

**Analyse des unkonventionellen
Sekretionsmechanismus
der Chitinase Cts1 aus
*Ustilago maydis***

Inaugural-Dissertation

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

vorgelegt von

Jörn Aschenbroich

aus Ratingen

Düsseldorf, Mai 2019

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

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

Erstgutachter: Prof. Dr. Michael Feldbrügge

Zweitgutachter: Dr. Nicole Linka

Tag der mündlichen Prüfung: _____

Eidesstattliche Erklärung

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

Ort, Datum

Jörn Aschenbroich

Die Untersuchungen zur vorliegenden Arbeit wurden von Dezember 2014 bis Dezember 2018 in Düsseldorf an der Heinrich-Heine-Universität im Institut für Mikrobiologie unter der Betreuung von Herrn Prof. Dr. Michael Feldbrügge durchgeführt.

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht in:

Aschenbroich, J., Hussnaetter, K. P., Stoffels, P., Langner, T., Zander, S., Sandrock, B., Bölker, M., Feldbrügge, M. und Schipper, K. (2018). The germinal centre kinase Don3 is crucial for unconventional secretion of chitinase Cts1 in *Ustilago maydis*. *Biochim Biophys Acta Proteins Proteom.*, S1570–9639(18)30176-6.

Weiterer wissenschaftlicher Beitrag:

Ökmen, B., Kemmerich, B., Hilbig, D., Wemhöner, R., Aschenbroich, J., Perrar, A., Huesgen, P. F., Schipper, K. und Doehlemann, G. (2018). Dual function of a secreted fungalysin metalloprotease in *Ustilago maydis*. *New Phytol.*, **220**(1):249–261.

Zusammenfassung

Der konventionelle Sekretionsweg von eukaryotischen Proteinen beginnt mit dem Signalpeptid-abhängigen Eintritt ins Endoplasmatische Retikulum, in dem Prozesse zur Faltung und *N*-Glykosylierung erfolgen. Die intrazelluläre Route des sekretorischen Proteins setzt sich im Transport zum Golgi-Apparat für weitere Prozessierungsschritte fort und endet mit der durch sekretorische Vesikel vermittelten Freisetzung an der Plasmamembran. Neben der konventionellen Proteinsekretion existiert eine Vielfalt an Exportmechanismen, die vom klassischen Weg durch das Endoplasmatische Retikulum und den Golgi-Apparat abweichen und unter dem Terminus *unkonventionelle Sekretion* zusammengefasst werden. Im Maisbeulenbrandpilz *Ustilago maydis* wird die Chitinase Cts1 unkonventionell sekretiert. Bisherige Untersuchungen belegten für die Chitinase eine Signalpeptid-unabhängige Sekretion mit einer spezifischen Akkumulation des Proteins im Teilungsbereich zwischen Mutter- und Tochterzelle. Das spezifische Lokalisationsmuster von Cts1 in der späten Zellteilungsphase weist dabei auf eine Freisetzung hin, die in dem Abschnitt des Zellzyklus stattfindet, bei dem Mutter- und Tochterzelle getrennt werden.

In dieser Arbeit wurde untersucht, ob die unkonventionelle Sekretion der Chitinase Cts1 im Zusammenhang mit der Zellteilung während des Zellzyklus steht. Mittels des Vergleichs der extrazellulären Aktivität der Chitinase und eines konventionell sekretierten Proteins, bei Arretierung des Zellzyklus, wurde eine Zellzyklus-abhängige Freisetzung von aktivem Cts1 nachgewiesen. Auf Grund des funktionalen Cts1-Exports in einigen Zellteilungsmutanten stellt die physische Trennung von Mutter- und Tochterzelle jedoch keine Voraussetzung für den Sekretionsprozess dar. Die Anwendungen der reversen Genetik und enzymatischer Aktivitätstests bewiesen den Einfluss zweier zuvor beschriebener Proteine auf die Sekretion der Chitinase. Bei Abwesenheit dieser an der sekundären Septenbildung beteiligten Proteine Don1 und Don3 sind die extrazellulären Aktivitäten von Cts1 und eines durch den Co-Export mit Cts1 freigesetzten Reporterproteins signifikant reduziert. Durch Quantifizierung der sekundären Septen in Zellteilungsmutanten wurde nachgewiesen, dass die Bildung des sekundären Septums jedoch nicht für die effektive Sekretion von aktivem Cts1 benötigt wird. Eine essentielle Rolle von Don3 in der Sekretion von Cts1 wurde mittels induzierter Expression von *don3* im Deletionshintergrund bestätigt. Für Don1 und Don3 wurden somit Hinweise für eine jeweils weitere Funktion abseits der Beteiligung an der sekundären Septenbildung ermittelt, die für die Sekretion der Chitinase erforderlich erscheint. Zudem konnte gezeigt werden, dass Don3 in geringen Mengen exportiert wird. Durch die Analysen in der vorliegenden Arbeit wurden somit weiterführende Erkenntnisse generiert, die zur Aufdeckung des unkonventionellen Sekretionsmechanismus von Cts1 in *U. maydis* beitragen.

Summary

The conventional secretory pathway of eukaryotic proteins is initiated by the signal peptide-dependent entry into the endoplasmic reticulum, in which processes for folding and *N*-glycosylation take place. The intracellular route of the secretory protein continues with the transport to the Golgi apparatus for further processing steps and ends with the release at the plasma membrane, mediated by secretory vesicles. In addition to the conventional secretion of proteins, a variety of export mechanisms exists that deviate from the classical pathway ER and Golgi apparatus and are summarized with the term *unconventional secretion*. The chitinase Cts1 is secreted unconventionally in the corn smut fungus *Ustilago maydis*. Previous studies have shown that the chitinase undergoes a signal peptide-independent secretion with a specific accumulation of the protein in the division zone between the mother and daughter cell. The specific localization pattern of Cts1 in the late cell division phase hints towards a release that takes place in the section of the cell cycle in which mother and daughter cells are separated.

In this work studies on the potential connection of unconventional chitinase Cts1 secretion to cell division during the cell cycle were conducted. By comparing the extracellular activities of the chitinase and a conventionally secreted protein during cell cycle arrest, cell cycle dependent release of active Cts1 was detected. However, due to the functional Cts1 export in some cell division mutants, physical separation of mother and daughter cells is not a prerequisite for the secretion process. Applications of reverse genetics and enzymatic activity assays confirmed the effect of two previously described proteins on the secretion of the chitinase. In the absence of Don1 and Don3, two proteins required for secondary septum formation, the extracellular activities of Cts1 and a reporter protein released by co-export with Cts1 are significantly reduced. By quantifying secondary septa in cell division mutants, it was demonstrated that the formation of secondary septa is not required for the effective secretion of active Cts1. An essential role of Don3 in the Cts1 secretion was confirmed by induced expression of *don3* in the deletion background. Thus, evidence for additional functions of both Don1 and Don3 apart from their involvement in secondary septa formation were obtained, which appear to be necessary for the secretion of the chitinase. In addition, it could be shown that Don3 is exported in small amounts. The results of the present study have generated further insights that contribute to deciphering the unconventional secretion mechanism of Cts1 in *U. maydis*.

Abkürzungen und Fachbegriffe

Δ	Delta (Deletion)	<i>in vitro</i>	im Glas
$^{\circ}\text{C}$	Grad Celsius	<i>in vivo</i>	im lebenden Organismus
μ	Mikro- (SI-Präfix)	k	Kilo- (SI-Präfix)
Abb.	Abbildung	kb	Kilobasen
Acetyl-CoA	Acetyl-Coenzym A	l	Liter
AM	Ammonium-Minimalmedium	m	Mili- (SI-Präfix)
Amp	Ampicillin	m	Meter
APS	Ammoniumperoxodisulfat	min	Minute(n)
Ara	Arabinose	M	Molar
AS	Aminosäure	MOPS	3-Morpholino-propansulfonsäure
ATP	Adenosintriphosphat	mRNS	<i>messenger</i> RNS
bp	Basenpaare	MUC	4-Methylumbelliferyl β -D-N,N',N''-triacetylchitotriosid
BSA	Bovines Serumalbumin	MUG	4-Methylumbelliferyl β -D-galactopyranoside
bzw.	beziehungsweise	n	Nano- (SI-Präfix)
Cbx	Carboxin	Nat	Nourseothrizin
CM	Vollmedium	NM	Nitrat-Minimalmedium
C-terminal	carboxyterminal	N-terminal	aminoterminal
CW	Calcofluor-White	OD ₆₀₀	optische Dichte (bei 600 nm)
Da	Dalton	ORF	offener Leserahmen
dATP	Desoxyadenosintriphosphat	p.a.	<i>pro analysi</i> , Reinheitsstufe
dCTP	Desoxycytosintriphosphat	PBS	<i>phosphate-buffered saline</i>
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat	PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
DIC	Differentialinterferenzkontrast	PEG	Polyethylenglycol
DIG	Digoxigenin	PM	Plasmamembran
DNS	Desoxyribonukleinsäure	PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat	PVDF	Polyvinylidenfluorid
DTT	Dithiothreitol	RFE	relative Fluoreszenzeinheiten
dTTP	Desoxythymidintriphosphat	RNS	Ribonukleinsäure
dUTP	Desoxyuridintriphosphat	RT	Raumtemperatur
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure	SDS	Natriumdodecylsulfat
<i>et. al.</i>	und andere	sec	Sekunde(n)
ER	endoplasmatisches Retikulum	SHH-Tag	Strep-TripleHA-Decahistidin-Tag
FRAP	<i>fluorescence recovery after photobleaching</i>	SP	Signalpeptid
<i>g</i>	Schwerebeschleunigung	Tab.	Tabelle
g	Gramm	TEMED	Tetramethylethylendiamin
Gfp	grün fluoreszierendes Protein	Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
GH	Glykosylhydrolase	U	Unit [$\mu\text{mol}/\text{min}$]
Gluk	Glukose	Upm	Umdrehungen pro Minute
h	Stunde(n)	UTR	untranslatierte Region
H ₂ O _{bid.}	zweifach destilliertes Wasser	UV	ultraviolettes Licht
HA	<i>human influenza hemagglutinin</i>	v/v	Volumenprozent
HRP	Meerrettichperoxidase	w/v	Gewichtsprozent
Hyg	Hygromycin	z. B.	zum Beispiel
Hz	Hertz	ZW	Zellwand

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	V
Summary.....	VI
Abkürzungen und Fachbegriffe	VII
Inhaltsverzeichnis	VIII
1. Einleitung.....	1
1.1 Proteinexport in eukaryotischen Organismen	1
1.1.1 Konventionelle Sekretion	1
1.1.2 Unkonventionelle Sekretion	7
1.1.2.1 Nicht-vesikuläre Transportmechanismen	9
1.1.2.2 Vesikuläre Transportmechanismen.....	12
1.2 Der Maisbeulenbrandpilz <i>Ustilago maydis</i>	16
1.2.1 Koordination der Zellteilung in haploiden Sporidien	22
1.2.2 Die Chitinase 1 als Beispiel für unkonventionelle Sekretion in <i>U. maydis</i>	25
1.3 Zielsetzung dieser Arbeit	28
2. Ergebnisse.....	29
2.1 Homologe Gene der sekretorischen Autophagie sind nicht am Export von Cts1 beteiligt.....	29
2.1.1 Identifizierung homologer Gene der sekretorischen Autophagie in <i>U. maydis</i>	29
2.1.2 Deletionen von homologen Genen der sekretorischen Autophagie zeigen keinen Einfluss auf die unkonventionelle Sekretion von Cts1.....	30
2.2 Die Sekretion von Cts1 erfolgt zellzyklusabhängig	33
2.2.1 Cts1 akkumuliert während des Zellzyklus in der Fragmentierungszone	33
2.2.2 Der Promotor von Cts1 deutet keine tochterzellspezifische Genexpression an.....	37
2.2.3 Cts1 wird in Filamenten über frühe Endosomen transportiert	40
2.2.4 Zellzyklusarrest inhibiert die unkonventionelle Sekretion von Cts1	46
2.3 Cts1-Sekretion ist unabhängig von der physischen Zellteilung	49
2.3.1 Charakterisierung der ausgeprägten Zellteilungsdefekte	50

2.3.2 In Stämmen mit Teilungsdefekt lokalisiert Cts1G an den Zellverbindungen	52
2.3.3 Extrazelluläre Cts1G-Aktivität ist in <i>don</i> -Mutanten reduziert	53
2.3.4 Sekundäre Septenbildung hat keinen Einfluss auf die Sekretion von Cts1G.....	57
2.4 Don3 mit spezifischer Funktion in der Cts1-Sekretion	58
2.4.1 Funktionelle Komplementation des <i>donΔ</i> -Phänotyps durch ektopische Überexpression	59
2.4.2 Don3 wird unkonventionell sekretiert	61
2.4.3 Eine nicht-funktionale FYVE-Domäne verringert die extrazelluläre Menge an Don1	64
2.4.4 Unkonventionelle Sekretion von Cts1 in <i>don</i> -Mutanten reduziert	71
2.4.5 Induzierte Genexpression von Don3 führt zur unkonventionellen Sekretion in <i>don3</i> -Mutanten	73
3. Diskussion	78
3.1 Die Sekretion von Cts1 zeigt keine Analogien zu bekannten Sekretionsmechanismen	78
3.2 Cts1 akkumuliert in der Fragmentierungszone und wird Zellzyklus-abhängig sekretiert.....	82
3.2.1 Der Transport von Cts1 zur Fragmentierungszone scheint sich vom Transport in Filamenten zu unterscheiden.....	84
3.2.2 Der Sekretionsmechanismus von Cts1 in Sporidien ist Zellzyklus-abhängig.....	89
3.3 Die unkonventionelle Sekretion von Cts1 ist abhängig von der Kinase Don3.....	93
3.3.1 Die Septierungsproteine Don1 und Don3 beeinflussen die Sekretion von Cts1	94
3.3.2 Die Kinase Don3 wird in geringen Mengen unkonventionell sekretiert	96
3.3.3 Funktionales Don3 wird für die Sekretion von Cts1 benötigt	99
3.4 Ausblick	101
4. Material und Methoden	104
4.1 Material und Bezugsquellen	104
4.1.1 Chemikalien, Enzyme, Kits	104
4.1.2 Lösungen, Puffer und Medien.....	105
4.1.3 Antibiotika.....	107

