleistet. Hierbei wird die Gesamtmenge an Proteinen in der Plasmamembran durch Endozytose reguliert und lokal begrenzt. (3) Intrinsische Fehler der Exozytose und laterale Diffusion resultieren in der Fehllokalisation von Membranproteinen, was durch ESCRT-vermittelte Endozytose behoben werden kann (Shivas *et al.*, 2010). In *S. cerevisiae* sind ESCRT-Komplexe nicht direkt an der Zytokinese beteiligt, aber Zytokinesedefekte von Mutanten in denen die Septinassemblierung gestört ist, können durch ESCRT-Mutanten unterdrückt oder gesteigert werden. Dies ist vermutlich auf einen reduzierten Membranumsatz von wichtigen Faktoren zurückzuführen (McMurray *et al.*, 2011). Dies könnte sehr wahrscheinlich auch für ESCRTs in *U. maydis* gelten. Welche Polaritätsfaktoren durch die ESCRT-Maschinerie reguliert werden und inwiefern Rrm4 daran beteiligt ist, muss aber noch geklärt werden.

Einzelne ESCRT-Komponenten könnten zudem in *U. maydis* auch direkt am mRNA-Transport beteiligt sein und auf diesem Wege die Zellpolarität regulieren. In *D. melanogaster* wird der ESCRT-II Komplex für die Lokalisation der *bicoid* mRNA in Embryonen benötigt. Hierbei erweist sich aber die Lokalisation der *bicoid* mRNA unabhängig von dem ESCRT-vermittelten Sortieren von Membranproteinen (Irion und St Johnston, 2007). Der Ko-Transport von Rrm4-enthaltenen mRNPs und ESCRT-Komplexen auf Endosomen würde die Interaktion zwischen mRNA und endosomalen ESCRT-Komplexen ermöglichen.

Des Weiteren wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass filamentöses Wachstum und Endozytose in *U. maydis* von der Ips1-vermittelten *myo*-Inositolphosphat-Synthese abhängig sind. Inositol ist ein wichtiger Ausgangsstoff, der für Prozesse wie Membranbiogenese, Membrantransport, Regulation des Zytoskeletts und Signaltransduktion benötigt wird (Martin, 1998 ; Roth, 2004 ; Michell, 2008 ; Saarikangas *et al.*, 2010). Eine verminderte Endozytose wurde beispielsweise aufgrund der Deletion des Gens der Inositolp-3-phosphat synthase

Ino1p (*INO1*) in *S. cerevisiae* beobachtet (Burston *et al.*, 2009). Die Wichtigkeit der Inositol synthese wurde auch für weitere Organismen, wie z.B. Pflanzen, beschrieben. Von den drei Inositolphosphat synthase-Isoformen der Acker-Schmalwand *Arabidopsis thaliana* zeigte die Deletion von *MIPS1* den stärksten Phänotyp. Betroffene Pflanzen waren kleiner und wiesen nekrotische Läsionen auf. Zudem hatte die *MIPS1*-Deletion aufgrund des reduzierten *myo*-Inositolspiegels einen Einfluss auf die Lipidkomposition von Membranen. Neben einem reduzierten Phosphatidylinositolspiegel wurde zudem auch eine erhöhte Menge an Ceramiden in Membranen beobachtet. Dies korrelierte, aufgrund der Ceramid-vermittelten Regulation des Zelltods, mit dem in *MIPS1*-Deletionspflanzen beobachteten Zelltod (Donahue *et al.*, 2010 ; Boss und Im, 2012). Aufgrund dessen ist zu erwarten, dass die Deletion von *ips1* in *U. maydis* ebenfalls zu einer Veränderung der Membranzusammensetzung führt. Inositolderivate wie die Phospholipide Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PI(4,5)P₂) und Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat (PI(3,4,5)P₃) sind an der Ausprägung der zellulären Polarität beteiligt (Roth, 2004 ; Saarikangas *et al.*, 2010). Die räumliche Verteilung beider Phospholipide ist für die Ausbildung und Aufrechterhaltung der Polarität in Epithelzellen essentiell (Saarikangas *et al.*, 2010). Inwiefern Rrm4 die Funktion und Lokalisation der Ips1 reguliert, sollte in weiteren Studien untersucht werden. Gfp-Fusionen könnten einen Aufschluss darüber geben, ob die intrazelluläre Lokalisation des Enzyms durch Rrm4 reguliert wird. Zudem sollte untersucht werden, ob die Lokalisation von Phospholipiden innerhalb der Plasmamembranen von *U. maydis* Filamenten durch Rrm4 reguliert wird. Eine Beteiligung von Membranlipiden am polaren Wachstum in *U. maydis* konnte bereits gezeigt werden. So äußerte sich die Inhibierung der Sphingolipidsynthese in einem Verlust des polaren Wachstums sowohl in Sporidien als auch in Filamenten. Intrazellulär wurde der Verlust von Sterol-reichen Domänen an den Wachstumsspitzen sowie die Delokalisation von Polaritätskomponenten beobachtet (Canovas und Perez-Martin, 2009). Die Phospholipiddynamik könnte *in vivo* anhand von Fusionsproteinen, bestehend aus Phosphoinositid-bindenden Domänen, wie die PH (*pleckstrin-homology*)-Domäne und Fluoreszenzproteinen untersucht werden (Halet, 2005). Die Spezifität dieser Domänen gegenüber verschiedenen Phospholipiden sollte die Analyse der subzellulären Lokalisation dieser Lipide ermöglichen.

3.5 Rrm4 bindet primär die 3'UTR von mRNAs

Die in beiden Ansätzen identifizierten Bindestellen zeigten, dass Rrm4 primär die 3'UTR von mRNAs bindet. Insbesondere die Ergebnisse der iCLIP-Experimente zeigten eindeutig, dass Quervernetzungsstellen größtenteils innerhalb der ersten 100 nt der 3'UTR lagen, was in Einklang mit der experimentell ermittelten Länge dieser Region steht (Median= 114 nt; Vollmeister *et al.*, 2009). Auch König *et al.* (2009) beobachteten, dass der Großteil der

identifizierten CLIP-Tags in der 3'UTR lagen, wobei nach den heutigen Erkenntnissen die in der Studie identifizierten Ziel-mRNAs nur als kleiner Auszug aus dem Gesamtbild gesehen werden können. Regulatorische RNA-Elemente, wie z.B. Lokalisationselemente, sind oft in der 3'UTR zu finden (St Johnston, 2005 ; Martin und Ephrussi, 2009). So befindet sich das Lokalisationselement der β -Aktin mRNA des Huhns zum Beispiel in der 3'UTR der mRNA. Dieses Lokalisationselement ist für die Beförderung der mRNA an die Zellperipherie in Hühnerzellen erforderlich und hinreichend (Kislauskis *et al.*, 1994). Des Weiteren wird in dem Krallenfrosch *Xenopus laevis* die Lokalisation der *Vg1* mRNA an den vegetativen Pol im Laufe der Oogenese ebenfalls durch in der 3'UTR liegende Lokalisationselemente reguliert (Deshler *et al.*, 1997 ; Lewis *et al.*, 2004). Lokalisationselemente sind jedoch nicht ausschließlich auf die 3'UTR von mRNAs beschränkt. Die Lokalisation der *ASH1* mRNA in *S cerevisiae* wird beispielsweise durch vier RNA-Elemente innerhalb des offenen Leserahmens der mRNA reguliert (Chartrand *et al.*, 1999 ; Gonzalez *et al.*, 1999). Dies könnte erklären, warum in dieser Arbeit in den Ziel-mRNAs von Rrm4 neben der 3'UTR ebenfalls eine Anreicherung von UAUG-enhaltenen Clustern in den ORFs, aber nicht in der 5'UTR beobachtet wurde (Daten nicht gezeigt). Die Verteilung der Bindestellen stimmt somit mit den Daten anderer, an mRNA-Lokalisation beteiligter RBPs, überein.

3.6 Das Motiv UAUG wird durch RRM3 gebunden

Im Vergleich zu der CLIP-Methode ermöglicht die iCLIP-Methode die hochauflösende Darstellung von Bindestellen auf der Ebene einzelner Nukleotide (König *et al.*, 2009). Die Identifizierung spezifischer Bindemotive durch die iCLIP-Methode konnte bereits für die RBPs hnRNP C, TDP-43, SRSF3, SRSF4, TIA1 (*T-cell intracellular antigen 1*) und TIAL1 (*TIA1-like*) gezeigt werden (König *et al.*, 2010 ; Wang *et al.*, 2010 ; Tollervey *et al.*, 2011 ; Ankö *et al.*, 2012). Für Rrm4 wurden zuvor in den CLIP-Experimenten CA-reiche Sequenzen als mögliches Bindemotiv postuliert (König *et al.*, 2009). Eine Anreicherung von CA-reichen Sequenzen wurde in den iCLIP-Experimenten jedoch nicht festgestellt. Aufgrund dessen stellt sich die Frage, ob CA-reiche Sequenzen tatsächlich durch Rrm4 gebunden werden. CA-reiche Sequenzen lassen sich im Verhältnis zu anderen Sequenzen vergleichsweise schlecht durch UV-Strahlung mit Proteinen quervernetzen. Die Photoreaktivierbarkeit von Nukleosiden lässt sich dabei wie folgt anordnen: U>C,A,G (Hockensmith *et al.*, 1986). Dementsprechend finden UV-induzierte Quervernetzungen in CLIP-Experimenten vorzugsweise an Uridinen statt (Sugimoto *et al.*, 2012). Neben der geringen Auflösung der Bindestellen durch die CLIP-Experimente könnte dies erklären, weshalb CA-reiche Sequenzen in den neuen Analysen bislang nur als schwaches Motiv identifiziert wurden.

In dieser Arbeit konnte anhand des iCLIP-Ansatzes stattdessen das Tetranukleotid UAUG als neues Bindemotiv für Rrm4 identifiziert werden. Darüber hinaus konnte in dieser Arbeit

gezeigt werden, dass dieses Motiv für die Interaktion mit Rrm4 im Hefe-Drei-Hybrid-System benötigt wird. Die in dieser Arbeit getestete und UAUG-enhaltene SELEX-Sequenz A1 wird spezifisch durch die dritte RRM-Domäne RRM3 von Rrm4 gebunden (König *et al.*, 2007). In Einklang mit diesen Ergebnissen äußert sich der funktionelle Verlust von RRM3 in Rrm4 in einer stark reduzierten UV-Quervernetzung von RNA an das Protein. Experimente mit Allelen von *rrm4*, in denen durch Punktmutationen die Protein-RNA Interaktionsflächen im kodierten Protein zerstört waren, zeigten, dass im Vergleich zum Wildtypallel bei der Mutation von RRM1 und RRM3 nur noch 57% bzw. 34% der gebundenen mRNA quervernetzt wurde (Becht *et al.*, 2006). RRM3 scheint somit, bezüglich den UV-Quervernetzungsexperimenten, die primäre RNA-bindende Domäne zu sein.

Einzelne RRM-Domänen binden zwischen vier und sechs Nukleotide (Maris *et al.*, 2005), wobei die RRM-RNA Interaktion jedoch nicht immer Sequenz-spezifisch erfolgt (Clery *et al.*, 2008). Der alternative Spleißregulator SRp20 (*serine- and arginine-rich protein*) z.B. bindet über seine einzelne RRM-Domäne vier Nukleotide, wovon jedoch nur das 5'Cytosin spezifisch durch die RBD gebunden wird (Hargous *et al.*, 2006). Dies könnte erklären, warum kein erweitertes UAUG Motiv in den MEME-Analysen beobachtet wurde. Stattdessen könnte RRM3 neben UAUG die weiteren Motive UUAU, CUAU und AUGC über das in allen Motiven enthaltene U/AU ebenfalls spezifisch binden.

Es wäre denkbar, dass Rrm4 über seine drei RRM-Domänen mit UAUG oder den weiteren U/AU-enthaltenen Motiven sowie evtl. CA-reichen Sequenzen zwei unterschiedliche Motive bindet. Die tatsächliche Relevanz der Bindung von CA-reichen Sequenzen oder andere, bislang unbekannte Motive durch Rrm4 sollte jedoch in Folgestudien sorgfältig überprüft werden. Die genaue Funktion von RRM3 in Rrm4 ist bislang noch unklar. Während die Mutation von RRM1 sich in einem Verlust des unipolaren Wachstums äußert, induziert die Mutation von RRM3 hingegen keinen mutanten Phänotyp (Becht *et al.*, 2006). Wie für andere ELAV-ähnlichen Proteine beschrieben, könnte RRM3 in Rrm4 aber eine duale Rolle ausüben und neben der spezifischen Bindung von UAUG zusätzlich als Protein-Protein-Interaktionsfläche fungieren und somit eventuell die Oligomerisierung von Rrm4 regulieren. RRM3 vermittelt in ELAV-ähnlichen Proteinen die Multimerisierung der Proteine auf gebundener mRNA und die Bildung sogenannter „Ribonukleosomen“ (Gao und Keene, 1996 ; Soller und White, 2005 ; Fialcowitz-White *et al.*, 2007 ; Toba und White, 2008 ; Simone und Keene, 2013). Dies trifft aber nicht auf alle ELAV-ähnlichen Proteine zu. In *X. laevis* beispielsweise zeigt das HuR-Homolog ElrA im Gegensatz zu dem HuB-Homolog ElrB keine Oligomerisierung auf (Devaux *et al.*, 2006). Laut Hefe-Zwei-Hybrid-System scheint Rrm4 diesbezüglich ebenfalls nicht mit sich selbst zu interagieren (T. Pohlmann, persönliche Mitteilung). In HuR spielt RRM3 eine wichtige Rolle bei der Bindung von mRNA (Doller *et al.*, 2010), obwohl laut Deletionsmutanten diese Domäne für die Multimerisierung von HuR, aber

nicht für die spezifische Bindung von AU-reichen Elementen (AREs) erforderlich ist (Fialcowitz-White *et al.*, 2007). Die Phosphorylierung des Serins 318 in RRM3 von HuR wird für die Bindung von AREs benötigt (Doller *et al.*, 2010). Aufgrund von beobachteten Unterschieden bezüglich der Länge des durch RRM1-RRM2 gebundenen Motivs ist es möglich, dass RRM3 an der RNA-Bindung beteiligt sein könnte und diese Interaktion vor oder während der Multimerisierung des Proteins aufgehoben wird (Fialcowitz-White *et al.*, 2007). Aus diesem Grund sollte das Bindeverhalten von Rrm4 und die Beteiligung der einzelnen RRM-Domänen in weiteren Studien untersucht werden.

Die detaillierte Auflösung von Bindestellen anhand der in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse lässt sich anhand der *ubi1* mRNA veranschaulichen. Diese mRNA konnte in allen drei CLIP-basierten Analysen jeweils als prominente Ziel-mRNA identifiziert werden (Abb. 4 C, Abb. 13 B, Abb. 24). *In vivo* Studien mittels eines RNA-Reportersystems zeigten zudem, dass die *ubi1* 3'UTR in der Lage war die Interaktion mit Rrm4 zu vermitteln. Durch Einfügen des *ubi1* 3'UTRs in eine nicht transportierte mRNA wurde die Anzahl und Prozessivität von mRNA-enthaltenen Partikel deutlich erhöht (König *et al.*, 2009). In dieser Arbeit wurden innerhalb der *ubi1* mRNA zwei potentielle Bindestellen in der 3'UTR identifiziert (Abb. 24 A und B, Abb. 4 C, Abb. 13 B). Von diesen beiden Bindestellen enthält die stromaufwärts gelegene Bindestelle einen CA-reichen Abschnitt sowie das in dieser Arbeit identifizierte UAUG-Motiv (Abb. 24 B). Das in der iCLIP-Analyse identifizierte Clustermaximum lag dabei innerhalb des UAUG-Motivs, was darauf hinweist, dass die Quervernetzung der mRNA an diesem Motiv stattfand (Abb. 24 B). Zudem zeigte die detaillierte Auflösung der Bindestellen, dass sich die Quervernetzungsstellen in unmittelbarer Nähe zu dem Clustermaximum häuften, so dass das Clustermaximum tatsächlich der Bindestelle von Rrm4 zu entsprechen scheint (vgl. Abb. 13 B). Darüber hinaus deuteten die in dieser Arbeit identifizierten Bindestellen innerhalb der *ubi1* 3'UTR an, dass CA-reiche Sequenzen möglicherweise nicht durch Rrm4 gebunden werden (Abb. 24 B).

Die spezifische Interaktion zwischen Rrm4 und der *ubi1* 3'UTR konnte in dieser Arbeit im Hefe-Drei-Hybrid-System jedoch nicht nachgewiesen werden. Ein möglicher Grund könnte die Länge der getesteten Sequenzen darstellen, da größere Sequenzen aufgrund der Bildung von alternativen Sekundärstrukturen oder Destabilisierung des RNA-Hybrids die Interaktion im Hefe-Drei-Hybrid System erheblich stören können (Sengupta *et al.*, 1999). Untersuchungen zur Bindung des *iron response elements* (IRE) durch das *Iron response Protein -1* (Irp1) ergaben, dass bereits mäßig lange RNA-Sequenzen die Interaktion zwischen Protein und RNA stören können und zu testende Sequenzen aus diesem Grund eher geringe Längen aufweisen sollten (Sengupta *et al.*, 1999). Aus diesem Grund sollte die Interaktion mit der *ubi1* 3'UTR erneut untersucht werden.

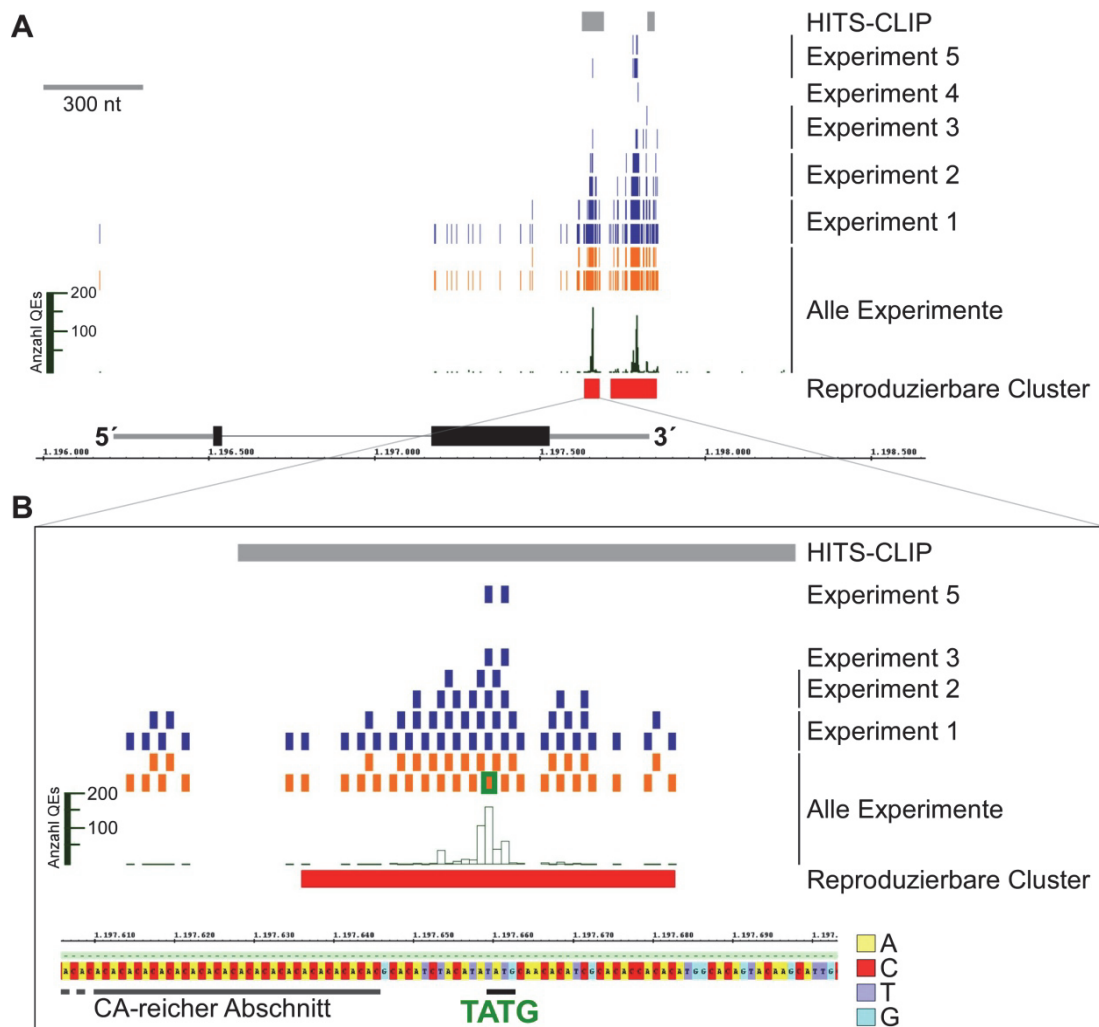


Abbildung 24: Die *ubi1* mRNA besitzt zwei potentielle Bindestellen in der 3'UTR

Grafische Darstellung der innerhalb der *ubi1* mRNA liegenden Bindestellen (**A**) Verteilung der in den iCLIP-Experimenten identifizierten Quervernetzungsstellen und reproduzierbaren Cluster, sowie der in dem HITS-CLIP Ansatz gefundenen CLIP-Tags. Die dicken grauen Linien stellen die 300 nt langen 5' und 3'UTR dar. Exons sind als schwarze Balken abgebildet, während die intronische Region durch die dünne schwarze Linie dargestellt wird. Alle identifizierten CLIP-Tags sind als graue Balken zusammengefasst. Die Positionen der Quervernetzungsstellen sind durch die hellblauen und orange-farbenen Linien markiert. Die Anzahl der Quervernetzungsereignisse pro Quervernetzungsstelle sind unterhalb der Quervernetzungsstellen des vereinigten Datensatzes als Balkendiagramm abgebildet. Die reproduzierbaren Cluster werden durch die roten Balken dargestellt. Die Zahlenleiste gibt die Koordinaten innerhalb von Chromosom 5 wieder (**B**) Detaillierte Auflösung des ersten Clusters in der 3'UTR der *ubi1* mRNA. Unterhalb der genomischen Koordinaten ist die genomische Sequenz abgebildet und farbig markiert (rot: C, gelb: A, hellblau: T, türkis: G). Die dem Clustermaximum entsprechende Quervernetzungsstelle des vereinigten Datensatzes ist durch eine grüne Umrahmung an Position 11.970.660 hervorgehoben. Des Weiteren sind die Positionen des CA-reichen Abschnitts und des TATG (UAUG)-Motifs markiert.

Um die offenen Fragen zu klären könnte die Interaktion von Rrm4 mit mRNA sowie die Bildung von Rrm4-Multimeren beispielsweise mit Hilfe von *Electrophoretic Mobility Shift Assays* (EMSAs; Hellman und Fried, 2007) untersucht werden.

3.7 Modellvorstellung für den Rrm4-vermittelten mRNA-Transport

Laut der aktuellsten Modellvorstellung des Rrm4-vermittelten mRNA-Transports wird Rrm4 in Filamenten bidirektional entlang von Mikrotubuli auf Rab5a-positiven Endosomen transportiert (Abb. 25 A und B; Baumann *et al.*, 2012 ; Göhre *et al.*, 2012). Der bidirektionale Transport entlang von Mikrotubuli wird dabei durch das Plusende-gerichtete Motorprotein Kinesin-3 und dem Minusende-gerichteten Motorprotein Dynein vermittelt (Baumann *et al.*, 2012). Die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse implizieren, dass Rrm4 eine globale Rolle während des filamentösen Wachstums einnimmt (vgl. Abb. 15). Die Funktion von Rrm4 scheint sich dabei nicht nur auf die Lokalisation von Polaritätsfaktoren an der Wachstumsspitze oder Septen von Filamenten zu beschränken. Stattdessen scheint Rrm4 die Rolle eines allgemeinen mRNA-Transporters in Filamenten einzunehmen. Wie jedoch die Proteinlokalisierung durch Rrm4 vermittelt wird, ist bislang noch unklar. Wahrscheinlich wird die Proteinlokalisierung durch die lokale Translation der transportierten mRNA ermöglicht (Abb. 25 A; Göhre *et al.*, 2012).

Die lokale Translation der bidirektional transportierten mRNAs könnte analog zu dem in Neuronen aufgestellten „Sushi-Fließband“ (*sushi belt*)-Modell erfolgen (Doyle und Kiebler, 2011). Der Modellvorstellung zufolge würden durch Rrm4 transportierte mRNAs je nach Bedarf und Funktion des kodierten Proteins am apikalen Pol, am basalen Pol oder an sonstiger Stelle im Zytoplasma lokal abgeladen und translatiert werden (Abb. 25 A). Kürzlich wurde zudem die Rrm4-abhängige Translation von Proteinen an Endosomen anhand des Septins Cdc3 postuliert (Baumann, 2013). Demnach könnten transportierte Transkripte bereits während des Transports translatiert werden, so dass neben mRNAs auch Proteine transportiert und lokal abgeladen werden können.

Die Bindung und die Translation der durch Rrm4 transportierten mRNAs könnte durch posttranslationelle Modifikationen reguliert werden. Die RNA-Bindung des ELAV-ähnlichen Proteins HuR wird durch Phosphorylierung des Proteins moduliert (Abdelmohsen *et al.*, 2008 ; Doller *et al.*, 2010 ; Kim *et al.*, 2010). Beispielsweise reguliert die Kinase Chk2 (**check point kinase 2**) die Bindung der für ein Sirtuin kodierenden *SIRT1* mRNA durch HuR (Abdelmohsen *et al.*, 2008). Die Translation transportierter mRNAs wird ebenfalls durch posttranslationelle Modifikationen gesteuert. In *S. cerevisiae* wird beispielsweise die Unterdrückung der Translation der *ASH1* mRNA durch die Phosphorylierung von Khd1p und Puf6p in der Tochterzelle aufgehoben (Heym und Niessing, 2012). Des Weiteren wird in Oligodendrozyten der Maus die während des mRNA-Transports blockierte Translation des

MBP (Myelin-Basisches Protein) ebenfalls durch Phosphorylierung der am Transport beteiligten RBPs hnRNP A2 und hnRNP F aufgehoben (White *et al.*, 2008 ; White *et al.*, 2012). Es erscheint daher plausibel, dass Rrm4 ebenfalls posttranslational modifiziert wird.

