

# **Analyse von Septinen während des hyphalen Wachstums in *Ustilago maydis***

Inaugural-Dissertation

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

vorgelegt von

**Sabrina Zander**

aus Düsseldorf

Düsseldorf, Juli 2016

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: 29.09.2016

## 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**

---

**Sabrina Zander**

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht in:

**S. Zander\***, S. Baumann\*, S. Weidtkamp-Peters and M. Feldbrügge (2016) Endosomal assembly and transport of heteromeric septin complexes promote septin cytoskeleton formation. *J. Cell Sci.* 129, 2778-2792

S. Baumann\*, **S. Zander\***, S. Weidtkamp-Peters and M. Feldbrügge (2016) Live cell imaging of septin dynamics in *Ustilago maydis*. *Methods in Cell Biol.* Septins, ed. Amy Gladfelter, Elsevier, 136, 143-159

\* geteilte Erstautorenschaft

Die Untersuchungen zur vorliegenden Arbeit wurden von Oktober 2012 bis Mai 2016 in Düsseldorf an der Heinrich-Heine-Universität in dem Institut für Mikrobiologie unter der Betreuung von Herrn Prof. Dr. Michael Feldbrügge durchgeführt.

## Zusammenfassung

Septine gehören zu der Klasse der GTP-bindenden Proteine und sind unter anderem an Zellpolarität, Membranumbau, Zytokinese und Zellmorphologie beteiligt. Konserviert in allen Eukaryoten außer höheren Pflanzen, bilden Septine nicht-polare, heteromere Komplexe aus. Diese können an ihren Enden assemblieren und so Filamente und eine Vielzahl anderer komplexerer Strukturen ausbilden. Diese heterooligomeren Strukturen und deren subzelluläre Lokalisation sind bereits intensiv untersucht worden. Der genaue Mechanismus, welcher der Assemblierung und des Transports von Septinen zugrunde liegt, ist jedoch nicht bekannt.

Das Genom des filamentösen Pilzes *U. maydis* kodiert für die folgenden vier Septine: Cdc3, Cdc10, Cdc11 und Cdc12. In dieser Arbeit wurde in Deletionsstudien der Einfluss des Verlusts der Septine während des hyphalen Wachstums in *U. maydis* getestet. Es konnte gezeigt werden, dass alle vier Septine für ein effizientes unipolares Wachstum benötigt werden und eine gemeinsame Funktion während des hyphalen Wachstums ausüben. Weiterhin wurde die subzelluläre Lokalisation aller Septine mit Gfp-Fusionen untersucht. Alle vier Septine konnten in zytoplasmatischen Ringen, am Septum, in Filamenten und auf sich bewegenden, frühen Endosomen gefunden werden. Kolokalisationsstudien verifizierten, dass alle Septine abhängig voneinander in denselben Strukturen vorkamen. Des Weiteren zeigten FRET-Analysen, dass Cdc3 und Cdc12 *in vivo* direkt miteinander interagieren. Die endosomale Lokalisation der Septine war nicht nur abhängig von jedem individuellen Septin, sondern auch von dem RNA-bindenden Protein Rrm4. RNA-Lebendzell-Experimente aller Septin-mRNAs zeigten, dass diese ebenfalls Rrm4-abhängig auf den Endosomen transportiert werden. FRAP-Experimente verdeutlichten weiterhin, dass die Rückgewinnung der Fluoreszenz von Cdc3-mCherryN und Cdc12-GfpN an denselben subzellulären Stellen stattfand und diese Rückgewinnung durch den endosomalen RNA-Transport gefördert wurde. Daher wurde ein Modell postuliert, in welchem eine lokale Translation die Assemblierung von neu synthetisierten Septinen in heteromere Strukturen auf den Endosomen unterstützt. Dies ist wichtig für den Langstreckentransport der Septine und für eine effiziente Bildung des Septin-Zytoskeletts.

### Summary

Septins are GTP-binding cytoskeletal proteins with functions in cell polarity, membrane remodelling, cytokinesis and cell morphology. Conserved across eukaryotes, except higher-order plants, septins assemble in nonpolar, heteromeric complexes. These further assemble end-to-end to form filaments and a variety of higher-order structures. The heterooligomeric structure of septins and their subcellular localisation have already been extensively studied. However, a precise mechanism of their subcellular assembly and their intracellular transport are unknown.

The genome of the filamentous fungus *U. maydis* encodes four septin proteins: Cdc3, Cdc10, Cdc11 and Cdc12. In this study the influence of septin deletions were analysed, during the hyphal state of *U. maydis*. All four septins are needed for efficient unipolar growth indicating a common function for septins during hyphal growth. Furthermore, the subcellular localisation were analysed with Gfp fusion proteins. All septins showed the same localisation in cytoplasmic rings, at septa, in filaments and on moving early endosomes. Colocalisation studies revealed that all septins localise interdependently in the same structures. Furthermore, FRET analysis showed that Cdc3 and Cdc12 interact directly *in vivo*. Endosomal transport was not only dependent on each individual septin, but also dependent on the RNA-binding protein Rrm4. RNA live imaging of all four mRNAs showed also an Rrm4-dependent transport. FRAP experiments demonstrated that recovery of Cdc3-mCherryN and Cdc12-GfpN occurs simultaneously at distinct subcellular sites and that the rate of recovery was facilitated by the endosomal RNA transport. Based on this results, a model was proposed where local translation promotes the assembly of newly synthesized septins in heteromeric structures on the surface of endosomes. This is important for the long-distance transport of septins and the efficient formation of the septin cytoskeleton.

## Abkürzungen und Fachbegriffe

Δ	Delta, steht für Deletion	HITS-CLIP	<i>high throughput sequencing CLIP</i>
4-MUC	4 Methylumbelliferyl-β-D-N,N',N'' Triacetylchitotriosid	Hyg	Hygromycin
°C	Grad Celsius	iCLIP	<i>individual nucleotide resolution CLIP</i>
μg	Mikrogramm	<i>in vitro</i>	Im Glas (außerhalb lebender Organismen)
μl	Mikroliter	<i>in vivo</i>	im lebendigen Organismus
μm	Mikrometer	l	Liter
Abb.	Abbildung	min	Minute
Amp	Ampicillin	ml	Milliliter
AS	Aminosäure	MLLE	Madmoiselle Domäne
ATP	Adenosintriphosphat	mM	Millimolar
bp	Basenpaar	mRNA	Messenger RNA
Cbx	Carboxin	mRNPs	Messenger Ribonukleoprotein
Cdc	<i>cell division cycle</i>	MS	Massenspektrometrie
CLIP	<i>in vivo UV-crosslinking and immune precipitation</i>	Nat	Nourseothricin
CM	Vollmedium	NM	Nitrat-Minimalmedium
CTE	<i>C-terminal extension</i> (C-terminaler Anhang)	nm	Nanometer
C-terminal	Carboxy-terminal	nt	Nukleotid
DIC	<i>differential interference contrast</i> (Differentialinterferenzkontrast)	N-terminal	Amino-terminal
DIG	Digoxigenin	OD <sub>600</sub>	optische Dichte
DIGE	<i>difference gel electrophoresis</i>	ORF	<i>open reading frame</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure	PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> (Polymerasekettenreaktion)
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat	PIP	Phosphatidylinositolphosphat
ELAV	<i>embryonic lethal abnormal vision</i>	RBP	<i>RNA binding protein</i> (RNA-bindendes Protein)
ER	endoplasmatisches Retikulum	RFU	<i>relative fluorescence unit</i>
ESCRT	<i>Endosomal sorting complex required for transport</i>	RNA	<i>ribonucleic acid</i> (Ribonukleinsäure)
<i>et al.</i>	und andere	RRM	<i>RNA-recognition motif</i>
FLIM-FRET	<i>fluorescence lifetime imaging microscopy FRET</i>	RT	Raumtemperatur
FRET	<i>fluorescence resonance energy transfer</i>	s	Sekunde
g	Schwerebeschleunigung	Tab.	Tabelle
GDP	Guanosindiphosphat	U	Unit
Gfp	Grün fluoreszierendes Protein	Upm	Umdrehungen pro Minute
-GfpC	C-terminale Gfp Fusion	UTR	<i>untranslated region</i> (Untranslatierte Region)
-GfpN	N-terminale Gfp Fusion	UV	ultraviolettes Licht
GTP	Guanosintriphosphat	v/v	Volumenprozent
h	Stunde	w/v	Gewichtsprozent
H <sub>2</sub> O <sub>bid.</sub>	zweifach destilliertes Wasser	WT	Wildtyp

# Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung.....	V
Summary .....	VI
Abkürzungen und Fachbegriffe .....	VII
Inhaltsverzeichnis.....	VIII
1. Einleitung.....	1
1.1 mRNA-Lokalisierung .....	1
1.1.1 Transport entlang des Aktin-Zytoskeletts .....	2
1.1.2 Transport entlang des Mikrotubuli-Zytoskeletts.....	4
1.2 Der Modellorganismus <i>Ustilago maydis</i> .....	6
1.2.1 Mikrotubuli-abhängiger Transport in <i>U. maydis</i> .....	9
1.3 Septine.....	12
1.3.1 Struktur und Funktionen der Domänen von Septinen .....	13
1.3.2 Der Septinkomplex .....	15
1.3.3 Septinstrukturen.....	17
1.3.4 Funktion von Septinen.....	18
1.3.5 Septine in Pilzen .....	20
1.3.6 Septine in <i>U. maydis</i> .....	21
1.4 Zielsetzung dieser Arbeit.....	23
2. Ergebnisse .....	24
2.1 Septine sind wichtig für das filamentöse Wachstum und die Sekretion von Cts1.....	24
2.2 Charakterisierung der Septin Gfp-Fusionen.....	27
2.3 Alle Septine lokalisieren am Septum und in zytoplasmatischen Ringen.....	30
2.4 Alle Septine lokalisieren auf beweglichen Endosomen und in Filamenten .....	33
2.5 Septine kolokalisieren in speziellen subzellulären Strukturen, in denen eine Interaktion von Cdc3 mit Cdc12 stattfindet.....	36
2.6 Es befinden sich heteromere Septinkomplexe auf Endosomen und in Filamenten .....	40
2.7 Rrm4 transportiert die mRNAs aller vier Septine.....	47
2.8 Rrm4 ist wichtig für die Lokalisation der Septine auf Endosomen .....	50
2.9 Septine werden zusammen über die Endosomen verteilt .....	52
2.10 Die Deletion von Septinen hat keinen Einfluss auf die Bildung des Aktin-Zytoskeletts...	55
3. Diskussion.....	57
3.1 Zelluläre Funktion der Septine in <i>U. maydis</i> .....	57
3.1.1 Zelluläre Funktion der Septine während des hyphalen Wachstums.....	57
3.1.2 Einfluss der Septine auf Aktin, Mikrotubuli und Sekretion .....	60



3.2	Der Mechanismus der Bildung von Septinkomplexen .....	63
3.2.1	Die Gfp-Fusionen interferieren mit der Filamentbildung .....	63
3.2.2	Septine bilden heteromere Komplexe .....	66
3.2.3	Endosomen-gekoppelte Translation für den Zusammenbau von Septinen.....	71
3.2.4	Septinkomplexe werden durch einen unbekanntem Mechanismus an Endosomen gekoppelt.....	77
3.3	Ausblick .....	80
4.	Material und Methoden.....	82
4.1	Material und Bezugsquellen.....	82
4.1.1	Chemikalien, Puffer, Lösungen, Medien, Enzyme und Kits.....	82
4.1.2	Zentrifugen .....	84
4.1.3	Oligonukleotide .....	84
4.1.4	Plasmide und Plasmidkonstruktionen.....	86
4.1.5	Stämme .....	93
4.2	Mikrobiologische, zellbiologische und genetische Methoden.....	97
4.2.1	Arbeiten mit <i>E. coli</i> .....	97
4.2.2	Arbeiten mit <i>Ustilago maydis</i> .....	98
4.3	Molekularbiologische Methoden .....	100
4.3.1	Isolierung von Nukleinsäuren.....	100
4.3.2	Arbeiten mit Nukleinsäuren .....	101
4.3.3	Polymerase Kettenreaktion (PCR) .....	103
4.3.4	Auftrennung und Nachweis von Nukleinsäuren .....	104
4.3.5	Sequenzanalyse.....	106
4.4	Mikroskopie und Bildverarbeitung.....	106
4.4.1	Mikroskop-Aufbau und Steuerung.....	106
4.4.2	Durchführung von Kollokalisationsstudien und deren Quantifizierung .....	106
4.4.3	Analyse von Phänotypen und Untersuchung der subzellulären Lokalisation.....	107
4.4.4	RNA-Lebendzell-Mikroskopie .....	107
4.4.5	3D-Photobleichexperimente .....	108
4.4.6	Zweifarbigen-3D-Photobleichen .....	108
4.4.7	Fluoreszenz-Resonanzenergietransfer (FRET) nach Akzeptorbleichen.....	108
4.4.8	Fluoreszenz-Lebenszeit-Mikroskopie (FLIM).....	109
4.4.9	FM4-64 Färbung, Benomyl und Latrunculin A Behandlung .....	109
4.5	Computerprogramme .....	109
5.	Literaturverzeichnis.....	111

## Inhaltsverzeichnis

---

6. Ergänzende Daten .....	131
Danksagung .....	132
Lebenslauf .....	133

## 1. Einleitung

### 1.1 mRNA-Lokalisierung

Die subzelluläre Position eines Proteins ist ein entscheidender Faktor für dessen Funktionalität. Der Transport und die dadurch entstehende Lokalisierung von mRNAs ist in Eukaryoten ein weit verbreiteter Mechanismus, um die Expression von Proteinen sowohl zeitlich als auch räumlich zu regulieren. Durch die Lokalisierung von mRNA wird die Proteinbiosynthese an eine bestimmte Stelle konzentriert, wodurch eine höhere oder exklusive Anhäufung des kodierten Proteins erreicht wird (Kloc *et al.*, 2002; Lopez de Heredia und Jansen, 2004; Palacios, 2007). Diese Konzentration und zeitliche Regulation kann wichtig für den lokalen Zusammenbau von Proteinkomplexen oder für die Aktivierung verschiedener Komponenten an einer bestimmten subzellulären Position sein (Czaplinski, 2014; Jung *et al.*, 2014; St Johnston, 2005). Die Lokalisierung von mRNA reguliert beispielsweise die Entwicklung des frühen Embryos, neuronale Zellfunktionen und verschiedene Aspekte der Zellbewegung und Zellpolarität (Martin und Ephrussi, 2009; St Johnston, 2005). Anfänglich wurde davon ausgegangen, dass mRNA-Lokalisierung nur in sehr großen oder stark polarisierten Zellen, wie Neuronen, vorkommt, da hier die Diffusion nicht ausreichen würde, um ein Protein in einer bestimmten Zeit an einen gewünschten Ort zu bringen. In neueren Studien wurde diese Form der posttranskriptionellen Regulation in fast allen Zelltypen gefunden und wird daher eher als Regel anstatt als Ausnahme angesehen (Blower, 2013). Ein gut untersuchtes Beispiel stellt der Embryo von *Drosophila melanogaster* dar, in dem 71 % aller mRNAs (von ca. 3000 getesteten Transkripten) eine klar definierte subzelluläre Lokalisierung zeigen (Lecuyer *et al.*, 2007). Die weite Verbreitung der mRNA-Lokalisierung kann durch die vielfältigen Vorteile dieser Form der posttranskriptionellen Regulation erklärt werden. Vor allem in ausgedehnten Zellen wie Neuronen, aber auch in Oocyten oder Embryonen ist es effizienter, mehrere Kopien eines Proteins durch wiederholte Translation an der gewünschten Endlokalisierung herzustellen, anstatt jedes einzelne translatierte Protein durch die gesamte Zelle zu transportieren. Des Weiteren kann die Zelle sehr schnell auf einen Stimulus, mit der Aktivierung der Translation eines lokalen Transkriptes, reagieren. Durch die lokale Translation wird wiederum auch verhindert, dass ein Protein an Stellen akkumuliert, an denen es schädlich für die Zelle ist. Letztlich können RNAs auch selbst als ein Gerüst dienen, um Proteine in einem Komplex

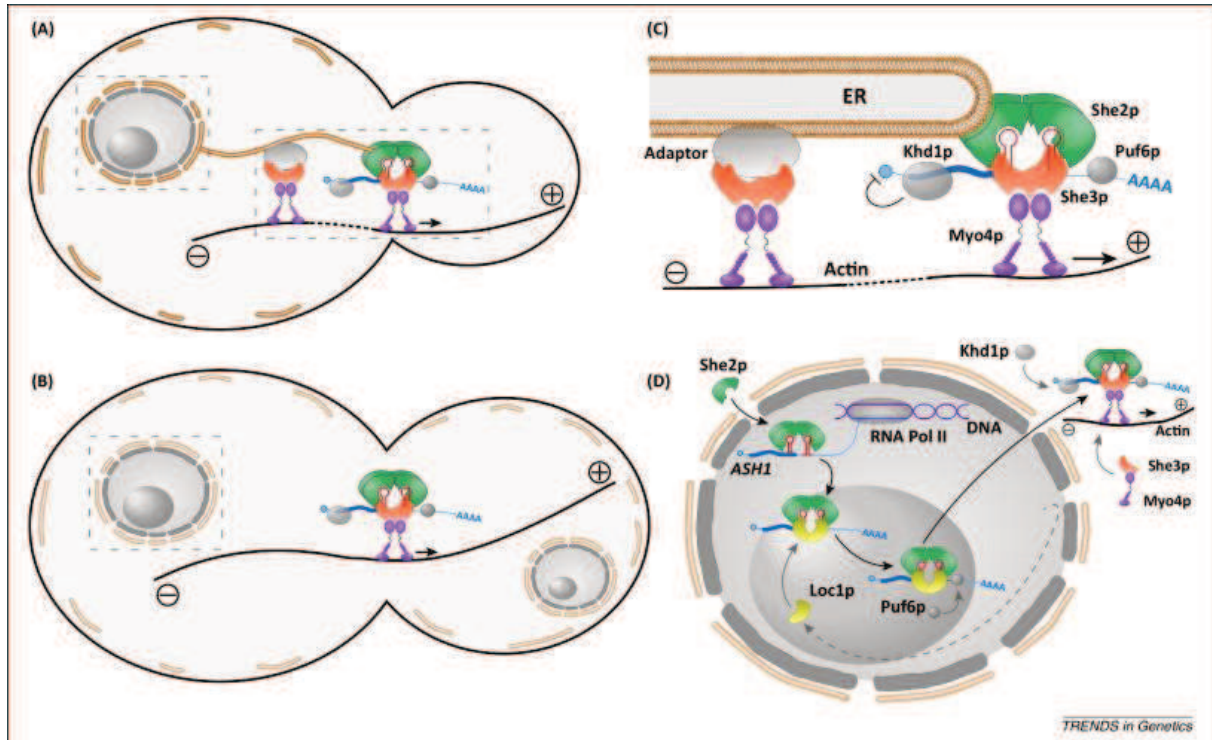
zusammenzubauen (Blower, 2013; Martin und Ephrussi, 2009; Weatheritt *et al.*, 2014). Damit mRNAs an einer spezifischen subzellulären Stelle lokalisieren können, benötigen sie verschiedene Eigenschaften. Manche Transkripte tragen in ihrer Sequenz bestimmte *cis*-wirkende Elemente, sogenannte *Zipcodes*, die meistens in der 3' untranslatierten Region (*untranslated region*, UTR) gefunden werden (Jambhekar und Derisi, 2007; Jansen, 2001; Kislauskis *et al.*, 1993). Diese Elemente werden durch RNA-bindende Proteine (*RNA binding proteins*, RBPs) erkannt, welche dann mit zusätzlichen Faktoren mRNA-enthaltene Ribonukleoproteinkomplexe (mRNPs) ausbilden können (Czaplinski, 2014; St Johnston, 2005). Für eine Erkennung und Bindung durch RBPs stellen neben der Primärsequenz auch sekundäre Strukturen der RNA wichtige Signale dar. Die entstandenen mRNPs können wiederum mit Motorproteinen assoziieren und werden von diesen entlang des Zytoskeletts durch die Zelle transportiert (Jansen, 2001; Kloc *et al.*, 2002; Palacios, 2007). Der RNA-Protein Komplex kann anschließend an einen gewünschten Zielort lokalisiert und dort verankert werden (Jansen, 2001). In zahlreichen untersuchten Beispielen zeigte sich, dass die mRNAs während des Transportprozesses translationell reprimiert sind. In diesen Fällen wurden die Transkripte zunächst von der Transportmaschinerie entkoppelt, damit eine Translation am Zielort stattfinden kann (Kloc *et al.*, 2002). Zum Beispiel können lokale Kinasen die RBPs phosphorylieren, wodurch die RNA Bindeaffinität verringert und das gebundene Transkript von der Transportmaschinerie abgeladen wird (Paquin *et al.*, 2007). Nach einer anschließenden Deregulation der Translationsinhibitoren kann die mRNA translatiert werden, was somit in einer definierten Lokalisierung des kodierten Proteins resultiert (Huttelmaier *et al.*, 2005; Jung *et al.*, 2014). Im Weiteren sollen einige gut untersuchte Beispiele des aktiven mRNA-Transports näher erläutert werden.

### 1.1.1 Transport entlang des Aktin-Zytoskeletts

Die Prinzipien des aktiven mRNA-Transports lassen sich exemplarisch an dem Beispiel des mRNA-Transports in *Saccharomyces cerevisiae* verdeutlichen. Dort werden während der Zytokinese über 30 mRNAs durch die SHE-Transportmaschinerie von der Mutterzelle in die neu entstehende Tochterzelle transportiert (Heym und Niessing, 2012). Die meisten Transkripte kodieren für Proteine, die am distalen Pol lokalisieren und mindestens ein *cis*-wirkendes Lokalisationselement tragen (Bohl *et al.*, 2000; Jambhekar und Derisi, 2007; Shepard *et al.*, 2003). Ein gut untersuchtes Beispiel dieser Transkripte ist die *ASH1* mRNA, welche über Motorproteine der Myosin-Familie entlang des Aktin-Zytoskeletts

transportiert wird (Abb. 1.1) (Bobola *et al.*, 1996; Heuck *et al.*, 2010; Heym und Niessing, 2012). Die *ASH1* mRNA kodiert für ein DNA-bindendes Protein, welches die Transkription der HO-Endonuklease in dem Zellkern der Tochterzelle reprimiert. Dadurch wird ein Wechsel des Paarungstyps in der Tochterzelle verhindert, sodass dieser während der Zellteilung ausschließlich im Mutterzellkern stattfinden kann (Bobola *et al.*, 1996; Long *et al.*, 1997). Um das Ash1- Protein spezifisch in der Tochterzelle zu lokalisieren, wird die mRNA an den distalen Pol der Tochterzelle transportiert. Dadurch gelangt das Ash1-Protein nur in den Zellkern der Tochterzelle, was eine asymmetrische Genexpression garantiert (Heym und Niessing, 2012). Entscheidend für den Transport der *ASH1* mRNA ist die SHE-Maschinerie, die aus dem RNA-bindenden Protein She2p und dem Adapterprotein She3p besteht (Munchow *et al.*, 1999). She2p erkennt und bindet die *ASH1* mRNA ko-transkriptionell anhand von vier *Zipcode* Elementen, was zur Ausbildung eines initialen Vorkomplexes führt (Abb. 1.1D) (Shen *et al.*, 2010). Nach dem Export des Komplexes aus dem Zellkern interagiert She2p im Zytoplasma mit She3p, welches wiederum mit dem Myosin-V Motorprotein Myo4p interagiert und den Transport entlang des Aktin-Zytoskeletts gewährleistet (Bohl *et al.*, 2000; Kremmentsova *et al.*, 2011). Während des Transportprozesses wird die Translation der *ASH1* mRNA durch die RBPs Kdh1p und Puf6p reprimiert (Gu *et al.*, 2004; Irie *et al.*, 2002). Am Zellkortex der Tochterzelle angekommen, werden Kdh1 und Puf6 von der Casein-Kinase Yck1p phosphoryliert, wodurch es zu einer Aktivierung der Translation kommt (Paquin *et al.*, 2007). Während der Transport der *ASH1* mRNA relativ gut verstanden ist, zeigt sich anhand der weiteren Zieltranskripte der SHE-Maschinerie ein vielschichtiger Mechanismus des Transports. So verdeutlichen neuere Studien einen SHE-abhängigen Ko-Transport von mRNA mit dem endoplasmatischen Retikulum (ER) (Jansen *et al.*, 2014; Kraut-Cohen und Gerst, 2010; Schmid *et al.*, 2006). Während der Phase des polaren Wachstums wird kortikales ER aktiv durch den She3p-Myo4p Komplex in die wachsende Knospe transportiert. Dieser Prozess ist jedoch unabhängig von She2p. Ebenfalls können She2p-She3p enthaltende mRNPs mit dem ER während des Transportes assoziieren und zusammen mit der mRNA in die Tochterzelle migrieren (Abb. 1.1 A/C) (Jansen *et al.*, 2014). Ein Transport von mRNA entlang des Aktin-Zytoskeletts ist nicht nur auf einzellige Organismen beschränkt. Die selektive Anreicherung der  $\beta$ -Aktin mRNA an der Spitze von embryonischen Fibroblasten wird als Modellsystem für die Lokalisierung eines Transkriptes in Vertebraten benutzt (Bullock, 2007). Die

Lokalisierung dieser mRNA benötigt ein intaktes Aktin-Zytoskelett und wird über Myosin II-B Motorproteine vermittelt (Latham *et al.*, 2001). Eine Störung der  $\beta$ -Aktin mRNA-Lokalisierung führt zu Mobilitätsstörungen der Zellen in Bezug auf Geschwindigkeit und Direktionalität (Kislauskis *et al.*, 1994; Kislauskis *et al.*, 1997).



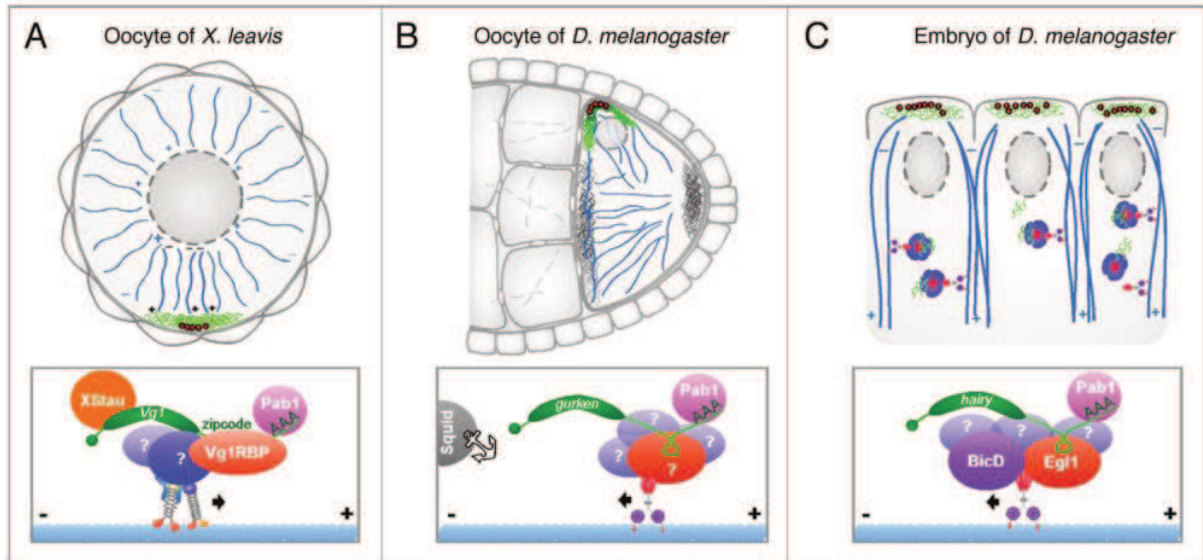
**Abbildung 1.1: Transport der *ASH1* mRNA entlang des Aktin-Zytoskeletts in *S. cerevisiae*.** Auf der linken Seite sind zwei unterschiedliche Zeitpunkte in der Knospentwicklung dargestellt. Gestrichelte Linien markieren vergrößerte Bereiche auf der rechten Seite. (A) Frühe Phase: Ko-Transport von mRNA (blau) mit kortikalem endoplasmatischem Retikulum (cER, Gold). Adapterprotein für cER ist unbekannt. (B) Späte Phase: Transport von cER ist unabhängig von *ASH1* mRNA. (C) Detaillierter Überblick des ER/mRNA Ko-Transports. (D) Detaillierter Überblick der Vorgänge im Kern während des She2p-abhängigen mRNP-Transports. She2p (grün) wird ko-transkriptionell auf die mRNA Elemente geladen (rote Haarnadelstrukturen). Das Kernkörperchenprotein Loc1 (gelb) wird während der zytosplasmatischen Remodulierung durch She3p (rot) ausgetauscht (Abbildung mit Genehmigung aus (Jansen *et al.*, 2014)).

### 1.1.2 Transport entlang des Mikrotubuli-Zytoskeletts

Während das Aktin-Zytoskelett für Kurzstreckentransporte genutzt wird, finden die meisten Langstreckentransporte in der Zelle mithilfe des Mikrotubuli-Zytoskeletts statt. Dabei werden die Transportprozesse, je nach Richtung, durch verschiedene Motorproteine vermittelt, wobei der Transport in Richtung der Mikrotubuli-Minus-Enden durch Dyneine und in Richtung der Plus-Enden durch Kinesine vermittelt wird (St Johnston, 2005). Diese Motorproteine sind auch am Transport von mRNA entlang des Mikrotubuli-Zytoskeletts beteiligt. Die umfangreichsten Studien, die auf Mikrotubuli-abhängigem Transport basieren, sind beispielsweise die Oogenese und Embryonalentwicklung des Krallenfrosches *Xenopus laevis* und der Taufliege *D. melanogaster*, sowie die Entwicklung von Neuronen in

Säugetieren (Vollmeister *et al.*, 2012b). Während der Oogenese von *X. leavis* ist der Transport der *Vg1* mRNA zu dem vegetativen Pol wichtig für eine lokale Sekretion des dadurch kodierten TGF- $\beta$  Wachstumsfaktors. Dieser wird für die spätere Musterbildung im Embryos benötigt (Birsoy *et al.*, 2006; King *et al.*, 2005). Der initiale Schritt ist die Interaktion von hnRNPI (Cote *et al.*, 1999) und Vg1RBP/Vera (Deshler *et al.*, 1997) mit dem Transkript. Nachdem das so entstandene mRNP ins Zytoplasma exportiert wurde, werden weitere Faktoren wie XStau an den Komplex rekrutiert (Kress *et al.*, 2004). Der Transport wird anschließend durch ein Zusammenspiel von Kinesin-1 und Kinesin-2 vermittelt (Abb. 1.2A) (Messitt *et al.*, 2008; Yoon und Mowry, 2004). Ein vergleichbarer Mechanismus findet sich bei dem Transport der *gurken* mRNA in der Oozyte von *D. melanogaster*. Die *gurken* mRNA kodiert für ein TGF $\alpha$ -ähnliches Protein, welches an der späteren Festlegung der Körperachsen beteiligt ist (Abb. 1.2B). Während der Oogenese ist der Transport dieser mRNA in Richtung des dorso-anterioren Pols notwendig für die Sekretion des TGF $\alpha$ -ähnlichen Proteins. Durch diesen Prozess wird die dorso-ventrale Körperachse, in dem sich entwickelnden Embryo, determiniert (Martin und Ephrussi, 2009; St Johnston, 2005). Der Transport und die anschließende Verankerung werden hierbei durch Dynein vermittelt (Delanoue *et al.*, 2007; Medioni *et al.*, 2012). Während der späten Embryogenese von *D. melanogaster* ist ein aktiver mRNA-Transport von *pair-rule*-Transkripten, die für transkriptionelle Regulatoren kodieren, an der Ausbildung der Segmentierung beteiligt (Bullock *et al.*, 2004). Zum Beispiel wird die *hairy* mRNA, die eine Haarnadelschleife in ihrer 3'UTR trägt, durch Egalitarian erkannt (Abb. 1.2C). Das mRNP ist über BicaudalD an Dynein gekoppelt, welches den Minus-End gerichteten Transport vermittelt (Delanoue und Davis, 2005; Li *et al.*, 2010). Die dadurch erreichte distinkte Lokalisierung an der apikalen Spitze der Kerne in dem Synzytium ist essentiell für die Segmentierung des Embryos (Martin und Ephrussi, 2009; St Johnston, 2005). Der mRNA-Transport ist auch an der Entwicklung des Nervensystems in Säugetieren beteiligt. Hier spielt der Transport der mRNA und die lokale Translation bei der Entwicklung und Funktion von Neuronen sowie bei deren Überleben und Regeneration eine Rolle und ist an synaptischer Plastizität beteiligt (Doyle und Kiebler, 2011; Jung *et al.*, 2012). In ausdifferenzierten Neuronen des Hippocampus wurden verschiedene mRNAs gefunden, die in die Dendriten transportiert werden. Die Aktivierung einer Synapse kann eine spezifische postsynaptische Translation auslösen. Die so erzeugten

Proteine bewirken nachfolgend eine modulierte Nervenantwort und regulieren die weitere synaptische Plastizität (Doyle und Kiebler, 2011).



**Abbildung 1.2: Mikrotubuli-abhängiger mRNA-Transport in verschiedenen Modellorganismen.** (A) Der Transport der *Vg1* mRNA, während der Oogenese in *X. leavis*, wird über Kinesin-1 und Kinesin-2 vermittelt. Dabei wird die *Vg1* mRNA in der 3'UTR durch das Vg1RBP erkannt und mit der Transportmaschinerie verbunden. Die mRNA wird an den vegetativen Pol transportiert. (B) Der Transport der *gurken* mRNA in der Oocyte von *D. melanogaster* zum dorso-anterioren Pol wird über Dynein vermittelt. Das Protein wird an dem Pol sekretiert, um die dorso-ventrale Körperachse zu determinieren. (C) Transport der *hairy* mRNA im Embryo von *D. melanogaster* wird ebenfalls durch Dynein vermittelt. Die *hairy* mRNA wird dabei durch Egalitarian (*Egl1*) erkannt und über den Adapter BicaudalD (*BicD*) an das Motorprotein gekoppelt (Abbildung mit Genehmigung aus (Vollmeister *et al.*, 2012b)).

Mikrotubuli können jedoch nicht nur als Strecke für den Langstreckentransport dienen, sondern sind auch selbst der Zielort für einige lokalisierende Transkripte (Martin und Ephrussi, 2009). Die Aufreinigung von Mikrotubuli aus verschiedenen Organismen zeigte eine Ko-Aufreinigung von hunderten mRNAs (Blower *et al.*, 2007; Sharp *et al.*, 2011). Neben Insekten und Vertebraten gibt es auch im Phylum Fungi filamentöse Organismen, die stark polarisierte Zellen aufweisen können. Der Mikrotubuli-abhängige Transport von Proteinen und Transkripten ist für die Entwicklung von Pilzen sehr wichtig und kann anhand des Modellorganismus *Ustilago maydis* untersucht werden (Martin und Ephrussi, 2009; Vollmeister *et al.*, 2012b).

## 1.2 Der Modellorganismus *Ustilago maydis*

*U. maydis*, der Verursacher des Maisbeulenbrands, ist ein pflanzenpathogener Pilz, welcher zur Familie der *Ustilaginaceae* gehört (Bölker, 2001; Kellner *et al.*, 2011). Dieser Pilz besitzt ein sehr enges Wirtsspektrum, da er neben Mais (*Zea mays* ssp. *mays*) nur dessen Urform Teosinte (*Zea mays* ssp. *parviglumis*) befällt (Banuett, 1992; Basse und Steinberg, 2004). In



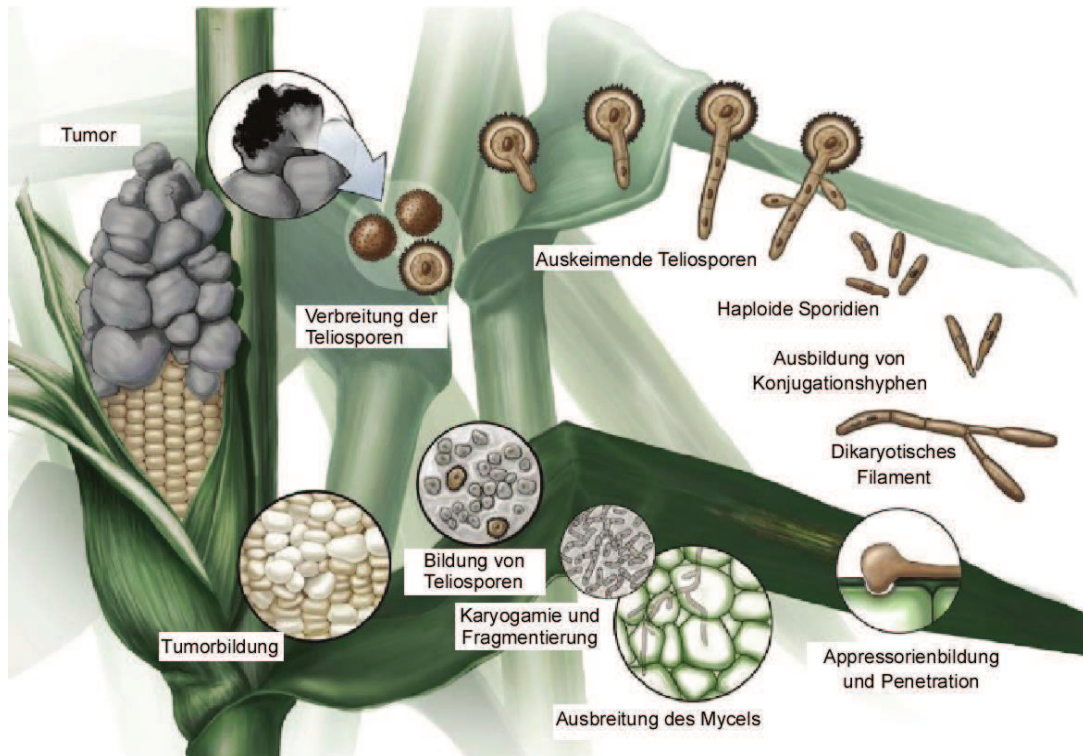
Mexiko gelten von *U. maydis* befallene Maiskolben als Delikatesse und sind unter dem Namen „Huitlacoche“ auf vielen Speisekarten zu finden (Juárez-Montiel *et al.*, 2011).

Der Lebenszyklus von *U. maydis* kann in eine saprophytische und eine parasitische Phase eingeteilt werden (Abb. 1.3). In der ersten Phase erfolgt das Auskeimen diploider Teliosporen, die durch die Luft verteilt werden. Während der Keimung findet Meiose statt, wodurch haploide Vorläufer produziert werden. Diese haploiden Zellen, die Sporidien genannt werden, haben eine zylindrische Zellmorphologie und vermehren sich durch Knospung (Bölker, 2001; Laurie *et al.*, 2012; Vollmeister *et al.*, 2012a). Der Übergang in die parasitische Phase erfolgt durch die Paarung zweier Sporidien. Kompatible Sporidien müssen sich in ihrem tetrapolaren Paarungstypsystem unterscheiden. Dieses besteht aus dem *a*- sowie *b*-Lokus. Der *a*-Lokus kodiert für ein Pheromon und einen Pheromonrezeptor. Der Pheromonrezeptor erkennt spezifisch das Pheromon des jeweils anderen Allels (Bölker *et al.*, 1992; Spellig *et al.*, 1994). Nach Erkennung eines Pheromons tritt der Zellzyklus in einen G2-Arrest ein und die Zellen wachsen durch Konjugationshyphen entlang des Pheromongradienten aufeinander zu. Nach der Fusion der Zellen an der Spitze wird die Plasmogamie der Zellen initiiert (Brefort *et al.*, 2009; Snetselaar *et al.*, 1996). Charakteristisch für Basidiomyceten ist hier, dass Plasmogamie und Karyogamie zeitlich separiert auftreten, wodurch ein Dikaryon mit zwei getrennten Zellkernen entsteht (Kruzel und Hull, 2010). Der Wechsel zum hyphalen Wachstum wird genetisch durch den *b*-Lokus kontrolliert. Der *b*-Lokus kodiert für die beiden Untereinheiten eines heterodimeren Homöodomänen-Transkriptionsfaktors bEast (bE) und bWest (bW) (Bölker, 2001; Gillissen *et al.*, 1992; Kronstad und Leong, 1990; Schulz *et al.*, 1990b). Nur wenn beide Untereinheiten von unterschiedlichen Paarungstypen stammen, kann sich ein funktioneller Transkriptionsfaktor bilden, welcher anschließend die Expression der Gene für die pathogene Entwicklung des Dikaryons aktiviert (Brefort *et al.*, 2009; Kämper *et al.*, 1995). Dadurch wird garantiert, dass ein aktiver Transkriptionsfaktor nur ausgehend von zwei verschiedenen Zellkernen gebildet wird und nicht in haploiden Zellen aktiv ist. Dieses Erkenntnis wurde für die Herstellung des Laborstammes AB33 genutzt, in dem das aktive bE/bW Heterodimer unter der Kontrolle eines Promotors exprimiert werden kann. Dadurch ist der Stamm in der Lage ohne vorherige Paarung Hyphen auszubilden (Brachmann *et al.*, 2001). Während des hyphalen Wachstums wächst die Zelle am apikalen Pol aus und zieht am basalen Pol Septen ein (Abb. 1.4A). Die Septen isolieren den lebenden Teil des Pilzes

von Segmenten, in denen sich kein Zytoplasma mehr befindet, was zu einer Bildung von gleichmäßigen, leeren Abschnitten führt (Lehmler *et al.*, 1997; Steinberg *et al.*, 1998). Die infektiöse Form des Pilzes wächst anschließend im nahen Kontakt zur Pflanze und als Antwort auf chemische und physische Signale auf der Pflanzenoberfläche wird die Bildung eines Appressoriums ausgelöst (Lanver *et al.*, 2010; Mendoza-Mendoza *et al.*, 2009). Das Appressorium ist eine spezielle Infektionsstruktur, die es dem pathogenen Pilz ermöglicht, durch die Penetration der Kutikula in die Pflanze einzudringen (Brefort *et al.*, 2009). Nach der Penetration ins Pflanzengewebe wird der Zellzyklusarrest aufgehoben. *U. maydis* teilt sich und bildet ein ausgedehntes Hyphennetzwerk aus, was zu Symptomen wie Anthozyan- oder Chlorosebildung an den Blättern führen kann. Abschließend erfolgt die Bildung von Tumoren, gefolgt von Sporogenese, welche Karyogamie und die Differenzierung in Melanin-haltige diploide Teliosporen auslöst. Nach Trocknung des Tumors platzt dieser auf, die diploiden Sporen werden freigesetzt und durch die Luft verteilt. Unter günstigen Umweltbedingungen können die Teliosporen auskeimen, wobei durch Meiose vier haploide Sporidien entstehen und der Lebenszyklus geschlossen ist (Bölker, 2001; Vollmeister *et al.*, 2012a).

*U. maydis* entwickelte sich in den letzten Jahren zu einem Modellorganismus der zellbiologischen Forschung, anhand dessen unter anderem Prozesse der Genregulation, Untersuchung von Signalwegen, transkriptionelle und post-transkriptionelle Regulation, DNA Rekombination und Reparatur, RNA Biologie, Sekretion oder molekularer Transport untersucht worden sind (Bölker, 2001; Brefort *et al.*, 2009; Dean *et al.*, 2012; Feldbrügge *et al.*, 2008; Kahmann, 2004; Langner und Göhre, 2015; Langner *et al.*, 2015; Perez-Martin *et al.*, 2006; Steinberg und Perez-Martin, 2008; Vollmeister *et al.*, 2012a). Die wohl bekanntesten Erkenntnisse gingen aus Studien zur Aufklärung der homologen Rekombination durch Holliday hervor, in denen er die Bildung der Kreuzstruktur aus heteroduplex DNA (Holliday-Struktur) untersuchte (Holliday, 1964; Holliday, 1974a). *U. maydis* besitzt viele Eigenschaften, die ihn zu einem guten Modellsystem machen. Besondere Vorteile des Pilzes sind seine kurze Generationszeit und seine einfache Kultivierbarkeit. Das mit 20,5 Mbp relativ kleine Genom des Pilzes ist vollständig sequenziert und manuell annotiert worden, wodurch im Zusammenspiel mit zahlreichen Methoden eine gezielte Manipulation von Genen ermöglicht wird (Brachmann *et al.*, 2004; Kämper *et al.*, 2006; Terfrüchte *et al.*, 2014). Neue Studien haben gezeigt, dass *U. maydis*

auch für biotechnologische Zwecke genutzt werden kann wie zum Beispiel für die Produktion von Sekundärmetaboliten, für die Sekretion von Proteinen oder zur Herstellung von Impfstoffen (Bölker *et al.*, 2008; Feldbrügge *et al.*, 2013; Juárez-Montiel *et al.*, 2015; Stock *et al.*, 2012).



**Abbildung 1.3: Lebenszyklus von *U. maydis*. Teliosporen keimen aus und bilden nach Meiose haploide Sporidien aus.** Sporidien mit einem unterschiedlichen Paarungstyp können sich erkennen und Konjugationshyphen ausbilden. Nach Fusion und Plasmogamie wird der Wechsel zum hyphalen Wachstum initiiert und es bildet sich ein dikaryotisches Filament aus. Dieses Filament ist in der Lage ein Appressorium auf der Pflanzenoberfläche zu bilden und die Pflanze zu penetrieren. In der Pflanze wird ein ausgedehntes Hyphennetzwerk gebildet. Abschließend erfolgt die Bildung von Tumoren, gefolgt von Karyogamie und der Differenzierung zu Teliosporen. Diese verbreiten sich und können einen erneuten Zyklus beginnen (verändert nach Fig. 1. The Life Cycle of *Ustilago maydis* - Scientific Figure on ResearchGate. Available from: [https://www.researchgate.net/figure/221926459\\_fig1\\_Fig-1-The-Life-Cycle-of-Ustilago-maydis-In-this-diagram-meiosis-begins-soon-after](https://www.researchgate.net/figure/221926459_fig1_Fig-1-The-Life-Cycle-of-Ustilago-maydis-In-this-diagram-meiosis-begins-soon-after) [accessed Jun 21, 2016] (Saville, 2012)).

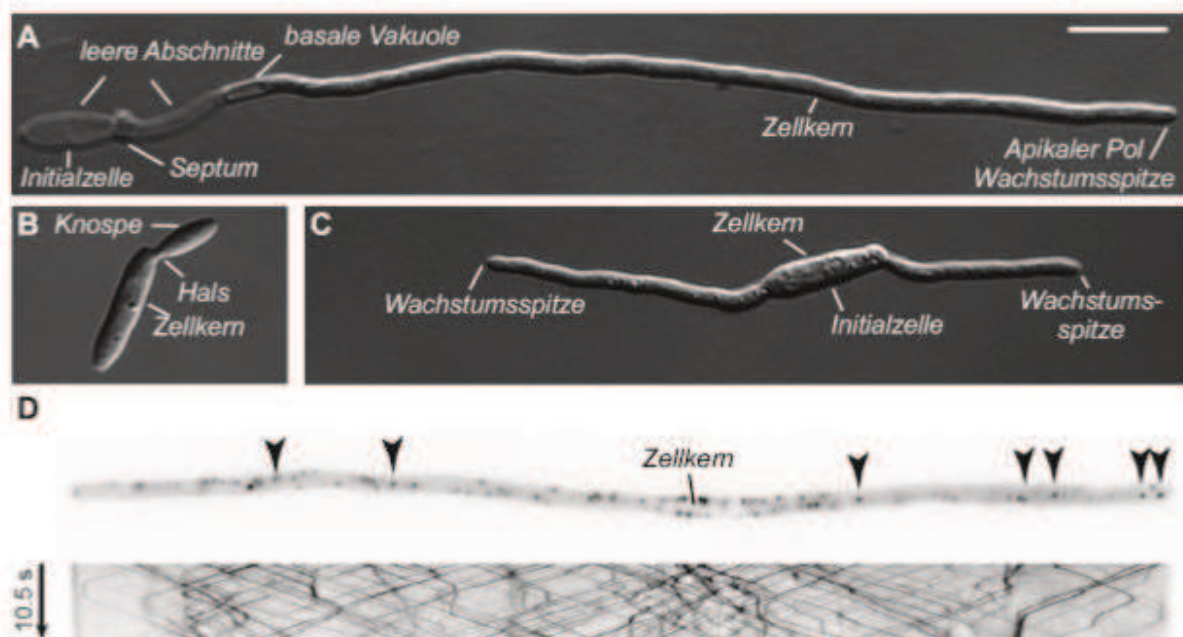
### 1.2.1 Mikrotubuli-abhängiger Transport in *U. maydis*

Filamentöse Pilze sind ein ideales Modellsystem um Mikrotubuli-abhängige Transportprozesse zu untersuchen (Egan *et al.*, 2012). In *U. maydis* ist das Mikrotubuli-Zytoskelett für ein korrektes hyphales Wachstum von großer Bedeutung (Fuchs *et al.*, 2005). In der Hyphe weisen die Mikrotubuli in der Zellmitte eine antipolare Anordnung auf, während diese in einer Zone von ungefähr 10 µm von dem Zellende unipolar organisiert sind. Dabei sind die Plus-Enden zu den Zellpolen hin ausgerichtet (Lenz *et al.*, 2006; Steinberg, 2000). An dieser Zytoskelett-Komponente werden verschiedene Ladungen transportiert. Ein Beispiel ist der Transport von Komponenten der Endozytose, den frühen Endosomen (Wedlich-Söldner *et al.*, 2000). Der Vorgang der Endozytose wird in

eukaryotische Zellen benötigt, um Lipide der Plasmamembran mit assoziierte Proteine in Vesikel zu verpacken, die anschließend mit dem endosomalen System fusionieren können (Peñalva, 2010). Dieser Weg kann genutzt werden, um die Ladung zurück zur Plasmamembran zu recyceln oder um den Abbau von Membranproteinen in der Vakuole zu gewährleisten. Nach der Internalisierung der Plasmamembran kommt es zur Ausbildung von vesikulären Strukturen, die durch Markerproteinen, wie der kleinen GTPase Rab5a und dem t-SNARE (*t*arget *s*oluble *N*-ethylmaleimide-sensitive factor *a*ttachment protein *r*eceptor) Yup1, als frühe Endosomen klassifiziert werden (Haag *et al.*, 2015; Higuchi *et al.*, 2014; Wedlich-Söldner *et al.*, 2000). Diese über 50 einzelnen vesikulären Strukturen werden mit einer hohen Prozessivität durch die gesamte Hyphe von *U. maydis* transportiert (Baumann *et al.*, 2012a; Schuster *et al.*, 2011b). Das Motorprotein Dynein transportiert die Endosomen entlang der unipolaren Regionen in Richtung der Minus-Enden, während Kinesin-3 im Bereich der antiparallelen Anordnung den Transport Richtung Zellkern vom Dynein übernimmt (Lenz *et al.*, 2006; Schuster *et al.*, 2011b). Das konventionelle Kinesin-1 transportiert Dynein anschließend wieder zu den Plus-Enden der Mikrotubuli, um es für die nächste Runde des Transportes wiederzuverwerten (Schuster *et al.*, 2011a). Anschließend können die frühen Endosomen zu späten Endosomen ausreifen, was durch einen Größenzuwachs, einen Verlust der Mobilität und der Anwesenheit des Markerprotein Rab7 gekennzeichnet ist (Peñalva, 2010; Rink *et al.*, 2005; Wedlich-Söldner *et al.*, 2000). Diese späten Endosomen können mit der Vakuole fusionieren und stellen so einen Mechanismus zum Abbau von Membranproteinen dar (Mellman, 1996; Steinberg, 2007).

Ein weiterer Mikrotubuli-abhängiger Transport in *U. maydis* ist der Langstreckentransport von mRNA. Ein Schlüsselprotein in diesem Prozess ist Rrm4, ein ELAV (*e*mbrionic *l*ethal *a*bnormal *v*ision)-ähnliches Protein, welches am N-terminus drei RNA-Bindedomänen (*R*NA *r*ecognition *m*otifs, RRM) besitzt (Becht *et al.*, 2006; Becht *et al.*, 2005; König *et al.*, 2009). Darüber hinaus ist Rrm4 durch zwei C-terminale *M*ademoise*LLE* (MLLE) Domänen charakterisiert, die für Protein-Protein Interaktionen benötigt werden und als Peptidasche für PAM2 Motive dienen (Becht *et al.*, 2005; Pohlmann *et al.*, 2015). Der Verlust von *rrm4* führt zu einem gestörten Hyphenwachstum, das durch eine erhöhte Rate an bipolaren Zellen, mit einer reduzierten Septenbildung, gekennzeichnet ist und in einer verminderten Virulenz resultiert (Abb. 1.4C) (Becht *et al.*, 2006). Eine C-terminale Fusion von Rrm4 mit Gfp zeigt, dass Rrm4 in distinkten Partikeln bidirektional durch die gesamte Hyphe

transportiert wird (Abb. 1.4D). Interessanterweise wird Rrm4 mit frühen Endosomen ko-transportiert, was eine weitere Rolle der Endosomen als Transportkomponente aufzeigt (Baumann *et al.*, 2012a). Für die Kopplung an Endosomen ist die MLE Domäne von Rrm4 von großer Bedeutung. Diese interagiert mit dem FYVE-Domänen Protein Upa1, welches somit als Vermittler zwischen Endosomen und RNA-Transport fungiert, indem es Rrm4 an die Endosomen binden kann (Pohlmann *et al.*, 2015).



**Abbildung 1.4: Mikrotubuli-abhängiger Transport von Rrm4-enthaltenen mRNPs ist wichtig für das filamentöse Wachstum in *U. maydis*.** (A) Hyphe des Laborstamms AB33, welcher eine aktive bW2/bE1 Variante unter der Kontrolle eines induzierbaren Promotor exprimiert. (B) Sporidie eines *rrm4* Deletionsstamms, die keine Veränderung zum Wildtyp (nicht gezeigt) aufweist. (C) Die Hyphe eines *rrm4* Deletionsstamms wächst an beiden Enden zu einem bipolaren Filament aus. (D) Subzelluläre Lokalisation eines Rrm4-Gfp exprimierenden Stamms. Rrm4-Gfp lokalisiert in distinkten Partikeln. Die Bewegung dieser Partikel ist im darunter abgebildeten Kymographen dargestellt, bei dem die Strecke pro Zeit abgebildet ist (Abbildung mit Genehmigung und Veränderungen aus (Vollmeister *et al.*, 2012a)).

Untersuchungen mit einer funktionellen Gfp Fusion des Poly(A)-bindenden Proteins Pab1, welches an die Poly(A)-Anhänge von sämtlichen mRNAs binden sollte, zeigten, dass die Rrm4-vermittelte Beförderung entlang von Mikrotubuli der zentrale Mechanismus für den Langstreckentransport von mRNA ist (König *et al.*, 2009). Eine Funktion dieses Transportes könnte die gleichmäßige Verteilung der mRNAs über die gesamte Hyphe sein. Die Analyse von Pab1-Gfp in einem *rrm4* Deletionsstamm zeigte einen Verlust der mobilen mRNA Partikel und die Bildung eines mRNA Gradienten, der vom Kern in Richtung der Pole abnimmt. Dies spricht dafür, dass die mRNA nicht mehr korrekt verteilt werden kann (König *et al.*, 2009). Um die spezielle Funktion des endosomalen mRNA-Transports zu untersuchen, sollten die transportierten mRNAs identifiziert werden. Um dies zu erreichen, wurden *in vivo* UV-Quervernetzungsexperimente (*UV-crosslinking and immune*

*precipitation*, CLIP) mit RNA-Lebendzell-Mikroskopie verbunden. Durch diese Experimente konnte gezeigt werden, dass Rrm4 eine Vielzahl verschiedener mRNAs bindet und transportiert (Koepke *et al.*, 2011; König *et al.*, 2009). Die identifizierten mRNAs kodieren für Proteine, die unter anderem an Prozessen in der Proteinbiosynthese, der Endozytose oder der Funktion von Mitochondrien beteiligt sind. Die Interaktion von Rrm4 mit drei identifizierten Ziel-mRNAs *ubi1*, *rho3* und *cdc3*, welche für das natürliche Fusionsprotein Ubiquitin-Rpl40, die kleine GTPase Rho3 und das Septin Cdc3 kodieren, konnte durch Lebendzell-Mikroskopie bestätigt werden (Baumann *et al.*, 2014; König *et al.*, 2009). Als mögliches Bindemotiv wurden CA-reiche Sequenzen identifiziert (König *et al.*, 2009). Auf Proteom-Ebene konnte in DIGE (*difference gel electrophoresis*) Experimenten in der Membran-assoziierten Fraktion ein Unterschied zwischen Wildtyp und der *rrm4* Mutante gefunden werden. Dabei schien die Endochitinase Cts1, die ebenfalls zu den Ziel-mRNAs von Rrm4 gehört, in den *rrm4* Deletionsmutanten angereichert zu sein. Nachfolgende Studien zeigten, dass Rrm4 und das Mikrotubuli-Zytoskelett von entscheidender Bedeutung für die effiziente unkonventionelle Sekretion von Cts1 sind und eine Störung dieses Prozesses zu einer intrazellulären Akkumulation des Enzyms führt (Koepke *et al.*, 2011; Stock *et al.*, 2012).

### 1.3 Septine

Die Proteinfamilie der Septine wurde als erstes in einer Untersuchung nach Temperatursensitiven Mutanten in *S. cerevisiae* identifiziert. Sie fielen in eine Gruppe von Mutanten, die einen Zellzyklus Defekt aufwiesen und wurden daher als Cdc (*cell division cycle*) bezeichnet (Hartwell, 1971; Hartwell, 1978). Die Mutation in einer der vier gefundenen Septine Cdc3, Cdc10, Cdc11 und Cdc12 verhinderte die Zytokinese, was zu einer Akkumulation von langen, multinuklearen Zellen in den konditionellen Mutanten bei restriktiver Temperatur führte (Adams und Pringle, 1984). Nach ihrer Funktion während der Septenbildung und Zellteilung erhielten die stark konservierten Proteine später den Namen „Septine“ (Longtine *et al.*, 1996). Weiterführende elektronenmikroskopische Analysen zeigten eine Lokalisation aller Septine in einem filamentösen Band um den Knospenhals der sich teilenden Hefezelle. Die Inaktivierung eines Septins führte zum Verlust der Filamente am Knospenhals (Byers und Goetsch, 1976). Mittels Immunofluoreszenz konnte gezeigt werden, dass Septine die strukturelle Komponente des Knospenhalses sind (Haarer und Pringle, 1987; Kim *et al.*, 1991). Phylogenetische

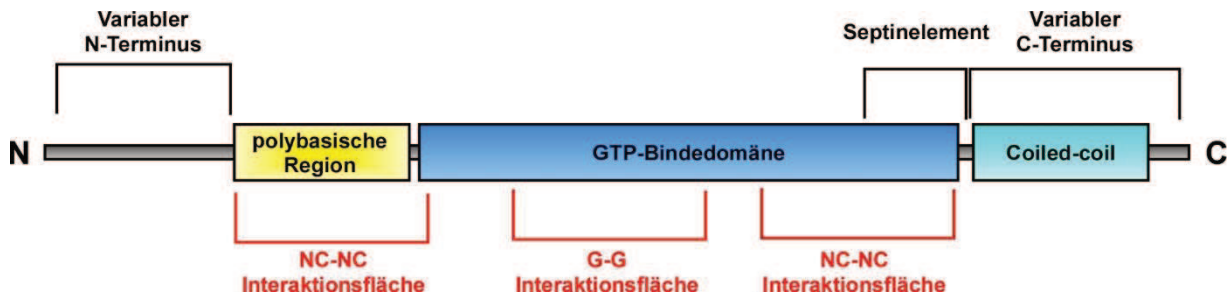
Untersuchungen ergaben, dass Septine in Pilzen, Tieren und Protisten, aber nicht in Pflanzen vorkommen (einzige Ausnahme Grünalgen, *Chlorophyta*, (Nishihama *et al.*, 2011; Pan *et al.*, 2007). Jedoch variiert die Anzahl der Septine zwischen den Organismen (Kinoshita, 2003; Nguyen *et al.*, 2000). Während *Chlamydomonas reinhardtii* ein Septin besitzt (Sep1), kommen in *Caenorhabditis elegans* zwei Septine (UNC-59 und UNC-61), in *S. cerevisiae* sieben Septine (Cdc3, Cdc10, Cdc11, Cdc12, Shs1, Spr3 und Spr 28), in *D. melanogaster* fünf Septine (Pnut, Sep1, Sep2, Sep4 und Sep5) und in Säugern 13 Septin Mitglieder (SEPT1-SEPT12 und SEPT14) vor (Hall *et al.*, 2005; Kinoshita, 2003). Die Anzahl der Septine in Säugetieren wird durch die Expression von verschiedenen Isoformen, die durch alternatives Spleißen entstehen und unterschiedliche Funktionen besitzen können, weiter erhöht (Estey *et al.*, 2011; Hall und Russell, 2004). Es gibt mehrere Klassifikationssysteme, um Septine einer bestimmten Gruppe zuzuordnen. Septine aus Säugetierzellen können anhand von Sequenzhomologie, wie zum Beispiel der strukturellen Ähnlichkeit und Anzahl der *Coiled-coil* Domänen, in vier Gruppen eingeteilt werden (Kinoshita, 2003). Diese vier Gruppen sind nicht ortholog zu den Septinen, die während des vegetativen Wachstums in *S. cerevisiae* exprimiert werden, zeigen aber strukturelle Ähnlichkeiten (Pan *et al.*, 2007; Versele und Thorner, 2005). Daher wurde von Pan und Mitarbeiter ein weiteres Fünf-Gruppen-System entwickelt, wobei die Gruppen 1 und 2 pilzliche und tierische Septine, Gruppe 3 und 4 pilzliche und microsporidiale Septine und Gruppe 5 nur pilzliche Septine beinhaltet (Pan *et al.*, 2007).