4.1.4 Oligonukleotide.....	107
4.1.5 Plasmide	110
4.1.6 Stämme.....	117
4.1.7 Computerprogramme und Bioinformatik	120
4.2 Mikrobiologische, genetische und zellbiologische Methoden	121
4.2.1 Arbeiten mit <i>E. coli</i>	121
4.2.2 Arbeiten mit <i>U. maydis</i>	123
4.3 Mikroskopische Analysen	126
4.3.1 Vorbereitung und Färbung von Präparaten.....	126
4.3.2 Fluoreszenzmikroskopie	127
4.3.3 Bearbeitung mikroskopischer Daten	128
4.4 Molekularbiologische Standardmethoden	129
4.4.1 Isolierung von Nukleinsäuren	129
4.4.2 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	131
4.4.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	131
4.4.4 Anwendungen zur Klonierung.....	132
4.4.5 Sequenzanalysen	134
4.4.6 Auftrennung und Nachweis von Nukleinsäuren	135
4.5 Biochemische Methoden	137
4.5.1 Herstellung von Gesamtzellextrakten	137
4.5.2 Präzipitation von Proteinen.....	138
4.5.3 Bestimmung des Proteingehalts	139
4.5.4 Auftrennung und Nachweis von Proteinen	139
4.5.5 Enzymatische Aktivitätstests	142
5. Literaturverzeichnis	146

1. Einleitung

1.1 Proteinexport in eukaryotischen Organismen

Für lebende Organismen ist der Proteinexport bzw. die Sekretion von Proteinen aus der Zelle in den extrazellulären Raum ein essentieller Prozess, welcher zahlreiche, durch zelluläre Proteine vermittelte Schritte umfasst (Delic *et al.*, 2013). In Prokaryoten wird der Transport von Proteinen aus der Zelle durch eine Vielzahl unterschiedlicher Sekretionssysteme beschrieben (Economou *et al.*, 2013; Green und Meccas, 2016). Hingegen kann der Export von Proteinen in eukaryotischen Organismen übergeordnet in konventionelle und unkonventionelle Sekretion unterteilt werden (Abrahamsen und Stenmark 2010). Steigende Nachfragen in der effizienten Proteinherstellung in Bezug auf die Sekretionskapazität des Produktionswirtes bei biotechnologischen Anwendungen begründen die Relevanz für die Untersuchung von Proteinsekretion ökonomisch. Zusätzlich bietet die Gewinnung eines Modellverständnis vom Proteinexport das Potential, Krankheiten, die wie Alzheimer auf Sekretionsvorgängen beruhen, besser zu verstehen (Coughlan und Brodsky, 2005; Delic *et al.*, 2013). Während sich die konventionelle Sekretion durch die vorgegebene Reihenfolge von Interaktionen mit spezifischen zellulären Kompartimenten auszeichnet, ist die unkonventionelle Sekretion durch zahlreiche Varianten abseits der konventionellen Sekretion charakterisiert. Die Notwendigkeit, beide Sekretionswege in Hinblick auf den Proteinexport zu berücksichtigen, ergibt sich aus der der Tatsache, dass einerseits die Mehrheit aller sekretorischen Proteine in Eukaryoten auf dem konventionellen Sekretionsweg ausgeschleust werden, dies jedoch nicht die erhebliche Anzahl von Proteinen ohne Signalpeptid im Sekretom der Organismen erklärt (Gee, *et al.*, 2018; Nickel 2010; Nickel und Rabouille 2008; Rabouille *et al.*, 2012; Rabouille, 2017). Nachfolgend werden beide Arten der eukaryotischen Sekretion im Detail beschrieben.

1.1.1 Konventionelle Sekretion

Einer der meist untersuchten Prozesse in eukaryotischen Zellen beschreibt den Vorgang der konventionellen Sekretion von Proteinen (Gee *et al.*, 2018). Ein Organismus, dem in diesem Zusammenhang auch im Hinblick auf industrielle Anwendbarkeit bzw. rekombinanter Proteinproduktion besondere Beachtung geschenkt wurde, ist der Modellorganismus *Saccharomyces cerevisiae* (Delic *et al.*, 2013; Fitzgerald und Glick, 2014; Gee *et al.*, 2018; Idiris *et al.*, 2010; Petranovic *et al.*, 2013). Insgesamt weist die konventionelle Sekretion aber von Hefen bis hin zu höheren Eukaryoten in ihren Kernfunktionen große Ähnlichkeiten auf (Delic *et al.*, 2013). Mit dem Eintritt in das Endoplasmatische Retikulum (ER) beginnt der konventionelle Sekretionsweg (Lee *et al.*, 2004). Eine gemeinsame Eigenschaft von

Proteinen, welche mittels des konventionellen Sekretionswegs exportiert werden, stellt die Anwesenheit eines N-terminalen Signalpeptids dar. Signalpeptide umfassen 16 bis 30 Aminosäuren, von denen gewöhnlich sechs bis zwölf hydrophobe Aminosäuren von einer oder mehreren positiv geladenen Aminosäuren umgeben sind (Benham, 2012). Die anschließende Translokation des Polypeptids an einem als Sec-Translokon bezeichneten Proteinkomplex des ERs kann sowohl co-translational als auch post-translational erfolgen (Akopian *et al.*, 2013; Delic *et al.*, 2013; Johnson und van Waes, 1999). Die Assoziation mehrerer Transmembranproteine am ER führt zur Bildung einer als Translokon bezeichneten Pore, durch die sekretorische Proteine vom Cytoplasma ins Lumen des ERs gelangen (Johnson und van Waes 1999).

Ein wesentliches Merkmal der co-translationalen Translokation ist die unmittelbare Interaktion des Signalpeptids am N-Terminus des naszierenden Polypeptids mit dem Signalerkennungspartikel (*engl.*: signal recognition partikel; SRP) und die anschließende Bindung am entsprechenden SRP-Rezeptor der ER Membran (Abb. 1.1 B; Akopian *et al.*, 2013; Benham, 2012). Mit Bindung des SRPs am Signalpeptid des am Ribosom hervortretenden neusynthetisierten Polypeptids wird zunächst die Translation angehalten, bis der gesamte Komplex aus entstandener Aminosäurekette, Ribosom und am Signalpeptid gebundenem SRP an das Translokon des ERs assoziiert (Delic *et al.*, 2013; Ng *et al.*, 1996). In Benham (2012) wird der Arrest der Translation als Notwendigkeit beschrieben, um das naszierende Polypeptid bis zur Interaktion mit einem verfügbaren SRP-Rezeptor Translokations-kompetent zu halten, sodass die Synthese des Polypeptids in einem für die Sekretion nicht geeigneten Kompartiment verhindert wird.

Auch wenn der Mechanismus der co-translationalen Translokation auf die meisten in Eukaryoten sekretierten Proteine zutrifft, so werden einige Proteine ebenfalls mittels eines post-translationalen Mechanismus ins ER transloziert, welcher mittlerweile in allen Organismen, einschließlich Säugerzellen, beschrieben ist (Benham, 2012; Delic *et al.*, 2013; Plath und Rapoport, 2000). Dabei erfolgt dieser Mechanismus SRP-unabhängig (Abb. 1.1 A; Delic *et al.*, 2013; Ng *et al.*, 1996). Es wird angenommen, dass die post-translational Translokation kleinerer Proteine dadurch zustande kommt, dass die Translation zeitlich bereits vollzogen, das Terminations-Codon erreicht und die Polypeptidkette vom Ribosom freigesetzt wird, bevor das SRP das Signalpeptid erreicht (Shao und Hedge, 2013). Für den späteren Eintritt ins ER muss die Polypeptidkette in einem ungefalteten bzw. lediglich locker gefalteten Zustand gehalten werden. In *S. cerevisiae* wird dies durch die Bindung an die cytoplasmatischen Co-Chaperone Ssa1 und Ydj1 erreicht (Delic *et al.*, 2013; Plath und Rapoport, 2000).

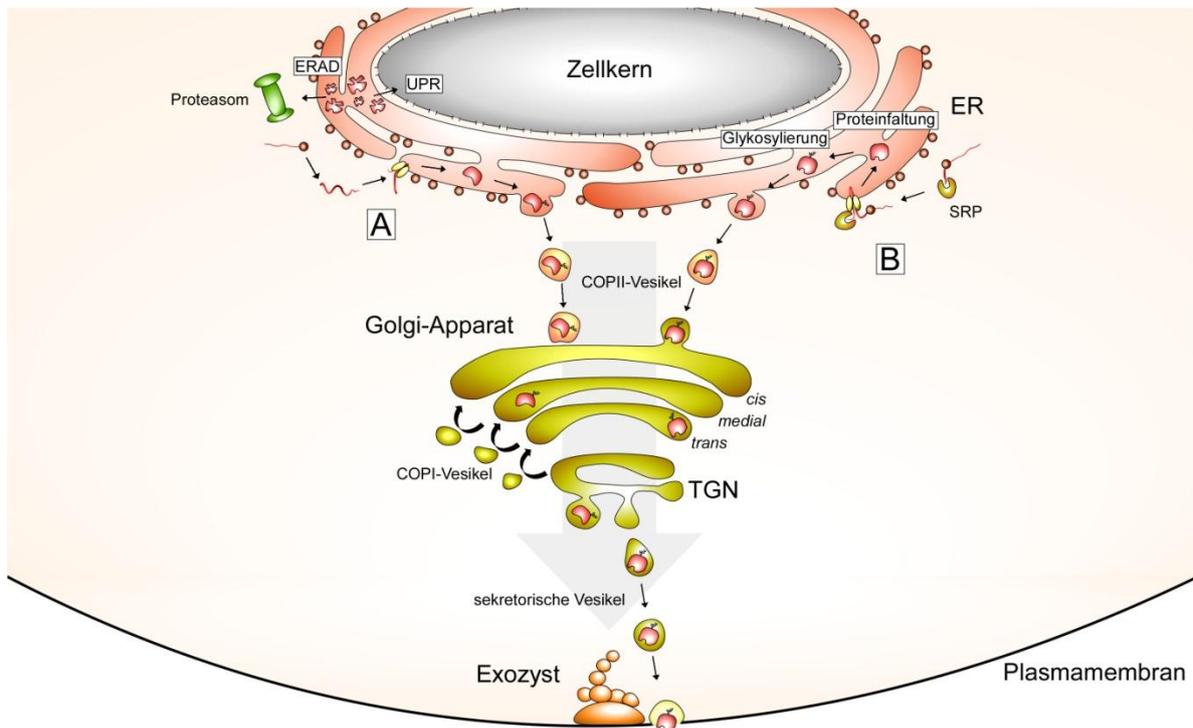


Abb. 1.1: Die konventionelle Sekretion in Eukaryoten. Über den konventionellen Weg sekretierte Proteine besitzen in der Aminosäuresequenz am N-Terminus ein Signalpeptid, welches den Eintritt ins Endoplasmatische Retikulum (ER) vermittelt. Im Gegensatz zur post-translationalen Translokation (A), bei der das vollständig synthetisierte Polypeptid ins ER translokalisiert, interagiert bei der co-translationalen Translokation (B) das N-terminale Signalpeptid des am Ribosom hervortretenden, naszierenden Polypeptids mit dem Signalerkennungspartikel (*engl.*: signal recognition partikel; SRP), wodurch die Synthese des Polypeptids zeitweise arretiert wird. Anschließend bindet der Komplex am SRP-Rezeptor der ER-Membran und die Polypeptidsynthese wird am Translokon fortgesetzt. Innerhalb des ERs erfolgt die Proteinfaltung und *N*-Glykosylierung des sekretorischen Proteins. In niederen Eukaryoten wie *S. cerevisiae* wird zudem die *O*-Glykosylierung im ER vollzogen, während dieser Prozessierungsschritt in Säugerzellen im Golgi-Apparat stattfindet. Zur Vermeidung von zellulärem Stress kann akkumuliertes und fehlgefaltetes Protein mittels ER-assoziiierter Degradation (*engl.*: ER-associated degradation; ERAD) zum Abbau durch Proteasomen ins Cytosol transportiert und die „ungefaltete Proteinantwort“ (*engl.*: unfolded protein response; UPR) induziert werden. Vom ER werden die sekretorischen Proteine mittels „Coat Protein Complex II“ (COPII)-Vesikel anterograd zum Golgi-Apparat übermittelt, in welchem weitere posttranslationale Modifikationen am Protein erfolgen können. Über Vesikeltransport entlang der *cis*-, *medial*- und *trans*-Regionen des Golgi-Apparats gelangen die sekretorischen Proteine zum *trans*-Golgi-Netzwerk (TGN). Zur Regeneration werden Proteine des Golgi-Apparats retrograd über COPI-Vesikel weitergeleitet. Am TGN werden die sekretorischen Proteine innerhalb sekretorischer Vesikel zum Exozytose transportiert, der die Fusion der sekretorischen Vesikel mit der Plasmamembran und folglich die Freisetzung des konventionell sekretierten Proteins in den extrazellulären Raum vermittelt. Abbildung anhand der im Text aufgeführten Bezugsquellen generiert; größtenteils nach Akopian *et al.* (2013); Benham (2012), Delic *et al.* (2013) und Parodi (2000).

Das im ER-Lumen lokalisierte, zur Familie der Hitzeschockproteine 70 kDa Chaperone (Hsp70) gehörende Protein Kar2 in *S. cerevisiae* bzw. dessen Homolog BiP in Säugerzellen ist sowohl an der co- als auch in der post-translationalen Translokation beteiligt und zieht mit weiteren Co-Chaperonen das ungefaltete Polypeptid ins Lumen des ERs (Brodsky *et al.*, 1995; Delic *et al.*, 2013). Zudem sind weitere für den konventionellen Sekretionsweg relevante Proteine, wie die Signalpeptidase zur Abspaltung des Signalpeptids oder die

Oligosaccharyltransferase (OST) zur Glykosylierung des Polypeptids, in der Nähe des Translokons lokalisiert (Benham 2012; Delic *et al.*, 2013; Johnson und van Waes 1999). Innerhalb des ERs erfolgt schließlich die Proteinfaltung und Glykosylierung des Polypeptids. Proteine, die über den konventionellen Sekretionsweg aus der Zelle exportiert werden, erhalten somit ihre Sekundär- und Tertiär- bzw. Quartärstruktur erst nach Eintritt in das ER (Hurtley und Helenius, 1989; Parodi, 2000).