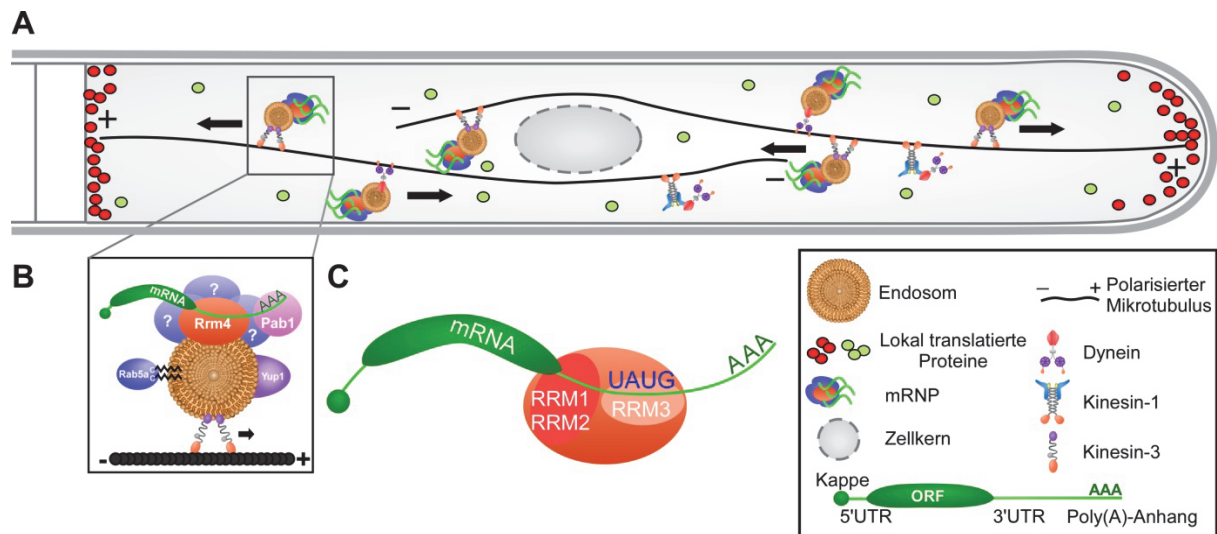


Abbildung 25: Modell des Rrm4-vermittelten Transport in *U. maydis*

Modell des an Endosomen gekoppelten Rrm4-vermittelten mRNA-Transports. **(A)** Rrm4 wird bidirektional entlang von Mikrotubuli durch den Plusende-gerichteten Motor Kinesin-3 und den Minusende-gerichteten Motor Dynein transportiert. Im Falle von Dynein erfordert dies den Kinesin-1-vermittelten Transport von Dynein an das Plusende von Mikrotubuli. Die spezifische Lokalisation von Proteinen wird wahrscheinlich durch lokale Translation transportierter mRNAs vermittelt. Im Falle von Polaritätsfaktoren (rote Kreise), wie z.B. Septinen, Rho-GTPase oder Forminen, gewährleistet der Rrm4-vermittelte mRNA-Transport deren Lokalisation an der Wachstumspitze und dem Septum (rote Kreise). Rrm4 scheint aber auch an der Kompartimentalisierung von beispielsweise mitochondrialen Proteinen (grüne Kreise) im gesamten Zytoplasma beteiligt zu sein. **(B)** Rrm4 wird auf Rab5a-positiven Endosomen transportiert. Die Kolokalisation mit dem Poly(A)-bindenden Protein Pab1 dient als Indikator für das Vorhandensein transportierter mRNAs innerhalb der Rrm4-positiven mRNPs. Die weitere Zusammensetzung der Rrm4-enthaltenen mRNPs ist jedoch noch unbekannt. **(C)** Anhand der in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse könnte Rrm4 mRNAs zunächst über die primär RNA-bindende Domäne RRM3 das Motiv UAUG in der 3'UTR binden. Dies würde es RRM1 und RRM2 ermöglichen weitere, bislang unbekannte Motive innerhalb der mRNA zu binden („Fliegenfischer-Modell“, Mackereth und Sattler, 2012). RRM3 könnte zudem auch als Protein-Proteininteraktionsfläche dienen und an der Rekrutierung weiterer Proteine beteiligt sein. Diese Abbildung ist modifiziert nach Göhre *et al.*, 2012.

Die Zusammensetzung der Rrm4-enthaltenen mRNPs ist noch unbekannt. Die in der iCLIP-Analyse beobachtete Anreicherung von AAA innerhalb der Cluster könnte aber auf eine Interaktion mit dem Poly(A)-Anhang von mRNAs zurückzuführen sein. Denkbar wäre, dass Rrm4 hierbei entweder direkt oder indirekt über einen bislang unbekanntem Faktor, wie z.B. die Upa-Proteine, mit dem Poly(A)-bindenden Protein Pab1 interagiert (Abb. 25 B; T. Pohlmann und M. Feldbrügge, persönliche Mitteilung).

Anhand des in dieser Arbeit identifizierten Bindemotivs könnte Rrm4 mRNA sequentiell binden („Fliegenfischer“ Modell, Mackereth und Sattler, 2012). Da RRM3 die primäre RNA-bindende Domäne zu sein scheint (siehe oben; Becht *et al.*, 2006 ; König *et al.*, 2007) erscheint es plausibel, dass dem Modell entsprechend mRNAs als Erstes über UAUG und RRM3 gebunden werden. Dies würde es daraufhin den ersten beiden Domänen RRM1 und

RRM2 ermöglichen, weitere Bindestellen innerhalb der Ziel-mRNA zu binden (Abb. 22 C). Möglicherweise könnten diese Bindestellen CA-reiche oder andere unstrukturierte Sequenzen enthalten.

3.8 Ausblick

Die in dieser Arbeit durchgeführten Analysen ermöglichten es das Bindeverhalten von Rrm4 zum ersten Mal im Detail zu analysieren. Neben einer großen Anzahl potentieller Ziel-mRNAs, wurde ein neues Bindemotiv identifiziert. Aufgrund der geringen Komplexität der bisherigen iCLIP-Banken besteht aber weiterer Optimierungsbedarf der Methode, um die Daten in vollem Umfang und reproduzierbar analysieren zu können. Diesbezüglich müssen weitere Experimente durchgeführt werden. Zudem erschweren fehlende Expressionsdaten die Differenzierung zwischen stabilen und instabilen Interaktionen. Auf Grund dessen sollten RNA-Seq-Experimente die Normalisierung der iCLIP-Daten ermöglichen.

Die Hauptfrage ist jedoch, welche biologische Funktion der Rrm4-vermittelte mRNA-Transport ausübt. Die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse implizieren, dass Rrm4 neben Zellpolarität an einer Vielzahl von weiteren Prozessen beteiligt zu sein scheint. Anhand der in dieser Arbeit gewonnenen Daten können nun Prozess-spezifische Analysen detaillierter durchgeführt werden. Beispielsweise kann die Beteiligung von bislang unbekanntem Kandidaten am polaren Wachstum durch Deletionsstudien untersucht werden. Aus diesem Grund wäre es interessant, ob weitere ESCRT-Komponenten ebenfalls eine Beteiligung am unipolaren Wachstum aufweisen. Ob die ESCRT-Maschinerie aber tatsächlich durch Rrm4 reguliert wird, muss noch geklärt werden. Zu diesem Zweck sollte untersucht werden, ob in *rrm4*-Deletionsstämmen mögliche Sortierungsdefekte von Membranproteinen vorliegen.

Die Beteiligung von Rrm4 an der Regulation der Zellpolarität kann aufgrund der Identifizierung vielversprechender Kandidaten wie z.B. Forminen, Septinen oder Rho-GTPasen nun gezielter erfolgen. In diesen Fällen sollte untersucht werden, ob eine Abhängigkeit der Proteinlokalisierung von Rrm4 vorliegt. Dies kann anhand von Gfp-Fusionsproteine untersucht werden.

Darüber hinaus kann nun das Bindeverhalten von Rrm4 präziser analysiert werden. Neben der Lokalisation von Bindestellen, konnte auch ein Bindemotiv für Rrm4 identifiziert werden. Dabei erwies sich das identifizierte Motiv als erforderlich für die Interaktion mit Rrm4, wobei dies noch anhand von *in vivo* Sequenzen bestätigt werden muss. Die fehlende Interaktion zwischen der *ubi1* 3'UTR und Rrm4 im Hefe-Drei-Hybrid-System zeigte jedoch, dass diese Methode für diesen Zweck ungeeignet zu sein scheint. Eine Alternative wäre stattdessen die Anwendung der EMSA Technik. Zudem ist noch gänzlich unklar, wie genau Rrm4 mit gebundener mRNA interagiert. Die hier durchgeführten Experimente deuten an, dass Rrm4 mRNA über RRM3 sequenzspezifisch bindet, obwohl diese Domäne für die Funktion von

Rrm4 nicht wichtig zu sein scheint (Becht *et al.*, 2006). Unklar blieb weiterhin die Rolle der für die Funktion von Rrm4 wichtigen Domänen RRM1 und RRM2. Offen bleibt die Frage, ob diese Domänen mRNA spezifisch oder unspezifisch binden. Die Durchführung von iCLIP-Experimenten mit den mutierten RRM-Domänen RRM1 und RRM3 beispielsweise könnten es hierbei ermöglichen, die durch die jeweiligen Domänen gebundenen mRNAs zu identifizieren (Becht *et al.*, 2006).

Die (i)CLIP-Daten könnten zudem anhand des Einfügens von Mutationen innerhalb von identifizierten Bindestellen verifiziert werden. Es wäre zu erwarten, dass hierdurch die Interaktion zwischen Rrm4 und mRNA erlischt bzw. stark geschwächt wird. Diese Analysen könnten biochemisch mit Hilfe der EMSA-Methode oder genetisch mittels des Hefe-Drei-Hybrid-Systems erfolgen. Zudem kann *in vivo* anhand des in *U. maydis* etablierten *in vivo* RNA-Reportersystems die Kolokalisation der mRNA mit Rrm4 überprüft werden (König *et al.*, 2009).

Des Weiteren wäre es von Interesse zu klären, ob die RNA-Bindung durch Rrm4 posttranslational reguliert wird. In diesem Fall sollte überprüft werden, ob Rrm4 modifiziert wird und ob diese Modifikation Einfluss auf die RNA-Bindung und eventuell die Translation des Proteins ausübt. Zudem sollte auch untersucht werden, ob für die mRNA-Bindung durch Rrm4 akzessorische Faktoren benötigt werden. Diesbezüglich ist die Zusammensetzung der Rrm4-enthaltenen mRNPs bislang noch unklar. Neben der Zusammensetzung der Rrm4-enthaltenen mRNPs ist ebenfalls noch nicht bekannt, ob mRNAs zufällig in Rrm4-enthaltene mRNPs gepackt werden oder ob diese, der Definition des eukaryotischen RNA-Operons entsprechend (Keene, 2007) funktionell verwandte mRNAs gemeinsam transportiert werden. Diese vertiefenden Studien in *U. maydis* sollten es ermöglichen einen umfangreicheren Einblick in die RNA-Biologie von filamentösen Pilzen erhalten und sollten zudem dazu beitragen das bisherige Wissen über die eukaryotische RNA-Biologie weiter zu vertiefen.

4. Material und Methoden

4.1 Materialien und Bezugsquellen

4.1.1 Chemikalien, Medien, Enzyme und Kits

Chemikalien:

Alle in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien wurden in p.a. Qualität von folgenden Herstellern bezogen:

Hersteller	Niederlassung
AppliChem	Darmstadt, Deutschland
Becton-Dickinson	Heidelberg, Deutschland
Biorad	München, Deutschland
Biozym	Hessisch Oldendorf, Deutschland
Carl-Roth	Karlsruhe, Deutschland
Grüssing	Filsum, Deutschland
Hartmann Analytic	Braunschweig, Deutschland
Life Technologies	Darmstadt, Deutschland
Merck	Darmstadt, Deutschland
Roche	Mannheim, Deutschland
Serva Electrophoresis	Heidelberg, Deutschland
Sigma-Aldrich	München, Deutschland
VWR	Darmstadt, Deutschland

Medien:

Alle verwendeten Medien wurden nach dem Ansetzen durch Autoklavieren (5 min bei 121°C) sterilisiert.

E. coli:

E. coli wurde in dYT-Flüssigmedium und YT-Festmedium kultiviert (nach Ausubel *et al.*, 1987; Sambrook *et al.*, 1989). Je nach Selektionsmarker wurde die entsprechende Menge Antibiotika zum Medium hinzugegeben.

dYT-Flüssigmedium:

1,6% (w/v) Bacto-Trypton
1% (w/v) Hefeextrakt
0,5% (w/v) NaCl

YT-Festmedium:

0,8% (w/v) Bacto-Trypton
0,5% (w/v) Hefeextrakt
0,5% (w/v) NaCl
2% (w/v) Bacto-Agar

S. cerevisiae:

S. cerevisiae wurde in Selektionsmedien kultiviert, die anhand eines Dreikomponentensystems erzeugt wurden:

- (Komponente 1) 200 ml 2x SC-Nährlösung ohne die gewünschten Aminosäuren bzw. 2xYP-Stammlösung
- (Komponente 2) 50 ml des gewünschten Zuckers (in dieser Arbeit nur 20% Glucose)
- (Komponente 3) Flüssigmedien: 250 ml H₂O
Festmedien: 10 g Agar in 250 ml H₂O

Zusätzlich wurden noch benötigte Komponenten wie 3-AT (Endkonzentration 5 mM)

hinzugegeben.

Dropout-Pulver:

Alanine	20 g
Cystein	20 g
Arginin	20 g
Glutamin	20 g
Asparagin	20 g
Glutaminsäure	20 g
Asparaginsäure	20 g
Glycin	20 g
Inositol	20 g
Serin	20 g
Isoleucin	20 g
Threonine	20 g
Lysine	20 g
Tyrosine	20 g
Methionine	20 g
Valine	20 g
Phenylalanine	20 g
p-Aminobenzoic Acid	2 g
Proline	20 g

SC Pulver:

Dropout-Pulver	36,7 g
Histidin	2 g
Leucin	4 g
Uracil	2 g
Tryptophan	2 g
Adenin	0,5 g

→ je nach Selektionsmedium die entsprechenden Komponenten weglassen

2x SC-Nährlösung:

SC Pulver (ohne spezifische AS) 5 g
 Yeast Nitrogen Base w/o Amino acids 16,75 g
 → auffüllen mit H₂O auf 1 L
 → Auf 200 ml in 250 ml Flaschen aliquotieren
 → Autoklavieren

2x YP Stammlösung:

Bacto Peptone 50 g
 Bacto Yeast Extract 25 g
 → auffüllen mit ddH₂O auf 1 L
 → Auf 200 ml aliquotieren
 → Autoklavieren

20% Glucose/Galaktose/Raffinose:

50 g auf 250 ml
 Auf 50 ml aliquotieren
 → sterilfiltrieren

Wasser-Agar:

250 ml Bidest
 10 g Agar
 in 500 ml Flasche autoklavieren

U. maydis:

U. maydis wurde in CM- oder NM-Medium kultiviert (nach Holliday, 1974):

CM (Complete Medium)-Medium

0,15% (w/v) NH₄NO₃
 0,25% (w/v) Casamino Acids
 0,05% (w/v) DNA
 0,1% (w/v) Hefeextrakt
 1% (v/v) Vitamin-Lösung (s.u.)
 6,25% (v/v) Salz-Lösung (s.u.)
 0,1% (v/v) Spurenelement-Lösung (s.u.)
 2% (w/v) Bacto Agar (für Festmedium)

- pH-Wert auf 7,0 mit **NaOH** einstellen und autoklavieren.

Nach dem Autoklavieren:

1% (w/v) Glukoselösung (steril)

Spurenelement-Lösung

(nach Holliday, 1974):
 0,006% (w/v) H₃BO₃
 0,014% (w/v) MnCl₂ x 4 H₂O
 0,04% (w/v) ZnCl₂
 0,004% (w/v) NaMoO₄ x 2 H₂O
 0,01% (w/v) FeCl₃ x 6 H₂O
 0,004% (w/v) CuSO₄ x 5 H₂O

In H₂O; sterilfiltrieren

NM (Nitrat Minimal)-Medium

0,3% (w/v) KNO₃
 6,25% (v/v) Salz-Lösung

- pH-Wert auf 7,0 mit **KOH** einstellen und autoklavieren.

Nach dem Autoklavieren:

1% (w/v) Glukoselösung (steril)

Vitamin-Lösung

(nach Holliday, 1974):
 0,01% (w/v) Thiamin
 0,005% (w/v) Riboflavin
 0,005% (w/v) Pyridoxin
 0,02% (w/v) Calcumpantothentat
 0,05% (w/v) p-Aminobenzoessäure
 0,02% (w/v) Nikotinsäure
 0,02% (w/v) Cholinchlorid
 0,1% (w/v) myo-Inositol

In H₂O sterilfiltrieren

Salz-Lösung (nach Holliday, 1974):

1,6% (w/v) KH₂PO₄
 0,4% (w/v) Na₂SO₄
 0,8% (w/v) KCl
 0,132 % (w/v) CaCl₂ x 2 H₂O
 0,8% (v/v) Spurenelement-Lösung (s.u.)
 0,2% (w/v) MgSO₄ (wasserfrei)

In H₂O; sterilfiltrieren

NSY-Glycerin

(Einfriermedium):
 0,8% (w/v) Nutrient Broth
 0,1% (w/v) Hefeextrakt
 0,5% (w/v) Saccharose
 69,9% (v/v) Glycerin

In H₂O; autoklavieren

Tabelle 4:: In dieser Arbeit verwendete Enzyme

Enzym	Hersteller
Lysozym	Serva
Phusion Polymerase	Thermo Scientific (Schwerte, Deutschland)
Restriktionsenzyme	New England Biolabs (Ipswich, MA, USA)
Alkalische Phosphatase	Roche
T4-DNA Ligase	Roche
Quick-Ligase	New England Biolabs
Taq-Polymerase	Laborpräparation
T4-Polynukleotidkinase (+ 3'Phosphataseaktivität)	New England Biolabs
T4-RNA Ligase	New England Biolabs
TEV-Protease	Promega (Mannheim, Deutschland)
Proteinase K	Roche
Superscript III Reverse Transkriptase	Life Technologies
RNAse T1	Roche
Circ Ligase II	Epicentre (Madison, WI; USA)
Accuprime Supermix I	Life Technologies
DNase I	Roche

Tabelle 5: In dieser Arbeit verwendete Kits

Kit	Hersteller	Beschreibung
TOPO-TA Klonierungskit	Life Technologies	Klonierung von DNA-Fragmenten in den pCRII-TOPO Vektor
JetSorb Kit	Genomed (Löhne, Deutschland)	Elution von DNA aus Agarosegelen
JetQuick	Genomed	Aufreinigung von Plasmid-DNA
SureClean	Bioline (Luckenwalde, Deutschland)	Entfernung von Proteinen aus PCR- und Restriktionsansätzen; Fällung von DNA
Plasmid Midi Kit	Qiagen (Hilden, Deutschland)	Hochreine Aufreinigung von Plasmid-DNA
BigDye [®] Terminator Cycle v3.1 Sequencing Kit	Life Technologies	Sequenzierungsreaktionen

Tabelle 6: In dieser Arbeit verwendete DNA-Größenstandards

Größenstandard	Hersteller
GeneRuler 50 bp Leiter	Thermo Scientific
GeneRuler 1 kb Leiter	Thermo Scientific
Low Molecular Weight DNA Leiter	New England Biolabs
λ-DNA PstI-Fragmente	Laborpräparation (λ DNA ; Thermo Scientific)

Tabelle 7: In dieser Arbeit verwendete Protein-Größenstandards

Protein-Größenstandard	Hersteller
Spectra Multicolor Broad Range Proteinleiter	Thermo Scientific

4.1.2 Oligonukleotide

Bis auf den in den iCLIP-Experimenten verwendeten L3-Oligo wurden die verwendeten Oligonukleotide bei den Firmen metabion GmbH (Martinsried, Deutschland) und Sigma (München, Deutschland) synthetisiert. Der L3-Oligo wurde von der Firma Integrated DNA Technologies (IDT; Leuven, Belgien) synthetisiert. Die Sequenzen sind jeweils in 5'- 3'-Richtung angegeben. Wenn nicht anders vermerkt, wurde in den PCR-Reaktionen jeweils eine Konzentration von 50 pmol/µl eingesetzt.

Tabelle 8: In den iCLIP-Experimenten verwendete Oligonukleotide

Bezeichnung	Sequenz (in 5'- 3'-Richtung)	Bemerkung
RL1	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT	P5-Oligo
RL2	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATCGGTCTCGGCATTCTGCTGAACCGCTCTTCCGATCT	P3-Oligo
RL3	GTTCAGGATCCACGACGCTCTTCaaaa	Cut_Oligo
RL4	NNAACCNNNAGATCGGAAGAGCGTCGTGgataCTGAACCGC	iCLIP RT-Oligo (oRT1)
RL5	NNACAANNAGATCGGAAGAGCGTCGTGgataCTGAACCGC	iCLIP RT-Oligo (oRT2)
RL6	NNATTGNNAGATCGGAAGAGCGTCGTGgataCTGAACCGC	iCLIP RT-Oligo (oRT3)
RL7	NNAGGTNNAGATCGGAAGAGCGTCGTGgataCTGAACCGC	iCLIP RT-Oligo (oRT4)
RL8	NNCGCCNNAGATCGGAAGAGCGTCGTGgataCTGAACCGC	iCLIP RT-Oligo (oRT5)
RL9	NNGCCANNAGATCGGAAGAGCGTCGTGgataCTGAACCGC	iCLIP RT-Oligo (oRT9)
L3-Oligo	App-AGATCGGAAGAGCGGTTCAG-ddC	5'Adenylierung 3'ddC

Tabelle 9: Bei Klonierungen und Überprüfungen von Stämmen eingesetzte Oligonukleotide

Bezeichnung	Sequenz (in 5'- 3'-Richtung)	Bemerkung
RL639	ACGAATCGGGTGCAGTG	<i>vps27</i>
RL644	GAAGGGCTCGAACCAGTC	<i>vps27</i>
RL645	CCCTCTGCTGCCACTTTG	<i>vps27</i>
RL646	CGCCTCGGTGAGCTTATC	<i>vps27</i>
RL649	CTGTGCGCTCGACTTGAC	<i>vps60</i>
RL650	GGTCTCGCCTGCAATATTGAAATCGAGCCGATTGGTC	<i>vps60</i>
RL651	GGTCTCCAGGCCGGTCAAAGAGTACGAGTAGATG	<i>vps60</i>
RL652	GGTCTCCGGCCGCGTCTTCTATTTCAGATCCGC	<i>vps60</i>
RL653	GGTCTCGCTGCAATATTGCAGACGGTTCAACCGCG	<i>vps60</i>
RL654	GACGGGCGGTACATTCAG	<i>vps60</i>
RL655	AAGATGCGCGATGGTCCC	<i>vps60</i>
RL656	CTTGAGACGCTCGGTAGG	<i>vps60</i>
RL657	GCAGTGGGTGGTCCTAAC	<i>did2</i>
RL658	GGTCTCGCCTGCAATATTTCTTGCCTCCACCGTCCG	<i>did2</i>
RL659	GGTCTCCAGGCCGATGCAGATACAGCCTTGCTG	<i>did2</i>
RL660	GGTCTCCGGCCAAGTCTCGACATGATCAAATTTTCG	<i>did2</i>
RL661	GGTCTCGCTGCAATATTAGCGCAGGAGTACGATCTCC	<i>did2</i>
RL662	GGCCGAAACCACCTTCAG	<i>did2</i>
RL663	GCTCGCTCAAGGCAACAC	<i>did2</i>
RL664	GCCGTTCTCGTCTGCTAC	<i>did2</i>
RL716	GTGTGAAAGATCCGAAGTTAAAAACGGCACGCGCTGGCGCTGTC	SELEX A1: AAAA
RL717	GACAGCGCCAGCGCGTGCCGTTTTTAACCTTCGGATCTTTCACAC	SELEX A1: AAAA
RL744	ATCGATGCTGTTTCGCTTTTGCTCG	<i>rpl40(ubi1; um02440)</i>
RL745	GGCGCGCCGTTTCATGATCCTGCCTTC	<i>rpl40(ubi1; um02440)</i>
RL746	GGCGCGCCCCAGTGCCTCCAGCACG	<i>rpl40(ubi1; um02440)</i>
RL750	GTGTGAAAGATCCGAAGTTTCTCACGGCACGCGCTGGCGCTG	SELEX A1: TCTCA
RL751	CAGCGCCAGCGCGTGCCGTGAGAACTTCGGATCTTTCACAC	SELEX A1: TCTCA
RL824	GGTGTCACGGCTACCTTC	<i>ips1</i>
RL825	GGTCTCGCCTGCATTTAAATAATCCATCTACGATATTCC	<i>ips1</i>
RL826	GGTCTCCAGGCCGCTTGCAGAACGTGAGGGAAAG	<i>ips1</i>
RL827	GGTCTCCGGCCACGTGTTTTCAAGGGCATGTG	<i>ips1</i>
RL828	GGTCTCGCTGCATTTAAATGGGCATGGCAACCGTCTGG	<i>ips1</i>
RL829	CCGGCGTGTTTCTGCTTC	<i>ips1</i>
RL830	CGACGGCTACAACCTCAG	<i>ips1</i>
RL831	GAGCCTTGAGCGAGTACG	<i>ips1</i>

4.1.3 Plasmide und cDNA-Banken

cDNA-Banken:

In dieser Arbeit verwendete cDNA-Banken

Name	Bemerkung
Rrm4 CLIP-Banken	König <i>et al.</i> , 2009

Plasmide:

Alle in dieser Arbeit verwendeten und hergestellten Plasmide enthalten als Selektionsmarker Ampicillin- oder Gentamycin-Resistenzkassetten zur Selektion in *E. coli*. Alle Klonierungsschnitte wurden durch Restriktionsanalysen überprüft, während PCR-Amplifikate nach erfolgreicher Klonierung sequenziert wurden. Als Selektionsmarker tragen die Plasmide Resistenzmarker gegenüber den folgenden Antibiotika:

Ampicillin (Amp)
 Kanamycin (Kann)
 Gentamycin (Gent)

Die Hefe-Vektoren tragen neben einer Ampicillin-Resistenzkassette folgende Auxotrophiemarker:

Adenin (ADE2)
 Leucin (LEU2)
 Uracil (URA3)

Tabelle 10: In dieser Arbeit verwendete Plasmide

Plasmidnummer	Bezeichnung	Marker	Bemerkung
	pCR 2.1 TOPO	Amp, Kan	Invitrogen
	pCR II Topo	Amp, Kan	Invitrogen
pUMa194	pBSshn	Amp	Hyg-Resistenzkassette (Kämper, 2004)
pUMa389	pMF5-1n	Amp, Kan	C-terminale eGfp-NatR-Kassette (Becht <i>et al.</i> , 2006)
pUMa399	pACTII-Ade	Amp, ADE, LEU	Hefe-Drei-Hybrid: Beutehybridvektor (M. Feldbrügge; unveröffentlicht)
pUMa494	pIII MS2-5	Amp, URA3	Hefe-Drei-Hybrid: Köderhybridvektor (J. Hohenner, unveröffentlicht)
pUMa550	pA1-IIIIMS2-4	Amp, URA3	Hefe-Drei-Hybrid-Vektor: Köderhybrid (König <i>et al.</i> , 2007)
pUMa427	RRM4-gfp-pACTII-Ade	Amp, ADE, LEU	Hefe-Drei-Hybrid: Beutehybrid (König <i>et al.</i> , 2007)
pUMa1467	pUC57-apR-Bsal-Linker	Amp	Bsal-Klonierung: Zielvektor (M. Terfrüchte und K. Schipper)
pUMa1507	Hyg-Bsal storage vector	Gent	Bsal-Klonierung: Hyg-Resistenzkassette (M. Terfrüchte und K. Schipper)
pUMa1546	Bsal storage vector 2 with Sfil module of pUMa317 (Hyg)	Gent	Bsal-Klonierung: eGfp-HygR-Fusionskassette (M. Terfrüchte und K. Schipper)

Tabelle 11: In dieser Arbeit hergestellte Plasmide

Plasmidnummer	Bezeichnung	Resistenz	Bemerkung
pUMa1698	pVps60-KO-hyg	Amp, Kan, Hyg	Geneletion
pUMa1699	pDid2-KO-hyg	Amp, Kan, Hyg	Gendeletion
pUMa1700	pDid2-gfp-nat	Amp, Kan, Nat	C-terminale Gfp-Fusion
pUMa1714	pVps27-gfp-hyg	Amp, Kan, Hyg	C-terminale Gfp-Fusion
pUMa1716	pVps60-gfp-hyg	Amp, Kan, Hyg	C-terminale Gfp-Fusion
pUMa1718	pDid2_cterm UF Sfil	Amp, Kan, Hyg	Klonierungsvektor
pUMa1719	pDid2_cterm DF Sfil	Amp, Kan, Hyg	Klonierungsvektor
pUMa1758	pA1-IIIMS2-4_AAAA	Amp, URA3	Hefe-Drei-Hybrid: Köderhybrid
pUMa1774	pRpl40-3'UTR-TOPO	Amp, Kan, Hyg	Klonierungsvektor
pUMa1775	pRpl40-3'UTR-bsl-TOPO	Amp, Kan, Hyg	Klonierungsvektor
pUMa1783	pIII MS2-4_ubi1-3U	Amp, URA3	Hefe-Drei-Hybrid: Köderhybrid
pUMa1784	pIII MS2-4_ubi1-3Ubsl	Amp, URA3	Hefe-Drei-Hybrid: Köderhybrid
pUMa1816	lps1-KO-hyg	Amp, Kan, Hyg	Deletion
pUMa1937	pA1-IIIMS2-4_TCTCA	Amp, URA3	Hefe-Drei-Hybrid: Köderhybrid

Plasmidbeschreibungen:**Verwendete Ausgangsplasmide:****pCR 2.1 TOPO** (Life Technologies)

Vektor zum Klonieren von PCR-Produkten mittels Topoisomerase-Aktivität. Die Insertion von Fragmenten kann anhand einer Blau/Weiß-Selektion überprüft werden. Der Vektor trägt zur Selektion in *E. coli* Ampicillin- und Kanamycin-Selektionsmarker.

pCR II TOPO (Life Technologies)

Plasmid zum Klonieren von PCR-Produkten mittels Topoisomerase-Aktivität. Die Insertion von Fragmenten kann anhand einer Blau/Weiß-Selektion überprüft werden. Zur Selektion in *E. coli* trägt der Vektor Ampicillin- und Kanamycin-Selektionsmarker.

pUMa194 (pBShhn; 4773 bp; Kämper, 2004)

Klonierungsplasmid. Trägt die zum *Sfil*-Kassettsystem (Brachmann *et al.*, 2004b) kompatible Hygromycin-Resistenzkassette für Gendeletionen.

pUMa389 (pMF5-1n; 5336 bp; Becht *et al.*, 2006)

Klonierungsplasmid. Trägt die zum *Sfil*-Kassettsystem (Brachmann *et al.*, 2004b) kompatible eGfp-Nourseothricin-Resistenzkassette für C-terminale Gfp-Fusionen.

pUMa399 (pACTII-Ade; 9829 bp; M. Feldbrügge; unveröffentlicht)

Beutehybridvektor des Hefe-Drei-Hybrid-Systems. Der Vektor kodiert die Gal4-Aktivierungsdomäne. Als Selektionsmarker enthält der Vektor eine Ampicillin-Resistenzkassette zur Selektion in *E. coli*, sowie die Auxotrophiemarker *leu2* und *ade2* zur Selektion in *S. cerevisiae*.