### 1.3.1 Struktur und Funktionen der Domänen von Septinen

Septine gehören zu den *P-loop*-enthaltenen Guanosintriphosphat (GTP) -bindenden Proteinen (Leipe *et al.*, 2002), deren generelle Struktur in Abbildung 1.5 gezeigt ist. Sie besitzen eine zentrale GTP-Bindedomäne, welche durch variable Amino (N)- und Carboxy (C)-Termini flankiert ist. Der N-Terminus zeigt keine Ähnlichkeit zwischen den Septinen, mit der Ausnahme der polybasischen Region, die vor der GTPase-Domäne liegt und an Phospholipide binden kann (Casamayor und Snyder, 2003; Zhang *et al.*, 1999). Charakteristisch für den C-terminalen Anhang (*C-terminal extension*, CTE) ist meist ein Segment, welches typisch für eine *Coiled-coil* Domäne ist (Harbury *et al.*, 1995; Parry *et al.*, 2008; Sirajuddin *et al.*, 2007; Weirich *et al.*, 2008). Es wird vermutet, dass die *Coiled-coil* Domäne für eine Interaktion mit anderen Septinen oder Proteinen benötigt wird (Casamayor und Snyder, 2003; Versele und Thorner, 2005). Die Länge dieser *Coiled-coil*



Region variiert zwischen den Septinen, wobei einigen Septinen wie zum Beispiel Cdc10, SEPT3, SEPT9 und SEPT12 diese Region vollständig fehlt (Versele *et al.*, 2004; Weirich *et al.*, 2008). Septine besitzen außerdem ein einzigartiges Septinelement, wodurch sie sich von den anderen Mitgliedern der *P-loop*-enthaltenden GTPasen unterscheiden (Pan *et al.*, 2007; Steels *et al.*, 2007; Versele und Thorner, 2004).



**Abbildung 1.5: Schematische Darstellung der Domänen eines Septins.** Die zentrale GTP-Bindedomäne wird von variablen N- und C-Termini flankiert. Die polybasische Region kann mit Phospholipiden interagieren. Im C-Terminus befindet sich meist eine *Coiled-coil* Domäne. Das Septinelement unterscheidet die Septine von den anderen Gruppen der *P-loop*-enthaltenden GTPasen. Die NC- und G-Interaktionsflächen sind in rot dargestellt (Abbildung in Anlehnung an Fung, 2014).

Jedes Septin besitzt eine Ras-verwandte GTP-Bindedomäne mit konservierten Motiven (Sirajuddin *et al.*, 2007) (Abb. 1.7). Das *P-loop*- oder G1-Motiv mit der Konsensussequenz GxxGxGKST stellt den Kontakt zum  $\alpha$ - und  $\beta$ -Phosphat des GTPs her. In dem G2-Motiv kommt es nach Bindung des GTPs zu einer Konformationsänderung durch die Veränderung der Orientierung eines kritischen Threonin-Restes. Das G3-Motiv (DxxG) ist an der Bindung von  $Mg^{2+}$  und dem  $\gamma$ -Phosphat des GTPs beteiligt während das G4-Motiv (xKxD) zuständig für die Erkennung des Guaninrings ist (Sprang, 1997). Die Rolle der GTP-Bindedomäne und die Funktion der Hydrolyse sind nicht komplett geklärt, da kontroverse Studien vorliegen. Field und Mitarbeiter zeigten, dass Septine aus *D. melanogaster* mit GTP zusammen aufgereinigt werden konnten und eine GTPase Aktivität besaßen (Field *et al.*, 1996). Dies wurde ebenfalls in Säugern und Hefe bestätigt (Farkasovsky *et al.*, 2005; Sheffield *et al.*, 2003). Im Gegensatz dazu enthält der *C. elegans* Septinkomplex kein GTP (John *et al.*, 2007). Die verschiedenen Septine aus *S. cerevisiae* sind alle in der Lage GTP zu binden und eine Mutation in der *P-loop* oder G4-Motivsequenz hat einen Effekt auf die GTP-Bindung, was zu Temperatur-sensitiven Defekten in der Lokalisation und Funktion der Septine führt. Jedoch wird die GTP-Hydrolyse nicht benötigt, um Septinkomplexe, wie zum Beispiel Filamente, zu bilden (Farkasovsky *et al.*, 2005; Field *et al.*, 1996; Kinoshita *et al.*, 2004; Sirajuddin *et al.*, 2007). Außerdem laufen die GTP-Hydrolyse und der Austausch von GTP zu GDP so langsam ab, dass diese Prozesse *in vivo* wahrscheinlich eine geringe Rolle in der

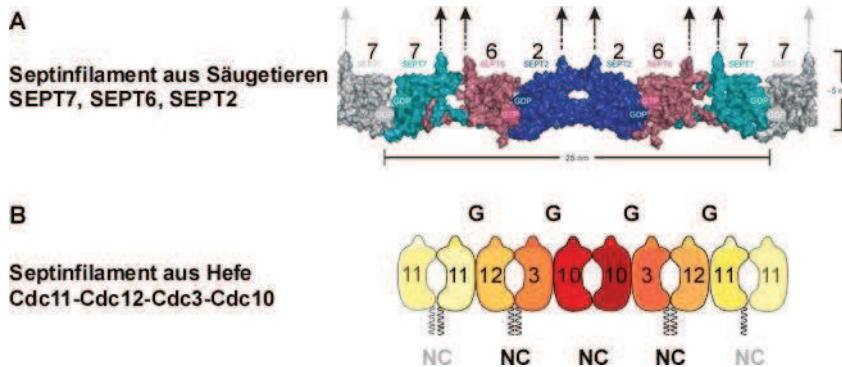


Septindynamik spielen (Vrabioiu *et al.*, 2004). Des Weiteren gibt es auch Septine, denen ein konservierter Threonin-Rest, welcher an der GTP-Hydrolyse beteiligt ist, fehlt (Brausemann *et al.*, 2016; Sirajuddin *et al.*, 2009; Versele und Thorner, 2004). Dennoch gibt es mehrere Beispiele, bei denen Septinmutanten, die kein GTP mehr binden können, eine veränderte Bildung, Erscheinung, subzelluläre Lokalisation und Funktion aufwiesen (Casamayor und Snyder, 2003; Hanai *et al.*, 2004; Kinoshita *et al.*, 1997; Robertson *et al.*, 2004; Steels *et al.*, 2007).

### 1.3.2 Der Septinkomplex

Die erste biochemische Charakterisierung von Septinen aus *D. melanogaster* zeigte, dass Septine einen heteromeren Komplex bilden, mit jeweils zwei Kopien von Pnut, Sep1 und Sep2 (Field *et al.*, 1996; Oegema *et al.*, 1998). Der Septinkomplex aus *S. cerevisiae* wurde anschließend als ein palindromisches Oktamer identifiziert, der die gleichen Anteile von Cdc3, Cdc10 und Cdc12 und entweder Cdc11 oder Shs1 aufwies (Bertin *et al.*, 2008; Frazier *et al.*, 1998; Mortensen *et al.*, 2002)(Abb. 6B). Cdc11 und sein Paralog Shs1 konkurrieren dabei um die terminalen Positionen des Oktamers (Bertin *et al.*, 2008; Finnigan *et al.*, 2015a; Garcia *et al.*, 2011). Ähnliche Komplexe wurden auch aus *Candida albicans* isoliert (Kaneko *et al.*, 2004). Da Säugetiere 13 verschiedene Septine besitzen, gibt es hier die Möglichkeit, größere und komplexere Strukturen zu bilden. Je nach Gewebe und Zelltyp konnten unterschiedliche Komplexe isoliert werden. Zum Beispiel wurde in einer biochemischen Isolation von Septinen aus Hirngewebe, ein Komplex aus drei Septinen SEPT3, SEPT5 und SEPT7 aufgereinigt (Lukoyanova *et al.*, 2008), während in Isolaten aus HeLa Zellen oktamerische Komplexe gefunden wurden (Kim *et al.*, 2011). Die molekulare Struktur eines Septinkomplexes wurde mit Hilfe von Röntgenkristallographie der rekombinanten Septine SEPT2, SEPT6 und SEPT7 aufgeklärt (Sirajuddin *et al.*, 2007). Zusätzlich wurde dieses Jahr die erste Kristallstruktur des Septins Cdc11 aus *S. cerevisiae* veröffentlicht (Brausemann *et al.*, 2016). Der Septinkomplex der rekombinanten Septine zeigte ebenfalls eine palindromische Struktur SEPT7- SEPT6 - SEPT2 - SEPT2 - SEPT6 - SEPT7 ähnlich zu den Oktameren aus Hefe. Mithilfe dieser Struktur war es möglich, Interaktionsschnittstellen zwischen den einzelnen Septinen aufzudecken (Sirajuddin *et al.*, 2007). Die Interaktionschnittstelle zwischen der GTP-Bindedomäne zweier Septine wurde dabei als G-Interaktionsfläche und die Wechselwirkungen zwischen dem N- und C-Termini als NC-Interaktionsfläche bezeichnet (Abb. 1.5 und Abb. 1.6) (Sirajuddin *et al.*, 2007). Diese

Komplexbildung kann am besten durch das *Jelly Bean* Modell visualisiert werden (Abb. 1.6B).



**Abbildung 1.6: Struktur der Septinfilamente aus Säugetieren mit vereinfachter Darstellung des Septinfilaments aus Hefe als *Jelly Bean* Modell.** (A) Abbildung der Oberflächen des basischen Hexamers (farbig). Das benachbarte Hexamer wird über SEPT7 verbunden (grau), wodurch sich Septinfilamente ausbilden. Der Nukleotidstatus ist in den Untereinheiten abgebildet. Die Orientierung der C-terminalen Verlängerung, gekennzeichnet als Pfeile, bildet vermutlich *Coiled-coil* Strukturen aus (Abbildung mit Genehmigung und Veränderungen aus (Sirajuddin *et al.*, 2007)). (B) Schematische Darstellung des Septinfilaments aus Hefe in Anlehnung an das *Jelly Bean* Modell von Kim *et al.*, 2011 angepasst auf die Hefeseptine. Das Septinfilament wird über die Verknüpfung mehrerer Heterooktamere über Cdc11 verlängert. Die NC- und G- Interaktionsflächen sind dargestellt.

Kim und Mitarbeiter untersuchten eine SEPT2 Mutante, die in der Lage war, Homopolymere zu bilden. Durch diese Untersuchung konnte festgestellt werden, dass Septinuntereinheiten vermutlich zuerst durch die Interaktion ihrer G-Interaktionsfläche zu Heterodimeren zusammengesetzt werden, die dann durch NC-Interaktionen heterooktamere Protofilamente ausbilden (Kim *et al.*, 2012). Septine aus Säugetieren, die nicht in der Lage sind eine funktionelle G-Interaktionsfläche auszubilden, können *in vivo* auch keine Dimerisierung durch die NC-Interaktionsfläche ausbilden. NC-Mutanten können jedoch weiterhin über die G-Interaktionsfläche Dimere bilden (Kim *et al.*, 2012; McMurray *et al.*, 2011b). Ähnliches konnte auch in früheren *in vitro* Studien von SEPT2 gezeigt werden. Wenn die G-Interaktionsfläche durch die Störung der GTP-Hydrolyse beeinträchtigt ist, kann die NC-Interaktionsfläche eine nicht native Konformation einnehmen, in der keine Dimerisierung mehr stattfinden kann (Nagaraj *et al.*, 2008; Sirajuddin *et al.*, 2009; Weems *et al.*, 2014). Somit kann die G-Interaktionsfläche die benachbarte NC-Interaktionsfläche durch Konformationsänderungen beeinflussen, wodurch die Interaktion verändert werden kann (Finnigan *et al.*, 2015a; Sirajuddin *et al.*, 2009). In neuen Studien von Weems und Mitarbeitern wurde ein semi-geordneter Zusammenbau von Septinen aus Hefe beschrieben. Demnach kommt es zunächst zu einer Nukleotid-unterstützten Bildung von G-Heterodimeren (Cdc3-Cdc10 und Cdc11-Cdc12) mit gleichzeitiger Nukleotid-unabhängigen Bildung der NC-Interaktionsfläche Cdc3-Cdc12, gefolgt von einer NC-

Homodimerbildung der Tetramere in Oktamere Cdc11-Cdc12-Cdc3-Cdc10-Cdc10-Cdc3-Cdc12-Cdc11. Außerdem zeigte diese Studie, dass viele Mutationen in der G-Interaktionsfläche zu einer Temperatursensitivität führen und mutierte Proteine in einer nicht nativen Konformation gefangen sind (Weems *et al.*, 2014).

### 1.3.3 Septinstrukturen

Die oben beschriebenen heteromeren Strukturen werden als Bausteine für höhergeordnete Strukturen angesehen. Septinfilamente werden mit großer Wahrscheinlichkeit durch das Verbinden von Oligomeren an den Enden gebildet, während Filamentbündel durch laterale Interaktion der Polymere entstehen können (Fung *et al.*, 2014). Die Bildung von Septinfilamenten am Knospenhals der Mutter- und Tochterzelle in *S. cerevisiae* ist schon lange bekannt (Byers und Goetsch, 1976). Ähnliche Strukturen konnten auch an der Hyphenspitze von *C. albicans* gefunden werden (DiDomenico *et al.*, 1994). Die Möglichkeit, dass es sich bei den Filamenten um Komponenten des Zytoskeletts handeln könnte, wurde nach der Isolation und Aufreinigung von Septinen aus *D. melanogaster* vermutet. Pnut, Sep1 und Sep2 konnten *in vitro* Polymere bilden, die einen Durchmesser von 7-9 nm besaßen (Field *et al.*, 1996). Es wurden ebenfalls Septinkomplexe aus *S. cerevisiae* (Frazier *et al.*, 1998), aus Hirnzellen von Ratten (Hsu *et al.*, 1998) und aus HeLa Zellen (Kinoshita *et al.*, 2002) aufgereinigt und alle zeigten die Fähigkeit, *in vitro* Filamente mit 7-9 nm Durchmesser bilden zu können. Die Länge der Filamente konnte in den meisten Fällen durch eine Verminderung der Salzkonzentration erhöht werden (Frazier *et al.*, 1998; Versele *et al.*, 2004). Außerdem führte eine längere Inkubation unter diesen Bedingungen zu einem lateralen Bündeln der gepaarten Filamente (Bertin *et al.*, 2008). Die Polymerisierung der Filamente konnte weiterhin durch die Anwesenheit von Lipidmonolayer, welche Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PI(4,5)P<sub>2</sub>) oder Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat (PI(3,4,5)P<sub>3</sub>) beinhalteten, erhöht werden (Bertin *et al.*, 2010). Die Fähigkeit, Filamente auszubilden, wird für die Durchführung von einigen essentiellen Funktionen benötigt (McMurray *et al.*, 2011b). Während der Interphase von Säugerzellen bilden Septine filamentöse Strukturen aus, die teilweise mit Aktinstrukturen kolokalisieren (Kinoshita *et al.*, 1997). Als Adapterprotein fungiert Annilin, welches *in vitro* Septine an Aktin rekrutieren kann (Kinoshita *et al.*, 2002; Oegema *et al.*, 2000). Die Filamentbildung von SEPT9 in menschlichen Epithelzellen ist abhängig von einer Interaktion mit Mikrotubuli und einer funktionellen GTP-Bindedomäne (Nagata *et al.*, 2003). Auch für

SEPT11 konnte eine Kollokalisierung mit Mikrotubuli und Aktin-Stressfilamenten in HMEC und REF52 Zellen gezeigt werden (Hanai *et al.*, 2004). Der genaue Mechanismus, der für die Bildung von höher-geordneten Strukturen benötigt wird, ist jedoch weitgehend unklar. Es wurden verschiedene Proteine gefunden, die als Regulatoren eine Rolle spielen könnten. Zum einen sind es Proteine der Borg Familie, welche direkt mit Septinen interagieren können (Joberty *et al.*, 2001). Borg3 kann an die *Coiled-coil* Domänen des SEPT6-SEPT7 Heteromers binden und eine Überexpression dieses Proteins führt zu verlängerten und vergrößerten Septinfilamenten (Joberty *et al.*, 2001; Sheffield *et al.*, 2003). Zum andern kann eine weitere Regulation über posttranslationelle Modifikationen der Septine stattfinden (Hernandez-Rodriguez und Momany, 2012; McMurray und Thorner, 2009). In *S. cerevisiae* ist zum Beispiel die Aktivierung der Septindynamik am Anfang des Zellzyklus abhängig von einer Dephosphorylierung von Shs1 (Dobbelaere *et al.*, 2003). Des Weiteren spielt die Phosphorylierung der Septine durch Cla4 und Gin4 eine wichtige Rolle bei der Initiation und der Stabilisierung von Filamenten während der Knospung (Dobbelaere *et al.*, 2003; Versele und Thorner, 2004; Versele und Thorner, 2005). Die Phosphorylierung von Cdc3 aus *S. cerevisiae* durch die Kinase Cdc23 ist notwendig für den Abbau des Septinrings, zwischen Mutter und Tochterzelle am Ende der G1 Phase (Tang und Reed, 2002). Neben Phosphorylierung kann auch SUMOylierung bei der Regulation von Septinen eine Rolle spielen. Die Konjugation von SUMO an Cdc3, Cdc11 und Shs1 ist essentiell für die Lebensfähigkeit der Hefezellen und wird für den Eintritt in die Mitose benötigt (Johnson und Blobel, 1999). Ferner wird angenommen, dass Septine in der Lage sind, sich selbst regulieren zu können (Fung *et al.*, 2014). Dies kann durch die oben beschriebene Hydrolyse von GTP oder Mutationen, die zur Bildung von Homodimeren führen (Kim *et al.*, 2012; Mendoza *et al.*, 2002), kontrolliert werden.

### 1.3.4 Funktion von Septinen

Septine sind an einer Reihe von verschiedenen Prozessen wie Zellteilung, Neuronalentwicklung oder Pflanzeninversion durch pilzliche Pathogene beteiligt (Beise und Trimble, 2011; Bridges und Gladfelter, 2014). Sie kontrollieren die Zytokinese, wobei ihre genaue Rolle nicht komplett geklärt ist. Die Zerstörung des Septums in Hefe führt zu einer verspäteten Zytokinese und nicht zu einem kompletten Abbruch der Zellseparation (Faty *et al.*, 2002; Wloka *et al.*, 2011). Im Gegenteil dazu beeinflusst die Störung der Septinfunktion die Zytokinese (Adams und Pringle, 1984; Frazier *et al.*, 1998). Daher

werden den Septinen in Hefe verschiedene mögliche Rollen zugesprochen. Zum einen dienen Septine als Gerüst, an welches andere Proteine rekrutiert oder aktiviert werden können (Field und Kellogg, 1999). Zum Beispiel werden Septine in *S. cerevisiae* für die Ausbildung des Aktomyosinrings an der Teilungszone von Mutter- und Tochterzelle benötigt (Longtine und Bi, 2003; Tolliday *et al.*, 2001). Zum anderen haben Septine die Aufgabe eine Barriere zwischen zellulären Kompartimenten zu schaffen (Barral, 2010). Dadurch kann in *S. cerevisiae* eine Kompartimentierung zwischen Mutter- und Tochterzelle aufgebaut werden, wodurch bestimmte Proteine auf eine Seite der Zelle beschränkt werden. Beispielsweise wird eine Diffusionsbarriere an der Knospungsstelle aufgebaut, um die Bewegung der Kernporenkomplexe nur auf die Tochterzelle zu begrenzen (Shcheprova *et al.*, 2008). Auch in Säugetieren sind Septine für die Ausbildung einer Diffusionsbarriere wichtig. Septine akkumulieren an dendritischen Dornfortsätzen, an denen die Diffusionsbarriere für die Aufteilung von Membran-assoziierten Proteinen und Transmembranproteinen benötigt wird (Ashby *et al.*, 2006; Xie *et al.*, 2007). Außerdem sind Septine an der Bildung einer ringähnlichen Diffusionsbarriere an der Basis von primären Zilien verwickelt (Hu *et al.*, 2010; Hu und Nelson, 2011).

Eine weitere zentrale Rolle der Septine findet sich auch bei der Membranorganisation und dem Vesikeltransport (Bridges *et al.*, 2016; Byers und Goetsch, 1976; Heasley und McMurray, 2016; Mostowy und Cossart, 2012; Saarikangas und Barral, 2011; Tanaka-Takiguchi *et al.*, 2009). Sie können möglicherweise die Flexibilität der Membran, durch ihre direkte Bindung an Phospholipide, beeinflussen. Es wurde gezeigt, dass aufgereinigte Septine eine Affinität für PI(4)P, PI(4,5)P<sub>2</sub> und PI(3,4,5)P<sub>3</sub> besitzen (Zhang *et al.*, 1999). In *vitro* können Septine die Form von Membranen, durch die Assoziation mit Lipiden, stark verändern. Nachdem unilamellaren Liposomen rekombinante Septinkomplexe zugesetzt wurden, bildeten sich aus den Liposomen tubuläre Strukturen aus, bis die komplette Oberfläche in Röhrchen umgewandelt wurde. Elektronenmikroskopische Bilder zeigten, dass die Röhrchen mit Septinfilamenten gebündelt vorlagen (Tanaka-Takiguchi *et al.*, 2009). In Säugern führt die Reduktion des gesamten PI(4,5)P<sub>2</sub>-Gehalts zu einem Verlust von SEPT4 Filamenten (Casamayor und Snyder, 2003; Zhang *et al.*, 1999). Außerdem ist die Assoziation von Septinen an Phospholipiden wichtig für die Bildung und Aufrechterhaltung von Membrandomänen, die für die Kompartimentierung der Hefezelle während Interphase und Mitose benötigt werden (Barral, 2010; Spiliotis und Nelson, 2006). Neuste Studien

deuten darauf hin, dass pilzliche und menschliche Septine in der Lage sind, verschiedene Stufen einer minimalen Krümmung der Plasmamembran in Zellen zu erkennen. Dadurch wird vermutet, dass die Erkennung der Krümmung eine fundamentale Eigenschaft des Septin-Zytoskeletts darstellt, um der Zelle einen Mechanismus zu bieten, ihre lokale Form erkennen zu können (Bridges *et al.*, 2016). Septine können auch mit Komponenten des Exocyst-Komplexes interagieren. Bei Koimmunopräzipitationsexperimenten von Sec8, einer Komponente des Exocyst-Komplexes aus Ratten, wurden verschiedene Septine gefunden, die ebenfalls eine Kolo-kalisation mit dem Exocyst-Komplex zeigten (Hsu *et al.*, 1998). Kurze Zeit später wurde SEPT5 als SNARE Interaktionspartner gefunden. SEPT5 wird im Säugetiergehirn exprimiert und ist dort durch die Interaktion mit der SNARE Domäne von Syntaxin 1A mit Vesikeln und Membran assoziiert. Vermutlich reguliert SEPT5 die Verfügbarkeit der SNARE Proteine und spielt somit eine Rolle in der Regulation der SNARE Funktion (Beites *et al.*, 2005; Beites *et al.*, 1999).

### 1.3.5 Septine in Pilzen

Die Sequenz und Funktionen von Septinen sind auch zwischen verschiedenen Pilzen konserviert, allerdings gibt es einige Unterschiede und Einzigartigkeiten in ihrer Funktion, die der Natur jedes Organismus zugrunde liegt (González-Novo *et al.*, 2009). Während in *S. cerevisiae* Cdc3 und Cdc12 für die Zellteilung essentiell sind, (Frazier *et al.*, 1998) sind alle vier Septine Spns1-4 in *Schizosaccharomyces pombe* unbedeutend für das Überleben der Zelle (An *et al.*, 2004; Longtine *et al.*, 1996; Tasto *et al.*, 2003). Die Deletion führt aber auch hier zu einer verzögerten Zellteilung und zudem zu einem kettenartigen Wachstumsphänotyp (Berlin *et al.*, 2003). In *Neurospora crassa* ist keines der gesamten sechs Septine essentiell. Die Deletion der vier Hauptseptine führt ebenfalls zu einem verlangsamten Wachstum und zu Defekten in der Septen- und Konidienbildung (Berepiki und Read, 2013). Während Shs1 aus *S. cerevisiae* für die Ringbildung entbehrlich ist, sind alle fünf Septine aus *Ashbya gossypii* für eine Ringbildung von Bedeutung (Garcia *et al.*, 2011; Helfer und Gladfelter, 2006; Iwase *et al.*, 2007; Kaufmann und Philippsen, 2009; McMurray *et al.*, 2011a). Außerdem werden Septine dort für die Septenbildung und die asexuelle Sporenbildung benötigt (Gladfelter, 2006). Im Gegensatz zu *S. cerevisiae* bestehen Septinringe in *A. gossypii* an Verzweigungsstellen aus Stangen, die unabhängig vom Zellzyklus sind (DeMay *et al.*, 2009). Die fünf Septine in *Aspergillus nidulans* oder *Aspergillus fumigatus* werden ebenfalls für die Septen- und Konidienbildung benötigt

(Lindsey *et al.*, 2010; Vargas-Muniz *et al.*, 2015). Wie in *S. cerevisiae* sind auch CDC3 und CDC12 aus *C. albicans* für das hyphale Wachstum essentiell. Infektionsstudien haben gezeigt, dass eine Deletion von CDC10 oder CDC11 zu einer veränderten Morphologie und zu einer abgeschwächten Virulenz in einem Mausmodell als Wirt führt (Warenda *et al.*, 2003). Auch die Deletionsstämme von *cdc3* und *cdc12* in *Cryptococcus neoformans* zeigen eine reduzierte Virulenz im heterologen Wirt *Galleria mellonella* (Kozubowski und Heitman, 2010). In *Magnaporthe grisea* führt die Deletion von *sep3*, einem Ortholog des Aspergillusseptins AspB, zu einem kompletten Verlust der Pathogenität. Außerdem konnte eine Veränderung der Keimschlauch- und Appressoriumbildung festgestellt werden, die den Verlust der Pathogenität erklären könnte (Dagdas *et al.*, 2012).

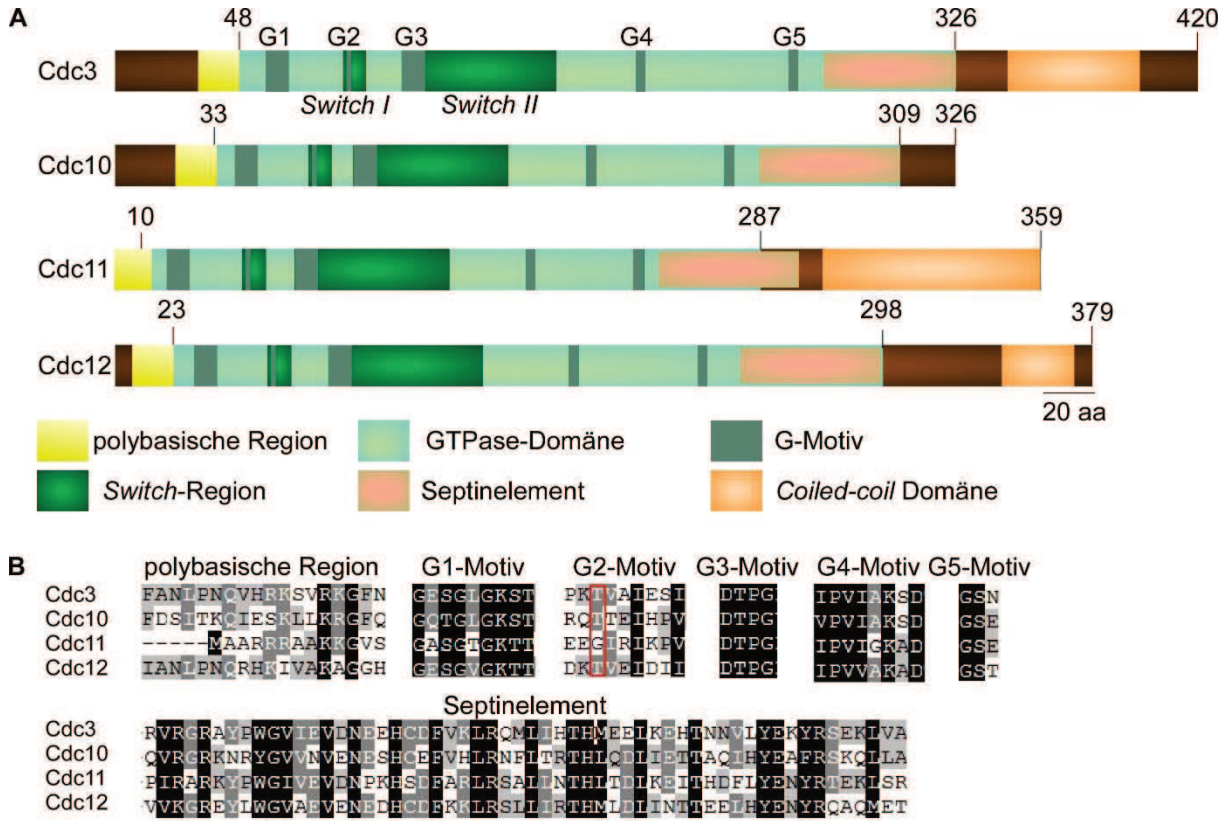
### 1.3.6 Septine in *U. maydis*

Das Genom von *U. maydis* kodiert für vier Septine: Cdc3, Cdc10, Cdc11 und Cdc12 (Abb. 1.7). Ein klares Ortholog zu Shs1 aus *S. cerevisiae* gibt es nicht (Alvarez-Tabares und Perez-Martin, 2010; Böhmer *et al.*, 2009). In einer Studie von Boyce und Mitarbeiter wurde Cdc11 aus *U. maydis* näher untersucht. Sie stellten fest, dass die Deletion von *cdc11* zu einer veränderten Zellmorphologie und Zellteilung in Sporidien führt. Die Paarung von *cdc11* Deletionsstämmen ist jedoch nicht gestört. Des Weiteren resultiert die Deletion von *cdc11* in einer reduzierten Pathogenität des Pilzes (Boyce *et al.*, 2005).

Eine genauere Analyse aller vier Septine wurde von Alvarez-Tabares und Martin durchgeführt (Alvarez-Tabares und Perez-Martin, 2010). Sie bestimmten die subzelluläre Lokalisation der Septine, die in einem Ring am Knospenhals, in bandartigen Strukturen an der Wachstumsspitze und in langen Filamenten, welche durch die gesamte Zelle am Zellkortex verlaufen, zu finden waren. Die Filamente konnten jedoch nur mit der Reporterfusion Cdc10-Gfp beobachtet werden und zeigten teilweise eine Kolo­kalisierung mit Mikrotubuli. Eine Analyse aller Septin-Deletionsmutanten ergab auch hier eine Beteiligung an der Morphogenese, da die Zellen kürzer waren und eine gestörte Polarität aufwiesen. Im Gegensatz zu früheren Studien konnte hier kein Einfluss auf die Virulenz der Deletionsstämme gezeigt werden (Alvarez-Tabares und Perez-Martin, 2010).

In Studien unserer Arbeitsgruppe wurde das Septin Cdc3 in *U. maydis* näher charakterisiert (Baumann *et al.*, 2014). Dabei wurde der Fokus auf die hyphale Form des Pilzes und den Zusammenhang von Septinen und dem endosomalen RNA-Transport durch Rrm4 gelegt.

Der Verlust von *cdc3* führt zu einer Erhöhung des bipolaren Wachstums, was eine Rolle von Cdc3 in der Etablierung der Polarität anzeigt. Eine N-terminale Fusion von Cdc3 mit Gfp konnte in Ringen, am Septum, in Filamenten und in einer neuen Lokalisation, auf sich bewegenden Endosomen, gefunden werden.



**Abbildung 1.7: Darstellung der Struktur der *U. maydis* Septine.** (A) Schematische Darstellung der verschiedenen Regionen in den *U. maydis* Septinen. Die Farbe der jeweiligen Region ist unten dargestellt. Zahlen markieren die Position der entsprechenden Aminosäure. (B) Sequenzvergleich der polybasischen Region, G-Motiven und des Septinelements der vier Septine (Domänenstruktur anhand von Blast Datenbank <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Dabei sind die Anwesenheit von Cdc3 auf Rrm4-positiven Endosomen und der Gradient an der Hyphenspitze von Rrm4-abhängig. Außerdem konnte gezeigt werden, dass die *cdc3* mRNA gleichzeitig mit dem Protein auf Endosomen transportiert wird. Die mRNA-Lokalisation auf Endosomen ist notwendig für die Lokalisation des Proteins auf Endosomen. Da ebenfalls translationell aktive Ribosomen transportiert werden, wurde die Hypothese aufgestellt, dass es sich hier um eine lokale Translation der mRNA auf Endosomen handelt, die vermutlich für einen Einbau von Septinen in Filamente wichtig sein könnte (Baumann *et al.*, 2014; Higuchi *et al.*, 2014; Palacios, 2014). Zusätzlich wurde ein weiteres Septin Cdc12 ebenfalls auf Endosomen gefunden, was vermuten lässt, dass es einen Zusammenbau von Septinen auf der Oberfläche von Endosomen geben kann (Baumann *et al.*, 2014).



## 1.4 Zielsetzung dieser Arbeit

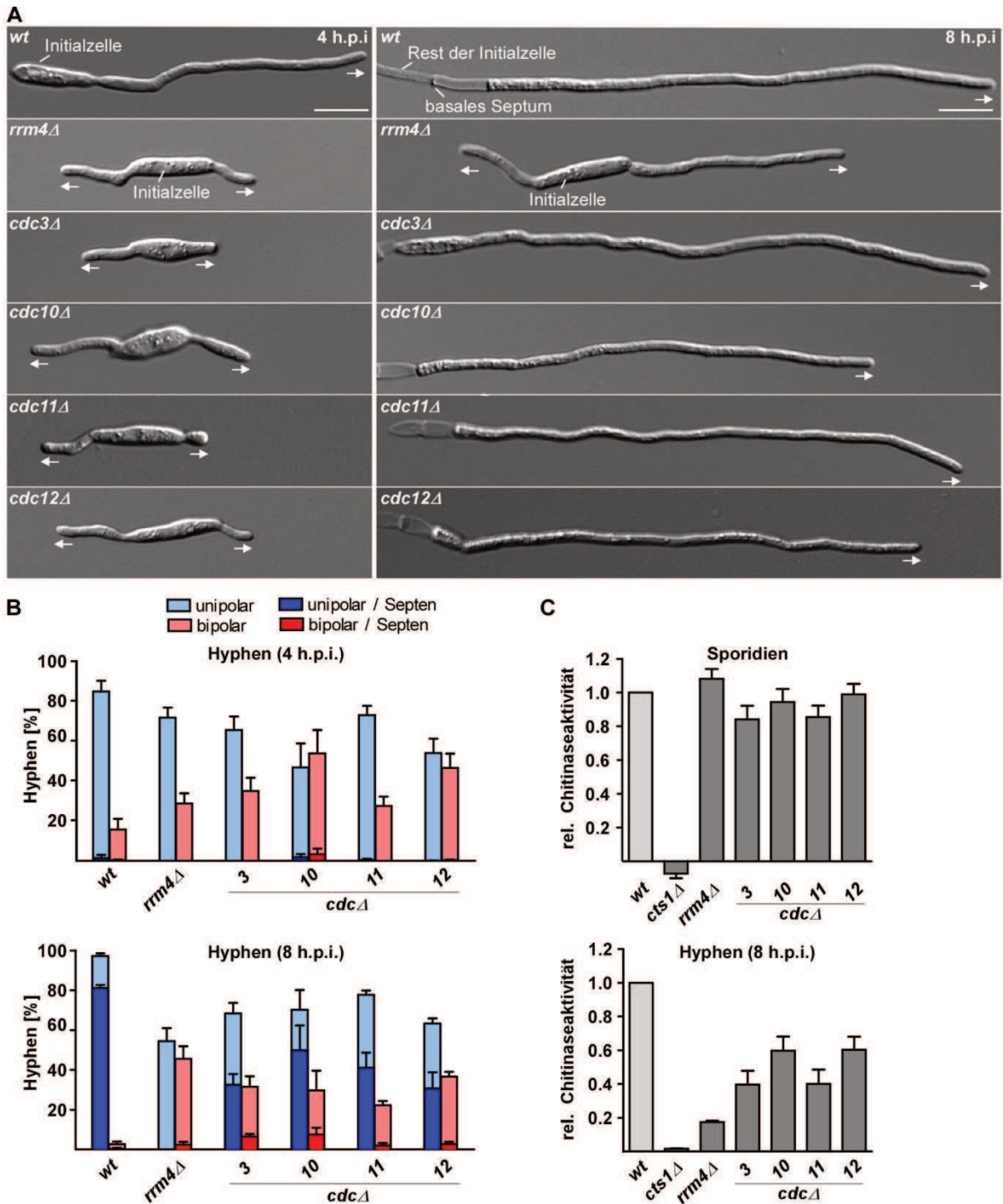
In den vorangegangenen Studien wurde das Septin Cdc3 in *U. maydis* untersucht und charakterisiert. Es konnte gezeigt werden, dass sowohl die mRNA als auch das Protein Mikrotubuli-abhängig auf Rrm4-positiven Endosomen transportiert wird. Da sich mRNA, Protein und translationell aktive Ribosomen auf den gleichen Endosomen befanden, wurde vermutet, dass es sich um eine lokale Translation des Septins *cdc3* auf Endosomen handelt. Im Genom von *U. maydis* werden insgesamt vier Septine Cdc3, Cdc10, Cdc11 und Cdc12 kodiert, welche in dieser Arbeit näher analysiert werden sollten. Dafür sollten genaue genetische und zellbiologische Untersuchungen Aufschluss über die Lokalisation und Interaktion der vier Septine in *U. maydis* geben. Der Fokus sollte dabei auf das hyphale Wachstum gelegt werden.

Darüber hinaus sollte die Funktion des endosomalen Transports von Septin-mRNA und Protein analysiert werden. In UV-Quervernetzungsexperimenten von dem RNA-bindenden Protein Rrm4 wurden alle Septin-mRNAs als potentielle Ziel-mRNAs gefunden. Durch RNA-Lebendzell Mikroskopie sollte daher die Lokalisation aller Septin-mRNAs geklärt und ihre Abhängigkeit von Rrm4 analysiert werden. Ebenfalls sollte der Transport der Septine auf Protein-Ebene untersucht werden, um den Nutzen des Transports für Septinproteine herauszufinden. Der Transport und die lokale Translation der Septine auf Endosomen könnten einen neuen Weg für den Zusammenbau von Septinkomplexen darstellen.

## 2. Ergebnisse

### 2.1 Septine sind wichtig für das filamentöse Wachstum und die Sekretion von Cts1

Durch genetische Analyse konnte gezeigt werden, dass das Septin Cdc3 während der Etablierung des unipolaren Wachstums von *U. maydis* wichtig ist (Baumann *et al.*, 2014). Um herauszufinden, ob die anderen drei Septine Cdc10, Cdc11 und Cdc12 eine gemeinsame Funktion in *U. maydis* besitzen, wurden Deletionsmutanten im genetischen Hintergrund von AB33 hergestellt. Durch die Wahl des Ausgangsstammes AB33 kann die Bildung von Hyphen in allen Stämmen durch einen Wechsel der Stickstoffquelle induziert werden (Brachmann *et al.*, 2001). Das Wachstum von Hyphen der verschiedenen Deletionsmutanten wurde vier und acht Stunden nach Induktion (*hours post induction*, h.p.i.) mikroskopisch untersucht. Dabei wurde das Hyphenwachstum anhand unterschiedlicher Kriterien quantifiziert. Unterschieden wurde zwischen unipolaren, bipolaren sowie septierten Zellen. Ähnlich zu den schon beschriebenen Deletionsphänotypen von *rrm4* (Becht *et al.*, 2006) und *cdc3* (Baumann *et al.*, 2014), führte der Verlust von *cdc10*, *cdc11* und *cdc12* zu einem gestörten hyphalen Wachstum nach den ersten vier Stunden (Abb. 2.1 A-B). Die höchste Rate an bipolaren Zellen wies die Deletionsmutante von *cdc10* mit fast 60%, gefolgt von der *cdc12* Mutante mit 50% bipolaren Zellen, auf. In der späteren Phase des hyphalen Wachstums (8 h.p.i.) reduzierte sich die Anzahl an bipolaren Zellen in den Septin-Deletionsmutanten (20-40%), wohingegen diese in einer *rrm4* Deletionsmutante weiterhin hoch blieb (45%). Obwohl alle Septin-Deletionsmutanten acht Stunden nach der Induktion überwiegend unipolare Hyphen ausbildeten, war die Ausbildung der Septen stark beeinträchtigt. Im Gegensatz zum Wildtyp, bei dem 80% aller Hyphen Septen aufwiesen, zeigten nur 30-60% aller Septin-Deletionsstämme eine Septenbildung. Dies spricht für eine Verzögerung des hyphalen Wachstums und der Septenbildung in den Septin-Deletionsmutanten. Demnach führt der Verlust von Septinen zu Störungen des unipolaren, hyphalen Wachstums in *U. maydis*. Diese Störung ist vor allem in der frühen Hyphenentwicklung zu beobachten, erreicht später jedoch nicht das Ausmaß einer *rrm4* Deletion.



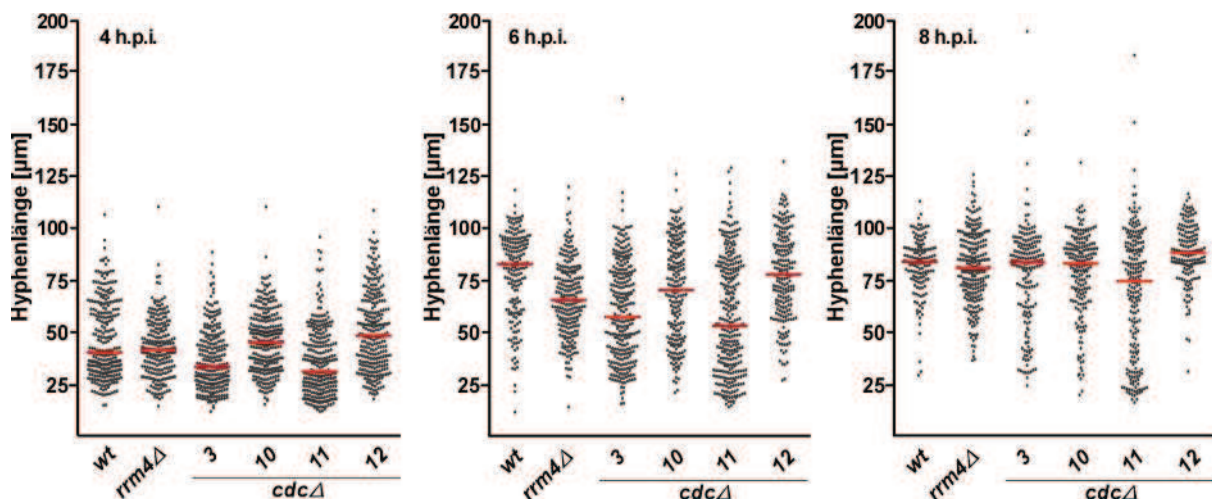
**Abbildung 2.1: Septine werden für effizientes polares Wachstum und die Sekretion von Cts1 benötigt.** (A) DIC Aufnahme einer Hyphe des Wildtyps, eines *rrm4* Deletionsstammes und aller Septin-Deletionsmutanten 4 h (links) und 8 h (rechts) nach Induktion des hyphalen Wachstums (Größenbalken 10  $\mu$ m). Die Wachstumsrichtung ist durch Pfeile markiert. (B) Anzahl der Hyphen [%] nach 4 h (oben) und 8 h (unten): unipolare und bipolare Zellen sowie die Bildung von Septen wurde quantifiziert (Fehlerbalken zeigen Standardfehler des Mittels, n= 4 unabhängige Experimente, mindestens 50 Hyphen pro Stamm und Experiment). (C) Relative Chitinaseaktivität der Endochitinase Cts1 (Koepeke *et al.*, 2011; Langner *et al.*, 2015) in allen Septin-Deletionsmutanten und der Kontrollen AB33, *cts1Δ* und *rrm4Δ* in Sporidien (oben) und Hyphen (unten; 8h.p.i.; Fehlerbalken zeigen Standardfehler des Mittels an, n= 7 unabhängige Experimente mit jeweils drei Replikaten).

Ein weiterer Test, der zur Charakterisierung von Deletionsstämmen genutzt wird, ist die Messung der endochitinolytischen Aktivität von Cts1. Es wurde beschrieben, dass der Verlust von *rrm4* zu einer verminderten extrazellulären Aktivität der Endochitinase Cts1 führt, da diese nicht mehr korrekt sekretiert wird (Koepeke *et al.*, 2011). Dieser Effekt konnte nur in Hyphen von *U. maydis*, nicht aber für Sporidien nachgewiesen werden (Koepeke *et al.*, 2011; Stock *et al.*, 2012). Neben den mikroskopischen Analysen wurde daher ebenfalls der Einfluss von Septin-Deletionen auf die Aktivität von Cts1 untersucht. Dazu wurde die relative chitinolytische Aktivität des Wildtypstammes AB33 sowie der Deletionen von *cts1*, *rrm4* und aller vier Septine mit Hilfe des fluoreszierenden Substrats 4-MUC untersucht. In Sporidien zeigte weder die Deletion von *rrm4* noch die Deletion der einzelnen Septine einen Einfluss auf die chitinolytische Aktivität (Abb. 2.1C). Vier Stunden nach Induktion des hyphalen Wachstums konnte ebenfalls kein Einfluss beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Jedoch konnte acht Stunden nach Induktion des hyphalen Wachstums eine Verminderung der chitinolytischen Aktivität in allen Septin-Deletionsmutanten detektiert werden. Hier zeigten die Deletionen von *cdc3* und *cdc11* den stärksten Effekt auf die Cts1-Aktivität, wobei die Deletion von *rrm4* zu stärkeren Defekten führt. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Deletionen der einzelnen Septine untereinander zu ähnlichen Phänotypen führt. Für alle konnte ein beeinträchtigtes hyphales Wachstum und eine verminderte Cts1-Sekretion festgestellt werden. Diese Ergebnisse deuten auf eine gemeinsame Funktion von Septinen in *U. maydis*, während des hyphalen Wachstums, hin.

Um zu überprüfen ob die Wachstumsgeschwindigkeit in den Septin-Deletionsmutanten gestört ist, wurden Längenmessungen zu verschiedenen Zeitpunkten nach Induktion des hyphalen Wachstums durchgeführt. Dabei wurden sowohl die Länge von unipolaren als auch die Länge von bipolaren Zellen gemessen. Die Abbildung 2.2 zeigt, dass vier Stunden nach Induktion des hyphalen Wachstums die Hyphen des Wildtypstammes eine durchschnittliche Länge von etwa 40  $\mu\text{m}$  erreichten. Die Deletion von *rrm4* führte zu einer vergleichbaren Zelllänge. Nur für die Deletionen von *cdc3* und *cdc11* konnte eine reduzierte Hyphenlänge beobachtet werden. Das heißt, dass, obwohl zu diesem Zeitpunkt viele bipolare Zellen vorhanden waren, die Gesamtzelllänge in etwa vergleichbar ist. Sechs Stunden nach der Induktion des hyphalen Wachstums war der Median der Hyphenlänge in allen Septin-Deletionsmutanten und in der *rrm4* Deletionsmutante, im Vergleich zum Wildtyp, reduziert. Es fällt auf, dass im Wildtyp nur eine geringe Anzahl an Zellen kurze

Hyphen (bis 60  $\mu\text{m}$ ) aufwiesen, während in den verschiedenen Deletionsstämmen eine erhöhte Anzahl an kürzeren Zellen vorlag. Insbesondere war dies bei den Deletionen von *cdc3* und *cdc11* zu beobachten. Acht Stunden nach der Induktion waren die Mediane aller Stämme, bis auf den der *cdc11* Deletion fast identisch. Der einzige Unterschied war in der Verteilung der Hyphenlängen zu erkennen. Während im Wildtyp fast alle Hyphen zwischen 50  $\mu\text{m}$  und 110  $\mu\text{m}$  lang waren, kam es zu einer deutlich stärkeren Streuung der Werte in den Septin-Deletionsmutanten. Hier befanden sich die Längen je nach Stamm zwischen 25  $\mu\text{m}$  und 175  $\mu\text{m}$ .

Abschließend kann gesagt werden, dass die Deletionen der einzelnen Septine in den frühen Phasen des hyphalen Wachstums zu einer leichten Reduktion der Hyphenlängen führte, diese sich jedoch zum späteren Zeitpunkt (8 h.p.i.) wieder normalisierten. Außerdem ist die Hyphenlänge der Zellen nicht so homogen wie im Wildtyp, was zu einer höheren Diversität zwischen den Stämmen führte.



**Abbildung 2.2:** Die Hyphenlängen der Septin-Deletionsmutanten unterscheiden sich in den frühen Stadien des hyphalen Wachstums. Es sind die Hyphenlängen [ $\mu\text{m}$ ] des Wildtyps AB33, der *rrm4* Deletionsmutante und allen Septin-Deletionsmutanten dargestellt. 4 h.p.i. links, 6 h.p.i. Mitte, 8 h.p.i. rechts. Die rote Linie stellt den Median dar ( $n=2$  Experimente).

## 2.2 Charakterisierung der Septin Gfp-Fusionen

Um die Funktion der Septine *in vivo* näher untersuchen zu können, wurden im AB33 Stammhintergrund Gfp-markierte Fusionsproteine von allen Septinen hergestellt. Dabei wurden jeweils N- und C-terminale Gfp-Fusionsproteine hergestellt (Abb. 2.3A), die unter der Kontrolle des endogenen Promotors, im endogenen Lokus exprimiert wurden. Wichtig dabei ist, dass die 3'UTR als potenzielles regulatorisches Element erhalten wurde (Abb. 2.3A). Die Funktionalität der Fusionsproteine wurde in einem Wachstumstest und in einem

Cts1-Sekretionstest untersucht (Abb. 2.3B-C). Der Wachstumstest wurde im Vergleich zu dem Test der Septin-Deletionsmutanten unter erschwerten Bedingungen durchgeführt (Material und Methoden 4.2.2). Bei diesen Bedingungen wurde das filamentöse Wachstum bei einer  $OD_{600}$  von 0,2 induziert und nach 6 Stunden wurde zwischen unipolaren und nicht unipolaren Zellen, einschließlich bipolarer, tripolarer und nicht ausgewachsenen Zellen, unterschieden (Abb. 2.3B). Ferner wurde ebenfalls die Ausbildung von Septen quantifiziert. Als Kontrolle wurde jeweils der Wildtypstamm AB33, der *rrm4*-Deletionsstamm und der dazugehörige Septin-Deletionsstamm untersucht. Während der Wildtypstamm bei diesen Bedingungen eine Rate an bipolaren Hyphen von 30% aufwies, war diese Rate in allen Gfp-Fusionsproteinen erhöht (50-60%). Dies lässt vermuten, dass alle Gfp-Fusionsproteine nicht vollständig funktionell sind. Im Vergleich zur Deletionsmutante des jeweiligen Septins konnte jedoch in allen Fällen (außer bei Cdc12) eine Komplementation in verschiedenen Ausmaßen erreicht werden. Mit diesem Test war es weiterhin möglich, zwischen der Funktionalität der N- und C-terminalen Fusionsproteine unterscheiden zu können. Die N-terminale Fusion von Cdc3 (Cdc3-GfpN) zeigte eine höhere Funktionalität als die C-terminale Fusion (Cdc3-GfpC). Für Cdc10 und Cdc11 wiesen beide Fusionsproteine in diesem Test eine etwa ähnliche Funktionalität auf. Im Fall von Cdc12 zeigte die C-terminale Variante eine gering höhere Funktionalität. Das komplette Set an Stämmen wurde ebenfalls, wie vorher die Deletionsstämme, auf die Aktivität der Endochitinase Cts1 getestet (Abb. 2.3C). Auch hier konnte bestätigt werden, dass in allen Fällen der starke Sekretionsdefekt der Deletionsstämme durch die Expression von Gfp-Fusionsproteinen teilweise komplementiert werden konnte. Das Cdc3-GfpN Protein zeigte auch bei diesem Test die höchste Funktionalität in der Cts1-Sekretion. Weiterhin deuteten die Untersuchungen der beiden Cdc10 Fusionsproteine auf dieselbe Aktivität hin. Im Gegensatz zum Wachstumstest war für die Cdc11-GfpC und Cdc12-GfpN Fusionen eine höhere Cts1-Aktivität, im Vergleich zu den Cdc11-GfpN und Cdc12-GfpC Fusionen, zu erkennen. Abschließend lässt sich sagen, dass durch diesen Test erste Hinweise auf die Funktionalität der Fusionsproteine gewonnen werden konnten und alle Fusionsproteine in einem unterschiedlichen Ausmaß funktionell sind.

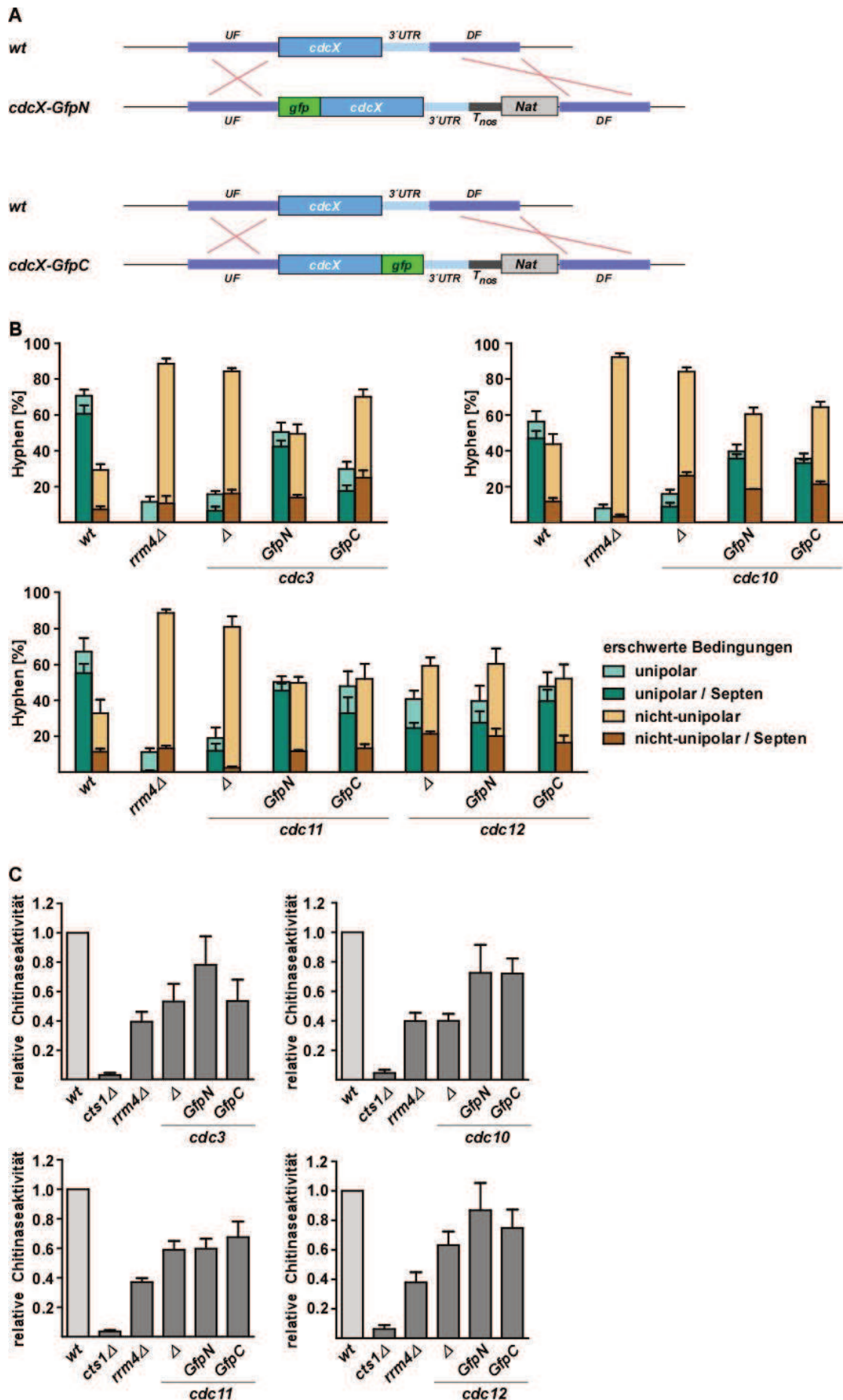


Abbildung 2.3: N- und C-terminale Gfp-Fusionen aller Septine unterscheiden sich in ihrer biologischen Aktivität.

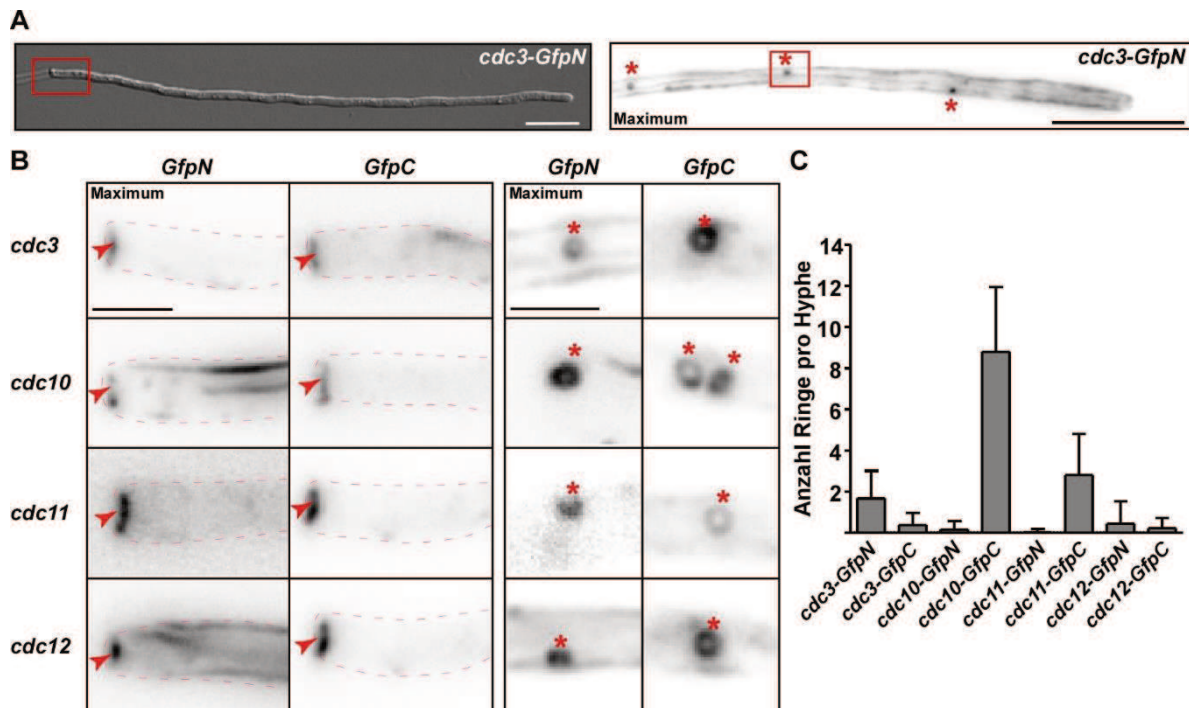


**Abbildung 2.3 (fortgesetzt): N- und C-terminale Gfp-Fusionen aller Septine unterscheiden sich in ihrer biologischen Aktivität.** (A) Schematische Illustration der Herstellung der Septin Gfp-Fusionsstämme durch homologe Rekombination. Es wurden sowohl N-terminale (oben) als auch C-terminale (unten) Gfp-Fusionsstämme hergestellt. Die 3'UTR wurde in allen Fällen erhalten (rotes Kreuz markiert die *Crossing-over* Ereignisse; UF: *upstream* Flanke; DF: *downstream* Flanke; cdcX: *cdc3*, *cdc10*, *cdc11* oder *cdc12*; T<sub>nos</sub>: heterologer transkriptioneller Terminator; Nat: Nourserothricin Resistenzkassette). (B) Anzahl der Hyphen 6 h.p.i.: unipolare und nicht unipolare (bipolare, tripolare und nicht ausgewachsene Zellen) und Septenbildung wurde in allen Septin-Deletionsmutanten und Gfp-Fusionsstämmen quantifiziert (Fehlerbalken zeigen Standardfehler des Mittels an, n= 3 unabhängige Experimente, mindestens 100 Hyphen pro Stamm und Experiment). Im Vergleich zu den Wachstumsanalysen in Abbildung 2.1 wurden die experimentellen Bedingungen leicht verändert. Das hyphale Wachstum wurde dabei nicht bei einer OD von 0,5 sondern bei einer OD von 0,2 induziert, was zu einer erhöhten Anzahl an bipolaren Zellen führte. Dadurch wurde die Sensitivität der Analyse verbessert. (C) Relative Chitinaseaktivität der Chitinase Cts1 in den Septin Deletions- und Gfp-Fusionsstämmen (Koepeke *et al.*, 2011; Stock *et al.*, 2012), Fehlerbalken zeigen Standardfehler des Mittels an, n= 3 unabhängige Experimente mit jeweils drei Replikaten).