In eukaryotischen Zellen unterscheidet sich in Bezug auf die Konzentration von Calciumionen (Ca^{2+}) das Lumen des ERs deutlich vom Cytoplasma. Die vergleichsweise stark erhöhte Ca^{2+} -Konzentration und das oxidative Milieu im ER begünstigt die Bildung von Disulfidbrücken zwischen den Thiolgruppen zweier Cystein-Aminosäurereste im Polypeptid. Zudem sind mehrere Chaperone und faltungsrelevante Proteine von einer angemessenen Ca^{2+} -Konzentration abhängig (Carelli *et al.*, 1997; Gilbert, 1995; Meldolesi und Pozzan, 1998; Parodi, 2000). Die Bildung, Isomerisierung und Reduktion von Disulfidbrücken werden in *S. cerevisiae* durch fünf Mitglieder der Proteindisulfidisomerase (PDI)-Familie katalysiert. Mit Hilfe der PDI-Aktivität können fehlerhafte Disulfidbrückenbindungen zudem wieder gelöst werden bzw. ist die Reduktion von Disulfidbrücken in fehlgefalteten Proteinen für deren Degradierung erforderlich. Die Proteinfaltung würde ohne die Stabilität vermittelnde Funktion dieser Oxidoreduktasen zu langsam ablaufen und eine Akkumulation aggregierender Proteine hervorrufen. Nach der Übertragung der Disulfidbindung auf das entsprechende Polypeptid werden PDIs durch Oxidasen im ER wieder oxidiert (Braakman und Hebert, 2013; Delic *et al.*, 2013; Gilbert, 1995; Kosuri *et al.*, 2013).

Weitere Faktoren, die für die korrekte Faltung der Polypeptide im ER relevant sind, stellen die Enzyme der Peptidylprolylisomerasen (PPIasen) und die bereits erwähnten Hsp70 Chaperone dar. PPIasen katalysieren die Isomerisierung der Prolin-Aminosäuren von der *trans*- in die *cis*-Konformation. Hsp70 Chaperone, wie das im Lumen des ER vorkommende Protein Kar2 in *S. cerevisiae*, assoziieren mit dem ungefalteten Polypeptid unter Adenosintriphosphat (ATP)-Bindung. Durch Hydrolyse des ATPs an der Nukleotidbindedomäne zu Adenosintriphosphat (ADP) wird das ungefaltete Polypeptid in der Substratbindedomäne gehalten. Mittels Nukleotidaustauschfaktoren kann ADP durch ATP substituiert und das Chaperon nach Freisetzung des gefalteten Proteins wieder bindungskompetent für neue Substrate werden (Braakman und Hebert, 2013; Delic *et al.*, 2013).

Als Voraussetzung für die Faltung des Proteins bzw. als Signal für die Rekrutierung ER-ständiger Lektin-Chaperone dient die *N*-Glykosylierung und die damit einhergehende Prozessierung der am Polypeptid angehängten Oligosaccharide, welche zudem die Peptidlöslichkeit steigern (Hebert *et al.*, 2014; Parodi, 2000; Wormald und Dwek, 1999). Für die *N*-Glykosylierung wird an einem ER-membranständigen Dolichol sowohl cytosolisch als

auch im Lumen des ERs an zwei *N*-Acetylglucosamin (GlcNAc)-Einheiten eine Oligosaccharidkette aus Glukose (Gluk)- und Mannose (Man)-Bausteinen gebildet. Das Polymer wird mittels einer Flippase über die ER-Membran transferiert, wobei die Identität der Flippase kontrovers diskutiert wird (Benham, 2012). Anschließend wird die Verbindung $\text{Gluk}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ durch die enzymatische Aktivität der o.g. OST vom Dolichol auf die Asparaginseitenkette einer *N*-Glykosylierungs-Erkennungssequenz (Asn-X-Ser/Thr; X steht für jede beliebige Aminosäure, außer Prolin) des Polypeptids während der Translokation transferiert (Dempski und Imperiali, 2002; Parodi, 2000). In *in vitro* Experimenten konnte gezeigt werden, dass die *N*-Glykosylierung bereits bei einem Abstand von 12 bis 14 Aminosäuren des Asparagins der Erkennungssequenz von der ER-Membran stattfindet (Nilsson und von Heijne, 1993).

Neben dem evolutionär hoch konservierten Prozess der *N*-Glykosylierung besteht zudem die Möglichkeit der *O*-Glykosylierung sekretorischer Proteine. Diese unterscheidet sich in niederen und höheren Eukaryoten bereits im Kompartiment, in dem sie stattfindet. Während die *O*-Glykosylierung in Säugerzellen im Golgi-Apparat erfolgt, ist dieser Prozess in der Hefe *S. cerevisiae* im ER vorzufinden. Dort wird mittels der Proteine der *O*-Mannosyltransferase (PMT)-Familie die Übertragung des Oligosaccharids auf die Hydroxygruppen der Aminosäurereste Serin oder Threonin des sekretierten Proteins katalysiert (Gentzsch und Tanner, 1996; Tanner und Lehle, 1992).

Vor allem für die Qualitätskontrolle von gefalteten Proteinen im ER spielt die *N*-Glykosylierung eine entscheidende Rolle (Delic *et al.*, 2013; Ferris *et al.*, 2014). Initial werden zwei der drei Glukose-Moleküle des Saccharidgerüsts durch eine ER-Glukosidase abgespalten, sodass das Oligosaccharid an das Membran-gebundene Calnexin bzw. das lösliche Calreticulin binden kann (Benham, 2012; Parodi, 2000). Die beiden Lektin-Chaperone agieren zusammen mit einer PDI zyklisch, bis die native Proteinkonformation erreicht ist (Zapun *et al.*, 1998). Dabei konkurrieren Glukosidasen mit Glukosyltransferasen, welche fehlgefaltete Proteine erkennen und zur Einleitung eines neuen Zyklus ein Glukosemolekül addieren, bis das Protein final korrekt gefaltet ist und das terminale Glukosemolekül endgültig entfernt wird. Das Glykoprotein besitzt dann keine Affinität mehr für Calnexin bzw. Calreticulin im Zyklus und wird für den weiteren Transport zum Golgi-Apparat freigesetzt (Benham, 2012; Ritter und Helenius, 2000). Fehlgefaltete Proteine, welche durch den Calnexin/Calreticulin-Zyklus nicht korrekt gefaltet werden können, werden durch den Mechanismus der ER-assoziierten Degradierung (*engl.*: ER-associated degradation; ERAD) aus dem ER transportiert und im Cytosol durch Proteasomen abgebaut (Benham, 2012). Akkumulation fehlgefalteter Proteine im ER sowie eine gestörte Qualitätskontrolle der Glykoproteine können zudem zur spezifischen Stressreaktion in Form der „ungefalteten Proteinantwort“ (*engl.*: unfolded protein response; UPR) führen, bei der Gene, die für ER

Chaperone kodieren, aktiviert, Proteinsynthese inhibiert und Proteindegradierung gesteigert werden (Groenendyk *et al.*, 2013; Rutkowski und Kaufman, 2004).

Sobald das sekretorische Protein die native Proteinkonformation im ER eingenommen hat, wird es für den Austritt in einem in Hefen und höheren Eukaryoten konservierten Prozess an spezialisierten ER-Membrandomänen sortiert, konzentriert und mittels Membranabschnürungen in sogenannten „Coat Protein Complex II“ (COPII)-Vesikeln anterograd zum *cis*-Golgi-Apparat transportiert (Benham, 2012; Delic *et al.*, 2013). Verantwortlich für die Bildung der Transportvesikel an der cytosolischen Seite der ER-Membran durch Induktion der Membrankrümmung, Konzentration der sekretorischen Moleküle in den wachsenden Abschnürungen und Förderung der Vesikelablösung sind die Proteine Sar1, Sec23, Sec24, Sec13 und Sec31 (Barlowe *et al.*, 1994; D’Arcangelo *et al.*, 2013; Matsuoka *et al.*, 1998). Die Interaktion der COPII-Vesikel mit der Membran des *cis*-Golgi-Apparats wird in Hefen neben dem TRAPPI-Komplex durch die Klasse der Rab-Proteine vermittelt, welche zur Familie der Ras-ähnlichen GTPasen gezählt werden (Delic *et al.*, 2013). Durch die Bindung mit definierten Effektoren, welche Proteine beschreiben, die vorzugweise mit der aktiven, Guanosintriphosphat (GTP)-gebundene Form des entsprechenden Rab-Proteins interagieren, regulieren Rab-Proteine den Transport an Membranen in vielfältiger Weise (Hutagalung und Novick, 2013).

Fusionsereignisse von Vesikeln mit einer Zielmembran stellen in eukaryotischen Organismen allgemein einen hoch-konservierten Prozess dar und erfordern den Einsatz von löslichen N-Ethylmaleimid-sensitiven Faktor Anlagerungsproteinrezeptor (*engl.*: soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor; SNARE)-Proteinen, die je nach Lokalisation am Kompartiment in Vesikelmembran (*engl.*: vesicle membran; v)-SNAREs und Zielmembran (*engl.*: target membrane; t)-SNAREs unterteilt werden. Als Komplex bilden SNARE-Proteine stabile Bündel aus vier helikalen Proteinen, welche die Vesikel- und Zielmembran in räumliche Nähe bringen und zur Generierung einer Fusionspore führen (Delic *et al.*, 2013; Jahn und Scheller, 2006).

Mit Eintritt in den Golgi-Apparat erfährt das sekretorische Protein potentielle posttranslationalen Modifikationen und Sortierung (Boncompain und Perez, 2013). Posttranslationale Modifikationen schließen weitere Glykosylierung, hauptsächlich durch Verlängerung der Saccharidketten durch das Anfügen bestimmter Zucker mittels Golgi-Apparat-spezifischer Glykosyltransferasen, ebenso wie Acetylierungen, Sulfatierung, Phosphorylierung, Methylierung und Palmitoylierung des Proteins ein. Des Weiteren können proteolytische Spaltungen von inaktiven Vorläuferproteinen zur aktiven Form im Lumen des Golgi-Apparats erfolgen (Potelle *et al.*, 2015; Vey *et al.*, 1994). Exemplarisch wird in *S. cerevisiae* die Prozessierung des Prepro- α -Faktors zum Peptidpheromon α -Faktor durch die Pro-Konvertase Kex2 beschrieben (Fuller, 1988). Für die Sortierung muss das

sekretorische Protein über die *cis*-, *medial*- und *trans*-Regionen des Kompartiments zum *trans*-Golgi-Netzwerk (TGN) gelangen. In Glick und Nakano 2009 wird dieser Prozess in zwei hypothetischen Modellen veranschaulicht, bei denen Proteine einerseits in anterograden COPI-Vesikel peripher entlang stabiler Golgi-Apparat-Zisternen oder andererseits innerhalb des aus Zusammenschlüssen von COPII-Vesikel gebildeten Organells durch dessen Reifung von *cis*- zu *trans*-Regionen übermittelt werden. Bei letzterer Modellvorstellung werden Proteine des Golgi-Apparats durch retrograd transportierte COPI-Vesikel regeneriert.

Nach Sortierung durch Domänen am TGN werden sekretorische Vesikel entlang von Aktinfilamenten zur definierten Bereichen der Plasmamembran transportiert, wo diese sich am Exozyst anlagern (Glick und Nakano, 2009; Jin *et al.*, 2008). Dieser evolutionär konservierte, multimere Proteinkomplex aus acht Untereinheiten ist von entscheidender Bedeutung in der Zielbestimmung von sekretorischen Vesikeln an der Plasmamembran während des Prozesses der Exozytose, bei dem Vesikelinhalte an die Außenseite der Zelle sekretiert werden (Liu und Guo, 2012). Die Relevanz des Exozysts wird dadurch deutlich, dass Temperatur-sensitive Exozystmutanten in Hefe die Bildung der SNARE-Komplexe blockieren (Grote *et al.*, 2000). Demnach wird die Exozystfunktion in Form von Rekrutierung an den sekretorischen Vesikeln für die Anordnung des SNARE-Komplexes und die finale Fusion der Vesikel mit der Plasmamembran benötigt (Delic *et al.*, 2013; Liu und Guo, 2012). Mit der Exozytose an der Plasmamembran ist die konventionelle Sekretion eines Proteins terminal vollzogen.

1.1.2 Unkonventionelle Sekretion

Die Forschung der letzten Jahre konnte zeigen, dass Proteine auch ohne den für die konventionelle Sekretion typischen Eintritt ins ER und den Golgi-Apparat zur Plasmamembran oder in den extrazellulären Raum gelangen können. In Nickel (2010) wird dieses, als unkonventionelle Proteinsekretion bezeichnete Phänomen als ein allgemein zusammenfassender Begriff für mehrere Arten von außerordentlichen Transportwegen, die zur Darstellung von Proteinen an der Zelloberfläche oder deren Freisetzung in den extrazellulären Raum führen, beschrieben. Die unkonventionelle Sekretion beinhaltet somit sämtliche Variationen und Abweichungen vom eingangs beschriebenen, ER/Golgi-Apparat umfassenden konventionellen Sekretionsweg, der die Rekrutierung in die Plasmamembran (z.B. Transmembranproteine) oder den Proteinexport aus den Zellen betrifft. Verdeutlicht wird dies u.a. auch durch die Immunität entsprechender Sekretionsereignisse gegenüber dem Toxin Brefeldin A, welches den vesikulären Transport vom ER zum Golgi-Apparat inhibiert, jedoch auf Grund seines pleiotropen Effekts auf den Organismus keine eindeutigen

Rückschlüsse zum Exportmechanismus liefert (Grieve und Rabouille, 2011; Rabouille *et al.*, 2012). Evolutionäre Gründe für die Etablierung unkonventioneller Sekretionswege könnten darin liegen, dass Proteine, die unkonventionell exportiert werden, in den luminalen Kompartimenten des klassischen sekretorischen Wegs vorzeitig an Glykoproteine bänden, aggregierten und dadurch die Sekretion aus der Zelle verhindert werden würde (Nickel, 2010).