UMa494 (pIII MS2-5; 12374 bp; J. Hohenner; unveröffentlicht)

Köderhybridvektor des Hefe-Drei-Hybrid-Systems. Der Vektor kodiert für beide MS2-Bindestellen sowie ein prf1-gfp Insert. Als Selektionsmarker enthält der Vektor eine

Ampicillin-Resistenzkassette zur Selektion in *E. coli*, sowie den Auxotrophiemarker *ura3* zur Selektion in *S. cerevisiae*.

pUMa427 (pRRM4-gfp-pACTII-Ade; 12930 bp; König *et al.*, 2007)

Beutehybridvektor des Hefe-Drei-Hybrid-Systems. Der Vektor kodiert für ein Rrm4-Fusionsprotein, welches N-terminal eine Gal4-Aktivierungsdomäne und C-terminal Gfp trägt. Als Selektionsmarker enthält der Vektor eine Ampicillin-Resistenzkassette zur Selektion in *E. coli*, sowie die Auxotrophiemarker *leu2* und *ade2* zur Selektion in *S. cerevisiae*.

pUMa550 (pA1-IIIMS2-4; 7984 bp ;König *et al.*, 2007)

Köderhybridvektor des Hefe-Drei-Hybrid-Systems. Der Vektor kodiert für beide MS2-Bindestellen sowie die SELEX-Sequenz A1. Als Selektionsmarker enthält der Vektor eine Ampicillin-Resistenzkassette zur Selektion in *E. coli*, sowie den Auxotrophiemarker *ura3* zur Selektion in *S. cerevisiae*.

pUMa1467 (pUC57-apR-Bsal-Linker; 2719 bp; M. Terfrüchte und K. Schipper)

Zielvektor der Bsal-Klonierung. Die Insertion des ligierten Fragments kann anhand der Blau/Weiß-Selektion überprüft werden. Zur Selektion in *E. coli* trägt dieser Vektor eine Ampicillin-Resistenzkassette.

pUMa1507 (Hyg-Bsal storage vector; 4328 bp; M. Terfrüchte und K. Schipper)

Bsal-Klonierungsvektor. Dieser Vektor trägt die zu dem Bsal-System kompatible Hygromycin-Resistenzkassette für Gendelektionen. Zur Selektion in *E. coli* trägt der Vektor eine Gentamycin-Resistenzkassette.

pUMa1546 (Bsal storage vector 2 with Sfil module of pUMa317 (Hyg); 6177 bp; M. Terfrüchte und K. Schipper)

Bsal-Klonierungsvektor. Dieser Vektor trägt die zu dem Bsal-System kompatible eGfp-Hygromycin-Fusionskassette für C-terminale Fusionen. Zur Selektion in *E. coli* trägt der Vektor eine Gentamycin-Resistenzkassette.

In dieser Arbeit hergestellte Plasmide:

pUMa1698 (pVps60-KO_hyg; 6504 bp)

Plasmid für die Deletion des Gens *vps60* (*um05282*). Das Deletionskonstrukt enthält die aus pUMa1467 stammende Hygromycin-Resistenzkassette, welche von den endogenen Flanken des Gens flankiert wird. Die Flanken wurden per PCR-Reaktion auf genomische DNA des Stammes 521 hergestellt: die (1) stromaufwärts-gelegene Flanke wurde mittels der Oligos RL650 & RL651 (773 bp) und die (2) stromabwärts-gelegene Flanke durch die Oligos RL652 & RL653 (961 bp) amplifiziert. Beide PCR-Reaktionen fügten die für die Bsal-Klonierung erforderlichen Bsal-Restriktionsschnittstellen, sowie die in der Transformation zum Ausschneiden des Konstruktes verwendeten SspI-Schnittstellen ein. Das Konstrukt wurde in den Zielvektor pUMa1507 kloniert.

pUMa1699 (pDid2-KO_hyg; 6504 bp)

Plasmid für die Deletion des Gens *did2* (*um05607*). Das Deletionskonstrukt enthält die aus pUMa1467 stammende Hygromycin-Resistenzkassette, welche von den endogenen Flanken des Gens flankiert wird. Die Flanken wurden per PCR-Reaktion auf genomische DNA des Stammes 521 hergestellt: die (1) stromaufwärts-gelegene Flanke wurde durch die Oligos

RL658 & RL659 (1064 bp) und die (2) stromabwärts-gelegene Flanke mittels den Oligos RL660 & RL661 (818 bp) amplifiziert. Beide PCR-Reaktionen fügten die für die Bsal-Klonierung erforderlichen Bsal-Restriktionsschnittstellen, sowie die in der Transformation zum Ausschneiden des Konstruktes verwendeten Sspl-Schnittstellen ein. Das Konstrukt wurde in den Zielvektor pUMa1507 kloniert.

pUMa1700 (pDid2-gfp-nat; 8299 bp)

Plasmid für die Expression einer C-terminalen Fusion von Did2 mit Gfp unter dem nativen Promotor. Es enthält die aus den Plasmiden pUMa1718 und pUMa1719 stammenden Sfil-Kassetten der stromauf- und -abwärts gelegenen Flanken von *did2*, sowie die von Sfil-Restriktionsschnittstellen flankierte Gfp-Nourseothricinresistenzkassette aus pUMa389 (2448 bp). Die Flanken wurden aus pUMa1718 und pUMa1719 mit Sfil und BglII herausgeschnitten (2059 bp bzw. 3799 bp). Das Fusionskonstrukt wird von zwei Sspl-Schnittstellen flankiert.

pUMa1714 (pVps27-gfp-hyg; 8452 bp)

Plasmid für die Expression einer C-terminalen Fusion von Vps27 (*um03862*) mit Gfp unter dem nativen Promotor. Das Konstrukt setzt sich aus einer C-terminalen Gfp-Hygromycinresistenzkassette aus pUMa1546 zusammen, welche von den endogenen Flanken des Gens flankiert wird. Die Flanken wurden per PCR-Reaktion auf genomische DNA des Stammes 521 hergestellt: die (1) stromaufwärts-gelegene Flanke wurde anhand der Oligos RL689 & RL690 (1108 bp) und die (2) stromabwärts-gelegene Flanke mit den Oligos RL642 & RL643 (940 bp) amplifiziert. Beide PCR-Reaktionen fügten die für die Bsal-Klonierung erforderlichen Bsal-Restriktionsschnittstellen sowie die in der Transformation des Konstruktes verwendeten Sspl-Schnittstellen ein. Das Konstrukt wurde in den Zielvektor pUMa1507 kloniert.

pUMa1716 (pVps60-gfp-hyg; 8356 bp)

Plasmid für die Expression einer C-terminalen Fusion von Vps60 mit Gfp unter dem nativen Promotor. Das Konstrukt setzt sich aus einer C-terminalen Gfp-Hygromycin-Fusionskassette aus pUMa1546 zusammen, die von endogenen stromaufwärts und stromabwärts gelegenen Flanken des Gens flankiert wird. Die Flanken wurden per PCR-Reaktion auf genomische DNA des Stammes 521 hergestellt: die (1) stromaufwärts-gelegene Flanke wurde in zwei PCR-Reaktionen anhand eines Megaprimers (RL692 & RL693: 66 bp) und RL691 (991 bp) hergestellt; die (2) stromabwärts-gelegene Flanke wurde mit den Oligos RL652 & RL653 (961 bp) amplifiziert. Beide PCR-Reaktionen fügten die für die Bsal-Klonierung erforderlichen Bsal-Restriktionsschnittstellen sowie die in der Transformation des Konstruktes verwendeten Sspl-Schnittstellen ein. Das Konstrukt wurde in den Zielvektor pUMa1507 kloniert.

pUMa1718 (pDid2_cterm UF Sfil, 5044 bp)

Klonierungsplasmid für die Deletion von *did2*. Das Plasmid trägt die zum Sfil-Kassettensystem kompatible stromaufwärts gelegene Flanke von *did2*. Die Flanke wurde per PCR-Reaktion anhand der Oligos RL694 & RL695 (1071 bp) auf genomische DNA des Stammes 521 amplifiziert. Das amplifizierte Fragment wurde in den Vektor pCR II TOPO inseriert und wird von einer Sspl- und einer Sfil-Schnittstelle flankiert.

pUMa1719 (pDid2_cterm DF Sfil, 4793 bp)

Klonierungsplasmid für die Deletion von *did2*. Das Plasmid trägt die zum Sfil-Kassettensystem kompatible stromabwärts gelegene Flanke von *did2*. Die Flanke wurde per PCR-Reaktion anhand der Oligos RL696 & RL661 (1052 bp) auf genomische DNA des

Stammes 521 amplifiziert. Mittels der PCR wurden eine Sfil- und Sspl-Schnittstelle eingefügt. Das amplifizierte Fragment wurde in den Vektor pCR II TOPO integriert.

pUMa1758 (pA1-IIIMS2-4_AAAA, 7984 bp)

Köderhybridplasmid des Hefe-Drei-Hybrid-Systems. Als Ködersequenz kodiert das Plasmid die mutierte SELEX A1-Sequenz, in der das UAUGC durch AAAAA ausgetauscht wurde. Die Mutation wurde mittels inverser PCR-Reaktion auf pUMa550 durch die Oligos RL716 & RL717 (7984 bp) eingebaut.

pUMa1774 (pRpl40-3'UTR; 4304 bp)

Klonierungsplasmid. Dieses Plasmid trägt die 3'UTR des Gens *rpl40* (*um02440*). Die 3'UTR wurde durch die Oligos RL744 & RL745 (331 bp) auf genomische DNA des Stammes 521 amplifiziert. Das PCR-Fragment wird durch eine *Cla*I- und *Asc*I-Schnittstelle flankiert und in den pCR II TOPO-Vektor integriert.

pUMa1775 (pRpl40-3'UTR-bsl; 4181 bp)

Klonierungsplasmid. Dieses Plasmid trägt die ersten 208 bp der 3'UTR des Gens *rpl40* (*um02440*), welche die CA-reiche Region und das UAUG enthalten. Das Fragment der 3'UTR wurde durch die Oligos RL744 & RL746 (208 bp) auf genomische DNA des Stammes 521 amplifiziert. Das PCR-Fragment wird durch eine *Cla*I- und *Asc*I-Schnittstelle flankiert und in den pCR II TOPO-Vektor integriert.

pUMa1783 (pIII MS2-5_ubi1-3U, 8222 bp)

Köderhybridplasmid für das Hefe-Drei-Hybrid-System. Als Ködersequenz kodiert das Plasmid die 3'UTR von *rpl40*. Mittels der *Cla*I- und *Asc*I-Restriktionsschnittstellen wurde die 3'UTR aus pUMa1774 in pUMa494 kloniert.

pUMa1784 (pIII MS2-5_ubi1-3Ubsl, 8099 bp)

Köderhybridplasmid des Hefe-Drei-Hybrid-Systems. Als Ködersequenz kodiert das Plasmid das 208 bp große Fragment der 3'UTR von *rpl40*. Mittels der *Cla*I und *Asc*I-Restriktionsschnittstellen wurde dieses Fragment aus pUMa1775 in pUMa494 kloniert.

pUMa1816 (*ips1*Δ-*hyg*; 6319 bp)

Plasmid für die Deletion des Gens *ips1* (*um05549*). Das Deletionskonstrukt setzt sich aus der Hygromycin-Resistenzkassette aus pUMa1467 zusammen, die von den endogenen Flanken des Gens flankiert wird. Die Flanken wurden per PCR-Reaktion auf genomische DNA des Stammes 521 hergestellt: die (1) stromaufwärts gelegene Flanke wurde anhand der Oligos RL825 & RL826 (1118 bp) und die (2) stromabwärts gelegene Flanke mit den Oligos RL827 & RL828 (646 bp) amplifiziert. Beide PCR-Reaktionen fügten die für die *Bsa*I-Klonierung erforderlichen *Bsa*I-Restriktionsschnittstellen und die zur Transformation des Konstruktes verwendeten *Swa*I-Schnittstellen ein. Das Konstrukt wurde in den Zielvektor pUMa1507 kloniert.

pUMa1937 (pA1-IIIMS2-4_TCTCA, 6319 bp)

Köderhybridplasmid des Hefe-Drei-Hybrid-Systems. Als Ködersequenz kodiert das Plasmid die mutierte SELEX A1-Sequenz, in der das UAUGC durch TCTCA ausgetauscht wurde. Die Mutation wurde mittels inverser PCR-Reaktion auf pUMa550 durch die Oligos RL750 & RL751 (7984 bp) eingebaut.

4.1.4 Stämme

E. coli:

Für alle in dieser Arbeit durchgeführten Klonierungen wurden der E. coli-Stamm TOP10 (Life Technologies) benutzt (Genotyp: F- mcrAΔ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80lacZΔM15 ΔlacX74 nupG recA1 araD139 Δ(ara-leu)7697 galE15 galK16 rpsL(Str^R) endA1 λ).

S. cerevisiae:

In den in dieser Arbeit durchgeführten Hefe-Drei-Hybrid-Experimenten wurde der Stamm L40-coat verwendet (SenGupta *et al.*, 1996). Der Genotyp dieses Stammes lautet: *MATa*, *ura3-52*, *leu2-3, 112*, *his3Δ200*, *trp1Δ1*, *ade2*, *LYS2::(LexA-op)₄-HIS3*, *ura3::(LexA-op)₈ – lacZ*. Dieser Stamm exprimiert das Adapter-Hybrid, welches aus LexA und dem MS2-Hüllenprotein (*coat protein*) besteht. Der Stamm ist auxotroph für Uracil, Leucin, Adenin und Histidin. Die Reportergene *lacZ* und *HIS3* sind jeweils unter Kontrolle des *lexA*-Operators.

U. maydis:

Tabelle 12: In dieser Arbeit verwendete Stämme

Stamm	Genotyp	UMa	Resistenz	Referenz
521	<i>a1 b1</i>			Banuett und Herskowitz, 1989
AB33	<i>a2 b2 Pnar: bE1/bW2</i>	133	Phleo	Brachmann <i>et al.</i> , 2001
AB33rrm4G	<i>a2 b2 Pnar: bE1/bW2 rrm4G</i>	274	Phleo, Nat	Becht <i>et al.</i> , 2006
AB33rrm4GT	<i>a2 b2 Pnar: bE1/bW2 rrm4GT</i>	303	Phleo, Nat	Becht <i>et al.</i> , 2006
AB33rrm4Δ	<i>a2 b2 Pnar: bE1/bW2 rrm4Δ</i>	273	Phleo, Hyg	Becht <i>et al.</i> , 2006

Tabelle 13: In dieser Arbeit hergestellte Stämme

Stamm	Genotyp	UMa	Resistenz	Ausgangs-stamm	Integriertes Plasmid	Lokus
AB33vps60Δ	<i>a2 b2 Pnar: bE1/bW2 vps60Δ</i>	933	Phleo, Hyg	AB33	pUMa1698	<i>vps60</i> (<i>um05282</i>)
AB33did2Δ	<i>a2 b2 Pnar: bE1/bW2 did2Δ</i>	934	Phleo, Hyg	AB33	pUMa1699	<i>did2</i> (<i>um05607</i>)
AB33vps27G	<i>a2 b2 Pnar: bE1/bW2 vps27G</i>	935	Phleo, Hyg	AB33	pUMa1714	<i>vps27</i> (<i>um03862</i>)
AB33vps60G	<i>a2 b2 Pnar: bE1/bW2 vps60G</i>	997	Phleo, Hyg	AB33	pUMa1715	<i>vps60</i> (<i>um05282</i>)
AB33did2G	<i>a2 b2 Pnar: bE1/bW2 did2G</i>	1149	Phleo, Hyg	AB33did2Δ	pUMa1700	<i>did2</i> (<i>um05607</i>)
AB33ips1Δ	<i>a2 b2 Pnar: bE1/bW2 ips1Δ</i>	1032	Phleo, Hyg	AB33	pUMa1816	<i>ips1</i> (<i>um05549</i>)
AB33vps27G/rrm4Δ	<i>a2 b2 Pnar: bE1/bW2 vps27G rrm4Δ</i>	1041	Phleo, Nat	AB33vps27G	pUMa865	<i>rrm4</i> (<i>um10836</i>)
AB33vps60G/rrm4Δ	<i>a2 b2 Pnar: bE1/bW2 vps60G rrm4Δ</i>	1115	Phleo, Nat	AB33vps60G	pUMa1750	<i>rrm4</i> (<i>um10836</i>)
AB33did2G/rrm4Δ	<i>a2 b2 Pnar: bE1/bW2 did2G rrm4Δ</i>	1148	Phleo, Nat	AB33rrm4Δ	pUMa1700	<i>did2</i> (<i>um05607</i>)

4.1.5 Zentrifugen

Die in den einzelnen Methoden angegebenen Umdrehungszahlen beziehen sich auf folgende Zentrifugen. Zum Zentrifugieren von Proben in Reaktionsgefäßen mit einem Volumen von 1,5 oder 2 ml wurde standardmäßig eine Heraeus Pico 17 Tischzentrifuge (Thermo Scientific) verwendet. Im Falle der iCLIP-Experimente wurde jedoch nach der Zelllyse zum Pelletieren der Zelltrümmer eine Heraeus Biofuge Stratos eingesetzt (Rotor #3341, Thermo Scientific). Proben und Zellkulturen in 15 oder 50 ml Reaktionsgefäßen wurden ebenfalls in einer Heraeus Biofuge Stratos zentrifugiert. Sehr große Volumina (150 ml) wurden hingegen in einer Beckman J2-21 Zentrifuge (Rotor JA-14; Beckman&Coulter, Krefeld) zentrifugiert.

4.2 Mikrobiologische, zellbiologische und genetische Methoden

4.2.1 Arbeiten mit *E. coli*

Kultivierung von *E. coli*

E. coli-Stämme wurden entweder als Schüttelkulturen bei 200 rpm oder auf Festmedien unter aeroben Bedingungen bei 37°C kultiviert. Übernachtskulturen wurden von YT-Amp-Festmedien angeimpft. Die bei -80°C gelagerten Glycerinkulturen wurden vor weiteren Arbeiten erneut auf YT-Amp-Festmedien ausgestrichen.

Ampicillin-Lösung:

10 mg/ml Ampicillin in ddH₂O sterilfiltriert

Für Festmedien wurden 2% Agar und bei Selektionsplatten zusätzlich Ampicillin in einer Konzentration von 100 µg/ml hinzugegeben.

Herstellung chemisch kompetenter *E. coli* Zellen nach der RbCl/CaCl₂-Methode

Das Protokoll ist nach Cohen *et al.*, 1972 modifiziert. Zur Herstellung chemisch kompetenter Zellen wurden 1000 ml dYT-Medium mit 20 ml einer TOP10 Übernachtskultur inokuliert und 10 mM MgCl₂ sowie 10 mM MgSO₄ hinzugegeben. Die Kultur wurde bei 37°C bei 200 rpm schüttelnd für 2,5 h inkubiert bis eine OD₆₀₀ ~0,6 erreicht worden ist. Anschließend wurden die Zellen für 30 min auf Eis gestellt und abzentrifugiert (8000 rpm, 3 min, 4°C). Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in 330 ml kalten Rbf1-Puffer resuspendiert und für 30-60 min auf Eis stehen lassen. Die Zellen wurden anschließend erneut pelletiert (8 000 rpm, 3 min, 4°C). Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in 50 ml kalter Rbf2-Lösung resuspendiert und 30 min auf Eis stehen lassen. Die Zellen wurde in 50 µl Aliquots auf 1,5 ml Reaktionsgefäße verteilt, mit flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

Chemische Transformation von *E. coli*

Für die Transformation wurden Aliquots der bei -80°C gelagerten chemisch kompetenten Zellen auf Eis aufgetaut und jeweils mit einer unterschiedlichen Menge an Plasmid-DNA bzw. Ligationsansatz versetzt:

<i>Retrafo</i>	1 µl	DNA
<i>Topoklonierung</i>	5 µl	DNA
<i>Ligation</i>	10 µl	DNA
<i>Bsal-Ligation</i>	2 µl	DNA

Der Transformationsansatz wurde anschließend 30 min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock von 45 Sekunden bei 42°C wurde der Transformationsansatz mit 150 µl dYT-Medium versetzt und 30 min bei 1 200 rpm und 37°C auf einem Vibrax inkubiert. Zuletzt wurde der Transformationsansatz auf YT-Platten (mit 100 µg/ml Ampicillin) ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

4.2.2 Arbeiten mit *S. cerevisiae*

Kultivierung von *S. cerevisiae*

Hefekulturen wurden entweder als Schüttelkulturen bei 200 rpm oder auf Festmedium unter aeroben Bedingungen bei 28°C in den entsprechenden Medien kultiviert. Als Medium wurde YP-Komplettmedium und SC-Selektionsmedium benutzt. Übernachtskulturen wurden von Kulturen auf Festmedium angeimpft, die für max. zwei Monate bei 4°C gelagert waren.

Bestimmung der Zelldichte von *S. cerevisiae*

Die Zelldichte von Flüssigkulturen wurde photometrisch in einem Novospec II Photometer (Pharmacia Biotech) bei 600 nm bestimmt. Um eine lineare Abhängigkeit sicherzustellen, wurden für die Messung der OD₆₀₀ die Kulturen durch entsprechende Verdünnung auf einen Wert unterhalb von 0,5 verdünnt. Als Nullwert wurde die OD₆₀₀ des jeweiligen Kulturmediums verwendet. OD₆₀₀ = 1,0 entspricht etwa 2x10⁷ Zellen/ml.

Transformation von *S. cerevisiae*

Von einer auf Platte wachsenden Kultur wurde zunächst eine Übernachts-Vorkultur in 10 ml YPD-Medium bei 28°C schüttelnd angeimpft. Anschließend wurde aus 1 ml dieser Vorkultur 50 ml YPD-Medium inokuliert und schüttelnd bei 28°C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5-0,7 inkubiert. Nach Erreichen der gewünschten OD₆₀₀ wurden die Zellen 5 min bei 500 g (1 900 rpm) abzentrifugiert und je einmal mit 20 ml sterilem Wasser sowie 10 ml HefeSORB-Puffer gewaschen. Die gewaschenen Zellen wurden im Anschluss in 360 µl HefeSORB-Puffer aufgenommen und 40 µl Lachssperma-DNA (10 mg/ml; vor der Zugabe 5 min bei 95°C denaturieren und anschließend für mehr als 5 min auf Eis inkubieren lassen) hinzugeben. Zellen anschließend in 50 µl Aliquots aliquotieren und bei -80°C lagern.

Nach kurzem Auftauen der gefrorenen Zellen (10 min auf Eis) wurden ca. 1 µg Plasmid-DNA hinzugeben und durch Schnippen vorsichtig gemischt. Anschließend wurden 300 µl PEG (in Lit) hinzugeben und ebenfalls durch Schnippen vorsichtig gemischt. Es folgte dann eine 30 min Inkubation bei Raumtemperatur auf einem Drehrad. Nach der Inkubation bei Raumtemperatur erfolgte ein 15 min Hitzeschock bei 42°C. Im Anschluß wurde den Zellen 1 ml YPD-Medium hinzugeben und diesen dann bei 2000 rpm für 5 min pelletiert. Nach Abnahme des Überstandes wurden 1 ml YPD-Medium hinzugegeben und die Zellen wurden auf einem Drehrad 1-4 h bei 28°C drehend inkubiert. Zum Abschluss wurden Zellen 5 min bei 2000 rpm pelletiert, in 150 µl YPD-Medium aufgenommen und ausgestrichen.

HefeSORB:

100mM Lithiumacetat
10mM Tris-Puffer pH 8
1 mM EDTA/NaOH, pH 8
1 M Sorbitol
pH 8, mit Essigsäure einstellen

PEG in LiT:

4 ml 50% PEG-3350
0,5 ml 1 M LiT-Puffer
0,5 ml 10x TE-Puffer
(100 ml Tris, 10 ml EDTA/NaOH,
pH 8)

LiT-Puffer:

100 mM Lithiumacetat
10 mM Tris-Puffer, pH 8

Mikroskopie von *S. cerevisiae*

Die zellmorphologische Betrachtung von *S. cerevisiae* erfolgte an einem Lichtmikroskop (Axiophot, ZEISS). Für DIC-Mikroskopie und Fluoreszenz-Mikroskopie wurde ein 100faches Plan-Apochromat Objektiv (ZEISS) mit 1,4 numerischer Apertur verwendet. 2-3 µl der entsprechenden Kultur bzw. des fixierten Präparats wurden zur Analyse auf Objektträger getropft.

4.2.3 Arbeiten mit *U. maydis*

Kultivierung von *U. maydis*

U. maydis-Stämme wurden entweder als Schüttelkulturen bei 200 rpm oder auf Festmedien

unter aeroben Bedingungen bei 28°C kultiviert, sofern nicht anders vermerkt. Übernachtskulturen wurden von Kulturen auf Festmedien, die weniger als vier Wochen bei 4°C gelagert wurden, angeimpft. Glycerinkulturen wurden aus über Nacht gewachsenen Schüttelkulturen angesetzt. In einem Cryogegefäß wurde der Übernachtskultur im Verhältnis 1:1 NSY-Glycerin hinzugegeben, es wurde gemischt und im Anschluß wurde die Kultur bei -80°C gelagert. Die bei -80°C gelagerten Glycerinkulturen wurden vor weiteren Arbeiten immer zuerst auf Festmedien ausgestrichen.