### 2.3 Alle Septine lokalisieren am Septum und in zytoplasmatischen Ringen

Um eine mögliche Funktion von Septinen in *U. maydis* untersuchen zu können, wurde zunächst die subzelluläre Lokalisation aller N- und C-terminalen Gfp-Fusionen der vier Septine untersucht. Die Analyse ergab, dass alle acht Septin-Fusionsproteine am basalen Septum und in zytoplasmatischen Ringen lokalisierten (Abb. 2.4A-C). Eine Quantifizierung der zytoplasmatischen Ringe zeigte, dass jede Hyphe ein bis zwei Ringe beinhaltete. Eine Ausnahme bildet die C-terminale Fusion von Cdc10 mit etwa zehn Ringen pro Hyphe (Abb. 2.4C). Bisher gibt es keine eindeutigen Hinweise auf die Funktion dieser Ringe (Böhmer, 2009). Eine Färbung mit dem lipophilen Farbstoff FM4-64 deutete darauf hin, dass Cdc11 in Ringen mit Lipiden assoziiert ist (Abb. 2.5A). Der Nachweis von ähnlichen Ringstrukturen mit FM4-64 in dem Wildtypstamm AB33 wies darauf hin, dass die Septin- und FM4-64 positiven Ringe keine aberranten Strukturen darstellen, aber ihre Bildung durch einige Septin-Fusionsproteine begünstigt werden kann (Abb. 2.4C). Um zu überprüfen, ob es sich bei den zytoplasmatischen Ringen um Derivate aus frühen Endosomen oder Endosomenmembran handelte, wurde ein Stamm, welcher den frühen endosomalen Marker Rab5-GfpC exprimiert, ebenfalls mit FM4-64 angefärbt. Eine Überlagerung der FM4-64 Färbung mit der Lokalisation von Rab5 zeigte, dass Rab5 nicht in diesen zytoplasmatischen Strukturen vorkam (Abb. 2.5B). Der dazugehörige Kymograph verdeutlichte ebenfalls, dass FM4-64 und Rab5a zwar auf denselben, sich bewegenden Endosomen zu finden waren, aber nur FM4-64 in den Ringen lokalisierte (Abb. 2.5B Stern). Somit konnte ausgeschlossen werden, dass es sich bei den Ringen um Derivate von frühen Endosomen handelte.





**Abbildung 2.4: Alle Septin-Fusionsproteine lokalisieren am Septum und in zytoplasmatischen Ringen.** (A) DIC Bild einer *Cdc3-GfpN* exprimierenden Hyphe (links), roter Kasten markiert die Region des Septums, die in B (links) vergrößert dargestellt ist. *Gfp*-Fluoreszenzbild eines Stammes der *Cdc3-GfpN* exprimiert (rechts). Roter Kasten markiert hier die vergrößerte Region in B (rechts). Sterne markieren zytoplasmatische Ringe (Größenbalken 10  $\mu$ m). (B) Fluoreszenzbilder der in A dargestellten Regionen, aller N- und C-terminalen Fusionsproteine. Links ist die Lokalisation am Septum (Pfeilkopf) und rechts die Lokalisation in zytoplasmatischen Ringen (Stern) dargestellt. (Maximum-Projektionen von Z-Stapel, Größenbalken 2  $\mu$ m). (C) Das Balkendiagramm stellt die Anzahl der Ringe pro Hyphe (8 h.p.i.) in allen Septin-Fusionsstämmen dar (mindestens 50 Hyphen pro Stamm; Fehlerbalken zeigen Mittelwert mit Standardabweichung).

Des Weiteren zeigten diese Ringe in Photobleichexperimenten, dass es sich hierbei um dynamische Strukturen handelte, da fünf Minuten nach Photobleichen ein Großteil der Fluoreszenz wiedergekehrt war, was ein Indiz für den Austausch von einzelnen Proteinen oder Einheiten darstellt (Abb. 2.5C). Es konnte auch mehrfach beobachtet werden, dass sich die Ringe in der Hyphe bewegen. Sie konnten sich drehen und nach einiger Zeit komplett ihre Lokalisation verändern. Außerdem konnte gezeigt werden, dass verschiedene Ringe in der Lage sind, Material wie z.B. Septinproteine, hier *Cdc11-GfpC*, auszutauschen (Abb. 2.5D grüner und violetter Pfeil). Die Bildung der zytoplasmatischen Ringstrukturen kann außerdem beeinflusst werden. Eine längere Inkubationszeit auf dem Objektträger unter dem Mikroskop führt zu einer verstärkten Ringbildung (nicht gezeigt). Ferner kann durch eine Behandlung der Zellen mit dem Inhibitor Benomyl, welcher die Polymerisierung von Mikrotubuli verhindert, eine verstärkte Ringbildung induziert werden (Abb. 2.5E). Ein ähnliches Ergebnis konnte mit dem Inhibitor Latrunculin A, welcher die Bildung des Aktin-Zytoskeletts inhibiert, erzielt werden (Abb. 2.5F).

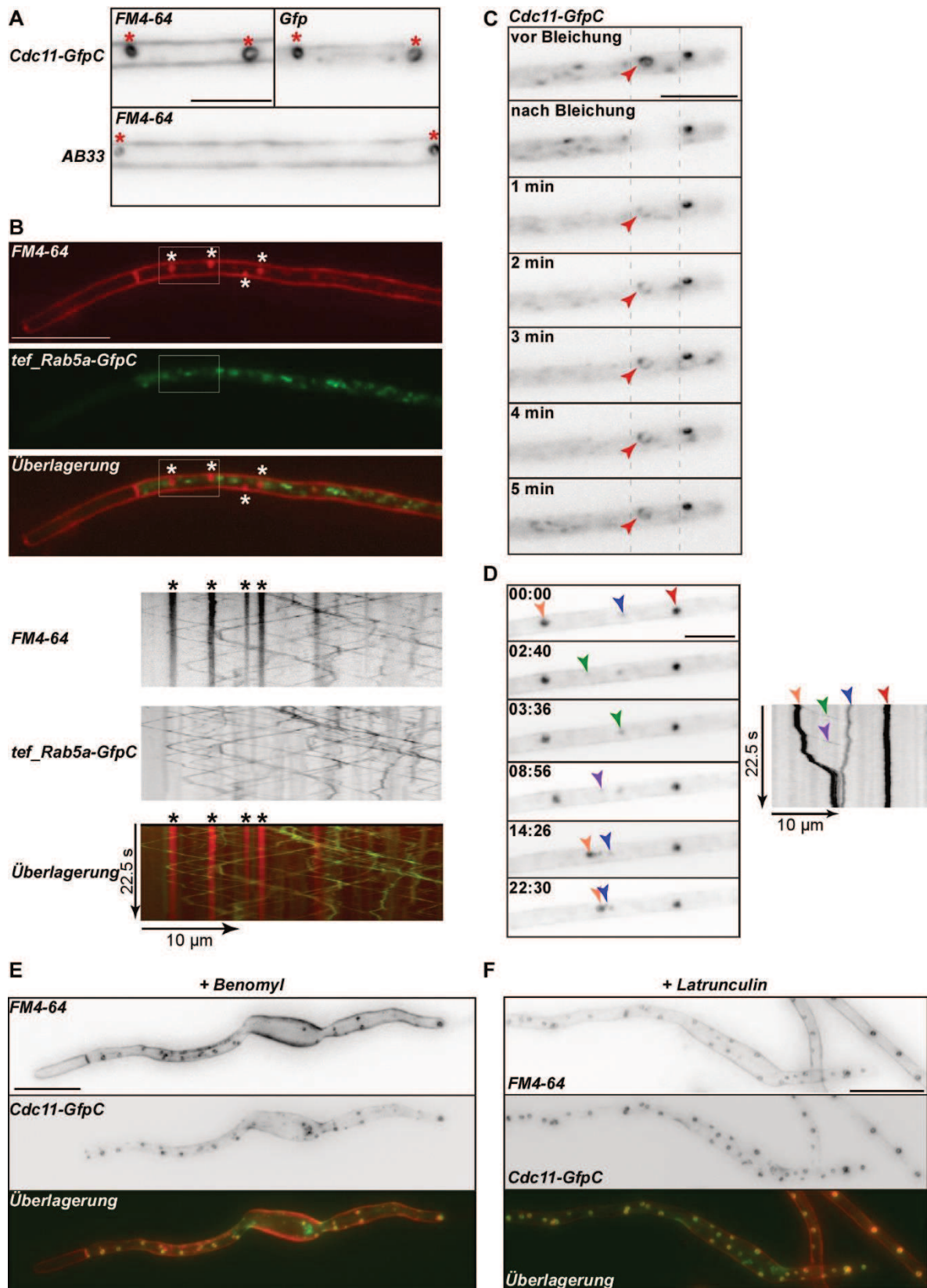


Abbildung 2.5: Analyse der zytoplasmatischen Ringe am Beispiel von *Cdc11-GfpC*.

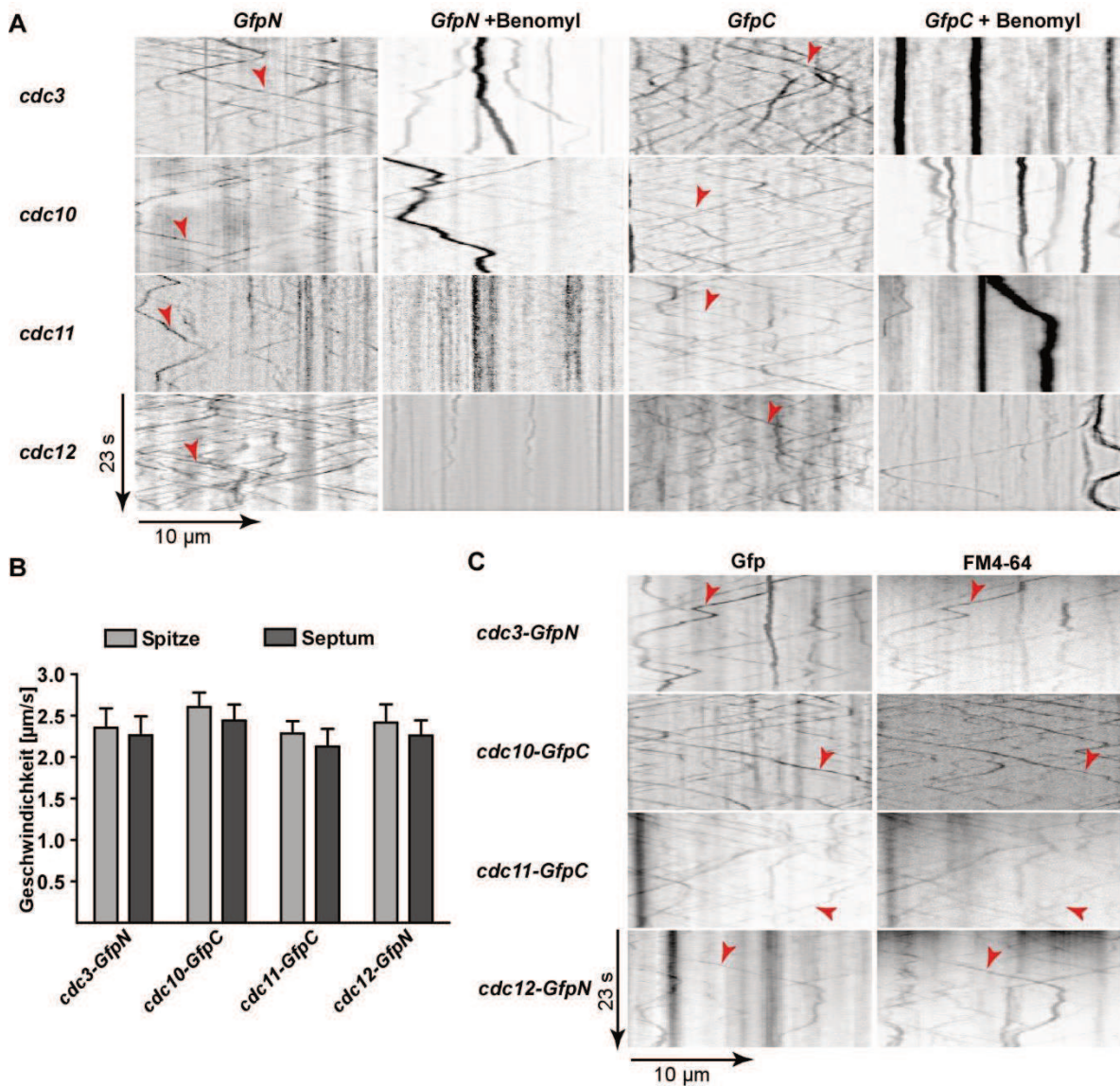
**Abbildung 2.5 (fortgesetzt): Analyse der zytoplasmatischen Ringe am Beispiel von Cdc11-GfpC.** (A) Ausschnitt einer Hyphe, in welcher Cdc11-GfpC-haltige Ringe (Stern) mit dem lipophilen Farbstoff FM4-64 kolokalisieren (oben). Die Anwesenheit von FM4-64 in Ringen konnte ebenfalls in Wildtyp Hyphen bestätigt werden (unten, Größenbalken 5  $\mu\text{m}$ ). (B) Oben: Kolokalisation des Endosomenmarkers Rab5a-GfpC (grün) und FM4-64 (rot) auf mobilen Partikeln, jedoch nicht in zytoplasmatischen Ringen (Stern). Unten: Bewegung von Rab5a-GfpC und FM4-64 als Kymographen, der die Strecke pro Zeit anzeigt (Größenbalken 10  $\mu\text{m}$ ). (C) Photobleichexperiment eines zytoplasmatischen Rings in einer Cdc11-GfpC exprimierenden Hyphe. Der Bereich zwischen den gestrichelten Linien wurde gebleicht und die wiederauftretende Fluoreszenz in einem Zeitraum von fünf Minuten in derselben Ringstruktur gemessen (roter Pfeil, Größenbalken 5  $\mu\text{m}$ ). (D) Ausschnitte eines Videos einer Cdc11-GfpC exprimierenden Hyphe (Zeitangaben in Sekunden). Austausch von Cdc11-GfpC (grüner und violett Pfeil) von Ring 1 (oranger Pfeil) zu Ring 2 (blauer Pfeil) sowie teilweise Fusion des Rings 1 mit Ring 2. Der rote Pfeil zeigt einen statischen Ring an. Der dazugehörige Kymograph (rechts) zeigt diese Austauschereignisse in denselben Farben an (Größenbalken 5  $\mu\text{m}$ , siehe ergänzende Daten Film 1). (E) Bildung von zytoplasmatischen Ringen nach einer drei stündigen Behandlung mit Benomyl (oben: FM4-64 Färbung, unten: Cdc11-GfpC Fluoreszenz, Größenbalken 10  $\mu\text{m}$ ). (F) Bildung von zytoplasmatischen Ringen nach der Behandlung mit Latrunculin A für zwei Stunden (oben: FM4-64 Färbung, unten: Cdc11-GfpC Fluoreszenz, Größenbalken 10  $\mu\text{m}$ ).

Diese Experimente weisen darauf hin, dass es eine direkte oder indirekte Interaktion zwischen den beiden Zytoskelett-Komponenten Aktin und Mikrotubuli mit dem Septin-Zytoskelett gibt. Abschließend kann gesagt werden, dass der genaue Ursprung und die Funktion der zytoplasmatischen Ringe nicht genau geklärt ist. Es kann jedoch ausgeschlossen werden, dass es sich dabei um Derivate von frühen Endosomen handelt. Außerdem werden die dynamischen Ringe vermehrt unter Stressbedingungen gebildet.

## 2.4 Alle Septine lokalisieren auf beweglichen Endosomen und in Filamenten

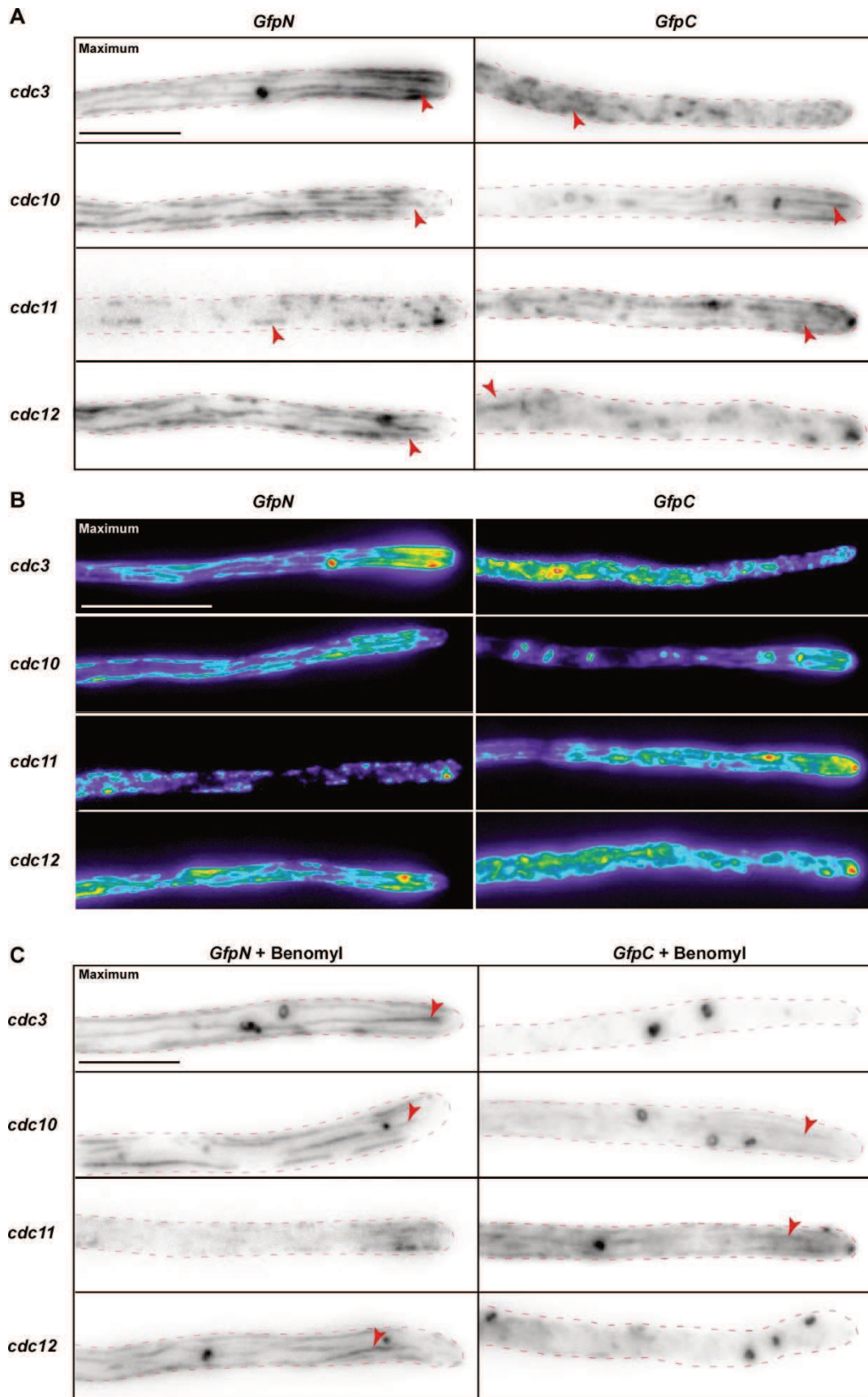
Aus vorherigen Studien ist bekannt, dass Cdc3 auf sich bewegenden Endosomen lokalisiert (Baumann *et al.*, 2014). Durch die Analyse von allen Septinfusionen konnte gezeigt werden, dass alle Fusionsproteine auf sich bewegenden Partikeln lokalisieren (Abb. 2.6A). Diese Partikel bewegten sich mit einer vergleichbaren Geschwindigkeit von 2,3  $\mu\text{m/s}$  in beide Richtungen durch die gesamte Hyphe fort (Abb. 2.6B). Die Lokalisation war auch hier unabhängig von der Position der Gfp-Fusion. In allen Fällen war die Bewegung beeinträchtigt, nachdem die Zellen mit dem Mikrotubuli-Inhibitor Benomyl behandelt worden sind. Somit konnte bestätigt werden, dass es sich um einen Mikrotubuli-abhängigen Transport handelt. Des Weiteren konnte eine Kolokalisation mit dem lipophilen Farbstoff FM4-64, welcher unter anderem Rab5a-positive Endosomen anfärbt (siehe oben, Higuchi, 2014), nachweisen, dass es sich bei den Partikeln um frühe Endosomen handelt (Abb. 2.6C). Ferner war bekannt, dass Cdc3-GfpN, Cdc10-GfpC und Cdc12-GfpN Septinfilamente durch die gesamte Hyphe bilden konnten (Baumann 2014, Alvarez-Tabares, 2010). Da für Cdc11 bislang keine Filamentbildung beobachtet werden konnte, wurde die Analyse der subzellulären Lokalisation auf alle acht Fusionsproteine ausgeweitet (Abb. 2.7A). Für die Darstellung der kortikalen Filamente wurden

Maximalprojektionen von Z-Stapeln erstellt (Baumann, 2014). Es konnte beobachtet werden, dass entgegen vorheriger Studien alle Septine in kortikalen Filamenten lokalisierten, die entlang der Längsachse der Hyphe verliefen (Alvarez-Tabares, 2010).



**Abbildung 2.6: Alle Septine lokalisieren auf sich bewegenden, frühen Endosomen.** (A) Kymographen von Hyphen der Gfp Fusionsstämme von Cdc3, Cdc10, Cdc11 und Cdc12. N-terminale Fusionsproteine in An- und Abwesenheit von Benomyl sind links und C-terminale Fusionsproteine sind rechts dargestellt (siehe auch ergänzende Daten Film 2-10). (B) Das Balkendiagramm zeigt die Geschwindigkeit der Partikel in μm/s von jeweils einer Fusion aller vier Septine. Dabei wird zwischen einer Bewegung zur Spitze (hellgrau) und einer Bewegung Richtung Septum (dunkelgrau) unterschieden (mindestens 10 Hyphen pro Stamm, Fehlerbalken zeigen Mittelwert mit Standardabweichung). (C) Kolokalisation von FM4-64 mit jeweils einem Septin-Fusionsprotein.





**Abbildung 2.7: Alle Septine lokalisieren in Filamenten.** (A) Fluoreszenzbilder von Hyphenspitzen, die N-(links) oder C-terminale (rechts) Septin-Fusionsproteine exprimieren. Diese bilden Septinfilamente (rote Pfeile, Maximum-Projektionen, Größenbalken 5  $\mu\text{m}$ ). (B) Bilder derselben Hyphenspitzen wie in A, jedoch in Pseudofarben dargestellt, um den Gradienten an der Spitze besser zu visualisieren (Größenbalken 10  $\mu\text{m}$ ).

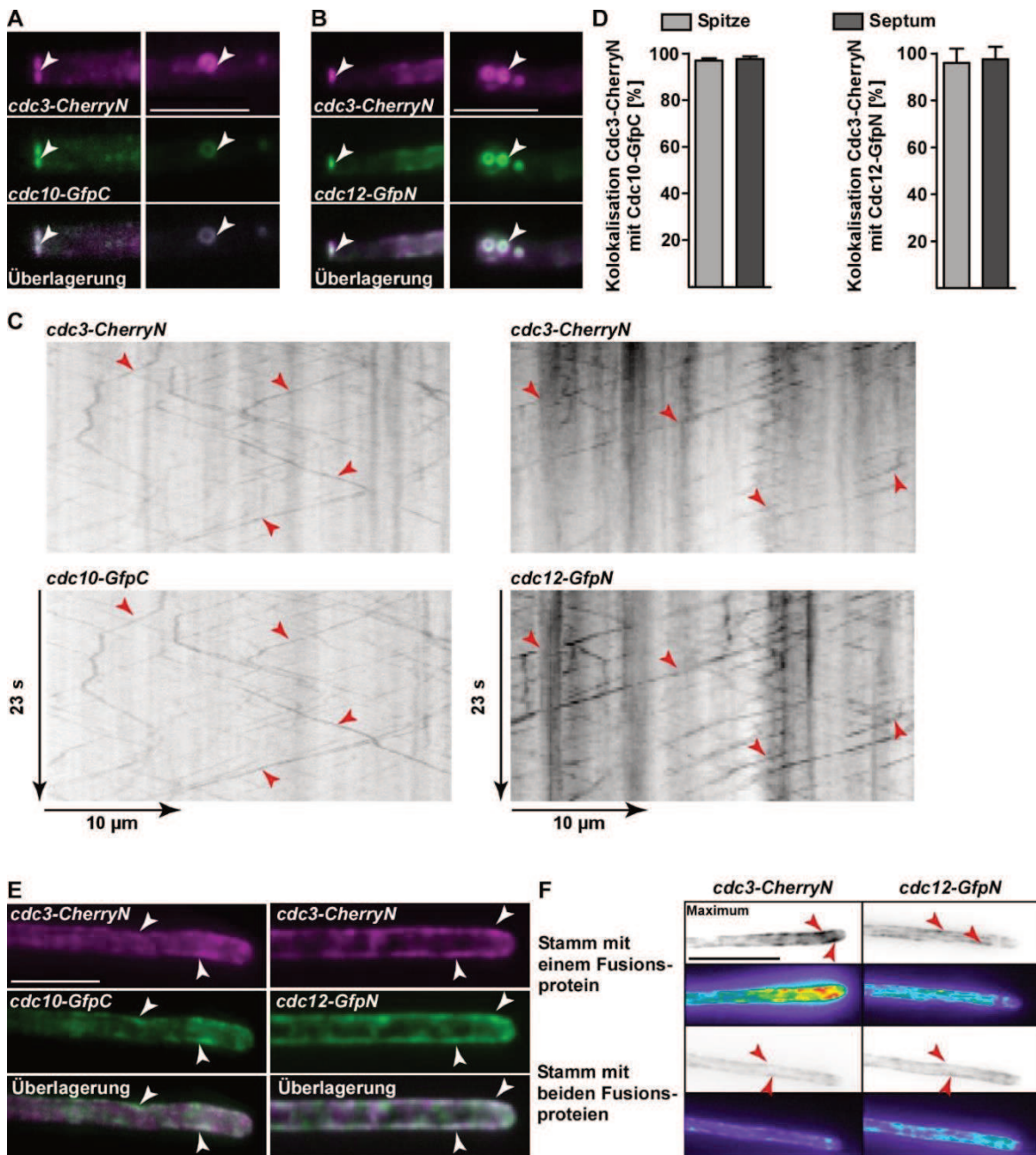
**Abbildung 2.7 (fortgesetzt): Alle Septine lokalisieren in Filamenten** (C) Fluoreszenzbilder von Hyphenspitzen, die N- (links) oder C-terminale (rechts) Septin-Fusionsproteine exprimieren und mit dem Mikrotubuli-Inhibitor Benomyl behandelt wurden. Rote Pfeile zeigen sofern vorhanden Septinfilamente an (Maximum-Projektion, Größenbalken 5  $\mu\text{m}$ ).

Hier zeigte sich zum ersten Mal ein Lokalisationsunterschied abhängig von der Fusion. Dies verdeutlicht die Wichtigkeit, sowohl N- als auch C-terminale Fusionen zu testen. Je nach Position konnte ein Unterschied in der Ausprägung der Filamente beobachtet werden. Zum Beispiel bildete der Cdc3-GfpN exprimierende Stamm Filamente mit einem von der Hyphenspitze abnehmenden Gradienten aus, während die C-terminale Fusion keine, bzw. nur sehr kurze Filamente ausbilden konnte (Abb. 2.7A-B). Im Fall von Cdc10 konnten beide Gfp-Fusionsproteine Filamente ausbilden. Für Cdc11 besaß das C-terminale Fusionsprotein die Fähigkeit, Filamente auszubilden. Im Fall von Cdc12 war, ebenfalls wie bei Cdc3, nur die N-terminale Gfp-Fusion in der Lage, Filamente auszubilden. Daher kann davon ausgegangen werden, dass die Gfp-Fusion die Bildung von höher geordneten Strukturen beeinträchtigen kann. Der erwähnte Spitzengradient konnte auch für die Cdc3-GfpN, Cdc10GfpC, Cdc11-GfpC und Cdc12-GfpN exprimierenden Stämme nachgewiesen werden (Abb. 2.7B). Eine Untersuchung der Filamentbildung in Anwesenheit von dem Mikrotubuli-Inhibitor Benomyl zeigte, dass diese unabhängig von einem funktionierenden Mikrotubuli-Zytoskelett und somit unabhängig von dem Transport der Septine war. Obwohl die Filamente prinzipiell noch gebildet werden konnten, zeigte Benomyl einen negativen Effekt auf die Ausbildung des Spitzengradienten (Abbildung 2.7C). Dies lässt die Vermutung zu, dass der Mikrotubuli-abhängige Transport für die Bildung des Gradienten wichtig ist (Baumann *et al.*, 2014). Zusammenfassend kann gesagt werden, dass übereinstimmend mit den vorherigen Ergebnissen von Cdc3 alle anderen Septine dieselbe Lokalisation am Septum, in Ringen, auf sich bewegenden Endosomen und in kortikalen Filamenten aufwiesen (Baumann *et al.*, 2014).

### **2.5 Septine kolokalisieren in speziellen subzellulären Strukturen, in denen eine Interaktion von Cdc3 mit Cdc12 stattfindet**

Da alle Septine in gleichen Strukturen lokalisieren, stellt sich die Frage, ob verschiedene Septine simultan in denselben Strukturen lokalisieren und in diesen interagieren. Zur Beantwortung dieser Frage wurde ein Cdc3-CherryN Fusionsprotein zusammen mit Cdc10-GfpC oder Cdc12-GfpN exprimiert. Die Expression des Cdc3-CherryN Fusionsproteins stand dabei unter der Kontrolle des starken  $P_{\text{otef}}$  Promotors, um die Detektion des schwachen Cherry Signals zu erhöhen (Shaner, 2004). Eine Analyse dieser Stämme bestätigte die

Kolokalisation von Cdc3 mit Cdc10 und Cdc12 in denselben Strukturen am Septum und in zytoplasmatischen Ringen (Abb. 2.8A-B).



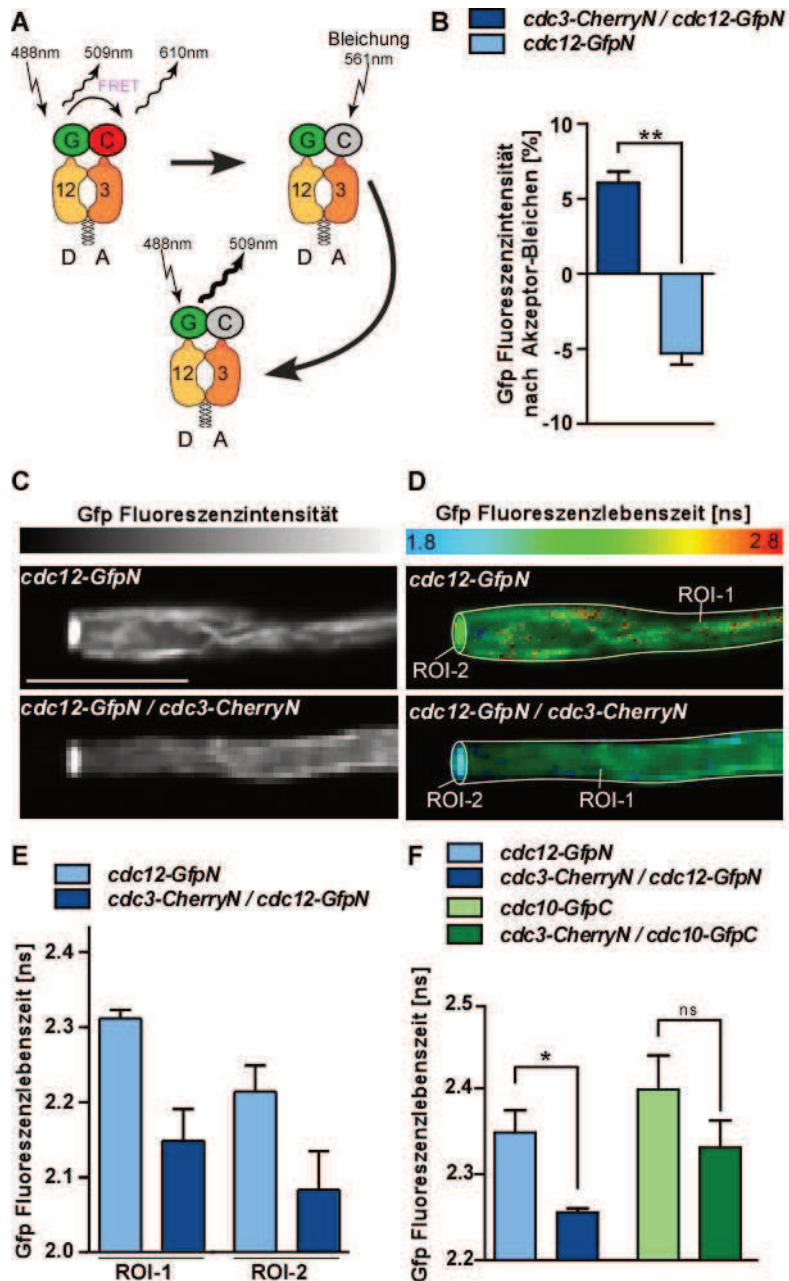
**Abbildung 2.8: Cdc3 kolokalisiert mit Cdc10 und Cdc12 in den beschriebenen, subzellulären Strukturen.** (A) Fluoreszenzbilder von Hyphenausschnitten, in denen Cdc3-CherryN (Magenta) unter der Kontrolle des konstitutiv aktiven  $P_{otef}$  Promotors und zusätzlich Cdc10-GfpC (grün) im endogenen Locus exprimiert wird. Kolokalisation (weiß) wurde am basalen Septum (links) und in zytoplasmatischen Ringen (rechts) analysiert (Größenbalken 5  $\mu$ m). (B) Fluoreszenzbilder von Hyphenausschnitten, in denen Cdc3-CherryN (Magenta) unter der Kontrolle des konstitutiv aktiven  $P_{otef}$  Promotors und zusätzlich Cdc12-GfpN (grün) im endogenen Locus exprimiert wird. Kolokalisation (weiß) wurde am basalen Septum (links) und in zytoplasmatischen Ringen (rechts) analysiert (Größenbalken 5  $\mu$ m, siehe auch ergänzende Daten Film 11 und 12.). (C) Kymographen die eine Kolokalisation von Cdc3-Cherry (oben) mit Cdc10-GfpC (links unten) oder Cdc12-GfpN (rechts unten) auf sich bewegenden Endosomen zeigen (rote Pfeile). Expression der Fusionsproteine wie in A. (D) Das Balkendiagramm zeigt die Anzahl der Cdc3-CherryN Signale, die mit Cdc10-GfpC oder Cdc12-GfpN Signalen kolokalisieren. Expression der Fusionsproteine wie in A. Es wurde zwischen Bewegungen zur Spitze hin (hellgrau) oder zum Septum hin (dunkelgrau) unterschieden (n=15 Hyphen, Fehlerbalken Mittelwert mit Standardabweichung). (E) Darstellung der Kolokalisation von Cdc3-CherryN mit Cdc10-GfpC oder Cdc12-GfpN in kortikalen Filamenten (weiße Pfeile) in der Hyphenspitze. Expression der Fusionsproteine wie in A (Größenbalken 5  $\mu$ m).

**Abbildung 2.8 (fortgesetzt): Cdc3 kolokalisiert mit Cdc10 und Cdc12 in den beschriebenen, subzellulären Strukturen.** (F) Hyphenspitzen von Zellen mit  $P_{\text{otefCdc3}}$ -CherryN und Cdc12-GfpN, jeweils einzeln (oben) oder zusammen (unten) exprimiert. Gezeigt ist jeweils ein Fluoreszenzbild als Maximum-Projektion und eine Darstellung mit Falschfarben zu besserer Visualisierung des Gradienten (Größenbalken 10  $\mu\text{m}$ ).

Durch Verwendung eines Zweikanal-Bildwandlers, der die gleichzeitige Detektion von Gfp und Cherry ermöglichte, konnte eine nahezu hundertprozentige Kolokalisation auf beweglichen Endosomen für beide Septinpaare festgestellt werden (Abb. 2.8C-D). Ferner konnte ebenfalls eine Kolokalisation in kortikalen Filamenten bestätigt werden (Abb. 2.8E). Interessanterweise konnte der Spitzengradient in Cdc3-CherryN nicht mehr gebildet werden, sobald Cdc12-GfpN ko-exprimiert wurde (Abb. 2.8F). Da die Anwesenheit von Cdc12-GfpN die Filamentbildung von Cdc3-CherryN beeinträchtigt, lässt sich eine direkte Interaktion zwischen Cdc3 und Cdc12 in Filamenten vermuten.

Strukturelle Daten des Septinoktamers aus *S. cerevisiae* sagen voraus, dass die N-Termini von Cdc3 und Cdc12 in räumlicher Nähe liegen, wohingegen sich der N-Terminus von Cdc3 und der C-Terminus von Cdc10 auf gegenüberliegenden Seiten befinden (Bertin *et al.*, 2008; Brausemann *et al.*, 2016). Um zu testen, ob diese strukturelle Anordnung auch in *U. maydis* vorhanden ist, wurden verschiedene FRET (*fluorescence resonance energy transfer*) Experimente durchgeführt. Der FRET Prozess beinhaltet die Übertragung von Energie von einem Fluorophor, welches sich im angeregten Zustand befindet, auf ein zweites Fluorophor. Für ein effizientes FRET muss es eine Überlappung des Donor-Emissionsspektrums und des Absorptionsspektrums des Akzeptors geben (Jares-Erijman und Jovin, 2003). Dieses wird hier durch die Verwendung von Gfp als Donor und Cherry als Akzeptor erreicht. Ferner müssen sich die Fluorophore in räumlicher Nähe, mit einer maximalen Distanz von 10 nm, aufhalten, damit FRET möglich ist. Zunächst wurden FRET Experimente nach Akzeptorphotobleichen mit dem Septinpaar Cdc3-CherryN und Cdc12-GfpN durchgeführt (Abb. 2.9A-B). Dazu wurde die Gfp-Fluoreszenz in der Hyphenspitze eines Cdc3-CherryN / Cdc12-GfpN exprimierenden Stammes vor und nach der Photobleichung des Cdc3-Cherry Akzeptorsignals gemessen. Anschließend wurde die Veränderung der Fluoreszenzintensität vor und nach der Photobleichung bestimmt. Es zeigte sich eine klare Zunahme der Gfp-Fluoreszenz (ca. 6%) nach Akzeptorphotobleichen im Cdc12-GfpN / Cdc3-CherryN Stamm im Vergleich zu dem Cdc12-GfpN Stamm als Donorkontrolle (Abb. 2.9B). Die Zunahme der Fluoreszenz deutet auf einen FRET Effekt und somit auf eine Interaktion zwischen Cdc3 und Cdc12 hin.





**Abbildung 2.9: FRET Experimente bestätigen die Interaktion von Cdc3 und Cdc12 *in vivo*.** (A) Schematische Darstellung eines FRET Experiments nach Akzeptorphotobleichen. Beschrieben wird die schematische Abbildung in Pfeilrichtung: Im angeregten Zustand kann Cdc12-GfpN (Donor) Energie auf Cdc3-CherryN (Akzeptor) übertragen. Nach der Photobleichung des Akzeptors kann Cdc12-GfpN keine Energie mehr auf den geblichenen Akzeptor übertragen, wodurch mehr Fluoreszenz des Donors emittiert werden kann. (B) Das Balkendiagramm zeigt die Gfp-Fluoreszenz von Cdc12 nach Akzeptorphotobleichen. Die Fluoreszenz des Kontrollstammes Cdc12-GfpN hat durch Photobleichen während der Aufnahmen abgenommen, während die Fluoreszenz im Cdc12-GfpN/Cdc3-CherryN Stamm durch FRET zugenommen hat (n=3 Experimente mit mindestens 5 Hyphen pro Stamm und Experiment, Fehlerbalken zeigen Standardfehler des Mittels; gepaarter zweiseitiger t-Test, p < 0,01 \*\*) (C) FLIM-FRET Experimente von Hyphen die Cdc12-GfpN als Donorkontrolle (oben) und Cdc3-CherryN / Cdc12-GfpN als FRET Probe exprimieren (unten). Intensität der Gfp Fluoreszenz ist abgebildet. (D) Abbildung derselben Hyphen wie in C. Hier ist die Fluoreszenzlebenszeit in einem Farbcode angegeben. Diese Veranschaulichung ermöglicht die Identifikation von verschiedenen Lebenszeiten aufgrund einer Interaktion der Septine. (E) Das Säulendiagramm zeigt die verkürzte Lebenszeit von Cdc12-GfpN in dem Stamm der Cdc3-CherryN / Cdc12-GfpN exprimiert, im Vergleich zum Kontrollstamm Cdc12-GfpN (n=3 Experimente, mindestens 10 Hyphen wurden pro Stamm und Experiment analysiert, Fehlerbalken zeigen Standardfehler des Mittels). ROI-1 und ROI-2 wurden separat analysiert. (G) Säulendiagramm der Gfp-Lebenszeit der Stämme Cdc12-GfpN und Cdc10-GfpC als Donorkontrolle und Cdc3-CherryN / Cdc12-GfpN oder Cdc10GfpN als FRET Probe. Es zeigt sich nur ein signifikanter FRET Effekt bei Cdc3 und Cdc12. Es wurde jeweils der gesamte Bildausschnitt analysiert (n=3 Experimente, mindestens 5 Hyphen wurden pro Stamm und Experiment analysiert, Fehlerbalken zeigen Standardfehler des Mittels, gepaarter zweiseitiger t-Test, p < 0,05 \*; p > 0,05 nicht signifikant ns).

In Zusammenarbeit mit Stephanie Weidkamp-Peters vom „Center for Advanced Imaging“ wurden FLIM-FRET (*fluorescence lifetime imaging microscopy*) Experimente durchgeführt (Oida *et al.*, 1993). In diesen Experimenten wurde die Lebenszeit des Gfp-Fluorophores gemessen. Bei FLIM-FRET führt die Anwesenheit eines Akzeptors zu einem Energietransfer und somit zu einer verkürzten Lebenszeit des Donors. Die Experimente wurden mit den beiden Septinpaaren Cdc3-CherryN / Cdc10-GfpC und Cdc3-CherryN / Cdc12-GfpN durchgeführt. Dazu wurde jeweils die Gfp Lebenszeit der Einzelstämme (Donorkontrolle) im Vergleich zu den Stämmen mit beiden Fluoreszenzproteinen gemessen. Eine Beispielmessung von Cdc3-Cherry / Cdc12-Gfp ist in Abbildung 2.9C-D dargestellt. Während das Fluoreszenzbild in Abbildung 2.9C die Intensitäten von Gfp abbildet, bei denen kein Unterschied zwischen dem Donorstamm Cdc12-GfpN und dem Cdc3-CherryN / Cdc12-Gfp Stamm zu erkennen ist, zeigt Abbildung 2.9D die Gfp Fluoreszenzlebenszeit. Hier war zu erkennen, dass die Lebenszeit von Cdc12-GfpN abnahm, wenn gleichzeitig Cdc3-CherryN koexprimiert wurde. Ferner konnten in einer Hyphe unterschiedliche Lebenszeiten in verschiedenen Regionen festgestellt werden (Vergleiche ROI 1 mit ROI 2 Abb. 2.9D-E). Die Lebenszeit ist in der Region des Septums generell verkürzt, was auf eine andere Proteinstruktur oder Unterschiede im Milieu wie zum Beispiel einen anderen pH-Wert hinweist. Die Auswertung mehrerer Experimente ist in Abbildung 2.9F dargestellt. Hier zeigte sich, dass es einen signifikanten Unterschied in der Lebenszeit von Cdc3-CherryN / Cdc12-GfpN im Vergleich zur Donorkontrolle gab, jedoch kein signifikanter Unterschied zwischen Cdc3-CherryN / Cdc10-GfpC im Vergleich zur Kontrolle zu erkennen war. Daher wird vermutet, dass sich im Gegensatz zu den N- und C-Termini von Cdc3 und Cdc10, die N-Termini von Cdc3 und Cdc12 in räumlicher Nähe befinden. Somit ist mit hoher Wahrscheinlichkeit zu sagen, dass Septine in *U. maydis* ähnliche Strukturen ausbilden wie in *S. cerevisiae* ausbilden. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Septine auch an Endosomen und in Filamenten kolokalisieren und dass Cdc3 und Cdc12 Heteromere *in vivo* bilden.

### **2.6 Es befinden sich heteromere Septinkomplexe auf Endosomen und in Filamenten**

Um zu untersuchen ob Septine heteromere Strukturen lokal auf Endosomen bilden, wurde die subzelluläre Lokalisation der Septine in Abwesenheit einzelner, anderer Septine analysiert. Zuerst wurde verifiziert, dass die Deletion von Septinen nicht die Endosomen

selbst beeinflussen. Dafür wurden alle Septin-Deletionsmutanten mit dem lipophilen Farbstoff FM4-64 angefärbt und die Bewegung der Endosomen untersucht. Es zeigte sich, dass die Bewegung und die Anzahl der Endosomen nicht verändert waren (Abb. 2.10A). Als Negativkontrolle diente die Deletion des Kinesin-3 (*kin3*), für welches vorangegangene Studien gezeigt haben, dass die Endosomenbewegung gestört ist und die Endosomen am Minusende der Mikrotubuli verharren (Baumann *et al.*, 2012a). Mit diesen Experimenten konnte bewiesen werden, dass Septine für die Bewegung der Endosomen generell nicht benötigt werden.

Anschließend wurde die Abhängigkeit der Septine untereinander untersucht (Abb. 2.10B). Für jedes Septin wurde eine funktionelle Gfp-Fusion ausgewählt, die als Ausgangsstamm diente. Anschließend wurden für alle Kombinationen Deletionsstämme der Septine hergestellt. Eine Analyse dieser Stämme ergab, dass der Verlust eines Septins zu einer starken Reduktion oder zu einem kompletten Verlust der endosomalen Lokalisation des Gfp-markierten Septins führte (Abb. 2.10B). Bei einer Deletion von *cdc3* oder *cdc12* befand sich kein anderes Septin mehr auf den Endosomen. Die Deletion von *cdc10* führt dazu, dass Cdc3-GfpN nur noch vermindert auf Endosomen lokalisierte. Im Gegensatz dazu konnte in Abwesenheit von Cdc10 ein stärkeres Cdc12-GfpN-Signal auf Endosomen beobachtet werden. Im *cdc11* Deletionshintergrund konnte nur noch Cdc3-GfpN auf Endosomen gefunden werden. Obwohl anhand dieser Ergebnisse keine genaue Reihenfolge des Septinkomplexes auf Endosomen ausgemacht werden kann, beeinflusst die Deletion eines Septins die Lokalisation der anderen. Dies spricht dafür, dass Septine als Heteromere auf Endosomen vorliegen. Dieselbe Abhängigkeit konnte ebenso in Filamenten beobachtet werden (Abb. 2.10C). Hier führte der Verlust von einem Septin ebenfalls zu einer veränderten Lokalisation der anderen Septine. Die Analyse von Cdc3-GfpN in den verschiedenen Septin-Deletionsmutanten zeigte, dass nach der Deletion von *cdc10* kaum noch Filamente gebildet wurden. Eine Deletion von *cdc11* führte zu kürzeren Filamenten, die nicht in der Initialzelle vorkamen, während eine Deletion von *cdc12* zu verkürzten Filamenten führt, die sich fast nur auf die Initialzelle beschränken. Somit wird auch hier die Vermutung bestätigt, dass in den Septinfilamenten heteromere Strukturen vorliegen. Ferner ist auch die Lokalisation der Septine am Septum reduziert oder komplett verloren, nachdem ein Septin deletiert wurde (Abb. 2.10D). Außerdem konnten die anderen Septine

nicht mehr in zytoplasmatischen Ringen lokalisieren, nachdem ein Septin deletiert worden war (Daten nicht gezeigt).

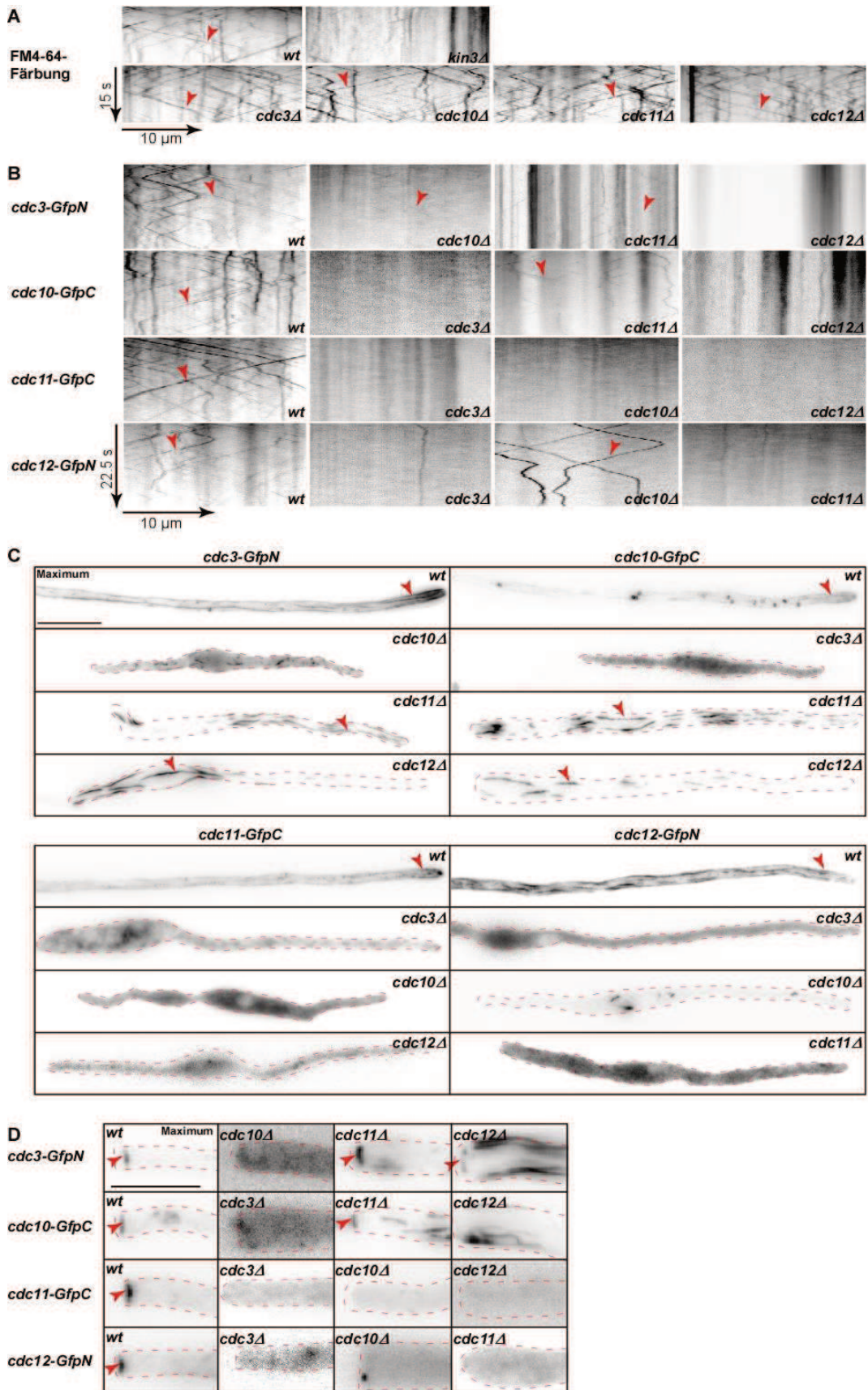


Abbildung 2.10: Septine bilden heteromere Komplexe.

**Abbildung 2.10 (fortgesetzt): Septine bilden heteromere Komplexe.** (A) Kymographen von FM4-64 gefärbten Hyphen, um die Bewegung früher Endosomen im Wildtyp und in den Septin-Deletionsstämmen sichtbar zu machen. Die Deletion von *kin3* dient als Negativkontrolle (Pfeile zeigen Endosomenbewegung). (B) Kymographen von Hyphen folgender Stämme: N- oder C-terminale Gfp-Fusionen der Septine (auf der linken Seite angegeben) exprimiert im Deletionshintergrund eines jeweils anderen Septins (Pfeile zeigen auf sich bewegende Endosomen, siehe auch ergänzende Daten Film 13). (C) Fluoreszenzaufnahmen von Hyphen dergleichen Stämme wie in B. Die Bildung von langen Filamenten ist, sofern vorhanden, angedeutet (rote Pfeile, Maximum-Projektion, Größenbalken 10  $\mu\text{m}$ ). (D) Fluoreszenzaufnahmen von Septen der gleichen Stämme wie in B. Die Lokalisation der Septin Gfp-Fusionen am Septum ist, sofern vorhanden, angedeutet (rote Pfeile, Maximum-Projektionen, Größenbalken 5  $\mu\text{m}$ ).

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Septine in allen Strukturen voneinander abhängig sind und somit eine Bildung von Heteromeren wahrscheinlich ist. Dennoch sind Septinmutanten von *U. maydis* in der Lage, hyphal auszuwachsen und Septen einzuziehen, obwohl die verbliebenden Septine nicht mehr in Filamenten vorkommen oder nicht mehr am Septum lokalisieren.

Um eine genauere Analyse der Septininteraktion durchzuführen, wurden Stämme hergestellt, in denen die  $\alpha 0$ -Helix deletiert wurde. Diese Region ist entscheidend für die Septin-Septin Interaktion über die NC-Interaktionsfläche und ist notwendig für die Ausbildung von Heteromeren (Bertin *et al.*, 2010; McMurray *et al.*, 2011a). Sequenzvergleiche mit SEPT2 aus Säugetieren und den Septinen aus *S. cerevisiae* zeigten, dass Cdc3, Cdc10 und Cdc12 eine relativ hohe Konservierung dieses Bereiches aufwiesen, wohingegen Cdc11 kaum konserviert war (Abb. 2.11A). Die Auswirkungen der Deletion von der  $\alpha 0$ -Helix wurden in verschiedenen Stämmen getestet. Zum einen wurde die  $\alpha 0$ -Helix in *cdc3*, *cdc10* und *cdc11* deletiert (roter Kasten Abb. 2.11A) und die Lokalisation dieser veränderten Proteine anhand von Gfp-Fusionen untersucht. Dadurch sollten die Auswirkungen einer gestörten Cdc3-Cdc12, Cdc10-Cdc10 und Cdc11-Cdc11 Interaktion überprüft werden. Dabei führte die Deletion der  $\alpha 0$ -Helix von *cdc11* vermutlich zu einem instabilen Protein und daher zu einem sehr schwachen Gfp-Signal. Deshalb wurde diese Mutante hier nicht näher analysiert. Zum anderen wurde die subzelluläre Lokalisation von Cdc12-GfpN untersucht, während entweder die  $\alpha 0$ -Helix in *cdc3* oder *cdc10* deletiert war. Eine Analyse aller Stämme zeigte, dass die Deletion der  $\alpha 0$ -Helix in allen Fällen zu einem Verlust von zytoplasmatischen Ringen und der Lokalisation am Septum führte (Abb. 2.11B). Dabei spielte es keine Rolle, ob die Gfp-Fusion der  $\alpha 0$ -Helix Deletion oder Cdc12-Gfp mit einer Deletion der  $\alpha 0$ -Helix von *cdc3* oder *cdc10* untersucht wurde. Dies lässt vermuten, dass die Deletion der  $\alpha 0$ -Helix die Interaktion zwischen Septinen beeinflusst und folglich die Lokalisation am Septum und in Ringen nicht mehr ausgebildet werden kann. Weiterhin konnte ein sehr starkes zytoplasmatische Signal beobachtet werden, was für einen

Überschuss an nicht eingebauten Septinproteinen spricht (Abb. 2.11E). Eine Analyse der Lokalisation auf Endosomen von Cdc3 $\alpha$ 0 $\Delta$ -GfpN ergab eine Detektion einiger sich bewegenden Endosomen nur in der Region des Zellkerns (Abb. 2.11C Stern). Das Signal war aber deutlich schwächer als bei Cdc3-GfpN, was vermuten lässt, dass weniger Cdc3 auf den Endosomen lokalisiert, wenn die Interaktion zwischen Cdc3 und Cdc12 gestört ist. Daher scheint die Fähigkeit zur Bildung von Heterodimeren wichtig für die endosomale Lokalisation zu sein. Auch bei der Analyse von Cdc10 $\alpha$ 0 $\Delta$ -GfpN zeigte sich ein sehr starkes zytoplasmatisches Signal. Jedoch konnte in diesem Stamm die Lokalisation auf Endosomen, überwiegend in der Kernregion, aber auch in einigen zytoplasmatischen Bereichen detektiert werden. Dies lässt vermuten, dass eine Cdc10-Cdc10 Interaktion nicht für die Lokalisation auf Endosomen benötigt wird, da wahrscheinlich auch tetramere Strukturen auf Endosomen lokalisieren können. Übereinstimmend mit den vorherigen Ergebnissen lokalisiert Cdc12-GfpN in beiden Fällen der  $\alpha$ 0-Helix Deletion noch auf Endosomen, das zu detektierende Signal scheint aber in der Cdc10 $\alpha$ 0 $\Delta$  Mutante deutlich stärker zu sein als in der Cdc3 $\alpha$ 0 $\Delta$  Mutante (Abb. 2.11D). Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Störung der Cdc3-Cdc12 Interaktion stärkere Auswirkungen auf die Lokalisation auf Endosomen hat als eine Störung der Cdc10-Cdc10 Interaktion. Dies spricht dafür, dass eher kurze Heteromere als längere Filamente auf Endosomen lokalisieren. Abschließend wurde ebenfalls die Auswirkung der  $\alpha$ 0-Helix Deletion auf die Fähigkeit der Filamentbildung getestet (Abb. 2.11E). Alle Stämme, die eine  $\alpha$ 0-Helix Deletion tragen, waren nicht mehr in der Lage, Filamente auszubilden. Daher scheint die funktionelle Interaktion zwischen allen Septinen notwendig für die Ausbildung von Septinfilamenten zu sein.

Somit konnte gezeigt werden, dass eine Störung der Septin-Septin Interaktion zu einem kompletten Verlust von Septinen am Septum und in Filamenten führt, jedoch die Lokalisation auf Endosomen nicht komplett inhibiert, aber reduziert ist. Dies lässt vermuten, dass auf Endosomen kürzere, heteromere Strukturen gebildet werden als in Ringen oder in Filamenten.

Um die Auswirkung einer G-Interaktionsflächenmutation zu überprüfen, wurde ein Cdc3-GfpN Stamm hergestellt, in dem ein konserviertes Histidin (H135) der GTP-Bindedomäne gegen ein Alanin ausgetauscht worden ist. In *S. cerevisiae* führte die Mutation dieser Aminosäure (H158) zu einem Temperatur-sensitiven Hefestamm und zeigte einen Effekt auf die Cdc3-Cdc10 Heteromerbildung *in vitro* (Sirajuddin 2009). Dagegen verhielt sich



diese Mutante in *U. maydis* wie der Wildtyp und es konnte kein Unterschied in der Endosomen Lokalisation oder der Septen- und Filamentbildung gezeigt werden (Daten nicht gezeigt).