Der Export von löslichen Proteinen aus dem Cytoplasma zu extrazellulären Kompartimenten schließt sowohl die Bindung an die Zelloberfläche und/oder extrazelluläre Matrix ein, als auch die Freisetzung der transportierten Proteine in einer löslichen Form (Nickel 2010; Rabouille *et al.*, 2012). Die große Varianz führt dazu, dass unkonventionelle Sekretion nicht anhand eines definierten Prozesses beschrieben werden kann, sondern vielfältige Exportmechanismen repräsentiert. Dennoch lassen sich einige Charakteristika für die unkonventionelle Sekretion festlegen. Unkonventionell sekretierte Proteine werden einerseits dahingehend kategorisiert, dass diese weder ein Signalpeptid noch eine Transmembrandomäne besitzen, aber dennoch die Plasmamembran queren können. Alternativ können sie mit einem Signalpeptid und/oder einer Transmembrandomäne ins ER eintreten, allerdings abweichend zum konventionellen Sekretionsweg den Golgi-Apparat umgehen, weshalb die Abwesenheit eines Signalpeptids somit nur als hinreichende und nicht als notwendige Bedingung für die unkonventionelle Sekretion gilt. (Nickel und Rabouille 2008; Rabouille *et al.*, 2012; Rabouille, 2017). Die unkonventionelle Sekretion der Signalpeptid/Transmembrandomänen enthaltenden Proteine, welche den Golgi-Apparat umgehen, kann entweder durch direkte Fusion mit der Plasmamembran mittels COPII-Vesikeln oder der vorherigen Fusion mit endosomalen oder lysosomalen Kompartimenten erfolgen (Abb. 1.3 C; Nickel und Rabouille 2008; Yoo *et al.*, 2002).

Ein Beispiel für die Golgi-Apparat-unabhängige Sekretion ist der Transport des Transmembranproteins und Chloridkanals CFTR (*engl.*: cystic fibrosis transmembrane conductance regulator) in die apikale Membran von Epithelzellen, der über COPII-Vesikel vom ER direkt zum TGN transportiert wird (Gee *et al.*, 2018; Wang *et al.*, 2004; Yoo *et al.*, 2002). Die Ursache, warum einige Proteine mit Signalpeptid zwar ins ER transloziert werden, aber schlussendlich den Golgi-Apparat umgehen, ist nicht abschließend geklärt. Es wird vermutet, dass Golgi-Apparat-interne Vorgänge, wie die Prozessierung der Oligosaccharidketten am Protein oder proteolytische Spaltungen, dadurch vermieden werden und somit möglicherweise die biologische Funktion des Proteins bewahrt wird (Nickel und Rabouille 2008; Rabouille, 2017).

Dem Golgi-Apparat-unabhängigen Export gegenüber steht die unkonventionelle Sekretion cyto- und karyoplasmatischer Proteine ohne Signalpeptid oder Transmembrandomäne. In der extrazellulären Umgebung sind diese Proteine häufig für essentielle regulatorische

Funktionen in Hinblick auf Immunantwort, Zellwachstum und -proliferation entscheidend (Nickel und Rabouille, 2008). Im Konsens damit steht, dass eine Vielzahl der bekannten unkonventionell sekretierten Proteine bei Eukaryoten wichtige Signalfaktoren (z.B. Zytokine, Wachstumsfaktoren) darstellen, die entsprechenden Einfluss auf physiologische Prozesse wie Entzündungen oder Zelldifferenzierung und -proliferation nehmen (Nickel und Seedorf, 2008). In dem Zusammenhang wird in Nickel und Seedorf (2008) eine weitere Klassifizierung der unkonventionellen Sekretion vorgenommen: Unkonventionell sekretierte Proteine mit primärer Funktion im extrazellulären Raum werden von Proteinen mit gewöhnlich cyto- oder karyoplasmatischer Lokalisation und intrazellulärer Funktion, die erst durch externe Stimuli sekretiert werden, differenziert. Der unkonventionelle Export der cyto- und karyoplasmatischen Proteine lässt sich, trotz Abweichungen in Anzahl und Einteilung in einigen Publikationen (Rabouille *et al.*, 2012; Rabouille, 2017), weitestgehend durch maximal vier bisher bekannte Sekretionswege beschreiben. Diese beinhalten die (i) direkte Translokation des sekretorischen Proteins an der Plasmamembran, den Transport mittels (ii) sekretorischer Lysosomen, den Export durch (iii) Exosomen, abgeleitet von multivesikulären Strukturen (*engl.*: multivesicular bodies; MVBs), einschließlich der sekretorischen Autophagie, sowie die Sekretion durch (iv) Vesikelabschnürung von der Plasmamembran (Nickel, 2005, 2010; Nickel und Rabouille, 2008). Unterteilt werden die einzelnen Transportwege in vesikuläre und nicht-vesikuläre Mechanismen, wovon für Letzteres die (i) direkte Translokation des sekretorischen Proteins an der Plasmamembran einen Vertreter darstellt (Nickel, 2010).

1.1.2.1 Nicht-vesikuläre Transportmechanismen

Eine Option für direkte Translokation besteht im Export mittels eines ATP-abhängigen (*engl.*: ATP-binding cassette; ABC) Transporters, der sich aus zwei Transmembrandomänen und zwei ATP-bindenden Domänen zusammensetzt (Cleves und Kelly, 1996; Nickel, 2005). Peptidpheromone in Hefen, wie der α -Faktor in *S. cerevisiae* oder der m-Faktor in *Schizosaccharomyces pombe*, werden mittels ABC-Transportern unkonventionell sekretiert (Abb. 1.2; Christensen *et al.*, 1997; McGrath und Varshavsky 1989; Rabouille *et al.*, 2012). In Säugerzellen wird das Lektin Galektin 3, welchem ein Signalpeptid für die Translokation ins ER fehlt, unabhängig von intrazellulären Vesikeln ebenfalls direkt zur Plasmamembran transportiert und anschließend über Vesikelabschnürungen in den extrazellulären Raum sezerniert. Extrazellulär erfolgt anschließend die Auflösung der aus der Plasmamembranabschnürung entstandenen Vesikel, sodass das Protein in löslicher Form vorliegt (Abb. 1.2; Mehul und Hughes, 1997).

Ein weiteres Beispiel für die direkte Translokation eines sekretorischen Proteins an die Plasmamembran und einen nicht-vesikulären sowie Transporter-unabhängigen Mechanismus

in Säugerzellen stellt der unkonventionelle Export des Fibroblasten-Wachstumsfaktors 2 (*engl.*: fibroblast growth factor 2; FGF2) dar (Abb.1.2; Nickel, 2011; Nickel und Rabouille, 2008; Schäfer *et al.*, 2004). FGF2 besitzt als direkter Regulator für die Bildung von Blutgefäßen aus bereits existierenden Blutgefäßen (Angiogenese) primäre Funktion im extrazellulären Raum und die konstitutive Sekretion scheint nicht durch einen externen Reiz stimuliert zu werden (Nickel, 2010, 2011; Nickel und Seedorf, 2008; Temmerman *et al.*, 2008).

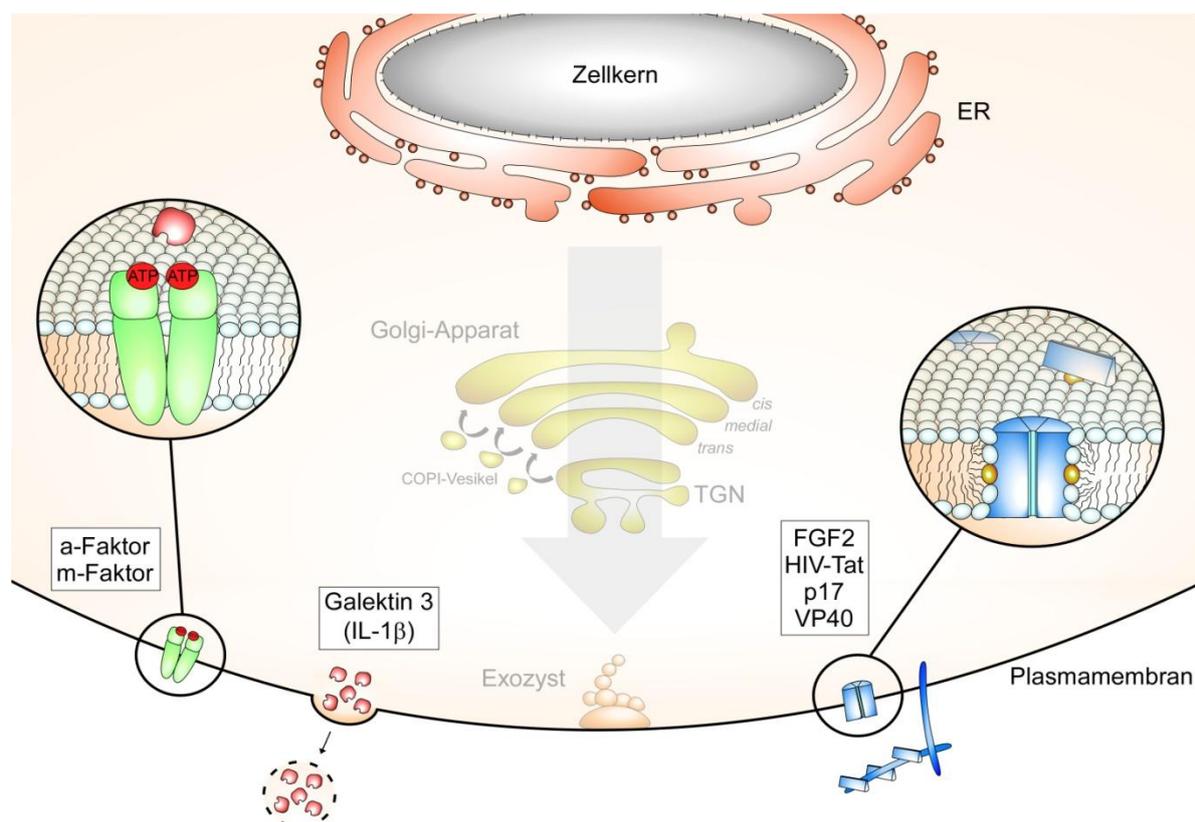


Abb. 1.2: Nicht-vesikuläre Transportmechanismen der unkonventionellen Sekretion. Als Beispiel für die direkte Translokation an der Plasmamembran dient die unkonventionelle Sekretion des a-Faktors (*S. cerevisiae*) und m-Faktor (*S. pombe*). Die Peptidhormone werden über einen ATP-abhängigen (*engl.*: ATP-binding cassette; ABC) Transporter, der aus zwei Transmembrandomänen und zwei ATP-bindenden Domänen besteht, in den extrazellulären Raum sekretiert. Der nicht-vesikuläre Transport und anschließende Export mittels Abschnürungen von der Plasmamembran sind für das Lektin Galektin 3 in Säugerzellen beschrieben. Dabei wird die Membran, welche die internalisierten Proteine umschließt, extrazellulär aufgelöst. Bei der unkonventionellen Sekretion des Fibroblasten-Wachstumsfaktors 2 (*engl.*: fibroblast growth factor 2; FGF2) in Säugerzellen erfolgt durch Bindung an PI(4,5)P2 (gelb) die Rekrutierung an die Plasmamembran und die Bildung einer Membranpore aus FGF2-Molekülen, welche die Autosekretion vermittelt. Extrazellulär interagiert FGF2 mit Heparansulfaten an der Oberfläche der Plasmamembran. Weitere Beispiele für die unkonventionelle Sekretion durch eine selbst-assemblierende Pore sind die Exportmechanismen viraler Proteine, wie den Transkriptionstransaktivator (*engl.*: transactivator of transcription; Tat) und das Matrixprotein p17 des Humanen Immundefizienz-Virus (HIV) sowie das Matrixprotein VP40 des Ebola Virus. Als Optionen für die unkonventionelle Sekretion des Interleukin-1β (IL-1β) werden neben dem nicht-vesikulären Mechanismus der Plasmamembranabschnürung auch mehrere vesikuläre Transportmechanismen (Abb. 1.3) eingeschlossen. Abbildung anhand der im Text aufgeführten Bezugsquellen generiert; größtenteils nach Cleves und Kelly (1996), Mehul und Hughes (1997), Rabouille *et al.* (2012) und Steringer *et al.* (2014).

Essentiell für die Translokation von FGF2 an der Plasmamembran ist die Eigenschaft, dass der C-Terminus des Proteins mit hoher Spezifität das Phospholipid Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PI(4,5)P2) an der intrazellulären Seite der Plasmamembran bindet (Nickel, 2011; Temmerman *et al.*, 2008). Die Rekrutierung an die Plasmamembran und Bindung an PI(4,5)P2 bewirkt die Oligomerisierung von FGF2, wodurch die Bildung einer Membranpore mit mutmaßlich ringförmiger Struktur und hexamerer FGF2-Positionierung induziert wird (Rabouille *et al.*, 2012; Steringer *et al.*, 2012). Vorangetrieben wird die FGF2-Oligomerisierung und Membraninsertion durch die Bildung intramolekularer Disulfidbrücken (Müller *et al.*, 2015). Als regulatorischer und essentieller Schritt für die Membrantranslokation zur Zelloberfläche dient die vorherige, intrazelluläre Phosphorylierung von FGF2 durch eine Tec-Kinase (Ebert *et al.*, 2010).