Einfache Konzentration der Antibiotika für Festmedien:

Nourseothricin	150 µg/ml
Hygromycin	200 µg/ml
Carboxin	2 µg/ml

Bestimmung der Zelldichte von *U. maydis*

Die Zelldichte von Flüssigkulturen wurde photometrisch in einem Novospec II Photometer (Pharmacia Biotech) bei 600 nm bestimmt. Um eine lineare Abhängigkeit der Messung sicherzustellen, wurden für die Messung der optischen Dichte die Kulturen standardmäßig 1:10 verdünnt. Als Nullwert wurde die OD₆₀₀ des jeweiligen Kulturmediums verwendet. Eine OD₆₀₀ von 1,0 entspricht etwa 1-5 x 10⁷ Zellen/ml.

Herstellen von Protoplasten von *U. maydis*

Dieses Protokoll ist modifiziert nach Schulz *et al.*, 1990 und Gillissen *et al.*, 1992. Von einer auf Festmedium wachsenden Kultur wurde eine 3 ml CM-Flüssigkultur angesetzt und über Nacht bei 28 °C schüttelnd inkubiert. Diese Vorkultur wurde anschließend 1:4000 in 50 ml frischem CM-Medium verdünnt und bei 28 °C bis zu einer Zelldichte von 1-2·10⁷ Zellen·ml⁻¹ (bis maximal OD₆₀₀ = 0,9) schüttelnd wachsen gelassen. Nach Erreichen der optimalen Zelldichte wurden die Zellen durch Zentrifugieren (3 500 rpm, 5 min, RT, Heraeus Varifuge 3.0R) pelletiert, einmal mit 20ml SCS gewaschen und erneut zentrifugiert (3 500 rpm, 5 min, RT, Heraeus Varifuge 3.0R). Das Zellpellet wurde anschließend in 5 ml SCS-Puffer resuspendiert und es wurden 2 ml SCS + 3,5 mg/ml Novozym dazugegeben. Die in diesem Puffer bei Raumtemperatur ablaufende Protoplastierung kann mikroskopisch verfolgt werden, da die zigarrenförmigen Zellen nach Lyse der Zellwand eine kugelige Form einnehmen. Nach vollständiger Protoplastierung (5-15min) wurden zum Stoppen der Reaktion 10 ml eiskalter SCS-Puffer hinzugegeben und die Protoplasten durch Zentrifugieren (2 400 rpm, 5 min, 4 °C, Heraeus Varifuge 3.0R) pelletiert. Um das Novozym vollständig zu entfernen, wurde das Pellet in 10 ml eiskalten SCS-Puffer resuspendiert und zentrifugiert (2 400 rpm, 5 min, 4 °C, Heraeus Varifuge 3.0R) und dieser Waschschrift einmal wiederholt. Anschließend wurde mit 10 ml eiskaltem STC-Puffer gewaschen und das Pellet danach in einem Volumen von 1 ml eiskaltem STC-Puffer aufgenommen und in 100 µl Aliquots auf vorgekühlte 2 ml Reaktionsgefäße verteilt. Die so behandelten Protoplasten wurden anschließend bei -80 °C gelagert.

SCS:

20 mM NaCitrat, pH 5,8
1 M Sorbitol

in ddH₂O ,

STC:

1 M Sorbitol (
10 m M Tris-HCl, pH 7,5
100 mM CaCl₂

in H₂O_{bid.},

Transformation von Protoplasten von *U. maydis*

Zur integrativen Transformation wurden 50 µl Protoplasten mit 1-5 µl linearisierter Plasmid-DNA (ca. 1-5 µg DNA) und 1 µl Heparin-Lösung für 10 min auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 0,5 ml STC/PEG folgte eine weitere Inkubation von 15 min auf Eis. Anschließend wurde der gesamte Transformationsansatz auf einer kurz zuvor mit Top-Agar überschichteten, Antibiotika-enthaltenden Regenerationsagarplatte ausgestrichen. Nach 2 bis 5 Tagen Inkubation bei 28°C wurden die gewachsenen Kolonien mit Zahnstochern auf antibiotikahaltigen CM-Platten vereinzelt.

Heparin-Lösung:	STC/PEG:	Regenerationsagar (Schulz et al, 1990):	
15 mg/ml Heparin	60% (v/v) STC-Puffer	1% (w/v)	Hefeextrakt
	40% (w/v) PEG 4000	2% (w/v)	Pepton
In H ₂ O		2% (w/v)	Saccharose
		18,22% (w/v)	Sorbitol
		1,5% (w/v)	Agar
		in H ₂ O	

Induktion des filamentösen Wachstums von *U. maydis*

Vorkulturen der entsprechenden Stämme wurden in 3 ml CM-Medium+Glukose angeimpft und über Nacht bei 28°C und 220 rpm inkubiert. Daraus wurden Hauptkulturen in je 50 ml CM-Medium+Glukose angeimpft (Verdünnung 1:4000) und erneut über Nacht bei 28°C und 220 rpm inkubiert. Die Zellen wurden bei Erreichen von OD₆₀₀=0,5 durch 5 min Zentrifugation bei 3000 rpm pelletiert. Für die Filamentinduktion wurde das Pellet in 20 ml NM-Medium+Glukose resuspendiert und bei 28°C und 220 rpm je nach gewünschter Inkubationsdauer inkubiert.

Fluorimetrische Messung der endochitinolytischen Aktivität (*Cts1*-Aktivitätsmessung)

Die Aktivität von Endochitininasen wurde anhand des spezifischen Substrats 4-Methylumbelliferyl-b-D-N,N',N''-triacetylchitotriosid (MUC; Sigma-Aldrich; M5639) ermittelt. Die MUC-Stammlösung (2,5 µM) wurde vor jeder Messung 1:10 mit KHM-Puffer (Endkonzentration 0,25 µM) verdünnt. Die in den Messungen eingesetzten Kulturen wurden jeweils auf eine OD₆₀₀=0,5 eingestellt. In einer Mikrotiterplatte wurden pro Näpfchen 30 µl Kultur vorgelegt. Anschließend wurden 70 µl Substrat hinzupipettiert. Die Zellen wurden anschließend abgedunkelt für 1 h bei 37°C inkubiert. Gestoppt wurde die Reaktion durch Zugabe von 200 µl 1 M Natriumcarbonat. Die fluorimetrische Endpunktbestimmung erfolgte am Reader (Anregung: 360 nm, Emission: 450 nm). Jede Messung wurde dabei dreifach bestimmt.

KHM-Puffer:

110 mM Kaliumacetat
20 mM HEPES
2 mM MgCl₂

Mikroskopie von *U. maydis*

Mikroskopische Analysen wurden mit den folgenden Mikroskopen durchgeführt:

(1) Zeiss (Oberkochen, Deutschland) Axio Imager.M1 ausgestattet mit einer Spot Pursuit CCD-Kamera (Diagnostic Instruments, Sterling Heights, MI, USA) und Plan Neofluar Objektiven (40x und 100x, numerische Apertur (NA) 1,3; 63x, NA 1,25).

(2) Zeiss Axio Observer.Z1 ausgestattet mit einer CCD-Kamera (Photometrics CoolSNAP HQ2, Tucson, AZ, USA) und den folgenden Objektiven: Plan Neofluar (40x, NA 1,3), Plan Aplanachromat (63x und 100x, NA 1,4), und a-Plan Aplanachromat (100x, NA 1,46).

Fluoreszenzmikroskopie wurde mit einer HXP Halogenmetalldampflampe (LEJ, Jena, Deutschland) und den folgenden Filtersets für GFP (ET470/40BP, ET495LP, ET525/50BP) und RFP und mCherry (ET560/40BP, ET585LP, ET630/74BP; Chroma, Bellow Falls, VT, USA) durchgeführt.

Die Kollokalisationsstudien wurden mit einem Zweikanal-Imager (DV2, Photometrics) durchgeführt, welcher die simultane Detektion von GFP und RFP bzw. mCherry ermöglichte. Ein dichroider Filter für GFP und mCherry (GFP/mCherry, Chroma) wurde zur simultanen Anregung der Fluorophoren eingesetzt. Ein zweiter dichroider Strahlteiler (dcxr565) innerhalb der Dualview-Apparatur trennte die Signale ihrer Farbe entsprechend auf, welche wiederum vor der Detektion auf unterschiedlichen Regionen des CCD-Chips der Kamera mit Emissionsfilter (GFP ET520/40; RFP/mCherry ET632/60) gefiltert wurden.

Die beiden verwendeten Mikroskope wurden durch das Programm MetaMorph (MolecularDevices, Sunnyvale, CA, USA) gesteuert.

Bildbearbeitung von mikroskopischen Bildern von *U. maydis*

Die Nachbearbeitung und Auswertung der Mikroskopiebilder (Bildausschnitt, Kontrastverstärkung, Maßstabsskalierung, Kymographen) erfolgte mit dem Programm MetaMorph.

Quantifizierung des filamentösen Wachstums von *U. maydis*

Die Quantifizierung des filamentösen Wachstums erfolgte durch manuelles Auszählen von unipolar, bipolar, tripolar und nicht filamentös ausgewachsenen Zellen. Die mikroskopischen Aufnahmen wurden dabei zufällig mit dem 40x-Objektiv aufgenommen. Pro Quantifizierung wurden jeweils 20 DIC-Bilder mittels der Zählfunktion von MetaMorph ausgewertet. Die Quantifizierung erfolgte an 4 h und 9 h alten Filamenten und jede Zählung wurde unabhängig voneinander an separaten Tagen insgesamt dreimal wiederholt.

Zellbiologische Färbungen von *U. maydis*

FM4-64 Färbung (N-(3-Triethylammoniumpropyl)-4-(6-(4-(Diethylamino) Phenyl) Hexatrienyl) Pyridinium Dibromid; Life Technologies)

Vor der Färbung wurde die FM4-64-Stammlösung 1/10 in DMSO verdünnt (Ausgangskonzentration: 8 mM in DMSO, Endkonzentration 0,8 mM). Für die Färbung wurden 1 ml Zellsuspension in ein 2 ml Reaktionsgefäß transferiert und 1 µl FM4-64 Färbelösung hinzugegeben. Anschließend wurden die Zellen für 1 min bei Raumtemperatur schwenkend inkubiert. Die Fluoreszenzmikroskopie erfolgte unter dem RFP-Filter (Anregung: 558 nm, Emission: 734 nm).

Celltracker Blue CMAC-Färbung (7-Amino-4-Chloromethylcoumarin; Life Technologies)

Für die Färbung wurden 1 ml Zellkultur in ein 2 ml Reaktionsgefäß transferiert. Der Zellsuspension wurde anschließend 1 µl Celltracker Blue-Färbelösung (Ausgangskonzentration: 10 mM in DMSO; Endkonzentration: 10 µM) hinzugegeben und lichtgeschützt für 20 min bei 28°C auf dem Drehrad drehend inkubiert. Als nächstes wurden die Zellen pelletiert und in 500 µl 1xPBS-Puffer resuspendiert. Die Fluoreszenzmikroskopie erfolgte mittels des DAPI-Filters (Anregung: 353 nm, Emission: 466 nm).

4.3 Molekularbiologische Methoden

4.3.1 Die Isolierung von Nukleinsäuren

Isolation von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Die Isolierung erfolgte durch Lyse durch Kochen nach Sambrook *et al.* (1989). Hierzu wurden *E. coli*-Zellen in 1,75 ml dYT+Ampicillin-Medium über Nacht bei 37°C in einem 2 ml-Reaktionsgefäß mit Lidbac (Eppendorf) auf einem Vibrax inkubiert. Die Übernachtskultur wurde am nächsten Tag mit einer Biofuge (Heraeus) bei 13.000 rpm (5 min, RT) pelletiert. Das Zellpellet wurde in 200 µl STET-Puffer resuspendiert, nach Zugabe von 20µl Lysozym-Lösung kräftig geschüttelt und anschließend 60 Sekunden bei 95°C in einem Thermomixer inkubiert. Die lysierten Zellen und die denaturierte genomische DNA wurden daraufhin 10 min bei 13.000 rpm pelletiert. Das Pellet wurde daraufhin mit einem sterilen Zahnstocher aus der wässrigen Lösung entfernt. Die Fällung der Plasmid-DNA erfolgte durch Zugabe von 20 µl 3 M NaAc (pH 5,3) und 500 µl 2-Propanol bei Raumtemperatur für 5 min und anschließender Zentrifugation für 5 min bei 13.000 rpm (Heraeus Biofuge). Hierbei war wichtig, dass vor der Zentrifugation die Reaktionsgefäße für eine gute Durchmischung mehrfach geschwenkt wurden. Das Pellet wurde anschließend mit 200 µl 70% Ethanol gewaschen und bei Raumtemperatur getrocknet (~10min). Die isolierte Plasmid-DNA wurde zuletzt in 100 µl TE-Puffer- RNase A-Puffer aufgenommen und bei -20°C gelagert.

STET-Puffer:

10 mM Tris-Cl, pH 8,0
100 mM NaCl
1 mM Na₂-EDTA
5% (v/v) Triton X-100
in ddH₂O

Lysozym-Lösung:

10 mg/ml Lysozym
10 mM Tris-Cl, pH 8,0
in ddH₂O

RNase A:

10 mg/ml RNaseA
in 0,1 M NaAcetat (pH 5,2)
15 min bei 100°C kochen
und abkühlen lassen

TE-RNaseA-Puffer:

50 ml TE-Puffer
50 µl RNase A (10 µg/µl)
(Endkonzentration: 0,5 µg/µl)

DNA-Isolierung aus *U. maydis*

Diese Methode wurde modifiziert nach (Hoffman und Winston, 1987). Dabei wurden 3 ml einer Übernachtskultur in CM-Medium zusammen mit 0,3 g Glasperlen in einem 2 ml-Reaktionsgefäß pelletiert (13.000 rpm, 2 min, RT, Heraeus Biofuge), der Überstand abgegossen und anschließend in 500µl Lysispuffer resuspendiert. Zu den Proben wurden des Weiteren 500 µl TE-Phenol/Chloroform hinzugegeben. Die Proben wurden 6-10min auf einem Vibrax-VXR Schüttler (IKA) geschüttelt. Nach Phasentrennung (13.000 rpm, 15min, RT, Heraeus Biofuge) wurden 400µl des Überstands in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt und mit 1 ml Ethanol gefällt. Nach erneuter Zentrifugation (13.000 rpm, 1 min, RT, Heraeus Biofuge) wurde das Pellet in 50µl TE mit 20µg-ml⁻¹ RNase A aufgenommen, bei 50 °C resuspendiert und bei 4 °C aufbewahrt.

Lysis-Puffer:

2% TritonX100;
1% SDS
100 mM NaCl
10 mM Tris-HCl, pH 8,0
1 mM EDTA
in ddH₂O

Phenol/Chloroform:

50% Phenol
50% Chloroform
Mit 10 mM TE-Puffer, pH 8 überschichten

4.3.2 Modifikation und Analyse von Nukleinsäuren *in vitro*

Bestimmung der DNA-Konzentration

Die DNA-Konzentration von Proben wurde anhand eines Nanodrop® Spectrophotometer (Thermo Scientific) gemessen. Dazu wurde 1 µl der zu messenden DNA-Lösung unverdünnt auf den Probenapparat aufgebracht und gemessen. Als Nullwert diente 1µl des Ausgangspuffers. Im Falle von Plasmid-DNA Präparationen war dies 10 mM TE-Puffer. Bei einer Schichtdicke von 1 cm entspricht $OD_{260} = 1$ einer Konzentration von 50 µg/ml doppelsträngiger DNA, 33 µg/ml einzelsträngiger DNA bzw. 40 µg/ml RNA. Als Maß für die Reinheit der Desoxyribonukleinsäuren diente der Quotient aus A_{260} zu A_{280} . Für reine DNA und RNA sollte er bei etwa 1,8 liegen. Niedrigere Werte weisen auf Verunreinigungen mit Proteinen hin, höhere Werte auf Verunreinigungen mit Salzen oder Zuckern.

Restriktionsanalyse

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

1 µg DNA
3 µl BSA (10-fach)
0,5 U Restriktionsenzym
3 µl Reaktionspuffer (10-fach)
ad 30 µl ddH₂O

Nach Inkubation für 2 h bei 37°C (bzw. einer anderen für das jeweilige Enzym optimalen Temperatur) wurden dem Ansatz 6 µl 5fach konzentrierter nativer Auftragspuffer zugesetzt und die Reaktionsprodukte auf Agarosegelen analysiert. Größere DNA-Mengen oder genomische DNA für Southern-Analysen wurden über Nacht bei 37° C und einem größeren Reaktionsvolumen von 50 µl inkubiert.

DNA-Fällung

Zur Anreicherung von DNA in einer Lösung oder zum Wechseln des Puffers wurde DNA gefällt. Zu der DNA-Lösung wurden 0,1 Volumen 3 M NaAc (pH 4,8) und 2,5 Volumen 100% Ethanol gegeben. Es wurde durch Invertieren gründlich gemischt und für 15min inkubiert. Die gefällte DNA wurde abzentrifugiert (15-30 min, 13.000 rpm, 4 °C, Heraeus Biofuge), der Überstand verworfen und der Niederschlag mit 70%igem Ethanol gewaschen. Der leicht getrocknete DNA-Niederschlag konnte dann im gewünschten Puffer und Volumen aufgenommen werden. Zur Erleichterung des Lösens konnte optional auf 55 °C erwärmt werden.

Dephosphorylierung von linearer DNA

Dem Restriktionsansatz zur Gewinnung des Vektorfragments wurden nach ausreichender Inkubation des Restriktionsenzym folgende Komponenten zugesetzt (bei größeren Restriktionsansätzen wurde der Ansatz entsprechend vergrößert):

20 µl Restriktionsansatz
5 µl 10xReaktionspuffer
3 U Alkalische Phosphatase
mit H₂O auf 50 µl aufgefüllt

Nach 30 min Inkubation im Wasserbad bei 37°C wurde ein einmaliger Phenol/Chloroform-Reinigungsschritt durchgeführt, die resultierende wässrige Phase direkt mit nativem DNA-Auftragspuffer versetzt und auf einem TAE-Agarosegel aufgetrennt, aus welchem das

Fragment abschließend extrahiert wurde.

Ligation von DNA-Fragmenten

Die kovalente Verknüpfung von DNA-Fragmenten erfolgte mit Hilfe der T4-DNA-Ligase. Die zu klonierenden Fragmente wurden in der Regel in zweifachem Überschuss gegenüber der linearisierten, z.T. dephosphorylierten Vektor-DNA eingesetzt. Ein typischer Reaktionsansatz enthielt:

100 ng Vektor-DNA
lineare Insertionsfragmente (in fünffachem molaren Überschuss) 1U T4 DNA-Ligase
2 µl 10 x Ligase-Puffer
mit H₂O auf 20 µl aufgefüllt

Die Ligation erfolgte über Nacht (maximal 16 h) bei 16°C.

Ligationspuffer (10x)

100 mM Tris-HCl, pH 7,5
100 mM MgCl₂
100 mM DTT
6 mM ATP
in H₂O_{bid}; sterilfiltriert

Polymerase Chain Reaction (PCR)

Die Methode ist modifiziert nach Innis et al., 1990. Je nach Fragestellung wurden zwei unterschiedliche Polymerasen eingesetzt. Für Klonierungen wurde die Phusion-Polymerase benutzt, während bei qualitativen PCR-Ansätzen, z.B. Stammverifizierung, die Taq-Polymerase verwendet wurde. Ein typischer analytischer PCR-Ansatz enthielt etwa:

„Template“-DNA
1 µM Oligonukleotid (2x)
1 U Taq-DNA-Polymerase
5 µl 10x PCR-Puffer
aufgefüllt mit H₂O auf 50 µl

10x PCR-Puffer:

500 mM KCl
15 mM MgCl₂
100 mM Tris-HCl, pH 8,3
Mit ddH₂O auffüllen

Standardmäßig wurde folgendes Programm angewandt. Die Taq-Polymerase benötigt für ein 1 kb ungefähr 1 min:

5 min bei 94°C
(Denaturieren: 30sec bei 94°C/Annealen: 1min bei 65°C/Elongieren: 1 min 72°C)
35 mal wiederholen
5 min bei 72°C

Eine Besonderheit stellt das „*Touchdown*“-PCR-Protokoll dar, bei dem mit fortschreitender Zykluszahl die Annealingtemperatur von anfangs 68°C bis auf 50°C herabgesetzt wird.

Zu klonierende Fragmente wurden mittels Phusion-Polymerase amplifiziert (Hauspräparation; S. Esch und K. Schipper, persönl. Mitteilung). Ein Reaktionsansatz setzte

sich wie folgt zusammen (siehe Phusion High Fidelity Polymerase, Thermo Scientific):

0,5 µl Template DNA
0,5 µl dNTPs (25 mM, Endkonzentration 250 µM)
1,5 µl DMSO
0,5 µl Oligo 1 (100 µM, Endkonzentration 1 µM)
0,5 µl Oligo 2 (100 µM, Endkonzentration 1 µM)
10 µl High Fidelity Puffer (Thermo Scientific; 5-fach konz.)
0,5 µl Phusion (1 U)
Aufgefüllt mit ddH₂O auf 50 µl

Die Phusion-Polymerase amplifiziert 1 kb in ungefähr 30 Sekunden. Das standardmäßige durchgeführte Programm sah dabei wie folgt aus:

98°C für 30 Sekunden (Denaturierung)
(Denaturieren: 98°C für 10 Sekunden/Annealen: 65°C für 20 Sekunde/Elongieren: 72°C für variabel) 34-mal wiederholen
72°C für 8 min

TOPO-TA-Klonierung von PCR-Produkten

Die Taq-Polymerase hängt matrizenunabhängig ein einzelnes Desoxyadenosin an die 3'-Enden von PCR Produkten. Der linearisierte Vektor pCR2.1-TOPO® (Life Technologies) enthält überhängende 3'-Desoxythymidin-Reste. Dadurch können PCR-Produkte sehr effizient in den Vektor eingebaut werden. Das TOPO-Cloning™-Kit von Invitrogen nutzt die Ligase-Aktivität der Topoisomerase aus. 2-3,5 µl des gereinigten PCR-Produktes wurden mit 0,5 µl pCR2.1-TOPO® Vektor versetzt, zu 5 µl mit ddH₂O aufgefüllt, vorsichtig gemischt und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurde kurz zentrifugiert und das Gefäß auf Eis gesetzt. Nach Transformation in TOP10-Zellen (Abschnitt 5.2.1.) wurde der Transformationsansatz auf eine YT-Amp-Platte mit X-Gal verteilt. Nach 12 h wurden weißen oder leicht blauen Kolonien gepickt und in dYT-Flüssigmedium + Ampicillin angezogen. Aus den Kulturen wurde anschließend Plasmid isoliert (siehe oben).

Auftrennung von Nukleinsäuren durch Gelelektrophorese

Nukleinsäuren können in Agarosegelen mittels eines elektrischen Felds ihrer Größe entsprechend nach aufgetrennt, identifiziert und aufgereinigt werden. In dieser Arbeit wurden in Abhängigkeit von der zu untersuchenden Fragmentgröße 0,5%-2% (w/v) Agarosegele verwendet. Hierfür wurde die entsprechende Menge an Agarose in 1x TAE-Puffer aufgekocht und nach Abkühlung auf ca. 60°C mit Ethidiumbromid versetzt (Endkonzentration 1 µg/ml). Die Gele wurden anschließend in Elektrophoreseschlitten mit entsprechendem Kamm gegossen, wobei darauf geachtet wurde, dass sich keine Luftblasen bildeten. Nach Erstarren des Gels wurde die Gelkammer mit 1x TAE-Puffer gefüllt. Vor dem Auftragen wurden die Proben im Verhältnis 5:1 mit DNA-Auftragspuffer gemischt. Dauer und Stromspannung wurden durch die Proben bestimmt. Die Gelelektrophorese konnte nach Ablauf anhand der Ethidiumbromidfärbung im UV-Durchlicht (254 nm) mittels Geldokumentationsapparatur (Vilber Lourmat) detektiert und auf Thermalpapier photographisch dokumentiert werden. Als DNA-Größenstandards für die Agarose-Gelelektrophorese dienten λ –DNA PstI-Fragmente, sowie die kommerziellen 1 kb- und 50 bp DNA-Leitern (Thermo Scientific).

TAE-Puffer (50-fach):

2 M Tris-Acetat
0,1 M Na₂EDTA

in ddH₂O.

Präparation von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Die Visualisierung der aufgetrennten DNA mittels UV-Strahlung ermöglichte die spezifische Aufreinigung von DNA-Fragmenten. Die entsprechenden Fragmente wurde aus den Agarosegelen mit einem Skalpell herausgeschnitten und mittels dem JETSORB®-Kit (Genomed) aus den Gelstücken eluiert. Die durchgeführten Schritte entsprachen den Angaben des Herstellers.

Insertion von Punktmutationen mittels inverser PCR (nach Weiner et al., 1994)

Punktmutationen wurden mittels positionsspezifischer PCR inseriert. Hierbei wurde das QuikChange XL Site-Directed Mutagenese Kit (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) als Referenz herangezogen. Die eingesetzten mutagenen Oligonukleotide hybridisierten dabei mit der gleichen Sequenz des jeweiligen Plasmids. Bei dem Design der Oligonukleotide wurden folgende Parameter berücksichtigt:

- 1.) Die Länge der Oligonukleotide lag zwischen 25 und 45 Nukleotiden
- 2.) Die Schmelztemperatur (T_M) der Oligonukleotide betrug jeweils $\geq 78^\circ\text{C}$.

$$T_M = 81,5 + 0,41(\%GC\text{-Gehalt}) - 675/N - \% \text{ Fehlpaarungen}$$

N: Länge des Oligonukleotids

%GC-Gehalt und **%-Fehlpaarungen** sind ganze Zahlen

- 3.) Die zu inserierenden Mutationen lag jeweils in der Mitte der Oligonukleotide und wurde von ~10-15 Basen flankiert.
- 4.) Jedes Oligonukleotid besaß einen minimalen GC-Gehalt von mindestens 40%.

Die PCR wurde auf Plasmid-DNA und Phusion Polymerase durchgeführt (siehe Polymerase Chain Reaction (PCR)). Die Größe des PCR-Produkts wurde mittels Agarosegelelektrophorese überprüft (siehe Auftrennung von Nucleinsäuren durch Gelelektrophorese). Der PCR-Ansatz wurde in ein neues Reaktionsgefäß transferiert, 1 µl DpnI-Restriktionsenzym (NEB) sowie die entsprechende Menge 10xNEB4-Puffer(NEB) wurden hinzugegeben und für 1 h bei 37°C inkubieren gelassen. DpnI schneidet nur methylierte DNA, so dass das nicht methylierte PCR-Produkt ungeschnitten bleibt. Nach der DpnI-Behandlung wurde das PCR-Produkt in *E. coli* transformiert (siehe 4.4.1 Chemische Transformation von *E. coli*).