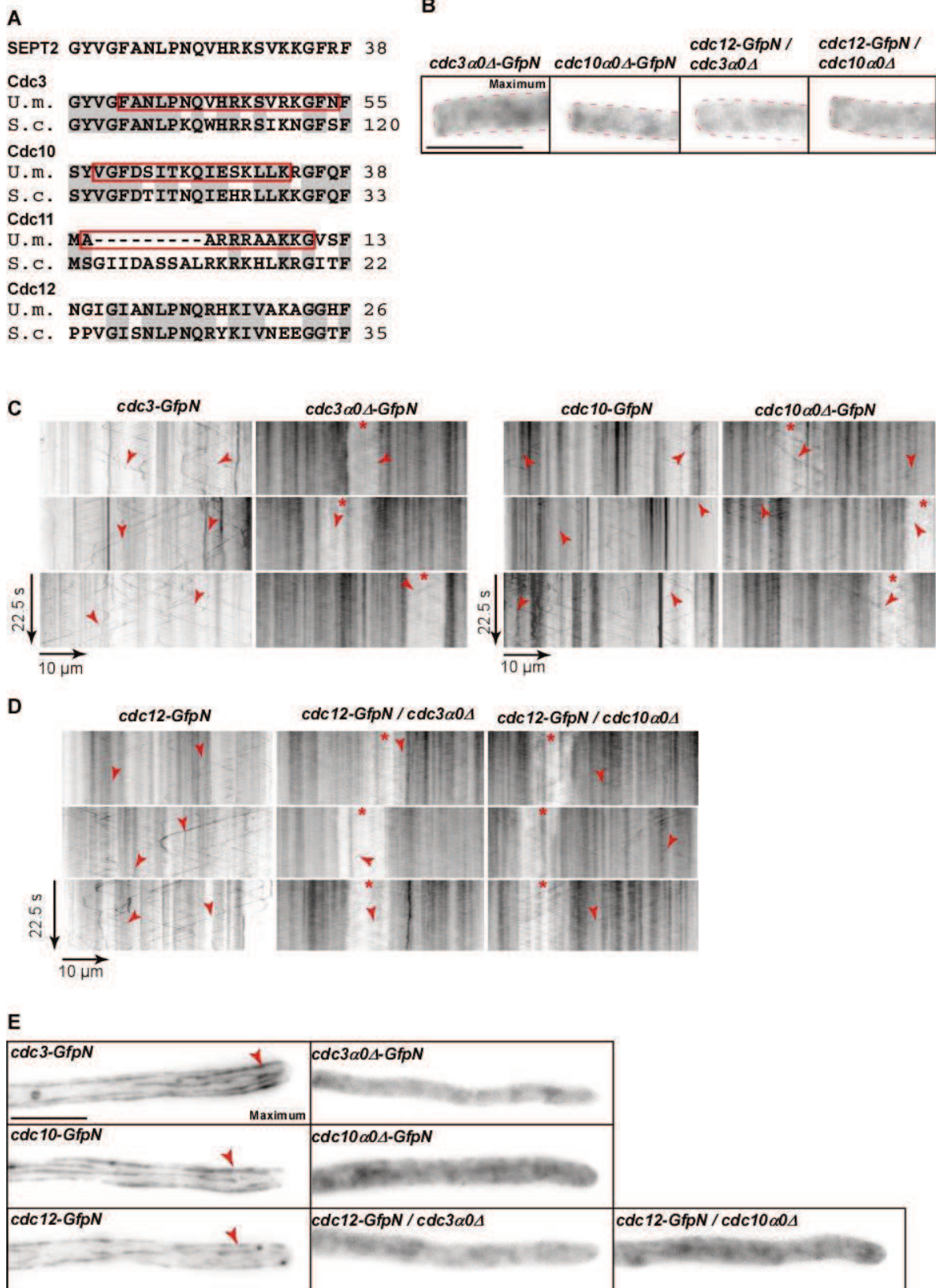
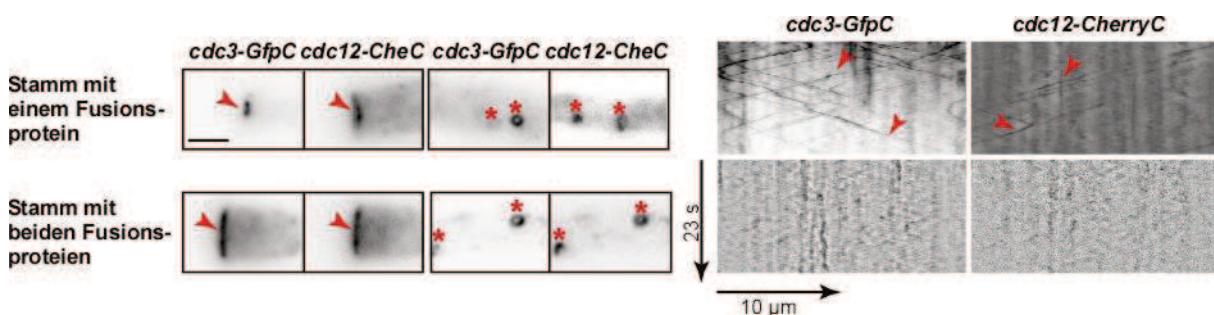


Abbildung 2.11: Die Deletion der  $\alpha$ 0-Helix führt zu einer Verminderung der endosomalen Lokalisation und Inhibition der Filamentbildung.

**Abbildung 2.11 (fortgesetzt): Die Deletion der  $\alpha$ 0-Helix führt zu einer Verminderung der endosomalen Lokalisation und Inhibition der Filamentbildung.** (A) Sequenzvergleich des  $\alpha$ 0-Segments des menschlichen SEPT2 Proteins mit Cdc3, Cdc10, Cdc11 und Cdc12 aus *U. maydis* (U.m) und *S. cerevisiae* (S.c.). Der rote Balken markiert die Regionen, die in Anlehnung an vergleichbare Deletionen aus *S. cerevisiae* deletiert wurden (Hernandez-Rodriguez und Momany, 2012; McMurray *et al.*, 2011a). Die Region in Cdc3, Cdc10 und Cdc12 ist stärker konserviert als in Cdc11. (B) Fluoreszenzbilder der Septenregion von Stämmen, die eine Deletion der  $\alpha$ 0-Helix in Cdc3 und Cdc10 tragen (für einen Vergleich mit dem Wildtyp, siehe Abbildung 2.10D links, Größenbalken 5  $\mu$ m, Maximum-Projektionen). (C) Kymographen von Hyphen, in denen Cdc3-GfpN bzw. Cdc3 $\alpha$ 0 $\Delta$ -GfpN (links) und Cdc10-GfpN bzw. Cdc10 $\alpha$ 0 $\Delta$ -GfpN (rechts) exprimiert werden. Die Bewegung der Septin-Varianten auf Endosomen (rote Pfeile) ist im gesamten Zytoplasma oder nur im Bereich des Zellkerns (Stern) zu erkennen (siehe auch ergänzende Daten Film 14 und 15). (D) Kymographen von Hyphen eines Cdc12-GfpN exprimierenden Stammes (links) und von Cdc12-GfpN exprimierenden Stämmen mit zusätzlichen Deletionen der  $\alpha$ 0-Helix von Cdc3 (Mitte) oder Cdc10 (rechts). Die Bewegung der Septine auf Endosomen ist im gesamten Zytoplasma oder in der Region des Zellkerns (Stern) sichtbar (Pfeile markieren Endosomen, siehe auch ergänzende Daten Film 16). (E) Fluoreszenzbilder von Hyphenspitzen verschiedener Stämme mit Septin-Gfp Fusionsproteinen und den dazugehörigen Stämmen, welche eine Deletion der  $\alpha$ 0-Helix tragen. Die Lokalisation in Filamenten ist, sofern vorhanden, angedeutet (Pfeile, Maximum-Projektionen, Größenbalken 10  $\mu$ m).

Ferner wurde ein Stamm getestet, der sowohl Cdc3-GfpC als auch Cdc12-mCherryC als C-terminale Fusionen exprimiert. Mit diesem Stamm sollte untersucht werden, ob sich die C-terminale Fusionen in einem Stamm störend auf die Interaktion von Cdc3-Cdc12 auswirken. Wie vorher gezeigt, waren die Stämme mit den einzelnen C-terminalen Fusionen nicht mehr in der Lage, Filamente auszubilden (Abb. 2.7A). Die Anwesenheit von beiden Fusionsproteinen in einem Stamm hatte keinen Einfluss auf die Lokalisation am Septum oder auf die Bildung von zytoplasmatischen Ringen (Abb. 2.12). Allerdings war die endosomale Lokalisation beider Proteine komplett gestört, sobald beide Proteine mit einem C-terminalen Fusionsprotein exprimiert wurden. Dies spricht ebenfalls dafür, dass Heteromere auf Endosomen vorhanden sein müssen. Des Weiteren scheint die Interaktion von Cdc3-Cdc12 über die C-terminale Domäne für die Bindung an Endosomen benötigt zu werden. Zusammenfassend zeigt auch dies, dass Septine heteromere Einheiten auf der Oberfläche von Endosomen bilden.

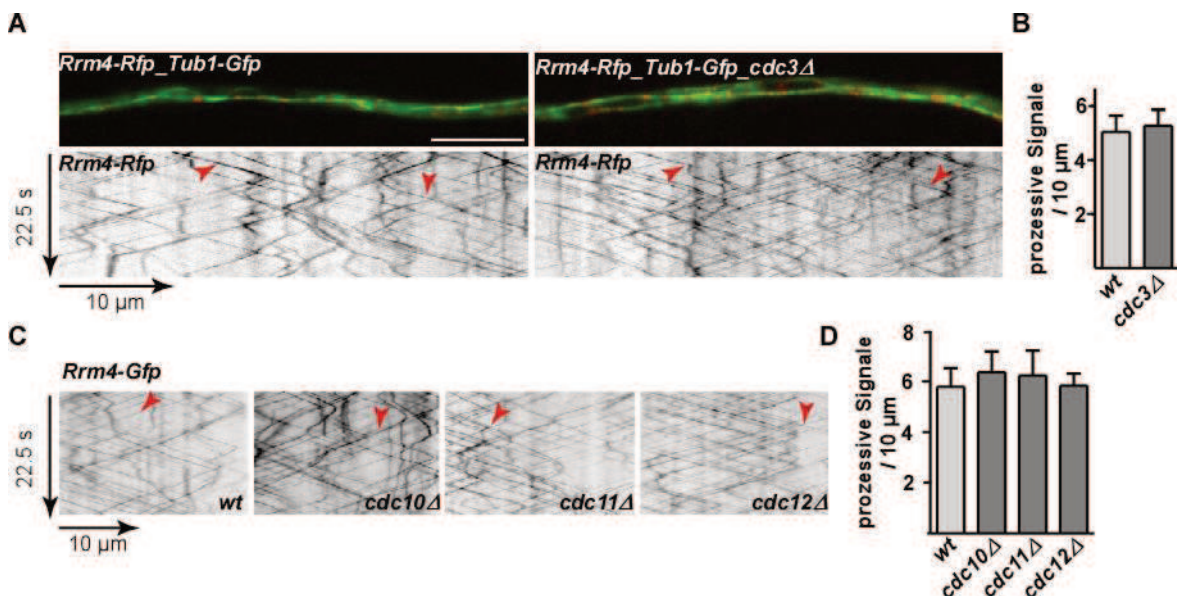


**Abbildung 2.12: Die Expression zweier C-terminalen Fusionen von Cdc3 und Cdc12 führt zu einem kompletten Verlust der endosomalen Lokalisation.** Mikrographen von Stämmen, die Cdc3-GfpC und Cdc12-CherryC einzeln (oben) oder simultan (unten) exprimieren. Die Lokalisation an Septen (Pfeile, links), in zytoplasmatischen Ringen (Sterne, Mitte) und auf Endosomen (Pfeile, Kymographen rechts) ist gekennzeichnet (Größenbalken 2  $\mu$ m).



## 2.7 Rrm4 transportiert die mRNAs aller vier Septine

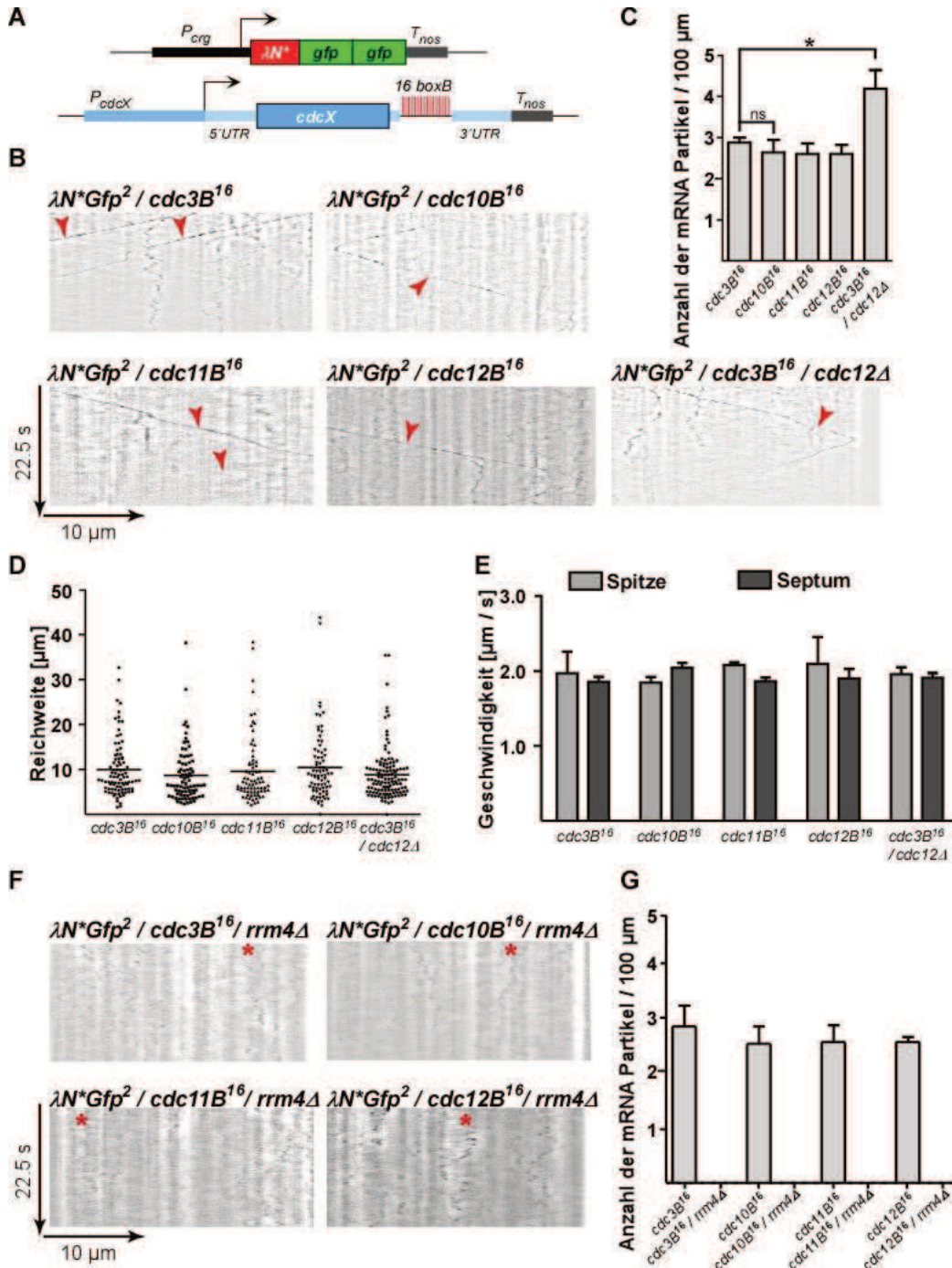
Um den Zusammenhang zwischen Septinen und dem Rrm4-abhängigen, endosomalen mRNA-Transport näher zu untersuchen, wurde zunächst die Bewegung von Rrm4 in allen Septin-Deletionsstämmen untersucht. Die Analyse eines Stammes, welcher Rrm4-RFP / Tub1-Gfp exprimiert, ermöglichte hierbei die gleichzeitige Visualisierung von Rrm4 Partikeln entlang des Mikrotubuli-Zytoskeletts (Abb. 2.13A). Die zusätzliche Deletion von *cdc3* zeigte weder einen Einfluss auf den Transport von Rrm4, noch konnten Veränderungen des Mikrotubuli-Zytoskeletts beobachtet werden. Auch die genaue Analyse der Rrm4-enthaltenden Partikel bestätigte nahezu dieselbe Anzahl an Rrm4 Partikeln in der *cdc3* Mutante im Vergleich zum Ausgangsstamm (Abb. 2.13B). Die jeweiligen Deletionen der anderen drei Septine wurden in einem Rrm4-Gfp Stammhintergrund untersucht. Auch hier zeigte sich kein Einfluss der Deletionen auf die Bewegung oder die Anzahl der Rrm4-Partikel (Abb. 2.13C-D). Somit deutete diese Analyse darauf hin, dass die Deletion von Septinen keine Veränderungen der Rrm4 Funktion hervorruft.



**Abbildung 2.13: Die Deletion eines Septins führt zu keiner Veränderung in der Rrm4-Bewegung.** (A) Fluoreszenzbild einer Hyphenseite eines Stammes, der Rrm4-Rfp (rot) / Tub1-Gfp (grün) exprimiert (oben, links) und der gleichzeitigen Deletion von *cdc3* (oben, rechts, Größenbalken 10 µm). Die Bewegung von Rrm4 ist in dem dazugehörigen Kymographen dargestellt (unten, Pfeile, siehe auch ergänzende Daten Film 17). (B) Quantifizierung der prozessiven Rrm4-Signale pro 10 µm Hyphenseite in Wildtyp und *cdc3* Deletionsmutanten. (C) Kymographien, welche die Bewegung von Rrm4-Gfp im Wildtyp und in den *cdc10*, *cdc11* und *cdc12* Deletionsstämmen visualisieren. (D) Quantifizierung der prozessiven Rrm4-Signale pro 10 µm Hyphenseite im Wildtyp und in den verschiedenen Septin-Deletionsmutanten.

Vorherige Studien haben gezeigt, dass Rrm4 verschiedenste Ziel-mRNAs binden kann (Baumann *et al.*, 2014; König *et al.*, 2009). Die Bewegung von RNA kann durch RNA-Lebendzell-Mikroskopie sichtbar gemacht werden (Baumann *et al.*, 2014) (Abb. 2.14A). Dafür werden in die 3'UTR der Ziel-mRNA 16 RNA-Haarnadelstrukturen (*boxB* Loops)

eingefügt. Ein RNA Bindeprotein aus dem Phagen Lambda, hier  $\lambda N$  genannt, erkennt diese Haarnadelstrukturen und kann diese binden. Da an  $\lambda N$  zwei Gfp-Fluoreszenzproteine fusioniert sind, werden diese ebenfalls an die mRNA rekrutiert und ermöglichen somit die Detektion der mRNA *in vivo*.



**Abbildung 2.14: Rrm4 transportiert die mRNAs aller Septine durch die Hyphe.** (A) Schematische Darstellung der Komponenten des  $\lambda N$ -Gfp RNA Reportersystems ( $P_{crg}$ : Arabinose induzierbarer Promotor;  $T_{nos}$ : heterologer transkriptioneller Terminator; *cdcX*: Septingen, welches 16 Kopien der *boxB* Haarnadelstrukturen in der 3'UTR trägt).  $\lambda N$ -Gfp<sup>2</sup> wird durch die Bindung an *boxBs* an die mRNA rekrutiert (Baumann *et al.*, 2014). (B) Kymographen der Bewegung von mRNA Partikeln der einzelnen Septine (bewegliche Partikel sind durch Pfeile markiert, siehe auch ergänzende Daten Film 18). (C) Das Balkendiagramm stellt die Anzahl der mRNA Partikel / 100 µm dar (n=3 unabhängige Experimente mit mindestens 10 Hyphen pro Stamm und Experiment, Fehlerbalken zeigen Standardfehler des Mittels). (D) Diagramm zeigt die Reichweite der prozessierten mRNA Partikel / µm (mindestens 30 Hyphen pro Stamm).

**Abbildung 2.14 (fortgesetzt): Rrm4 transportiert die mRNAs aller Septine durch die Hyphe.** (E) Das Balkendiagramm stellt die Geschwindigkeit der mRNA Partikel in  $\mu\text{m} / \text{s}$  dar. Dabei wird zwischen einer Bewegung in Richtung der Spitze und Septum unterschieden. (F) Kymographen zeigen nur statische mRNA Partikel (Stern) nach der Deletion von *rrm4*. (G) Balkendiagramm verdeutlicht die Anzahl der Septin-mRNA Partikel pro  $100 \mu\text{m}$  im Wildtyp, im Vergleich zu keinen Partikel im *rrm4* Deletionshintergrund ( $n=3$  unabhängige Experimente mit mindestens 5 Hyphen pro Stamm und Experiment, Fehlerbalken zeigen Standardfehler des Mittels)

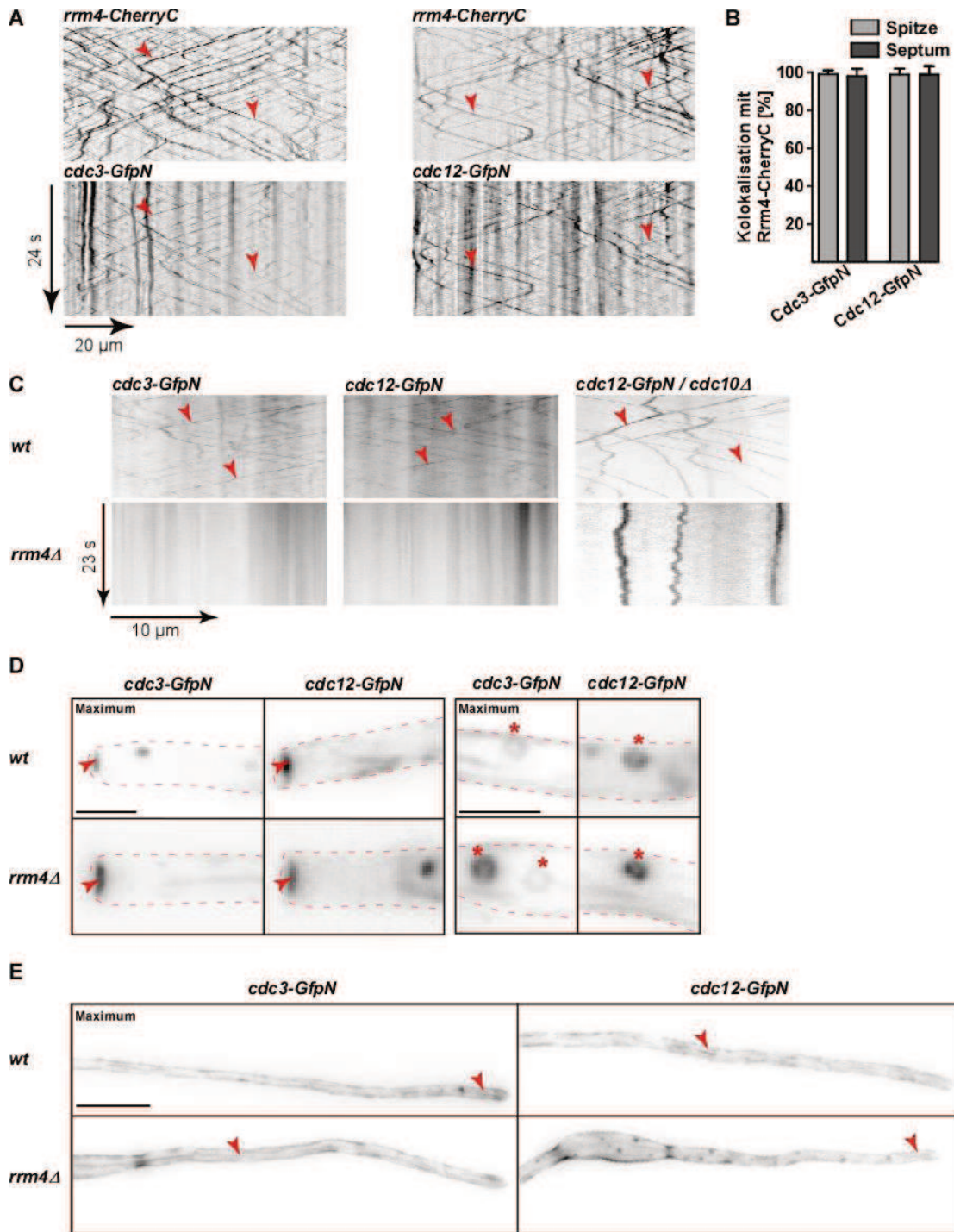
In vorangegangenen Experimenten wurde gezeigt, dass das RNA-Bindeprotein Rrm4 zuständig für den endosomalen Transport der *cdc3* mRNA und des Cdc3 Proteins ist. Mit hoher Wahrscheinlichkeit wird dies durch lokale Translation auf den sich bewegenden Endosomen erreicht (Baumann *et al.*, 2014). In iCLIP Experimenten wurden alle Septine als Rrm4 Ziel-mRNAs gefunden (Carl Haag, Dissertation 2013). Um diese biochemischen Experimente *in vivo* zu bestätigen, wurden mit allen Septin-mRNAs RNA-Lebendzell-Mikroskopie Analysen durchgeführt. Dazu wurden Stämme hergestellt, in denen jeweils 16 *boxB* Loops in die 3'UTR der mRNAs integriert wurden und das  $\lambda\text{N-Gfp}$  Konstrukt im IP Lokus (Broomfield und Hargreaves, 1992) unter der Kontrolle des regulierbaren  $P_{\text{crg}}$  Promotors exprimiert wurde (Abb. 2.14A). Eine Analyse dieser Stämme zeigte, dass alle Septin-mRNAs durch die Hyphe transportiert wurden (Abb. 2.14B-C). Die Anzahl der beobachteten, transportierten mRNA Partikel war bei allen Septinen mit etwa 2,8 Partikel /  $100 \mu\text{m}$  identisch (Abb. 2.14C). Auch die Geschwindigkeit und die Reichweite der mRNAs waren vergleichbar (Abb. 2.14D-E). Ferner konnte gezeigt werden, dass der mRNA-Transport durch Rrm4 vermittelt wird, da die Deletion von *rrm4* zu einem kompletten Verlust der Prozessivität führte (Abb. 2.14F-G). Es wurden nur Partikel beobachtet, welche sich durch eingeschränkte Diffusion über kurze Distanzen bewegten. Somit konnten die vorherigen Ergebnisse, dass Rrm4 das Schlüsselprotein im mRNA-Transport ist, bestätigt werden. Um die Untersuchung weiter auszuweiten wurde außerdem ein Stamm untersucht, indem die *cdc3* mRNA in Abwesenheit von *cdc12* analysiert wurde. Die vorangegangenen Experimente haben gezeigt, dass das Cdc3 Protein nicht mehr auf Endosomen lokalisiert, wenn *cdc12* deletiert ist (Abb. 2.10B). Jedoch wurde die *cdc3* mRNA in einem *cdc12* Deletionsstamm mit derselben Geschwindigkeit und Reichweite transportiert wie im Wildtyp (Abb. 2.14B-C). Die Anzahl der Partikel pro Hyphe war jedoch leicht erhöht (4 Partikel /  $100 \mu\text{m}$ ). Möglicherweise konkurrieren die mRNAs von *cdc3* und *cdc12* um dieselbe Bindungsstelle auf dem Endosom und somit kann mehr *cdc3* mRNA transportiert werden, wenn *cdc12* deletiert ist. Durch dieses Experiment konnte erstmals der endosomale Transport von *cdc3* mRNA vom Cdc3 Protein entkoppelt werden. Somit kann ausgeschlossen werden, dass das Translationsprodukt Cdc3 seine eigene mRNA für autoregulatorische Prozesse bindet

(Caballero-Lima *et al.*, 2014; Haag *et al.*, 2015). Zusammenfassend lässt sich sagen, dass alle Septin-mRNAs Rrm4-abhängig auf Endosomen transportiert werden, was die Vermutung zulässt, dass es zu einem Zusammenbau der Translationsprodukte auf Endosomen kommen kann.

### **2.8 Rrm4 ist wichtig für die Lokalisation der Septine auf Endosomen**

Nachdem gezeigt wurde, dass die mRNA aller Septine Rrm4-abhängig auf Endosomen transportiert wird, wurde als nächstes die Lokalisation der Proteine untersucht. Dafür wurde zusätzlich zu dem bereits untersuchten Stamm mit Rrm4-CherryC / Cdc3-GfpN (Baumann *et al.*, 2014) ein Stamm mit Rrm4-CherryC / Cdc12-GfpN hergestellt, mit welchem die Kolo­kalisierung von Cdc12 mit Rrm4 analysiert werden konnte. Die Abbildung 2.15A zeigt eine deutliche Kolo­kalisierung beider Septine mit Rrm4. Diese Kolo­kalisierung konnte auf nahezu 100 % quantifiziert werden (Abb. 2.15B). Dies bestätigt die Analysen, dass Septine mit großer Wahrscheinlichkeit auch Cdc10 und Cdc11 auf Rrm4-positiven Endosomen transportiert werden. Um die Rrm4 Abhängigkeit dieses Transports zu testen, wurden *rrm4* Deletionsstämme mit Cdc3-GfpN und Cdc12-GfpN untersucht. Eine Analyse dieser Stämme bewies die Abhängigkeit der Septinproteine von Rrm4 auf Endosomen, da Cdc3 und Cdc12 in der *rrm4* Mutante nicht mehr auf Endosomen detektiert werden konnten (Abb. 2.15C). Auch die Bewegung von Cdc12-Gfp auf Endosomen in Abwesenheit von *cdc10* (Abb. 2.10B / Abb. 2.15C) war Rrm4-abhängig, was zeigte, dass auch in diesem Fall Cdc12-GfpN Rrm4 für die endosomale Lokalisation benötigt wird. Die Deletion von *rrm4* führte jedoch zu keinerlei Veränderungen in der Lokalisation der Proteine am Septum, in Ringen oder in Filamenten (Abb. 2.15D-E). Zusammenfassend lässt sich sagen, dass ohne Rrm4 keine Septin-mRNA mehr transportiert werden kann, was zu einem kompletten Verlust der Septinproteine auf Endosomen führt. Dies unterstützt die Hypothese der lokalen Translation von Septinen auf den Endosomen.

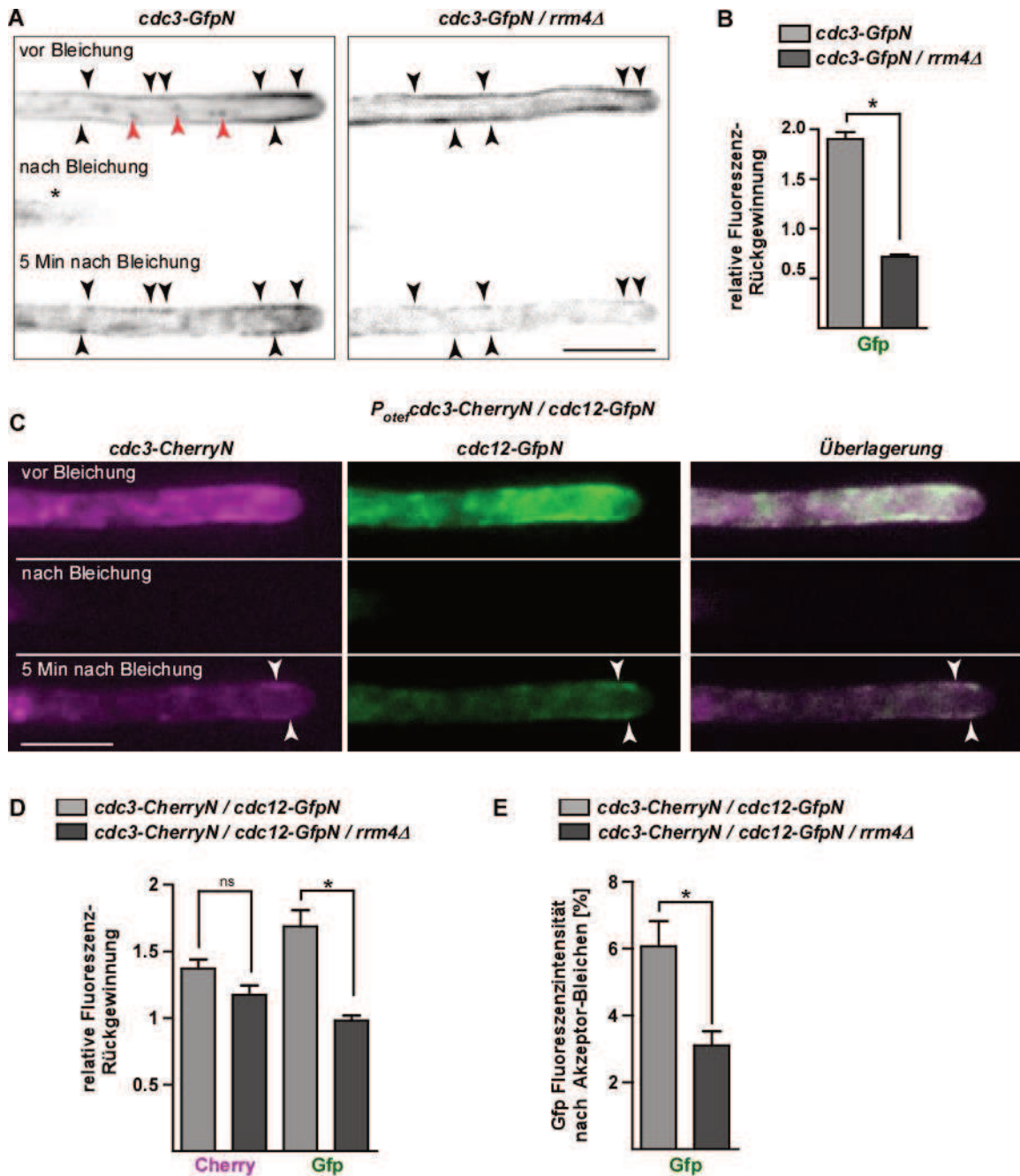




**Abbildung 2.15: Rrm4 wird für die Lokalisation der Septine auf Endosomen benötigt.** (A) Kymographen zeigen die Kolokalisation von Rrm4 mit den beiden Septinen Cdc3 und Cdc12. Rote Pfeile markieren Beispiele der Kolokalisation auf sich bewegenden Endosomen (siehe auch ergänzende Daten Film 19). (B) Das Balkendiagramm stellt die Prozentzahl von Cdc3-GfpN oder Cdc12-GfpN Partikeln dar, die mit Rrm4-CherryC kolokalisieren. Dabei wird zwischen Partikeln, die sich in Richtung Spitze oder Richtung Septum bewegen unterschieden (n= 15 Hyphen, Fehlerbalken zeigen Mittelwert mit Standardabweichung). (C) Kymographen der Stämme, die Cdc3-GfpN (links) oder Cdc12-GfpN (Mitte, rechts noch mit einer zusätzlichen Deletion von *cdc10*) exprimieren (oben). Pfeile markieren sich bewegende Endosomen. Unten sind Kymographen derselben Stämme mit einer zusätzlichen Deletion von *rrm4* gezeigt. (D) Fluoreszenzbilder von Hyphen zur Lokalisation von Cdc3-GfpN und Cdc12-GfpN in Septen und Ringen (oben) im Vergleich zu der Lokalisation in der dazugehörigen *rrm4* Deletionsmutante (unten, Maximum-Projektionen). (F) Fluoreszenzbilder von Hyphen zur Lokalisation von Cdc3-GfpN und Cdc12-GfpN in Filamenten im Wildtyp (oben) und in der *rrm4* Deletionsmutante (unten, Maximum-Projektionen, Größenbalken 10 $\mu$ m).

### 2.9 Septine werden zusammen über die Endosomen verteilt

Bis hierhin konnte gezeigt werden, dass alle Septin-mRNAs und die kodierten Proteine auf Endosomen transportiert werden. Dieser Transport wird wahrscheinlich für die effiziente Bildung von höher-geordneten Strukturen an der wachsenden Spitze benötigt. Um diese Hypothese weiter zu untersuchen, wurde zunächst Cdc3-GfpN in FRAP (*fluorescence recovery after photobleaching*) Experimenten analysiert. Cdc3-GfpN wurde ausgewählt, da es zum einen die beste biologische Aktivität zeigte und zum anderen schon in früheren Studien in FRAP Experimenten genutzt wurde. In der letzten Studie wurde dargelegt, dass die Rückgewinnung der Fluoreszenz von Cdc3-GfpN Rrm4 abhängig ist (Baumann *et al.*, 2014; Pohlmann *et al.*, 2015). Im Vergleich zu den vorherigen Experimenten wurde in dieser Arbeit die räumliche Auflösung verbessert, sodass kortikale Filamente in den FRAP Experimenten untersucht werden konnten. Für die Experimente wurde jeweils die gesamte Fluoreszenz in einem Bereich von 15  $\mu\text{m}$  ab der Hyphenspitze durch einen 405 nm Laser gebleicht und die wiederkehrende Fluoreszenz wurde nach fünf Minuten detektiert. Dieser Zeitraum wurde gewählt, da in vorherigen Experimenten die Halbwertszeit der Rückgewinnung von Cdc3-GfpN ca. fünf Minuten betrug (Baumann *et al.*, 2014). Um die gesamten kortikalen Filamente untersuchen zu können, wurden Z-Stapel aufgenommen und eine Maximum-Projektion analysiert. Abbildung 2.16 stellt beispielhaft eine Hyphenspitze eines Cdc3-GfpN exprimierenden Stammes vor der Photobleichung, direkt nach der Photobleichung und nach fünf Minuten dar. In dieser ist zu erkennen, dass Cdc3-GfpN in denselben kortikalen Strukturen zurückkommt, die vor dem Photobleichen vorhanden waren. Die Rückgewinnung der Fluoreszenz fand hierbei über den gesamten gebleichten Bereich statt und war nicht nur auf die Filamentenden beschränkt. Dasselbe Bild war in einem Cdc3-GfpN Stamm zu erkennen, der zusätzlich eine *rrm4* Deletion trug (Abb. 2.16A). Auch hier kehrte die Fluoreszenz von Cdc3-GfpN in den kortikalen Filamenten zurück. Eine Analyse der relativen Fluoreszenz Rückgewinnung zeigte, dass in Abwesenheit von *rrm4* die rückgewonnene Fluoreszenz deutlich reduziert war (Abb. 2.16B). Daher wird vermutet, dass Rrm4 für den endosomalen Transport von Cdc3 benötigt wird, um einen effizienteren Einbau von Cdc3 in kortikale Filamente an der Hyphenspitze zu erreichen.



**Abbildung 2.16: Rrm4 wird für einen effizienten Einbau der Septine in Filamente benötigt.** (A) Repräsentatives Experiment der 3D-Photobleichexperimente in einer Cdc3-GfpN exprimierenden Hyphe (links) im Vergleich zu einer zusätzlichen Deletion von *rrm4* (rechts, schwarze Pfeile markieren Septinfilamente, rote Pfeile markieren Endosomen). (B) Das Balkendiagramm zeigt die relative Fluoreszenzrückgewinnung von Cdc3-GfpN in den 3D-Photobleichexperimenten (n=3 unabhängige Experimente mit mindestens 5 Hyphen pro Stamm und Experiment, Fehlerbalken zeigen Standardfehler des Mittels, gepaarter zweiseitiger t-Test,  $p > 0,05$  \*). (C) Repräsentatives 3D-Photobleichexperiment des Cdc3-CherryN / Cdc12-GfpN exprimierenden Stammes. Die Fluoreszenz beider Proteine kehren in denselben Strukturen zurück (Pfeile). (D) Das Balkendiagramm der Auswertung der Zweifarben-3D-Photobleichexperimente, welches die Zurückgewinnung von Cdc3-CherryN (Magenta) oder Cdc12-GfpN (grün) darstellt (n=3 unabhängige Experimente mit mindestens 5 Hyphen pro Stamm und Experiment, Fehlerbalken zeigen Standardfehler des Mittels, gepaarter zweiseitiger t-Test,  $p > 0,05$  \*, nicht signifikant ns). (E) Das Balkendiagramm zeigt die Gfp Fluoreszenz von Cdc12 nach Akzeptorphotobleichen. Die Fluoreszenz des Cdc3-CherryN/Cdc12-GfpN Stammes ist stärker als die Fluoreszenz in demselben Stammhintergrund mit einer zusätzlichen Deletion von *rrm4*. (n=3 Experimente mit mindestens 5 Hyphen pro Stamm und Experiment, Fehlerbalken zeigen Standardfehler des Mittels; gepaarter zweiseitiger t-Test,  $p < 0,05$  \*).

Weiterhin wurde untersucht, ob verschiedene Septine an identischen Stellen wiederkehren. Dafür wurden Zweifarben-3D-Photobleichexperimente durchgeführt. Dazu

wurden ebenfalls 15  $\mu\text{m}$  der Hyphenspitze Cdc3-Cherry / Cdc12-GfpN exprimierenden Stamms geblichen. Auch hier wurde die Rückgewinnung der Fluoreszenz fünf Minuten nach der Photobleichung analysiert. Es konnte eine simultane Rückgewinnung von Cdc3-CherryN und Cdc12-GfpN in den identischen Strukturen beobachtet werden (Abb. 2.16C). Dies lässt darauf schließen, dass heteromere Einheiten in kortikalen Filamenten eingebaut werden. Ebenfalls konnte bestätigt werden, dass die Rückgewinnung beider Septine von Rrm4 abhängig ist, da auch hier die Rückgewinnung in der *rrm4* Deletionsmutante deutlich geringer ist (Abb. 2.16D). In der statistischen Auswertung ist jedoch nur ein signifikanter Unterschied für Cdc12-GfpN zu erkennen. Dass die Rückgewinnung von Cdc3-CherryN nicht so stark ausfällt, kann eventuell an den photophysikalischen Eigenschaften von Cherry liegen. Durch die Aufnahme mehrerer Z-Stapel kommt es hier zu einem verstärkten Photobleichen während der Aufnahmen. Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass Septine in kortikale Filamente eingebaut werden und dass die Rückgewinnung effizienter ist, wenn die Septinproteine Rrm4-anhängig durch die Hyphe transportiert werden.

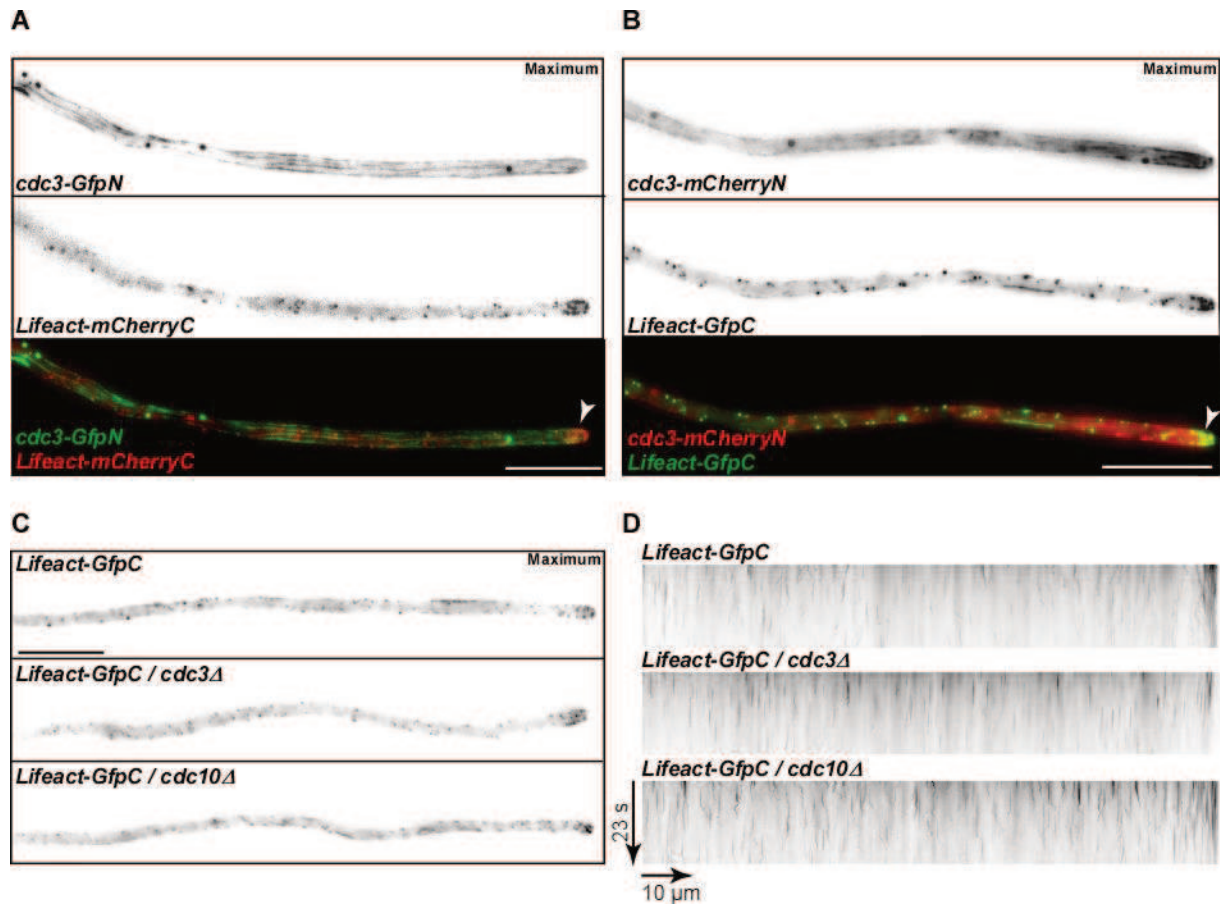
Des Weiteren wurden erneut FRET Experimente nach Akzeptorphotobleichen durchgeführt, bei welchem die Stärke des FRET Signals zwischen Cdc3 und Cdc12 in Hyphen des Wildtyps und der *rrm4* Deletionsmutante verglichen wurden (Abb. 2.16E). Wie in Abbildung 2.9B gezeigt, führte das Photobleichen des Akzeptors Cdc3-CherryN zu einem sechs prozentigen Anstieg der Gfp Fluoreszenz durch FRET. Die zusätzliche Deletion von *rrm4* in diesem Stammhintergrund führte zu einer Verminderung dieses FRET Effekts auf drei Prozent. Dies deutet darauf hin, dass in Abwesenheit von *rrm4* Septine noch miteinander interagieren können, wahrscheinlich an Septen, in Ringen und in Filamenten, aber dass diese Interaktion durch die Abwesenheit der Septine auf Endosomen vermindert ist. Daher stellt die Interaktion der Septine auf Endosomen einen zentralen Teil der Septinlokalisierung und Interaktion dar. Durch diese beiden Experimente konnte bestätigt werden, dass die Lokalisation auf Endosomen wichtig für die Interaktion und somit die Bildung von heteromeren Septineinheiten ist. Diese vorgefertigten Strukturen auf sich bewegenden Endosomen werden benötigt, um die Bildung von höher-geordneten Strukturen an der Hyphenspitze zu gewährleisten.



## 2.10 Die Deletion von Septinen hat keinen Einfluss auf die Bildung des Aktin-Zytoskeletts

Da eine Interaktion von Septinen mit dem Aktin-Zytoskelett in vielen verschiedenen Organismen und Geweben beschrieben wurde, wurde das Aktin-Zytoskelett in *U. maydis* durch das Aktin-bindende Peptid Lifeact untersucht (Kinoshita 2002, Nagata 2003, Surka 2002). Eine Analyse der Kollokalisierung von Cdc3 und Lifeact gestaltete sich als schwierig, da die Cherry-Fusion permanent deutlich schlechter zu erkennen war. Daher wurden beide möglichen Kombinationen, Cdc3-GfpN / Lifeact-CherryC (Abbildung 2.17A) oder Cdc3-CherryN / Lifeact-GfpC (Abbildung 2.17B) auf eine mögliche Kollokalisierung hin getestet. In dem Cdc3-GfpN / Lifeact-CherryC exprimierenden Stamm war die Lokalisation des Septins am Septum, in Ringen, in Filamenten und auf Endosomen gut zu detektieren. Die Lokalisation von Lifeact-Cherry war jedoch relativ schwach und meist nur punktuell auf Aktin-Patches beschränkt. Beide Proteine lokalisierten an der Hyphenspitze, aber auch hier konnte keine klare Kollokalisierung bestätigt werden. Im Cdc3-CherryN / Lifeact-GfpC exprimierenden Stamm war die Lokalisation von Cdc3 in Filamenten sehr schlecht zu erkennen. Nur in dem Bereich der Hyphenspitze konnten genaue Filamente ausgemacht werden. Hier war jedoch die Lokalisation von Lifeact-Gfp deutlicher in Aktin-Patches, kurzen Filamenten und an der Hyphenspitze zu sehen. Eine Kollokalisierung der Aktin Filamente und der Septinfilamente konnte nicht beobachtet werden. Auch hier trat eine gemeinsame Lokalisation nur an der Hyphenspitze auf. Somit ist eine generelle Aussage zur Interaktion von Aktin und Septinen nicht möglich.

Ferner wurde der Einfluss einer Deletion von *cdc3* oder *cdc10* auf das Aktin-Zytoskelett untersucht (Abbildung 2.17C-D). Es konnte keine Veränderung des Aktin-Zytoskeletts, nach Deletion von *cdc3* oder *cdc10*, beobachtet werden. Lifeact-Gfp war in denselben Strukturen zu finden wie zuvor. Auch eine Analyse der Dynamik der Aktin-Patches zeigte keine Veränderungen (Abb. 2.17D). Daher konnte in dieser Arbeit keine Auswirkungen der Deletion eines Septins auf das Aktin-Zytoskelett in *U. maydis* nachgewiesen werden.



**Abbildung 2.17: Analyse des Zusammenhangs zwischen dem Septin- und Aktin-Zytoskelett.** (A) Lokalisation von Cdc3-GfpN und dem Aktin-bindenden Peptid Lifeact-CherryC in einer Hyphe. Beide Proteine lokalisieren unter anderem an der Hyphenspitze (Maximum-Projektion, Größenbalken 10 μm). (B) Lokalisation von Cdc3-mCherryN und dem Lifeact-GfpC in einer Hyphe (Maximum-Projektion, Größenbalken 10 μm). (C) Expression von Lifeact-GfpC im Wildtyp und in einem Deletionsstamm von *cdc3* oder *cdc10* (Maximum-Projektion, Größenbalken 10 μm). (D) Darstellung der Dynamik der Aktin-Patches durch Kymographen im Wildtyp und in den Deletionsmutanten von *cdc3* oder *cdc10*.

### 3. Diskussion

Septine sind vielseitige Zytoskelett-Komponente, die verschiedene höher-geordnete Strukturen wie Ringe und Filamente bilden können (Bridges und Gladfelter, 2015; Fung *et al.*, 2014). Gegenwärtig ist nicht klar, wie der Septintransport reguliert wird und welchen Beitrag er an der Bildung von höher-geordneten Komplexen trägt. Ferner war es fraglich, ob die Septinfilamente in *U. maydis* aus heterooktameren Strukturen bestehen und wo diese subzellulär gebildet werden. In dieser Arbeit wurden umfangreiche genetische und zellbiologische Untersuchungen mit N- und C- terminalen Gfp-Fusionsproteinen aller Septine durchgeführt. Dabei konnte gezeigt werden, dass alle vier Septine die gleiche Lokalisation an Septen, in Ringen, in kortikalen Filamenten und auf Endosomen aufwiesen. Die Ergebnisse dieser Arbeit legen den Schluss nahe, dass Septin-Untereinheiten bereits auf Endosomen zusammengesetzt werden und dies notwendig für den effizienten Zusammenbau von kortikalen Filamenten ist.

#### 3.1 Zelluläre Funktion der Septine in *U. maydis*

##### 3.1.1 Zelluläre Funktion der Septine während des hyphalen Wachstums

In *U. maydis* sind Septine, im Gegensatz zu *S. cerevisiae* (Ford und Pringle, 1991; Haarer und Pringle, 1987; Hartwell, 1971) oder *C. albicans* (Warena *et al.*, 2003), nicht essentiell für das Überleben der Zelle (Alvarez-Tabares und Perez-Martin, 2010; Boyce *et al.*, 2005). Allerdings sind Sporidien der Septin-Deletionsmutanten temperatursensitiv und zeigen eine veränderte Morphologie (Alvarez-Tabares und Perez-Martin, 2010). In dieser Arbeit wurde der Fokus auf das hyphale Wachstum von Septin-Deletionsmutanten gelegt. Um den Einfluss der Septin-Deletionen während des hyphalen Wachstums zu untersuchen und Störungen in der Morphologie zu vermeiden, war es notwendig, die Sporidien bei einer permissiven Temperatur von 22°C zu kultivieren. Die Analysen ergaben, dass Septin-Deletionsmutanten eine Störung der Polarität in der frühen Phase des hyphalen Wachstums aufwiesen, was durch eine erhöhte Rate an bipolaren Zellen gekennzeichnet war. In einem späteren Stadium reduzierte sich dieser Defekt und ein Großteil der Zellen wechselte zu einem unipolaren Wachstum. Es ist bekannt, dass Septine die Polarität von Zellen durch ihre Funktion als Gerüst für *Landmark*-Proteine spezifizieren können (Khan *et al.*, 2015). In einigen Pilzen kann die Anzahl der Polaritätsstellen durch einen bisher unbekanntem Mechanismus limitiert werden (Khan *et al.*, 2015). In *A. nidulans* führt die

Deletion von AspB (Cdc3 Homolog) zu einer Vergrößerung und stärkeren Verzweigung des Keimschlauchs (Hernandez-Rodriguez *et al.*, 2012). Ähnlich dazu zeigen auch Septinmutanten in *N. crassa* ein erhöhtes Auftreten von Keimschläuchen mit starken Verzweigungen (Berepiki und Read, 2013). Daher liegt eine konservierte Funktion der Septine vermutlich darin, die Anzahl der Polaritätsstellen in Hyphen zu limitieren. Dies könnte zum Beispiel durch eine negative Regulierung der Polaritätsmaschinerie stattfinden. Es könnte einen ähnlichen Mechanismus analog zu dem Mechanismus geben, der die Knospungsstelle in *S. cerevisiae* determiniert. Dort dienen Septine am Ende des Zellzyklus als Gerüst für Rga1, welches die GTPase Cdc42 aktiviert, wodurch die Zellen die frühere Knospungsstelle nicht mehr benutzen, sondern eine neue Knospe an einer danebenliegenden Stelle ausbilden (Tong *et al.*, 2007). In *U. maydis* könnte die Determination der Polaritätsachse durch Septine in den frühen Stadien eine Rolle spielen. Septine könnten ebenfalls als Gerüst für GTPasen aktivierende Proteine dienen und so an der Determinierung der Polarität beteiligt sein. Eine Störung dieser Funktion könnte zu einer Störung der Polarität und demnach zu einer erhöhten Anzahl von bipolaren Zellen führen. Zu einem späteren Zeitpunkt wird diese Rolle eventuell von anderen Proteinen übernommen, wodurch die Septin-Deletionsmutanten zu einem unipolaren Wachstum wechseln.

Des Weiteren konnte in einem späteren Stadium der Einfluss der Septin-Deletionen auf die Septenbildung gezeigt werden. Nach acht Stunden wiesen nur 30-50% der Hyphen der Septin-Deletionsmutanten Septen auf, während im Wildtyp über 80% der Hyphen Septen eingezogen hatten, was für eine Verzögerung der Septenbildung in den Deletionsmutanten spricht. Dieser Effekt wurde ebenfalls für Septin-Deletionsmutanten in *A. nidulans* und *S. pombe* beschrieben (An *et al.*, 2004; Hernandez-Rodriguez *et al.*, 2012; Longtine *et al.*, 1996; Vargas-Muniz *et al.*, 2015). Da die Septenbildung der Septin-Deletionsmutanten in Hyphen nur verspätet stattfindet und ebenfalls eine wildtypische Zytokinese bei 22° ablaufen kann, führen diese Ergebnisse zu der Schlussfolgerung, dass der Verlust eines Septins in *U. maydis* nicht ausreichend ist, um die Septenbildung zu verhindern. Wenn Septine als Gerüst für Polaritätsfaktoren dienen, ist vielleicht die Effizienz des hyphalen Wachstums in Mutanten beeinträchtigt, doch kann die korrekte Polarität immer noch verlangsamt eingestellt werden und so auch das Septum noch gebildet werden. Die Doppeldeletion von *cdc3/cdc12* und Tripeldeletion von *cdc3/cdc12/cdc10* zeigten weder

während des sporidialen Wachstums, noch während des hyphalen Wachstums einen additiven Phänotyp (Daten nicht gezeigt). Mehrfachmutanten zeigten somit dieselben Defekte wie die Einfachdeletionen. Auch in anderen Studien von Alvarez-Tabares und Perez-Martin verhielten sich Sporidien von einigen Doppeldelationen in Bezug auf die Morphologie ähnlich zu den Einfachmutanten (Alvarez-Tabares und Perez-Martin, 2010). Diese Ergebnisse lassen zwei mögliche Hypothesen zu. Eine denkbare Möglichkeit wäre, dass der Verlust eines oder mehrerer Septine durch die verbleibenden kompensiert werden könnte. Eine alternative Hypothese besagt, dass der Verlust von Septinen durch andere Proteine, die ebenfalls an der Septinbildung beteiligt sind, ersetzt werden könnten. Um festzustellen, ob die Septinbildung bei Verlust eines Septins aufrechterhalten wird, indem die verbleibenden Septine vermehrt an das Septum rekrutiert werden, wurden Lokalisationsstudien durchgeführt. Nach der Deletion eines Septins ist die Lokalisation der anderen Septine am Septum reduziert oder fehlt vollständig. Trotzdem sind diese Stämme in der Lage, Septen auszubilden. Somit muss es einen weiteren Septin-unabhängigen Mechanismus, der für die Ausbildung des Aktomyosinrings sorgt, geben. Dabei kann es sich auch um einen Kontrollmechanismus handeln, der nach festgestellten Defekten andere für die Ausbildung des Aktomyosinrings notwendige Proteine rekrutiert. Um diesen Mechanismus weiter aufzuklären, könnte die Lokalisation einiger bekannter Komponenten, die an der Septinbildung beteiligt sind, wie Cdc4, Cdc15, Don1, Don3 und Drf1, in den Septin-Deletionsstämmen untersucht werden.

Auch Septinfilamente könnten eine Funktion während des hyphalen Wachstums haben, obwohl diese wie in *S. cerevisiae* nicht essentiell für das Überleben der Zellen sind (Frazier *et al.*, 1998). Jedoch wurde des Öfteren, nach der Deletion eines Septins, ein Unterschied in der Morphologie der Hyphen beobachtet (Daten nicht gezeigt). Für die Septin-Deletionsmutanten konnte eine erhöhte Anzahl an wellenförmige Hyphen beobachtet werden, was dafür spricht, dass Septinfilamente als Zytoskelett-Komponente fungieren oder andere Komponenten des Zytoskeletts modulieren können (siehe 3.1.2). Außerdem konnte eine Interaktion von Septinfilamenten mit Membranen gezeigt werden (Bridges *et al.*, 2016). Septine werden häufig in Regionen gefunden, in denen die Membranen gekrümmt sind, wie am Knospenhals in *S. cerevisiae* oder an der Basis von dendritischen Dornfortsätzen und primären Zilien (Fares *et al.*, 1995; Hu *et al.*, 2010; Xie *et al.*, 2007). Diese stärkere Lokalisation an Membrankrümmungen konnte ebenfalls in *U. maydis*

beobachtet werden (Abb.2.1). Es kann vermutet werden, dass Septinfilamente durch eine Interaktion mit der Membran der Zelle ihre aktuelle Form übermitteln können. Zusätzlich könnten die Septinfilamente als Diffusionsbarriere für Proteine, wie Polaritätsfaktoren, dienen und somit deren Lokalisation für das hyphale Wachstum beschränken.