Für die finale Sekretion ist die Interaktion von FGF2 mit extrazellulären Heparansulfaten an der Oberfläche der Plasmamembran essentiell. Wahrscheinlich auf Grund der hohen Affinität zur extrazellulären Struktur werden die PI(4,5)P2 gebundenen Oligomere aus FGF2 gelöst und die Durchquerung der Plasmamembran forciert (Nickel, 2010; Zehe *et al.*, 2006). Damit einhergehend ist die Tatsache, dass für den FGF2-Export weder die Hydrolyse von Adenosintriphosphat (ATP) noch ein Membranpotential erforderlich ist (Nickel und Rabouille, 2008; Schäfer *et al.*, 2004). Gleichsam dem Proteinimport in Peroxisomen und Chloroplasten oder dem bakteriellen „twin-arginine translocation (Tat) system“ belegen Experimente in Backhaus *et al.*, (2004), dass FGF2 in einer gefalteten Konformation durch die Plasmamembran gelangt. Diese Auffassung widerspräche zudem dem hypothetischen Einsatz eines klassischen Protein-leitenden Kanals, wie beispielsweise eines ABC-Transporters, für die Sekretion von FGF2 ins extrazelluläre Milieu, da diese für den Prozess ungefaltete Proteine benötigen (Clark und Theg 1997; Dalbey und Robinson 1999; Holland *et al.*, 2005; Nickel, 2011; Rabouille *et al.*, 2012; Steringer *et al.*, 2014; Walton, 1996). Gleichzeitig liefert die Erkenntnis, dass FGF2 gefaltet transloziert wird, ein Indiz für eine mögliche Qualitätskontrolle. Es ist anzunehmen, dass nicht korrekt gefaltete Proteine abgewiesen bzw. ausschließlich richtig gefaltete und funktionale Proteine durch die Plasmamembran treten (Nickel, 2005). Mit der Rekonstruktion des kompletten Prozesses *in vitro* mittels gereinigter Komponenten der FGF2-Sekretion konnte bewiesen werden, dass alle Faktoren für den Durchtritt an der Plasmamembran gefunden worden sind (Steringer *et al.*, 2017). Experimente bei denen FGF2 ein Signalpeptid N-terminal angehängt wurde, zeigten, dass das Fusionsprotein aus Signalpeptid und FGF2 zwar effizient mittels des konventionellen Sekretionsweg exportiert wird, allerdings unfähig zur Bindung an Heparansulfate ist. Ursächlich für den Funktionsverlust in Bezug auf FGF2-Anlagerung an der Zelloberfläche bzw. extrazellulären Matrix und damit verbundener Signalweiterleitung scheint die künstlich herbeigeführte O-Glykosylierung auf dem konventionellen

Sekretionsweg zu sein (Wegehingel *et al.*, 2008). Dies unterstützt die Annahme, dass durch ausbleibende posttranslationale Modifikationen die Funktionalität unkonventionell sekretierter Proteine gewährleistet wird und begründet potentiell die Existenz unkonventioneller Sekretionsmechanismen.

Ein weiteres Beispiel für die unkonventionelle Sekretion mittels einer mutmaßlich selbst-assemblierten Membranpore durch die einhergehende Bindung an PI(4,5)P2 liefert die Freisetzung des Transkriptionstransaktivators (*engl.*: transactivator of transcription; Tat) des Humanen Immundefizienz-Virus (HIV) aus infizierten Zellen (Rayne *et al.*, 2010; Zeitler *et al.*, 2015). Die Detektion im extrazellulären Bereich, unabhängig von Zelllyse, und das Fehlen eines Signalpeptids weisen das 10 kDa große, basische HIV-Tat als unkonventionell sekretiertes Protein aus, welches extrazellulär als virales Toxin von Zielzellen aufgenommen wird und durch vielfältige Aktivitäten die Vermehrung des Virus bedingt (Debaisieux *et al.*, 2012; Ensoli *et al.*, 1990; Jeang *et al.*, 1999; Schatz *et al.*, 2018). HIV-Tat erkennt durch drei Seitenketten der basischen Region spezifisch einzelne PI(4,5)P2-Moleküle, was zur Akkumulation an der Plasmamembran führt, und wird zusätzlich durch die Membraninsertion einer Tryptophan Seitenkette des Proteins stabilisiert. Neben der für die HIV-Tat-Sekretion erforderlichen Erkennung bindet die basische Region zudem an extrazelluläre Heparansulfate (Chang *et al.*, 1997; Rayne *et al.*, 2010). Im Vergleich zum Sekretionsprozess von FGF2 weist der Exportmechanismus von HIV-Tat in Bezug auf die Bildung membranständiger HIV-Tat Oligomere und der *in vitro* nachgewiesenen Porenbildung mittels PI(4,5)P2-Interaktion sowie der Bindung an Heparansulfaten Ähnlichkeiten auf, grenzt sich dennoch durch die fehlende Notwendigkeit intramolekularer Disulfidbrücken und einer deutlich erhöhten Effizienz in der Bildung der Membranpore bei gleichzeitig geringerer Konzentration des Proteins ab (Schatz *et al.*, 2018; Zeitler *et al.*, 2015). Das HIV Matrixprotein p17 und das Ebola Virus Matrixprotein VP40 repräsentieren weitere Beispiele für virale Proteine, die für die Oligomerisierung an der Plasmamembran bzw. unkonventionelle Sekretion PI(4,5)P2 benötigen, und deuten darauf hin, dass dieser Mechanismus weit mehr Gruppen unkonventionell exportierter Proteine betreffen könnte (Caccuri *et al.*, 2016; Johnson *et al.*, 2016; Zeitler *et al.*, 2015).

1.1.2.2 Vesikuläre Transportmechanismen

Neben der nicht-vesikulären, direkten Translokation an der Plasmamembran kann die unkonventionelle Sekretion der cyto- und karyoplasmatischen Proteine auch vesikulär erfolgen. In Villeneuve *et al.* (2017) wird anhand einer Maus-Zelllinie die unkonventionelle Sekretion des cytoplasmatischen Fettsäuren-bindenden Proteins 4 (*engl.*: fatty acid binding protein 4; FABP4) aus Fettzellen mittels membranöser Kompartimente beschrieben (Abb. 1.3 E). Demnach erfolgt der FABP4-spezifische Sekretionsmechanismus über

Endosomen, die mit sekretorischen Lysosomen fusionieren oder zu diesen Strukturen reifen, um in der lysosomalen Exozytose mit der Plasmamembran zu fusionieren und FABP4 ins extrazelluläre Milieu freizusetzen. Bereits in früheren Arbeiten wurde mittels Dichtegradientenzentrifugation in Vesikeln der Fraktion der späten Endosomen und frühen Lysosomen das Vorläuferprotein des unkonventionell sekretierten Zytokins Interleukin-1 β (IL-1 β), welches ohne Signalpeptid aus Makrophagen sezerniert wird, entdeckt. (Andrei *et al.*, 1999; Monteleone *et al.*, 2015). Des Weiteren wiesen schon frühere Untersuchungen von Rubartelli *et al.* (1990) darauf hin, dass intrazelluläre Vesikel an der unkonventionellen Sekretion von IL-1 β beteiligt sein könnten. Trotz der anzunehmenden Fusion der Vesikel mit der Plasmamembran ist der exakte Mechanismus, welcher zur Freisetzung von IL-1 β führt, nicht geklärt und schließt mehrere Optionen ein: Der Export mittels sekretorischer Lysosomen, die als Zellkompartimente durch Stimulation an die Plasmamembran mobilisiert werden, die Bildung intrazellulärer multivesikulärer Strukturen (MVBs) und anschließende Freisetzung durch Exosomen, die sekretorische Autophagie und die Abschnürung von Mikrovesikeln an der extrazellulären Seite der Plasmamembran (Abb. 1.2 – 1.3 A-B und D-E; Monteleone *et al.*, 2015; Nickel, 2005; Nickel und Rabouille 2008; Rabouille *et al.*, 2012).

Ein wichtiger Regulator für eine Reihe unkonventionell sekretierter Proteine stellt die durch Inflammasomen aktivierte Protease Caspase 1 dar. Sowohl die Sekretion von FGF2, als auch die proteolytische Spaltung des Vorläuferproteins zur biologisch aktiver Form von IL-1 β zeigen Abhängigkeit von der Caspase 1 (Keller *et al.*, 2008; Ogura *et al.*, 2006; Rabouille *et al.*, 2012). In Monteleone *et al.* (2015) bietet dies u.a. Argumente gegen einen Vesikelvermittelten Export von IL-1 β , da diese Form der Sekretion die Caspase 1-Aktivierung und IL-1 β -Prozessierung in endolysosomalen Strukturen oder in Mikrovesikeln annähme, obwohl die Aktivierung der Caspase 1 und die Prozessierung von IL-1 β nachweislich im Cytosol stattfindet (Franklin *et al.*, 2014). Zusätzlich wird die Möglichkeit der „passiven Freisetzung“ von IL-1 β durch Zelllyse, bedingt durch Caspase 1-abhängige Permeabilisierung der Plasmamembran und daraus folgender osmotischer Lyse oder die Sekretion mittels direkter Translokation an der Plasmamembran eingeschlossen (Fink und Cookson 2006; Monteleone *et al.*, 2015; Brough *et al.*, 2017). Im Gegensatz zur konstitutiven Sekretion von FGF2 wird der IL-1 β -Export durch exogene Reize stimuliert und verdeutlicht, dass die meisten unkonventionellen Sekretionsereignisse als Reaktion auf Stressfaktoren, wie zellulären Stress durch Entzündungen und Nährstoffmangel bzw. mechanischem Stress durch Zell-Zell-Neuordnung während der Entwicklung, erfolgen (Giuliani *et al.*, 2011).

In den eukaryotischen Einzellern *S. cerevisiae* und *Pichia pastoris* induziert Nährstoffmangel die unkonventionelle Sekretion des Acetyl-Coenzym A bindenden Proteins (Acb1) mittels sekretorischer Autophagie (Abb. 1.3 A-B; Duran *et al.*, 2010; Manjithaya *et al.*, 2010).

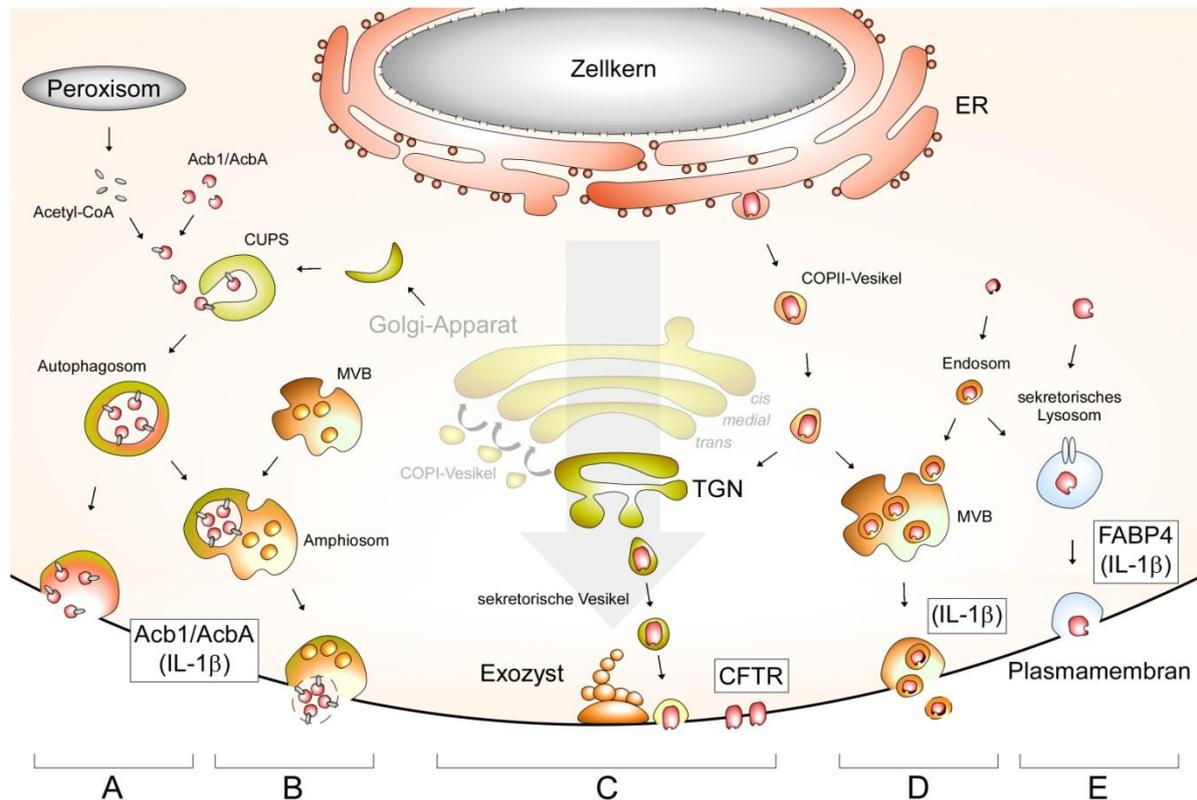


Abb. 1.3: Vesikuläre Transportmechanismen der unkonventionellen Sekretion. Bei der sekretorischen Autophagie des Acetyl-Coenzym A bindenden Proteins Acb1 (*S. cerevisiae* und *P. pastoris*) bzw. AcbA (*D. discoideum*) werden aus Membranen des Golgi-Apparats sogenannte Kompartimente der unkonventionellen Proteinsekretion (*engl.*: compartments for unconventional protein secretion; CUPS) generiert. Die Interaktion von Acb1/AcbA mit dem Acetyl-Coenzym A (Acetyl-CoA), welches in Peroxisomen synthetisiert wird, ermöglicht wahrscheinlich die Rekrutierung an die CUPS. Diese werden als Vorläuferstrukturen von Autophagosomen interpretiert. Für die Freisetzung von Acb1/AcbA bestehen die Optionen der direkten Autophagosomen-Plasmamembran-Fusion (A) oder die vorherige Fusion der Autophagosomen mit multivesikulären Strukturen (MVBs) zu Amphiosomen und der darauffolgenden Interaktion mit der Plasmamembran (B). Ein Beispiel für die Golgi-Apparat-unabhängige Sekretion stellt der Transport des Transmembranproteins und Chloridkanals CFTR (*engl.*: cystic fibrosis transmembrane conductance regulator) dar, der über „Coat Protein Complex II“ (COPII)-Vesikel vom ER unmittelbar zum *trans*-Golgi-Netzwerk (TGN) gelangt (C). Alternativ können COPII-Vesikel bei der Golgi-Apparat-unabhängigen Sekretion ebenso direkt zur Plasmamembran transportiert werden (nicht gezeigt) oder mit endosomalen/lysosomalen Kompartimenten fusionieren. Des Weiteren besteht die Möglichkeit der Zusammenschlüsse von Endosomen zu MVBs und die daraus folgende Freisetzung sekretorischer Proteine in Vesikeln (D) oder wie für das cytoplasmatische Fettsäuren-bindende Protein 4 (*engl.*: fatty acid binding protein 4; FABP4) die Sekretion mittels sekretorischer Lysosomen (E). Als Option für die unkonventionelle Sekretion des Interleukin-1 β (IL-1 β) wird neben mehreren vesikulären Transportmechanismen auch der nicht-vesikulären Mechanismus der Plasmamembranabschnürung (Abb. 1.2) eingeschlossen. Abbildung anhand der im Text aufgeführten Bezugsquellen generiert; größtenteils nach Abrahamsen und Stenmark (2010), Malhotra (2013), Monteleone *et al.* (2015) Nickel (2005) und Nickel und Rabouille (2008).