4.3.3 Transfer und Nachweis von Nucleinsäuren

Transfer von DNA-Fragmenten auf eine Nylon-Membran (nach Southern, 1975)

Der Transfer der aufgetrennten DNA-Fragmente aus einem Agarosegel auf eine Nylonmembran (Hybond-N+, GE Healthcare) erfolgte anhand eines Kapillar-Blots. Hierbei wird die Transfer-Lösung (0,4 M NaOH) aus einem Pufferreservoir über Kapillarkräfte durch das Gel hindurch in einen auf dem Gel platzierten Stapel Papierhandtücher gezogen. Die DANN-Fragmente werden durch den Pufferstrom aus dem Gel eluiert und binden an die darüberliegende Nylonmembran. Ein gleichmäßig verteiltes Gewicht auf dem Papierstapel garantiert eine dichte Verbindung zwischen den jeweiligen Lagen des Transfersystems. Vor

dem Transfer wurde das Agarosegel 15 min in 0,25 M HCl inkubiert, um einen Teil der Purine abzuspalten, um den Transfer großer DNA-Fragmente zu erleichtern. Anschließend wurde das Gel für 15 min in DENAT inkubiert. Zusammensetzung eines Blotaufbaus von unten nach oben:

Whatman 3MM-Brücke zum Pufferreservoir
Agarosegel
Nylonmembran (Biodyne® B)
2 Lagen Whatman 3MM
Stapel Papierhandtücher
Glasplatte
Gewicht (ca. 500 g)

Der Kapillar-Blot erfolgte über Nacht. Vor der weiteren Verwendung wurde der Filter getrocknet.

DENAT-Puffer:	RENAT-Puffer:	20x SSC-Puffer:
1,5 M NaCl	1,5 M NaCl	400 mM Na-Citrat, pH 7,0
0,4 M NaOH	282 mM Tris-HCl	3 M NaCl
in H ₂ O _{bid}	218 mM Tris-Base	in H ₂ O _{bid}
	in H ₂ O _{bid}	

Herstellung einer Digoxigenin-markierten Sonde

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

PCR-DIG-Labeling-Mix (Roche)
2 mM dATP
2 mM dCTP
2 mM dGTP
1,9 mM dTTP
0,1 mM alkali-labile DIG-11-dUTP (pH7,0)
in ddH₂O

Der Nachweis immobilisierter DNA

Die Hybond-N+-Membranen (GE Healthcare) wurden zur Absättigung der unspezifischen Bindungsstellen mit Southern-Hybridisierungspuffer für ~15 min bei 65°C präinkubiert. Nach Wechsel der Hybridisierungslösung wurde die für mindestens 5 min bei 95°C denaturierte DIG-Sonde zugegeben und über Nacht bei 65°C hybridisiert. Im Anschluss wurden die Filter für je 15 min bei 65°C mit 2xSSPE+0,1%SDS, 1xSSPE+0,1%SDS und 0,1xSSPE+0,1%SDS gewaschen. Für die Detektion wurde die Membran bei Raumtemperatur unter langsamen Schwenken in folgenden Lösungen inkubiert: 5 min DIG-Waschpuffer, 30 min DIG2-Lösung, 30 min DIG2- Antikörper-Lösung (1:20.000 Anti-Digoxigenin-AB Fab-Fragmente (Roche) in DIG2-Lösung) und zweimal 20 min in DIG-Waschpuffer. Danach wurde die Membran für 5 min in DIG3-Lösung äquilibriert und anschließend für 5 min in Chemilumineszenz-Lösung (1:100 CDP-Star (Roche) in DIG3-Lösung) inkubiert. Die Membran wurde luftblasenfrei in einen Plastikbeutel eingeschweißt. Das Chemilumineszenzsignal wurde an einem ImageQuant LAS-4000 Imager (GE Healthcare Life Sciences) detektiert.

SSPE (20-fach):

3 mM NaCl
227 mM NaH₂PO₄·H₂O
20 mM Na₂EDTA
pH 7,4

DIG2 (Blockierungslösung):

DIG1
1% (w/v) Milchpulver

Denhardt-Lösung:

2% (w/v) BSA Fraktion V (Sigma, A9647)
2% (w/v) Ficoll
2% (w/v) Polyvinyl Pyrrolidone (Sigma, PVP360)

Southern Hybridisierungspuffer:

26% (v/v) SSPE (20-fach)
5% (v/v) Denhardt-Lösung
5% (v/v) SDS (10%)

DIG3:

0,1 M Tris-HCl
0,1 M NaCl
pH 9,5

DIG1:

0,1 M Maleinsäure
0,15 M NaCl
pH 7,5

DIG-Wash:

DIG1
0,3% (v/v) Tween-20

4.3.4 Sequenz- und Strukturanalysen

Sequenzierung von DNA

Alle Sequenzierungen wurden durch den Sequenzierservice der biologischen Fakultät, Ludwig-Maximilians-Universität, München durchgeführt. Zu sequenzierende Plasmide wurde zuvor mittels des JetQuick-Kits aufgereinigt.

Für jede Sequenzierreaktion wurden eingereicht:

250 ng Plasmid-DNA
3,2 pmol Oligonukleotid
Mit Tris-HCl-Puffer, pH=8,5 (ohne EDTA!) auf 7 µl auffüllen

Für die Auswertung der Sequenzen wurde das Programm Clone Manager (Version 9; Scientific & Educational Software) genutzt.

4.4 Biochemische Methoden

4.4.1 Proteinbiochemische Methoden

Proteinpräparation aus *U. maydis*

Für eine Standardproteinpräparation wurde eine 50 ml Kultur angeimpft und über Nacht bei 28°C und 200 rpm schüttelnd inkubiert. Nach dem Erreichen einer OD₆₀₀ von mindestens 0,5 wurden die Zellen pelletiert (3500 rpm; 5 min, RT) und in 2 ml Usti-Lysispuffer + Proteaseinhibitoren resuspendiert (siehe TAP-Aufreinigung). Die Zellsuspension wurde in flüssigem Stickstoff schockgefroren und in einen Retsch Mahlbecher mit 2 Mahlkugeln (d=12 mm) transferiert. Der Zellaufschluss erfolgte an einer Schwingmühle (MM400, Retsch; Haan, Deutschland). Der Zellaufschluss erfolgte 2-mal bei 30 Hz für 5 min. Das Lysat wurde anschließend in vorgekühlte Reaktionsgefäße transferiert. Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation (13 000 rpm/10 min/ 4°C) und Abnahme des Überstandes entfernt. Der Überstand wurde mit flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -20°C gelagert.

Bestimmung der Proteinkonzentration (modifiziert nach Bradford, 1976)

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte anhand der Bradford-Methode. Hierbei wurde eine kommerziell verfügbare Protein Färbelösung verwendet (Bio-Rad Protein Färbelösung (5x), #500-0006). Vor jeder Messung wurde die Färbelösung zunächst mit Wasser 1:5 verdünnt. Die Färbung erfolgte in Mikrotiterplatten und pro Nöpfchen wurden folgende Mengen pipettiert:

200 µl Färbelösung (1-fach)
10 µl Proteinlösung/Proteinstandard

Proben wurden lichtgeschützt für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde in einem Fluoreszenzspektrometer (Infinite M200, Tecan; Crailsheim, Deutschland) die Absorption bei 595 nm gemessen.

Bei jeder Konzentrationsbestimmung wurde eine neue BSA-Eichgerade angesetzt. Die verwendeten BSA-Standards wiesen dabei folgende Konzentrationen auf: 0, 50, 100, 150 und 200 µg/ml BSA (in H₂O). Die Proteinkonzentration der jeweiligen Proben wurde anschließend anhand der Eichgerade berechnet. Proben, deren Konzentrationen außerhalb der Eichgerade lagen, wurden mit H₂O verdünnt und erneut gemessen.

SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE; modifiziert nach Laemmli, 1970)

Die SDS-PAGE von Tris-HCl Gelen erfolgte mittels des Mini-Protean Systems (Bio-Rad). Die gegossenen Gele bestanden aus Sammel- und Trenngel und besaßen jeweils eine Schichtdicke von 1 mm. Der Polyacrylamidteil orientierte sich an der Größe der aufzutrennenden Proteine. Für Rrm4GT (134 kDa) beispielsweise wurden 6% PA-Gele verwendet.

Trenngel:

- 0,375 M Tris-HCl, pH 8,8
- 7,5 - 15% (v/v) Polyacrylamid
- 0,1% (w/v) SDS
- 1,25% (v/v) Glyzerin
- 0,05% (w/v) Ammoniumpersulfat (APS)
- 0,1% (v/v) N, N, N', N'-tetramethylethylenediamine (TEMED)

Das Trenngel wurde mit Isopropanol beschichtet und polymerisieren gelassen. Anschließend wurde der Isopropanol abgenommen und die Gele kurz mit H₂O gewaschen. Daraufhin wurde das Sammelgel mit einem entsprechenden Kamm gegossen:

Sammelgel:

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

Gegossene Gele wurden für einige Tage kühl und feucht gelagert.

Proteinproben wurden vor dem Auftragen zusammen mit einem 3-fachen Probenpuffer 10 min bei 95°C denaturiert. Die Elektrophorese erfolgte für 50 min bei 30 mA/Gel.

Probenpuffer (Laemmli, 3-fach)		Laufpuffer (10-fach)	
0,15 M	Tris-HCl; pH 6,8	25 mM	Tris; pH 8,4
30%	glycerine	192 mM	Glyzin
6%	SDS	0,1% (w/v)	SDS
0,003%	Bromphenolblau		
	in H ₂ O _{bid}		In H ₂ O _{bid}

Western-Blot

Das Blot-Protokoll wurde nach Kyhse-Andersen, 1984 modifiziert. Die in der SDS-PAGE

aufgetrennten Proteine wurden per halb-trockenem (*semi dry*) Blot auf eine PVDF-Membran (Hybond™-P; GE Healthcare Life Sciences) transferiert. Vor dem Transfer wurde die Membran zunächst für mindestens 1 Minute in Methanol inkubiert und anschließend mit H₂O_{bid} gewaschen. Bis zum Aufbau des Blots wurde die Membran in Anodenpuffer 2 äquilibriert. Der Blot wurde wie folgt aufgebaut:

(Kathode)

Filterpapier (3 Stück) in Kathodenpuffer

Gel

Membran

Filterpapier (1 Stück) in Anodenpuffer 2

Filterpapier (2 Stück) in Anodenpuffer 1

(Anode)

Proteine wurden für 60 min und 75 mA/Gel auf die Membran transferiert. Anschließend wurden die Membranen für 30 min schüttelnd mit TBST-Puffer + 3% Milchpulver blockiert. Die Hybridisierung des ersten Antikörpers erfolgte über Nacht bei 4°C drehend auf einem Drehrad. Nach der Hybridisierung wurden Membranen dreimal für 10 min mit TBST-Puffer gewaschen bevor der zweite Antikörper hinzugegeben wurde. Die Hybridisierung des zweiten Antikörpers erfolgte für 1 h drehend auf einem Drehrad bei Raumtemperatur. Anschließend wurde erneut dreimal für 10 min mit TBST-Puffer und anschließend einmal 5 min mit TBS-Puffer gewaschen. Die Visualisierung von Proteinen erfolgte anhand der an den sekundären Antikörper gekoppelten Meerrettich-Peroxidase (HRP; *horsesradish peroxidase*). Die ECL-Kit (GE Healthcare Life Sciences). 1 ml Lösung A wurden mit 25 µl Lösung B gemischt und für 2 min mit der Membran inkubiert. Das Chemilumineszenzsignal wurde anhand des ImageQuant LAS-4000 Imagers (GE Healthcare Life Sciences) detektiert und ausgewertet.

Zur Färbung geblotteter Proteine wurden Membranen anschließend mit Coomassiefärbelösung kurz gefärbt, mit Entfärber entfärbt und bei Raumtemperatur trocknen gelassen.

Coomassiefärbung von SDS-Gelelen

Zur Coomassiefärbung wurden SDS-Gele nach erfolgreicher Elektrophorese 1 h bei Raumtemperatur zunächst schwenkend in Fixierungslösung gewaschen. Die Fixierung wurde anschließend durch Waschen der Gele in Waschlösung über Nacht bei Raumtemperatur fortgesetzt. Am nächsten Tag wurden die Gele mittels der Färbelösung für mindestens 2-3 h bei Raumtemperatur gefärbt. Zum Teil wurde die Färbung auch durch kurzes Erhitzen der Färbelösung auf 50°C beschleunigt. Nach abgeschlossener Färbung wurden Gele in Entfärber bei Raumtemperatur solange entfärbt, bis außer den Proteinbanden in den Gelen nichts mehr zu beobachten war. Dabei wurde der Entfärber häufig ausgetauscht. Nach erfolgreicher Entfärbung wurden die gefärbten Gele in 5% (v/v) Essigsäure äquilibriert und gelagert.

Fixierungslösung	Waschlösung	Färbelösung	Entfärber
50% (v/v) Ethanol 10% (v/v) Acetat	50% (v/v) Methanol 10% (v/v) Acetat	0,05% (w/v) Coomassie R-250 50% (v/v) Acetat 10% (v/v) Methanol	10% (v/v) Methanol 10% (v/v) Acetat
in H ₂ O	in H ₂ O	in H ₂ O	in H ₂ O

4.4.2 iCLIP (individual nucleotide resolution CLIP)

Tabelle 14: In den iCLIP-Experimenten verwendete Reagenzien

Reagenz	Hersteller
SUPERase-In RNase-Inhibitor	Ambion (Life Technologies)
IgG-Perlen (Proteinaufreinigung)	Sigma-Aldrich
Calmodulin-Affinitätsharz (Proteinaufreinigung)	Agilent Technologies (Santa Clara, CA, USA)
(Gamma- ³² P) ATP	Hartmann Analytic
Nupage 4-12% Bis-Tris Gradientengele	Life Technologies
Whatman Protran BA-85 Nitrozellulosemembran (Porengröße 0,45 µm)	GE Healthcare(Freiburg, Deutschland)
Phase Lock Gel Heavy (2 ml) Reaktionsgefäß	5Prime(Hamburg, Deutschland)
6% TBE-Harnstoffgele	Life Technologies
CoStar Spin-X Säulen	Corning (Corning, NY, USA)
Whatman Glasfaserfilter (d=1 cm)	GE Healthcare(Freiburg, Deutschland)
6% TBE-Acrylamidgele	Life Technologies
SYBR-Green I (dsDNA)	Life Technologies
SYBR-Green II (ssDNA/RNA)	Life Technologies

In vivo UV-Quervernetzung

Als Vorkultur wurden Flüssigkulturen in 3 ml CM-Glukose-Medium angeimpft und über Nacht bei 28°C schüttelnd inkubiert (200 rpm). Aus der Vorkultur wurde anschließend die Hauptkultur in 150 ml CM-Glukose-Medium angeimpft und über Nacht bei 28°C schüttelnd bis zu einer OD₆₀₀ von 0,8-1 am nächsten Tag inkubiert. Die Zellen wurden bei 5000 rpm (~3.840 g; Beckman J2-21 Zentrifuge, Rotor JA-14) für 5 min bei Raumtemperatur abzentrifugiert und einmal mit NM-Glukose-Medium gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation wurde das Zellpellet in 150 ml NM-Glukose-Medium resuspendiert und die resuspendierten Zellen wurden anschließend 6 h bei 28°C schüttelnd inkubiert. Die Induktion des filamentösen Wachstums wurde 6 h nach Induktion mikroskopisch überprüft. Als nächstes wurden die filamentös auswachsenden Zellen bei 7000 rpm (~7.520 g; Beckman J2-21 Zentrifuge, Rotor JA-14) 10 min lang bei Raumtemperatur abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen wurden während der nächsten Schritte auf Eis kühl gehalten. Das Zellpellet wurde in 5 ml TAP-Lysispuffer (mit Inhibitoren) resuspendiert und in eine auf Eis gekühlte Petrischale transferiert.

Protease-Inhibitoren:

Benzamidin (Endkonzentration 5 µM)

PMSF (Endkonzentration 1 µM)

Complete-Tablette (1-fach; Roche)

DTT (Endkonzentration 1 µM)

Die UV-Quervernetzung erfolgte auf Eis bei einer Wellenlänge von 254 nm in einem Bio-Link UV-Quervernetzer (Vilber-Lourmat). Zellen wurden dreimal mit 160 mJ/cm² bestrahlt (Gesamtdosis 480 mJ/cm²) und nach jeder Bestrahlung wurde die Petrischale kurz geschwenkt. Nach UV-Quervernetzung wurden 2 µl SUPERase-In RNase-Inhibitor (Life Technologies) hinzugegeben. Anschließend wurden die Zellen mit flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zum Zellaufschluss am nächsten Tag bei -80°C gelagert.

Usti-Lysispuffer:	0,5 M Na₃VO₄ (in H₂O):	Protease-Inhibitoren:
100 mM Na ₂ HPO ₄	pH auf 10 einstellen	0,5 M Benzamidin (in H ₂ O)
100 mM NaH ₂ PO ₄ *H ₂ O	Für 10 min bei 100°C kochen	0,1 M PMSF (in Ethanol)
0,1% NP40	pH erneut auf 10 einstellen	Complete-Tabletten (20-fach;
150 mM NaCl	Erneut für 10 min bei 100°C kochen	Roche)
2 mM EDTA	Auf 0, 1 M mit H ₂ O verdünnen	
50 mM NaF		
0,1 mM Na ₃ VO ₄		

Zellyse

Die gefrorenen Zellen wurden mittels einer Schwingmühle (MM400; Retsch) aufgeschlossen. Proben wurden mit jeweils zwei Mahlkugeln (d=12 mm) 3-mal 10 min lang bei 30 Hz aufgeschlossen. Nach jedem Durchgang wurden die Proben mit flüssigem Stickstoff gekühlt. Dem aufgetauten Zellysate wurde anschließend 2 µl SUPERase-In RNase-Inhibitor (20 U/µl; Life Technologies) hinzugegeben. Das Zellysate wurde anschließend bei 4°C bei 22 000 rpm (~45 000 g) 20 min lang zentrifugiert (Heraeus, Rotor #3341). Der Protein-RNA Komplex wurde aus dem Überstand aufgereinigt, während die Pellets verworfen wurden.

Tandemaffinitätsaufreinigung

Für die TAP (Tandemaffinitätsaufreinigung) wurden 150 µl IgG-Agarosekügelchen (Sigma-Aldrich; A2909) in ein 15 ml Reaktionsgefäß pipettiert. Zur Vorbereitung auf die Proteinaufreinigung wurden die Agarosekügelchen mit 500 µl Usti-Lysispuffer (ohne Inhibitoren) einmal gewaschen. Anschließend wurde der Überstand des Zellysats zu den Agarosekügelchen hinzugegeben und für 1 h bei 4°C auf einem Drehrad drehend inkubiert. Als nächstes wurde der Überstand verworfen, in 1 ml IPP150-Puffer (Endkonzentration DTT 1 mM) resuspendiert und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß transferiert. Die Agarosekügelchen wurden daraufhin insgesamt dreimal mit jeweils 1 ml IPP150-Puffer gewaschen. Anschließend wurden die Kügelchen ebenfalls dreimal mit 1 ml TEV-Puffer (Endkonzentration DTT 1 mM) gewaschen und in 150 µl TEV-Puffer resuspendiert. Zu den Agarosekügelchen wurden nun 12 µl TEV-Protease Plus (5 U/µl; Promega) und 2 µl SUPERase-In RNase-Inhibitor (Life Technologies) hinzugegeben und anschließend 90 min bei 4°C drehend auf einem Drehrad inkubiert. Als nächstes wurde der Überstand in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß transferiert und die Agarosekügelchen wurden erneut in 150 µl TEV-Puffer resuspendiert. Der Überstand wurde mit dem Überstand des vorhergegangenen Schritts vereint. Um eine Kontamination durch IgG-Agarosekügelchen auszuschließen wurden von dem vereinten Überständen 270 µl in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß transferiert. Der zweite Aufreinigungsschritt erfolgte über Calmodulin-Harz (Agilent Technologies, 214303). Zur Vorbereitung wurden 50 µl der Calmodulinkügelchen mit 500 µl CBP-Puffer gewaschen. Zu dem TEV-Eluat wurden 900 µl CBP-Puffer (Konzentration β-Mercaptoethanol 7,5 µl/10 ml Puffer), 1 µl 1 M CaCl₂ und 2 µl SUPERase-In RNase-Inhibitor (Life Technologies) zunächst hinzugegeben und anschließend wurde das Eluat mit den vorbereiteten Calmodulinkügelchen vereint. Die Proben wurden 90 min bei 4°C auf einem Drehrad drehend inkubiert. Daraufhin wurden die Calmodulinkügelchen dreimal mit 1 ml CBP-Puffer gewaschen und in 80 µl CBP-Puffer resuspendiert.

IPP150-Puffer:	TEV-Puffer:	CBP-Puffer:
10 mM Tris-HCl, pH 7,5	10 mM Tris-HCl, pH 7,5	10 mM Tris-HCl, pH 7,5
150 mM NaCl	150 mM NaCl	150 mM NaCl
0,1% NP40	0,1% NP40	0,1% NP40
	0,5 mM EDTA	1 mM MgAcetat
		1 mM Imidazol

2 mM CaCl₂

DNase-Verdau, Dephosphorylierung und Ligation des Linkers

Zu den Calmodulinkügelchen wurden 5 µl RNase-freie DNase I (10 U/µl; Roche) sowie 2 µl SUPERase-In RNase-Inhibitor (Life Technologies) hinzu pipettiert. Im Falle der RNase-Kontrollen wurde ebenfalls noch RNase T1 (Roche) hinzugegeben (hohe Konzentration: 10 U; niedrige Konzentration 0,5 U). Die Proben wurden daraufhin für 10 min bei 1000 rpm und 37°C in einem Thermomixer (Eppendorf) schüttelnd inkubiert. Anschließend wurden die Calmodulinkügelchen dreimal mit 1 ml CBP-PNK-Puffer (Endkonzentration DTT 5 mM) und einmal mit 50 µl PNK-Puffer (einfach) gewaschen. Als nächstes wurden die Calmodulinkügelchen in 20 µl Dephosphorylierungsmix resuspendiert:

- 15 µl ddH₂O
- 4 µl PNK-Puffer (5-fach)
- 0,5 µl T4-PNK (mit 3'Phosphataseaktivität; NEB)
- 0,5 µl SUPERase-In RNase-Inhibitor (Life Technologies)

Die Proben wurden im Anschluss für 20 min bei 37°C in einem Thermomixer (Eppendorf) bei 1000 rpm schüttelnd inkubiert. Nach der Dephosphorylierung wurden die Calmodulinkügelchen dreimal mit 1 ml CBP-PNK Puffer und einmal mit 50 µl Ligationspuffer gewaschen. Anschließend wurden die Calmodulinkügelchen in 20 µl Ligationsmix aufgenommen:

- 6 µl ddH₂O
- 5 µl 4x Ligationspuffer
- 1 µl T4 RNA Ligase (NEB)
- 1 µl SUPERase-In RNase-Inhibitor (Life Technologies)
- 4 µl PEG400 (Sigma)
- 4 µl pre-adenylierten L3-Linker (Konzentration 20 µM)

Die Ligation erfolgte für maximal 16 h über Nacht bei 16°C. Daraufhin wurden die Calmodulinkügelchen dreimal mit 1 ml CBP-PNK-Puffer gewaschen. Nach jedem Waschschrift wurden die Proben für 5 min bei 4°C drehend auf einem Drehrad inkubiert.

PNK-Puffer (5-fach):	CBP-PNK Puffer:	Ligationspuffer (4-fach):
350 mM Tris-HCl, pH 6,5	50 mM Tris-HCl, pH 7,5	200 mM Tris-HCl, pH 7,5
50 mM MgCl ₂	150 mM NaCl	40 mM MgCl ₂
25 mM DTT	0,1% NP40	40 mM DTT
	10 mM MgAcetat	
	1 mM Imidazol	
	2 mM CaCl ₂	

³²P-Markierung, SDS-Gelelektrophorese und Membrantransfer

Zur Vorbereitung auf die ³²P-Markierung wurden die Calmodulinkügelchen mit 50 µl NEB-PNK Puffer (einfach; NEB) gewaschen und anschließend in 80 µl NEB-PNK Puffer (einfach) resuspendiert. Zur ³²P-Markierung wurde folgendes hinzu pipettiert:

- + 5 µl T4 PNK (NEB)
- +1 µl SUPERase-In RNase-Inhibitor (Life Technologies)
- +5 µl ³²P gamma-ATP (0,37 MBq/µl; Hartmann Analytic; SRP-301)

Die Proben wurden für 20 min bei 37°C und 1000 rpm schüttelnd inkubiert und dreimal mit 1

ml CBP-Puffer gewaschen. Für die reduzierende SDS-PAGE wurden die Calmodulinkügelchen in 25 µl LDS-Ladepuffer (einfach; Endkonzentration DTT 10 mM; Life Technologies). Die Kügelchen wurden 10 min bei 70°C bei 750 rpm schüttelnd inkubiert und anschließend wurden 20 µl auf ein NuPage 4-12% Bis-Tris Gradientengel (Life Technologies) geladen. SDS-PAGE und Membrantransfer wurden nach der NuPage-Anleitung (Life Technologies) durchgeführt. Die Elektrophorese fand bei 180 V für 60 min statt. Als Laufpuffer wurde ein MOPS-Laufpuffer (einfach) verwendet. Als nächstes wurde der Protein-RNA Komplex auf eine Nitrozellulosemembran (Protran BA-85; Whatman) transferiert. Verwendet wurde ein 1-facher Transferpuffer (Life Technologies), welchem 0,01% SDS sowie 8% Methanol hinzugegeben wurden. Der Membrantransfer (30 V) fand über Nacht bei 4°C statt. Im Anschluss wurde die Membran 5 min in 1xPBS-Puffer gewaschen, in Frischhaltefolie gewickelt und in eine Röntgenfilmkassette geklebt. Röntgenfilme wurden über Nacht bei -80°C belichtet.

MOPS-Laufpuffer (20-fach; NuPage):	Transferpuffer (20-fach; NuPage):	PBS (10-fach):
50 mM MOPS	500 mM Bicine	79 mM Na ₂ HPO ₄
50 mM Tris-Base	500 mM Tris-Bis	145 mM KH ₂ PO ₄
0,1% SDS	20 mM EDTA	5 mM MgCl ₂ *6 H ₂ O
1 mM EDTA	Optional:	27 mM KCl
pH 7,7	1 mM Chlorobutanol	1,37 M NaCl

RNA-Isolation

Der belichtete Röntgenfilm wurde entwickelt, am Computer eingescannt, und anschließend als Schablone präpariert: mittels einer Rasierklinge wurden die entsprechenden Areale auf dem Röntgenfilm ausgeschnitten. Anhand des Röntgenfilms wurden daraufhin die entsprechenden Membranareale ausgeschnitten und in ein sauberes 1,5 ml Reaktionsgefäß transferiert. Aufgereinigte RNA wurde nun mittels Proteinase K-Behandlung isoliert:

+200 µl PK-Puffer
+10 µl Proteinase K (Roche)

Die Membranfragmente wurden für 20 min bei 1000 rpm schüttelnd bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden 200 µl PK + 7 M Harnstoff-Puffer hinzugegeben und die Membranfragmente wurden abermals 20 für min bei 1000 rpm schüttelnd bei 37°C inkubiert. Als nächstes wurde der Überstand in ein sauberes 1,5 ml Reaktionsgefäß transferiert. Zu den Proben wurden nun 400 µl RNA Phenol/Chloroform (Ambion) hinzu pipettiert, gemischt und in ein PhaseLock Gel Heavy (2 ml) Reaktionsgefäß (5Prime) transferiert. Die Lösung wurde anschließend für 5 min bei 30°C und 1000 rpm schüttelnd inkubiert. Die Phasentrennung erfolgte durch Zentrifugation bei 13 000 rpm (~ 16 000 g; Heraeus Pico Fuge) für 5 min. Die wässrige Lösung wurde in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß transferiert und die RNA wurde durch Zugabe von 0,5 µl Glycoblau (Life Technologies, 9510) und 40 µl 3 M NaAcetat, pH 5,5 sowie 1 ml vorgekühltem 100% Ethanol bei -20°C über Nacht präzipitiert.