### 3.1.2 Einfluss der Septine auf Aktin, Mikrotubuli und Sekretion

Es gibt eine enge funktionelle Verbindung zwischen Mikrotubuli und Septinen (Spiliotis, 2010). Der erste Hinweis auf eine mögliche Septin-Mikrotubuli-Interaktion wurde in *S. cerevisiae* gefunden. Dort konnte gezeigt werden, dass Cdc11 mit zytoplasmatischen Mikrotubuli kolokalisiert (Ford und Pringle, 1991). Auch in einer Vielzahl weiterer eukaryotischer Organismen und Zelltypen kolokalisieren Septinfilamente mit Mikrotubuli (Hanai *et al.*, 2004; Nagata *et al.*, 2003; Spiliotis *et al.*, 2008; Spiliotis *et al.*, 2005). Der genaue Interaktionsmechanismus von Septinfilamenten und Mikrotubuli ist jedoch weitgehend unklar. Eine direkte Interaktion der Septine mit Mikrotubuli wurde für den Septinkomplex SEPT2/SEPT6/SEPT7/SEPT9 aus Säugetieren gezeigt, welcher in der Lage ist, direkt über die SEPT9, SEPT7 und SEPT6 Untereinheiten mit den Mikrotubuli zu interagieren. Für SEPT9 wurde gezeigt, dass über ein neu identifiziertes Motiv am N-Terminus eine Interaktion mit dem C-Terminus von  $\beta$ -Tubulin stattfindet (Bai *et al.*, 2013). Durch die Interaktion der Septine mit Mikrotubuli können sie deren Organisation und Dynamik beeinflussen (Bai *et al.*, 2016; Spiliotis, 2010). Zum Beispiel leiten Septine in polarisierten Epithelzellen die Bewegung der Mikrotubuli-Plusenden, indem sie die Katastrophenphase der Mikrotubuli verhindern. Dadurch spielen Septine eine wichtige Rolle in der Führung von Mikrotubuli und werden für die Polarisierung des Mikrotubuli-Netzwerks in Epithelzellen benötigt (Bowen *et al.*, 2011). Außerdem wird spekuliert, dass Septine das Mikrotubuli-Zytoskelett durch post-translationelle Modifikationen verändern können (Spiliotis *et al.*, 2008).

In *U. maydis* gibt es ebenfalls Hinweise auf eine mögliche Interaktion der Septine und Mikrotubuli, da eine Kolokalisation von Cdc10- oder Cdc3-Filamenten mit Teilen des Mikrotubuli-Zytoskeletts beobachtet werden konnte (Alvarez-Tabares und Perez-Martin, 2010) (S. Baumann unveröffentlicht). Eventuell werden Septinfilamente in *U. maydis* für die Stabilisierung oder Führung der Mikrotubuli während des hyphalen Wachstums benötigt. Eine Untersuchung des Mikrotubuli-Zytoskeletts in einer *cdc3* Deletionsmutante

zeigte bisher keinen Unterschied (Daten nicht gezeigt). Jedoch sollten Langzeitaufnahmen von Zellen durchgeführt werden, um die Dynamik der Mikrotubuli über mehrere Minuten verfolgen zu können und somit potentielle Unterschiede in der Verankerungsdauer, Ausrichtung oder Ähnliches zu überprüfen. Des Weiteren könnte hochauflösende Mikroskopie bessere Ergebnisse über die Kolo-kalisation der beiden Komponenten liefern, wodurch Rückschlüsse auf die Funktion bzw. Interaktion gezogen werden könnten. Somit wird eine Interaktion zwischen Septinfilamenten und Mikrotubuli bisher lediglich vermutet.

Ebenfalls konnte sowohl in Säugetierzellen als auch in Pilzen eine funktionelle Abhängigkeit zwischen dem Septin- und Aktin-Zytoskelett nachgewiesen werden (Hu *et al.*, 2012; Juvvadi *et al.*, 2013; Mavrakis *et al.*, 2014; Norden *et al.*, 2004). Zum Beispiel kolokalisiert SEPT2 während der Interphase mit Aktinbündeln und eine Zerstörung des Aktin-Zytoskeletts durch Latrunculin A führt zu einer Veränderung der subzellulären Lokalisation von SEPT2 und fördert die Bildung von Ringstrukturen, die dieses Protein enthalten (Kinoshita *et al.*, 2002; Schmidt und Nichols, 2004; Xie *et al.*, 1999). Es wird vermutet, dass Septine durch die Interaktion mit dem Aktin-Zytoskelett eher in Filamenten gehalten werden, während nach dem Verlust von Aktin die Septinfilamente zu Ringen kollabieren (Fung *et al.*, 2014). Weiterhin kann das Aktin-Zytoskelett, zusammen mit dem Adapterprotein Anillin, als eine Vorlage für die Bildung von Septinfilamenten dienen (Kinoshita *et al.*, 2002; Kinoshita und Noda, 2001). Auch in *S. pombe* konnte gezeigt werden, dass Mid2, ein Anillin-Homolog, ebenfalls die Bildung und Organisation von Septinen unterstützt (Berlin *et al.*, 2003; Tasto *et al.*, 2003). Die Abhängigkeit der beiden Zytoskelett Komponenten wird weiterhin dadurch gefördert, dass Septine im Embryo von *D. melanogaster* die Bildung von F-Aktin durch eine Quervernetzung der Aktinfilamente in kurvige Bündel unterstützen können (Mavrakis *et al.*, 2014).

In *U. maydis* wurde der Einfluss des Aktin-Zytoskeletts auf Septine ebenfalls untersucht (Böhmer *et al.*, 2009). Auch hier führt die Depolarisation des Aktin-Zytoskeletts durch Latrunculin A zu einem Zerfall der Septinfilamente. Jedoch sind die Septinfilamente über einen längeren Zeitraum stabiler als das Aktin-Zytoskelett, welches sofort nach der Behandlung mit Latrunculin A zerstört wird. Dies lässt vermuten, dass das filamentöse Aktin eine Rolle bei der Errichtung der Septinfilamente spielt, aber nicht absolut notwendig für deren Erhaltung ist (Böhmer *et al.*, 2009). Ein hyphales Auswachsen der Zellen in Latrunculin A-haltigem Medium führte zu der Bildung von Septinfilamenten, die jedoch

schwächer erschienen (Daten nicht gezeigt). Somit wird das Aktin-Zytoskelett in *U. maydis* nicht für die Bildung der Septinfilamente benötigt, jedoch werden diese eventuell durch Aktin stabilisiert. Dafür spricht ebenfalls die verstärkte Ringbildung nach der Behandlung mit Latrunculin A. Es ist wahrscheinlich, dass eine Destabilisierung der Septinfilamente zu einer erhöhten Septinkonzentration im Zytoplasma führt und diese überschüssigen Septinproteine in Ringen gelagert werden. Eine Kollokalisierung zwischen dem Aktin- und Septin-Zytoskelett konnte in dieser Arbeit nicht bestätigt werden. Die Hyphenspitze war der einzige Bereich, in dem eine Kollokalisierung zu beobachten war. Dies lässt jedoch nicht unbedingt auf eine gemeinsame Funktion schließen, da während des polaren Wachstums verschiedenste Proteine des Polarisomes, Exocysts oder Spitzenkörpers an der Hyphenspitze lokalisieren (Carbo und Perez-Martin, 2008; Harris, 2009; Virag und Harris, 2006). Der Einfluss von Septinen auf das Aktin-Zytoskelett wurde in einem *cdc3* oder *cdc10* Deletionsstamm mit der gleichzeitigen Expression von Lifeact-Gfp analysiert. Es konnte jedoch kein Unterschied auf die Bildung des Aktin-Zytoskeletts und die Dynamik der Aktin-Patches gefunden werden. Daher kann vermutet werden, dass Septine nicht für die Ausbildung des Aktin-Zytoskeletts benötigt werden. Dieses konnte auch in *N. crassa* gezeigt werden, da die Deletion von *cdc11* in diesem Pilz ebenfalls zu keinen Veränderungen des Aktin-Zytoskeletts führte (Berepiki und Read, 2013).

Ein genauer Zusammenhang zwischen dem Aktin-, Mikrotubuli- und Septin-Zytoskelett in *U. maydis* ist noch unklar. Es ist jedoch vorstellbar, dass alle drei Zytoskelett-Komponenten eine gewisse Abhängigkeit aufweisen. Obwohl weder Aktin noch Mikrotubuli benötigt werden um Septinfilamente zu bilden, scheinen die Septinfilamente in ihrer Stabilität beeinflusst zu sein. Des Weiteren führt der Verlust von Septinen zu wellenförmigen Hyphen, was dafür spricht, dass Septine als Zytoskelett-Komponente agieren. Es ist wahrscheinlich, dass Septine eine Rolle in der Organisation und Führung der Mikrotubuli übernehmen und die Bündelung von Aktin beeinflussen können. Diese Interaktion wird für die Aufrechterhaltung des polaren Wachstums benötigt. Da die Abhängigkeit der drei Zytoskelett-Komponenten in *U. maydis* nicht genau geklärt ist, sollten weitere Analysen folgen.

Ferner wurde die Funktion von Septinen hinsichtlich der unkonventionellen Sekretion der Chitinase Cts1 (Stock *et al.*, 2012) untersucht. Eine Analyse der subzellulären Lokalisation von Cts1 in Hyphen ergab eine verstärkte Lokalisation an der Zellwand von leeren



Abschnitten und ein Gradient des Proteins an der Hyphenspitze (Thorsten Langner, Dissertation 2015). Cts1 wird in Hyphen vermutlich durch zwei verschiedene Mechanismen in den extrazellulären Raum gebracht. Zum einen kann Cts1 durch die Lyse der leeren Abschnitte in den Überstand gelangen (Thorsten Langner, Dissertation 2015). Zum anderen wäre es vorstellbar, dass Cts1 an der Hyphenspitze sekretiert wird, was die verstärkte Lokalisation an der Hyphenspitze erklären würde. Da die Deletion der Septine in Hyphen zu einer Verminderung der Cts1-Sekretion führt, könnten Septine in diesem zweiten Weg eine Rolle spielen. Möglicherweise wird hier die Bildung von heteromeren Septinstrukturen benötigt. In Säugetierzellen konnte gezeigt werden, dass Septine mit Komponenten des Exocyst-Komplexes interagieren können, welcher an der Anbindung und/oder Fusion der exozytotischen Vesikel beteiligt ist (Hsu *et al.*, 1998; Lipschutz und Mostov, 2002). Des Weiteren ist SEPT5 in der Lage, direkt mit dem SNARE-Protein Syntaxin zu interagieren, welches für die Fusion mit Membranen wichtig ist (Beites *et al.*, 1999). Vermutlich reguliert SEPT5 die Verfügbarkeit der SNARE Proteine und spielt somit eine Rolle in der SNARE Funktion (Beites *et al.*, 2005). Somit wäre es vorstellbar, dass Cts1 über Vesikel zur Plasmamembran gebracht wird und die Bildung oder Fusion dieser Vesikel über eine Interaktion der Septine mit den Komponenten des Exocyst-Komplexes oder über eine Interaktion mit SNARE Proteinen vermittelt werden kann. Dies würde ebenfalls zu einer Verminderung der Cts1-Sekretion in Septin-Deletionsmutanten führen.

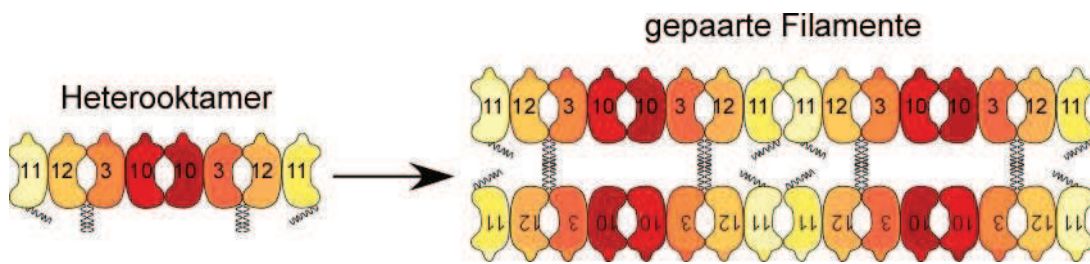
## **3.2 Der Mechanismus der Bildung von Septinkomplexen**

### **3.2.1 Die Gfp-Fusionen interferieren mit der Filamentbildung**

Um die Septinproteine in *U. maydis* näher zu charakterisieren, wurden N- und C-terminale Gfp-Fusionsproteine hergestellt. Da bekannt war, dass die Fusion von Gfp mit der Funktionalität von Septinen interferieren kann, wurden in dieser Arbeit genaue Charakterisierungstests der einzelnen Gfp-Fusionsstämme durchgeführt (Baumann *et al.*, 2014). Dabei zeigte sich, dass die Gfp-Fusionen der Septine keine vollständige Funktionalität erreichten, da sich die entsprechenden Stämme phänotypisch nicht wie der Wildtypstamm verhielten. Allerdings konnten für alle Gfp-Fusionen eine Komplementation der Deletionsmutante in verschiedenen Ausmaßen erreicht werden. Auch für weitere Zytoskelett-Komponente wie zum Beispiel Aktin konnte gezeigt werden, dass eine Gfp-Fusion mit der Funktion interferieren kann (Deibler *et al.*, 2011; Doyle und Botstein, 1996).

Daher wird für die Visualisierung von Aktin heutzutage meist das Peptid-bindende Protein Lifeact benutzt (Riedl *et al.*, 2008). Da jedoch für Septine kein spezifisches Peptid-bindendes Protein existiert, muss die eingeschränkte Funktion der Gfp-Fusionen hingenommen werden.

Ähnlich zu Säugetierzellen oder anderen filamentösen Pilzen bilden Septine in *U. maydis* Filamente am Kortex der Hyphenzelle aus (Hsu *et al.*, 1998; Kaufmann und Philippsen, 2009; Khan *et al.*, 2015; Kozubowski und Heitman, 2010). In Lokalisationsstudien über die Septine aus *U. maydis* wurden bisher Cdc3, Cdc10 und Cdc12 in Filamenten gefunden (Alvarez-Tabares und Perez-Martin, 2010; Baumann *et al.*, 2014; Böhmer *et al.*, 2009). In dieser Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass alle vier Septine in kortikalen Filamenten vorkommen und dort kolokalisieren, was für eine Bildung von heteromeren Strukturen, wie sie auch ähnlich aus *S. cerevisiae* bekannt sind, spricht (Bertin *et al.*, 2008; Frazier *et al.*, 1998) (Abb. 3.1).



**Abbildung 3.1: Modell der Septinfilamentbildung in *U. maydis*.** Es wird vermutet, dass es zu einer Bildung von Heterooktameren kommt. Diese können in gepaarte Filamente assoziieren. Die Bildung der gepaarten Filamente ist dabei abhängig von einer Interaktion der Coiled-coil Domäne von Cdc3 und Cdc12. Die Coiled-coil Domäne von Cdc11 wird für diese Interaktion wahrscheinlich nicht benötigt.

Interessanterweise zeigte sich in den Filamenten ein Lokalisationsunterschied abhängig von der Position der Gfp-Fusion. Für Cdc3 und Cdc12 konnten nur die N-terminalen Gfp-Fusionen Filamente ausbilden. Eine C-terminale Fusion von Gfp könnte eventuell mit der Funktion der *Coiled-coil* Strukturen interferieren. Es ist bekannt, dass die *Coiled-coil* Struktur für die Bildung von lateral gepaarten Filamenten benötigt wird und weiterhin eine Interaktionsfläche für andere Proteine darstellt (Casamayor und Snyder, 2003; Finnigan *et al.*, 2015b; Fung *et al.*, 2014; Sadian *et al.*, 2013). Es kann vermutet werden, dass eine Fusion von Gfp an die *Coiled-coil* Struktur zu einer sterischen Hinderung führt, wodurch diese nicht mehr mit anderen *Coiled-coil* Strukturen interagieren kann. Dies würde die Ausbildung von gepaarten Filamenten und somit die Bildung von höher-geordneten Septinstrukturen beeinträchtigen. Genetische Analysen und *in vitro* Experimente mit aufgereinigten Septinen aus *S. cerevisiae* unterstützen die Vermutung, dass die Fusion von

Gfp an den C-Terminus zu sterischen Hinderungen führt. Denn es konnte gezeigt werden, dass der C-terminale Anhang (CTE) von Cdc3 und Cdc12 essentiell für das Überleben der Zellen ist (Bertin *et al.*, 2010; Versele und Thorner, 2004). Experimente mit rekombinant exprimierten Septinproteinen aus Bakterien zeigten außerdem, dass die CTEs für eine hohe Affinität der Interaktion von Cdc3 mit Cdc12 benötigt werden (Versele und Thorner, 2004). Ferner werden die CTEs *in vitro* für die Bildung von Filamenten in Lösung gebraucht (Bertin *et al.*, 2010). Obwohl die CTEs von Cdc3 und Cdc12 *per se* nicht notwendig für den Zusammenbau von Heterooktameren sind, führt deren Abwesenheit, im Vergleich zum Wildtyp, zu instabileren Heterooktameren (Bertin *et al.*, 2010). Im Gegensatz zu allen anderen Septinen beeinflusste weder die C-terminale noch die N-terminale Fusion von Gfp an Cdc10 die Ausbildung von Septinfilamenten. Es kann vermutet werden, dass dies daran liegt, dass Cdc10 keine *Coiled-coil* Domäne am C-Terminus besitzt (Weirich *et al.*, 2008). Somit interferiert die Gfp-Fusion in diesem Fall nicht mit der Filamentbildung.

Interessanterweise kann die C-terminale, aber nicht die N-terminale Gfp-Fusion an Cdc11 in *U. maydis* Filamente ausbilden. Dies legt die Vermutung nahe, dass die *Coiled-coil* Domäne von Cdc11 nicht wichtig für die Interaktion und damit für die Filamentbildung ist (Abb. 3.1). In *S. cerevisiae* konnte gezeigt werden, dass die CTE von Cdc11 weder für die Bildung von Filamenten noch für die Bildung von Heterooktameren benötigt wird (Bertin *et al.*, 2008; Bertin *et al.*, 2010; Booth *et al.*, 2015; Versele und Thorner, 2004). Somit ist es wahrscheinlich, dass auch in *U. maydis* die CTE von Cdc11 nicht für die Filamentbildung benötigt wird. Der N-Terminus von Cdc11 scheint dagegen eine besondere Rolle zu spielen und interagiert eventuell mit anderen Faktoren, welche die Filamentbildung beeinflussen können. Hefe-Zwei-Hybrid Analysen, *in vitro* Bindungsstudien und Lokalisationsanalysen in *S. cerevisiae* zeigten, dass der N-terminale Bereich von Cdc11 wichtig für die Interaktion mit Bni5 ist (Lee *et al.*, 2002; Nam *et al.*, 2007). Bni5 wurde als ein Suppressor von Septindefekten gefunden und ist essentiell für die Morphogenese der Knospe (Lee *et al.*, 2002; Nam *et al.*, 2007). Da in *U. maydis* allerdings kein Bni5 Homolog existiert, gibt es vermutlich einen anderen Interaktionspartner. Eine Gfp-Fusion am N-Terminus könnte diese Interaktion stören und einen Einfluss auf die Bildung von Filamenten haben. Da die Filamentbildung durch manche Fusionen gestört ist, kann davon ausgegangen werden, dass es sich bei den Filamenten um höher-geordnete Strukturen handelt.

### 3.2.2 Septine bilden heteromere Komplexe

Mit einer Kombination aus genetischen und zellbiologischen Methoden wurde gezeigt, dass Septine auf Endosomen und in Filamenten kolokalisieren und ihre Lokalisation voneinander abhängig ist. Außerdem wurde mit FRET und FLIM-FRET Experimenten nachgewiesen, dass heteromere Einheiten in kortikalen Filamenten existieren. Die Abhängigkeit der Septine untereinander konnte durch die Analyse von Gfp-Fusionen der Septine mit einer zusätzlichen Deletion eines Septins untersucht werden. Die Deletion eines Septins führte zu Veränderungen der Lokalisation aller anderen Septine. Die Ausprägung der Veränderung war davon abhängig, welches Septin deletiert wurde. Eine Deletion von *cdc3* führte zum Beispiel zu einem kompletten Verlust der anderen Septine auf Endosomen und in den Filamenten (Tab. 3.1). Es kann vermutet werden, dass die anderen Septine die zentrale Position von Cdc3 nicht ersetzen können. Dafür spricht, dass ebenfalls die Deletion von *cdc12* zu einem Verlust von allen anderen Septinen auf den Endosomen führt. In diesem Stammhintergrund konnten noch vereinzelt Septinfilamente gebildet werden, die sich jedoch auf die Initialzelle beschränkten und vermutlich nur aus Mono- oder Dimeren von Cdc3-GfpN und Cdc10-GfpC bestanden. Im Gegensatz dazu führte die Deletion von *cdc11* nur zu einem kompletten Verlust von Cdc12-GfpN auf Endosomen, während Cdc3-GfpN und Cdc10-GfpC vermindert auf Endosomen zu detektieren waren. Sowohl Cdc3-GfpN als auch Cdc10-GfpC konnten in diesem Deletionshintergrund noch in längeren filamentösen Strukturen eingebaut werden. Somit ist der Verlust des terminalen Septins *cdc11* weniger ausgeprägt wie der Verlust eines zentralen Septins. Auch die Deletion von *cdc10* führte nur zu verkürzten Filamenten und zu einer verminderten Lokalisation von Cdc3-GfpN auf Endosomen. Folglich kann in den meisten Fällen eine Korrelation zwischen dem endosomalen Transport und dem Einbau in Septinfilamente beobachtet werden. Nach der Deletion eines Septins, welches zu einem kompletten Verlust der anderen Septine auf Endosomen führt, konnten keine Septinfilamente gebildet werden, bzw. beschränkten sich diese auf die Initialzelle. Eine Verminderung des Transports führt zu verkürzten Filamenten. Es ist daher wahrscheinlich, dass der Zusammenbau von Septinkomplexen bestehend aus allen vier Septinen auf Endosomen für eine richtige Lokalisation aller Septine in Filamenten benötigt wird. Eine Ausnahme stellt die Deletion von *cdc10* in einem Cdc12-GfpN Hintergrund dar. Hier war ein stärkeres Cdc12-GfpN Signal auf Endosomen zu beobachten als in Anwesenheit von Cdc10. Eventuell führt die Deletion von *cdc10* zu einer Bildung von

Cdc12-GfpN Homomeren auf den Endosomen. Eine ähnliche Beobachtung konnte für Cdc3 aus *S. cerevisiae* gezeigt werden, nachdem *cdc10* deletiert wurde (McMurray *et al.*, 2011a). Die Homomere auf den Endosomen sind jedoch nicht in der Lage, längere Filamente auszubilden. Somit führt die Deletion von *cdc10* zu einer Veränderung in der Affinität der Interaktionsoberfläche von Cdc12, obwohl keine direkte Interaktion dieser beiden Septine vermutet wird. Dies verdeutlicht die vielfältigen Möglichkeiten des Einflusses von Septinen und unterstreicht die Komplexität der Analyse.

**Tabelle 3.1: Lokalisation der Gfp-markierten Septine (erste Zeile) nach der Deletion eines Septins (erste Spalte).** Beschrieben werden zum einen das Vorkommen von Septinfilamenten und zum anderen die Lokalisation der Septine auf Endosomen.

	Cdc3-GfpN		Cdc10-GfpC		Cdc11-GfpC		Cdc12-GfpN	
	Filamente	Endosomen	Filamente	Endosomen	Filamente	Endosomen	Filamente	Endosomen
<i>cdc3Δ</i>	/	/	fehlen	fehlen	fehlen	fehlen	fehlen	fehlen
<i>cdc10Δ</i>	sehr kurz	vermindert	/	/	fehlen	fehlen	sehr kurz	erhöht
<i>cdc11Δ</i>	verkürzt, kaum in Initialzelle	vermindert	verkürzt, kürzer Richtung Pol	vermindert	/	/	fehlen	fehlen
<i>cdc12Δ</i>	nur in Initialzelle	fehlen	nur in Initialzelle	fehlen	fehlen	fehlen	/	/

Es ist jedoch hervorzuheben, dass die Septin-Fusionsproteine nie zusammen in einem Stamm getestet wurden. Um zum Beispiel den Einfluss der Deletion von *cdc3* zu untersuchen, wurden drei Stämme, jeweils mit Cdc10-GfpN, Cdc11-GfpC und Cdc12-GfpN im *cdc3* Deletionshintergrund, hergestellt. Daher können anhand der gebildeten Strukturen in den jeweiligen Stämmen über die Lokalisation der anderen Septine lediglich Vermutungen angestellt werden. Die exakte Bestimmung der Lokalisation von drei Septinen, bei gleichzeitiger Deletion des Vierten, müsste jedoch mit mehreren Fusionsproteinen in einem Stamm weiter untersucht werden. Um drei Septine gleichzeitig *in vivo* zu visualisieren, müssten ein weiteres Fluoreszenzprotein und die technischen Möglichkeiten für dessen Detektion etabliert werden (Kremers *et al.*, 2011). Es ist jedoch sicher, dass sich veränderte Strukturen der Septine auf Endosomen und in Septinfilamenten bilden, sobald ein einzelnes Septin deletiert worden ist. Verschiedene Auswirkungen von Septindeletionen bei der Visualisierung eines Septins wurde ebenfalls in *A. nidulans* beobachtet. Die Analyse von AspB-Gfp zeigte eine starke Reduktion der Septinfilamente nach der Deletion von *aspE* oder *aspA* / *aspC*, aber nur einen geringen Effekt nach der Deletion von *aspD* (Hernandez-Rodriguez *et al.*, 2012).

Mit den Untersuchungen dieser Arbeit konnte somit gezeigt werden, dass die Deletion eines Septins Auswirkungen auf die Lokalisation aller anderen Septine hat. Somit ist es wahrscheinlich, dass sich sowohl auf Endosomen als auch in Filamenten heteromere Komplexe befinden. Während die Gfp-Fusion in manchen Fällen mit der Bildung von Septinfilamenten interferiert, lokalisieren alle Septin-Fusionen auf den Endosomen. Daher handelt es sich bei den Filamenten eher um höher-geordnete Strukturen, während sich auf Endosomen eher einzelne Bausteine befinden. Ob es jedoch zu einem Zusammenbau von Dimeren, Tetrameren oder Oktameren auf Endosomen kommt, kann mit den hier durchgeführten Experimenten nicht genau bestätigt werden. Einen Aufschluss über die Struktur der Septine auf Endosomen könnte durch eine Aufreinigung von Endosomenfraktionen mithilfe einer Dichtegradientenzentrifugation erzielt werden. Diese Methode wurde unter anderem dazu genutzt, um frühe und späte Endosomen aus infizierten Fibroblasten zu isolieren und den Transport von Herpesviren durch Endosomen zu untersuchen (Walker *et al.*, 2016). Nach der Aufreinigung der Endosomen könnten im Anschluss Septinkomplexe aufgereinigt und *in vitro* untersucht werden.

Die Bildung der heteromeren Einheiten wird auch durch die Analyse der  $\alpha 0$ -Helix Deletionen unterstützt. Für die  $\alpha 0$ -Region ist beschrieben, dass sie entscheidend für eine Septin-Septin Interaktion über die NC-Interaktionsfläche und somit wichtig für die Ausbildung von Heteromeren ist (Bertin *et al.*, 2010; McMurray *et al.*, 2011a). Daher kommt es bei diesen Mutationen nicht zu einem kompletten Verlust eines Septins, sondern nur zu einer Störung der Interaktion. Durch einen Sequenzvergleich mit SEPT2 aus Säugetieren und den vier homologen Septinen aus *S. cerevisiae* konnte die  $\alpha 0$ -Helix in den Septinen von *U. maydis* identifiziert und deletiert werden. Die Analyse von Cdc3 $\Delta\alpha 0$ -GfpN und Cdc10 $\Delta\alpha 0$ -GfpN exprimierenden Stämmen ergab, dass Cdc3 $\Delta\alpha 0$ -GfpN in einer wesentlich geringeren Menge auf Endosomen lokalisierte, während die Lokalisation von Cdc10 $\Delta\alpha 0$ -GfpN nur geringfügig beeinträchtigt war. Dies unterstützt die These, dass es auf den Endosomen zu keiner Bildung von höheren Komplexen kommt, sondern wahrscheinlich ein Zusammenbau der Grundbausteine, nämlich von Tetrameren oder Oktameren, stattfindet. Es könnte sein, dass es auf den Endosomen noch zu einer Restinteraktion zwischen den genetisch modifizierten und wildtypischen Proteinen kommt. Eventuell könnte es hier ausreichen, wenn nur ein Septin eine funktionelle  $\alpha 0$ -Helix besitzt, um eine NC-Interaktion zu gewährleisten (Finnigan *et al.*, 2015b). Eine Analyse der Septinfilamente in den  $\alpha 0$ -Helix

Mutanten ergab, dass sowohl Cdc3 $\Delta\alpha$ -GfpN als auch Cdc10 $\Delta\alpha$ -GfpN nicht mehr in Septinfilamente eingebaut werden konnten. Um zu überprüfen, ob die anderen Septine in diesem Hintergrund noch in der Lage waren Filamente auszubilden, wurde beispielhaft die Lokalisation von Cdc12-GfpN in den beiden Deletionsstämmen der  $\alpha$ -Helix überprüft. Auch hier konnten keine Septinfilamente mehr beobachtet werden. Daher kann vermutet werden, dass die Expression eines Septins mit einer Deletion der  $\alpha$ -Helix zu einem kompletten Verlust der Septinfilamente führt. Es ist wahrscheinlich, dass durch die Störung der NC-Interaktionsfläche keine langkettigen Filamente mehr gebildet werden konnten. Dies konnte ebenfalls in *in vitro* und *in vivo* Studien mit Septinen aus *S. cerevisiae* bestätigt werden (Bertin *et al.*, 2008; McMurray *et al.*, 2011a).

Ein Teil der  $\alpha$ -Helix umfasst auch Bereiche der polybasischen Region, die wichtig für die Interaktion mit sauren Phospholipiden der Plasmamembran, speziell PI(4,5)P<sub>2</sub>, ist (Bertin *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 1999). Da Teile dieser Region ebenfalls deletiert wurden, könnte der Verlust der Filamentbildung auch auf den Verlust der polybasischen Region und nicht auf einen Verlust der Interaktion zurückzuführen sein. In *S. cerevisiae* wurde dazu eine Studie durchgeführt, in der alle Lysin- und Argininreste in der polybasischen Region mit Alanin substituiert wurden. Somit wurde nur die Ladung der  $\alpha$ -Helix verändert, aber die Struktur an sich erhalten. Eine Analyse dieser Mutation der basischen Reste in der  $\alpha$ -Helix von Cdc11, Shs1 und Cdc10 ergab, dass diese wichtig für die Interaktion mit der Plasmamembran, aber nicht notwendig für die Interaktion der Septine über die NC-Interaktionsfläche ist. Außerdem konnte eine größere Fraktion freier Proteine im Zytoplasma beobachtet werden (Finnigan *et al.*, 2015b). Somit kann auch für *U. maydis* vermutet werden, dass die fehlende Filamentbildung in den  $\alpha$ -Helix Mutanten durch eine fehlende Interaktion der NC-Interaktionsfläche und nicht durch eine fehlende Interaktion mit der Plasmamembran hervorgerufen wird. Eventuell ist jedoch das stärkere zytoplasmatische Signal auf die fehlende Interaktion mit der Plasmamembran zurückzuführen, da sich alle Septine im Zytoplasma ansammeln, anstatt an der Membran zu lokalisieren. Um dieses jedoch zu verifizieren, könnten auch weitere Septinmutanten mit vergleichbaren Modifikationen in *U. maydis* hergestellt werden.

Durch FRET-Experimente konnten Konformationen und Anordnungen des humanen Septinkomplexes, SEPT2, SEPT6 und SEPT7 charakterisiert werden (Low und Macara, 2006). Daher wurden in dieser Arbeit FRET und FLIM-FRET Experimente benutzt um eine Bildung

von heteromeren Komplexen weiterhin zu verifizieren. Eine Analyse der Interaktion von Cdc3-mCherryN und Cdc12-GfpN ergab, dass sich beide Proteine in den Filamenten in räumlicher Nähe zueinander befanden. Dies stützt wiederum die Hypothese von hetero-oktameren Strukturen als Grundbausteine für Filamente. Weiterhin wurde die Nähe von Cdc3-mCherryN und Cdc10-GfpC untersucht. Laut des Modells sollte es zu keinem FRET-Ereignis zwischen dem N-Terminus von Cdc3 und dem C-Terminus von Cdc10 kommen, solange sich die Filamente in der „in register“ Anordnung befinden und eine Verknüpfung der Filamente über die *Coiled-coil* Strukturen stattfindet (Bertin *et al.*, 2008; Kaplan *et al.*, 2015). Wie erwartet konnte in den FLIM-FRET Experimente keine signifikante Interaktion zwischen Cdc3-mCherryN und Cdc10-GfpC gezeigt werden. Dies spricht dafür, dass Septine in *U. maydis* ebenfalls durch laterale Interaktion größere Filamentbündel ausbilden können, die sich ähnlich wie in *A. gossypii in register* anordnen (Abb. 3.2A) (Booth *et al.*, 2015; DeMay *et al.*, 2011; Fung *et al.*, 2014; Kaplan *et al.*, 2015). Um diese Hypothese zu verifizieren, könnte TIRF (*total internal reflection fluorescence*) Mikroskopie und Einzelmolekül-Mikroskopie durchgeführt werden (Bridges *et al.*, 2014). Diese Methode wurde ebenfalls mit Cdc11-SNAP in *A. gossypii* angewandt, um eine Anordnung der Septine zu untersuchen (Kaplan *et al.*, 2015).

Als abschließendes Experiment zur Verifikation von heteromeren Strukturen wurden 3D-Zweikanal-FRAP-Experimente durchgeführt. In diesen Experimenten konnte gezeigt werden, dass eine Rückgewinnung der Fluoreszenz von Cdc3-Cherry und Cdc12-Gfp simultan in den gleichen Strukturen stattfand. In Pilzen wurde gezeigt, dass heteromere Septinuntereinheiten *head-to-tail* zusammengebaut werden, um längere Filamente zu bilden (Bridges und Gladfelter, 2014). Dabei kann die Plasmamembran die Polymerisation durch eingeschränkte Diffusion in zwei Dimensionen unterstützen, sodass es vorrangig zu einer Polymerisation an der Spitze der Filamente kommt (Bridges und Gladfelter, 2014). Im Gegenteil zu membrangebundenen Septinfilamenten, die neue Untereinheiten nach Fragmentierung einbauen können, sind zytoplasmatische Septinfilamente dynamischer und können die Untereinheiten über die gesamte Länge austauschen (Bridges *et al.*, 2014; Hu *et al.*, 2008; Schmidt und Nichols, 2004). In den FRAP-Experimenten dieser Arbeit konnte eine Rückgewinnung der Fluoreszenz über die gesamte Länge beobachtet werden, was für eine Umformung des gesamten Septin-Zytoskeletts spricht. Es kann daher vermutet werden, dass in unseren Experimenten nur die laterale Aneinanderreihung der Filamente



beobachtet werden kann, aber nicht den Anlagerungsprozess selbst (DeMay *et al.*, 2011). Eine erhöhte Bildung von Septinbündeln würde den Gradienten an der Spitze erklären (Abb. 3.2A). Dieser Gradient konnte jedoch nicht in allen Fusionsproteinen beobachtet werden, was darauf hinweist, dass die Gfp-Fusion ebenfalls mit der Gradientenbildung interferieren kann. Außerdem ist die Bildung des Gradienten abhängig vom endosomalen Transport der Septinuntereinheiten (siehe 3.2.3).

### 3.2.3 Endosomen-gekoppelte Translation für den Zusammenbau von Septinen

In vorangegangenen Studien wurde gezeigt, dass die *cdc3* mRNA und das kodierte Protein auf denselben Endosomen kolokalisieren. Des Weiteren fehlt das Translationsprodukt, wenn die mRNA oder Ribosomen nicht transportiert werden (Baumann *et al.*, 2014; Haag *et al.*, 2015; Jansen *et al.*, 2014). Daher wurde angenommen, dass durch lokale Translation der Septin-mRNA der endosomale Zusammenbau der Septinheteromere gewährleistet werden kann. Diese These wird dadurch unterstützt, dass Rrm4-positive Endosomen translationell aktive Ribosomen transportieren (Higuchi *et al.*, 2014; Palacios, 2014). Um diese Hypothese weiter zu untersuchen, wurde in dieser Arbeit neben den Proteinlokalisationen auch die Lokalisation der Septin-mRNAs durch RNA-Lebendzell-Mikroskopie analysiert. Es konnte gezeigt werden, dass die mRNAs aller vier Septine auf den Endosomen transportiert werden. Einen Zusammenhang zwischen dem Ko-Transport von mRNA mit Membranderivaten konnte auch in anderen Organismen beobachtet werden. In *S. cerevisiae* gibt es einen Ko-Transport von mRNA und ER, während in *D. melanogaster* der ESCRT-II Komplex und Rab11 an dem Transport von mRNA beteiligt sind (Cohen, 2005; Irion und St Johnston, 2007; Schmid *et al.*, 2006). In vorangegangenen biochemischen Experimenten wurde die mRNA der Septine in iCLIP und Hits CLIP Experimenten als potentielle Ziel-mRNAs von Rrm4 gefunden (König *et al.*, 2009) (Carl Haag, Dissertation 2013). Da der Transport aller mRNAs abhängig von Rrm4 war, konnten die Septin-mRNAs als Ziele von Rrm4 bestätigt werden. Wo genau die mRNAs von Rrm4 gebunden werden, ist noch nicht endgültig aufgeklärt. Für *cdc3*, *cdc10* und *cdc11* wurde eine Bindung in der 3'UTR vorhergesagt, während für *cdc12* eine Bindung im ORF vorausgesagt wurde (Carl Haag, Dissertation 2013). Eine Analyse von Stämmen mit einer Deletion der 3'UTR von *cdc3*, *cdc11* oder *cdc12* führte nicht zu einem Verlust des Proteins auf Endosomen. Um hier einen genauen Aufschluss zu erlangen, müsste der Einfluss der Deletion der 3'UTR auf RNA-Ebene untersucht werden. Dazu könnte RNA-Lebendzell-

Mikroskopie mit einer mRNA, deren 3'UTR deletiert wurde, durchgeführt werden. Anhand der Lokalisation könnte somit untersucht werden, ob die 3'UTR für eine Bindung von der mRNA an Rrm4 benötigt wird. Anhand dieser Experimente könnten weitere Schlussfolgerungen auf den Transport der mRNAs getroffen werden.

Weiterhin wurde die *cdc3* mRNA in einem *cdc12* Deletionshintergrund untersucht. Durch dieses Experiment konnte zum einen ausgeschlossen werden, dass Cdc3 seine eigene mRNA für autoregulatorische Prozesse bindet, da sich in diesem Stammhintergrund kein Cdc3 Protein mehr auf Endosomen befindet (Caballero-Lima *et al.*, 2014; Haag *et al.*, 2015). Zum anderen wurde eine erhöhte Anzahl an *cdc3* mRNA auf den Endosomen festgestellt. Dieses Ergebnis lässt vermuten, dass sich Septin-mRNAs dieselbe Bindestelle von Rrm4 teilen. Daher müsste im Folgenden untersucht werden, ob Septin-mRNAs auf denselben oder auf unterschiedlichen Endosomen transportiert werden. Um dies analysieren zu können, wurde das RNA-Lebendzell-Mikroskopiesystem um die zwei weiteren RNA-Bindeproteine MS2 und PP7, die an spezifischen RNA Haarnadelstrukturen binden, erweitert (Kira Müntjes, Masterarbeit 2015) (Bertrand *et al.*, 1998; Larson *et al.*, 2011). Dies ermöglicht die Visualisierung mehrerer verschiedener mRNAs in einer Zelle.

Die Deletion von *rrm4* führt nicht nur zu einem Verlust der mRNA, sondern ebenfalls zu einem Verlust der Septinproteine auf den Endosomen. Daher muss es einen Zusammenhang zwischen mRNA- und Proteintransport geben. Eine mögliche Erklärung wäre die lokale Translation aller mRNAs auf den Endosomen. Die gegenseitige Abhängigkeit der Septinproteine auf Endosomen spricht weiterhin für einen Zusammenbau der Translationsprodukte zu heteromeren Einheiten. Allerdings gibt es eine Diskrepanz in der Anzahl der Septin-mRNA und der Septinproteine auf Endosomen. Während pro Hyphe ca. 2-3 mRNA-positive Endosomen beobachtet wurden, kann das Protein auf einem Großteil bis allen der ca. 50 transportierten Endosomen gefunden werden. Somit stellt sich die Frage, wie die Proteine gleichmäßig auf die Endosomen verteilt werden, auf denen sie nicht translatiert worden sind. Die Aufteilung des Translationsprodukts könnte durch eine Fusion und Teilung der Endosomen erreicht werden. In früheren Studien mit photoaktivierbarem Gfp konnte diese Fusion und Teilung der Endosomen in *U. maydis* bereits beobachtet werden (Baumann *et al.*, 2014). Daher können verschiedene Szenarien spekuliert werden, wie der Transportprozess ablaufen könnte. Zum einen könnten alle vier Septin-mRNAs auf denselben Endosomen transportiert und translatiert werden. Die Septin-

Translationsprodukte könnten im weiteren Verlauf assemblieren und durch Fusion und Teilung der Endosomen auf die gesamten endosomalen Membrankompartimente verteilt werden. Zum anderen könnte es auch möglich sein, dass die Septin-mRNAs nicht zwangsläufig auf ein Endosom geladen werden, sondern eher zufällig auf verschiedenen Endosomen lokalisieren. Demnach müssten die Translationsprodukte zufällig über die gesamten Endosomen verteilt werden. Für beide Transportmöglichkeiten gibt es ähnliche Beispiele aus Neuronen, in denen verschiedene mRNAs für eine lokale Expression in die Dendriten transportiert werden. Dieser Transport ist wichtig für die synaptische Plastizität. Als ein Beispiel für den erstgenannten Mechanismus wird die mRNA der Calmodulin-abhängigen Proteinkinase II (*CaMKII $\alpha$* ) mit der mRNA des Aktivitäts-regulierten, Zytoskelett-assoziierten Proteins (*Arc*) in denselben RNA-Partikel assembliert und zusammen an die Dendriten transportiert, wodurch eine koordinierte Genexpression an der Synapse stattfinden kann (Gao *et al.*, 2008). Im Gegensatz dazu werden die mRNAs des Mikrotubuli-assoziierten Proteins 2 (*MAP2*), *CaMKII $\alpha$*  und  $\beta$ -Aktin in verschiedenen mRNPs transportiert. Dies sorgt für eine strenge zeitliche und räumliche Kontrolle der Expression der einzelnen mRNAs (Mikl *et al.*, 2011; Tubing *et al.*, 2010). Da die vier Septine in *U. maydis* vermutlich wie in anderen Organismen in einer äquimolaren Stöchiometrie vorkommen, würde ein Transport aller mRNAs auf einem Endosomen von Vorteil sein, da die Expression aller mRNAs gleichzeitig reguliert werden könnte (Frazier *et al.*, 1998; Hsu *et al.*, 1998). Um dies zu untersuchen, sollten zunächst, wie oben erwähnt, Kollokalisationsstudien mit zwei Septin-mRNAs durchgeführt werden. Des Weiteren bietet die Etablierung eines zweiten Systems der RNA-Mikroskopie die Möglichkeit, die Translation gewünschter mRNAs *in vivo* mit der TRICK (Translating RNA Imaging by Coat protein Kick-off) Methode zu untersuchen (Halstead *et al.*, 2015). Bei dieser Methode werden zwei RNA-bindende Proteine benutzt, z.B. PP7, MS2 oder  $\lambda$ N, um eine bestimmte mRNA im ORF (Gfp) und in der 3'UTR (Rfp) zu markieren. Nicht translatierte mRNA erscheinen durch die Markierung mit grünen und roten Fluoreszenzproteinen gelb. Während der ersten Translationsrunde wird das RNA-bindende Protein mit einer Gfp-Fusion, welches die Haarnadelstrukturen im ORF gebunden hat, durch das Ribosom von der mRNA verdrängt. Dadurch erscheint die translatierte mRNA rot, da die Markierung in der 3'UTR der mRNA zurückbleibt (Halstead *et al.*, 2015). Darüber hinaus wurde aktuell in vier verschiedenen Gruppen eine weitere Methoden zur Visualisierung der Translation veröffentlicht (Morisaki *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2016; Wu

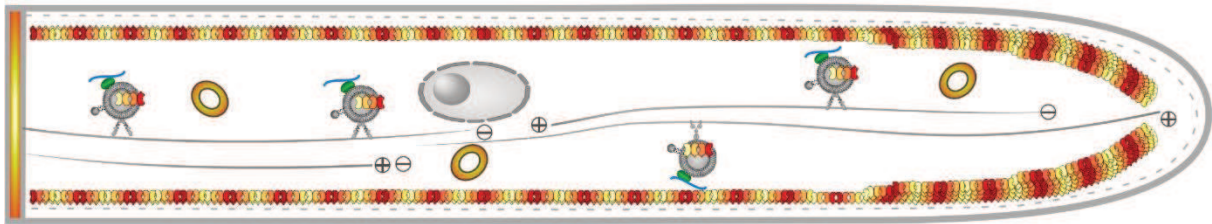
*et al.*, 2016; Yan *et al.*, 2016). Diese Gruppen benutzen ein System, welches RNA-Lebendzell-Mikroskopie mit der Visualisierung von freiwerdenden translatierten Peptidketten verknüpft. Auch bei diesen Methoden kommt es zu einer Markierung der mRNA durch MS2- oder PP7-Haarnadelstrukturen in der 3'UTR, die ebenfalls durch Fluoreszenz-markierten Bindeproteine erkannt werden. Anders als im TRICK-System wird in die kodierende Sequenz am 5'-Ende ein Sun- oder FLAG-Epitop eingefügt, der durch Antikörperfragmente gebunden werden kann. Die Antikörperfragmente sind wiederum an Fluoreszenzproteine oder an Fluoreszenzfarbstoffe gekoppelt, sodass damit die wachsende Peptidkette markiert wird. Der Vorteil dieses Systems ist, dass die freiwerdende Peptidkette sofort von Antikörpern gebunden und nicht nur die erste Translationsrunde visualisiert werden kann. Durch einen Vergleich der Fluoreszenzintensitäten zwischen der markierten mRNA und der Peptidkette wurden in den meisten Fällen mehrere Peptidketten pro mRNA gefunden, was ebenfalls die Visualisierung von Polyribosomen ermöglicht. Im Gegensatz zu früheren Hypothesen, dass transportierte mRNA translationell reprimiert vorkommt, konnte in Neuronen gezeigt werden, dass verschiedene transportierte mRNAs translationell aktiv waren (Wang *et al.*, 2016; Wu *et al.*, 2016). Außerdem wurde gezeigt, dass verschiedene mRNA-Isoformen eine beträchtliche Heterogenität in der Translationseffizienz aufwiesen (Yan *et al.*, 2016). Ferner konnte das System erweitert werden, wodurch eine Mikroskopie mit drei Farben die gleichzeitige Visualisierung von zwei mRNAs ermöglicht. Dadurch konnte gezeigt werden, dass die meisten Polyribosomen unabhängig voneinander interagierten. In 5 % der Fälle konnten jedoch zwei verschiedene mRNAs simultan translatiert werden (Morisaki *et al.*, 2016). Dies könnte einen Mechanismus darstellen, um höher-geordnete Komplexe ko-translationell zusammenzubauen. Eine Etablierung dieses Systems in *U. maydis* bietet die Möglichkeit, die Translation der Septin-mRNAs auf den Endosomen zu verifizieren. Des Weiteren kann durch eine Visualisierung von zwei Septin-mRNAs untersucht werden, ob es zu einer simultanen Translation und im Folgenden zu einem ko-translationellen Zusammenbau kommt.

Die Abwesenheit von *rrm4* führt neben dem Verlust von Septin-mRNAs und Proteinen auf Endosomen auch zum Verlust der Akkumulation der Septine an der Hyphenspitze. Septinfilamente werden allerdings weiterhin gebildet (Abb. 3.2B). Wahrscheinlich treffen Septine durch Diffusion im Zytoplasma aufeinander und bilden heteromere Einheiten.

Diese werden anschließend am Septum und in Filamente eingebaut. Weil jedoch der Transport auf den Endosomen fehlt, sind die Zellen nicht mehr in der Lage, die Heteromere effektiv an der Wachstumszone der Hyphe zu integrieren. Darüber hinaus kommt es zu einer verstärkten Bildung von Septinringen, welche eventuell auf einen Überschuss von Septinproteinen im Zytoplasma zurückzuführen ist. Ist die Bildung von höher-geordneten Septinstrukturen wie Filamenten gestört, so treten vermehrt Septinringe in der Zelle auf. Dieses Phänomen konnte von anderen Arbeitsgruppen bestätigt werden (Böhmer *et al.*, 2009). Die im Zytoplasma zusammengebauten Einheiten müssten sich aber von den lokal auf Endosomen translatierten Septinen unterscheiden, weil Septine in Abwesenheit von *rrm4* nicht mehr an Endosomen gekoppelt werden können. Eventuell findet auf den Endosomen eine andere post-translationelle Modifikation der Septine statt als im Zytoplasma. Durch post-translationelle Modifikation werden auch in anderen Organismen verschiedene Strukturen beeinflusst. In *S. cerevisiae* zum Beispiel wird eine Phosphorylierung der Septine für einen Auf- bzw. Abbau der Ringe während der Zytokinese benötigt (Hernandez-Rodriguez und Momany, 2012). Des Weiteren ist auch bekannt, dass eine Acetylierung der Septine die Bildung von Heteropolymeren und deren Stabilität beeinflussen kann (Mitchell *et al.*, 2011). Es könnte aber auch möglich sein, dass es ein Adapterprotein gibt, welches ebenfalls Rrm4-abhängig an die Endosomen rekrutiert oder direkt auf den Endosomen translatiert wird. Dieses Adapterprotein könnte an der Kopplung der Septine an die Endosomen beteiligt sein. Zweifarben-3D-Photobleichexperimente und FRET-Experimente nach Akzeptorphotobleichen demonstrierten, dass der Verlust von *rrm4* die Interaktion von Cdc3 und Cdc12 *in vivo* verändert. Durch die fehlende Verteilung der Septinuntereinheiten mittels Endosomen kommt es zu einer langsameren Rückgewinnung von Cdc3-CherryN und Cdc12-GfpN nach dem Photobleichen. Außerdem zeigten die FRET Experimente, dass die Endosomen eine wichtige Interaktionsfläche für Cdc3 und Cdc12 darstellen, da die FRET Effizienz in einem *rrm4* Deletionsstamm nur noch halb so stark ist. Daher sprechen alle Experimente dafür, dass durch die lokale Translation der Septine auf Endosomen ein effizienterer Zusammenbau der Septinkomplexe und eine bessere Verteilung dieser stattfindet (Abb. 3.3). Somit wurde in dieser Arbeit eine neue Funktion von Endosomen beobachtet. Neben ihrer Rolle im Recycling und Abbau von Proteinen kommt es hier zu einem Transport und Zusammenbau von *de novo* Komplexen auf der Oberfläche dieses vielseitigen Endomembransystems.

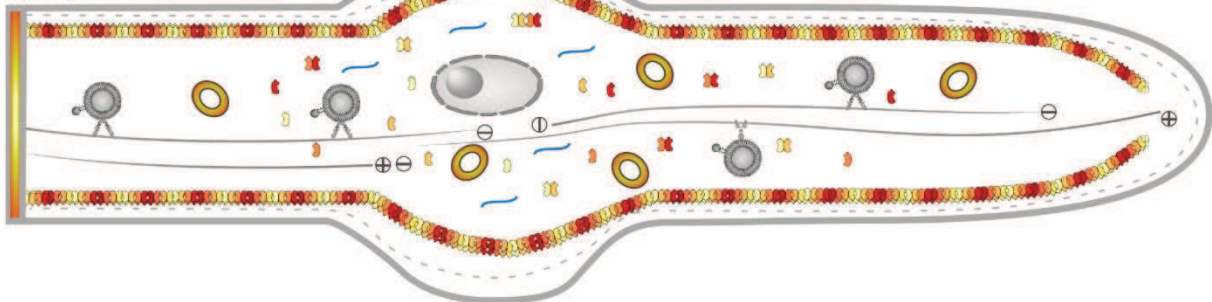
A

Wildtyp



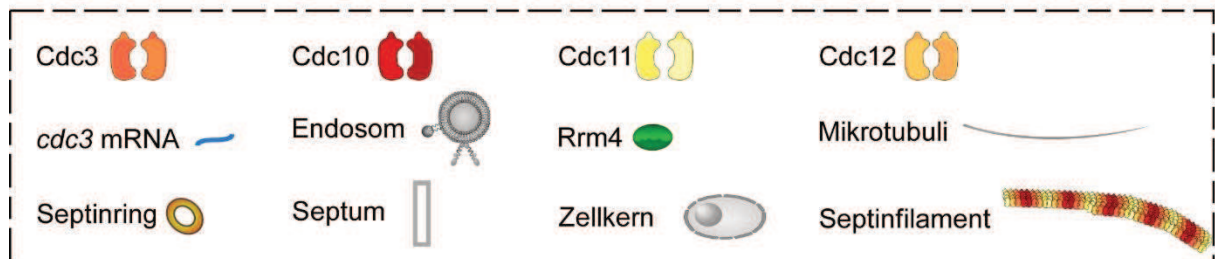
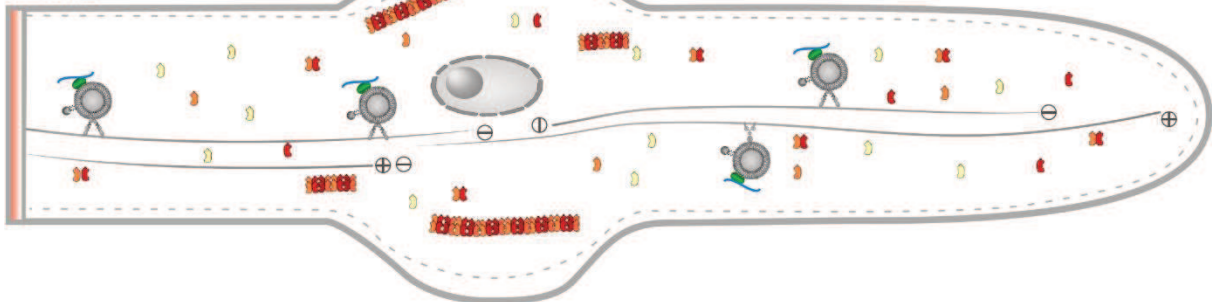
B

*rrm4*Δ



C

*cdc12*Δ



**Abbildung 3.2: Modell der lokalen Translation der Septine auf Endosomen, welche für einen effizienten Einbau in alle Strukturen benötigt wird.** (A) Im Wildtyp kommen alle vier Septine am Septum, in Ringen, in Filamenten und auf Endosomen vor. Eine mögliche lokale Translation der mRNAs führt zu einer Bildung von Septinkomplexen auf den Endosomen. Diese können in verschiedene Strukturen eingebaut werden. An der Spitze kommt es zu einer vermehrten Lokalisation von Septinen. (B) In einem *rrm4* Deletionsstamm befinden sich alle Septine am Septum, in Filamenten und vermehrt in Ringen. Es kann keine Septin-mRNA mehr transportiert werden, sodass es ebenfalls zu einem Verlust der Septinproteine auf Endosomen kommt. Die heteromeren Strukturen werden im Zytoplasma zusammgebaut. (C) Die Deletion von *cdc12* führt zu verkürzten Septinfilamenten, welche nur aus Cdc3 und Cdc10 bestehen. Am Septum lokalisiert nur noch schwach Cdc3. Die mRNA der anderen Septine wird vermutlich noch auf den Endosomen translatiert, aber eine Kopplung der Translationsprodukte kann nicht mehr stattfinden.

### 3.2.4 Septinkomplexe werden durch einen unbekanntem Mechanismus an Endosomen gekoppelt

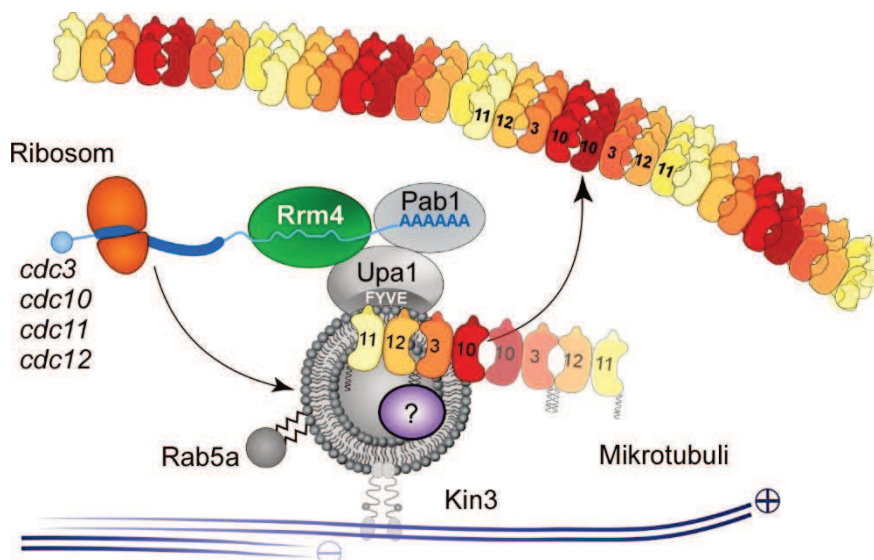
Durch die gegenseitige Abhängigkeit der Septinproteine für deren Lokalisation auf den Endosomen kann vermutet werden, dass eine lokale Translation auf diesen nicht ausreicht, um das Translationsprodukt an die Endosomen zu binden. Der genaue Mechanismus, der für die Kopplung an Endosomen benötigt wird, ist nicht bekannt. Es können jedoch verschiedene Theorien aufgestellt werden. Septine besitzen eine polybasische Region, die in der Lage ist, an Lipide zu binden. Es könnte sein, dass, im Vergleich zu den einzelnen Septinproteinen, die heterooligomeren Einheiten die endosomalen Lipide stärker binden können. Durch diesen additiven Effekt würde sich eine höhere Avidität mit der Membran ergeben. Dieses könnte zum Beispiel durch eine Vervielfachung der basischen Region in den Septinoligomeren erreicht werden, oder mit der Fähigkeit, Membrankrümmungen zu erkennen, in Verbindung stehen (Bridges *et al.*, 2016). Alternativ könnte es einen Interaktionspartner geben, der Septinheteromere spezifisch an die Endosomen koppelt. Aufgrund der Rrm4-Abhängigkeit der Septinproteine wird diese Hypothese favorisiert (siehe 3.2.3 und Abb. 3.3). Es kann vermutet werden, dass dieser Adapter spezifisch mit den C-Termini von Cdc3 und Cdc12 interagieren kann, da die gleichzeitige Expression von C-terminalen Fusionen an Cdc3 und Cdc12 zu einem kompletten Verlust dieser Proteine auf Endosomen führt. Ferner wurde in *S. cerevisiae* gezeigt, dass Cdc3 und Cdc12 durch ihre CTEs interagieren können und diese ausreichend für eine Interaktion sind (Versele *et al.*, 2004). Die Möglichkeit einer Interaktionsfläche über Cdc3 / Cdc12 wird auch dadurch unterstützt, dass die Deletionen von *cdc3* oder *cdc12* zu einem kompletten Verlust aller Septine auf Endosomen führen (Tab.3.1). Da in der Membran von frühen Endosomen ein hoher Anteil an Phosphatidylinositol-3-Phosphat (PI(3)P) gefunden wird, könnte ein potentieller Adapter eine FYVE Domäne tragen, da diese mit hoher Spezifität an PI(3)P binden können (Hayakawa *et al.* 2004). In *U. maydis* kommen sechs Gene vor, deren Genprodukte eine FYVE Domäne tragen: Upa1, Vps27, Don1, Pep7, Fab1 und ein unbekanntes Protein umag\_03883 (Fuchs *et al.*, 2005) (Thomas Pohlmann, Dissertation 2013). Der Verlust von Upa1 führt zu einer Reduktion von Rrm4 auf den Endosomen und daher auch zu einer Reduktion des Cdc3 Proteins auf den Endosomen (Pohlmann *et al.*, 2015). Upa1 wird jedoch für die Kopplung von Rrm4 an Endosomen benötigt und kann daher nicht durch Lokalisationsanalysen als Adapter von Septinen untersucht werden. Um Upa1 als ein potentielles Adapterprotein zu untersuchen, könnten Hefe-Zwei-Hybrid Analysen mit Upa1

und den Septinen durchgeführt werden. Außerdem könnte eine biochemische Analyse mit Hilfe von *GST-Pulldowns* Aufschluss über eine mögliche Interaktion geben. Vps27 ist eine Komponente des ESCRT-Komplexes. Es konnte gezeigt werden, dass die Vps27-Gfp Fusion in endosomalen Vesikeln durch die Hyphe transportiert wird, was Vps27 zu einem potentiellen Adapter macht (Carl Haag, Dissertation 2013). Daher müsste der Einfluss der Deletion von *vps27* auf den Transport von Septinen näher untersucht werden. Don1 ist ein GTP-Austauschfaktor der Dbl Familie und wird für die Initiation der Bildung des sekundären Septums benötigt. Die Deletion von *don1* führt zu einer fehlerhaften Zytokinese und dadurch zu der Bildung von Zellklustern. Außerdem wurde gezeigt, dass Don1-Gfp durch seine FYVE-Domäne an endosomalen Vesikeln lokalisiert (Hlubek *et al.*, 2008; Schink und Bölker, 2009). Eine Untersuchung der Cdc3-GfpN Lokalisation in einem *don1* Deletionsstamm zeigte keinen Einfluss auf die Bewegung von Cdc3-GfpN. Somit kann Don1 als Adapter für Septine ausgeschlossen werden. Fab1 kodiert für eine Phosphatidylinositol-3-Phosphat-5-Kinase. Die Deletion dieses Proteins führt in *C. albicans* zu vergrößerten Vakuolen mit Ansäuerungsdefekten, zu einer verlängerten Generationszeit und zu einer Störung in der Hyphenbildung (Augsten, 2002). In *S. cerevisiae* führt die Deletion von *fab1* ebenfalls zu Defekten in der Vakuole und zu einer veränderten Morphologie (Yamamoto 1995, Cooke 1998). Die Deletion des *fab1* Genes in *U. maydis* zeigte ähnliche Defekte. Die Hyphen zeigten ebenfalls vergrößerte Vakuolen im Vergleich zum Wildtyp. Die Untersuchung der endosomalen Cdc3-GfpN Bewegung war jedoch auch hier nicht beeinträchtigt (Daten nicht gezeigt). Somit konnte auch Fab1 als Adapterprotein ausgeschlossen werden. Das Pep7 Homolog Vac1p reguliert die Fusion von Vesikeln der Plasmamembran und des Golgi-Apparates mit den Vakuolen in *S. cerevisiae* (Peterson 1999, Weismann 1992). In *C. albicans* ist Vac1p am Transport von Vesikeln zur Vakuole beteiligt und wird für die Virulenz benötigt (Franke 2006). In *U. maydis* ist bisher keine genaue Funktion dieses Proteins bekannt. Daher sollten die Auswirkungen der Deletion dieses entsprechenden Gens, ebenso wie die Deletion des bisher nicht untersuchten Gens *umag\_03883*, in *U. maydis* untersucht werden. Die Effizienz der Rekombination zur Deletion dieser Gene war jedoch sehr gering, sodass es sich möglicherweise um essentielle Gene handelt. Falls unter den FYVE-Domänen Proteinen kein Adapterprotein gefunden werden kann, könnten im Weiteren Proteine mit einer Phox-Homologie Domäne (PX) untersucht werden, da auch diese mit einer hohen Affinität und Spezifität an PI(3)P binden



kann (Teasdale und Collins, 2012). Um jedoch gezielt Interaktionsproteine zu identifizieren, wäre die Ko-Immunopräzipitation eines Septins mit anschließender massenspektrometrischer Analyse der Interaktionspartner von Vorteil. Ähnliche Experimente wurden auch in *A. fumigatus* oder *A. gossypii* durchgeführt (Juvvadi *et al.*, 2013; Meseroll *et al.*, 2012; Vargas-Muniz *et al.*, 2015). Für eine gezielte Analyse der Interaktionspartner von Septinen auf Endosomen würde eine vorherige Isolierung der Endosomen-Fractionen die Liste der interagierenden Kandidaten einengen und so die Aussagekraft der Analyse erhöhen.