Unter Nährstoffmangel beschreibt Autophagie den hoch-konservierten, intrazellulären Prozess, bei dem cytosolische Proteine zur Degradierung über Vesikel (Autophagosomen) zu Lysosomen oder Vakuolen transportiert werden (Simonsen und Tooze, 2009; Suzuki und Ohsumi, 2010). Im Gegensatz dazu konnte anhand von Deletionen diverser Autophagie-zugehöriger (ATG) Gene in *S. cerevisiae* und die daraus resultierende fehlende Aktivität des aus Acb1 extrazellulär prozessierten Sporulationsdifferenzierungsfaktors-2 (SDF-2)

geschlussfolgert werden, dass der Weg der Autophagie für die Acb1-Sekretion notwendig ist (Duran *et al.*, 2010). Erste Hinweise auf diese Art des Exports wurden im Zusammenhang mit der unkonventionellen Sekretion des Acb1-Pendants AcbA im Schleimpilz *Dictyostelium discoideum* gefunden und verweisen auf einen konservierten Sekretionsmechanismus (Kinseth *et al.*, 2007).

Die sekretorische Autophagie beginnt in der räumlichen Nähe des ERs mit der Bildung sogenannter Kompartimente der unkonventionellen Proteinsekretion (*engl.*: compartments for unconventional protein secretion; CUPS), die sich aus Membranen des Golgi-Apparats zusammensetzen und mutmaßlich cytoplasmatisches Acb1 akkumulieren, wodurch Acb1-angereicherte Vesikel erzeugt werden (Bruns *et al.*, 2011; Cruz-Garcia *et al.*, 2014; Malhotra, 2013). CUPS bestehen neben den Autophagie-zugehörigen Proteinen Atg8 und Atg9 zudem aus dem vom Golgi-Apparat relokalierten und für die Acb1-Sekretion und CUPS-Biogenese essentiellen Protein Grh1, dem Hefehomolog des „Golgi Reassembly Stacking Proteins“ (GRASP) in Säugerzellen (Bruns *et al.*, 2011; Duran *et al.*, 2010; Malhotra, 2013; Ponpuak *et al.*, 2015). Während GRASP für die strukturelle Organisation und den Proteintransport im Golgi-Apparat benötigt wird, weist das Hefehomolog Grh1 am Organell keine essentielle Rolle in der Strukturierung auf; allerdings scheint Grh1 in *S. cerevisiae* im Komplex mit dem Protein Bug1 an der Anheftung der COPII-Vesikel am Golgi-Apparat beteiligt zu sein (Behnia *et al.*, 2007; Levi *et al.*, 2011). Bei unkonventionellen Sekretionsereignissen sind GRASP bzw. dessen Homologe sowohl für den Export cytoplasmatischer Proteine ohne Signalpeptid, wie Acb1, als auch für den Golgi-Apparat-unabhängigen Transport von Proteinen mit Signalpeptid essentiell und identifizieren das Protein neben der Caspase 1 als zweiten wichtigen Faktor für unkonventionelle Sekretionsereignisse (Giuliani *et al.*, 2011; Nickel und Rabouille, 2008).

In *P. pastoris* zeigten Mutanten in der Peroxisomenentstehung eine verhinderte Acb1-Produktion und weisen auf die Notwendigkeit des fetthaltigen, in Peroxisomen hergestellten und metabolisierten Acetyl-Coenzym A in der Acb1-Sekretion hin (Manjithaya *et al.*, 2010; Manjithaya und Subramani, 2011). Deletionen der Gene für die Peroxine Pex3 und Pex8, die zusammen mit anderen Kandidaten unter Multiuntereinheiten-Komplexbildung den Proteinimport in die peroxisomale Matrix vermitteln, führen zusätzlich zu einer eingeschränkten SDF-2 Aktivität (Manjithaya *et al.*, 2010). Die Bindung des Acetyl-Coenzym A wird von Acb1 für Anlagerungen an Membranen benötigt, woraus sich die Annahme entwickelte, dass das hydrophobe Acetyl-Coenzym A Acb1 an die CUPS rekrutiert und fixiert. Dies könne als potentieller Sortierungsmechanismus für die Acb1-Lokalisation an CUPS gegenüber anderen cytoplasmatischen Proteinen interpretiert werden (Hansen *et al.*, 2008; Malhotra, 2013). Anhand des Vorkommens der Autophagie-zugehörigen Proteine Atg8 und Atg9 und des Autophagosomen-typischen Phospholipids Phosphatidylinositol-3-

phosphat (PI3P) werden CUPS in Bruns *et al.*, 2011 als mögliche Vorläuferstrukturen für die Biogenese von sekretorischen Autophagosomen angesehen. Entsprechend wird die essentielle Funktion von Atg8 im Exportmechanismus durch ausbleibende Sekretion von Acb1 bei Deletion des Autophagie-Gens in *S. cerevisiae* deutlich (Duran *et al.*, 2010; Nadal und Gold, 2010).

Die Identifizierung von Proteinen, die für die Fusion mit frühen Endosomen (Ypt6 und Tlg2) und aus Endosomen generierten MVBs (Vps4 und Vps23) benötigt werden und essentiell im Acb1-Sekretionsprozess sind, schließen neben der direkten Fusion der Autophagosomen mit der Plasmamembran auch die vorherige Bildung von Hybridstrukturen mit Endosomen bzw. MVBs ein, die als sogenannte Amphiosomen Acb1 extrazellulär freisetzen (Duran *et al.*, 2010; Manjithaya und Subramani, 2011). Die Fusion von MVBs mit der Plasmamembran würde zur Sekretion von Einzelmembran-haltigen Exosomen bzw. Exosomen-ähnlichen Vesikeln mit Acb1 führen, die für die endgültige Freisetzung von Acb1 extrazellulär aufgelöst werden müssten, damit Acb1 durch die Protease TagC zu SDF-2 prozessiert werden kann (Malhotra, 2013; Manjithaya und Subramani, 2011; Nickel, 2010). Im Kontext mit der Fusion an der Plasmamembran konnte gezeigt werden, dass die Acb1-Sekretion in *S. cerevisiae* vom t-SNARE Protein Sso1, welches während der Exocytose die Fusion an der Plasmamembran vermittelt, abhängig ist und in *P. pastoris* die Gendeletion der Phospholipase Spo14, die die Rekrutierung von Sso1 an der Plasmamembran steuert, zu ausbleibender extrazellulärer SDF-2 Aktivität führt (Aalto *et al.*, 1993; Duran *et al.*, 2010; Manjithaya *et al.*, 2010; Neiman, 2005; Xie *et al.*, 1998). Eine Kontroverse im beschriebenen Mechanismus der sekretorischen Autophagie besteht darin, dass in Cruz-Garcia *et al.* (2014) und Malhotra (2013) CUPS nicht als die Vorläuferstruktur von spezialisierten Autophagosomen angesehen werden. Unterstützt wird diese These durch beschriebene Funktionen von Atg-Proteinen abseits der Autophagie (Subramani und Malhotra, 2013).

1.2 Der Maisbeulenbrandpilz *Ustilago maydis*

Neben der ausführlich untersuchten und beschriebenen unkonventionellen Sekretion des Acetyl-Coenzym A bindenden Proteins Acb1 in *S. cerevisiae* und *P. pastoris* wurde mit *U. maydis* ein weiterer, zumindest fakultativ einzelliger, eukaryotischer Organismus identifiziert, bei dem die unkonventionelle Sekretion eines Proteins, auf das in Abschnitt 1.2.2 näher eingegangen wird, nachgewiesen werden konnte (Stock *et al.*, 2012). Im Gegensatz zu den eingangs erwähnten Ascomyceten (Schlauchpilzen) wird *U. maydis* als Vertreter der Ordnung der Ustilaginales (Brandpilzartigen) zu dem Phylum der Basidomyceten (Ständerpilze) gezählt und gilt als prominenter Verursacher des Maisbeulenbrands bei der Pflanze *Zea mays* (Banuett, 1992; Martínez-Espinoza *et al.*, 2002). *U. maydis* agiert dabei

äußerst wirtsspezifisch und befällt ausschließlich die Kulturpflanze und Teosinte, als evolutiver Vorfahre von *Z. mays* (Banuett 1992; Banuett, *et al.*, 2009). Die pathogene Lebensweise von *U. maydis* ist Bestandteil des dimorphen Lebenszyklus des Pilzes.

Aus diploiden Sporen bildet sich unter geeigneten Keimungsbedingungen ein mehrzelliges Promyzelium, welches nach Meiose haploide, einzellige Sporidien hervorbringt (Abb. 1.4 A). Die hefeartigen Sporidien teilen sich durch polare Knospung, bis zwei geeignete Einzelzellen im Kontext eines Paarungsereignisses auf der Pflanzenoberfläche ins filamentöse Wachstum wechseln (Abb. 1.4 B-D; Steinberg und Perez-Martin 2008; Vollmeister *et al.*, 2011). Entscheidend für den morphologischen Wechsel sind zwei, je Individuum divergente Paarungstyploci im Genom des Pilzes. Der biallelische Paarungstyplocus *a* kodiert für ein Pheromon/Rezeptor-System und kontrolliert damit die Ausbildung von aufeinander zu wachsenden Konjugationshyphen, die zur Fusion zweier Sporidien führt (Plasmogamie). Durch die Pheromonerkennung arretiert der Zellzyklus zeitweise in der G2-Phase. Anschließend wird durch den multiallelischen Paarungstyplocus *b* ein Heterodimer aus den Proteinen bEast (bE) und bWest (bW) gebildet, welcher als Transkriptionsfaktor das filamentöse Wachstum einleitet (Bölker *et al.*, 1992; Feldbrügge *et al.*, 2004; García-Muse *et al.*, 2003; Vollmeister *et al.*, 2011). Im genetisch modifizierten Laborstamm AB33 kann durch den Wechsel der Stickstoffquelle und eines entsprechend induzierbaren Promotors die Expression beider Gene des bE/bW-Transkriptionsfaktors in einer Zelle initiiert und damit das filamentöse Wachstum artifiziell ohne vorheriges Paarungsereignis ausgelöst werden (Abb. 1.5 A; Brachmann *et al.*, 2001).

Auf der Pflanzenoberfläche setzt sich das apikale Wachstum der dikaryotischen Hyphe mit der Entstehung leerer Abschnitte durch Einzug von Septen am basalen Ende des Pilzes fort, bis mit Wiedereinsetzen des Zellzyklus die Besiedlung der Pflanze beginnt (Steinberg und Perez-Martin 2008; Vollmeister *et al.*, 2011). Eingeleitet wird die Infektion mit der Penetration und dem Durchdringen der pflanzlichen Zelloberfläche mit Hilfe einer an der Hyphenspitze gebildeten Appressorium-ähnlichen Struktur und sekretierter, lytischer Enzyme und setzt sich mit der Vermehrung des Pilzes in Form eines mehrzelligen Myzeliums innerhalb der Zelle fort (Abb. 1.4 E-H; Brefort *et al.*, 2008; Doehlemann *et al.*, 2008). Durch die Freisetzung spezifischer, pilzlicher Effektorproteine werden zudem pflanzliche Verteidigungsmechanismen unterdrückt (Doehlemann *et al.*, 2009; Lanver *et al.*, 2017; Schirawski *et al.*, 2010). Mit der Sequenzierung und Annotierung des Genoms von *U. maydis* wurde deutlich, dass von den Genen der insgesamt 23 Chromosomen eine große Anzahl Relevanz in der Pathogenität besitzen, von denen wiederum viele für sekretierte Effektorproteine kodieren (Brefort *et al.*, 2009; Kämper *et al.*, 2006). Zusätzlich zum verkümmerten Wachstum und reduzierten Ertrag resultiert der Pathogenbefall der Maispflanze in unkontrollierter Zellteilung des Wirtsgewebes mit der Folge der Entstehung tumorartiger Strukturen, als Reaktion auf

die massive Verbreitung des Pilzes innerhalb der Pflanze (Abb. 1.4 I; Kämper *et al.*, 2006; Vollmeister *et al.*, 2011). Zeitlich vergleichsweise kurz nach der Infektion kann *U. maydis* im Gegensatz zu anderen Brandpilzen an allen oberirdischen Bereichen der Wirtspflanze die im Krankheitsverlauf typische Tumorbildung lokal induzieren (Brefort *et al.*, 2009; Schirawski *et al.*, 2010).