PK-Puffer:	PK-Puffer + 7 M Harnstoff:
100 mM Tris-HCl, pH 7,4	100 mM Tris-HCl, pH 7,4
50 mM NaCl	50 mM NaCl
10 mM EDTA	10 mM EDTA
	7 M Harnstoff

Reverse Transkription und cDNA-Aufreinigung

Die präzipitierte RNA wurde durch Zentrifugation bei 15 000 rpm und 4°C für 15 min pelletiert. Anschließend wurde das RNA Pellet mit 0,5 ml 80% EtOH gewaschen, in 6,25 µl ddH₂O resuspendiert und in eine PCR-Gefäß transferiert. Zu dem resuspendierten RNA-Pellet wurde hinzu pipettiert:

+0,5 µl RT-Oligo (0,5 µM)
+0,5 µl dNTPs (10 mM)

Im PCR-Cycler wurde folgendes Programm gefahren:

70°C für 5 min
25°C bis Reverse Transkriptionsmix hinzu pipettiert wurde

Der Reverse Transkriptionsmix setzte sich wie folgt zusammen:

2 µl 5xRT-Puffer (Life Technologies)
0,5 µl 0,1 M DTT
0,25 µl Superscript III Reverse Transkriptase (200 U/µl; Life Technologies)

Das RT-Programm wurde im PCR-Cycler anschließend fortgesetzt:

25 °C für 5 min
42°C für 20 min
50°C für 40 min
80°C für 5 min
4°C für immer

Als nächstes wurden dann 400 µl TE-Puffer, 0,5 µl Glycoblau (Life Technologies), 40 µl 3 M NaAcetat, pH 5,5 sowie 1 ml vorgekühltem 100% Ethanol hinzugegeben. Die Präzipitation der einzelsträngigen cDNA erfolgte über Nacht bei -20°C.

Folgende RT-Oligonukleotide wurden in den jeweiligen iCLIP-Experimenten in dieser Arbeit eingesetzt:

10 mM TE-Puffer:
1,31 mM Tris-Base
8,69 mM Tris-HCl
10 mM EDTA

cDNA-Aufreinigung

Die präzipitierte einzelsträngige cDNA wurde wie bereits oben beschrieben pelletiert, mit 80% Ethanol gewaschen und anschließend in 6 µl ddH₂O resuspendiert. Anschließend wurden dann 6 µl 2x TBE-Harnstoff Ladepuffer (Life Technologies) hinzu gegeben. Die Proben wurden 5 min bei 80°C denaturiert und daraufhin auf ein 6% TBE-Harnstoffgel (Life Technologies) aufgetragen. Als Marker wurden 6 µl Low Molecular Weight Marker (1/30 verdünnt; NEB) aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei 180 V für 40 min. Die den Marker enthaltene Spur wurde ausgeschnitten und in 20 ml TBE+2 µl SYBR Green II Stammlösung (Life Technologies) 10 min lang schüttelnd gefärbt und anschließend mittels UV-Strahlung visualisiert. Die gefärbten Markerbanden dienten als Referenz, um aus dem Gel Gelstücke herauszuschneiden, welche ~70-90 nt und 90-100 nt große cDNA-Moleküle enthielten. Die herausgeschnittenen Gelstücke wurden in neue 1,5 ml Reaktionsgefäße transferiert und es wurden jeweils 400 µl TE-Puffer hinzugegeben. Anschließend wurden die Gelstücke mit dem Kolben einer 1 ml Spritze zerkleinert. Die in den Gelstücken enthaltene cDNA wurde wie folgt eluiert:

1 h bei 37°C; schüttelnd bei 1100 rpm
2 min auf Trockeneis (-80°C)

1 h bei 37°C; schüttelnd bei 1100 rpm

Der flüssige Überstand wurde anschließend in eine CoStar SpinX Säule (Corning Inc., 8161) transferiert, in der zwei 1 cm Glasfaserfilter (Whatman, 1823010) platziert worden waren. Die Säulen wurden für 1 min bei 13 000 rpm (Heraeus Pico Fuge) zentrifugiert und das Filtrat in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß transferiert. Die cDNA wurde durch Zugabe von 0,5 µl Glycoblau (Life Technologies), 3 M NaAcetat, pH 5,5 sowie 1 ml vorgekühltem 100% Ethanol über Nacht bei -20°C präzipitiert.

Selbstzirkularisierung (Ligation des L3-Linkers an das 5'Ende der cDNA)

Die cDNA wurde wie bereits beschrieben pelletiert, gewaschen und in 8 µl Ligationsmix resuspendiert:

- 6,5 µl ddH₂O
- 0,8 µl 10xCircLigase-Puffer (Epicentre)
- 0,4 µl 50 mM MnCl₂
- 0,3 µl CircLigasell (Epicentre)

Der Ligationsmix wurde für 1 h bei 60°C inkubiert. Im Anschluss wurden 30 µl Hybridisierungsmix hinzugegeben:

- 26 µl ddH₂O
- 3 µl NEB4-Puffer (NEB)
- 1 µl 10 µM Cut-Oligo

Die Hybridisierung des Cut-Oligos wurde mit folgenden Programm durchgeführt:

- 95°C für 2 min
- Sukzessive Zyklen von jeweils 20 Sekunden; Reduktion der Temperatur mit jedem Zyklus um 1°C von 95°C auf 25°C
- 25°C für immer

Anschließend wurden 2 µl *Bam*HI-HF (NEB) hinzugegeben und 30 min bei 37°C inkubiert. Die cDNA wurde durch Zugabe von 350 µl TE-Puffer, 0,5 µl Glycoblau (Life Technologies), 50 µl NaAcetat, pH 5,5 und 1 ml vorgekühlten 100% Ethanol über Nacht bei -20°C präzipitiert.

Herstellung von cDNA-Banken (PCR-Amplifikation)

Die präzipitierte cDNA wurde wie bereits beschrieben pelletiert, gewaschen und anschließend in 11 µl ddH₂O resuspendiert.

Zur Optimierung der Anzahl an Zyklen wurde folgender PCR-Mix zunächst angesetzt:

- 0,5 µl cDNA
- 0,25 µl Primer-Mix (P5Solexa und P3Solexa, je 10 µM)
- 5 µl Accuprime Supermix 1 (Life Technologies)
- 4,25 µl ddH₂O

Es wurde folgendes Programm gefahren:

- 94°C 2 min

- 25 und 30 Zyklen
- 94°C 15 Sekunden
- 65°C 30 Sekunden
- 68°C 30 Sekunden
- 68°C 3 Minuten

25°C für immer

8 µl des PCR-Produkts wurden mit 2 µl 6x Ladepuffer (Fermentas) versetzt und auf ein 6% TBE-Gel (Life Technologies) aufgetragen. Das Gel wurde anschließend mit SYBR Green I (Life Technologies) gefärbt (siehe **SYBR Green II-Färbung**: cDNA-Aufreinigung), um die Größe der amplifizierten cDNA-Moleküle zu visualisieren.

Da in der präoperativen PCR mehr cDNA amplifiziert wird, wurde die PCR mit 28 Zyklen durchgeführt:

10 µl cDNA

9 µl ddH₂O

1 µl Primer-Mix (P5Solexa und P3Solexa, je 10 µM)

20 µl Accuprime Supermix 1 (Life Technologies)

PCR-Programm: siehe oben, mit 28 Zyklen

8 µl des PCR-Produkts wurden mit 2 µl 6x Ladepuffer (Fermentas) versetzt und auf ein 6% TBE-Gel (Life Technologies) aufgetragen. Das Gel wurde anschließend mit SYBR Green I (Life Technologies) gefärbt (siehe **SYBR Green II-Färbung**: cDNA-Aufreinigung), um die Größe der amplifizierten cDNA-Moleküle zu visualisieren.

4.5 Bioinformatische Analysen

4.5.1 Verwendete Programme

Computerprogramme

bowtie (Version 0.12.7; <http://bowtie-bio.sourceforge.net/index.shtml>; Langmead *et al.*, 2009)
Die Kartierung von Sequenzen innerhalb des Genoms erfolgte anhand dieses Programms.

Canvas 12 (ACD Systems of America; Seattle, WA, USA)

Die Bearbeitung von Bildern und die Erstellung von Abbildungen erfolgten mittels dieses Programms.

Clone Manager 9 (Sci-Ed Software, Cary, NC, USA)

Dieses Programm wurde für die virtuelle Klonierung von Plasmiden und genomischen Loci verwendet. Zudem wurde dieses Programm bei der Planung von Oligonukleotiden, der Auswertung von Sequenzierungen und der Herstellung von Karten von Plasmiden/genomischen Loci eingesetzt.

R (Version: 2.15.2; R Core Team (2012); www.R-project.org/;))

RStudio (Version: 0.97.336; RStudio, Inc.)

Die Auswertung der HITS-CLIP und der iCLIP-Daten erfolgte mittels R. Als Entwicklungsumgebung diente dabei RStudio. Die Auswertung der Daten erfolgte mittels Paketen der Bioconductor-Plattform (www.bioconductor.org). Folgende Pakete (*packages*, *libraries*) wurden in dieser Arbeit eingesetzt:

ShortRead (Morgan *et al.*, 2009)

Lattice (Sarkar, 2008)

latticeExtra (Sarkar und Andrews,)

Rtracklayer (Lawrence *et al.*, 2009)

seqLogo (Bembom, 2007)
GenomicRanges (Lawrence *et al.*, 2013)
Biostrings (Pages *et al.*, 2009)
Xtable (Dahl, 2009)
Gplots (Warnes *et al.*, 2011)
Umaydis BSgenome (K. Zarnack)

Integrated Genome Browser (IGB; <http://bioviz.org>; Nicol *et al.*, 2009)

Die Positionen der ermittelten CLIP-Tags, Quervernetzungsstellen und Clustern innerhalb des Genoms wurden mittels dieses Browsers visualisiert.

Web-basierte Programme

BLAST (Basic Local Alignment Search Tool; <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>; Gish und States, 1993 ; McGinnis und Madden, 2004)

Der Vergleich von Aminosäuresequenzen und die Identifizierung homologer Proteine erfolgte mittels BLAST. Für reziproke Analysen wurde zudem die WU-BLAST Funktion der MUMDB verwendet (<http://mips.helmholtz-muenchen.de/genre/proj/ustilago>).

iCount (<http://icount.biolab.si>)

Die Auswertung der Sequenzen der iCLIP-Experimente wurde durch iCount durchgeführt (Kartierung, Quantifizierung der Quervernetzungsereignisse, Identifizierung der korrespondierenden Quervernetzungsstellen)

MEME (*Multiple Em for Motif elicitation*, <http://meme.nbcr.net/meme/>; Bailey *et al.*, 2009)

Die Identifizierung konservierter innerhalb von Nukleinsäuresequenzen erfolgte anhand dieses Programms.

mfold (<http://mfold.rna.albany.edu>; Zuker, 2003)

Dieses Programm wurde zur Vorhersage der Sekundärstrukturen von RNA-Sequenzen eingesetzt.

SMART (**S**imple **M**odular **A**rchitecture **R**esearch **T**ool; <http://smart.embl-heidelberg.de/>; Schultz *et al.*, 1998 ; Letunic *et al.*, 2012)

Die Identifikation von annotierten Domänen innerhalb von Aminosäuresequenzen erfolgte anhand dieser Datenbank.

4.5.2 Analysen der HITS-CLIP und iCLIP-Daten

Die durchgeführten Analysen erfolgten anhand des annotierten *U. maydis* Genoms (MUMDB; http://mips.helmholtz-muenchen.de/genre/proj/ustilago/About/FTP_sites.html).

Analyse der HITS-CLIP Daten

Die Auswertung der HITS-CLIP Analyse erfolgte in enger Zusammenarbeit mit Kathi Zarnack und Nick Luscombe (EMBL European Bioinformatics Institute, Hinxton, Cambridge, UK)

Genomweite Kartierung der erhaltenen Sequenzen mit bowtie

Die Hochdurchsatzsequenzierung der beiden CLIP-Banken (König *et al.*, 2009) ergab 1.290.949 und 7.594.055 Sequenzen für Experiment 1 bzw. Experiment 2. Vor der Kartierung mit *bowtie* wurden bei allen Sequenzen die für die Sequenzierung benötigten Adaptersequenzen entfernt. Jede Sequenz war 50 nt lang, wovon die Adaptersequenzen jeweils die ersten 26 nt ausmachten. Die genomweite Kartierung wurde anschließend mit *bowtie* (Version 0.12.07) im *U. maydis* Genom (MUMDB; <http://mips.helmholtz-muenchen.de/genre/proj/ustilago/>; Version April 2008) durchgeführt. Sequenzen durften nur einmalig kartiert werden und maximal eine Fehlpaarung aufweisen: `bowtie -v 1 -m 1`

Die kartierten Sequenzen wurden anschließend zur Identifizierung von CLIP-Tags mit dem *U. maydis* Genom (MUMDB, Version April 2008) abgeglichen. CLIP-Tags wurden hierbei als einmalig kartierte Sequenzen definiert. Aufgrund der Homologien zu rRNA wurden bei dieser Analyse die zu den Genen *um05243*, *um06265* und *um06266* korrespondierenden CLIP-Tags bei den Analysen Protein-kodierender Gene nicht berücksichtigt. Die Vereinigung der 1 565 bzw. 1 521 identifizierten CLIP-Tags resultierte in der genomweiten Identifizierung von 2 551 CLIP-Tags. Um die UTRs von mRNAs zu berücksichtigen wurde jeder ORF um jeweils 300 nt in 5' und 3'Richtung erweitert. Insgesamt lagen 1 657 der 2 551 CLIP-Tags in transkribierten Bereichen Protein-kodierender Gene. Für jedes annotierte Gen im Genom wurde die Anzahl an CLIP-Tags in 5'UTR, ORF, 3'UTR sowie der gesamten mRNA ermittelt. Die Visualisierung der identifizierten CLIP-Tags erfolgte mittels des IGB-Browsers.

MEME-Analyse (<http://meme.nbcr.net/meme/>, Bailey *et al.*, 2009)

Alle CLIP-Tags wurden um 100 nt in 5' und 3' Richtung erweitert. Um eine Überrepräsentierung von überlappenden CLIP-Tags zu vermeiden, wurden alle überlappenden CLIP-Tags vereint. Die genomische Sequenz der CLIP-Tags wurden im FASTA-Format extrahiert und durch MEME analysiert. Als Parameter wurden „Ein Motiv pro Sequenz“ sowie „Ein oder kein Motiv pro Sequenz“ verwendet. Die komplementäre Sequenz wurde in diesen Analysen nicht berücksichtigt.

4.5.3 Analyse der iCLIP-Daten**Identifizierung von reproduzierbaren Clustern**

Die Kartierung, Ermittlung von Quervernetzungsstellen, Quervernetzungsereignissen und die Identifizierung von Clustern erfolgte durch die iCount-Plattform (<http://icount.biolaab.si>). Zusätzlich zu den einzelnen Experimenten wurden die in allen fünf Replikaten identifizierten Quervernetzungsstellen in einem einzelnen gemeinsamen Datensatz vereint. Die im gemeinsamen Datensatz identifizierten Cluster wurde auf Reproduzierbarkeit hin mit den fünf einzelnen Experimenten abgeglichen. Aufgrund des zum Teil sehr geringen Umfangs der einzelnen Experimente galt ein Cluster als reproduzierbar, wenn er in mindestens zwei Experimenten identifiziert wurde und mindestens fünf Quervernetzungsereignisse besaß. Reproduzierbare Cluster wurden in dem *GenomicRanges*-Objekt *rrm4.clusts* zusammengefasst. Neben der genomischen Position wurden zudem die Anzahl der Quervernetzungsereignisse (Gesamtanzahl und Verteilung auf die einzelnen Experimente), die Anzahl an Replikate und die Position der Quervernetzungsstelle mit der höchsten Anzahl an Quervernetzungsereignisse (dem Clustermaximum) innerhalb eines Clusters ermittelt. Zusätzlich wurde für die in mRNAs liegenden Cluster die entsprechende Region, sowie die

relative Position (*rel.start* und *rel.end*) zu dem 300 nt großen UTR bestimmt. Zu Berücksichtigung der UTRs wurden, wie bereits in der HITS-CLIP Analyse beschrieben, mRNAs um jeweils 300 nt in 5' und 3'Richtung erweitert. Die Verteilung der Cluster innerhalb der jeweiligen Regionen, sowie deren Normalisierung auf die Gesamtlänge der Regionen (Clusterdichte pro Region) wurden grafisch als Balkendiagramm wiedergegeben.

Identifizierung eines Bindemotivs

Für jeden reproduzierbaren Cluster wurde die Position der Quervernetzungsstelle mit der höchsten Anzahl an Quervernetzungsereignissen, das Clustermaximum, identifiziert. Ausgehend von dem Clustermaximum als Mitte, wurde ein Fenster mit einer Gesamtbreite von 40 nt auf mögliche Anreicherungen von Di-, Tri- und Tetranukleotiden untersucht. Jeder der reproduzierbaren Cluster wurde daraufhin untersucht, ob innerhalb des 40 nt Fensters mindestens ein CTAT, TTAT, TATG, ATGC oder AAAA vorlag. Die Verteilung der Nukleotide innerhalb des Fensters wurde als Liniendiagramm abgebildet. Für die MEME-Analyse wurde die genomische Sequenz der entsprechenden Motif-enthaltenen Cluster extrahiert, im FASTA-Format abgespeichert und mittels MEME analysiert.

MEME-Analyse (<http://meme.nbcr.net/meme/>, Bailey *et al.*, 2009)

Die Sequenzen der entsprechenden Cluster wurden im FASTA-Format extrahiert und durch MEME analysiert. Als Parameter wurde „Ein Motiv pro Sequenz“ und „Ein oder kein Motiv pro Sequenz“ verwendet. Die komplementäre Sequenz wurde in die Analyse nicht miteinbezogen.

Abgleich von UAUG-enthaltenen Clustern mit Bindemotiv

Die identifizierten, reproduzierbaren Cluster wurden auf das Vorhandensein der angereicherten Motive (TTAT, CTAT, TATG, ATGC, AAAA) untersucht. Zu diesem Zweck wurde die genomische Sequenz innerhalb der die Clustermaxima umfassenden, 40 nt großen Fenster auf das Vorhandensein von mindestens einer Kopie des jeweiligen Motivs untersucht. Die genomische Sequenz des 40 nt großen Fensters wurde dabei mit dem jeweiligen Motiv abgeglichen. Falls der Cluster auf dem Minusstrang lag wurde die Komplementärsequenz verwendet. Das Vorhandensein der Motive wurde in Form von „Yes“ oder „No“ jeweils festgehalten.

Abgleich Cluster/CLIP-Tags mit Introns

Um zu ermitteln, welche der reproduzierbaren Cluster und CLIP-Tags in Introns lagen wurden die in mRNAs liegenden Cluster mit denen in CDS (coding sequences, kodierenden Sequenzen=Exons) liegenden Clustern abgeglichen. In Introns liegende Cluster sollten folglich in mRNAs, aber nicht in CDS liegen.

Identifizierung von Ziel-mRNAs

Zur Identifizierung von Ziel-mRNAs wurde die genomische Position der reproduzierbaren Cluster mit dem annotierten Genen des *U. maydis* Genoms abgeglichen. Die UTR-Länge wurde dabei mit jeweils 300 nt manuell definiert. Aufgrund von Sequenzähnlichkeit zu rRNA wurden die zu den Genen *um05243*, *um06265* und *um06266* korrespondierenden Cluster in dieser Analyse nicht berücksichtigt (siehe 7.1). Für jedes Transkript wurden die Anzahl an

Reproduzierbaren Cluster, deren Positionen innerhalb des Transkripts, die Anzahl an QEs, sowie die Anzahl an QEs und QS innerhalb der einzelnen Experimente festgehalten.

Analyse der in HITS-CLIP und iCLIP gemeinsam identifizierten Kandidaten

Die gemeinsam identifizierten Ziel-mRNAs wurden durch den Abgleich der iCLIP- und HITS-CLIP Kandidaten ermittelt. Gemeinsame Kandidaten mussten identisch zueinander sein:

```
subsetByOverlaps(#iCLIP-targets, query=HITS-CLIP_targets, type="equal")
```

Anhand der gemeinsam identifizierten Kandidaten konnten anschließend die mRNAs identifiziert werden, welche ausschließlich durch HITS-CLIP oder iCLIP („nur HITS-CLIP“ bzw. „nur iCLIP“) gefunden wurden. Dies entsprach den mRNAs, welche nicht innerhalb der gemeinsam identifizierten mRNAs gefunden wurden.

```
temp<-match(#gemeinsame_mRNAs, Ziel_mRNAs)  
mRNAs <- Ziel_mRNAs[-temp]
```


5. Literaturverzeichnis

Abdelmohsen, K., Srikantan, S., Kuwano, Y. und Gorospe, M. (2008). miR-519 reduces cell proliferation by lowering RNA-binding protein HuR levels. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 20297-302.

Alvarez-Tabares, I. und Perez-Martin, J. (2010). Septins from the phytopathogenic fungus *Ustilago maydis* are required for proper morphogenesis but dispensable for virulence. *PLoS One* **5**, e12933.

Ankö, M. L., Muller-McNicoll, M., Brandl, H., Curk, T., Gorup, C., Henry, I., Ule, J. und Neugebauer, K. M. (2012). The RNA-binding landscapes of two SR proteins reveal unique functions and binding to diverse RNA classes. *Genome Biol* **13**, R17.

Ascano, M., Jr., Mukherjee, N., Bandaru, P., Miller, J. B., Nusbaum, J. D., Corcoran, D. L., Langlois, C., Munschauer, M., Dewell, S., Hafner, M. et al. (2012). FMRP targets distinct mRNA sequence elements to regulate protein expression. *Nature* **492**, 382-6.

Ausubel, F. M., Brent, R., Kinstom, R. E., Moore, D. D., Smith, J. A., Seidman, J. G. und Struhl, K. (1987). Current Protocols in Molecular Biology.

Auweter, S. D., Oberstrass, F. C. und Allain, F. H. (2006). Sequence-specific binding of single-stranded RNA: is there a code for recognition? *Nucleic Acids Res* **34**, 4943-59.

Azmi, I. F., Davies, B. A., Xiao, J., Babst, M., Xu, Z. und Katzmann, D. J. (2008). ESCRT-III family members stimulate Vps4 ATPase activity directly or via Vta1. *Dev Cell* **14**, 50-61.

Bailey, T. L., Boden, M., Buske, F. A., Frith, M., Grant, C. E., Clementi, L., Ren, J., Li, W. W. und Noble, W. S. (2009). MEME SUITE: tools for motif discovery and searching. *Nucleic Acids Res* **37**, W202-8.

Baltz, A. G., Munschauer, M., Schwanhauser, B., Vasile, A., Murakawa, Y., Schueler, M., Youngs, N., Penfold-Brown, D., Drew, K., Milek, M. et al. (2012). The mRNA-bound proteome and its global occupancy profile on protein-coding transcripts. *Mol Cell* **46**, 674-90.

Banuett, F. und Herskowitz, I. (1989). Different alleles of *Ustilago maydis* are necessary for maintenance of filamentous growth but not for meiosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**, 5878-82.

Bashirullah, A., Halsell, S. R., Cooperstock, R. L., Kloc, M., Karaiskakis, A., Fisher, W. W., Fu, W., Hamilton, J. K., Etkin, L. D. und Lipshitz, H. D. (1999). Joint action of two RNA degradation pathways controls the timing of maternal transcript elimination at the midblastula transition in *Drosophila melanogaster*. *EMBO J* **18**, 2610-20.

Bashirullah, A., Cooperstock, R. L. und Lipshitz, H. D. (2001). Spatial and temporal control of RNA stability. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 7025-8.

Baumann, S., Pohlmann, T., Jungbluth, M., Brachmann, A. und Feldbrugge, M. (2012). Kinesin-3 and dynein mediate microtubule-dependent co-transport of mRNPs and endosomes. *J Cell Sci* **125**, 2740-52.

- Baumann, S.:** Microtubule-dependent mRNA-transport is coupled to endosomes and is important for unipolar growth in *Ustilago maydis*; Dissertation, Philipps-Universität Marburg (2013)
- Becht, P., Vollmeister, E. und Feldbrügge, M.** (2005). Role for RNA-binding proteins implicated in pathogenic development of *Ustilago maydis*. *Eukaryot Cell* **4**, 121-33.
- Becht, P., König, J. und Feldbrügge, M.** (2006). The RNA-binding protein Rrm4 is essential for polarity in *Ustilago maydis* and shuttles along microtubules. *J Cell Sci* **119**, 4964-73.
- Beise, N. und Trimble, W.** (2011). Septins at a glance. *J Cell Sci* **124**, 4141-6.
- Bembom, O.** (2007). seqLogo: An R package for plotting DNA sequence logos.
- Bhavsar, R. B., Makley, L. N. und Tsonis, P. A.** (2010). The other lives of ribosomal proteins. *Hum Genomics* **4**, 327-44.
- Bi, E. und Park, H. O.** (2012). Cell polarization and cytokinesis in budding yeast. *Genetics* **191**, 347-87.
- Bianco, A., Dienstbier, M., Salter, H. K., Gatto, G. und Bullock, S. L.** (2010). Bicaudal-D regulates fragile X mental retardation protein levels, motility, and function during neuronal morphogenesis. *Curr Biol* **20**, 1487-92.
- Blower, M. D.** (2013). Molecular insights into intracellular RNA localization. *Int Rev Cell Mol Biol* **302**, 1-39.
- Bölker, M.** (2001). *Ustilago maydis*--a valuable model system for the study of fungal dimorphism and virulence. *Microbiology* **147**, 1395-401.
- Boss, W. F. und Im, Y. J.** (2012). Phosphoinositide signaling. *Annu Rev Plant Biol* **63**, 409-29.
- Brachmann, A., Weinzierl, G., Kamper, J. und Kahmann, R.** (2001). Identification of genes in the bW/bE regulatory cascade in *Ustilago maydis*. *Mol Microbiol* **42**, 1047-63.
- Brachmann, A., König, J., Julius, C. und Feldbrügge, M.** (2004a). A reverse genetic approach for generating gene replacement mutants in *Ustilago maydis*. *Mol Genet Genomics* **272**, 216-26.
- Brachmann, A., König, J., Julius, C. und Feldbrügge, M.** (2004b). A reverse genetic approach for generating gene replacement mutants in *Ustilago maydis*. *Mol Genet Genomics* **272**, 216-26.
- Bradford, M. M.** (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**, 248-54.
- Brefort, T., Doehlemann, G., Mendoza-Mendoza, A., Reissmann, S., Djamei, A. und Kahmann, R.** (2009). *Ustilago maydis* as a Pathogen. *Annu Rev Phytopathol* **47**, 423-45.