Zusammenfassend kann vermutet werden, dass mehrere Faktoren eine Rolle spielen, um den Zusammenbau der Septine auf den Endosomen zu gewährleisten. Zum einen wird die lokale Translation benötigt um neue Proteine zu synthetisieren. Zum anderen können die Translationsprodukte nur als Komplex oder durch einen Adapter an die Endosomen gekoppelt werden. Der Verlust des mRNA Transports oder die Deletion eines Septins führen zu einem Verlust der Proteine auf den Endosomen. Somit stellt die lokale Translation auf Endosomen einen eleganten Weg dar, um Septine in eine physikalisch beschränkte Umgebung zu bringen. Dies erleichtert die Bildung von Septinkomplexen, welche anschließend in höher-geordnete Strukturen eingebaut werden können. Diese Arbeit stellt somit einen neuen Mechanismus für den Transport und den Zusammenbau der Septinkomplexe dar.



**Abbildung 3.3: Modell des Zusammenbaus der Septine auf Endosomen.** Die lokale Translation der mRNAs führt zu einem Zusammenbau der Proteine auf den Endosomen. Die Proteine werden vermutlich durch ein Adapter (gekennzeichnet mit einem „?“) oder eine additive Interaktion der polybasischen Region an die Endosomen gekoppelt. Die entstandenen Heteromere können anschließend in höher-geordnete Strukturen, wie die Filamente eingebaut werden.

### 3.3 Ausblick

In dieser Arbeit konnten grundlegende Erkenntnisse in Bezug auf den Transport der Septin-mRNAs und der Septinproteine in *U. maydis* gewonnen werden. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde ein Modell aufgestellt, in welchem die lokale Translation der Septin-mRNAs für die Komplexbildung der Septine auf den Endosomen benötigt wird. Der Transport dieser Komplexe ist wichtig für einen effizienten Einbau in höhere Septinstrukturen. Weiterführende Fragestellungen schließen sich an die hier gewonnenen Ergebnisse an.

Zum einen sollte im Folgenden die Struktur der Septinkomplexe biochemisch untersucht werden. Alle bisherigen Vermutungen basieren auf dem Modell aus *S. cerevisiae*, welches in *U. maydis* durch zahlreiche Experimente unterstützt wurde. Es war jedoch nicht möglich, die genaue Abfolge der Septine im Komplex anhand von mikroskopischen Untersuchungen und genetischen Studien zu ermitteln.

Des Weiteren sollten Experimente folgen, die zur Identifikation der Kopplung der Septine auf Endosomen beitragen könnten. Da in dieser Arbeit gezeigt wurde, dass die Lokalisation der Septine auf Endosomen sowohl von Rrm4 als auch von der Anwesenheit mehrerer Untereinheiten abhängt, sollte der gesamte Komplex, wie bereits beschrieben, untersucht werden. Zusätzlich könnte hier auch die BioID-Technik zur Entfernung-abhängigen Markierung mit Biotin *in vivo* zur Anwendung kommen (Rhee *et al.*, 2013; Roux *et al.*, 2012). Dazu kann zum Beispiel eine Septin-APEX-Fusion benutzt werden. Durch die Zugabe von Wasserstoffperoxid und Biotinphenol kann APEX alle Proteine in räumlicher Nähe markieren und somit können potentielle Adapterproteine identifiziert werden. Allerdings muss auch hier beachtet werden, dass eine APEX-Fusion mit der Funktionalität der Septine interferieren kann. Da jedoch bisher alle Gfp-Fusionen auf Endosomen lokalisieren, kann dies zumindest ausgetestet werden.

Weiterführende Studien in Bezug auf den RNA-Transport könnten Aufschluss über den Zusammenhang der Septin-mRNAs und deren lokale Translation bringen. Wie im oberen Abschnitt erwähnt, würde hier eine Kolo-kalisation mehrerer Septin-mRNAs zeigen, ob diese auf demselben oder auf unterschiedlichen Endosomen transportiert werden. Obwohl

viele Faktoren für eine lokale Translation sprechen, sollte diese zuvor mittels TRICK Experimenten oder der Markierung von translatierten Peptidketten verifiziert werden.

Es wäre interessant, die Doppel- und Tripeldeletionen der Septine näher zu charakterisieren. Initiale Experimente zeigten keinen additiven Defekt im hyphalen Wachstum. Dies müsste jedoch nochmals genauer untersucht werden. Außerdem könnte auch mit diesen Stämmen die Aktivität der Endochitinase Cts1 getestet werden. Mit diesem Assay sollte sicher geklärt werden können, ob die Deletion weiterer Septine zu additiven Defekten führt, was für eine gemeinsame Rolle der Septine in der Sekretion sprechen könnte.

Eine zentrale Fragestellung, die dazu beitragen könnte den endosomalen Transport von mRNA und Proteinen näher zu charakterisieren, wäre eine Analyse der Protein-Stöchiometrie. Es wäre interessant zu wissen, wie viele Rrm4 Moleküle sich auf einem Endosom befinden und dementsprechend wie viele verschiedene mRNAs potentiell gebunden werden können. Dadurch kann ebenfalls die Anzahl der Septinkomplexe analysiert werden. Für diese Analysen muss ein Referenzsystem etabliert werden, von dem die Anzahl der Gfps bekannt ist. Durch verschiedene Referenzproteine mit unterschiedlicher Anzahl an Fluoreszenzproteinen können anschließend die Anzahl aller Komponenten des endosomalen Transports untersucht werden. Dadurch kann ein besseres Verständnis des Transportes erlangt werden.

## 4. Material und Methoden

Die hier beschriebene, standardisierte Methoden und/oder Medienzusammensetzungen, sowie Informationen zu den verwendeten Materialien sind zum Teil wörtlich oder leicht modifiziert aus den Methodensammlungen der AG Feldbrügge übernommen.

### 4.1 Material und Bezugsquellen

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

##### Chemikalien

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

##### Puffer und Lösungen

In dieser Arbeit verwendete Standard-Puffer und Lösungen wurden nach Ausubel und Sambrook hergestellt. Spezielle Puffer und Lösungen sind unter den jeweiligen Methoden aufgeführt.

##### Medien

###### E. coli:

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

###### **YT-Festmedium** (Sambrook *et al.*, 1989)

8 g Trypton  
5 g Hefeextrakt  
5g NaCl  
20 g Bacto Agar  
Mit H<sub>2</sub>O<sub>bid.</sub> auf 1 L aufgefüllt

###### **dYT-Flüssigmedium** (Sambrook *et al.*, 1989)

16g Trypton  
10g Hefeextrakt  
5g NaCl  
Mit H<sub>2</sub>O<sub>bid.</sub> auf 1 L aufgefüllt

Antibiotika wurden in folgender Konzentration eingesetzt:

Ampicillin: 100 µg/ml

Kanamycin: 50 µg/ml

###### U. maydis:

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

**CM (Vollmedium)**

(Banuett und Herskowitz, 1989; Holliday, 1974b)  
 1,5 g NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>  
 2,5 g Casein-Hydrolysat  
 0,5 g Heringssperma DNA  
 1 g Hefeextrakt  
 10 ml Vitamin-Lösung (s.u.)  
 62,5 ml Salz-Lösung (s.u.)  
 0,5 ml Spurenelement-Lösung (s.u.)  
 20 g Bacto Agar (für Festmedium)  
 Mit H<sub>2</sub>O<sub>bid.</sub> auf 980 ml aufgefüllt, der pH-Wert wurde mit NaOH auf pH 7,0 eingestellt. Nach dem Autoklavieren wurde 2% (v/v) 50% sterile Glukose-Lösung (1% f.c.) oder 4% (v/v) 25% sterile Arabinose-Lösung (1% f.c.) zugefügt.

**Salz-Lösung** (Holliday, 1974b)

8 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
 2 g Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>  
 1 g MgSO<sub>4</sub> \* 7 H<sub>2</sub>O  
 Mit H<sub>2</sub>O<sub>bid.</sub> auf 1L aufgefüllt und autoklaviert.

**Regenerationsagar (light)** (Schulz *et al.*, 1990a)

Top-Agar:  
 182,2 g Sorbitol  
 10 g Hefeextrakt  
 4 g Bacto Pepton  
 4 g Saccharose  
 15 g Agar  
 Mit H<sub>2</sub>O<sub>bid.</sub> auf 1L aufgefüllt und autoklaviert.  
 Bottom-Agar:  
 wie Top-Agar mit Antibiotika (s.u.)

**NM (Nitrat-Minimalmedium)**

(Scherer *et al.*, 2006)  
 62,5 ml Salz-Lösung (s.u.)  
 3,8 g KNO<sub>3</sub>  
 Mit H<sub>2</sub>O<sub>bid.</sub> auf 1L aufgefüllt, der pH-Wert wurde mit NaOH auf pH 7,0 eingestellt.  
 Nach dem Autoklavieren wurde 2% (v/v) 50% sterile Glukose-Lösung (1% f.c.) oder 4% (v/v) 25% Arabinose-Lösung (1% f.c.) zugefügt

**Spurenelemente-Lösung** (Holliday, 1974b)

60 mg H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>  
 191 mg MnCl<sub>2</sub>  
 400 mg ZnCl<sub>2</sub>  
 47 mg NaMoO<sub>4</sub> \* 2 H<sub>2</sub>O

**NSY-Glycerin (Für Glycerinkulturen)**

8 g Nutrient Broth  
 1 g Hefeextrakt  
 5 g Sukrose  
 800 ml 87% Glycerin  
 Mit H<sub>2</sub>O<sub>bid.</sub> auf 1L aufgefüllt und steril filtriert.

**Vitamin-Lösung** (Holliday, 1974b)

100 mg Thiamin  
 20 mg Calciumpanthothenat  
 50 mg p-Aminobenzoensäure  
 20 mg Nikotinsäure  
 20 mg Cholinchlorid  
 40 mg myo-Inositol  
 50 mg Folsäure  
 Mit H<sub>2</sub>O<sub>bid.</sub> auf 1L aufgefüllt und steril filtriert.

Tab 4.1: In dieser Arbeit verwendete Antibiotikakonzentrationen.

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

**Enzyme**

Tab 4.2: In dieser Arbeit verwendete Enzyme.

Enzym	Bezugsquelle
Alkalische Phosphatase	Roche
Lysozym	Merck
Novozym 234	Novo Nordisc
Phusion DNA-Polymerase	NEB
Phusion DNA-Polymerase	Laborpräparation
Restriktionsendonukleasen	New England Biolabs
Ribonuklease A	Boehringer
T4-DNA-Ligase	Roche
Quick Ligase	NEB

### Größenstandards für DNA-Gelelektrophorese

- $\lambda$ PstI: Mit dem Restriktionsenzym PstI geschnittene genomische DNA des Phagen  $\lambda$  ( $\lambda$  genomische DNA von Thermo Fisher Scientific)
- Generuler 1 kb DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific)

### Verwendete Kits

In der vorliegenden Arbeit wurden folgende Kits nach Angaben des Herstellers verwendet:

Tab 4.3: In dieser Arbeit verwendete Kits.

Name	Hersteller	Verwendungszweck
Plasmid Midi Kit (100)	Qiagen	Plasmidpräparation aus <i>E. coli</i>
JETQUICK DNA Clean-Up Kit	Genomed	Aufreinigung von Plasmiden oder PCR-Produkten
JETQUICK Gel Extraktion Spin Kit	Genomed	Aufreinigung von Fragmenten aus einem Agarosegel
NucleoSpin Plasmid Kit	Machery-Nagel	Plasmidpreparation aus <i>E. coli</i>
PCR-DIG-labeling Kit	Roche	Herstellung Digoxigenin markierter DNA-Sonden
TOPO-TA cloning Kit	Life Technologies	Zwischenklonierung von DNA-Fragmenten
SureClean	Bioline	Aufreinigung von PCR-Produkten

#### 4.1.2 Zentrifugen

Die Proben in 1,5 ml und 2 ml Reaktionsgefäßen wurden in einer Heraeus Biofuge pico oder Heraeus Biofuge fresco (Heraeus/Thermo Fisher Scientific) zentrifugiert. Proben mit einem größeren Volumen wurden in 15 ml oder 50 ml Zentrifugationsröhren in einer Heraeus Biofuge stratos (Heraeus/Thermo Fisher Scientific) zentrifugiert.

#### 4.1.3 Oligonukleotide

Die Oligonukleotide wurden von der Firma Metabion GmbH (Martinsried, Deutschland) synthetisiert. In Tabelle 4.4 sind die Oligonukleotide angegeben, die für Klonierungen verwendet wurden. Nähere Informationen finden sich bei den Plasmidbeschreibungen. Oligonukleotide, die für Sequenzierungsreaktionen verwendet wurden, sind nicht angegeben.

Tab 4.4: In dieser Arbeit verwendete Oligonukleotide.

Name	Nucleotide Sequenz (5' → 3')	Verwendungszweck
oDD101	GGTCTCCGGCCATGCTCGCAAGTCATGTGCTATC	<i>don1D</i> d1
oDD102	GGTCTCGCTGCAATATTGGATGCGAGCTGTTGTGC	<i>don1D</i> d2
oDD107	GGTCTCGCTGCAATATTGGACATGAGTGACATGCAGC	<i>don1D</i> u2
oDD108	GGTCTCCAGGCCCCGAGCCGTTGAACGCTAAG	<i>don1D</i> u3
oDD109	GGTCTCCGGCCTGTGGACATCGTGCATGAATCG	<i>fab1D</i> d1
oDD110	GGTCTCGCTGCAATATTTACTGCTGCGTTAGGGGC	<i>fab1D</i> d2
oDD115	GGTCTCGCTGCAATATTCACGACTAGAACCGAGGATC	<i>fab1D</i> u2
oDD116	GGTCTCCAGGCCGACTGGTTCGACTGTTTTGAAGG	<i>fab1D</i> u3
oMB235	GCCATGGGTGTTTCCTTCTGTCTTAAGTCGTCG	<i>cdc11a0D</i>

oMB246	GGTCTCGCTGCCATGGACGGAGGTTCTCAC	<i>cdc3(H135A)</i>
oMB247	GGTCTCTTGACCCGGTGGGCTGCACAAAGTAGAT	<i>cdc3(H135A)</i>
oMB248	GGTCTCGTGCAAGTCTGCGACCCATCGAC	<i>cdc3(H135A)</i>
oMB249	GGTCTCGCTGCTTAGTTTCGACAGTGAGAAAC	<i>cdc3(H135A)</i>
oMF803	TTCGGCCATCTAGGCCGGCAAGGTTCCGACTTG	<i>rrm4 u3</i>
oMF804	TGAGGCCTGAGTGGCCTCCGAGTGACAACCAGAC	<i>rrm4 d2</i>
oRL36	AATATTCTTGCTTCGCTCTGCAG	<i>cdc12 UF+ORF</i>
oRL37	AAGCTTCCATGGCTTTGCGGCTAGTGTAGTAC	<i>cdc12 UF+ORF</i>
oRL38	CCATGGCTACCAACGGCATC	<i>cdc12 u2</i>
oRL39	CCGCGGTACGATACACGAACTTCTGG	<i>cdc12 u3</i>
oRL40	GTCGACTCGTTTACGTGCAACTCGC	<i>cdc12 3'UTR</i>
oRL41	GGCGCGCCGACCCGGCTATCCGAGAT	<i>cdc12 3'UTR</i>
oRL42	GGCCTGAGTGGCCTTCCGGACCAGTGAGAGG	<i>cdc12 d1</i>
oRL43	AATATTTTCATGACGCTCACGGC	<i>cdc12 d2</i>
oRL152	AATATTGTGCCGCCACCAGAC	<i>cdc10 u2</i>
oRL154	CATATGACGGCGGTACTATCGC	<i>cdc10 ORF+3'UTR</i>
oRL155	GGCGCGCTAACCTGCAGCTGGTGCACC	<i>cdc10 ORF+3'UTR</i>
oRL156	GGCCTGAGTGGCCTGCGTGTGACGAACGAC	<i>cdc10 d1</i>
oRL157	AATATTCCGAGTCGTGGTTGGAG	<i>cdc10 d2</i>
oRL161	GGCCATCTAGGCCAGTCGTACTTTTCGTAGCT	<i>cdc10 u3</i>
oRL170	ATTTAAATCATCTTGCTGATGAGCAGGG	<i>cdc11 u2</i>
oRL171	ATTTAAATCCGAGCTAGACAACCAATC	<i>cdc11 d2</i>
oRL190	GGCCATCTAGGCCGAGAGAGCCGGTGAAGGC	<i>cdc11 u3</i>
oRL191	GGCCTGAGTGGCCTTACGCAGCAGAACGGGGT	<i>cdc11 d1</i>
oRL194	CATATGCTCAACTCCAGCATGGCCG	<i>cdc11 ORF+3'UTR</i>
oRL195	GGCGCGCCAATCGAAGCTGCACACC	<i>cdc11 ORF+3'UTR</i>
oRL1252	GGCCGCGTTGGCCGCCTCGTTGATGTTCTGAG	<i>cdc11 UF+ORF</i>
oRL1253	GGCGCGCCAGGCGCGTGCCGAATGAC	<i>cdc11 3'UTR</i>
oRL1254	GGCGCGCCCGATCGGCAACCACAATTTTCAGCG	<i>cdc11 3'UTR</i>
oRL1255	GGCCTGAGTGGCCGTTAGTGACATTCGTGATTGATGTGG	<i>cdc11 DF-Gfp</i>
oRL1366	GGCCGCGTTGGCCGCACGACGCTGCGAGCCACG	<i>cdc12 UF+ORF</i>
oRL1367	GGCGCGCCTCGTTTACGTGCAACTCGCTC	<i>cdc12 3'UTR</i>
oRL1368	GGCGCGCCCGATCGAGACCGTCGCCGAGACCG	<i>cdc12 3'UTR</i>
oRL1379	GGCCGCGTTGGCCGCATGCTGAGTGGGAGGCTGC	<i>cdc10 UF+ORF</i>
oRL1380	GGCGCGCCCGCTCTCTTGTTCATC	<i>cdc10 3'UTR</i>
oRL1381	GGCGCGCCCGATCGGCGCTTTATCCTGCAGCTG	<i>cdc10 3'UTR</i>
oRL1495	GGTCTCGCTGCCGGGCTGAGTGGCCTGCAGGAATTCGATCCCATG	<i>cdc3α0D</i>
oRL1496	GGTCTCGACCGACATAGCCCATGAGCTTCTTGC	<i>cdc3α0D</i>
oRL1497	GGTCTCGCGGTTTTACTGCTATGGTCGTCGGAG	<i>cdc3α0D</i>
oRL1498	GGTCTCGCTGCGAGGTTTGAAATTGTCCCGCGG	<i>cdc3α0D</i>
oRL1499	GGTCTCGCTGGGTTTCACTCCATGGTGAGCAAG	<i>cdc10α0D</i>
oRL1500	GGTCTCGGTACGACTGCAGAGGAGTGTGC	<i>cdc10α0D</i>
oRL1501	GGTCTCGGTACCGCGGCTTCCAGTTTAAACGTCATG	<i>cdc10α0D</i>
oRL1502	GGTCTCGCTGCTGCGGCCGCCGGCCGCGCGCCTAACCT	<i>cdc10α0D</i>
oRL1776	CCGCGGGCAGGATACATTGGAG	<i>cdc10 u3-boxB</i>
oRL1777	GTCGACTTGTGCTGTTGGTATTCC	<i>cdc10 d1-boxB</i>
oRL1780	CCGCGGATAGAAAACAGAACTCGAGC	<i>cdc11 u3-boxB</i>

oRL1781	GTCGACGGTTTGTCTTGCTCGTTTG	<i>cdc11</i> 3'UTR
oRL1782	GGCGGCCATCCACACGAGCACACAC	<i>cdc11</i> 3'UTR
oRL1783	GGCCTGAGTGGCCTTACTCCAAGCCACGAGCC	<i>cdc11</i> d1-boxB
oSL892	GACATTTAAATTCATTCACGATTCACCC	<i>rrm4</i> u2
oSL893	GACATTTAAATTCGGCGAAAGCTCCC	<i>rrm4</i> d1

#### 4.1.4 Plasmide und Plasmidkonstruktionen

##### Plasmide für Arbeiten mit *U. maydis*

###### In dieser Arbeit verwendete Plasmide und Klonierungsvektoren:

###### pCR®II-TOPO (Life Technologies)

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

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

Dieser Vektor enthält eine Hygromycin-Resistenzkassette als 1884 bp langes *Sfil/Sfil*-Fragment. Die Kassette besteht aus dem konstitutiv aktiven Promotor *Phsp70*, dem *hph*-Gen für die Hygromycin-Phosphotransferase und dem heterologen Terminator *Tnos* aus *Agrobacterium tumefaciens* (Bevan *et al.*, 1983).

###### pMF1g (pUMa1057; (Baumann *et al.*, 2012a))

Dieser Vektor enthält eine Geneticin-Resistenzkassette als 2073 bp langes *Sfil/Sfil*-Fragment. Die Kassette besteht aus dem konstitutiv aktiven Promotor *Potef*, dem Gen *neo* für eine 3-Aminoglykosid-Phosphotransferase und dem Terminator des *iso-1-cytochrom c* Gens aus *S. cerevisiae* *Tcyc1*.

###### pRrm4Δ-HygR (pUMa 495; (Becht *et al.*, 2006))

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

###### pRrm4Δ-GentR (pUMa 1755; (Becht *et al.*, 2006))

Plasmid für die Herstellung einer Deletionsmutante des *rrm4*-Gens (um10836). Es enthält eine 1072 bp lange stromaufwärts des offenen Leserahmens von *rrm4* liegende Flanke, sowie eine 1972 bp lange stromabwärts liegende Flanke. Zwischen den Flanken befindet sich ein 2017 bp langes *Sfil/Sfil*-Fragment aus pMF1g (pUMa1057) mit einer Geneticin-Resistenzkassette. Das Plasmid wurde für die homologe Integration in den *rrm4*-Lokus verwendet.



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

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

**pRrm4C-HygR** (pUMa1468; (Baumann *et al.*, 2014))

Plasmid für die Expression einer C-terminalen Fusion von Rrm4 mit mCherry unter der Kontrolle des nativen Promotors. Es enthält eine 3205 bp lange stromaufwärts gelegene Flanke, inklusive 2376 bp des offenen Leserahmens von *rrm4*, sowie eine 1987 bp lange stromabwärts gelegene Flanke für die homologe Rekombination im *rrm4*-Lokus. Zwischen den Flanken wurde ein 2898 bp langes *Sfil/Sfil*-Fragment mit *mCherry*, gefolgt von dem Terminator *Tnos* in Kombination mit einer Hygromycin Resistenz eingefügt (pUMa 1409 MF5-15h, Baumann *et al.*, 2013). Das Plasmid wurde für die homologe Integration in den *rrm4*-Lokus verwendet.

**pP<sub>otef</sub>Tub1-GfpN-CbxR** (pUMa 503, (Steinberg *et al.*, 2001))

Plasmid für die Expression einer N-terminalen Fusion von Tubulin1 mit Gfp unter der Kontrolle des P<sub>otef</sub> Promotors. Das Plasmid enthält den offenen Leserahmen von Tubulin1 inklusive einer 383 bp langen Region stromabwärts des 3' Endes von Tubulin1. Außerdem enthält das Plasmid eine Carboxin Resistenz und wurde für die Integration im *ip<sup>s</sup>*-Lokus verwendet.

**pCts1Δ-HygR** (pUMa 780; (Koepeke *et al.*, 2011))

Plasmid für die Herstellung einer Deletionsmutante des *cts1*-Gens (um10419). Es enthält eine 1730 bp lange stromaufwärts des offenen Leserahmens von *cts1* liegende Flanke, sowie eine 1060 bp lange stromabwärts liegende Flanke. Zwischen den Flanken befindet sich ein 1884 bp langes *Sfil/Sfil*-Fragment aus pMF1hs (pUMa194) mit einer Hygromycin-Resistenzkassette. Das Plasmid wurde für die homologe Integration in den *cts1*-Lokus verwendet.

**pCdc3Δ -HygR** (pUMa 1004; (Baumann *et al.*, 2014))

Plasmid für die Herstellung einer Deletionsmutante des *cdc3*-Genes (um 10503). Es enthält eine 1749 bp lange stromaufwärts des offenen Leserahmens von *cdc3* liegende Flanke, sowie eine 1108 bp lange stromabwärts liegende Flanke. Zwischen den Flanken befindet sich ein 1884 bp langes *Sfil/Sfil*-Fragment aus pMF1hs (pUMa194) mit einer Hygromycin-Resistenzkassette. Das Plasmid wurde für die homologe Integration in den *cdc3*-Lokus verwendet.

### **pCdc3-GfpN -NatR** (pUMa 1028; (Baumann *et al.*, 2014))

Plasmid für die Expression einer N-terminalen Gfp Fusion von Cdc3 (um 10503) unter der Kontrolle des nativen Promotors. Es enthält eine 1757 bp lange stromaufwärts liegende Flanke, ein Gfp im gleichen Leserahmen mit dem 1531bp langen offenen Leserahmen gefolgt von 608 bp 3'UTR Region. Ein 1434 bp langes *Sfil/Sfil* Fragment aus pMF1-n (pUMa 262) mit einer Nourseothricin Resistenz befindet sich zwischen der 3'UTR und der 1115 bp langen stromabwärts liegenden Flanke. Das Plasmid wurde für die homologe Integration in den *cdc3*-Lokus verwendet.

### **pCdc3-GfpC -NatR** (pUMa 990; (Baumann *et al.*, 2014))

Plasmid für die Expression einer C-terminalen Gfp Fusion von Cdc3 (um 10503) unter der Kontrolle des nativen Promotors. Es enthält eine 2112 bp lange stromaufwärts liegende Flanke, inklusive 1528 bp des offenen Leserahmens von *cdc3*, sowie eine 1115 bp lange stromabwärts gelegene Flanke für die homologe Rekombination im *cdc3* Lokus. Zwischen den Flanken wurde ein eGfp, 608 bp 3'UTR, gefolgt von einem Terminator T<sub>nos</sub> in Kombination mit einer Nourseothricin Resistenz eingefügt. Das Plasmid wurde für die homologe Integration in den *cdc3*-Lokus verwendet.

### **pP<sub>otef</sub>Cdc3-B16-NatR** (pUMa1448; (Baumann *et al.*, 2014))

Plasmid um die *cdc3* mRNA Lokalisation zu analysieren. Es enthält eine 1601 bp lange stromaufwärts liegende Flanke des *cdc3* Genes gefolgt von einem P<sub>otef</sub> Promotors. Anschließend folgt der offene Leserahmen von Cdc3 mit 1528 bp Länge. Es folgen 99 bp der 3'UTR, gefolgt von 16 boxB Sequenzen mit einer Gesamtlänge von 514 bp. Der restliche Teil der 3'UTR 608 bp wird gefolgt von einem T<sub>nos</sub> Terminator in Kombination mit einer Nourseothricin Resistenz, sowie einer 1181 bp lange stromabwärts gelegene Flanke für die homologe Rekombination im *cdc3* Lokus. Das Plasmid wurde für die homologe Integration in den *cdc3*-Lokus verwendet.

### **pCdc10 $\Delta$ -HygR** (pUMa 1500; (Zander *et al.*, 2016))

Plasmid für die Herstellung einer Deletionsmutante des *cdc10*-Genes (um 10644). Es enthält eine 1002 bp lange stromaufwärts des offenen Leserahmens von *cdc10* liegende Flanke, sowie eine 952 bp lange stromabwärts liegende Flanke. Zwischen den Flanken befindet sich ein 1884 bp langes *Sfil/Sfil*-Fragment aus pMF1hs (pUMa194) mit einer Hygromycin-Resistenzkassette. Das Plasmid wurde für die homologe Integration in den *cdc10*-Lokus verwendet.

### **pCdc10-GfpN -NatR** (pUMa 1499; (Zander *et al.*, 2016))

Plasmid für die Expression einer N-terminalen Gfp Fusion von Cdc10 (um 10644) unter der Kontrolle des nativen Promotors. Es enthält eine 1083 bp lange stromaufwärts liegende Flanke, ein Gfp im gleichen Leserahmen mit dem 981bp langen offenen Leserahmen gefolgt von 505 bp 3'UTR Region und einem T<sub>nos</sub> Terminator. Ein 1434 bp langes *Sfil/Sfil* Fragment aus pMF1-n (pUMa 262) mit einer Nourseothricin Resistenz befindet sich zwischen der

3'UTR und der 952 bp langen stromabwärts liegenden Flanke. Das Plasmid wurde für die homologe Integration in den *cdc10*-Lokus verwendet.

**pCdc11Δ -HygR** (pUMa 1569; (Zander *et al.*, 2016))

Plasmid für die Herstellung einer Deletionsmutante des *cdc11*-Genes (um03449). Es enthält eine 1003 bp lange stromaufwärts des offenen Leserahmens von *cdc11* liegende Flanke, sowie eine 1466 bp lange stromabwärts liegende Flanke. Zwischen den Flanken befindet sich ein 1884 bp langes *Sfil/Sfil*-Fragment aus pMF1hs (pUMa194) mit einer Hygromycin-Resistenzkassette. Das Plasmid wurde für die homologe Integration in den *cdc11*-Lokus verwendet.

**pCdc11-GfpN -NatR** (pUMa 1504; (Zander *et al.*, 2016))

Plasmid für die Expression einer N-terminalen Gfp Fusion von Cdc11 (um03449) unter der Kontrolle des nativen Promotors. Es enthält eine 1063 bp lange stromaufwärts liegende Flanke, ein Gfp im gleichen Leserahmen mit dem 1224bp langen offenen Leserahmen gefolgt von 288 bp 3'UTR Region und einem T<sub>nos</sub> Terminator. Ein 1434 bp langes *Sfil/Sfil* Fragment aus pMF1-n (pUMa 262) mit einer Nourseothricin Resistenz befindet sich zwischen der 3'UTR und der 1466 bp langen stromabwärts liegenden Flanke. Das Plasmid wurde für die homologe Integration in den *cdc11*-Lokus verwendet.

**pCdc12Δ -HygR** (pUMa 1459; (Zander *et al.*, 2016))

Plasmid für die Herstellung einer Deletionsmutante des *cdc12*-Genes (um 03599). Es enthält eine 1080 bp lange stromaufwärts des offenen Leserahmens von *cdc12* liegende Flanke, sowie eine 1139 bp lange stromabwärts liegende Flanke. Zwischen den Flanken befindet sich ein 1884 bp langes *Sfil/Sfil*-Fragment aus pMF1hs (pUMa194) mit einer Hygromycin-Resistenzkassette. Das Plasmid wurde für die homologe Integration in den *cdc12*-Lokus verwendet.

**pCdc12-GfpN -NatR** (pUMa 1458; (Zander *et al.*, 2016))

Plasmid für die Expression einer N-terminalen Gfp Fusion von Cdc12 (um 03599) unter der Kontrolle des nativen Promotors. Es enthält eine 1160 bp lange stromaufwärts liegende Flanke, ein Gfp im gleichen Leserahmen mit dem 1140 bp langen offenen Leserahmen gefolgt von 465 bp 3'UTR Region und einem T<sub>nos</sub> Terminator. Ein 1434 bp langes *Sfil/Sfil* Fragment aus pMF1-n (pUMa 262) mit einer Nourseothricin Resistenz befindet sich zwischen der 3'UTR und der 1134 bp langen stromabwärts liegenden Flanke. Das Plasmid wurde für die homologe Integration in den *cdc12*-Lokus verwendet.

**pP<sub>otef</sub>Cdc12-B16-NatR** (pUMa1449; (Zander *et al.*, 2016))

Plasmid um die *cdc12* mRNA Lokalisation zu analysieren. Es enthält eine 1160 bp lange stromaufwärts liegende Flanke des *cdc12* Genes gefolgt von einem P<sub>otef</sub> Promotors. Anschließend folgt der offene Leserahmen von Cdc12 mit 1140 bp Länge. Es folgen 46 bp der 3'UTR, gefolgt von 16 boxB Sequenzen mit einer Gesamtlänge von 514 bp. Der restliche Teil der 3'UTR 466 bp wird gefolgt von einem T<sub>nos</sub> Terminator in Kombination mit einer

Nourseothricin Resistenz, sowie einer 1134 bp lange stromabwärts gelegene Flanke für die homologe Rekombination im *cdc12* Locus. Das Plasmid wurde für die homologe Integration in den *cdc12*-Lokus verwendet.

### **pP<sub>tef</sub>\_Rab5a-GfpC-Tnos-Cbx** (pUMa1712; (Pohlmann *et al.*, 2015))

Plasmid für die Expression von einer C-terminalen Rab5a unter der Kontrolle des konstitutiven Promotor P<sub>tef</sub>. Wie pPotefRab5aGn-CbxR, jedoch wurde der stark konstitutiv aktive Promotor Potef durch den konstitutiven Promotor P<sub>tef</sub> ersetzt. Hierfür wurde ein 1137 bp langes *MfeI/NcoI*-Fragment aus P<sub>tef</sub>-eGfp-Tnos/cbxR (pUMa1139, Koepke *et al.*, 2011) inklusive des Promotors P<sub>tef</sub> mit einem 5744 bp langen *MfeI/NcoI*-Fragment aus pPotefRab5aGn-CbxR (pUMa1481) ligiert. Das Plasmid enthält eine Carboxin-Resistenz und wurde für die Integration in den ip<sup>S</sup>-Lokus verwendet.

### **p123\_otef-Lifeact-emGfp-Cbx** (pUMa1329; Kay Schink)

Plasmid für die Expression des Aktin-bindenden Peptids Lifeact unter der Kontrolle des konstitutiven Promotors P<sub>otef</sub>. Das 59bp große Peptid ist an seinem C-terminus an emGfp fusioniert. Das Plasmid enthält eine Carboxin-Resistenz und wurde für die Integration in den ip<sup>S</sup>-Lokus verwendet.

### **p123\_otef-Lifeact-mCherry-Cbx** (pUMa1332; Kay Schink)

Plasmid für die Expression des Aktin-bindenden Peptids Lifeact unter der Kontrolle des konstitutiven Promotors P<sub>otef</sub>. Das 59bp große Peptid ist an seinem C-terminus an mCherry fusioniert. Das Plasmid enthält eine Carboxin-Resistenz und wurde für die Integration in den ip<sup>S</sup>-Lokus verwendet.

### **In dieser Arbeit hergestellte Plasmide:**

Alle Plasmide wurden mittels molekularbiologischer Standardmethoden hergestellt. Sie tragen entweder eine Ampicillin oder Kanamycin Resistenzkassette zur Selektion in *E.coli*. Einzelne Klonierungsschnitte wurden durch Restriktionsanalyse überprüft und alle benutzten Schnittstellen und PCR-Amplifikate durch eine Sequenzierung auf deren Richtigkeit überprüft.

### **pP<sub>otef</sub>Cdc3-mCherryN -HygR** (pUMa 1961; (Zander *et al.*, 2016))

Plasmid für die Expression einer N-terminalen mCherry Fusion von Cdc3 (um 10503) unter der Kontrolle des P<sub>otef</sub> Promotors. Das Plasmid enthält Flanken, P<sub>otef</sub>, mCherry und den offenen Leserahmen von Cdc3 aus otef-Cdc3-mCherry-16BoxB-Nat (pUMa1757, Baumann *et al.*, 2014) und die 608bp lange 3'UTR aus Cdc3-GfpN-Nat (pUMa 1028, Baumann *et al.*, 2014). Außerdem ein 1884 bp langes *SfiI/SfiI*-Fragment aus pMF1hs (pUMa194) mit einer Hygromycin-Resistenzkassette. Das Plasmid wurde für die homologe Integration in den *cdc3*-Lokus verwendet.

**pCdc3 $\Delta\alpha 0$ -GfpN -NatR** (pUMa 2935; (Zander *et al.*, 2016))

Plasmid für die Expression einer N-terminalen Gfp Fusion von Cdc3 (um 10503) welches eine Deletion der Aminosäuren 35-53 trägt, unter der Kontrolle des nativen Promotors. Das Plasmid ist wie Cdc3-GfpN-Nat (pUMa 1028, Baumann *et al.*, 2014), jedoch wurde durch eine PCR mit den Oligonukleotiden oRL1495/oRL1496 und oRL1497/oRL1498 die Aminosäuren 36-53 deletiert. Das Plasmid wurde für die homologe Integration in den *cdc3*-Lokus verwendet.

**pCdc3 $\Delta\alpha 0$ -GentR** (pUMa 2961; (Zander *et al.*, 2016))

Plasmid für die Expression von Cdc3 (um 10503) welches eine Deletion der Aminosäuren 35-53 trägt, unter der Kontrolle des nativen Promotors. Das Plasmid ist wie pCdc3 $\Delta\alpha 0$ -GfpN -NatR (pUMa 2935), jedoch wurde das Gfp entfernt und die Nourseothricin Resistenz durch eine Geneticin Resistenzkassette ersetzt. Das Plasmid wurde für die homologe Integration in den *cdc3*-Lokus verwendet.

**pCdc3H135A-GfpN -NatR** (pUMa 2948)

Plasmid für die Expression einer N-terminalen Gfp Fusion von Cdc3 (um 10503) welches einen Aminosäureaustausch an Position 135 von Histidin zu Alanin besitzt und unter der Kontrolle des nativen Promotors exprimiert wird. Das Plasmid ist wie Cdc3-GfpN-Nat (pUMa 1028, Baumann *et al.*, 2014), jedoch wurde durch eine PCR mit den Oligonukleotiden oMB246/oMB247 und oMB248/oMB249 die Aminosäuren 135 mutiert. Das Plasmid wurde für die homologe Integration in den *cdc3*-Lokus verwendet.

**pCdc10-GfpC -NatR** (pUMa 2160; (Zander *et al.*, 2016))

Plasmid für die Expression einer C-terminalen Gfp Fusion von Cdc10 (um 10644) unter der Kontrolle des nativen Promotors. Es enthält eine 2161 bp lange stromaufwärts liegende Flanke, inklusive 978 bp des offenen Leserahmens von *cdc10*, sowie eine 952 bp lange stromabwärts gelegene Flanke für die homologe Rekombination im *cdc10* Lokus. Zwischen den Flanken wurde ein eGfp, 500 bp 3'UTR, gefolgt von einem Terminator T<sub>nos</sub> in Kombination mit einer Nourseothricin Resistenz eingefügt. Die stromaufwärts gelegene Flanke inklusive dem offenen Leserahmen, die stromabwärts gelegene Flanke und die 3'UTR wurden mittels folgender Oligonukleotide durch PCR amplifiziert: oRL152/oRL1379, oRL156/oRL157 und RL1380/RL1381. Das Plasmid wurde für die homologe Integration in den *cdc10*-Lokus verwendet.

**pCdc10 $\Delta\alpha 0$ -GfpN -NatR** (pUMa 2936; (Zander *et al.*, 2016))

Plasmid für die Expression einer N-terminalen Gfp Fusion von Cdc10 (um 10644) welches eine Deletion der Aminosäuren 18-33 trägt und unter der Kontrolle des nativen Promotors exprimiert wird. Das Plasmid ist wie Cdc10-GfpN-Nat (pUMa 1499), jedoch wurden durch eine PCR mit den Oligonukleotiden oRL1499/oRL1500 und oRL1501/oRL1502 die Aminosäuren 18-33 deletiert. Das Plasmid wurde für die homologe Integration in den *cdc10*-Lokus verwendet.

**pCdc10 $\Delta\alpha 0$ -GentR** (pUMa 2960; (Zander *et al.*, 2016))

Plasmid für die Expression von Cdc10 (um 10644) welches eine Deletion der Aminosäuren 18-33 trägt, unter der Kontrolle des nativen Promotors exprimiert wird. Das Plasmid ist wie pCdc10 $\Delta\alpha 0$ -GfpN -NatR (pUMa 2936), jedoch wurde das Gfp entfernt und die

Nourseothricin Resistenz durch eine Geneticin Resistenzkassette ersetzt. Das Plasmid wurde für die homologe Integration in den *cdc10*-Lokus verwendet.

### **pP<sub>oter</sub>Cdc10-B16-NatR** (pUMa2288; (Zander *et al.*, 2016))

Plasmid um die *cdc10* mRNA Lokalisation zu analysieren. Es enthält eine 2064 bp lange stromaufwärts liegende Flanke, inklusive 981 bp des offenen Leserahmens von *cdc10*. Es folgen 64 bp der 3'UTR, gefolgt von 16 boxB Sequenzen mit einer Gesamtlänge von 514 bp. Der restliche Teil der 3'UTR 441 bp wird gefolgt von einem T<sub>nos</sub> Terminator in Kombination mit einer Nourseothricin Resistenz, sowie einer 952 bp lange stromabwärts gelegene Flanke für die homologe Rekombination im *cdc10*-Lokus. Die stromaufwärts gelegene Flanke inklusive dem offenen Leserahmen, die stromabwärts gelegene Flanke und die 3'UTR wurden mittels folgender Oligonukleotide durch PCR amplifiziert: RL152/oRL1776, oRL1777/oRL155 und oRL156/oRL157. Das Plasmid wurde für die homologe Integration in den *cdc10*-Lokus verwendet.

### **pCdc11-GfpC -NatR** (pUMa 2111; (Zander *et al.*, 2016))

Plasmid für die Expression einer C-terminalen Gfp Fusion von Cdc11 (um03449) unter der Kontrolle des nativen Promotors. Es enthält eine 2284 bp lange stromaufwärts liegende Flanke, inklusive 1221 bp des offenen Leserahmens von *cdc11*, sowie eine 1399 bp lange stromabwärts gelegene Flanke für die homologe Rekombination im *cdc11* Lokus. Zwischen den Flanken wurde ein eGfp, 300 bp 3'UTR, gefolgt von einem Terminator T<sub>nos</sub> in Kombination mit einer Nourseothricin Resistenz eingefügt. Die stromaufwärts gelegene Flanke inklusive dem offenen Leserahmen, die stromabwärts gelegene Flanke und die 3'UTR wurden mittels folgender Oligonukleotide durch PCR amplifiziert: oRL170/oRL1252, oRL1255/oRL157, RL1253/RL1254. Das Plasmid wurde für die homologe Integration in den *cdc11*-Lokus verwendet.

### **pCdc11 $\Delta\alpha$ 0 -GfpN -NatR** (pUMa 2945)

Plasmid für die Expression einer C-terminalen Gfp Fusion von Cdc11 (um03449) welches eine Deletion der Aminosäuren 2-10 trägt und unter der Kontrolle des nativen Promotors exprimiert wird. Das Plasmid ist wie Cdc11-GfpC-NatR (pUMa 2111), jedoch wurden durch eine PCR mit den Oligonukleotiden oMB235/RL1252 die Aminosäuren 2-10 deletiert. Das Plasmid wurde für die homologe Integration in den *cdc11* Lokus verwendet.

### **pP<sub>oter</sub>Cdc11-B16-NatR** (pUMa2292; (Zander *et al.*, 2016))

Plasmid um die *cdc10* mRNA Lokalisation zu analysieren. Es enthält eine 2287 bp lange stromaufwärts liegende Flanke, inklusive 1224 bp des offenen Leserahmens von *cdc11*. Es folgen 181 bp der 3'UTR, gefolgt von 16 boxB Sequenzen mit einer Gesamtlänge von 514 bp. Der restliche Teil der 3'UTR 228 bp wird gefolgt von einem T<sub>nos</sub> Terminator in Kombination mit einer Nourseothricin Resistenz, sowie einer 1289 bp lange stromabwärts gelegene Flanke für die homologe Rekombination im *cdc11*-Lokus. Die stromaufwärts gelegene Flanke inklusive dem offenen Leserahmen, die stromabwärts gelegene Flanke und die 3'UTR wurden mittels folgender Oligonukleotide durch PCR amplifiziert: RL1783/oRL171, oRL170/oRL1780, und oRL1781/oRL1782 Das Plasmid wurde für die homologe Integration in den *cdc11*-Lokus verwendet.

**pCdc12-mCherryC -NatR** (pUMa 2145; (Zander *et al.*, 2016))

Plasmid für die Expression einer C-terminalen mCherry Fusion von Cdc12 (um 03599) unter der Kontrolle des nativen Promotors. Es enthält eine 2297 bp lange stromaufwärts liegende Flanke, inklusive 1221 bp des offenen Leserahmens von *cdc12*, sowie eine 1137 bp lange stromabwärts gelegene Flanke für die homologe Rekombination im *cdc12* Locus. Zwischen den Flanken wurde ein mCherry, 501 bp 3'UTR, gefolgt von einem Terminator T<sub>nos</sub> in Kombination mit einer Nourseothricin Resistenz eingefügt. Die stromaufwärts gelegene Flanke inklusive dem offenen Leserahmen, die stromabwärts gelegene Flanke und die 3'UTR wurden mittels folgender Oligonukleotide durch PCR amplifiziert: oRL36/oRL1366, oRL42/oRL43, RL1367/RL1368. Das Plasmid wurde für die homologe Integration in den *cdc12*-Lokus verwendet.

**pCdc12-GfpC -NatR** (pUMa 2600; (Zander *et al.*, 2016))

Plasmid für die Expression einer C-terminalen Gfp Fusion von Cdc12 (um 03599) unter der Kontrolle des nativen Promotors. Das Plasmid ist wie pCdc12-mCherryC -NatR (pUMa 2145) nur dass das mCherry gegen Gfp ausgetauscht wurde. Das Plasmid wurde für die homologe Integration in den *cdc12*-Lokus verwendet.

**pCdc12-mCherryC -HygR** (pUMa 2235)

Plasmid für die Expression einer C-terminalen mCherry Fusion von Cdc12 (um 03599) unter der Kontrolle des nativen Promotors. Das Plasmid ist wie pCdc12-mCherryC -NatR (pUMa 2145) nur dass die Nourseothricin Resistenzkassette gegen eine Hygromycin Resistenzkassette ausgetauscht wurde. Das Plasmid wurde für die homologe Integration in den *cdc12*-Lokus verwendet.

**pDon1Δ -HygR** (pUMa 2412)

Plasmid für die Herstellung einer Deletionsmutante des *don1*-Genes (um 10152). Es enthält eine 1274bp lange stromaufwärts des offenen Leserahmens von *don1* liegende Flanke, sowie eine 713 bp lange stromabwärts liegende Flanke. Das Konstrukt wurde mittels Golden Gate Klonierung hergestellt. Dabei wurde pUMa1507 für die Hygromycin-Resistenzkassette und pUMa 1467 als Zielvektor genutzt. Das Plasmid wurde für die homologe Integration in den *don1*-Lokus verwendet.

**pFab1Δ -HygR** (pUMa 2413)

Plasmid für die Herstellung einer Deletionsmutante des *fab1*-Genes (um10465). Es enthält eine 1035bp lange stromaufwärts des offenen Leserahmens von *fab1* liegende Flanke, sowie eine 732 bp lange stromabwärts liegende Flanke. Das Konstrukt wurde mittels Golden Gate Klonierung hergestellt. Dabei wurde pUMa1507 für die Hygromycin-Resistenzkassette und pUMa 1467 als Zielvektor genutzt. Das Plasmid wurde für die homologe Integration in den *fab1*-Lokus verwendet.

#### 4.1.5 Stämme

***E. coli* Stämme**

Für Standardklonierungen wurde der Stamm TOP10 (Invitrogen) verwendet, bei dem es sich um ein Derivat des *E.coli*-Stamms DH10B mit folgenden genetischen Markern handelt:



*F- mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80lacZΔM15 ΔlacX74 nupG recA1 araD139 Δ(ara-leu)7697 galE15 galK16 rpsL(StrR) endA1 λ-*

**U. maydis Stämme**

Die Stämme in Tabelle 4.5 lagen zu Beginn dieser Arbeit vor oder wurden gleichzeitig von Mitarbeitern in der Arbeitsgruppe hergestellt. Sie dienten als Ausgangs- und/oder Teststämmen. Die in Tabelle 4.6 aufgeführten Stämme wurden im Rahmen dieser Arbeit hergestellt. In allen hergestellten Stämmen wurden die homologen Rekombinationsereignisse durch eine Southern-Analyse bestätigt.

Tab 4.5: In dieser Arbeit verwendeten Ausgangs- und/oder Kontrollstämmen.

Stamm	relevanter Genotyp	UMa	Referenz
AB33	<i>a2,Pnar:bE1,Pnar:bW2</i>	133	(Brachmann <i>et al.</i> , 2001)
AB33cdc3Δ	<i>cdc3Δ</i>	442/724	(Baumann <i>et al.</i> , 2014)
AB33rrm4Δ	<i>rrm4Δ</i>	273	(Becht <i>et al.</i> , 2006)
AB33rrm4G	<i>rrm4G</i>	274	(Becht <i>et al.</i> , 2006)
AB33rrm4R / tub1G	<i>rrm4R, tub1G</i>	299	Becht, unveröffentlicht
AB33cts1Δ	<i>cts1Δ</i>	387	(Koepke <i>et al.</i> , 2011)
AB33 cdc3Gn / rrm4Δ	<i>cdc3Gn, rrm4Δ</i>	429	(Baumann <i>et al.</i> , 2014)
AB33cdc3Gc	<i>cdc3Gc</i>	441	(Baumann <i>et al.</i> , 2014)
AB33cdc3Gn	<i>cdc3Gn</i>	449	(Baumann <i>et al.</i> , 2014)
AB33cdc3Gn / rrm4C	<i>cdc3Gn, rrm4C</i>	722	(Baumann <i>et al.</i> , 2014)
AB33Pcrg-λN*G2-cbx	<i>Pcrg-λN*G2</i>	760	(Baumann <i>et al.</i> , 2014)
AB33rrm4R / tub1G / cdc3Δ	<i>rrm4R, tub1G, cdc3Δ</i>	770	(Zander <i>et al.</i> , 2016)
AB33cdc12Gn	<i>cdc12Gn</i>	775	(Baumann <i>et al.</i> , 2014)
AB33cdc12Δ	<i>cdc12Δ</i>	776	(Zander <i>et al.</i> , 2016)
AB33rrm4R / cdc10Gn	<i>rrm4R, cdc10Gn</i>	833	(Zander <i>et al.</i> , 2016)
AB33cdc10Δ	<i>cdc10Δ</i>	834	(Zander <i>et al.</i> , 2016)
AB33Pcrg-λN*G2 / cdc3-16boxB-3'UTR	<i>Pcrg-λN*G2, cdc3-16boxB-3'UTR</i>	848	(Baumann <i>et al.</i> , 2014)
AB33Pcrg-λN*G2 / cdc12-16boxB-3'UTR	<i>Pcrg-λN*G2, cdc12-16boxB-3'UTR</i>	849	(Zander <i>et al.</i> , 2016)
AB33Pcrg-λN*G2 / cdc3-16boxB-3'UTR / rrm4Δ	<i>Pcrg-λN*G2, cdc3-16boxB-3'UTR, rrm4Δ</i>	885	(Zander <i>et al.</i> , 2016)
AB33cdc3Gn / cdc10Δ	<i>cdc3Gn, cdc10Δ</i>	942	(Zander <i>et al.</i> , 2016)
AB33cdc3Gn / cdc11Δ	<i>cdc3Gn, cdc11Δ</i>	943	(Zander <i>et al.</i> , 2016)
AB33cdc3Gn / cdc12Δ	<i>cdc3Gn, cdc12 Δ</i>	944	(Baumann <i>et al.</i> , 2014)
AB33Pcrg-λN*G2 / cdc3-16boxB-3'UTR / cdc12Δ	<i>Pcrg-λN*G2, cdc3-16boxB-3'UTR, cdc12Δ</i>	984	(Zander <i>et al.</i> , 2016)
AB33Ptef-rab5aGc	<i>Ptef_rab5a-GfpC</i>	988	Pohlmann <i>et al.</i> , 2015

Tab 4.6: In dieser Arbeit hergestellte Stämme.