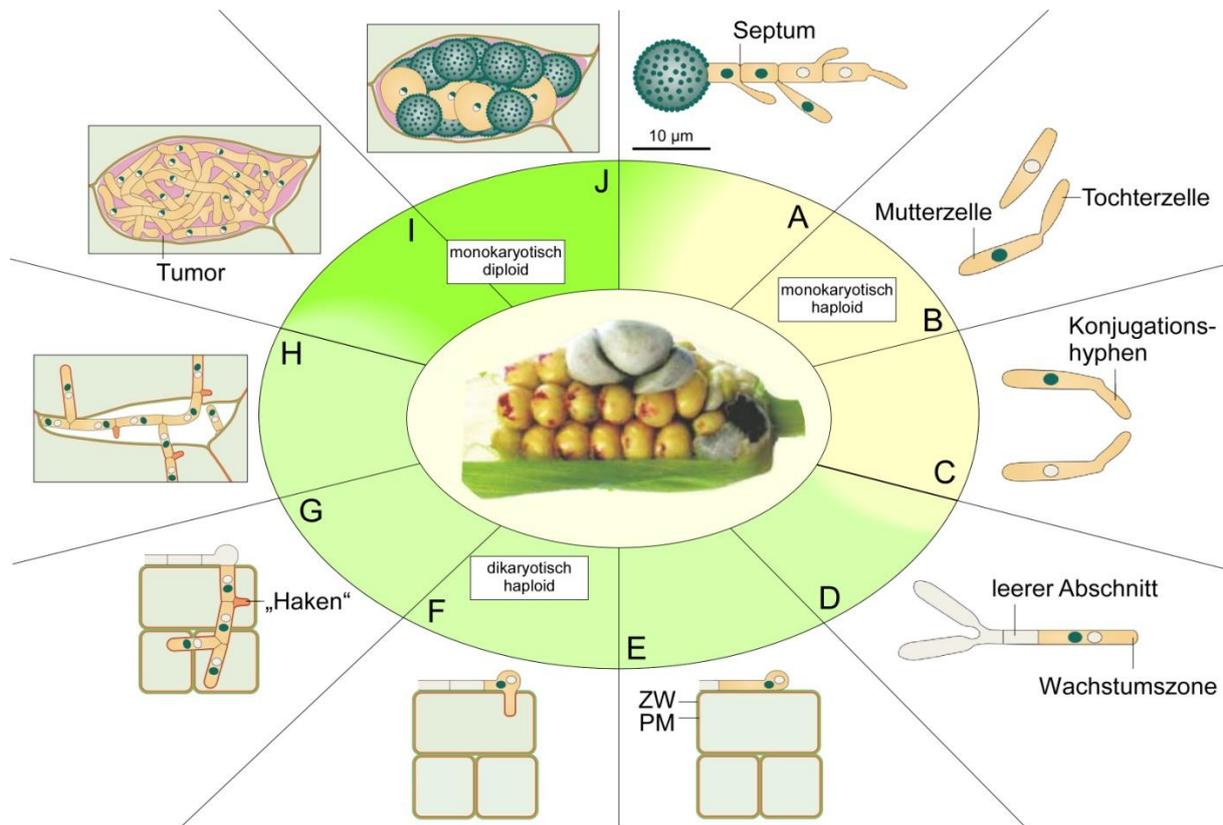


Abb. 1.4: Der dimorphe Lebenszyklus des Pflanzenpathogens *U. maydis*. Während des Lebenszyklus wechselt der Verursacher des Maisbeulenbrands in *Z. mays* und Teosinte von der saprotrophen Phase (gelb) zur biotrophen Phase (grün). **(A)** Aus Tumoren einer infizierten Pflanze werden monokaryotische, diploide Teliosporen freigesetzt. Durch Meiose entstehen in einem Promyzelium monokaryotische, haploide Zellen, die durch Septen begrenzt werden. **(B)** Nach Mitose erfolgt die Vermehrung einzelliger Sporidien durch Knospung, bei der an den Zellpolen der Mutterzelle eine neue Tochterzelle gebildet wird. **(C)** Der Zellzyklus wird zeitweise arretiert, sobald sich auf der Pflanzenoberfläche zwei Sporidien mit kompatiblen Paarungstypocli paaren und für die Zellfusion Konjugationshyphen ausbilden. **(D)** Nach der Plasmogamie entsteht eine dikaryotische, haploide Zelle. Septenbildung am basalen Ende des Filaments führt zu leeren Abschnitten während des apikalen Wachstums. **(E-F)** Die Pflanzeninfektion beginnt mit der Penetration und dem Durchdringen der pflanzlichen Zellwand (ZW) mittels einer an der Hyphenspitze gebildeten Appressorium-ähnlichen Struktur und der Sekretion lytischer Enzyme. Während der intrazellulären Phase sind die pilzlichen Zellen von der pflanzlichen Plasmamembran (PM) umschlossen. **(G)** Nachdem der Zellzyklus-Arrest aufgehoben wurde, proliferiert der Pilz innerhalb des Pflanzengewebes. Die Trennung zweier unterschiedlicher Zellkerne und der Erhalt der dikaryotischen Zellen im pilzlichen Myzelium werden durch sogenannte „Haken“-ähnliche Strukturen ermöglicht (Scherer *et al.*, 2006). **(H)** Mit beginnender Tumorbildung der Pflanze ist der Großteil pilzlicher Filamente interzellulär lokalisiert. **(I)** Mittels Karyogamie entstehen monokaryotische, diploide Zellen, die große Aggregate in apoplastischen Hohlräumen bilden. **(J)** In den Tumoren entwickeln sich die Pilzhyphen zu schwarzen, monokaryotischen, diploiden Teliosporen, die nach Aufbrechen der Tumore in die Umwelt freigesetzt werden und einen neuen Lebenszyklus initiieren. Abbildung modifiziert nach Lanver *et al.* (2017) und Feldbrügge *et al.* (2004).

In den Tumoren entwickeln sich aus dikaryotischen, haploiden Zellen im Myzelium mittels Karyogamie schwarze, monokaryotische, diploide Teliosporen, bis diese nach Aufbrechen

des jeweiligen Tumors in die Umwelt freigesetzt und als reife Sporen über den Wind verteilt werden (Abb. 1.4 J; Kämper *et al.*, 2006; Steinberg und Perez-Martin 2008; Vollmeister *et al.*, 2011). Dieses biotrophe Wachstum, basierend auf systematischer Infektion, ohne die Wirtspflanze zu töten, ist charakteristisch für alle parasitären Arten der Ordnung Ustilaginales (Feldbrügge *et al.*, 2013; Mendgen und Hahn, 2002). Dennoch verursachen Brandpilze bei einer weltweiten Verbreitung in einigen Regionen fortwährende, landwirtschaftliche Verluste mit Ernteschäden in Millionendollarhöhe (Martínez-Espinoza *et al.*, 2002).

Abseits der parasitären Erscheinung erlangte der Pilz *U. maydis* als Modellorganismus zusätzliche Bekanntheit in der Forschung. Neben der exemplarischen Interaktion zwischen Pathogen und Wirtspflanze (Abb. 1.5 B) dient der Mikroorganismus als Modell für zahlreiche zelluläre Prozesse, wie transkriptionale und posttranskriptionale Regulation, den Langstreckentransport entlang von Mikrotubuli (Abb. 1.5 C), die Regulation des Zellzyklus, sowie der Desoxyribonukleinsäure (DNS)-Reparatur und -Rekombination (Feldbrügge *et al.*, 2008; Martínez-Espinoza *et al.*, 2002; Matei und Doehlemann 2016; Pérez-Martín *et al.*, 2006; Steinberg und Perez-Martin 2008; Vollmeister *et al.*, 2011; Vollmeister *et al.*, 2012). Zu letzterem wurden in *U. maydis* 1964 erstmals die bei der DNS-Rekombination auftretenden und nach dem australischen Forscher Robin Holliday benannten Hollidaystrukturen entdeckt (Abb. 1.5 D; Holliday, 2004; Steinberg und Perez-Martin 2008). Vorteilhaft für die Erforschung des Pilzes ist die einfache Kultivierung des Organismus unter Laborbedingungen bei einer Verdopplungsrate von 2 h während des exponentiellen Wachstums der einzelligen Lebensform. Zudem sind zahlreiche molekulare Werkzeuge (Steinberg und Perez-Martin 2008) verfügbar und *U. maydis* mittels Transformations-techniken, basierend auf der hohen Rate homologer Rekombinationsereignisse, für genetische Manipulationen gut zugänglich (Brachmann *et al.*, 2004; Feldbrügge *et al.*, 2013; Kämper, 2004; Pérez-Martín *et al.*, 2006; Terfrüchte *et al.*, 2013). Die Rechtfertigung der Anwendung von *U. maydis* als Modellorganismus für Säugerzellen zeigt sich in einem Genom-umfassenden Vergleich des vorhergesagten Proteoms des Menschen und der jeweiligen Modellorganismen *S. cerevisiae* und *U. maydis*. In Münsterkötter und Steinberg (2007) konnte festgestellt werden, dass *U. maydis* in Relation zu *S. cerevisiae* bzw. der Hefen untereinander mehr Ähnlichkeiten in den Proteinsequenzen mit denen des Menschen aufweist (Abb. 1.5 E).

Weiteres Potenzial von *U. maydis* umfasst die biotechnologische Anwendung des Pilzes, wie beispielsweise die Herstellung von Glykolipiden, welche allgemein breite Anwendung in der Textil-, Papier-, Polymer-, Plastik-, Kosmetik-, Arzneimittel- und Nahrungsmittelindustrie finden. Diesbezüglich zeigt sich der Organismus zudem robust gegenüber der Kultivierung in großräumigen Fermentationsbehältern (Kitamoto, 2002; Feldbrügge *et al.*, 2013). *U. maydis* synthetisiert im sekundären Metabolismus als Glykolipide Mannosylerythritollipide (MEL) und

Ustilaginsäure, die unter Stickstofflimitierung im Kultivierungsmedium in großen Mengen nadelförmige Strukturen ausbildet (Bölker *et al.*, 2008). Ustilaginsäure wird von *U. maydis* durch 12 Gene, die für Transkriptionsfaktoren und Enzyme im Syntheseweg kodieren, in einem Gemisch aus vier Varianten produziert und wirkt wachstumshemmend gegen prokaryotische und eukaryotische Mikroorganismen, was u.a. anhand der unterdrückten Pflanzeninfektion durch den grauen Schimmelpilz *Botrytis cinerea* zum Ausdruck kommt (Feldbrügge *et al.*, 2013; Haskins und Thorn, 1951; Teichmann *et al.*, 2007). MELs repräsentieren ölige, Oberflächen-aktive Glykolipide aus Mannosylerythritoldisacchariden, die je nach Acetylierungsgrad mit Fettsäureketten in vier unterschiedlichen Varianten (A-D) vorkommen (Hewald *et al.*, 2006; Kitamoto *et al.*, 1990). Die Eigenschaften von MELs ermöglichen potentiellen, vielseitigen Nutzen, beispielsweise in medizinischen Bereichen durch die antimikrobielle Aktivität oder in biotechnologischer Anwendung als Waschdetergens (Kitamoto *et al.*, 1993; Morita *et al.*, 2011; Singh und Cameotra 2004). Neben weiteren Sekundärmetaboliten (z.B. Siderphore) und katalytischen Enzymen, wie Lipasen und Phytasen, die für die industrielle Anwendung von Interesse sein könnten, kodieren 33 Gene des *U. maydis*-Genoms für sekretierende Zellwand abbauende Enzyme (*engl.*: cell wall degrading enzymes; CWDEs). CWDEs bieten dabei das Potential, für die Biokraftstoffproduktion ligninreiche, pflanzliche Biomasse zu fermentierbaren Einfachzuckern zu degradieren, sodass die Fermentation zu hochwertigen Verbindungen wie Itakonsäure erfolgen könnte (Feldbrügge *et al.*, 2013; Kämper *et al.*, 2006; Mueller *et al.*, 2008; Geiser *et al.*, 2016).

Mit der Entdeckung der unkonventionellen Sekretion der Chitinase Cts1 (Abschnitt 1.2.2) in *U. maydis* hat die Etablierung des selbigen Organismus als Expressionsplattform biotechnologisch an Bedeutung gewonnen (Koepke *et al.*, 2011; Stock *et al.*, 2012). Gebunden an die Chitinase können Proteine von Interesse mithilfe eines bisher unbekanntem Sekretionswegs aus der Zelle exportiert werden. Vorteilhafte Konditionen für die Produktion heterologer Proteine ergeben sich dadurch, dass wahrscheinlich die Qualitätskontrolle und nachweislich die *N*-Glykosylierung im ER vermieden werden, wodurch zum einen die Herstellung organismusfremder Proteine erleichtert wird und zum anderen keine *N*-glykosylierten Produkte gebildet werden (Stock *et al.*, 2012). Letzteres kann für die therapeutische Anwendung auf Grund einer ausbleibenden Immunreaktion, ausgelöst durch pilzliche *N*-Glykosylierung, in anderen Organismen relevant werden (Gerngross, 2004). Des Weiteren wurde gezeigt, dass die Sekretion vergleichsweise großer Proteine (bis zu 173 kDa) und die Bildung intramolekularer Disulfidbrücken durch die unkonventionelle Sekretion gewährleistet wird (Sarkari *et al.*, 2014; Stock *et al.*, 2012). Exemplarisch für die Herstellung eines biopharmazeutischen Proteins, welches Disulfidbrückenbildung, aber keine *N*-Glykosylierung benötigt, steht die Cts1-vermittelte funktionale Sekretion eines scFv-

Antikörperfragments (*engl.*: single-chain variable fragment; scFvs) in *U. maydis* (Sarkari *et al.*, 2014). Allgemein werden durch Sekretion kostspielige Zellyse, Denaturierungs- und erneute Faltungsprozesse des rekombinanten Proteins, sowie die Kontamination mit zellulären Komponenten vermieden (Feldbrügge *et al.*, 2013; Schmidt, 2004). Der guten Eignung *U. maydis* für genetische Manipulationen und für die Kultivierung im großen Ansatz (s.o.) sowie die Einschätzung des Pilzes, für den menschlichen Organismus ungefährlich zu sein, steht die mengenmäßig bisher geringe Sekretionsleistung auf dem unkonventionellen Weg gegenüber, um *U. maydis* als Expressionsplattform konkurrenzfähig zu machen (Feldbrügge *et al.*, 2013; Stock *et al.*, 2012). Ein besseres Verständnis des Sekretionsweges könnte daher auch zur Verbesserung des Expressionssystems beitragen.