- Burston, H. E., Maldonado-Baez, L., Davey, M., Montpetit, B., Schluter, C., Wendland, B. und Conibear, E.** (2009). Regulators of yeast endocytosis identified by systematic quantitative analysis. *J Cell Biol* **185**, 1097-110.
- Calcagno-Pizarelli, A. M., Hervas-Aguilar, A., Galindo, A., Abenza, J. F., Penalva, M. A. und Arst, H. N., Jr.** (2011). Rescue of *Aspergillus nidulans* severely debilitating null mutations in ESCRT-0, I, II and III genes by inactivation of a salt-tolerance pathway allows examination of ESCRT gene roles in pH signalling. *J Cell Sci* **124**, 4064-76.
- Canovas, D. und Perez-Martin, J.** (2009). Sphingolipid biosynthesis is required for polar growth in the dimorphic phytopathogen *Ustilago maydis*. *Fungal Genet Biol* **46**, 190-200.
- Carman, G. M. und Han, G. S.** (2011). Regulation of phospholipid synthesis in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Annu Rev Biochem* **80**, 859-83.
- Castello, A., Fischer, B., Eichelbaum, K., Horos, R., Beckmann, B. M., Strein, C., Davey, N. E., Humphreys, D. T., Preiss, T., Steinmetz, L. M. et al.** (2012). Insights into RNA biology from an atlas of mammalian mRNA-binding proteins. *Cell* **149**, 1393-406.
- Chartrand, P., Meng, X. H., Singer, R. H. und Long, R. M.** (1999). Structural elements required for the localization of ASH1 mRNA and of a green fluorescent protein reporter particle in vivo. *Curr Biol* **9**, 333-6.
- Chesarone, M. A., DuPage, A. G. und Goode, B. L.** (2010). Unleashing formins to remodel the actin and microtubule cytoskeletons. *Nat Rev Mol Cell Biol* **11**, 62-74.
- Clery, A., Blatter, M. und Allain, F. H.** (2008). RNA recognition motifs: boring? Not quite. *Curr Opin Struct Biol* **18**, 290-8.
- Cohen, S. N., Chang, A. C. und Hsu, L.** (1972). Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **69**, 2110-4.
- Cooper, T. A., Wan, L. und Dreyfuss, G.** (2009). RNA and disease. *Cell* **136**, 777-93.
- Crofts, A. J., Washida, H., Okita, T. W., Satoh, M., Ogawa, M., Kumamaru, T. und Satoh, H.** (2005). The role of mRNA and protein sorting in seed storage protein synthesis, transport, and deposition. *Biochem Cell Biol* **83**, 728-37.
- Culbertson, M. R. und Henry, S. A.** (1975). Inositol-requiring mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **80**, 23-40.
- Dahl, D. B.** (2009). xtable: Export Tables to LATEX or HTML. *R package version*, 1.5-5.
- Darnell, J. C., Van Driesche, S. J., Zhang, C., Hung, K. Y., Mele, A., Fraser, C. E., Stone, E. F., Chen, C., Fak, J. J., Chi, S. W. et al.** (2011). FMRP stalls ribosomal translocation on mRNAs linked to synaptic function and autism. *Cell* **146**, 247-61.
- De Wachter, R., Neefs, J. M., Goris, A. und Van de Peer, Y.** (1992). The gene coding for small ribosomal subunit RNA in the basidiomycete *Ustilago maydis* contains a group I intron. *Nucleic Acids Res* **20**, 1251-7.

- 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. et al.** (2012). The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Mol Plant Pathol* **13**, 414-30.
- Deshler, J. O., Highett, M. I. und Schnapp, B. J.** (1997). Localization of *Xenopus* Vg1 mRNA by Vera protein and the endoplasmic reticulum. *Science* **276**, 1128-31.
- Devaux, A., Colegrove-Otero, L. J. und Standart, N.** (2006). *Xenopus* ElrB, but not ElrA, binds RNA as an oligomer: possible role of the linker. *FEBS Lett* **580**, 4947-52.
- Dictenberg, J. B., Swanger, S. A., Antar, L. N., Singer, R. H. und Bassell, G. J.** (2008). A direct role for FMRP in activity-dependent dendritic mRNA transport links filopodial-spine morphogenesis to fragile X syndrome. *Dev Cell* **14**, 926-39.
- Dienstbier, M., Boehl, F., Li, X. und Bullock, S. L.** (2009). Egalitarian is a selective RNA-binding protein linking mRNA localization signals to the dynein motor. *Genes Dev* **23**, 1546-58.
- Dimaano, C., Jones, C. B., Hanono, A., Curtiss, M. und Babst, M.** (2008). Ist1 regulates Vps4 localization and assembly. *Mol Biol Cell* **19**, 465-74.
- Djamei, A., Schipper, K., Rabe, F., Ghosh, A., Vincon, V., Kahnt, J., Osorio, S., Tohge, T., Fernie, A. R., Feussner, I. et al.** (2011). Metabolic priming by a secreted fungal effector. *Nature* **478**, 395-8.
- Djamei, A. und Kahmann, R.** (2012). *Ustilago maydis*: dissecting the molecular interface between pathogen and plant. *PLoS Pathog* **8**, e1002955.
- Doehlemann, G., Wahl, R., Horst, R. J., Voll, L. M., Usadel, B., Poree, F., Stitt, M., Pons-Kuhnemann, J., Sonnewald, U., Kahmann, R. et al.** (2008). Reprogramming a maize plant: transcriptional and metabolic changes induced by the fungal biotroph *Ustilago maydis*. *Plant J* **56**, 181-95.
- Doller, A., Schlepckow, K., Schwalbe, H., Pfeilschifter, J. und Eberhardt, W.** (2010). Tandem phosphorylation of serines 221 and 318 by protein kinase Cdelta coordinates mRNA binding and nucleocytoplasmic shuttling of HuR. *Mol Cell Biol* **30**, 1397-410.
- Donahue, J. L., Alford, S. R., Torabinejad, J., Kerwin, R. E., Nourbakhsh, A., Ray, W. K., Hernick, M., Huang, X., Lyons, B. M., Hein, P. P. et al.** (2010). The *Arabidopsis thaliana* Myo-inositol 1-phosphate synthase1 gene is required for Myo-inositol synthesis and suppression of cell death. *Plant Cell* **22**, 888-903.
- Doyle, M. und Kiebler, M. A.** (2011). Mechanisms of dendritic mRNA transport and its role in synaptic tagging. *EMBO J* **30**, 3540-52.
- Eliyahu, E., Pnueli, L., Melamed, D., Scherrer, T., Gerber, A. P., Pines, O., Rapaport, D. und Arava, Y.** (2010). Tom20 mediates localization of mRNAs to mitochondria in a translation-dependent manner. *Mol Cell Biol* **30**, 284-94.
- Eliyahu, E., Lesnik, C. und Arava, Y.** (2012). The protein chaperone Ssa1 affects mRNA localization to the mitochondria. *FEBS Lett* **586**, 64-9.

- Fialcowitz-White, E. J., Brewer, B. Y., Ballin, J. D., Willis, C. D., Toth, E. A. und Wilson, G. M.** (2007). Specific protein domains mediate cooperative assembly of HuR oligomers on AU-rich mRNA-destabilizing sequences. *J Biol Chem* **282**, 20948-59.
- Finley, D., Bartel, B. und Varshavsky, A.** (1989). The tails of ubiquitin precursors are ribosomal proteins whose fusion to ubiquitin facilitates ribosome biogenesis. *Nature* **338**, 394-401.
- Finley, D., Ulrich, H. D., Sommer, T. und Kaiser, P.** (2012). The ubiquitin-proteasome system of *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **192**, 319-60.
- Forrest, K. M. und Gavis, E. R.** (2003). Live imaging of endogenous RNA reveals a diffusion and entrapment mechanism for nanos mRNA localization in *Drosophila*. *Curr Biol* **13**, 1159-68.
- Franceschetti, M., Bueno, E., Wilson, R. A., Tucker, S. L., Gomez-Mena, C., Calder, G. und Sesma, A.** (2011). Fungal virulence and development is regulated by alternative pre-mRNA 3'end processing in *Magnaporthe oryzae*. *PLoS Pathog* **7**, e1002441.
- Freitag, J., Lanver, D., Bohmer, C., Schink, K. O., Bolker, M. und Sandrock, B.** (2011). Septation of infectious hyphae is critical for appressoria formation and virulence in the smut fungus *Ustilago maydis*. *PLoS Pathog* **7**, e1002044.
- Gadir, N., Haim-Vilmovsky, L., Kraut-Cohen, J. und Gerst, J. E.** (2011). Localization of mRNAs coding for mitochondrial proteins in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *RNA* **17**, 1551-65.
- Gao, F. B. und Keene, J. D.** (1996). Hel-N1/Hel-N2 proteins are bound to poly(A)⁺ mRNA in granular RNP structures and are implicated in neuronal differentiation. *J Cell Sci* **109** (Pt 3), 579-89.
- Gerber, A. P., Herschlag, D. und Brown, P. O.** (2004). Extensive association of functionally and cytotopically related mRNAs with Puf family RNA-binding proteins in yeast. *PLoS Biol* **2**, E79.
- Gillissen, B., Bergemann, J., Sandmann, C., Schröer, B., Bölker, M. und Kahmann, R.** (1992). A two-component regulatory system for self/non-self recognition in *Ustilago maydis*. *Cell* **68**, 647-657.
- Gish, W. und States, D. J.** (1993). Identification of protein coding regions by database similarity search. *Nat Genet* **3**, 266-72.
- Glisovic, T., Bachorik, J. L., Yong, J. und Dreyfuss, G.** (2008). RNA-binding proteins and post-transcriptional gene regulation. *FEBS Lett* **582**, 1977-86.
- Göhre, V., Vollmeister, E., Bölker, M. und Feldbrügge, M.** (2012). Microtubule-dependent membrane dynamics in *Ustilago maydis*: Trafficking and function of Rab5a-positive endosomes. *Commun Integr Biol* **5**, 485-90.

- Gonzalez, I., Buonomo, S. B., Nasmyth, K. und von Ahsen, U.** (1999). ASH1 mRNA localization in yeast involves multiple secondary structural elements and Ash1 protein translation. *Curr Biol* **9**, 337-40.
- Greenberg, J.** (1979). Ultraviolet light-induced crosslinking of mRNA to proteins. *Nucleic Acids Res* **6**, 715-32.
- Gu, W., Deng, Y., Zenklusen, D. und Singer, R. H.** (2004). A new yeast PUF family protein, Puf6p, represses ASH1 mRNA translation and is required for its localization. *Genes Dev* **18**, 1452-65.
- Hafner, M., Landthaler, M., Burger, L., Khorshid, M., Hausser, J., Berninger, P., Rothballer, A., Ascano, M., Jr., Jungkamp, A. C., Munschauer, M. et al.** (2010). Transcriptome-wide identification of RNA-binding protein and microRNA target sites by PAR-CLIP. *Cell* **141**, 129-41.
- Halbeisen, R. E., Galgano, A., Scherrer, T. und Gerber, A. P.** (2008). Post-transcriptional gene regulation: from genome-wide studies to principles. *Cell Mol Life Sci* **65**, 798-813.
- Halet, G.** (2005). Imaging phosphoinositide dynamics using GFP-tagged protein domains. *Biol Cell* **97**, 501-18.
- Hargous, Y., Hautbergue, G. M., Tintaru, A. M., Skrisovska, L., Golovanov, A. P., Stevenin, J., Lian, L. Y., Wilson, S. A. und Allain, F. H.** (2006). Molecular basis of RNA recognition and TAP binding by the SR proteins SRp20 and 9G8. *EMBO J* **25**, 5126-37.
- Hegde, A. N.** (2010). The ubiquitin-proteasome pathway and synaptic plasticity. *Learn Mem* **17**, 314-27.
- Hellman, L. M. und Fried, M. G.** (2007). Electrophoretic mobility shift assay (EMSA) for detecting protein-nucleic acid interactions. *Nat Protoc* **2**, 1849-61.
- Henne, W. M., Buchkovich, N. J. und Emr, S. D.** (2011). The ESCRT pathway. *Dev Cell* **21**, 77-91.
- Herpers, B. und Rabouille, C.** (2004). mRNA localization and ER-based protein sorting mechanisms dictate the use of transitional endoplasmic reticulum-golgi units involved in gurken transport in Drosophila oocytes. *Mol Biol Cell* **15**, 5306-17.
- Hervas-Aguilar, A., Rodriguez-Galan, O., Galindo, A., Abenza, J. F., Arst, H. N., Jr. und Penalva, M. A.** (2010). Characterization of *Aspergillus nidulans* DidB Did2, a non-essential component of the multivesicular body pathway. *Fungal Genet Biol* **47**, 636-46.
- Heym, R. G. und Niessing, D.** (2012). Principles of mRNA transport in yeast. *Cell Mol Life Sci* **69**, 1843-53.
- Hochstrasser, M.** (2009). Origin and function of ubiquitin-like proteins. *Nature* **458**, 422-9.
- Hockensmith, J. W., Kubasek, W. L., Vorachek, W. R. und von Hippel, P. H.** (1986). Laser cross-linking of nucleic acids to proteins. Methodology and first applications to the phage T4 DNA replication system. *J Biol Chem* **261**, 3512-8.

- Hoffman, C. S. und Winston, F.** (1987). A ten-minute DNA preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformation of *Escherichia coli*. *Gene* **57**, 267-72.
- Holliday, R.** (1974). *Ustilago maydis*. In *Handbook of Genetics*, (ed. R. C. King), pp. 575-95. New York: Plenum Press.
- Huh, W. K., Falvo, J. V., Gerke, L. C., Carroll, A. S., Howson, R. W., Weissman, J. S. und O'Shea, E. K.** (2003). Global analysis of protein localization in budding yeast. *Nature* **425**, 686-91.
- Hurley, J. H.** (2010). The ESCRT complexes. *Crit Rev Biochem Mol Biol* **45**, 463-87.
- Imig, J., Kanitz, A. und Gerber, A.** (2012). RNA regulons and the RNA-protein interaction network. *BioMolecular Concepts* **3**, 403-14.
- Irie, K., Tadauchi, T., Takizawa, P. A., Vale, R. D., Matsumoto, K. und Herskowitz, I.** (2002). The Khd1 protein, which has three KH RNA-binding motifs, is required for proper localization of ASH1 mRNA in yeast. *EMBO J* **21**, 1158-67.
- Irion, U. und St Johnston, D.** (2007). bicoid RNA localization requires specific binding of an endosomal sorting complex. *Nature* **445**, 554-8.
- Jambhekar, A. und Derisi, J. L.** (2007). Cis-acting determinants of asymmetric, cytoplasmic RNA transport. *RNA* **13**, 625-42.
- Jüschke, C., Ferring, D., Jansen, R. P. und Seedorf, M.** (2004). A novel transport pathway for a yeast plasma membrane protein encoded by a localized mRNA. *Curr Biol* **14**, 406-11.
- Kämper, J.** (2004). A PCR-based system for highly efficient generation of gene replacement mutants in *Ustilago maydis*. *Mol Genet Genomics* **271**, 103-10.
- Katzmann, D. J., Stefan, C. J., Babst, M. und Emr, S. D.** (2003). Vps27 recruits ESCRT machinery to endosomes during MVB sorting. *J Cell Biol* **162**, 413-23.
- Keene, J. D.** (2007). RNA regulons: coordination of post-transcriptional events. *Nat Rev Genet* **8**, 533-43.
- Kim, H. H., Abdelmohsen, K. und Gorospe, M.** (2010). Regulation of HuR by DNA Damage Response Kinases. *J Nucleic Acids* **2010**.
- Kishore, S., Jaskiewicz, L., Burger, L., Hausser, J., Khorshid, M. und Zavolan, M.** (2011). A quantitative analysis of CLIP methods for identifying binding sites of RNA-binding proteins. *Nat Methods* **8**, 559-64.
- Kislauskis, E. H., Zhu, X. und Singer, R. H.** (1994). Sequences responsible for intracellular localization of beta-actin messenger RNA also affect cell phenotype. *J Cell Biol* **127**, 441-51.
- Klose, J., de Sa, M. M. und Kronstad, J. W.** (2004). Lipid-induced filamentous growth in *Ustilago maydis*. *Mol Microbiol* **52**, 823-35.

- Koepke, J.:** Die Rolle des RNA-bindenden Proteins Rrm4 während des polaren Wachstums von *Ustilago maydis*; Dissertation, Philipps-Universität Marburg (2010)
- Koepke, J., Kaffarnik, F., Haag, C., Zarnack, K., Luscombe, N. M., König, J., Ule, J., Kellner, R., Begerow, D. und Feldbrugge, M.** (2011). The RNA-binding protein Rrm4 is essential for efficient secretion of endochitinase Cts1. *Mol Cell Proteomics* **10**, M111 011213.
- Komili, S., Farny, N. G., Roth, F. P. und Silver, P. A.** (2007). Functional specificity among ribosomal proteins regulates gene expression. *Cell* **131**, 557-71.
- Kondrashov, N., Pusic, A., Stumpf, C. R., Shimizu, K., Hsieh, A. C., Xue, S., Ishijima, J., Shiroishi, T. und Barna, M.** (2011). Ribosome-mediated specificity in Hox mRNA translation and vertebrate tissue patterning. *Cell* **145**, 383-97.
- Kong, J. und Lasko, P.** (2012). Translational control in cellular and developmental processes. *Nat Rev Genet* **13**, 383-94.
- König, J., Julius, C., Baumann, S., Homann, M., Goring, H. U. und Feldbrugge, M.** (2007). Combining SELEX and the yeast three-hybrid system for in vivo selection and classification of RNA aptamers. *RNA* **13**, 614-22.
- König, J.:** Die Identifikation von Ziel-Transkripten des RNA bindenden Proteins Rrm4 aus *Ustilago maydis*; Dissertation, Philipps-Universität Marburg (2008)
- König, J., Baumann, S., Koepke, J., Pohlmann, T., Zarnack, K. und Feldbrugge, M.** (2009). The fungal RNA-binding protein Rrm4 mediates long-distance transport of ubi1 and rho3 mRNAs. *EMBO J* **28**, 1855-66.
- König, J., Zarnack, K., Rot, G., Curk, T., Kayikci, M., Zupan, B., Turner, D. J., Luscombe, N. M. und Ule, J.** (2010). iCLIP reveals the function of hnRNP particles in splicing at individual nucleotide resolution. *Nat Struct Mol Biol* **17**, 909-15.
- König, J., Zarnack, K., Luscombe, N. M. und Ule, J.** (2011). Protein-RNA interactions: new genomic technologies and perspectives. *Nat Rev Genet* **13**, 77-83.
- Kozlov, G., Menade, M., Rosenauer, A., Nguyen, L. und Gehring, K.** (2010). Molecular determinants of PAM2 recognition by the MLE domain of poly(A)-binding protein. *J Mol Biol* **397**, 397-407.
- Kraakman, L. S., Griffioen, G., Zerp, S., Groeneveld, P., Thevelein, J. M., Mager, W. H. und Planta, R. J.** (1993). Growth-related expression of ribosomal protein genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Gen Genet* **239**, 196-204.
- Kruse, C., Jaedicke, A., Beaudouin, J., Bohl, F., Ferring, D., Guttler, T., Ellenberg, J. und Jansen, R. P.** (2002). Ribonucleoprotein-dependent localization of the yeast class V myosin Myo4p. *J Cell Biol* **159**, 971-82.
- 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.

- Laemmli, U. K.** (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-5.
- Langmead, B., Trapnell, C., Pop, M. und Salzberg, S. L.** (2009). Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome. *Genome Biol* **10**, R25.
- Lawrence, M., Gentleman, R. und Carey, V.** (2009). rtracklayer: an R package for interfacing with genome browsers. *Bioinformatics* **25**, 1841-2.
- Lawrence, M., Huber, W., Pages, H., Aboyoun, P., Carlson, M., Gentleman, R., Morgan, M. T. und Carey, V. J.** (2013). Software for computing and annotating genomic ranges. *PLoS Comput Biol* **9**, e1003118.
- Lebedeva, S., Jens, M., Theil, K., Schwanhauser, B., Selbach, M., Landthaler, M. und Rajewsky, N.** (2011). Transcriptome-wide analysis of regulatory interactions of the RNA-binding protein HuR. *Mol Cell* **43**, 340-52.
- Lebreton, A., Saveanu, C., Decourty, L., Rain, J. C., Jacquier, A. und Fromont-Racine, M.** (2006). A functional network involved in the recycling of nucleocytoplasmic pre-60S factors. *J Cell Biol* **173**, 349-60.
- Lecuyer, E., Yoshida, H., Parthasarathy, N., Alm, C., Babak, T., Cerovina, T., Hughes, T. R., Tomancak, P. und Krause, H. M.** (2007). Global analysis of mRNA localization reveals a prominent role in organizing cellular architecture and function. *Cell* **131**, 174-87.
- Lee, A. S., Burdeinick-Kerr, R. und Whelan, S. P.** (2013). A ribosome-specialized translation initiation pathway is required for cap-dependent translation of vesicular stomatitis virus mRNAs. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**, 324-9.
- Letunic, I., Doerks, T. und Bork, P.** (2012). SMART 7: recent updates to the protein domain annotation resource. *Nucleic Acids Res* **40**, D302-5.
- Lewis, R. A., Kress, T. L., Cote, C. A., Gautreau, D., Rokop, M. E. und Mowry, K. L.** (2004). Conserved and clustered RNA recognition sequences are a critical feature of signals directing RNA localization in *Xenopus* oocytes. *Mech Dev* **121**, 101-9.
- Licatalosi, D. D., Mele, A., Fak, J. J., Ule, J., Kayikci, M., Chi, S. W., Clark, T. A., Schweitzer, A. C., Blume, J. E., Wang, X. et al.** (2008). HITS-CLIP yields genome-wide insights into brain alternative RNA processing. *Nature* **456**, 464-9.
- Ling, S. C., Fahrner, P. S., Greenough, W. T. und Gelfand, V. I.** (2004). Transport of *Drosophila* fragile X mental retardation protein-containing ribonucleoprotein granules by kinesin-1 and cytoplasmic dynein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 17428-33.
- Lo, K. Y., Li, Z., Bussiere, C., Bresson, S., Marcotte, E. M. und Johnson, A. W.** (2010). Defining the pathway of cytoplasmic maturation of the 60S ribosomal subunit. *Mol Cell* **39**, 196-208.
- Lobert, V. H. und Stenmark, H.** (2012). The ESCRT machinery mediates polarization of fibroblasts through regulation of myosin light chain. *J Cell Sci* **125**, 29-36.

- Lohi, O. und Lehto, V. P.** (1998). VHS domain marks a group of proteins involved in endocytosis and vesicular trafficking. *FEBS Lett* **440**, 255-7.
- Lukong, K. E., Chang, K. W., Khandjian, E. W. und Richard, S.** (2008). RNA-binding proteins in human genetic disease. *Trends Genet* **24**, 416-25.
- Mackereth, C. D. und Sattler, M.** (2012). Dynamics in multi-domain protein recognition of RNA. *Curr Opin Struct Biol* **22**, 287-96.
- Mahlert, M., Leveleki, L., Hlubek, A., Sandrock, B. und Bolker, M.** (2006). Rac1 and Cdc42 regulate hyphal growth and cytokinesis in the dimorphic fungus *Ustilago maydis*. *Mol Microbiol* **59**, 567-78.
- Mansfield, K. D. und Keene, J. D.** (2009). The ribonome: a dominant force in co-ordinating gene expression. *Biol Cell* **101**, 169-81.
- Maris, C., Dominguez, C. und Allain, F. H.** (2005). The RNA recognition motif, a plastic RNA-binding platform to regulate post-transcriptional gene expression. *FEBS J* **272**, 2118-31.
- Martin, K. C. und Ephrussi, A.** (2009). mRNA localization: gene expression in the spatial dimension. *Cell* **136**, 719-30.
- Martin, T. F.** (1998). Phosphoinositide lipids as signaling molecules: common themes for signal transduction, cytoskeletal regulation, and membrane trafficking. *Annu Rev Cell Dev Biol* **14**, 231-64.
- McGinnis, S. und Madden, T. L.** (2004). BLAST: at the core of a powerful and diverse set of sequence analysis tools. *Nucleic Acids Res* **32**, W20-5.
- McMurray, M. A., Stefan, C. J., Wemmer, M., Odorizzi, G., Emr, S. D. und Thorner, J.** (2011). Genetic interactions with mutations affecting septin assembly reveal ESCRT functions in budding yeast cytokinesis. *Biol Chem* **392**, 699-712.
- Medioni, C., Mowry, K. und Besse, F.** (2012). Principles and roles of mRNA localization in animal development. *Development* **139**, 3263-76.
- Mendoza-Mendoza, A., Berndt, P., Djamei, A., Weise, C., Linne, U., Marahiel, M., Vranes, M., Kamper, J. und Kahmann, R.** (2009). Physical-chemical plant-derived signals induce differentiation in *Ustilago maydis*. *Mol Microbiol* **71**, 895-911.
- Michell, R. H.** (2008). Inositol derivatives: evolution and functions. *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**, 151-61.
- Morgan, M., Anders, S., Lawrence, M., Aboyoun, P., Pages, H. und Gentleman, R.** (2009). ShortRead: a bioconductor package for input, quality assessment and exploration of high-throughput sequence data. *Bioinformatics* **25**, 2607-8.
- Mukherjee, N., Corcoran, D. L., Nusbaum, J. D., Reid, D. W., Georgiev, S., Hafner, M., Ascano, M., Jr., Tuschl, T., Ohler, U. und Keene, J. D.** (2011). Integrative regulatory mapping indicates that the RNA-binding protein HuR couples pre-mRNA processing and mRNA stability. *Mol Cell* **43**, 327-39.

- Müller-McNicoll, M. und Neugebauer, K. M.** (2013). How cells get the message: dynamic assembly and function of mRNA-protein complexes. *Nat Rev Genet* **14**, 275-87.
- Müller, M., Heym, R. G., Mayer, A., Kramer, K., Schmid, M., Cramer, P., Urlaub, H., Jansen, R. P. und Niessing, D.** (2011). A cytoplasmic complex mediates specific mRNA recognition and localization in yeast. *PLoS Biol* **9**, e1000611.
- Nethe, M. und Hordijk, P. L.** (2010). The role of ubiquitylation and degradation in RhoGTPase signalling. *J Cell Sci* **123**, 4011-8.
- Nickerson, D. P., West, M. und Odorizzi, G.** (2006). Did2 coordinates Vps4-mediated dissociation of ESCRT-III from endosomes. *J Cell Biol* **175**, 715-20.
- Nickerson, D. P., West, M., Henry, R. und Odorizzi, G.** (2010). Regulators of Vps4 ATPase activity at endosomes differentially influence the size and rate of formation of intraluminal vesicles. *Mol Biol Cell* **21**, 1023-32.
- Nicol, J. W., Helt, G. A., Blanchard, S. G., Jr., Raja, A. und Loraine, A. E.** (2009). The Integrated Genome Browser: free software for distribution and exploration of genome-scale datasets. *Bioinformatics* **25**, 2730-1.
- Oh, Y. und Bi, E.** (2011). Septin structure and function in yeast and beyond. *Trends Cell Biol* **21**, 141-8.
- Pages, H., Aboyoun, P., Gentleman, R., DebRoy, S. und Alignments, P. R. S. P. S.** (2009). String objects representing biological sequences, and matching algorithms. *R package version 2*.
- Pan, F., Malmberg, R. L. und Momany, M.** (2007). Analysis of septins across kingdoms reveals orthology and new motifs. *BMC Evol Biol* **7**, 103.
- Panse, V. G. und Johnson, A. W.** (2010). Maturation of eukaryotic ribosomes: acquisition of functionality. *Trends Biochem Sci* **35**, 260-6.
- Perez, P. und Rincon, S. A.** (2010). Rho GTPases: regulation of cell polarity and growth in yeasts. *Biochem J* **426**, 243-53.
- Pham, C. D., Yu, Z., Sandrock, B., Bolker, M., Gold, S. E. und Perlin, M. H.** (2009). *Ustilago maydis* Rho1 and 14-3-3 homologues participate in pathways controlling cell separation and cell polarity. *Eukaryot Cell* **8**, 977-89.
- Piper, R. C. und Lehner, P. J.** (2011). Endosomal transport via ubiquitination. *Trends Cell Biol* **21**, 647-55.
- Rigaut, G., Shevchenko, A., Rutz, B., Wilm, M., Mann, M. und Seraphin, B.** (1999). A generic protein purification method for protein complex characterization and proteome exploration. *Nat Biotechnol* **17**, 1030-2.
- Roth, M. G.** (2004). Phosphoinositides in constitutive membrane traffic. *Physiol Rev* **84**, 699-730.