Stamm	relevanter Genotyp	UMa	integriertes Plasmid	Lokus	Ausgangstamm	Referenz
AB33cdc3Δ / cdc12Δ	<i>cdc3Δ, cdc12Δ</i>	1106	cdc12Δ-nat	<i>cdc12</i>	AB33cdc3Δ	diese Arbeit

<b>AB33cdc11Gn</b>	<i>cdc11Gn</i>	1152	Cdc11Gn-nat	<i>cdc11</i>	AB33	(Zander <i>et al.</i> , 2016)
<b>AB33cdc11Δ</b>	<i>cdc11Δ</i>	1263	cdc11Δ -hyg	<i>cdc11</i>	AB33	(Zander <i>et al.</i> , 2016)
<b>AB33cdc11Gc-w/o 3'UTR-Tnos</b>	<i>cdc11Gc w/o 3'UTR</i>	1318	cdc11Gc w/o 3'UTR-nat	<i>cdc11</i>	AB33	diese Arbeit
<b>AB33cdc12Cc</b>	<i>cdc12Cc</i>	1352	cdc12Cc-nat	<i>cdc12</i>	AB33	(Zander <i>et al.</i> , 2016)
<b>AB33cdc3Gc / cdc12Cc</b>	<i>cdc3Cn cdc12Cc</i>	1362	cdc12Cc-hyg	<i>cdc12</i>	AB33cdc3Gc	(Zander <i>et al.</i> , 2016)
<b>AB33Potef-cdc3Cn</b>	<i>otef-Cdc3Cn</i>	1365	otef-Cdc3Cn-hyg	<i>cdc3</i>	AB33	(Zander <i>et al.</i> , 2016)
<b>AB33cdc10Gc</b>	<i>cdc10Gc</i>	1368	cdc10Gc-nat	<i>cdc10</i>	AB33	(Zander <i>et al.</i> , 2016)
<b>AB33cdc12Gn_ote f-cdc3Cn</b>	<i>cdc12Gn, otef-cdc3Cn</i>	1398	otef-cdc3Cn-hyg	<i>cdc3</i>	AB33cdc12Gn	(Zander <i>et al.</i> , 2016)
<b>AB33cdc12Gn / cdc10Δ</b>	<i>cdc12Gn, cdc10Δ</i>	1399	cdc10Δ-hyg	<i>cdc10</i>	AB33cdc12Gn	Zander <i>et al.</i> , 2016
<b>AB33cdc11Gc / cdc10Δ</b>	<i>cdc11Gc, cdc10Δ</i>	1400	cdc11Δ-hyg	<i>cdc11</i>	AB33cdc12Gn	(Zander <i>et al.</i> , 2016)
<b>AB33 cdc12Gn / rrm4Δ</b>	<i>cdc12Gn, rrm4Δ</i>	1470	rrm4Δ-hyg	<i>rrm4</i>	AB33cdc12Gn	(Zander <i>et al.</i> , 2016)
<b>AB33 cdc12Gn / rrm4C</b>	<i>cdc12Gn, rrm4C</i>	1471	rrm4C-hyg	<i>rrm4</i>	AB33cdc12Gn	(Zander <i>et al.</i> , 2016)
<b>AB33 cdc12Gn/ cdc10Δ / rrm4Δ</b>	<i>cdc12Gn, cdc10Δ, rrm4Δ</i>	1477	rrm4Δ-gent	<i>rrm4</i>	AB33cdc12Gn / cdc10Δ	(Zander <i>et al.</i> , 2016)
<b>AB33cdc12Gn w/o 3'UTR-Tnos</b>	<i>cdc12Gn w/o 3'UTR</i>	1516	cdc12Gn w/o 3'UTR-Tnos	<i>cdc12</i>	AB33	diese Arbeit
<b>AB33cdc3Gn / don1Δ</b>	<i>cdc3Gn, don1Δ</i>	1523	don1Δ -hyg	<i>don1</i>	AB33cdc3Gn	diese Arbeit
<b>AB33cdc3Gn / fab1Δ</b>	<i>cdc3Gn, fab1Δ</i>	1524	fab1Δ -hyg	<i>fab1</i>	AB33cdc3Gn	diese Arbeit
<b>AB33cdc12Gn_ote f-cdc3Cn / rrm4Δ</b>	<i>cdc12Gn, otef-cdc3C, rrm4 Δ</i>	1558	rrm4Δ-gent	<i>rrm4</i>	AB33cdc12Gn _otef-cdc3Cn	(Zander <i>et al.</i> , 2016)
<b>AB33λN*G<sup>2</sup> / cdc10B<sup>16</sup></b>	<i>λN*G<sup>2</sup> cdc10B<sup>16</sup></i>	1617	cdc10B <sup>16</sup> -NatR	<i>cdc10</i>	AB33	(Zander <i>et al.</i> , 2016)
<b>AB33λN*G<sup>2</sup> / cdc11B<sup>16</sup></b>	<i>λN*G<sup>2</sup> cdc11B<sup>16</sup></i>	1618	cdc11B <sup>16</sup> -NatR	<i>cdc11</i>	AB33	(Zander <i>et al.</i> , 2016)
<b>AB33cdc12Gc</b>	<i>cdc12Gc</i>	1637	Cdc12Gc-nat	<i>cdc12</i>	AB33	(Zander <i>et al.</i> , 2016)
<b>AB33cdc12Gn / cdc3Δ</b>	<i>cdc12Gn, cdc3Δ</i>	1638	cdc3Δ-hyg	<i>cdc3</i>	AB33cdc12Gn	(Zander <i>et al.</i> , 2016)
<b>AB33cdc12Gn / cdc11Δ</b>	<i>cdc12Gn, cdc11Δ</i>	1639	cdc11Δ-hyg	<i>cdc11</i>	AB33cdc12Gn	(Zander <i>et al.</i> , 2016)
<b>AB33cdc11Gc</b>	<i>cdc11Gc</i>	1659	cdc11Gc w/o 3'UTR-nat	<i>cdc11</i>	AB33	(Zander <i>et al.</i> , 2016)
<b>AB33Pcrg-λN*G<sup>2</sup> / cdc12-16boxB-3'UTR / rrm4Δ</b>	<i>Pcrg-λN*G<sup>2</sup>, cdc12-16boxB-3'UTR, rrm4Δ</i>	1693	rrm4Δ-gent	<i>rrm4</i>	AB33Pcrg-λN*G <sup>2</sup> / cdc12-16boxB-3'UTR	(Zander <i>et al.</i> , 2016)

<b>AB33cdc11Gc / cdc3Δ</b>	<i>cdc11Gc, cdc3Δ</i>	1717	cdc3Δ-hyg	<i>cdc3</i>	AB33cdc11Gc	(Zander <i>et al.</i> , 2016)
<b>AB33cdc11Gc / cdc10Δ</b>	<i>cdc11Gc, cdc3Δ</i>	1718	cdc10Δ-hyg	<i>cdc10</i>	AB33cdc11Gc	(Zander <i>et al.</i> , 2016)
<b>AB33cdc10Gc / cdc3Δ</b>	<i>cdc10Gc, cdc3Δ</i>	1719	cdc3Δ-hyg	<i>cdc3</i>	AB33cdc10Gc	(Zander <i>et al.</i> , 2016)
<b>AB33cdc10Gc / cdc11Δ</b>	<i>cdc10Gc, cdc11Δ</i>	1720	cdc3Δ-hyg	<i>cdc11</i>	AB33cdc10Gc	(Zander <i>et al.</i> , 2016)
<b>AB33cdc10Gc / cdc12Δ</b>	<i>cdc10Gc, cdc12Δ</i>	1721	cdc12Δ-hyg	<i>cdc3</i>	AB33cdc10Gc	(Zander <i>et al.</i> , 2016)
<b>AB33cdc3Δ / cdc12Δ / cdc10 Δ</b>	<i>cdc3Δ, cdc12Δ, cdc10 Δ</i>	1722	cdc10Δ-gent	<i>cdc10</i>	AB33cdc3Δ / cdc12Δ	diese Arbeit
<b>AB33otef-Lifeact-emGfp</b>	<i>otef-Lifeact-emGfp</i>	1818	otef-Lifeact-emGfp-cbx	<i>ip<sup>s</sup></i>	AB33	diese Arbeit
<b>AB33otef-Lifeact-mCherry</b>	<i>otef-Lifeact-mCherry</i>	1821	otef-Lifeact-mCherry-cbx	<i>ip<sup>s</sup></i>	AB33	diese Arbeit
<b>AB33cdc3Gn / otef-Lifeact-mCherry</b>	<i>cdc3Gn, otef-Lifeact-mCherry,</i>	1822	otef-Lifeact-mCherry-cbx	<i>ip<sup>s</sup></i>	AB33cdc3Gn	diese Arbeit
<b>AB33otef-Lifeact-emGfp / cdc3Δ</b>	<i>otef-Lifeact-emGfp, cdc3Δ</i>	1865	cdc3Δ-hyg	<i>cdc3</i>	AB33otef-Lifeact-emGfp	diese Arbeit
<b>AB33otef-Lifeact-emGfp / cdc10Δ</b>	<i>otef-Lifeact-emGfp, cdc10Δ</i>	1866	cdc10Δ-hyg	<i>cdc10</i>	AB33otef-Lifeact-emGfp	diese Arbeit
<b>AB33otef-Lifeact-emGfp / otef-cdc3Cn</b>	<i>otef-Lifeact-emGfp, otef-cdc3Cn</i>	1867	otef-Cdc3Cn-hyg	<i>cdc3</i>	AB33otef-Lifeact-emGfp	diese Arbeit
<b>AB33rrm4Gc / cdc10 Δ</b>	<i>rrm4G, cdc10Δ</i>	1922	cdc10Δ-hyg	<i>cdc10</i>	AB33rrm4Gc	(Zander <i>et al.</i> , 2016)
<b>AB33rrm4Gc / cdc11 Δ</b>	<i>rrm4G, cdc11Δ</i>	1923	cdc11Δ-hyg	<i>cdc11</i>	AB33rrm4Gc	(Zander <i>et al.</i> , 2016)
<b>AB33rrm4Gc / cdc12 Δ</b>	<i>rrm4G, cdc12Δ</i>	1924	cdc12Δ-hyg	<i>cdc12</i>	AB33rrm4Gc	(Zander <i>et al.</i> , 2016)
<b>AB33Pcrg-λN*G2 / cdc10-16boxB-3'UTR / rrm4Δ</b>	<i>Pcrg-λN*G2, cdc10-16boxB-3'UTR, rrm4Δ</i>	1925	rrm4Δ-gent	<i>rrm4</i>	AB33Pcrg-λN*G2 / cdc10-16boxB-3'UTR	(Zander <i>et al.</i> , 2016)
<b>AB33Pcrg-λN*G2 / cdc11-16boxB-3'UTR / rrm4Δ</b>	<i>Pcrg-λN*G2, cdc11-16boxB-3'UTR, rrm4Δ</i>	1926	rrm4Δ-gent	<i>rrm4</i>	AB33Pcrg-λN*G2/cdc11-16boxB-3'UTR	(Zander <i>et al.</i> , 2016)
<b>AB33cdc3α0ΔGn</b>	<i>cdc3α0ΔGn</i>	1933	cdc3α0ΔGn-nat	<i>cdc3</i>	AB33cdc3Δ	(Zander <i>et al.</i> , 2016)
<b>AB33cdc10α0ΔGn</b>	<i>cdc10α0ΔGn</i>	1934	cdc10α0ΔGn-nat	<i>cdc10</i>	AB33cdc10Δ	(Zander <i>et al.</i> , 2016)
<b>AB33cdc11α0ΔGc</b>	<i>cdc11α0ΔGc</i>	1935	cdc11α0ΔGc-nat	<i>cdc11</i>	AB33cdc11Δ	diese Arbeit
<b>AB33cdc12Gn / cdc3α0Δ</b>	<i>cdc12Gn, cdc3α0Δ</i>	1936	cdc3α0Δ-gent	<i>cdc3</i>	AB33cdc12Gn / cdc3Δ	(Zander <i>et al.</i> , 2016)
<b>AB33cdc3 (H135A)Gn</b>	<i>cdc3(H135A)Gn</i>	1939	cdc3(H135A)Gn-nat	<i>cdc3</i>	AB33cdc3Δ	diese Arbeit

<b>AB33cdc12Gn / cdc10<math>\alpha</math>0<math>\Delta</math></b>	<i>cdc12Gn, cdc10<math>\alpha</math>0<math>\Delta</math></i>	1978	cdc10 $\alpha$ 0 $\Delta$ -gent	<i>cdc10</i>	AB33cdc12Gn / cdc10 $\Delta$	(Zander <i>et al.</i> , 2016)
<b>AB33cdc10Gc / Potef-cdc3Cn</b>	<i>cdc10Gc, otfe-cdc3Cn</i>	1941	otef-Cdc3Cn-hyg	<i>cdc3</i>	AB33cdc10Gc	(Zander <i>et al.</i> , 2016)

## 4.2 Mikrobiologische, zellbiologische und genetische Methoden

### 4.2.1 Arbeiten mit *E. coli*

#### Kultivierung von *E. coli*

Zur Kultivierung von *E. coli* wurde YT-Flüssigmedium und dYT-Festmedium verwendet (Sambrook *et al.*, 1989). Als Antibiotikum wurde Ampicillin mit einer Konzentration von 100  $\mu\text{g} / \text{ml}$  eingesetzt. Die Stämme wurden in Flüssigmedium bei 100 Upm in Schikanekolben oder in Reagenzgläsern auf dem Drehrad inkubiert. Die Inkubation erfolgte unter aeroben Bedingungen über Nacht bei 37 °C.

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

Die Zelldichte von Flüssigkulturen wurde photometrisch mit einem Novospec II Photometer (Pharmacia Biotech) bei einer Wellenlänge von 600 nm bestimmt. Um eine lineare Abhängigkeit sicherzustellen wurden die Kulturen so verdünnt, dass der gemessene Wert der OD<sub>600</sub> zwischen 0,2 und 0,5 lag. Als Blindwert wurde die OD<sub>600</sub> des YT-Mediums gemessen. Eine OD<sub>600</sub> von 1,0 entspricht ungefähr 10<sup>9</sup> Zellen / ml.

#### Herstellung kompetenter Zellen nach der RbCl-Methode

Das Protokoll für die Herstellung kompetenter Zellen ist nach Cohen *et al.* (1972) modifiziert (Cohen *et al.*, 1972). Zur Herstellung wurde 100 ml dYT-Medium (mit 10 mM MgCl<sub>2</sub> und 10 mM MgSO<sub>4</sub>) mit 1 ml einer Übernachtskultur des Stammes TOP10 angeimpft und bei 37 °C und 200 Upm inkubiert, bis eine OD<sub>600</sub> von ~0,5 erreicht worden ist. Die Zellen wurden durch Zentrifugation bei 1250g für 15 Minuten bei 4°C pelletiert. Das Zellpellet wurde anschließend in 33 ml eiskalter RF1-Lösung resuspendiert und 30-60 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen durch erneute Zentrifugation bei 1250g für 15 Minuten bei 4°C pelletiert. Das Zellpellet wurde in 5 ml eiskalter RF2-Lösung resuspendiert und für 15 min auf Eis inkubiert. Die Zellsuspension wurde zu je 50  $\mu\text{l}$  in 1,5 ml-Reaktionsgefäßen aliquotiert, in flüssigem Stickstoff gefroren und bei -80 °C gelagert.

#### RF1-Lösung

100 mM RbCl  
 50 mM MnCl<sub>2</sub> x 4 H<sub>2</sub>O  
 30 mM KAc  
 10 mM CaCl<sub>2</sub> x 2 H<sub>2</sub>O  
 15% (v/v) Glycerin in H<sub>2</sub>O<sub>bid</sub>.  
 Mit Essigsäure auf pH 5,8 einstellen.  
 und steril filtrieren.

#### RF2-Lösung

10 mM MOPS  
 10mM RbCl  
 75 mM CaCl<sub>2</sub> x 2 H<sub>2</sub>O  
 15% (v/v) Glycerin in H<sub>2</sub>O<sub>bid</sub>  
 Mit NaOH auf pH 5,8 einstellen und  
 steril filtrieren.

### Transformation von Plasmid-DNA

Für eine Transformation wurden 50 µl chemisch (RbCl)-kompetente Zellen von *E. coli* auf Eis aufgetaut (~10 min), mit 1-10 µl Plasmidlösung (~1-5 ng DNA) bzw. einem Ligationsansatz (10µl) versetzt und 30 min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock von 45 s bei 42 °C wurde die Zellsuspension mit 250 µl dYT-Medium versetzt und 30 min schüttelnd bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde der Transformationsansatz auf YT-Festmedium (+Antibiotikum) ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

### 4.2.2 Arbeiten mit *Ustilago maydis*

#### Kultivierung von *U. maydis*

*U. maydis* Stämme wurden im Schikanekolben bei 200 Upm oder auf Festmedien unter aeroben Bedingungen bei 28 °C kultiviert. Kulturen auf Festmedien wurden bis zu einem Monat bei 4 °C gelagert. Von diesen wurden Vorkulturen in einem Reagenzglas in 3 ml CM-Medium angeimpft und über Nacht auf einem Drehrad bei 28 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurde eine Hauptkultur in 30 ml CM-Medium mit der Vorkultur (meist 1:2000) im Schikanekolben angeimpft und über Nacht bei 200 Upm bei 28°C kultiviert. Eine Ausnahme stellen alle Septin Deletionsstämme da. Diese wurden immer bei Raumtemperatur inkubiert um morphologische Defekte auszuschließen (Alvarez-Tabares und Perez-Martin, 2010).

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

Die Zelldichte von Flüssigkulturen wurde photometrisch mit einem Novospec II Photometer (Pharmacia Biotech) bei einer Wellenlänge von 600 nm bestimmt. Um eine lineare Abhängigkeit sicherzustellen, wurden die Kulturen so verdünnt, dass der gemessene Wert der OD<sub>600</sub> zwischen 0,2 und 0,5 lag. Als Blindwert wurde die OD<sub>600</sub> des CM-Mediums gemessen. Eine OD<sub>600</sub> von 1,0 entspricht ungefähr  $1-5 \times 10^7$  Zellen/ml.

#### Transformation von *U. maydis*

Dieses Protokoll ist modifiziert nach (Schulz *et al.* 1990) und (Gillissen *et al.*, 1992). Von einem *U. maydis* Stamm wurde eine Vorkultur in 3 ml CM angeimpft und über Nacht bei 28°C inkubiert. Von dieser Vorkultur wurde am nächsten Tag eine Hauptkultur in 50 ml CM angeimpft und über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Kultur bei einer OD<sub>600</sub> von 0,6-1,0 durch Zentrifugation bei 2500xg für 6 min pelletiert und der Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde in 20 ml SCS resuspendiert und erneut durch Zentrifugation bei 2500xg für 6 min pelletiert und der Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde in 5 ml SCS resuspendiert und es wurden 4ml SCS mit 12,5 mg/ml Novozym 234 (steril filtriert) hinzugegeben. Die Protoplastierung erfolgte bei Raumtemperatur und konnte mikroskopisch verfolgt werden, da die Zellen nach Lyse der Zellwand eine kugelige Form annehmen. Nachdem etwa 1/3 der Zellen protoplastiert waren (3-8 min), wurden 30 ml eiskaltes SCS hinzugegeben und die Zellen durch Zentrifugation bei 1100xg für 8 min bei 4 °C pelletiert. Das Zellpellet wurde anschließend zweimal mit 10 ml eiskaltem SCS

gewaschen (1100xg, 8 min, 4 °C). Anschließend wurde das Zellpellet in 10 ml eiskaltem STC resuspendiert und durch Zentrifugation (1100xg, 8 min, 4 °C) pelletiert. Das so entstandene Zellpellet wurde in 2,5 ml eiskaltem STC resuspendiert und zu je 110 µl in vorgekühlte 2 ml-Reaktionsgefäße aliquotiert. Die so behandelten Protoplasten konnten einige Stunden auf Eis gelagert werden oder bei -80°C für mehrere Jahre aufbewahrt werden.

Zur integrativen Transformation wurden 110 µl Protoplasten mit 2-4 µg Plasmid-DNA und 1 µl Heparinlösung für 10 min auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 500 µl STC/PEG erfolgte eine weitere Inkubation von 15 min auf Eis. Anschließend wurde der Transformationsansatz auf zwei (kurz zuvor mit Top-Agar überschichteten) Regenerationsagarplatten ausgestrichen. Nach 4 bis 7 Tagen Inkubation bei 28 °C wurden die gewachsenen Kolonien auf antibiotikahaltigen CM-Platten vereinzelt.

**SCS**

20 mM Na-Citrat pH 5,8  
1 M Sorbitol in H<sub>2</sub>O<sub>bid.</sub> steril filtriert

**STC**

10 mM Tris-HCl, pH 7,5  
100 mM CaCl<sub>2</sub>  
1 M Sorbitol in H<sub>2</sub>O<sub>bid.</sub> steril filtriert

**STC/PEG**

15 ml STC  
10 g PEG 4000

**Heparin-Lösung**

15 mg/ml Heparin in H<sub>2</sub>O<sub>bid.</sub>, steril filtriert

**Induktion des filamentösen Wachstums von AB33**

Der Stamm AB33 trägt die kompatiblen Allele bW2 und bE1 unter der Kontrolle des Stickstoff-regulierten Promotors P<sub>nar</sub>. Um die Expression zu induzieren wurden die Zellen von einem NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>-haltigen Medium (CM) in ein KNO<sub>3</sub>-haltiges Medium (NM) überführt. Die OD<sub>600</sub> einer Hauptkultur wurde gemessen und die entsprechende Menge Zellen für eine OD<sub>600</sub> von 0,5 wurde durch Zentrifugation bei 5000 Upm für 3 min pelletiert. Die Zellen wurden anschließend in 20 ml NM resuspendiert und erneut bei 5000 Upm für 3 min zentrifugiert. Das Pellet wurde erneut in 20 ml NM Medium resuspendiert und in einen Schikanekolben überführt. Die Kultur wurde für 4-10 h bei 28°C und 200 Upm inkubiert. Eine Ausnahme stellt hier der Test unter erschwerten Bedingungen für die Charakterisierung der Funktionalität der Septin-Fusionsstämme dar. Für diesen Test wurden die Induktion des filamentösen Wachstums bei einer OD<sub>600</sub> von 0,2 durchgeführt.

**Fluorimetrische Messung der endochitinolytischen Aktivität**

Dieses Protokoll ist modifiziert nach Koepke *et al.*, 2011. Die enzymatische Aktivität der Endochitinasen von *U. maydis* wurde mit Hilfe des spezifischen Substrats 4-Methylumbelliferyl β-D-N,N',N''-triacetylchitotriosid (Sigma-Aldrich, Taufkirchen) ermittelt. *U. maydis* Zellen wurden ca. 16 h in 30 ml CM + 1% Glucose bei 20 °C inkubiert, auf eine OD<sub>600</sub> von 0,5 eingestellt und dieses nach Einstellung erneut überprüft. Zur Messung von Hefezellen wurden diese einmal mit KHM Puffer gewaschen. Zur Messung von Hyphen wurde das filamentöse Wachstum durch einen Mediumswechsel zu NM + 1% Glucose induziert und die Zellen wurden für weitere 8 Stunden bei 28°C und 200 Upm inkubiert. 30 µl der Kultur wurden mit 70 µl 0,25 µM 4-Methylumbelliferyl β-D-N,N',N''-triacetylchitotriosid in einer 96 Well Platte gemischt. Die enzymatische Aktivität wurde

bestimmt in dem die Fluoreszenz des Produktes mit einem Fluoreszenzspektrometer Infinite M200 (Tecan Group Ltd., Männedorf, Schweiz) mit folgenden Einstellungen gemessen wurde: Anregungswellenlänge 360 nm, Emissionswellenlänge 450 nm, kinetische Messung über 1 h mit einer Intervallzeit von 2 min. Zur Analyse wurde die Steigung der Kinetik berechnet und der AB33 Wildtyp wurde auf eine relative Chitinaseaktivität von 1 gesetzt. Es wurden mindestens drei unabhängige Experimente mit jeweils drei biologischen Replikaten durchgeführt.

### **KHM-Puffer (zur Verdünnung der Substrat-Stammlösung)**

20mM HEPES, pH 7,3

110 mM KAc

2 mM MgCl<sub>2</sub> In H<sub>2</sub>O<sub>bid.</sub>, autoklaviert

## **4.3 Molekularbiologische Methoden**

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

### **4.3.1 Isolierung von Nukleinsäuren**

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

Die Isolierung von Plasmid-DNA erfolgte nach der Methode der „Lyse durch Kochen“ (modifiziert nach (Sambrook *et al.*, 1989)). Es wurden 1,5 ml einer Übernachtskultur von *E. coli* durch Zentrifugation bei 8.000 Upm für 2 min pelletiert. Das Zellpellet wurde nach Zugabe von 200 µl STET und 20 µl Lysozym-Lösung durch vortexen resuspendiert und danach für 1 min bei 95 °C in einem Eppendorf-Heizblock inkubiert. Die lysierten Zellreste und die denaturierte genomische DNA wurden 15 min bei 13.000 Upm zentrifugiert und anschließend mit einem Zahnstocher aus der wässrigen Lösung entfernt. Die Fällung der Plasmid-DNA erfolgt durch eine Zugabe von 20 µl 3 M Na-Acetat (pH 5,3) sowie 500 µl Isopropanol, einer Durchmischung durch Invertieren und einer Zentrifugation bei 13.000 Upm für 10 min. Das Pellet wird durch Zugabe von 200 µl 70% Ethanol gewaschen und anschließend 10 min bei 50 °C getrocknet. Das Pellet wird in 100 µl TE / RNase A aufgenommen und gelagert.

#### **STET**

50 mM Tris-HCl, pH 8,0

50 mM Na<sub>2</sub>-EDTA

8% (w/v) Saccharose

5% (w/v) Triton x-100 in H<sub>2</sub>O<sub>bid.</sub>

#### **Lysozym-Lösung**

10 mg/ml Lysozym

10 mM Tris-HCl, pH 8,0 In H<sub>2</sub>O<sub>bid.</sub>

#### **TE / RNase A**

10 mM Tris-HCl, pH 7,9

1 mM Na<sub>2</sub>-EDTA

20 µg/ml RNase A in H<sub>2</sub>O<sub>bid</sub>

#### **Präparation von genomischer DNA aus *U. maydis***

Diese Methode ist modifiziert nach (Hoffman und Winston, 1987). Eine Vorkultur von 3 ml CM-Medium wird mit einem Stamm angeimpft und über 2 Tage bei RT auf einem Drehrad inkubiert. 2 ml der dicht gewachsenen Kultur wird in ein 2 ml- Reaktionsgefäß überführt und für 3 min bei 8000 Upm pelettiert. Der Überstand wird abgenommen und zu dem

Zellpellet werden ca. 0,3 g Glasperlen gegeben. In das Gefäß wird nun 500 µl TE-Phenol/Chloroform und 500 µl Ustilago-Lysispuffer hinzugegeben. Die Suspension wird für 6-10 min auf einem Vibrax-Schüttler geschüttelt und anschließend bei 13.000 Upm für 15 min abzentrifugiert. Durch die Zentrifugation entsteht eine Phasentrennung in eine untere (organische) und obere (wässrige) Phase erreicht. Proteine und Zelltrümmer sammeln sich im Bereich des Phasenübergangs, während die DNA in der wässrigen Phase gelöst vorliegt. Es werden 400 µl dieser wässrigen Phase abgenommen und in ein neues mit 1 ml Ethanol (100 %) vorbereitetes 1,5 ml- Reaktionsgefäß überführt. Durch mehrmaliges invertieren fällt die DNA sichtbar aus und wird durch Zentrifugation bei 13.000 Upm für 5 min pelletiert. Der Überstand wird komplett abgenommen und das Pellet wird in 50 µl TE / RNase A bei 50 °C durch Schütteln resuspendiert und kann bei -20 °C gelagert werden.

**Ustilago-Lysispuffer**

10 mM Tris-HCl, pH 8  
 100 mM NaCl  
 1% (w/v) SDS  
 2% (w/v) Triton X-100  
 5mM EDTA In H<sub>2</sub>O<sub>bid.</sub>

**TE-Phenol/Chloroform**

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

**4.3.2 Arbeiten mit Nukleinsäuren**

**Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren**

Die Konzentration von Nukleinsäuren in Lösungen wurde photometrisch mit einem NanoDrop ND-2000c Spectrophotometer (Thermo Scientific) bestimmt. Die Konzentration der Nukleinsäure wurde anhand der Absorption bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt. Die Reinheit der Nukleinsäurelösung konnte aus dem Quotient der OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> ermittelt werden.

**Restriktionsendonukleolytische Reaktionen**

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

**Analytische Reaktion**

0,5-2 µl Plasmid-DNA  
 2 µl NEB-Puffer 10x  
 0,5-1 U Restriktionsenzym  
 ad 20 µl mit H<sub>2</sub>O<sub>bid.</sub>

**Präparative Reaktion**

5-20 µl Plasmid DNA  
 5 µl NEB-Puffer 10x  
 1-2 U Restriktionsenzym  
 ad 50 µl mit H<sub>2</sub>O<sub>bid.</sub>

**Reaktion für Transformationsfragmente**

40 µl Plasmid-DNA (500 ng/µl)  
 10 µl NEB-Puffer 10x  
 3-6 U Restriktionsenzym  
 ad 100 µl mit H<sub>2</sub>O<sub>bid.</sub>

**Reaktion für Southern-Analyse**

20 µl genomische DNA  
 3 µl NEB-Puffer 10x  
 1-2 U Restriktionsenzym  
 ad 30 µl mit H<sub>2</sub>O<sub>bid.</sub>



### Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten

Um eine Religation von Plasmiden zu verhindern kann eine Dephosphorylierung von Plasmid DNA durchgeführt werden. Dabei wird die 5'-terminale Phosphatgruppen mit Hilfe von Alkalischer Phosphatase abgespalten und so die Religation verhindert. Ein typischer Reaktionsansatz enthielt:

50µl	min. 2 h inkubierter präparativer Restriktionsansatz (siehe oben)
3µl	Alkalische Phosphatase
7µl	Alkalische Phosphatase-Puffer (1x)
20µl	H <sub>2</sub> O

Der Ansatz wurde 2 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde der gesamte Ansatz auf ein Agarosegel aufgetragen und die benötigte Bande ausgeschnitten.

### Golden Gate-Klonierung

Bei der Gateway-Klonierung handelt es sich um eine Klonierungsmethode bei der Restriktion und Ligation auf Grund besonderer Eigenschaften des verwendeten Restriktionsenzym (hier *BsaI* oder *SapI*, New England Biolabs) vereint werden können. Die Erkennungssequenz und die Schnittstelle der verwendeten Restriktionsenzyme liegen räumlich voneinander getrennt vor, sodass die Erkennungssequenz während der Reaktion entfernt wird und variable Enden entstehen. Dies ermöglicht eine Klonierungsreaktion, bei welcher verschiedene Fragmente, sog. Aufbewahrungs-Plasmide und Ziel-Plasmide kombiniert werden können um, ohne vorherige Restriktion, gezielt ein spezifisches Ligationsprodukt zu erzeugen welches die gewünschten Fragmente in der gewünschten Orientierung vereint. Ein typischer Klonierungsansatz war wie folgt zusammengesetzt:

75 ng	Aufbewahrungs-Plasmid
75 ng	Ziel-Plasmid
40 ng	Flanken (PCR-generiert und aufgereinigt)
0,75 µl	T4 DNA-Ligase
0,5 µl	<i>BsaI</i> -HF/ <i>SapI</i> -HF (NEB)
Auf 15 µl mit H <sub>2</sub> O <sub>bid.</sub> auffüllen	

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

PCR-Programm: <Main>; <GOGATE>

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

### Auftrennung von Nukleinsäuren mittels Gelelektrophorese

DNA-Fragmente wurden mit Hilfe einer Agarose-Gelelektrophorese der Größe entsprechend aufgetrennt. Dazu wurde ein TAE-Puffersystem verwendet. Die Agarosekonzentration der Gele lag je nach Größe der Nukleinsäurefragmente bei 0,8% bis 2%. Die entsprechende Menge Agarose wurde in einem 1xTAE-Puffer aufgekocht, auf eine Temperatur von 55 °C bis 60 °C abgekühlt und schließlich wurde dem flüssigen Gel Ethidiumbromidlösung (1 µg/ml Endkonzentration) hinzugegeben. Das Gel wurde in einen präparierten Gelschlitten gegossen, die Taschen mit einem Kamm abgesteckt und nach frühestens 30 Minuten verwendet. Das Gel wurde hierfür in eine Laufkammer gefüllt mit 1x TAE-Puffer gelegt und die Nukleinsäure vermisch mit DNA-Auftragspuffer in die entstandenen Taschen gefüllt. Dauer und Stromspannung der Gelelektrophorese wurde je nach Probe eingestellt. Der Verlauf der Elektrophorese konnte anhand der Lauffront des Auftragspuffers nachverfolgt werden.

#### TAE (50x)

2 M Tris-Acetat  
100 mM Na<sub>2</sub>-EDTA in H<sub>2</sub>O<sub>bid.</sub>

#### DNA-Auftragspuffer

30% (v/v) Glycerin  
0,4% (w/v) Bromphenolblau in H<sub>2</sub>O<sub>bid.</sub>

### Präparation von Gelfragmenten aus Agarosegelen

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

### Ligation von Nukleinsäurefragmenten

Nukleinsäurefragmente wurden mit Hilfe einer T4 DNA-Ligase (Roche) oder einer Quick Ligase (NEB) ligiert. Bei einer Ligation von zwei Fragmenten wurde darauf geachtet, dass das Verhältnis zwischen dem Vektorrückgrad und dem Insert bei 1:3 lag. Bei einer Ligation von mehreren Fragmenten wurden diese in einem Verhältnis von 1:1 eingesetzt. Die Ligation erfolgte mit der T4-Ligase über Nacht bei 16 °C oder mit der Quick Ligase für 15 Minuten bei RT.

#### Ligationsansatz

x µl Fragmente  
2 µl T4 Ligase-Puffer (10x)  
1 µl T4 DNA-Ligase  
ad 20 µl mit H<sub>2</sub>O<sub>bid.</sub>

x µl Fragmente  
10 µl Quick Ligase-Puffer (2x)  
1 µl Quick-Ligase  
ad 20 µl mit H<sub>2</sub>O<sub>bid.</sub>

### 4.3.3 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase Kettenreaktion (PCR) wurde modifiziert nach (Innis *et al.*, 1990) durchgeführt. Zur Generierung von Fragmenten für Klonierungen wurde die Phusion Polymerase von NEB eingesetzt. Für verschiedene Kontroll-PCRs die im Anschluss nicht weiterverwendet wurden, wurde eine selbst hergestellte Phusion Polymerase benutzt.

Diese ist nicht so effizient wie die kommerziell erworbene Polymerase und benötigt eine etwas verlängerte Elongationszeit.

Ein typischer Ansatz:

10-100 ng	Matrizen-DNA
1,5 µl	DMSO
0,5 µl	25 mM dNTPs
Je 0,5 µl	100 µM Oligonukleotid
0,5 µl	Phusion-Polymerase
5 µl	Phusion-HF Puffer (10x)
ad 50 µl	H <sub>2</sub> O

Das standardmäßig angewendete Programm war:

Initiale Denaturierung	98 °C	/ 30 sec
Amplifikation (30-34 Zyklen):		
Denaturierung	98°C	/ 10 sec
Hybridisierung	55 – 65 °C	/ 20 sec
Elongation	72 °C	/ 30 sec pro 1 kb für die NEB Phusion Polymerase, 45-60 sec pro 1 kb für die selbsthergestellte Phusion Polymerase
Endelongation	72 °C	/ 8 min

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

### 4.3.4 Auftrennung und Nachweis von Nukleinsäuren

#### Transfer von DNA (Southern-Blot)

Diese Methode ist modifiziert nach (Southern, 1975). Die in einer Restriktionsendonukleolyse geschnittene genomische DNA wird in einem TAE-Agarosegel aufgetrennt. Anschließend wird das Agarosegel je 20 min in 0,25 M HCl, DENAT- und RENAT-Lösung inkubiert um durch die Auftrennung der Stränge einen besseren Transfer zu erreichen. Der Transfer der DNA-Fragmente auf eine Nylonmembran erfolgte durch einen Kapillar-Blot. Der Blot wird folgendermaßen aufgebaut: Ein Behältnis wird mit Transferlösung (20xSSC) befüllt. Eine Glasplatte wird auf den Behälter gelegt und ein Streifen Whatman-Papier als Salzbrücke, wird so über die Glasscheibe gelegt, dass beide Enden in die Pufferlösung ragen. Das Gel wird mit den Taschen nach unten zeigend auf die Salzbrücke platziert auf das eine Nylonmembran (Hybond-N+, GE Healthcare Life Sciences) und zwei gleich große Whatman-Papiere gelegt werden. Ein großer Stapel Papierhandtücher mit einem Gewicht gewährleisten einen Transfer des SSCs über die Salzbrücke, das Gel, und die Membran. Die DNA-Fragmente werden durch den Pufferstrom aus dem Gel eluiert und binden an die darüber liegende Nylonmembran. Der Kapillar-Blot erfolgte mindestens für 4 Stunden oder ü/N. Nach dem Transfer der Nukleinsäuren wurde die DNA auf der Membran durch UV-Bestrahlung (120 mJ/cm<sup>2</sup>) in einer UV-Kammer (BLX-254; Vilber Lourmat) fixiert.

**20x SSC**

3 M NaCl  
300 mM Na-Citrat x 2 H<sub>2</sub>O in H<sub>2</sub>O<sub>bid.</sub>  
Mit HCl auf pH 7,0 einstellen

**DENAT-Lösung**

1,5 M NaCl  
400 mM NaOH in H<sub>2</sub>O<sub>bid.</sub>

**RENAT-Lösung**

1,5 M NaCl  
282 mM Tris-HCl  
218 mM Tris in H<sub>2</sub>O<sub>bid.</sub>

**Der spezifische Nachweis immobilisierter Nukleinsäure (Southern-Analyse)**

Für den Nachweis der gewünschten Fragmente wurden genspezifische Sonden verwendet. Diese wurden durch den Einbau von Digoxigenin-11-dUTP (DIG-dUTP) während einer PCR markiert. Ein PCR-Ansatz enthielt 5-25 ng linearisierte Plasmid-DNA, 5 µl PCR-Puffer (10x), 5 µl PCR-DIG-Labeling-Mix (DIG-Labeling Kit, Roche), 1,5µl DMSO, jeweils 20 pmol der beiden Oligonukleotide, 0,5 µl Phusion-DNA-Polymerase und wurde mit H<sub>2</sub>O<sub>bid.</sub> auf 50 µl aufgefüllt. Die Reaktion erfolgte in einem Thermocycler PTC200 (MJ Research) analog einer normalen PCR (siehe 4.3.3). Die Hybond-N+-Membran wurde mit Southern-Hybridisierungspuffer für mindestens 30 min bei 65 °C in einer Hybridisierungsröhre prä-inkubiert. Die DIG-markierte Sonde wurde in 15- 20 ml Southern-Hybridisierungspuffer gelöst und für 10 min bei 99 °C in einem Heizblock denaturiert und nach dem Entfernen des Prä-inkubationspuffers zu der Membran gegeben. Die Hybridisierung der Sonde erfolgte bei 65 °C meist über Nacht, mindestens 4 Stunden. Anschließend wurde die Membran für jeweils 15 min bei 65 °C mit Southern-Waschpuffer I, Southern-Waschpuffer II und Southern-Waschpuffer III gewaschen. Die nachfolgenden Waschschrte wurden bei Raumtemperatur ausgeführt. Nach 5 min Inkubation mit DIG-Waschpuffer wurde die Membran 30 min mit DIG2-Puffer blockiert. Anschließend wurde eine DIG2-Antikörperlösung (Anti-Digoxigenin-AB Fab-Fragmente, Roche 1:10.000 in DIG2-Puffer) hinzugegeben und für 30 bis 60 min inkubiert. Anschließend wurde die Membran zweimal 15 min mit DIG-Waschpuffer gewaschen und 5 min mit DIG3 äquilibriert. In einer Plastikhülle wurde die Membran für 5 min mit einer Chemilumineszenzlösung (CDP-Star [Roche] 1:100 in DIG3) inkubiert. Anschließend wurde das Chemilumineszenzsignal mit dem Aufnahmesystem ImageQuant LAS 4000 (GE Healthcare Life Sciences) detektiert.

**20xSSPE**

3 M NaCl 200 mM  
Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 20 mM  
Na<sub>2</sub>-EDTA in H<sub>2</sub>O<sub>bid.</sub>, pH 7,4

**Denhardt-Lösung**

2% (v/v) BSA Fraktion V (Sigma A-9647)  
2% (v/v) Ficoll 2% (v/v)  
PVP (Sigma PVP-360) in H<sub>2</sub>O<sub>bid.</sub>

**Southern-Hybridisierungspuffer**

26% (v/v) SSPE (20x)  
5% (v/v) Denhardt-Lösung  
5% (v/v) SDS (10%) in H<sub>2</sub>O<sub>bid.</sub>

**Southern-Waschpuffer I**

2x SSPE  
0,1% SDS in H<sub>2</sub>O<sub>bid.</sub>

**Southern-Waschpuffer II**

1x SSPE  
0,1% SDS in H<sub>2</sub>O<sub>bid.</sub>

**Southern Waschpuffer III**

0,1x SSPE  
0,1% SDS in H<sub>2</sub>O<sub>bid.</sub>

**DIG1**

100 mM Maleinsäure  
150 mM NaCl in H<sub>2</sub>O<sub>bid.</sub>, pH-Wert mit NaOH auf 7,5 einstellen

**DIG-Waschpuffer**

0,3% Tween-20 In DIG1-Lösung

### DIG2

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

### DIG3

100 mM Tris-HCl

100 mM CaCl<sub>2</sub> In H<sub>2</sub>O<sub>bid.</sub> pH-Wert mit NaOH auf 9,5 einstellen

## 4.3.5 Sequenzanalyse

### Sequenzierung von DNA

Die DNA-Sequenzierung wurde von dem Sequencing Service, am Biozentrum der LMU München durchgeführt. Dafür wurden 250ng Plasmid DNA, 0,64µl Oligonukleotid (5pM) gemischt und auf 7µl mit 10mM Tris/HCl pH 8,5 aufgefüllt. Die Sequenzierung erfolgte nach der BigDye v3.1-Methode. Die erhaltenen Daten wurden mit dem Programm Clonemanager (Version 9; Scientific and Educational Software) ausgewertet.

## 4.4 Mikroskopie und Bildverarbeitung

### 4.4.1 Mikroskop-Aufbau und Steuerung

Für die Mikroskopie wurde das Weitfeldsystem Zeiss Axio Observer.Z1 System der Firma Visitron Systems (München, Deutschland) benutzt. Das System ist ausgestattet mit einer CoolSNAP HQ2 CCD Kamera (Photometrics, Tucson, USA) und den Zeiss Objektivlinsen 63x Plan-Apochromat (NA 1,4), 100x EC Plan-Neofluar (NA1, 3) und 100x a-Plan-Apochromat (NA 1,46). Die Anregung der Fluoreszenzproteine erfolgte mittels einer HXP Halogen-Metalldampf Lampe (LEJ, Jena), Laser für die Anregung von eGfp (488 nm/100mW) oder Rfp/mCherry (561nm/150mW), in Kombination mit den Filtersets für eGfp (ET 470/40x, ET525/50m, T495\_PXR) oder mCherry (ET560/40x, ET630/75m, T581p, AHF Analysetechnik, Tübingen) oder einer LED Lampe (CoolLED, precisExcite, Andover, UK). Die generelle Steuerung des Mikroskops wurde mit dem Programm MetaMorph (Version 7, Molecular Devices, Sunnyvale USA) durchgeführt. Dieses Programm wurde ebenfalls für die Auswertung der Daten inklusive Einstellungen an Helligkeit/Kontrast, Quantifizierungen, Kymographen und Maximum Projektionen von Z-Stapeln genutzt. Für die Steuerung der Laserintensitäten und für FRAP Experimente wurden die VisiFRAP 2D Software (Visitron Systems, München, Deutschland) benutzt.

### 4.4.2 Durchführung von Kollokalisationsstudien und deren Quantifizierung

Kollokalisationsstudien wurden unter Verwendung eines Zweikanal-Bildwandlers (DV2, Photometrics, Tucson, USA) durchgeführt, welcher die simultane Detektion von Gfp und Rfp/mCherry möglich macht. Ein dichroitischer Strahlteiler (dcxr565) und ein spezieller Anregungsfilter für Gfp und mCherry (Gfp/mCherry, Chroma Technology, USA) wurden genutzt um die Fluorophore simultan anzuregen. Für die gleichzeitige Anregung und Detektion von Gfp und Rfp/mCherry wurde ein dichroitischer Strahlteiler in Verbindung mit einem spezifischen Anregungsfilter (Gfp/mCherry, Chroma Technology, USA) verwendet. Ein zweiter dichroitischer Strahlteiler (dcxr565) innerhalb des Zweikanal-Bildwandlers teilt

die Fluoreszenzsignale in die jeweilige Wellenlänge auf. Die Fluoreszenzsignale wurden anschließend getrennt mit Emissionsfiltern (Gfp ET520/40; Rfp/mCherry ET632/60) gefiltert, bevor sie auf unterschiedlichen Bereichen eines CCD-Chips detektiert wurden. Für Kolokalisationsstudien mit starken Fluoreszenzsignalen wurde msALEX (*millisecond alternating laser excitation* (Lange *et al.*, 2008)) mit der Verwendung des Zweikanal-Bildwandlers kombiniert. Der schnelle Wechsel zwischen dem 488 nm und 561 nm Laser wurde mit Hilfe eines akustooptischen Modulators erreicht. Die Fluorophore wurden jeweils alternierend für jeweils 70 ms angeregt.

Für die Quantifizierung von kolokalisierenden Proteinen in sich bewegenden Partikeln, wurde das Signal des schwächeren Signals (meist mCherry) mit dem Signal des stärkeren Signals verglichen. Wenn in beiden Kanälen der gleiche Partikel zu sehen war, wurde dies als Kolokalisation gewertet. Es wurden mindestens 10 Hyphen ausgewertet.

#### **4.4.3 Analyse von Phänotypen und Untersuchung der subzellulären Lokalisation**

Für die phänotypische Analyse der Hyphen wurden mindestens 100 Zellen pro Stamm ausgezählt und in die Kategorien uni-oder bipolar/ uni-oder nicht-unipolar ebenso wie die in septenbildende/ nicht-septenbildende Zellen eingeteilt. Es wurden mindestens drei unabhängige Experimente durchgeführt.

Um die subzelluläre Lokalisation von Septinen an Septen, in Ringen oder in Filamenten besser sichtbar zu machen wurden z-Stapel mit einer Belichtungszeit von 150 ms/Ebene und einer Z-Distanz von 0,23  $\mu\text{m}$  aufgenommen.

Für die Analyse der Anzahl der Signale und deren Geschwindigkeit wurden Filme mit einer Belichtungszeit von 150 ms und 150/155 Bildern aufgenommen. Die Anzahl der Signale, sowie die Geschwindigkeit wurden aus den anschließend erstellten Kymographen entnommen. Signale die ihre Geschwindigkeit während der Aufnahme veränderten wurden als verschiedene Datenpunkte erfasst.

#### **4.4.4 RNA-Lebendzell-Mikroskopie**

RNA-Lebendzell-Mikroskopie Experimente wurden 8-10 Stunden nach Induktion des filamentösen Wachstums und nach Induktion der Expression des  $\lambda\text{N}^*\text{Gfp}^2$  Peptides durchgeführt. Für die Anregung von Gfp wurden 30-60% der Laserleistung benötigt. Jeder Film wurde mit einer Belichtungszeit von 150 ms und 150 Bildern aufgenommen. Pro Stamm und Experiment wurden mindestens 10 Hyphen analysiert. Für die Quantifizierung wurden Kymographen generiert, von denen die Anzahl der Partikel, deren Geschwindigkeit, deren Reichweite und deren Richtung ermittelt wurde. Um die durchschnittliche Anzahl der Partikel pro 100 $\mu\text{m}$  Hyphenlänge angeben zu können wurden die jeweiligen Hyphenlängen gemessen und durch die Anzahl der Partikel geteilt.

### 4.4.5 3D-Photobleichexperimente

Für 3D-Photobleichexperimente wurde die 472 nm LED für die Anregung von Gfp benutzt. Ein Bereich von 15 µm ab der Hyphenspitze wurde mit 33% Laserleistung des 405 nm Lasers gebleicht. Der Strahldurchmesser wurde auf 16 Pixel und die Bleichzeit auf 5 ms pro Pixel gesetzt. Es wurde in 18 Z-Ebenen mit einem Z-Abstand von 0,3 µm gebleicht. Die Intensität der Fluoreszenz wurde direkt nach dem Bleichen und nach 5 Minuten, ebenfalls in einem Z-Stapel mit 18 Ebenen und einem Abstand von 0,3µm, gemessen. Für die Auswertung der Daten wurden alle Ebenen in eine Maximum Projektion zusammengefasst und der mittlere Hintergrund abgezogen. Die Fluoreszenzintensität nach dem Bleichen wurde auf 0 gesetzt, die Fluoreszenzrückkehr nach 5 Minuten wurde berechnet und als relative Fluoreszenzrückkehr angegeben.

### 4.4.6 Zweifarben-3D-Photobleichen

3D-Photobleichexperimente des Kollokalisationsstammes wurden mit Hilfe des Zweikanal-Bildwandlers durchgeführt. Die Laserleistung für 488 nm wurde auf 15% und für 561 auf 20% gesetzt. Ein Bereich von 15 µm von der Hyphenspitze wurde mit 33% Laserleistung des 405 nm Lasers gebleicht. Der Strahldurchmesser wurde auf 16 Pixel und die Bleichzeit auf 5 ms pro Pixel gesetzt. Es wurde in 12 Z-Ebenen mit einem Z-Abstand von 0,2 µm gebleicht. Die Intensität der Fluoreszenz wurde direkt nach dem Bleichen und nach 5 Minuten, ebenfalls in einem Z-Stapel mit 12 Ebenen und einem Abstand von 0,2µm, gemessen. Für die Auswertung der Daten wurden alle Ebenen in eine Maximum Projektion zusammengefasst und der mittlere Hintergrund abgezogen. Die Fluoreszenzintensität nach dem Bleichen wurde auf 0 gesetzt und die Fluoreszenzrückkehr nach 5 Minuten wurde berechnet und als relative Fluoreszenzrückkehr angegeben.

### 4.4.7 Fluoreszenz-Resonanzenergietransfer (FRET) nach Akzeptorbleichen

Intensität-basierte FRET Messungen wurden mit dem Stamm der Cdc3-mCherry und Cdc12-Gfp exprimiert und mit dem dazugehörigen *rrm4* Deletionsstamm durchgeführt. Als Kontrolle wurde der Cdc12-Gfp Stamm verwendet. Die Anfangsfluoreszenz des Gfp Signals wurde mit einer Belichtungszeit von 100ms / Ebene und einem Z-Stapel von 13 Ebenen mit einem Z-Abstand von 0,3µm mit dem 488 nm Laser gemessen. Bleichen des Akzeptors erfolgte anschließend mit einer Belichtungszeit von 5 Sekunden / Ebene in einem Z-Stapel von 13 Ebenen mit einem Z-Abstand von 0,3µm mit dem 561 nm Laser. Die Gfp-Fluoreszenz nach dem Bleichen des Akzeptors wurde mit denselben Einstellungen wie oben beschrieben erneut aufgenommen. Für die Auswertung der Daten wurde eine Summenprojektion aller Ebenen hergestellt und der maximale Hintergrund abgezogen. Die FRET Effizienz wurde mit der folgenden Formel berechnet:  $E_{\text{FRET}} = (\text{Intensität}_{\text{nachher}} - \text{Intensität}_{\text{vorher}}) / \text{Intensität}_{\text{nachher}} * 100$ . Es wurde eine Region mit ungefähr 30 µm von der Hyphenspitze untersucht.

#### 4.4.8 Fluoreszenz-Lebenszeit-Mikroskopie (FLIM)

FLIM Experimente wurden an einem konfokalen Laser-Scanning Mikroskop (Zeiss LSM 780) mit einem Einzelphotonenzähler (Hydra Harp 400, PicoQuant, Berlin, Deutschland) durchgeführt. Die Gfp Fluoreszenz wurde bei 485 nm mit einem linear polarisierten Diodenlaser (LDH-D-C-485, 32MHz) angeregt. Die Anregungsleistung wurde auf 1 $\mu$ W am Objektiv (40x Wasserimmersion, Zeiss C-PlanApo, NA 1.2) festgesetzt. Das emittierte Licht wurde am selben Objektiv gesammelt und in senkrechte und parallele Polarisation aufgetrennt (Thorlabs PBS 101, Thorlabs GmbH, Deutschland). Die Fluoreszenz wurde in dem engen Emissionsspektrum von Gfp (Bandpassfilter: HC520/30 AHF) mit einem Tau-SPADs (PicoQuant) detektiert. Es wurden Bilder mit einer Pixelzeit von 12,6  $\mu$ s und einer Auflösung von 100 nm / Pixel aufgenommen (Zoom 3,9; 520x50). Eine Serie von 40 Bildern wurden zu einem Bild zusammengefügt umso die Photonenzahl pro Pixel zu erhöhen. Die Lebenszeiten von Gfp wurde mit der Software SymPhoTime 64, Version 2.0 (PicoQuant, Berlin, Deutschland) analysiert. Aufgrund einer schwachen Anregungsstärke, um Photobleichung zu vermeiden und einer kleinen Pixelgröße, um die räumliche Auflösung zu vergrößern, war die Anzahl an Photonen pro Pixel nach dem Zusammenfügen der Bilder noch schwach, ca. 300-2000 Photonen pro Pixel. Daher wurde ein Modell mit einer minimalen Anzahl an Parametern und einer Maximum-Likelihood Methode auf die Daten angewandt (Stahl *et al.*, 2013; Weidtkamp-Peters *et al.*, 2009). Es wurde eine bi-exponentielle Modellfunktion mit zwei Fluoreszenzlebenszeiten  $\tau_1$  und  $\tau_2$ . Dasselbe Modell wurde für die FRET Probe und die Donor Probe benutzt.

#### 4.4.9 FM4-64 Färbung, Benomyl und Latrunculin A Behandlung

Für die Färbung der Hyphen mit dem lipophilen Farbstoff FM4-64 (Invitrogen, Darmstadt, Deutschland) wurden 500  $\mu$ l der Suspension mit 0,8 $\mu$ M FM4-64 für 30-60 Sekunden bei Raumtemperatur inkubiert (Baumann *et al.*, 2012b). Anschließend wurden die Proben der mikroskopischen Analyse unterzogen. Benomyl (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) wurde zu einer 20 ml Flüssigkultur gegeben (50  $\mu$ M f.c.) und die Kultur wurde für mindestens eine weitere Stunde bei 28°C und 200 Upm inkubiert bevor die Proben einer mikroskopischen Analyse unterzogen wurden (Becht *et al.*, 2006). Für eine Behandlung mit Latrunculin A wurden 0,5 $\mu$ M (20mM) zu 500 $\mu$ l Zellsuspension gegeben. Anschließend erfolgte eine Inkubation für 30-60 bei 28°C in einem 2ml Reaktionsgefäß. Alternativ wurde Latrunculin A in einen kompletten Kolben mit Zellen gegeben und dieser für mindestens 1h inkubiert.

### 4.5 Computerprogramme

Für die Erstellung und Bearbeitung der Sequenzen von Plasmiden und genomischen Loki, wurde das Programm Clonemanager 9 (Scientific and Educational Software; Cary, NC, USA) verwendet. Ferner wurden mit diesem Programm Klonierungsstrategien entworfen,



Oligonukleotide geplant, sowie genetische Karten der bearbeiteten Nukleinsäuresequenzen erstellt.

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

Für die Erstellung und Bearbeitung der Abbildungen wurden das Programme Canvas 12 (ACD Systems of America, Inc., Seattle, WA, USA) verwendet.

## 5. Literaturverzeichnis

- Adams, A. E. und Pringle, J. R.** (1984). Relationship of actin and tubulin distribution to bud growth in wild-type and morphogenetic-mutant *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol* **98**, 934-45.
- 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.
- An, H., Morrell, J. L., Jennings, J. L., Link, A. J. und Gould, K. L.** (2004). Requirements of fission yeast septins for complex formation, localization, and function. *Mol Biol Cell* **15**, 5551-64.
- Ashby, M. C., Maier, S. R., Nishimune, A. und Henley, J. M.** (2006). Lateral diffusion drives constitutive exchange of AMPA receptors at dendritic spines and is regulated by spine morphology. *J Neurosci* **26**, 7046-55.
- Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A. und Struhl, K.** (1987). Current Protocols in Molecular Biology. *John Wiley & Sons, Inc., USA*.
- Bai, X., Bowen, J. R., Knox, T. K., Zhou, K., Pendziwiat, M., Kühlenbaumer, G., Sindelar, C. V. und Spiliotis, E. T.** (2013). Novel septin 9 repeat motifs altered in neuralgic amyotrophy bind and bundle microtubules. *J Cell Biol* **203**, 895-905.
- Bai, X., Karasmanis, E. P. und Spiliotis, E. T.** (2016). Septin 9 interacts with kinesin KIF17 and interferes with the mechanism of NMDA receptor cargo binding and transport. *Mol Biol Cell* **27**, 897-906.
- Banuett, F.** (1992). *Ustilago maydis*, the delightful blight. *Trends Genet* **8**, 174-80.
- Banuett, F. und Herskowitz, I.** (1989). Different alleles of *Ustilago maydis* are necessary for maintenance of filamentous growth but not for meiosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **86**, 5878-5882.
- Barral, Y.** (2010). Cell biology. Septins at the nexus. *Science* **329**, 1289-90.
- Basse, C. W. und Steinberg, G.** (2004). *Ustilago maydis*, model system for analysis of the molecular basis of fungal pathogenicity. *Mol Plant Pathol* **5**, 83-92.
- Baumann, S., König, J., Koepke, J. und Feldbrügge, M.** (2014). Endosomal transport of septin mRNA and protein indicates local translation on endosomes and is required for correct septin filamentation. *EMBO Rep* **15**, 94-102.
- Baumann, S., Pohlmann, T., Jungbluth, M., Brachmann, A. und Feldbrügge, M.** (2012a). Kinesin-3 and dynein mediate microtubule-dependent co-transport of mRNPs and endosomes. *J Cell Sci* **125**, 2740-52.
- Baumann, S., Pohlmann, T., Jungbluth, M., Brachmann, A. und Feldbrügge, M.** (2012b). Kinesin-3 and dynein mediate microtubule-dependent co-transport of mRNPs and endosomes. *J. Cell Sci.* **125**, 2740-2752.

- 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.
- 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.
- Beise, N. und Trimble, W.** (2011). Septins at a glance. *J Cell Sci* **124**, 4141-6.
- Beites, C. L., Campbell, K. A. und Trimble, W. S.** (2005). The septin Sept5/CDCrel-1 competes with alpha-SNAP for binding to the SNARE complex. *Biochem J* **385**, 347-53.
- Beites, C. L., Xie, H., Bowser, R. und Trimble, W. S.** (1999). The septin CDCrel-1 binds syntaxin and inhibits exocytosis. *Nat Neurosci* **2**, 434-9.
- Berepiki, A. und Read, N. D.** (2013). Septins are important for cell polarity, septation and asexual spore formation in *Neurospora crassa* and show different patterns of localisation at germ tube tips. *PLoS One* **8**, e63843.
- Berlin, A., Paoletti, A. und Chang, F.** (2003). Mid2p stabilizes septin rings during cytokinesis in fission yeast. *J Cell Biol* **160**, 1083-92.
- Bertin, A., McMurray, M. A., Grob, P., Park, S. S., Garcia, G., 3rd, Patanwala, I., Ng, H. L., Alber, T., Thorner, J. und Nogales, E.** (2008). *Saccharomyces cerevisiae* septins: supramolecular organization of heterooligomers and the mechanism of filament assembly. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 8274-9.
- Bertin, A., McMurray, M. A., Thai, L., Garcia, G., 3rd, Votin, V., Grob, P., Allyn, T., Thorner, J. und Nogales, E.** (2010). Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate promotes budding yeast septin filament assembly and organization. *J Mol Biol* **404**, 711-31.
- Bertrand, E., Chartrand, P., Schaefer, M., Shenoy, S. M., Singer, R. H. und Long, R. M.** (1998). Localization of *ASH1* mRNA particles in living yeast. *Mol Cell* **2**, 437-45.
- Birsoy, B., Kofron, M., Schaible, K., Wylie, C. und Heasman, J.** (2006). Vg1 is an essential signaling molecule in *Xenopus* development. *Development* **133**, 15-20.
- Blower, M. D.** (2013). Molecular insights into intracellular RNA localization. *Int Rev Cell Mol Biol* **302**, 1-39.
- Blower, M. D., Feric, E., Weis, K. und Heald, R.** (2007). Genome-wide analysis demonstrates conserved localization of messenger RNAs to mitotic microtubules. *J Cell Biol* **179**, 1365-73.
- Bobola, N., Jansen, R.-P., Shin, T. H. und Nasmyth, K.** (1996). Asymmetric Accumulation of Ash1p in Postanaphase Nuclei Depends on a Myosin and Restricts Yeast Mating-Type Switching to Mother Cells. *Cell* **84**, 699-709.
- Bohl, F., Kruse, C., Frank, A., Ferring, D. und Jansen, R. P.** (2000). She2p, a novel RNA-binding protein tethers *ASH1* mRNA to the Myo4p myosin motor via She3p. *EMBO J* **19**, 5514-24.
- Böhmer, C., Ripp, C. und Bölker, M.** (2009). The germinal centre kinase Don3 triggers the dynamic rearrangement of higher-order septin structures during cytokinesis in *Ustilago maydis*. *Mol Microbiol* **74**, 1484-96.

- Bölker, M.** (2001). *Ustilago maydis*--a valuable model system for the study of fungal dimorphism and virulence. *Microbiology* **147**, 1395-401.
- Bölker, M., Basse, C. W. und Schirawski, J.** (2008). *Ustilago maydis* secondary metabolism--from genomics to biochemistry. *Fungal Genet Biol* **45 Suppl 1**, S88-93.
- Bölker, M., Urban, M. und Kahmann, R.** (1992). The a mating type locus of *U. maydis* specifies cell signaling components. *Cell* **68**, 441-50.
- Booth, E. A., Vane, E. W., Dovala, D. und Thorner, J.** (2015). A Förster Resonance Energy Transfer (FRET)-based System Provides Insight into the Ordered Assembly of Yeast Septin Heterooctamers. *J Biol Chem* **290**, 28388-401.
- Bowen, J. R., Hwang, D., Bai, X., Roy, D. und Spiliotis, E. T.** (2011). Septin GTPases spatially guide microtubule organization and plus end dynamics in polarizing epithelia. *J Cell Biol* **194**, 187-97.
- Boyce, K. J., Chang, H., D'Souza, C. A. und Kronstad, J. W.** (2005). An *Ustilago maydis* septin is required for filamentous growth in culture and for full symptom development on maize. *Eukaryot Cell* **4**, 2044-56.
- Brachmann, A., König, J., Julius, C. und Feldbrügge, M.** (2004). A reverse genetic approach for generating gene replacement mutants in *Ustilago maydis*. *Mol Genet Genomics* **272**, 216-26.
- Brachmann, A., Weinzierl, G., Kämper, J. und Kahmann, R.** (2001). Identification of genes in the bW/bE regulatory cascade in *Ustilago maydis*. *Mol Microbiol* **42**, 1047-63.
- Brausemann, A., Gerhardt, S., Schott, A. K., Einsle, O., Grosse-Berkenbusch, A., Johnsson, N. und Gronemeyer, T.** (2016). Crystal structure of Cdc11, a septin subunit from *Saccharomyces cerevisiae*. *J Struct Biol* **193**, 157-61.
- 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.
- Bridges, A. A. und Gladfelter, A. S.** (2014). Fungal pathogens are platforms for discovering novel and conserved septin properties. *Curr Opin Microbiol* **20**, 42-8.
- Bridges, A. A. und Gladfelter, A. S.** (2015). Septin Form and Function at the Cell Cortex. *J Biol Chem* **290**, 17173-80.
- Bridges, A. A., Jentsch, M. S., Oakes, P. W., Occhipinti, P. und Gladfelter, A. S.** (2016). Micron-scale plasma membrane curvature is recognized by the septin cytoskeleton. *J Cell Biol*.
- Bridges, A. A., Zhang, H., Mehta, S. B., Occhipinti, P., Tani, T. und Gladfelter, A. S.** (2014). Septin assemblies form by diffusion-driven annealing on membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**, 2146-51.
- Broomfield, P. L. und Hargreaves, J. A.** (1992). A single amino-acid change in the iron-sulphur protein subunit of succinate dehydrogenase confers resistance to carboxin in *Ustilago maydis*. *Curr Genet* **22**, 117-21.

- Bullock, S. L.** (2007). Translocation of mRNAs by molecular motors: think complex? *Semin Cell Dev Biol* **18**, 194-201.
- Bullock, S. L., Stauber, M., Prell, A., Hughes, J. R., Ish-Horowicz, D. und Schmidt-Ott, U.** (2004). Differential cytoplasmic mRNA localisation adjusts pair-rule transcription factor activity to cytoarchitecture in dipteran evolution. *Development* **131**, 4251-61.
- Byers, B. und Goetsch, L.** (1976). A highly ordered ring of membrane-associated filaments in budding yeast. *J Cell Biol* **69**, 717-21.
- Caballero-Lima, D., Hautbergue, G. M., Wilson, S. A. und Sudbery, P. E.** (2014). In *Candida albicans* hyphae, Sec2p is physically associated with SEC2 mRNA on secretory vesicles. *Mol Microbiol* **94**, 828-42.
- Carbo, N. und Perez-Martin, J.** (2008). Spa2 is required for morphogenesis but it is dispensable for pathogenicity in the phytopathogenic fungus *Ustilago maydis*. *Fungal Genet Biol* **45**, 1315-27.
- Casamayor, A. und Snyder, M.** (2003). Molecular dissection of a yeast septin: distinct domains are required for septin interaction, localization, and function. *Mol Cell Biol* **23**, 2762-77.
- Cohen, R. S.** (2005). The role of membranes and membrane trafficking in RNA localization. *Biology of the Cell* **97**, 5-18.
- Cohen, S. N., Chang, A. C. und Hsu, L.** (1972). Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **69**, 2110-2114
- Cote, C. A., Gautreau, D., Denegre, J. M., Kress, T. L., Terry, N. A. und Mowry, K. L.** (1999). A *Xenopus* protein related to hnRNP I has a role in cytoplasmic RNA localization. *Mol Cell* **4**, 431-7.
- Czaplinski, K.** (2014). Understanding mRNA trafficking: are we there yet? *Semin Cell Dev Biol* **32**, 63-70.
- Dagdas, Y. F., Yoshino, K., Dagdas, G., Ryder, L. S., Bielska, E., Steinberg, G. und Talbot, N. J.** (2012). Septin-mediated plant cell invasion by the rice blast fungus, *Magnaporthe oryzae*. *Science* **336**, 1590-5.
- Dean, R., Van Kan, J. A., Pretorius, Z. A., Hammond-Kosack, K. E., Di Pietro, A., Spanu, P. D., Rudd, J. J., Dickman, M., Kahmann, R., Ellis, J. und Foster, G. D.** (2012). The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Mol Plant Pathol* **13**, 414-30.
- Deibler, M., Spatz, J. P. und Kemkemer, R.** (2011). Actin Fusion Proteins Alter the Dynamics of Mechanically Induced Cytoskeleton Rearrangement. *PLoS One* **6**, e22941.
- Delanoue, R. und Davis, I.** (2005). Dynein anchors its mRNA cargo after apical transport in the *Drosophila* blastoderm embryo. *Cell* **122**, 97-106.
- Delanoue, R., Herpers, B., Soetaert, J., Davis, I. und Rabouille, C.** (2007). *Drosophila* Squid/hnRNP helps Dynein switch from a *gurken* mRNA transport motor to an ultrastructural static anchor in sponge bodies. *Dev Cell* **13**, 523-38.

- DeMay, B. S., Bai, X., Howard, L., Occhipinti, P., Meseroll, R. A., Spiliotis, E. T., Oldenbourg, R. und Gladfelter, A. S. (2011). Septin filaments exhibit a dynamic, paired organization that is conserved from yeast to mammals. *J Cell Biol* **193**, 1065-81.
- DeMay, B. S., Meseroll, R. A., Occhipinti, P. und Gladfelter, A. S. (2009). Regulation of distinct septin rings in a single cell by Elm1p and Gin4p kinases. *Mol Biol Cell* **20**, 2311-26.
- Deshler, J. O., Hightett, M. I. und Schnapp, B. J. (1997). Localization of *Xenopus* Vg1 mRNA by Vera protein and the endoplasmic reticulum. *Science* **276**, 1128-31.
- DiDomenico, B. J., Brown, N. H., Lupisella, J., Greene, J. R., Yanko, M. und Koltin, Y. (1994). Homologs of the yeast neck filament associated genes: isolation and sequence analysis of *Candida albicans* CDC3 and CDC10. *Mol Gen Genet* **242**, 689-98.
- Dobbelaere, J., Gentry, M. S., Hallberg, R. L. und Barral, Y. (2003). Phosphorylation-dependent regulation of septin dynamics during the cell cycle. *Dev Cell* **4**, 345-57.
- Doyle, M. und Kiebler, M. A. (2011). Mechanisms of dendritic mRNA transport and its role in synaptic tagging. *EMBO J* **30**, 3540-3552.
- Doyle, T. und Botstein, D. (1996). Movement of yeast cortical actin cytoskeleton visualized *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 3886-91.
- Egan, M. J., McClintock, M. A. und Reck-Peterson, S. L. (2012). Microtubule-based transport in filamentous fungi. *Curr Opin Microbiol* **15**, 637-45.
- Estey, M. P., Kim, M. S. und Trimble, W. S. (2011). Septins. *Curr Biol* **21**, R384-7.
- Fares, H., Peifer, M. und Pringle, J. R. (1995). Localization and possible functions of *Drosophila* septins. *Mol Biol Cell* **6**, 1843-59.
- Farkasovsky, M., Herter, P., Voss, B. und Wittinghofer, A. (2005). Nucleotide binding and filament assembly of recombinant yeast septin complexes. *Biol Chem* **386**, 643-56.
- Faty, M., Fink, M. und Barral, Y. (2002). Septins: a ring to part mother and daughter. *Curr Genet* **41**, 123-31.
- Feldbrügge, M., Kellner, R. und Schipper, K. (2013). The biotechnological use and potential of plant pathogenic smut fungi. *Appl Microbiol Biotechnol* **97**, 3253-65.
- Feldbrügge, M., Zarnack, K., Vollmeister, E., Baumann, S., Koepke, J., König, J., Münsterkötter, M. und Mannhaupt, G. (2008). The posttranscriptional machinery of *Ustilago maydis*. *Fungal Genet Biol* **45 Suppl 1**, S40-6.
- Field, C. M., al-Awar, O., Rosenblatt, J., Wong, M. L., Alberts, B. und Mitchison, T. J. (1996). A purified *Drosophila* septin complex forms filaments and exhibits GTPase activity. *J Cell Biol* **133**, 605-16.
- Field, C. M. und Kellogg, D. (1999). Septins: cytoskeletal polymers or signalling GTPases? *Trends Cell Biol* **9**, 387-94.

- Finnigan, G. C., Booth, E. A., Duvalyan, A., Liao, E. N. und Thorner, J.** (2015a). The Carboxy-Terminal Tails of Septins Cdc11 and Shs1 Recruit Myosin-II Binding Factor Bni5 to the Bud Neck in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **200**, 843-62.
- Finnigan, G. C., Takagi, J., Cho, C. und Thorner, J.** (2015b). Comprehensive Genetic Analysis of Paralogous Terminal Septin Subunits Shs1 and Cdc11 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **200**, 821-41.
- Ford, S. K. und Pringle, J. R.** (1991). Cellular morphogenesis in the *Saccharomyces cerevisiae* cell cycle: localization of the CDC11 gene product and the timing of events at the budding site. *Dev Genet* **12**, 281-92.
- Frazier, J. A., Wong, M. L., Longtine, M. S., Pringle, J. R., Mann, M., Mitchison, T. J. und Field, C.** (1998). Polymerization of purified yeast septins: evidence that organized filament arrays may not be required for septin function. *J Cell Biol* **143**, 737-49.
- Fuchs, U., Manns, I. und Steinberg, G.** (2005). Microtubules are dispensable for the initial pathogenic development but required for long-distance hyphal growth in the corn smut fungus *Ustilago maydis*. *Mol Biol Cell* **16**, 2746-58.
- Fung, K. Y., Dai, L. und Trimble, W. S.** (2014). Cell and molecular biology of septins. *Int Rev Cell Mol Biol* **310**, 289-339.
- Gao, Y., Tatavarty, V., Korza, G., Levin, M. K. und Carson, J. H.** (2008). Multiplexed dendritic targeting of alpha calcium calmodulin-dependent protein kinase II, neurogranin, and activity-regulated cytoskeleton-associated protein RNAs by the A2 pathway. *Mol Biol Cell* **19**, 2311-27.
- Garcia, G., 3rd, Bertin, A., Li, Z., Song, Y., McMurray, M. A., Thorner, J. und Nogales, E.** (2011). Subunit-dependent modulation of septin assembly: budding yeast septin Shs1 promotes ring and gauze formation. *J Cell Biol* **195**, 993-1004.
- Gillissen, B., Bergemann, J., Sandmann, C., Schroeer, B., Bölker, M. und Kahmann, R.** (1992). A two-component regulatory system for self/non-self recognition in *Ustilago maydis*. *Cell* **68**, 647-57.
- Gladfelder, A. S.** (2006). Control of filamentous fungal cell shape by septins and formins. *Nat Rev Microbiol* **4**, 223-9.
- González-Novo, A., Vázquez de Aldana, C. und Jiménez, J.** (2009). Fungal septins: one ring to rule it all? *Open Life Sciences* **4**.
- 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.
- Haag, C., Steuten, B. und Feldbrügge, M.** (2015). Membrane-Coupled mRNA Trafficking in Fungi. *Annu Rev Microbiol* **69**, 265-81.
- Haarer, B. K. und Pringle, J. R.** (1987). Immunofluorescence localization of the *Saccharomyces cerevisiae* CDC12 gene product to the vicinity of the 10-nm filaments in the mother-bud neck. *Mol Cell Biol* **7**, 3678-87.

- Hall, P. A., Jung, K., Hillan, K. J. und Russell, S. E. (2005). Expression profiling the human septin gene family. *J Pathol* **206**, 269-78.
- Hall, P. A. und Russell, S. E. (2004). The pathobiology of the septin gene family. *J Pathol* **204**, 489-505.
- Halstead, J. M., Lionnet, T., Wilbertz, J. H., Wippich, F., Ephrussi, A., Singer, R. H. und Chao, J. A. (2015). Translation. An RNA biosensor for imaging the first round of translation from single cells to living animals. *Science* **347**, 1367-671.
- Hanai, N., Nagata, K., Kawajiri, A., Shiromizu, T., Saitoh, N., Hasegawa, Y., Murakami, S. und Inagaki, M. (2004). Biochemical and cell biological characterization of a mammalian septin, Sept11. *FEBS Lett* **568**, 83-8.
- Harbury, P. B., Tidor, B. und Kim, P. S. (1995). Repacking protein cores with backbone freedom: structure prediction for coiled coils. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 8408-12.
- Harris, S. D. (2009). The Spitzenkorper: a signalling hub for the control of fungal development? *Mol Microbiol* **73**, 733-6.
- Hartwell, L. H. (1971). Genetic control of the cell division cycle in yeast. IV. Genes controlling bud emergence and cytokinesis. *Exp Cell Res* **69**, 265-76.
- Hartwell, L. H. (1978). Cell division from a genetic perspective. *J Cell Biol* **77**, 627-37.
- Heasley, L. R. und McMurray, M. A. (2016). Roles of septins in prospore membrane morphogenesis and spore wall assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* **27**, 442-50.
- Helfer, H. und Gladfelter, A. S. (2006). AgSwe1p regulates mitosis in response to morphogenesis and nutrients in multinucleated *Ashbya gossypii* cells. *Mol Biol Cell* **17**, 4494-512.
- Hernandez-Rodriguez, Y., Hastings, S. und Momany, M. (2012). The septin AspB in *Aspergillus nidulans* forms bars and filaments and plays roles in growth emergence and conidiation. *Eukaryot Cell* **11**, 311-23.
- Hernandez-Rodriguez, Y. und Momany, M. (2012). Posttranslational modifications and assembly of septin heteropolymers and higher-order structures. *Curr Opin Microbiol* **15**, 660-8.
- Heuck, A., Fetka, I., Brewer, D. N., Huls, D., Munson, M., Jansen, R. P. und Niessing, D. (2010). The structure of the Myo4p globular tail and its function in ASH1 mRNA localization. *J Cell Biol* **189**, 497-510.
- Heym, R. G. und Niessing, D. (2012). Principles of mRNA transport in yeast. *Cell Mol Life Sci* **69**, 1843-53.
- Higuchi, Y., Ashwin, P., Roger, Y. und Steinberg, G. (2014). Early endosome motility spatially organizes polysome distribution. *J Cell Biol* **204**, 343-57.
- Hlubek, A., Schink, K. O., Mahlert, M., Sandrock, B. und Bolker, M. (2008). Selective activation by the guanine nucleotide exchange factor Don1 is a main determinant of Cdc42 signalling specificity in *Ustilago maydis*. *Mol Microbiol* **68**, 615-23.



- 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.** (1964). The Induction of Mitotic Recombination by Mitomycin C in *Ustilago* and *Saccharomyces*. *Genetics* **50**, 323-35.
- Holliday, R.** (1974a). Molecular Aspects of Genetic Exchange and Gene Conversion. *Genetics* **78**, 273-287.
- Holliday, R.** (1974b). *Ustilago maydis*. *Handbook of Genetics Vol. 1: Plenum Press*.
- Hsu, S. C., Hazuka, C. D., Roth, R., Foletti, D. L., Heuser, J. und Scheller, R. H.** (1998). Subunit composition, protein interactions, and structures of the mammalian brain sec6/8 complex and septin filaments. *Neuron* **20**, 1111-22.
- Hu, J., Bai, X., Bowen, J. R., Dolat, L., Korobova, F., Yu, W., Baas, P. W., Svitkina, T., Gallo, G. und Spiliotis, E. T.** (2012). Septin-driven coordination of actin and microtubule remodeling regulates the collateral branching of axons. *Curr Biol* **22**, 1109-15.
- Hu, Q., Milenkovic, L., Jin, H., Scott, M. P., Nachury, M. V., Spiliotis, E. T. und Nelson, W. J.** (2010). A septin diffusion barrier at the base of the primary cilium maintains ciliary membrane protein distribution. *Science* **329**, 436-9.
- Hu, Q. und Nelson, W. J.** (2011). Ciliary diffusion barrier: the gatekeeper for the primary cilium compartment. *Cytoskeleton (Hoboken)* **68**, 313-24.
- Hu, Q., Nelson, W. J. und Spiliotis, E. T.** (2008). Forchlorfenuron alters mammalian septin assembly, organization, and dynamics. *J Biol Chem* **283**, 29563-71.
- Hüttelmaier, S., Zenklusen, D., Lederer, M., Dichtenberg, J., Lorenz, M., Meng, X., Bassell, G. J., Condeelis, J. und Singer, R. H.** (2005). Spatial regulation of beta-actin translation by Src-dependent phosphorylation of ZBP1. *Nature* **438**, 512-5.
- Innis, M. A., Gelfand, D. H., Sninsky, J. J. und White, T. J.** (1990). PCR Protocols: a guide to methods and amplifications. *San Diego, USA: Academic press*.
- Irie, K., Tadauchi, T., Takizawa, P. A., Vale, R. D., Matsumoto, K. 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.
- Iwase, M., Luo, J., Bi, E. und Toh-e, A.** (2007). Shs1 plays separable roles in septin organization and cytokinesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **177**, 215-29.
- Jambhekar, A. und Derisi, J. L.** (2007). Cis-acting determinants of asymmetric, cytoplasmic RNA transport. *RNA* **13**, 625-42.
- Jansen, R.-P.** (2001). mRNA localization: message on the move. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**, 247-256.
- Jansen, R. P., Niessing, D., Baumann, S. und Feldbrügge, M.** (2014). mRNA transport meets membrane traffic. *Trends Genet* **30**, 408-17.

- Jares-Erijman, E. A. und Jovin, T. M. (2003). FRET imaging. *Nat Biotech* **21**, 1387-1395.
- Joberty, G., Perlungher, R. R., Sheffield, P. J., Kinoshita, M., Noda, M., Haystead, T. und Macara, I. G. (2001). Borg proteins control septin organization and are negatively regulated by Cdc42. *Nat Cell Biol* **3**, 861-6.
- John, C. M., Hite, R. K., Weirich, C. S., Fitzgerald, D. J., Jawhari, H., Faty, M., Schläpfer, D., Kroschewski, R., Winkler, F. K., Walz, T., Barral, Y. und Steinmetz, M. O. (2007). The *Caenorhabditis elegans* septin complex is nonpolar. *EMBO J* **26**, 3296-3307.
- Johnson, E. S. und Blobel, G. (1999). Cell cycle-regulated attachment of the ubiquitin-related protein SUMO to the yeast septins. *J Cell Biol* **147**, 981-94.
- Juárez-Montiel, M., Romero-Maldonado, A., Monreal-Escalante, E., Becerra-Flora, A., Korban, S. S., Rosales-Mendoza, S. und Jiménez-Bremont, J. F. (2015). The Corn Smut ('Huitlacoche') as a New Platform for Oral Vaccines. *PLoS One* **10**, e0133535.
- Juárez-Montiel, M., Ruiloba de León, S., Chávez-Camarillo, G., Hernández-Rodríguez, C. und Villa-Tanaca, L. (2011). Huitlacoche (corn smut), caused by the phytopathogenic fungus *Ustilago maydis*, as a functional food. *Revista Iberoamericana de Micología* **28**, 69-73.
- Jung, H., Gkogkas, Christos G., Sonenberg, N. und Holt, Christine E. (2014). Remote Control of Gene Function by Local Translation. *Cell* **157**, 26-40.
- Jung, H., Yoon, B. C. und Holt, C. E. (2012). Axonal mRNA localization and local protein synthesis in nervous system assembly, maintenance and repair. *Nat Rev Neurosci* **13**, 308-24.
- Juvvadi, P. R., Belina, D., Soderblom, E. J., Moseley, M. A. und Steinbach, W. J. (2013). Filamentous fungal-specific septin AspE is phosphorylated in vivo and interacts with actin, tubulin and other septins in the human pathogen *Aspergillus fumigatus*. *Biochem Biophys Res Commun* **431**, 547-53.
- Kahmann, R. K., J. . (2004). *Ustilago maydis*: how its biology relates to pathogenic development. . *New Phytol.* **164**, 31-42.
- Kämper, J., Kahmann, R., Bölker, M., Ma, L. J., Brefort, T., Saville, B. J., Banuett, F., Kronstad, J. W., Gold, S. E., Müller, O., Perlin, M. H., Wosten, H. A., de Vries, R., Ruiz-Herrera, J., Reynaga-Pena, C. G., Snetselaar, K., McCann, M., Perez-Martin, J., Feldbrügge, M., Basse, C. W., Steinberg, G., Ibeas, J. I., Holloman, W., Guzman, P., Farman, M., Stajich, J. E., Sentandreu, R., Gonzalez-Prieto, J. M., Kennell, J. C., Molina, L., Schirawski, J., Mendoza-Mendoza, A., Greilinger, D., Munch, K., Rössel, N., Scherer, M., Vranes, M., Ladendorf, O., Vincon, V., Fuchs, U., Sandrock, B., Meng, S., Ho, E. C., Cahill, M. J., Boyce, K. J., Klose, J., Klosterman, S. J., Deelstra, H. J., Ortiz-Castellanos, L., Li, W., Sanchez-Alonso, P., Schreier, P. H., Hauser-Hahn, I., Vaupel, M., Koopmann, E., Friedrich, G., Voss, H., Schluter, T., Margolis, J., Platt, D., Swimmer, C., Gnirke, A., Chen, F., Vysotskaia, V., Mannhaupt, G., Guldener, U., Munsterkotter, M., Haase, D., Oesterheld, M., Mewes, H. W., Mauceli, E. W., DeCaprio, D., Wade, C. M., Butler, J., Young, S., Jaffe, D. B., Calvo, S., Nusbaum, C., Galagan, J. und Birren, B. W. (2006). Insights from the genome of the biotrophic fungal plant pathogen *Ustilago maydis*. *Nature* **444**, 97-101.

- Kämper, J., Reichmann, M., Romeis, T., Bölker, M. und Kahmann, R.** (1995). Multiallelic recognition: nonself-dependent dimerization of the bE and bW homeodomain proteins in *Ustilago maydis*. *Cell* **81**, 73-83.
- Kaneko, A., Umeyama, T., Hanaoka, N., Monk, B. C., Uehara, Y. und Niimi, M.** (2004). Tandem affinity purification of the *Candida albicans* septin protein complex. *Yeast* **21**, 1025-33.
- Kaplan, C., Jing, B., Winterflood, C. M., Bridges, A. A., Occhipinti, P., Schmied, J., Grinhagens, S., Gronemeyer, T., Tinnefeld, P., Gladfelter, A. S., Ries, J. und Ewers, H.** (2015). Absolute Arrangement of Subunits in Cytoskeletal Septin Filaments in Cells Measured by Fluorescence Microscopy. *Nano Lett* **15**, 3859-64.
- Kaufmann, A. und Philippsen, P.** (2009). Of bars and rings: Hof1-dependent cytokinesis in multiseptated hyphae of *Ashbya gossypii*. *Mol Cell Biol* **29**, 771-83.
- Kellner, R., Vollmeister, E., Feldbrügge, M. und Begerow, D.** (2011). Interspecific sex in grass smuts and the genetic diversity of their pheromone-receptor system. *PLoS Genet* **7**, e1002436.
- Khan, A., McQuilken, M. und Gladfelter, A. S.** (2015). Septins and Generation of Asymmetries in Fungal Cells. *Annu Rev Microbiol* **69**, 487-503.
- Kim, H. B., Haarer, B. K. und Pringle, J. R.** (1991). Cellular morphogenesis in the *Saccharomyces cerevisiae* cell cycle: localization of the CDC3 gene product and the timing of events at the budding site. *J Cell Biol* **112**, 535-44.
- Kim, M. S., Froese, C. D., Estey, M. P. und Trimble, W. S.** (2011). SEPT9 occupies the terminal positions in septin octamers and mediates polymerization-dependent functions in abscission. *J Cell Biol* **195**, 815-26.
- Kim, M. S., Froese, C. D., Xie, H. und Trimble, W. S.** (2012). Uncovering principles that control septin-septin interactions. *Journal of Biological Chemistry* **287**, 30406-13.
- King, M. L., Messitt, T. J. und Mowry, K. L.** (2005). Putting RNAs in the right place at the right time: RNA localization in the frog oocyte. *Biology of the Cell* **97**, 19-33.
- Kinoshita, M.** (2003). The septins. *Genome Biol* **4**, 236.
- Kinoshita, M., Field, C. M., Coughlin, M. L., Straight, A. F. und Mitchison, T. J.** (2002). Self- and actin-templated assembly of Mammalian septins. *Dev Cell* **3**, 791-802.
- Kinoshita, M., Kumar, S., Mizoguchi, A., Ide, C., Kinoshita, A., Haraguchi, T., Hiraoka, Y. und Noda, M.** (1997). Nedd5, a mammalian septin, is a novel cytoskeletal component interacting with actin-based structures. *Genes Dev* **11**, 1535-47.
- Kinoshita, M. und Noda, M.** (2001). Roles of septins in the mammalian cytokinesis machinery. *Cell Struct Funct* **26**, 667-70.
- Kinoshita, N., Kimura, K., Matsumoto, N., Watanabe, M., Fukaya, M. und Ide, C.** (2004). Mammalian septin Sept2 modulates the activity of GLAST, a glutamate transporter in astrocytes. *Genes Cells* **9**, 1-14.

- Kislauskis, E. H., Li, Z., Singer, R. H. und Taneja, K. L. (1993). Isoform-specific 3'-untranslated sequences sort alpha-cardiac and beta-cytoplasmic actin messenger RNAs to different cytoplasmic compartments. *J Cell Biol* **123**, 165-72.
- 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.
- Kislauskis, E. H., Zhu, X. und Singer, R. H. (1997). beta-Actin messenger RNA localization and protein synthesis augment cell motility. *J Cell Biol* **136**, 1263-70.
- Kloc, M., Zearfoss, N. R. und Etkin, L. D. (2002). Mechanisms of subcellular mRNA localization. *Cell* **108**, 533-44.
- Koepke, J., Kaffarnik, F., Haag, C., Zarnack, K., Luscombe, N. M., König, J., Ule, J., Kellner, R., Begerow, D. und Feldbrügge, M. (2011). The RNA-binding protein Rrm4 is essential for efficient secretion of endochitinase Cts1. *Mol Cell Proteomics* **10**, M111 011213.
- König, J., Baumann, S., Koepke, J., Pohlmann, T., Zarnack, K. und Feldbrügge, M. (2009). The fungal RNA-binding protein Rrm4 mediates long-distance transport of *ubi1* and *rho3* mRNAs. *EMBO J* **28**, 1855-66.
- Kozubowski, L. und Heitman, J. (2010). Septins enforce morphogenetic events during sexual reproduction and contribute to virulence of *Cryptococcus neoformans*. *Mol Microbiol* **75**, 658-75.
- Kraut-Cohen, J. und Gerst, J. E. (2010). Addressing mRNAs to the ER: cis sequences act up! *Trends Biochem Sci* **35**, 459-69.
- Krementsova, E. B., Hodges, A. R., Bookwalter, C. S., Sladewski, T. E., Travaglia, M., Sweeney, H. L. und Trybus, K. M. (2011). Two single-headed myosin V motors bound to a tetrameric adapter protein form a processive complex. *J Cell Biol* **195**, 631-41.
- Kremers, G.-J., Gilbert, S. G., Cranfill, P. J., Davidson, M. W. und Piston, D. W. (2011). Fluorescent proteins at a glance. *J Cell Sci* **124**, 157-160.
- Kress, T. L., Yoon, Y. J. und Mowry, K. L. (2004). Nuclear RNP complex assembly initiates cytoplasmic RNA localization. *J Cell Biol* **165**, 203-11.
- Kronstad, J. W. und Leong, S. A. (1990). The b mating-type locus of *Ustilago maydis* contains variable and constant regions. *Genes Dev* **4**, 1384-95.
- Kruzel, E. K. und Hull, C. M. (2010). Establishing an unusual cell type: how to make a dikaryon. *Curr Opin Microbiol* **13**, 706-11.
- Lange, S., Katayama, Y., Schmid, M., Burkacky, O., Brauchle, C., Lamb, D. C. und Jansen, R. P. (2008). Simultaneous transport of different localized mRNA species revealed by live-cell imaging. *Traffic* **9**, 1256-67.
- Langner, T. und Göhre, V. (2015). Fungal chitinases: function, regulation, and potential roles in plant/pathogen interactions. *Current Genetics* **62**, 243-254.

- Langner, T., Ozturk, M., Hartmann, S., Cord-Landwehr, S., Moerschbacher, B., Walton, J. D. und Göhre, V.** (2015). Chitinases Are Essential for Cell Separation in *Ustilago maydis*. *Eukaryot Cell* **14**, 846-57.
- Lanver, D., Mendoza-Mendoza, A., Brachmann, A. und Kahmann, R.** (2010). Sho1 and Msb2-related proteins regulate appressorium development in the smut fungus *Ustilago maydis*. *Plant Cell* **22**, 2085-101.
- Larson, D. R., Zenklusen, D., Wu, B., Chao, J. A. und Singer, R. H.** (2011). Real-time observation of transcription initiation and elongation on an endogenous yeast gene. *Science* **332**, 475-8.
- Latham, V. M., Yu, E. H., Tullio, A. N., Adelstein, R. S. und Singer, R. H.** (2001). A Rho-dependent signaling pathway operating through myosin localizes beta-actin mRNA in fibroblasts. *Curr Biol* **11**, 1010-6.
- Laurie, J. D., Ali, S., Linning, R., Mannhaupt, G., Wong, P., Guldener, U., Münsterkötter, M., Moore, R., Kahmann, R., Bakkeren, G. und Schirawski, J.** (2012). Genome comparison of barley and maize smut fungi reveals targeted loss of RNA silencing components and species-specific presence of transposable elements. *Plant Cell* **24**, 1733-45.
- 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, P. R., Song, S., Ro, H. S., Park, C. J., Lippincott, J., Li, R., Pringle, J. R., De Virgilio, C., Longtine, M. S. und Lee, K. S.** (2002). Bni5p, a septin-interacting protein, is required for normal septin function and cytokinesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **22**, 6906-20.
- Lehmle, C., Steinberg, G., Snetselaar, K. M., Schliwa, M., Kahmann, R. und Bölker, M.** (1997). Identification of a motor protein required for filamentous growth in *Ustilago maydis*. *EMBO J* **16**, 3464-73.
- Leipe, D. D., Wolf, Y. I., Koonin, E. V. und Aravind, L.** (2002). Classification and evolution of P-loop GTPases and related ATPases1. *J Mol Biol* **317**, 41-72.
- Lenz, J. H., Schuchardt, I., Straube, A. und Steinberg, G.** (2006). A dynein loading zone for retrograde endosome motility at microtubule plus-ends. *EMBO J* **25**, 2275-86.
- Li, X., Kuromi, H., Briggs, L., Green, D. B., Rocha, J. J., Sweeney, S. T. und Bullock, S. L.** (2010). Bicaudal-D binds clathrin heavy chain to promote its transport and augments synaptic vesicle recycling. *EMBO J* **29**, 992-1006.
- Lindsey, R., Cowden, S., Hernandez-Rodriguez, Y. und Momany, M.** (2010). Septins AspA and AspC are important for normal development and limit the emergence of new growth foci in the multicellular fungus *Aspergillus nidulans*. *Eukaryot Cell* **9**, 155-63.
- Lipschutz, J. H. und Mostov, K. E.** (2002). Exocytosis: the many masters of the exocyst. *Curr Biol* **12**, R212-4.

- Long, R. M., Singer, R. H., Meng, X., Gonzalez, I., Nasmyth, K. und Jansen, R. P.** (1997). Mating type switching in yeast controlled by asymmetric localization of *ASH1* mRNA. *Science* **277**, 383-7.
- Longtine, M. S. und Bi, E.** (2003). Regulation of septin organization and function in yeast. *Trends Cell Biol* **13**, 403-9.
- Longtine, M. S., DeMarini, D. J., Valencik, M. L., Al-Awar, O. S., Fares, H., De Virgilio, C. und Pringle, J. R.** (1996). The septins: roles in cytokinesis and other processes. *Curr Opin Cell Biol* **8**, 106-19.
- Lopez de Heredia, M. und Jansen, R. P.** (2004). mRNA localization and the cytoskeleton. *Curr Opin Cell Biol* **16**, 80-5.
- Low, C. und Macara, I. G.** (2006). Structural analysis of septin 2, 6, and 7 complexes. *J Biol Chem* **281**, 30697-706.
- Lukoyanova, N., Baldwin, S. A. und Trinick, J.** (2008). 3D reconstruction of mammalian septin filaments. *J Mol Biol* **376**, 1-7.
- Martin, K. C. und Ephrussi, A.** (2009). mRNA localization: gene expression in the spatial dimension. *Cell* **136**, 719-30.
- Mavrikakis, M., Azou-Gros, Y., Tsai, F. C., Alvarado, J., Bertin, A., Iv, F., Kress, A., Brasselet, S., Koenderink, G. H. und Lecuit, T.** (2014). Septins promote F-actin ring formation by crosslinking actin filaments into curved bundles. *Nat Cell Biol* **16**, 322-34.
- McMurray, M. A., Bertin, A., Garcia, G., 3rd, Lam, L., Nogales, E. und Thorner, J.** (2011a). Septin filament formation is essential in budding yeast. *Dev Cell* **20**, 540-9.
- McMurray, M. A., Stefan, C. J., Wemmer, M., Odorizzi, G., Emr, S. D. und Thorner, J.** (2011b). Genetic interactions with mutations affecting septin assembly reveal ESCRT functions in budding yeast cytokinesis. *Biol Chem* **392**, 699-712.
- McMurray, M. A. und Thorner, J.** (2009). Septins: molecular partitioning and the generation of cellular asymmetry. *Cell Div* **4**, 18.
- Medioni, C., Mowry, K. und Besse, F.** (2012). Principles and roles of mRNA localization in animal development. *Development* **139**, 3263-76.
- Mellman, I.** (1996). Endocytosis and molecular sorting. *Annu Rev Cell Dev Biol* **12**, 575-625.
- 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.
- Mendoza, M., Hyman, A. A. und Glotzer, M.** (2002). GTP binding induces filament assembly of a recombinant septin. *Curr Biol* **12**, 1858-63.
- Meseroll, R. A., Howard, L. und Gladfelter, A. S.** (2012). Septin ring size scaling and dynamics require the coiled-coil region of Shs1p. *Mol Biol Cell* **23**, 3391-406.

- Messitt, T. J., Gagnon, J. A., Kreiling, J. A., Pratt, C. A., Yoon, Y. J. und Mowry, K. L.** (2008). Multiple kinesin motors coordinate cytoplasmic RNA transport on a subpopulation of microtubules in *Xenopus oocytes*. *Dev Cell* **15**, 426-36.
- Mikl, M., Vendra, G. und Kiebler, M. A.** (2011). Independent localization of MAP2, CaMKIIalpha and beta-actin RNAs in low copy numbers. *EMBO Rep* **12**, 1077-84.
- Mitchell, L., Lau, A., Lambert, J. P., Zhou, H., Fong, Y., Couture, J. F., Figeys, D. und Baetz, K.** (2011). Regulation of septin dynamics by the *Saccharomyces cerevisiae* lysine acetyltransferase NuA4. *PLoS One* **6**, e25336.
- Morisaki, T., Lyon, K., DeLuca, K. F., DeLuca, J. G., English, B. P., Zhang, Z., Lavis, L. D., Grimm, J. B., Viswanathan, S., Looger, L. L., Lionnet, T. und Stasevich, T. J.** (2016). Real-time quantification of single RNA translation dynamics in living cells. *Science* **352**, 1425-1429.
- Mortensen, E. M., McDonald, H., Yates, J., 3rd und Kellogg, D. R.** (2002). Cell cycle-dependent assembly of a Gin4-septin complex. *Mol Biol Cell* **13**, 2091-105.
- Mostowy, S. und Cossart, P.** (2012). Septins: the fourth component of the cytoskeleton. *Nat Rev Mol Cell Biol* **13**, 183-94.
- Münchow, S., Sauter, C. und Jansen, R. P.** (1999). Association of the class V myosin Myo4p with a localised messenger RNA in budding yeast depends on She proteins. *J Cell Sci* **112 ( Pt 10)**, 1511-8.
- Nagaraj, S., Rajendran, A., Jackson, C. E. und Longtine, M. S.** (2008). Role of nucleotide binding in septin-septin interactions and septin localization in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **28**, 5120-37.
- Nagata, K., Kawajiri, A., Matsui, S., Takagishi, M., Shiromizu, T., Saitoh, N., Izawa, I., Kiyono, T., Itoh, T. J., Hotani, H. und Inagaki, M.** (2003). Filament formation of MSF-A, a mammalian septin, in human mammary epithelial cells depends on interactions with microtubules. *J Biol Chem* **278**, 18538-43.
- Nam, S. C., Sung, H., Kang, S. H., Joo, J. Y., Lee, S. J., Chung, Y. B., Lee, C. K. und Song, S.** (2007). Phosphorylation-dependent septin interaction of Bni5 is important for cytokinesis. *J Microbiol* **45**, 227-33.
- Nguyen, T. Q., Sawa, H., Okano, H. und White, J. G.** (2000). The *C. elegans* septin genes, *unc-59* and *unc-61*, are required for normal postembryonic cytokineses and morphogenesis but have no essential function in embryogenesis. *J Cell Sci* **113 Pt 21**, 3825-37.
- Nishihama, R., Onishi, M. und Pringle, J. R.** (2011). New insights into the phylogenetic distribution and evolutionary origins of the septins. *Biol Chem* **392**, 681-7.
- Norden, C., Liakopoulos, D. und Barral, Y.** (2004). Dissection of septin actin interactions using actin overexpression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol* **53**, 469-83.
- Oegema, K., Desai, A., Wong, M. L., Mitchison, T. J. und Field, C. M.** (1998). Purification and assay of a septin complex from *Drosophila* embryos. *Methods Enzymol* **298**, 279-95.

- Oegema, K., Savoian, M. S., Mitchison, T. J. und Field, C. M. (2000). Functional analysis of a human homologue of the *Drosophila* actin binding protein anillin suggests a role in cytokinesis. *J Cell Biol* **150**, 539-52.
- Oida, T., Sako, Y. und Kusumi, A. (1993). Fluorescence lifetime imaging microscopy (flimscopy). Methodology development and application to studies of endosome fusion in single cells. *Biophys J* **64**, 676-85.
- Palacios, I. M. (2007). How does an mRNA find its way? Intracellular localisation of transcripts. *Semin Cell Dev Biol* **18**, 163-170.
- Palacios, I. M. (2014). Hop-on hop-off: polysomes take a tour of the cell on endosomes. *J Cell Biol* **204**, 287-9.
- Pan, F., Malmberg, R. L. und Momany, M. (2007). Analysis of septins across kingdoms reveals orthology and new motifs. *BMC Evol Biol* **7**, 103.
- Paquin, N., Menade, M., Poirier, G., Donato, D., Drouet, E. und Chartrand, P. (2007). Local activation of yeast *ASH1* mRNA translation through phosphorylation of Khd1p by the casein kinase Yck1p. *Mol Cell* **26**, 795-809.
- Parry, D. A., Fraser, R. D. und Squire, J. M. (2008). Fifty years of coiled-coils and alpha-helical bundles: a close relationship between sequence and structure. *J Struct Biol* **163**, 258-69.
- Peñalva, M. Á. (2010). Endocytosis in filamentous fungi: Cinderella gets her reward. *Curr Opin Microbiol* **13**, 684-692.
- Perez-Martin, J., Castillo-Lluva, S., Sgarlata, C., Flor-Parra, I., Mielnichuk, N., Torreblanca, J. und Carbo, N. (2006). Pathocycles: *Ustilago maydis* as a model to study the relationships between cell cycle and virulence in pathogenic fungi. *Mol Genet Genomics* **276**, 211-29.
- Pohlmann, T., Baumann, S., Haag, C., Albrecht, M. und Feldbrügge, M. (2015). A FYVE zinc finger domain protein specifically links mRNA transport to endosome trafficking. *Elife* **4**.
- Rhee, H.-W., Zou, P., Udeshi, N. D., Martell, J. D., Mootha, V. K., Carr, S. A. und Ting, A. Y. (2013). Proteomic Mapping of Mitochondria in Living Cells via Spatially-Restricted Enzymatic Tagging. *Science (New York, N.Y.)* **339**, 1328-1331.
- Riedl, J., Crevenna, A. H., Kessenbrock, K., Yu, J. H., Neukirchen, D., Bista, M., Bradke, F., Jenne, D., Holak, T. A., Werb, Z., Sixt, M. und Wedlich-Söldner, R. (2008). Lifeact: a versatile marker to visualize F-actin. *Nat Meth* **5**, 605-607.
- Rink, J., Ghigo, E., Kalaidzidis, Y. und Zerial, M. (2005). Rab conversion as a mechanism of progression from early to late endosomes. *Cell* **122**, 735-49.
- Robertson, C., Church, S. W., Nagar, H. A., Price, J., Hall, P. A. und Russell, S. E. H. (2004). Properties of SEPT9 isoforms and the requirement for GTP binding. *J Pathol* **203**, 519-527.
- Roux, K. J., Kim, D. I., Raida, M. und Burke, B. (2012). A promiscuous biotin ligase fusion protein identifies proximal and interacting proteins in mammalian cells. *J Cell Biol* **196**, 801-810.
- Saarikangas, J. und Barral, Y. (2011). The emerging functions of septins in metazoans. *EMBO Rep* **12**, 1118-26.



- Sadian, Y., Gatsogiannis, C., Patasi, C., Hofnagel, O., Goody, R. S., Farkasovsky, M. und Raunser, S.** (2013). The role of Cdc42 and Gic1 in the regulation of septin filament formation and dissociation. *Elife* **2**, e01085.
- Sambrook, J., Frisch, E. F. und Maniatis, T.** (1989). Molecular Cloning: A Laboratory Manual. *Cold Spring Harbour Laboratory Press Cold Spring Harbour, New York, USA*.
- Saville, B. J., Donaldson, M.E., Doyle, C.E.** (2012). Investigating Host Induced Meiosis in a Fungal Plant Pathogen. *Swan, A, editor. Meiosis - Molecular mechanisms and cytogenetic diversity. Rijeka:InTech*, 411-460.
- Scherer, M., Heimel, K., Starke, V. und Kämper, J.** (2006). The Clp1 Protein Is Required for Clamp Formation and Pathogenic Development of *Ustilago maydis*. *The Plant Cell Online* **18**, 2388-2401.
- Schink, K. O. und Bölker, M.** (2009). Coordination of cytokinesis and cell separation by endosomal targeting of a Cdc42-specific guanine nucleotide exchange factor in *Ustilago maydis*. *Mol Biol Cell* **20**, 1081-8.
- Schmid, M., Jaedicke, A., Du, T. G. und Jansen, R. P.** (2006). Coordination of endoplasmic reticulum and mRNA localization to the yeast bud. *Curr Biol* **16**, 1538-43.
- Schmidt, K. und Nichols, B. J.** (2004). Functional interdependence between septin and actin cytoskeleton. *BMC Cell Biol* **5**, 43.
- Schulz, B., Banuett, F., Dahl, M., Schlesinger, R., Schäfer, W., Martin, T., Herskowitz, I. und Kahmann, R.** (1990a). The b alleles of *U. maydis*, whose combinations program pathogenic development, code for polypeptides containing a homeodomain-related motif. *Cell* **60**, 295-306
- Schulz, B., Banuett, F., Dahl, M., Schlesinger, R., Schäfer, W., Martin, T., Herskowitz, I. und Kahmann, R.** (1990b). The b alleles of *U. maydis*, whose combinations program pathogenic development, code for polypeptides containing a homeodomain-related motif. *Cell* **60**, 295-306.
- Schuster, M., Kilaru, S., Ashwin, P., Lin, C., Severs, N. J. und Steinberg, G.** (2011a). Controlled and stochastic retention concentrates dynein at microtubule ends to keep endosomes on track. *EMBO J* **30**, 652-64.
- Schuster, M., Kilaru, S., Fink, G., Collemare, J., Roger, Y. und Steinberg, G.** (2011b). Kinesin-3 and dynein cooperate in long-range retrograde endosome motility along a nonuniform microtubule array. *Mol Biol Cell* **22**, 3645-57.
- Sharp, J. A., Plant, J. J., Ohsumi, T. K., Borowsky, M. und Blower, M. D.** (2011). Functional analysis of the microtubule-interacting transcriptome. *Mol Biol Cell* **22**, 4312-23.
- Shcheprova, Z., Baldi, S., Frei, S. B., Gonnet, G. und Barral, Y.** (2008). A mechanism for asymmetric segregation of age during yeast budding. *Nature* **454**, 728-34.
- Sheffield, P. J., Oliver, C. J., Kremer, B. E., Sheng, S., Shao, Z. und Macara, I. G.** (2003). Borg/septin interactions and the assembly of mammalian septin heterodimers, trimers, and filaments. *J Biol Chem* **278**, 3483-8.

- Shen, Z., St-Denis, A. und Chartrand, P.** (2010). Cotranscriptional recruitment of She2p by RNA pol II elongation factor Spt4-Spt5/DSIF promotes mRNA localization to the yeast bud. *Genes Dev* **24**, 1914-26.
- 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.
- Sirajuddin, M., Farkasovsky, M., Hauer, F., Kühlmann, D., Macara, I. G., Weyand, M., Stark, H. und Wittinghofer, A.** (2007). Structural insight into filament formation by mammalian septins. *Nature* **449**, 311-5.
- Sirajuddin, M., Farkasovsky, M., Zent, E. und Wittinghofer, A.** (2009). GTP-induced conformational changes in septins and implications for function. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 16592-7.
- Snetselaar, K. M., Bölker, M. und Kahmann, R.** (1996). *Ustilago maydis* Mating Hyphae Orient Their Growth toward Pheromone Sources. *Fungal Genet Biol* **20**, 299-312.
- Southern, E. M.** (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* **98**, 503-17.
- Spellig, T., Bölker, M., Lottspeich, F., Frank, R. W. und Kahmann, R.** (1994). Pheromones trigger filamentous growth in *Ustilago maydis*. *EMBO J* **13**, 1620-7.
- Spiliotis, E. T.** (2010). Regulation of microtubule organization and functions by septin GTPases. *Cytoskeleton (Hoboken)* **67**, 339-45.
- Spiliotis, E. T., Hunt, S. J., Hu, Q., Kinoshita, M. und Nelson, W. J.** (2008). Epithelial polarity requires septin coupling of vesicle transport to polyglutamylated microtubules. *J Cell Biol* **180**, 295-303.
- Spiliotis, E. T., Kinoshita, M. und Nelson, W. J.** (2005). A mitotic septin scaffold required for Mammalian chromosome congression and segregation. *Science* **307**, 1781-5.
- Spiliotis, E. T. und Nelson, W. J.** (2006). Here come the septins: novel polymers that coordinate intracellular functions and organization. *J Cell Sci* **119**, 4-10.
- Sprang, S. R.** (1997). G protein mechanisms: insights from structural analysis. *Annu Rev Biochem* **66**, 639-78.
- St Johnston, D.** (2005). Moving messages: the intracellular localization of mRNAs. *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**, 363-375.
- Stahl, Y., Grabowski, S., Bleckmann, A., Kühnemuth, R., Weidtkamp-Peters, S., Pinto, K. G., Kirschner, G. K., Schmid, J. B., Wink, R. H., Hulsewede, A., Felekyan, S., Seidel, C. A. und Simon, R.** (2013). Moderation of Arabidopsis root stemness by CLAVATA1 and ARABIDOPSIS CRINKLY4 receptor kinase complexes. *Curr Biol* **23**, 362-71.

- Steels, J. D., Estey, M. P., Froese, C. D., Reynaud, D., Pace-Asciak, C. und Trimble, W. S.** (2007). Sept12 is a component of the mammalian sperm tail annulus. *Cell Motil Cytoskeleton* **64**, 794-807.
- Steinberg, G.** (2000). The cellular roles of molecular motors in fungi. *Trends Microbiol* **8**, 162-8.
- Steinberg, G.** (2007). On the move: endosomes in fungal growth and pathogenicity. *Nat Rev Micro* **5**, 309-316.
- Steinberg, G. und Perez-Martin, J.** (2008). *Ustilago maydis*, a new fungal model system for cell biology. *Trends Cell Biol* **18**, 61-7.
- Steinberg, G., Schliwa, M., Lehmler, C., Bölker, 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., Wedlich-Söldner, R., Brill, M. und Schulz, I.** (2001). Microtubules in the fungal pathogen *Ustilago maydis* are highly dynamic and determine cell polarity. *J Cell Sci* **114**, 609-22.
- 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.
- Tanaka-Takiguchi, Y., Kinoshita, M. und Takiguchi, K.** (2009). Septin-mediated uniform bracing of phospholipid membranes. *Curr Biol* **19**, 140-5.
- Tang, C. S. und Reed, S. I.** (2002). Phosphorylation of the septin cdc3 in g1 by the cdc28 kinase is essential for efficient septin ring disassembly. *Cell Cycle* **1**, 42-9.
- Tasto, J. J., Morrell, J. L. und Gould, K. L.** (2003). An anillin homologue, Mid2p, acts during fission yeast cytokinesis to organize the septin ring and promote cell separation. *J Cell Biol* **160**, 1093-1103.
- Teasdale, Rohan D. und Collins, Brett M.** (2012). Insights into the PX (phox-homology) domain and SNX (sorting nexin) protein families: structures, functions and roles in disease. *Biochemical Journal* **441**, 39-59.
- Terfrüchte, M., Joehnk, B., Fajardo-Somera, R., Braus, G. H., Riquelme, M., Schipper, K. und Feldbrügge, M.** (2014). Establishing a versatile Golden Gate cloning system for genetic engineering in fungi. *Fungal Genet Biol* **62**, 1-10.
- Tolliday, N., Bouquin, N. und Li, R.** (2001). Assembly and regulation of the cytokinetic apparatus in budding yeast. *Curr Opin Microbiol* **4**, 690-5.
- Tong, Z., Gao, X. D., Howell, A. S., Bose, I., Lew, D. J. und Bi, E.** (2007). Adjacent positioning of cellular structures enabled by a Cdc42 GTPase-activating protein-mediated zone of inhibition. *J Cell Biol* **179**, 1375-84.
- Tubing, F., Vendra, G., Mikl, M., Macchi, P., Thomas, S. und Kiebler, M. A.** (2010). Dendritically localized transcripts are sorted into distinct ribonucleoprotein particles that display fast directional motility along dendrites of hippocampal neurons. *J Neurosci* **30**, 4160-70.

- Vargas-Muniz, J. M., Renshaw, H., Richards, A. D., Lamoth, F., Soderblom, E. J., Moseley, M. A., Juvvadi, P. R. und Steinbach, W. J. (2015). The *Aspergillus fumigatus* septins play pleiotropic roles in septation, conidiation, and cell wall stress, but are dispensable for virulence. *Fungal Genet Biol* **81**, 41-51.
- Versele, M., Gullbrand, B., Shulewitz, M. J., Cid, V. J., Bahmanyar, S., Chen, R. E., Barth, P., Alber, T. und Thorner, J. (2004). Protein-protein interactions governing septin heteropentamer assembly and septin filament organization in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* **15**, 4568-83.
- Versele, M. und Thorner, J. (2004). Septin collar formation in budding yeast requires GTP binding and direct phosphorylation by the PAK, Cla4. *J Cell Biol* **164**, 701-15.
- Versele, M. und Thorner, J. (2005). Some assembly required: yeast septins provide the instruction manual. *Trends Cell Biol* **15**, 414-24.
- Virag, A. und Harris, S. D. (2006). The Spitzenkorper: a molecular perspective. *Mycol Res* **110**, 4-13.
- Vollmeister, E., Schipper, K., Baumann, S., Haag, C., Pohlmann, T., Stock, J. und Feldbrügge, M. (2012a). Fungal development of the plant pathogen *Ustilago maydis*. *FEMS Microbiol Rev* **36**, 59-77.
- Vollmeister, E., Schipper, K. und Feldbrügge, M. (2012b). Microtubule-dependent mRNA transport in the model microorganism *Ustilago maydis*. *RNA Biology* **9**, 261-268.
- Vrabioiu, A. M., Gerber, S. A., Gygi, S. P., Field, C. M. und Mitchison, T. J. (2004). The majority of the *Saccharomyces cerevisiae* septin complexes do not exchange guanine nucleotides. *J Biol Chem* **279**, 3111-8.
- Walker, L. R., Hussein, H. A. und Akula, S. M. (2016). Subcellular fractionation method to study endosomal trafficking of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. *Cell Biosci* **6**, 1.
- Wang, C., Han, B., Zhou, R. und Zhuang, X. (2016). Real-Time Imaging of Translation on Single mRNA Transcripts in Live Cells. *Cell* **165**, 990-1001.
- Warena, A. J., Kauffman, S., Sherrill, T. P., Becker, J. M. und Konopka, J. B. (2003). *Candida albicans* Septin Mutants Are Defective for Invasive Growth and Virulence. *Infect Immun* **71**, 4045-4051.
- Weatheritt, R. J., Gibson, T. J. und Babu, M. M. (2014). Asymmetric mRNA localization contributes to fidelity and sensitivity of spatially localized systems. *Nat Struct Mol Biol* **21**, 833-9.
- Wedlich-Söldner, R., Bölder, M., Kahmann, R. und Steinberg, G. (2000). A putative endosomal t-SNARE links exo- and endocytosis in the phytopathogenic fungus *Ustilago maydis*. *EMBO J* **19**, 1974-86.
- Weems, A. D., Johnson, C. R., Argueso, J. L. und McMurray, M. A. (2014). Higher-order septin assembly is driven by GTP-promoted conformational changes: evidence from unbiased mutational analysis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **196**, 711-27.

- Weidtkamp-Peters, S., Felekyan, S., Bleckmann, A., Simon, R., Becker, W., Kühnemuth, R. und Seidel, C. A.** (2009). Multiparameter fluorescence image spectroscopy to study molecular interactions. *Photochem Photobiol Sci* **8**, 470-80.
- Weirich, C. S., Erzberger, J. P. und Barral, Y.** (2008). The septin family of GTPases: architecture and dynamics. *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**, 478-89.
- Wloka, C., Nishihama, R., Onishi, M., Oh, Y., Hanna, J., Pringle, J. R., Krauss, M. und Bi, E.** (2011). Evidence that a septin diffusion barrier is dispensable for cytokinesis in budding yeast. *Biol Chem* **392**, 813-29.
- Wu, B., Eliscovich, C., Yoon, Y. J. und Singer, R. H.** (2016). Translation dynamics of single mRNAs in live cells and neurons. *Science* **352**, 1430-1435.
- Xie, H., Surka, M., Howard, J. und Trimble, W. S.** (1999). Characterization of the mammalian septin H5: distinct patterns of cytoskeletal and membrane association from other septin proteins. *Cell Motil Cytoskeleton* **43**, 52-62.
- Xie, Y., Vessey, J. P., Konecna, A., Dahm, R., Macchi, P. und Kiebler, M. A.** (2007). The GTP-binding protein Septin 7 is critical for dendrite branching and dendritic-spine morphology. *Curr Biol* **17**, 1746-51.
- Yan, X., Hoek, Tim A., Vale, Ronald D. und Tanenbaum, Marvin E.** (2016). Dynamics of Translation of Single mRNA Molecules In Vivo. *Cell* **165**, 976-989.
- Yoon, Y. J. und Mowry, K. L.** (2004). *Xenopus* Staufen is a component of a ribonucleoprotein complex containing *Vg1* RNA and kinesin. *Development* **131**, 3035-45.
- Zander, S., Baumann, S., Weidtkamp-Peters, S. und Feldbrügge, M.** (2016). Endosomal assembly and transport of heteromeric septin complexes promote septin cytoskeleton formation. *J Cell Sci* **129**, 2778-2792.
- Zhang, J., Kong, C., Xie, H., McPherson, P. S., Grinstein, S. und Trimble, W. S.** (1999). Phosphatidylinositol polyphosphate binding to the mammalian septin H5 is modulated by GTP. *Curr Biol* **9**, 1458-67.

## 6. Ergänzende Daten

Auf dem beiliegenden Datenträger befinden sich ergänzende Filme, die zum Teil für die Erstellung von Kymographen verwendet worden sind. Die Filme sind in den relevanten Abbildungen gekennzeichnet. Außerdem befindet sich eine elektronische Version dieser Arbeit auf dem Datenträger.

## Danksagung

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

Zunächst einmal geht ein großes Danke an Prof. Dr. Michael Feldbrügge für die super Betreuung und das vielfältige Projekt. Danke Michael, dass du immer ein offenes Ohr für mich hattest und mir mit Ratschlägen und deinen Ideen weitergeholfen und zur Seite standst. Ich möchte mich auch für die wahnsinnig tolle Organisation des Labors bedanken. Die zahlreichen Listen haben mein Leben ungemein vereinfacht.

Ich danke Prof. Dr. Heiner Schaal für die Übernahme des Zweitgutachtens sowie der Betreuung meiner Arbeit im Rahmen der MOI. Ebenso für viele unterhaltsame Stunden bei diversen Meetings und auch für deine interessierten Fragen. Der Jürgen Manchot Stiftung danke ich für meine Finanzierung im Rahmen der MOI. Vielen Dank auch an Dr. Inge Krümpelbeck für die hervorragende Koordination und Organisation der Graduiertenschule.

Ein großer Dank geht an meine Kollegin und sehr gute Freundin Lilli. Ich danke dir für die unzähligen Mittagessen und „Frust“-Bierchen, deine Unterstützung und Motivation, das Korrekturlesen dieser Arbeit, deine Ehrlichkeit und Offenheit. Mit dir waren die schwierigen Phasen dieser Arbeit viel einfacher zu überstehen. Ich danke Sebastian, der mich in die geheimnisvolle Welt des Mikroskopierens eingearbeitet hat und mir immer mit Rat, Tat und neuen Ideen beiseite stand. Danke für deine Zuversicht, dass ich eines Tages das Mikroskop bedienen konnte.

Meinen Bürokollegen Ben, Silke und Kira danke ich für viele alberne Momente im Labor, eine tolle Arbeitsatmosphäre und die vielen „kleinen“ Gefallen, die ihr mir hin und wieder getan habt. Ich danke Marius, für die unzähligen Anekdoten die den Laboralltag ergänzt haben und die freundlichen Begrüßungen und Aufmunterungen am Morgen. Vielen Dank an Ben, Carl und Thomas, dass ihr eure Erfahrungen und euer Wissen mit mir geteilt habt und mir immer wieder Mut gemacht habt. Ich möchte mich auch bei Simone und Ute für eure Unterstützung im Labor und die Beantwortung vieler dämlicher „Wo ist denn...“ „Wo finde ich...“ Fragen bedanken. Danke Janpeter für die Organisation zahlreicher Grillabende, deine Speck-Gerichte und unsere geteilte Freude am Eis essen und Karneval feiern. Außerdem bedanke ich mich bei Katie für das Korrekturlesen zahlreicher Abstracts oder Reports. Ich danke Sebastian, Lilli, Ben und Thomas für das Korrekturlesen dieser Arbeit, eure ehrlichen Kommentare und zahlreichen Tipps. Ohne euch hätte ich das echt nicht geschafft.

Ich bedanke mich auch bei allen anderen Mitgliedern und ehemaligen Mitgliedern des Instituts, ihr seid echt ein gutes Team. Danke für die tolle Zusammenarbeit und die angenehme Stimmung im Labor, im Büro, bei Seminaren, beim gemeinschaftlichen Essen, beim Sekt trinken, beim Karneval feiern und bei den Grillabenden.

Des Weiteren bedanke ich mich bei meinen Eltern, meiner Schwester und meinen Freunden, die mich mein Leben lang unterstützt und für viele Momente gesorgt haben, die mich den Laboralltag vergessen ließen.

Ein ganz großen Dank an meinen Mann Moritz, der mich auch in schwierigen Phasen immer unterstützt und motiviert hat und meine Macken und mein „nicht ausgelastet sein“ in der Zeit des Schreibens ertragen hat. Danke.

## Lebenslauf

### PERSÖNLICHE DATEN

**Sabrina Zander geb. Haenlein**

Geboren 02.10.1987

Geburtsort Düsseldorf

### SCHULISCHE UND UNIVERSITÄRE AUSBILDUNG

- 10/2012 – heute **Promotionsstudium Biologie**  
Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf, Institut für Mikrobiologie,  
Prof. Dr. Michael Feldbrügge  
Thema der Dissertation : „Analyse von Septinen während des hyphalen  
Wachstums in *Ustilago maydis*“
- 10/2010 – 08/2012 **Master of Science Biology**  
Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf  
Thema der Masterarbeit: „Heterologe Expression von Adhäsionsproteinen  
verschiedener Pilze in *Pichia pastoris*“  
Durchgeführt bei der Firma Henkel AG & Co. KGaA, HSA - Corporate  
Scientific Services, Microbiology & Product Safety in Düsseldorf
- 10/2007 – 09/2010 **Bachelor of Science Biology**  
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf  
Thema der Bachelorarbeit: „Charakterisierung der Funktion des Gens  
*lethal(2)giant discs* während der Autophagy und Endozytose in *Drosophila  
melanogaster*“  
Durchgeführt am Institut für Genetik
- 08/1998 – 07/2007 **Allgemeine Hochschulreife**  
Max-Planck-Gymnasium, Düsseldorf

### PUBLIKATIONEN

**S. Zander\***, S. Baumann\*, S. Weidtkamp-Peters and M. Feldbrügge (2016)  
Endosomal assembly and transport of heteromeric septin complexes promote septin  
cytoskeleton formation. J. Cell Sci. 129, 2778-2792

S. Baumann\*, **S. Zander\***, S. Weidtkamp-Peters and M. Feldbrügge (2016)  
Live cell imaging of septin dynamics in *Ustilago maydis*.  
Methods in Cell Biol. Septins, ed. Amy Gladfelter, Elsevier, 136, 143-159

\* geteilte Erstautorenschaft

### STIPENDIEN UND PROGRAMME

- 05/2014-heute **SelmaMeyerMentoring Programm**  
Mentoring Programm für junge weibliche Akademikerinnen,  
einschließlich Workshops in Mitarbeiterführung und  
Konfliktmanagement
- 04/2013-heute **Promotionsstipendium der MOI II Graduiertenschule (Moleküle der  
Infektion)**  
Interdisziplinäre Graduiertenschule mit Vorlesungen in Immunologie  
und Infektiologie, Organisation und Umsetzung von Symposien, Training  
von Softskills und schreiben von Berichten
- 10/2012-heute **iGRAD (Interdisciplinary Graduate and Research Academy Düsseldorf)**  
Training von Softskills durch die Workshops: Good scientific practice,  
Presenting science, Get into teaching for doctoral researchers, Success  
in companies



## PRAKTIKA

- 08/2011 - 12/2011 **Pilotprojekt:** HSA - Corporate Scientific Services, Microbiology & Product Safety, Henkel AG & Co. KGaA, Düsseldorf  
Projektbeschreibung: Identifikation verschiedener Mikroben aus Abflüssen und Böden mit Hilfe des MALDI-Biotypers und Sequenzierung der IST-Region.
- 03/2010 - 05/2010 **Laborpraktikum:** Institute für Genetik, Heinrich-Heine-Universität  
Projektbeschreibung: Analyse von verschiedenen Endozytose/Autophagy Komponenten in *Drosophila melanogaster*.
- 08/2009 - 09/2009 **Praktikum:** NABU-Wasservogelreservat, Wallnau Fehmarn  
Projektbeschreibung: Führung von Gruppen durch das Wasservogelreservat inclusive Erklärungen verschiedener Vögel und deren Lebensweise.

## KONFERENZEN UND POSTER

- 06/2015 EMBO Conference on RNA Localization and Local Translation, Hersonissos, Griechenland  
Posterpräsentation: „Local translation of Septin-mRNAs on endosomes“
- 10/2013 Seeing is Believing - Imaging the process of Life, Heidelberg  
Posterpräsentation: „Applying RNA live imaging to study endosomal mRNA transport“
- 03/2013 64. Mosbacher Kolloquium Membranes in Motion, Mosbach  
Posterpräsentation: „Applying the yeast three-hybrid system to investigate *in vivo* RNA-binding affinities of lambda-N peptides“