- Rougemaille, M., Villa, T., Gudipati, R. K. und Libri, D.** (2008). mRNA journey to the cytoplasm: attire required. *Biol Cell* **100**, 327-42.
- Ruepp, A., Zollner, A., Maier, D., Albermann, K., Hani, J., Mokrejs, M., Tetko, I., Guldener, U., Mannhaupt, G., Munsterkotter, M. et al.** (2004). The FunCat, a functional annotation scheme for systematic classification of proteins from whole genomes. *Nucleic Acids Res* **32**, 5539-45.
- Rusten, T. E., Vaccari, T. und Stenmark, H.** (2012). Shaping development with ESCRTs. *Nat Cell Biol* **14**, 38-45.
- Saarikangas, J., Zhao, H. und Lappalainen, P.** (2010). Regulation of the actin cytoskeleton-plasma membrane interplay by phosphoinositides. *Physiol Rev* **90**, 259-89.
- Sambrook, J., Maniatis, T. und Fritsch, E. F.** (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2nd edition).
- Sarkar, D. und Andrews, F.** latticeExtra: extra graphical utilities based on lattice.
- Sarkar, D.** (2008). *Lattice: Multivariate Data Visualization with R*. New York: Springer.
- Saveanu, C., Namane, A., Gleizes, P. E., Lebreton, A., Rousselle, J. C., Noillac-Depeyre, J., Gas, N., Jacquier, A. und Fromont-Racine, M.** (2003). Sequential protein association with nascent 60S ribosomal particles. *Mol Cell Biol* **23**, 4449-60.
- Scherrer, T., Mittal, N., Janga, S. C. und Gerber, A. P.** (2010). A screen for RNA-binding proteins in yeast indicates dual functions for many enzymes. *PLoS One* **5**, e15499.
- Schirawski, J., Mannhaupt, G., Munch, K., Brefort, T., Schipper, K., Doehlemann, G., Di Stasio, M., Rossel, N., Mendoza-Mendoza, A., Pester, D. et al.** (2010). Pathogenicity determinants in smut fungi revealed by genome comparison. *Science* **330**, 1546-8.
- Schultz, J., Milpetz, F., Bork, P. und Ponting, C. P.** (1998). SMART, a simple modular architecture research tool: identification of signaling domains. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 5857-64.
- Schulz, B., Banuett, F., Dahl, M., Schlesinger, R., Schafer, W., Martin, T., Herskowitz, I. und Kahmann, R.** (1990). The b alleles of *U. maydis*, whose combinations program pathogenic development, code for polypeptides containing a homeodomain-related motif. *Cell* **60**, 295-306.
- Schwanhausser, B., Busse, D., Li, N., Dittmar, G., Schuchhardt, J., Wolf, J., Chen, W. und Selbach, M.** (2011). Global quantification of mammalian gene expression control. *Nature* **473**, 337-42.
- Schwarz, L. A. und Patrick, G. N.** (2012). Ubiquitin-dependent endocytosis, trafficking and turnover of neuronal membrane proteins. *Mol Cell Neurosci* **49**, 387-93.
- Semotok, J. L., Cooperstock, R. L., Pinder, B. D., Vari, H. K., Lipshitz, H. D. und Smibert, C. A.** (2005). Smaug recruits the CCR4/POP2/NOT deadenylase complex to trigger maternal transcript localization in the early *Drosophila* embryo. *Curr Biol* **15**, 284-94.

- SenGupta, D. J., Zhang, B., Kraemer, B., Pochart, P., Fields, S. und Wickens, M.** (1996). A three-hybrid system to detect RNA-protein interactions in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 8496-501.
- Sengupta, D. J., Wickens, M. und Fields, S.** (1999). Identification of RNAs that bind to a specific protein using the yeast three-hybrid system. *RNA* **5**, 596-601.
- Shepard, K. A., Gerber, A. P., Jambhekar, A., Takizawa, P. A., Brown, P. O., Herschlag, D., DeRisi, J. L. und Vale, R. D.** (2003). Widespread cytoplasmic mRNA transport in yeast: identification of 22 bud-localized transcripts using DNA microarray analysis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 11429-34.
- Shivas, J. M., Morrison, H. A., Bilder, D. und Skop, A. R.** (2010). Polarity and endocytosis: reciprocal regulation. *Trends Cell Biol* **20**, 445-52.
- Simmonds, A. J., dosSantos, G., Livne-Bar, I. und Krause, H. M.** (2001). Apical localization of wingless transcripts is required for wingless signaling. *Cell* **105**, 197-207.
- Simone, L. E. und Keene, J. D.** (2013). Mechanisms coordinating ELAV/Hu mRNA regulons. *Curr Opin Genet Dev* **23**, 35-43.
- Soller, M. und White, K.** (2005). ELAV multimerizes on conserved AU4-6 motifs important for ewg splicing regulation. *Mol Cell Biol* **25**, 7580-91.
- Southern, E. M.** (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* **98**, 503-17.
- St Johnston, D.** (2005). Moving messages: the intracellular localization of mRNAs. *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**, 363-75.
- Steinberg, G., Schliwa, M., Lehmler, C., Bolker, M., Kahmann, R. und McIntosh, J. R.** (1998). Kinesin from the plant pathogenic fungus *Ustilago maydis* is involved in vacuole formation and cytoplasmic migration. *J Cell Sci* **111 (Pt 15)**, 2235-46.
- Steinberg, G. und Perez-Martin, J.** (2008). *Ustilago maydis*, a new fungal model system for cell biology. *Trends Cell Biol* **18**, 61-7.
- Stenmark, H., Aasland, R. und Driscoll, P. C.** (2002). The phosphatidylinositol 3-phosphate-binding FYVE finger. *FEBS Lett* **513**, 77-84.
- Stewart, A. und Deacon, J. W.** (1995). Vital fluorochromes as tracers for fungal growth studies. *Biotech Histochem* **70**, 57-65.
- Steyaert, J.** (1997). A Decade of Protein Engineering on Ribonuclease T1— Atomic Dissection of the Enzyme-Substrate Interactions. *European Journal of Biochemistry* **247**, 1-11.
- Stock, J., Sarkari, P., Kreibich, S., Brefort, T., Feldbrügge, M. und Schipper, K.** (2012). Applying unconventional secretion of the endochitinase Cts1 to export heterologous proteins in *Ustilago maydis*. *J Biotechnol* **161**, 80-91.

- Sugimoto, Y., Konig, J., Hussain, S., Zupan, B., Curk, T., Frye, M. und Ule, J.** (2012). Analysis of CLIP and iCLIP methods for nucleotide-resolution studies of protein-RNA interactions. *Genome Biol* **13**, R67.
- Tadros, W., Goldman, A. L., Babak, T., Menzies, F., Vardy, L., Orr-Weaver, T., Hughes, T. R., Westwood, J. T., Smibert, C. A. und Lipshitz, H. D.** (2007). SMAUG is a major regulator of maternal mRNA destabilization in Drosophila and its translation is activated by the PAN GU kinase. *Dev Cell* **12**, 143-55.
- Tenenbaum, S. A., Carson, C. C., Lager, P. J. und Keene, J. D.** (2000). Identifying mRNA subsets in messenger ribonucleoprotein complexes by using cDNA arrays. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**, 14085-90.
- Thompson, B. J.** (2013). Cell polarity: models and mechanisms from yeast, worms and flies. *Development* **140**, 13-21.
- Toba, G. und White, K.** (2008). The third RNA recognition motif of Drosophila ELAV protein has a role in multimerization. *Nucleic Acids Res* **36**, 1390-9.
- Tollervey, J. R., Curk, T., Rogelj, B., Briese, M., Cereda, M., Kayikci, M., Konig, J., Hortobagyi, T., Nishimura, A. L., Zupunski, V. et al.** (2011). Characterizing the RNA targets and position-dependent splicing regulation by TDP-43. *Nat Neurosci* **14**, 452-8.
- Tsvetanova, N. G., Klass, D. M., Salzman, J. und Brown, P. O.** (2010). Proteome-wide search reveals unexpected RNA-binding proteins in Saccharomyces cerevisiae. *PLoS One* **5**.
- Ule, J., Jensen, K. B., Ruggiu, M., Mele, A., Ule, A. und Darnell, R. B.** (2003). CLIP identifies Nova-regulated RNA networks in the brain. *Science* **302**, 1212-5.
- Ule, J., Jensen, K., Mele, A. und Darnell, R. B.** (2005). CLIP: a method for identifying protein-RNA interaction sites in living cells. *Methods* **37**, 376-86.
- Valverde, R., Edwards, L. und Regan, L.** (2008). Structure and function of KH domains. *FEBS J* **275**, 2712-26.
- Vida, T. A. und Emr, S. D.** (1995). A new vital stain for visualizing vacuolar membrane dynamics and endocytosis in yeast. *J Cell Biol* **128**, 779-92.
- Vollmeister, E., Haag, C., Zarnack, K., Baumann, S., Konig, J., Mannhaupt, G. und Feldbrugge, M.** (2009). Tandem KH domains of Khd4 recognize AUACCC and are essential for regulation of morphology as well as pathogenicity in Ustilago maydis. *RNA* **15**, 2206-18.
- Vollmeister, E. und Feldbrügge, M.** (2010). Posttranscriptional control of growth and development in Ustilago maydis. *Curr Opin Microbiol* **13**, 693-9.
- Vollmeister, E., Schipper, K., Baumann, S., Haag, C., Pohlmann, T., Stock, J. und Feldbrugge, M.** (2012a). Fungal development of the plant pathogen Ustilago maydis. *FEMS Microbiol Rev* **36**, 59-77.
- Vollmeister, E., Schipper, K. und Feldbrugge, M.** (2012b). Microtubule-dependent mRNA transport in the model microorganism Ustilago maydis. *RNA Biol* **9**, 261-8.

- Walter, P. und Blobel, G.** (1981a). Translocation of proteins across the endoplasmic reticulum III. Signal recognition protein (SRP) causes signal sequence-dependent and site-specific arrest of chain elongation that is released by microsomal membranes. *J Cell Biol* **91**, 557-61.
- Walter, P. und Blobel, G.** (1981b). Translocation of proteins across the endoplasmic reticulum. II. Signal recognition protein (SRP) mediates the selective binding to microsomal membranes of in-vitro-assembled polysomes synthesizing secretory protein. *J Cell Biol* **91**, 551-6.
- Wang, Z., Gerstein, M. und Snyder, M.** (2009). RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nat Rev Genet* **10**, 57-63.
- Wang, Z., Kayikci, M., Briese, M., Zarnack, K., Luscombe, N. M., Rot, G., Zupan, B., Curk, T. und Ule, J.** (2010). iCLIP predicts the dual splicing effects of TIA-RNA interactions. *PLoS Biol* **8**, e1000530.
- Warner, J. R. und McIntosh, K. B.** (2009). How common are extraribosomal functions of ribosomal proteins? *Mol Cell* **34**, 3-11.
- Warnes, G. R., Bolker, B., Bonebakker, L., Gentleman, R., Huber, W., Liaw, A., Lumley, T., Maechler, M., Magnusson, A. und Moeller, S.** (2011). gplots: Various R programming tools for plotting data. *R package version 2*.
- Weiner, M. P., Costa, G. L., Schoettlin, W., Cline, J., Mathur, E. und Bauer, J. C.** (1994). Site-directed mutagenesis of double-stranded \DNA\ by the polymerase chain reaction *Gene* **151**, 119 - 123.
- White, R., Gonsior, C., Kramer-Albers, E. M., Stohr, N., Huttelmaier, S. und Trotter, J.** (2008). Activation of oligodendroglial Fyn kinase enhances translation of mRNAs transported in hnRNP A2-dependent RNA granules. *J Cell Biol* **181**, 579-86.
- White, R., Gonsior, C., Bauer, N. M., Kramer-Albers, E. M., Luhmann, H. J. und Trotter, J.** (2012). Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein (hnRNP) F is a novel component of oligodendroglial RNA transport granules contributing to regulation of myelin basic protein (MBP) synthesis. *J Biol Chem* **287**, 1742-54.
- Wollert, T., Wunder, C., Lippincott-Schwartz, J. und Hurley, J. H.** (2009). Membrane scission by the ESCRT-III complex. *Nature* **458**, 172-7.
- Yeo, G. W., Coufal, N. G., Liang, T. Y., Peng, G. E., Fu, X. D. und Gage, F. H.** (2009). An RNA code for the FOX2 splicing regulator revealed by mapping RNA-protein interactions in stem cells. *Nat Struct Mol Biol* **16**, 130-7.
- Zhao, C., Waalwijk, C., de Wit, P. J., Tang, D. und van der Lee, T.** (2013). RNA-Seq analysis reveals new gene models and alternative splicing in the fungal pathogen *Fusarium graminearum*. *BMC Genomics* **14**, 21.
- Zimyanin, V. L., Belaya, K., Pecreaux, J., Gilchrist, M. J., Clark, A., Davis, I. und St Johnston, D.** (2008). In vivo imaging of oskar mRNA transport reveals the mechanism of posterior localization. *Cell* **134**, 843-53.

Zipor, G., Haim-Vilmovsky, L., Gelin-Licht, R., Gadir, N., Brocard, C. und Gerst, J. E. (2009). Localization of mRNAs coding for peroxisomal proteins in the yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 19848-53.

Ziv, I., Matiuhin, Y., Kirkpatrick, D. S., Erpapazoglou, Z., Leon, S., Pantazopoulou, M., Kim, W., Gygi, S. P., Haguenuer-Tsapis, R., Reis, N. et al. (2011). A perturbed ubiquitin landscape distinguishes between ubiquitin in trafficking and in proteolysis. *Mol Cell Proteomics* **10**, M111 009753.

Zuker, M. (2003). Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Res* **31**, 3406-15.

6. Ergänzende Daten

Auf dem dieser Arbeit beigelegten Datenträger befinden sich:

1. Auswertung der HITS-CLIP- und iCLIP-Analysen
2. Datensätze der HITS-CLIP und iCLIP-Experimente (*.bed*-Dateien):
 - HITS-CLIP (CLIP-Tags)
 - iCLIP (Quervernetzungsstellen, Cluster, reproduzierbare Cluster)
3. Skripte der bioinformatischen Auswertung

HITS-CLIP	01 Identifizierung HITS-CLIP Ziel-mRNAs	(K. Zarnack)
	02 Filtern der Ziel-mRNAs nach Anzahl der CLIP-Tags	
iCLIP	03 Identifizierung reproduzierbarer Cluster	(K. Zarnack)
	04 Analyse Bindestellen	(K. Zarnack)
	05 Identifizierung Bindemotiv	(K. Zarnack)
	06 Abgleich Cluster mit Bindemotiven	
	07 Identifizierung gemeinsam identifizierter mRNAs	
	08 Analyse CLIP-Tags/Cluster Introns	

4. Filme (korrespondierend zu den abgebildeten Kymographen)

7. Anhang

7.1 Identifizierung von rRNA innerhalb der HITS-CLIP- und iCLIP-Daten

Der Abgleich der HITS-CLIP und iCLIP-Daten mit dem *U. maydis* Genom zeigte, dass auf Chromosom 4 des Genoms drei Gene in unmittelbarer Nachbarschaft zueinander (*um05243*, *um06265*, *um06266*) aufgrund der großen Anzahl an CLIP-Tags und Quervernetzungsereignissen vergleichsweise stark gebunden zu sein schienen (Abb. 26 und Tab. 15). In allen drei Fällen lagen potentielle Bindestellen innerhalb der UTRs der vorhergesagten mRNAs (Abb. 26 B).

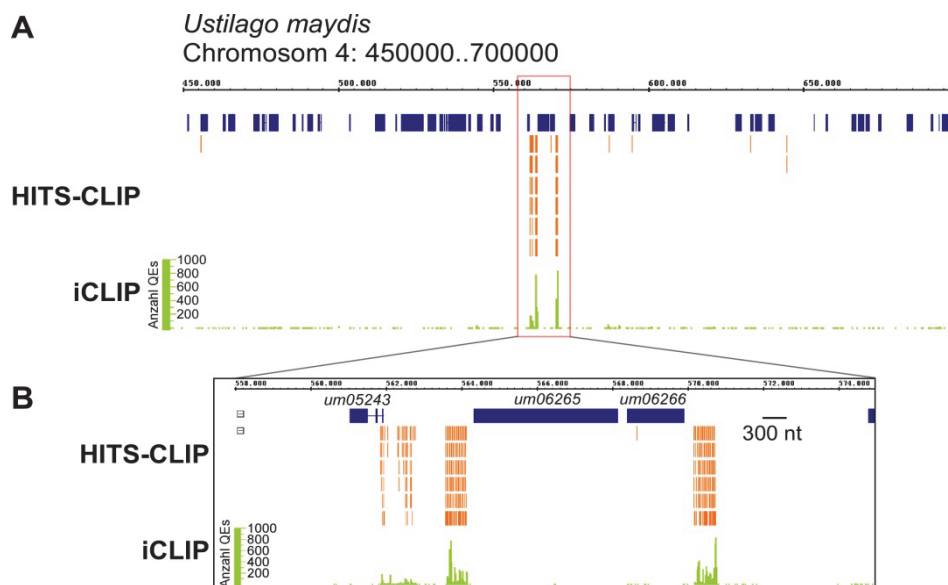


Abbildung 26: Identifizierung der *um05243*, *um06265* und *um06266* mRNAs durch die HITS-CLIP und iCLIP-Analyse

(A) Graphische Darstellung der Verteilung von CLIP-Tags, Quervernetzungsstellen und Quervernetzungsereignissen innerhalb des Genoms. Abgebildet ist der Minusstrang eines Ausschnitts aus Chromosom 4. Exons sind als blaue Balken und Introns als dünne Linien dargestellt. Die in der HITS-CLIP Analyse identifizierten CLIP-Tags sind als orangefarbene Kästchen abgebildet. QEs und QS der iCLIP-Analyse sind als Liniendiagramm aufgeführt. Die Y-Achse gibt die Anzahl an QEs pro QS wieder. Die rote Box umrahmt den in (B) dargestellten Bereich. (B) Detaillierte Darstellung der drei Gene *um05243*, *um06265* und *um06266*.

Tabelle 15: Zusammenfassende Übersicht über die Identifizierung der *um05243*, *um06265* und *um06266* mRNAs als potentielle Ziel-mRNAs von Rrm4

Gen	Anzahl an CLIP-Tags ¹	Anzahl an QEs ²	Anzahl an Quervernetzungsstellen ²	Anzahl an reproduzierbaren Clustern ^{2,3}
<i>um05243</i>	27	1005	63	1
<i>um06265</i>	46	1843	80	2
<i>um06266</i>	23	232	30	2

¹ Vereinigte CLIP-Tags beider Experimente

² Vereinigter Datensatz aller fünf iCLIP-Experimente (vgl. Ergänzende Daten)

³ In mindestens zwei Replikaten identifiziert und mindestens fünf QEs pro Cluster

Da diese drei Gene für unbekannte Proteine kodieren, wurden deren genomische Sequenzen mittels BLAST-Analysen auf Homologien zu bekannten Genen in anderen Organismen untersucht. (BLAST; <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>; Gish und States, 1993 ; McGinnis und Madden, 2004). Diese BLAST-Analysen ergaben, dass die durch die beiden CLIP-Ansätze identifizierten Sequenzbereiche identisch zu Sequenzen ribosomaler RNA anderer Basidiomyzeten waren. Im Falle der *um05243* mRNA korrespondierte der gefundene Sequenzbereich zur 28S rRNA, während die den in *um06265* und *um06266* mRNAs identifizierten Regionen nahezu identisch mit 18S rRNA waren (Tab. 16, Abb. 27). Diesbezüglich korrespondierten Teile der genomischen Sequenz des *U. maydis* Gens der rRNA der kleinen ribosomalen Untereinheit (European Nucleotide Archive, X62396; De Wachter *et al.*, 1992) den beiden identifizierten Sequenzbereichen der *um06265* bzw. *um06266* mRNA. Der Abgleich mit der Genomsequenz des mit *U. maydis* nahe verwandten Brandpilzes *Sporisorium reilianum* bestätigte, dass die innerhalb der *um05243*, *um06265* und *um06266* mRNAs gefundenen Regionen identisch zu Sequenzabschnitten der für die 28S und 18S rRNA-kodierenden Gene *rrna1* und *rrna2* waren (Abb. 27; MRSDB: MIPS *Sporisorium reilianum* Data Base, <http://mips.helmholtz-muenchen.de/genre/proj/sporisorium/>; Schirawski *et al.*, 2010).

Tabelle 16: Resultat der BLAST-Analysen für die potentiell gebundenen Regionen innerhalb der *um05243*, *um06265* und *um06266* mRNAs

	Organismus	Ortholog	Abdeckung ¹	Identität ²	E-Wert ³
<i>um05243</i> (924 bp) ⁴	<i>Rhodotorula glutinis</i>	28S rRNA	91%	90%	0
	<i>Antodia vaillanti</i>	28S rRNA	81%	92%	0
	<i>Donkioporia expansa</i>	28S rRNA	81%	92%	0
<i>um06265</i> (586 bp) ⁴	<i>Ustilago esculenta</i>	18S rRNA	83%	100%	0
	<i>Sporisorium reilianum</i>	18S rRNA	83%	99%	0
	<i>Pseudozyma flocculosa</i>	18S rRNA	83%	99%	0
<i>um06266</i> (590 bp) ⁴	<i>Ustilago esculenta</i>	18S rRNA	84%	100%	0
	<i>Sporisorium reilianum</i>	18S rRNA	84%	100%	0
	<i>Pseudozyma flocculosa</i>	18S rRNA	80%	100%	0

¹ Anteil der analysierten Sequenz, welcher in der orthologen Sequenz gefunden wurde

² Anteil der identischen Nukleotide

³ Erwartungswert

⁴ Länge der in dieser Arbeit identifizierten Sequenzbereiche

Sporisorium reilianum
Chromosom 10: 344541..355341

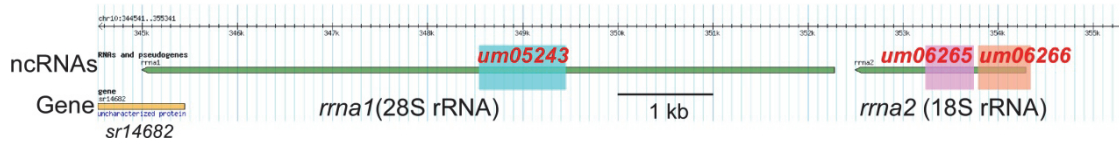


Abbildung 27: Die identifizierten Sequenzbereiche innerhalb der *um05243*, *um06265* und *um06266* mRNAs sind identisch zu Abschnitten der *S. reilianum* rRNA-Gene *rna1* und *rna2*

Graphische Darstellung der für rRNA-kodierenden Gene *rna1* und *rna2* im Genom von *S. reilianum*. Beide Gene liegen in Chromosom 10 auf dem komplementären Strang. Die farbigen Boxen innerhalb der beiden Gene markieren die zu den Bindestellen homologen Bereiche innerhalb von *rna1* und *rna2* (MRSDB; MIPS *Sporisorium reilianum* Data Base; <http://mips.helmholtz-muenchen.de/genre/proj/sporisorium/>).

Zusammenfassend zeigten diese Ergebnisse, dass es sich bei diesen drei Sequenzbereichen sehr wahrscheinlich um rRNA handelt. Aufgrund dessen wurden die drei Gene in den weiteren Analysen Protein-kodierender Gene nicht berücksichtigt. Stattdessen wurden die insgesamt 96 CLIP-Tags und fünf reproduzierbare Cluster den „sonstigen Regionen“ zugeordnet (siehe Ergebnisse.2.1 und 2.4).

Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Michael Feldbrügge für die exzellente Betreuung dieser Doktorarbeit bedanken. Exzellent!

Des Weiteren bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. Heiner Schaal für die Übernahme des Zweitgutachtens sowie der Betreuung meiner Arbeit im Rahmen der MOI-Graduiertenschule.

Der Jürgen Manchot Stiftung bin ich für die Finanzierung der „Molecules of Infection“-Graduiertenschule sehr dankbar. Zudem möchte ich mich insbesondere bei Frau Dr. Inge Krümpelbeck für die Koordination und Organisation der Graduiertenschule bedanken.

Zu großem Dank bin ich Kathi und Julian verpflichtet, ohne deren Hilfe diese Dissertation wahrscheinlich nie gedruckt worden wäre. Kathi bin ich dankbar für ihren bioinformatischen Beistand und ihre(n) Bioinformatikcrashkurs(e), während Julians Hilfe als iCLIP-Urvater zur Durchführung der iCLIP-Experimente beigetragen hat. Beiden möchte ich zudem auch für ihre Gastfreundschaft danken, die ich bei meinen Trips nach Cambridge, UK in Anspruch nehmen konnte.

Ebenso möchte ich Simone für exzellente technische Assistenz und die sympathische Arbeitsatmosphäre danken. Thomas danke ich für die zum Teil sehr heitere Stimmung im Labor und Büro während der letzten Jahre (sechs wenn man es genau nimmt. Oder sind es jetzt doch schon sieben Jahre?). Vielen Dank für die angenehme Zeit und produktive Zusammenarbeit! Zudem möchte ich mich bei Evelyn, Kerstin und Lilli bedanken, die sich die Zeit genommen hatten meine Arbeit Korrektur zu lesen. Zusätzlich möchte ich mich auch bei den übrigen Mitgliedern (aktuell und ehemalgig) des StaR bzw. RAB-Labs (Janine, Petra, Sebastian, Ute, Thorsten, Sabrina, Katie & Co.), dem restlichen Institut für Mikrobiologie an der HHU und Elmar für die tolle Zusammenarbeit und angenehme Stimmung im Labor, Büro, Arbeitsgruppe und Institut bedanken.

Ein besonderer Dank gilt meinen Eltern, meinen Geschwistern und meinem Großvater.

Last but not least, bedanke ich mich insbesondere bei meiner kleinen Familie, Judith und Carlotta, die mich in schwierigen Zeiten unterstützt hat und mich seit vier Monaten durchgehend auf Trab hält.

Lebenslauf

Persönliche Angaben

Carl Haag
geboren am 10.05.1983
in Hamburg

Schulische und universitäre Ausbildung

1993-1996	Christian-Wirth-Schule, Usingen
1996-1997	Jane Lathrop Stanford Middle School, Palo Alto, CA (USA)
1997-1999	Henry M. Gunn High School, Palo Alto, CA (USA)
1999-2002	Werner-Heisenberg-Gymnasium, Bad Dürkheim Allgemeine Hochschulreife
10/2003-09/2008	Philipps-Universität, Marburg Studium <i>Fach:</i> Biologie, <i>Abschluss:</i> Diplom <i>Titel der Diplomarbeit:</i> Die funktionelle Charakterisierung des RNA-bindenden Proteins Khd4 in <i>Ustilago maydis</i>
11/2008 – 02/2009	BASF SE, Limburgerhof Praktikum
04/2009-heute	Promotionsstudium <i>Thema:</i> Transkriptomweite Einblicke in den Rrm4-vermittelten mRNA-Transport in <i>Ustilago maydis</i>
04/2009-09/2009	Beginn der Promotion an der Philipps-Universität in der Abteilung Organismische Interaktionen am Max-Planck-Institut für terrestrische Mikrobiologie, Marburg
10/2009-heute	Umzug nach Düsseldorf und Fortsetzung der Promotion am Institut für Mikrobiologie der Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf

Stipendien

10/2009-03/2013	Stipendiat der Manhot Graduiertenschule „Molecules of Infection“
-----------------	--