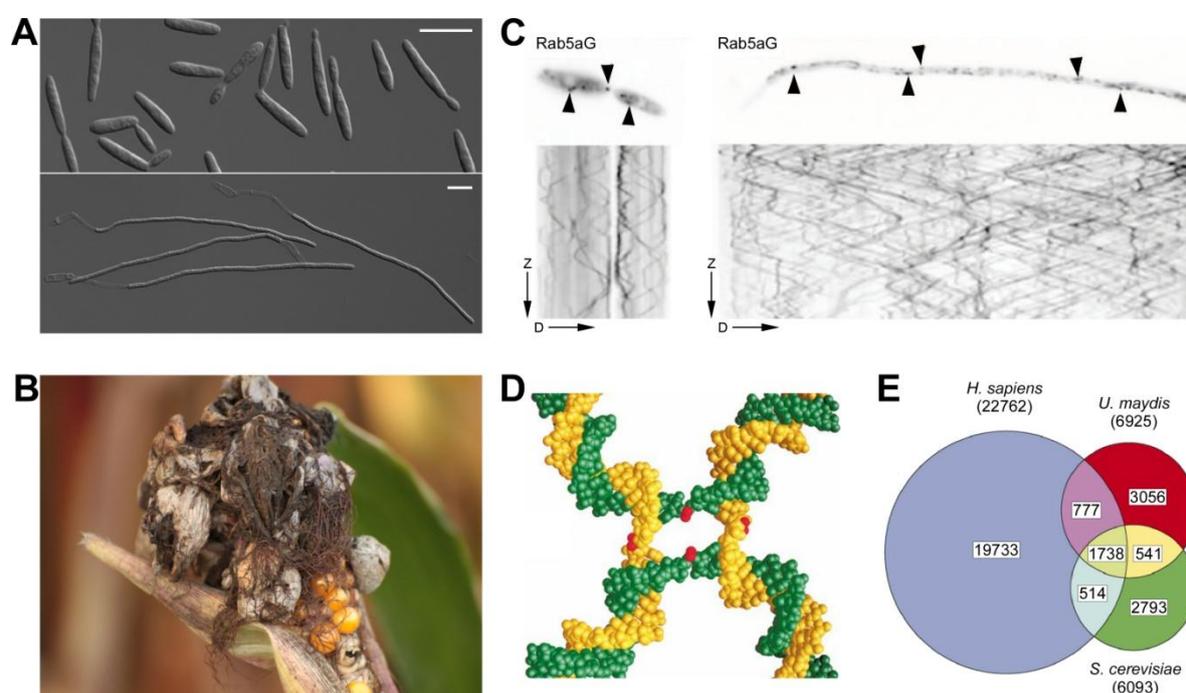


Abb. 1.5: Der Maispathogen *U. maydis* als Modellorganismus. (A) Flüssigkulturen des Laborstamms AB33 während des hefeartigen (oben) und des filamentösen Wachstums (unten). Durch Wechsel der Stickstoffquelle kann in diesem Stamm das filamentöse Wachstum induziert werden. Die Vermehrung der haploiden Sporidien erfolgt durch Knospung. Größenmaßstab: 10 µm. (B) Anhand der Infektion von Maispflanzen bietet *U. maydis* das Potential Pathogen-Wirtspflanzen-Interaktionen zu erforschen. Der Befall zeigt sich durch die Ausbildung tumorartiger Strukturen an der Pflanzenoberfläche in denen sich schwarze, monokaryotische, diploide Teliosporen entwickeln. Abbildungen modifiziert nach Feldbrügge *et al.* (2013). (C) Untersuchungen des Mikrotubuli-abhängigen, endosomal Transport in Sporidien (links) und Filamenten (rechts) des Laborstamms AB33. Mit Hilfe der Fusion von Gfp an den Endosomen Marker Rab5a wurden intrazelluläre Bewegungen visualisiert und mittels Kymographen über die Parameter Zeit (Z) und Distanz (D) analysiert. Abbildung modifiziert nach Göhre *et al.* (2012). (D) Modellhafte Darstellung der bei der DNS-Rekombination auftretenden und erstmalig in *U. maydis* entdeckten Hollidaystruktur. Abbildung modifiziert nach Gopaul *et al.* (2013). (E) Die Sequenzvergleiche vorhergesagter Proteine belegen eine größere Ähnlichkeit des Proteoms von *H. sapiens* und *U. maydis*, als von *H. sapiens* und *S. cerevisiae* oder *U. maydis* und *S. cerevisiae*. Aufgeführt sind Proteine mit mehr als 20 % Identität über die gesamte Proteinslänge. Abbildung modifiziert nach Steinberg und Perez-Martin (2008).

1.2.1 Koordination der Zellteilung in haploiden Sporidien

Abgesehen von der Proliferation innerhalb der Wirtspflanze während des filamentösen Wachstums kann sich *U. maydis* in der einzelligen Lebensphase durch Zellteilung vermehren. Die zylindrischen Sporidien bilden, anders als beispielsweise in *S. cerevisiae* während der S-Phase, erst nach der DNS-Synthese in der G2-Phase des Zellzyklus polar, an den terminalen Bereichen der Zelle eine Knospe aus (Abb. 1.6 A). Anschließend kann sich die im Regelfall einmalige Knospung pro Zellzyklus an der selbigen Knospungsstelle oder an einer neuen Position am gleichen oder gegenüberliegenden Pol in der nächsten Periode wiederholen (Banuett und Herskowitz, 2002; Pérez-Martín *et al.*, 2006; Snetselaar und McCann, 1997). Mittels Anlagerung von neuem Zellwandmaterial an der Spitze der Knospe erfolgt das Wachstum der späteren Tochterzelle. Fluoreszenzmikroskopische Analysen verdeutlichen, dass das polare Wachstum anhand der Spitzenverlängerung der Knospe durch die zwischenzeitliche Konzentration von Aktin vermittelt wird. Bereiche mit akkumuliertem Aktin, in dessen Richtung Aktinkabel als potentielle Transportrouten für bewegliche Vesikel polymerisieren, befinden sich am Knospungsursprung und später innerhalb der wachsenden Knospe bzw. Knospenspitze. Diese Stellen des polarisierten Wachstums benötigen dabei die kontinuierliche Sekretion von neuem Zellwandmaterial (Banuett und Herskowitz, 2002).

Sobald eine entsprechende Größe der Knospe erreicht wurde, migriert der Zellkern aus der Mutterzelle in Richtung der angehenden Tochterzelle, wo eine offene Mitose erfolgt. Im Übergang von Mutter- zur späteren Tochterzelle wird die Kernhülle aufgelöst. Dieser Prozess wird durch ein Heterodimer aus den Proteinen Don3 und Dip1 reguliert (Sandrock *et al.*, 2006; Theisen *et al.*, 2008). Im Zuge der Zellteilung werden Mikrotubuli organisierende Zentren (*engl.*: microtubule organizing center; MTOC) mittels des Motorproteins Dynein zur Knospungsstelle transportiert (Fink und Steinberg 2006; Vollmeister *et al.*, 2011). Während in der Interphase Mikrotubuli die Zelle in der Längsachse antiparallel durchspannen, bewirkt das tubuläre Netzwerk, als Spindel organisiert, in der Mitose zunächst die Positionierung gänzlichen Chromatins in der Knospe und nach der Anaphase die Verteilung eines Chromosomensatzes von der Knospe in die Mutterzelle (Altamirano *et al.*, 2017; Banuett und Herskowitz 2002; Steinberg *et al.*, 2001).

Die finale physische Trennung von Mutter- und Tochterzelle in haploiden Zellen wird mit dem Einziehen von zwei Septen an der Knospungsstelle initiiert (Abb. 1.6 B). Die Bildung des primären Septums auf der Seite der Mutterzelle erzeugt eine erste physische Barriere, die das Cytoplasma von Mutter- und Tochterzelle separiert. Durch den Aufbau des sekundären Septums auf der Seite der Tochterzelle, der im Gegensatz zum primären Septum unabhängig vom Zellzyklus erfolgt, wird zwischen den Septen die Entstehung einer sogenannten Fragmentierungszone erreicht (Altamirano *et al.*, 2017; Böhmer *et al.*, 2008;

Weinzierl *et al.*, 2002). Mit der doppelten Septenbildung einhergehend ist die jeweilige Bildung eines kontraktiven Aktomyosinrings (AMR), der sich aus dem Motorprotein Myosin II und filamentösen Aktin (F-Aktin) zusammensetzt (Satterwhite und Pollard, 1992). In *S. cerevisiae* wird die einschnürende Funktion des AMR, die zur Invagination der Plasmamembran führt, in gegenseitiger Abhängigkeit mit der Septenbildung beschrieben.

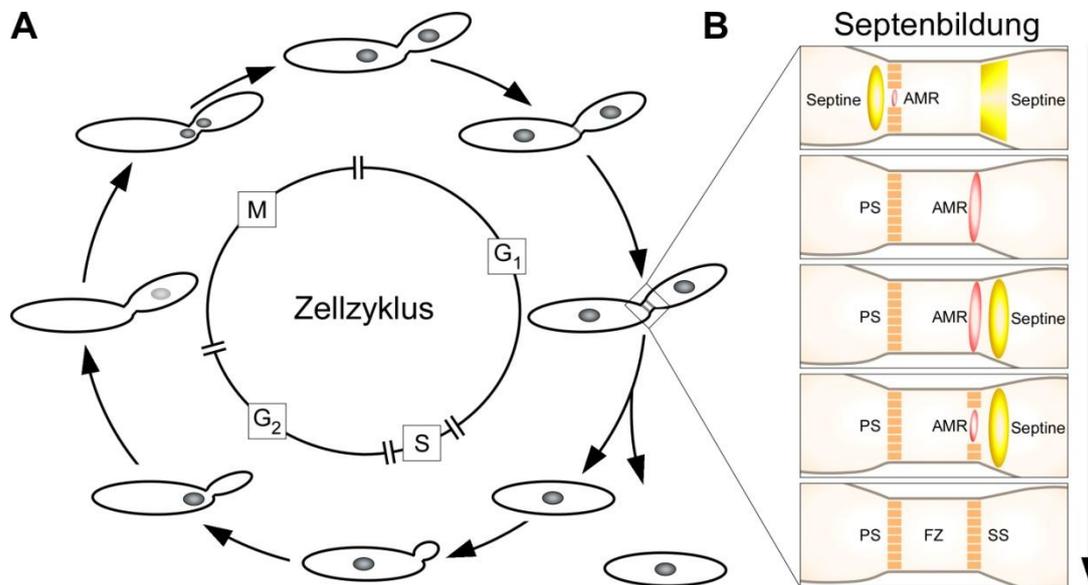


Abb. 1.6: Der Zellzyklus und die Septenbildung in haploiden Sporidien von *U. maydis*. (A) Nachdem am Ende der G₁-Phase aus der Trennung von Mutter- und Tochterzelle eine neue Einzelzelle hervorgeht und in der S-Phase keine morphologischen Veränderungen sichtbar werden, beginnt in der G₂-Phase durch polare Knospung die Entstehung einer neuen Tochterzelle. In der M-Phase kommt es in der angehenden Tochterzelle zu einer offenen Mitose bei der zuvor im Übergang von Mutter- zur späteren Tochterzelle die Hülle des migrierenden Zellkerns aufgelöst wird. Anschließend wird ein Chromosomensatz von der Knospe auf die Mutterzelle verteilt und die Kernhüllen erneuert. Final erfolgt in der G₁-Phase der Aufbau zunächst des primären Septums (PS) und anschließend des sekundären Septums (SS), bis mit der Auflösung der Fragmentierungszone (FZ) die Trennung von Mutter- und Tochterzelle vollzogen und ein Zellzyklus beendet ist. (B) Bei der primären und sekundären Septenbildung werden an der jeweiligen Septierungsstelle initial Septinfilamente kragenförmig angeordnet (oben). Bei der sekundären Septenbildung wird durch die Kinase Don3 die Auflösung des Septinkragens vermittelt, sodass der kontraktile Aktomyosinring (AMR) etabliert werden kann. Nach der Aktivierung von Cdc42 durch den spezifischen GEF Don1 und der vollständigen Synthese des AMRs (2. von oben) werden in ringförmiger Struktur erneut Septinfilamente an der Septierungsstelle angeordnet (Mitte). Mit Einschnürung des AMRs erfolgt der Aufbau des Septums (2. von unten). Zum Ende eines Zellzyklus hat sich nach der sekundären Septenbildung zwischen PS und SS eine Fragmentierungszone etabliert (unten). Abbildung anhand der im Text aufgeführten Bezugsquellen generiert; größtenteils nach Altamirano *et al.* (2017), Snetselaar und McCann (1997) und Steinberg *et al.* (2001).

Die primäre Funktion des AMRs basiert auf der Steuerung der zentripetalen Ausbildung des Septums. Umgekehrt wird die Einschnürung durch den AMR durch die Septenbildung während der Zytokinese stabilisiert (Böhmer *et al.*, 2009; Meitinger und Palani, 2016). Zuvor lokalisieren Septine kragenförmig als Grundgerüst am Zellkortex, wo das spätere primäre bzw. sekundäre Septum entstehen wird, disassemblieren zeitweise, während sich der AMR formiert, und reassemblieren ringförmig auf der Seite der Mutterzelle bzw. Tochterzelle, nachdem der AMR etabliert ist (Altamirano *et al.*, 2017; Böhmer *et al.*, 2009; Zander *et al.*,

2016). Deletion der Gene für die Proteine Rac1 und dessen Effektor, der Kinase Cla4, die für die Organisation der Septine benötigt werden, führen zu fehlender Aktinpolymerisation an der Septierungsstelle und sind dadurch mutmaßlich für den Aufbau des AMR und des primären Septums erforderlich (Altamirano *et al.*, 2017; Leveleki *et al.*, 2004; Mahlert *et al.*, 2006).

Essentiell für die sekundäre Septumbildung in *U. maydis* ist die Kinase Don3, die in dualer Funktion neben der Auflösung der Kernhülle (s.o.) als Homodimer den zwischenzeitlichen Abbau der kragenförmig lokalisierten Septine katalysiert, damit der AMR gebildet werden kann. Die Deletion des Gens für Don3 ist durch einen deutlichen Zellteilungsdefekt in Form von mehreren Bäumchen-artig zusammenhängender Zellen ausgeprägt, da kein sekundäres Septum gebildet wird (Altamirano *et al.*, 2017; Böhmer *et al.*, 2009). Trotz nachgewiesener Interaktion in Hefe-zwei-Hybrid-Versuchen konnte in Experimenten mit chemisch induzierbarer Inaktivierung von Don3 gezeigt werden, dass Don3 während der Zytokinese unabhängig von dem GTP-bindenden Protein Cdc42 agiert, welches in hoch-konservierter Funktion für die Anordnung des AMR verantwortlich ist. Es wird jedoch vermutet, dass Don3 durch seine Kinaseaktivität ein bisher unbekanntes Protein als Voraussetzung für die Cdc42 vermittelte Synthese des AMRs phosphoryliert (Böhmer *et al.*, 2008; Hlubek *et al.*, 2008; Weinzierl *et al.*, 2002). Folgerichtig führt die Deletion des Formins und Cdc42 Effektors Drf1 ebenfalls zu einem Zellteilungsdefekt in Sporidien des Pilzes (Freitag *et al.*, 2011). Formine werden für die Ausbildung neuer Aktinfilamente (Nukleation), die in antiparalleler Orientierung den AMR bilden, während des polarisierten Wachstums und der Zytokinese benötigt (Evangelista, 2003; Meitinger und Palani, 2016).

Damit die Signalkaskade für die sekundäre Septumbildung und finale Septierung von Mutter- und Tochterzelle erfolgen kann, muss die spezifische Aktivierung der GTPase Cdc42 durch den Guaninaustauschfaktor (*engl.*: guanine exchange factor; GEF) Don1 vermittelt werden (Böhmer *et al.*, 2009; Hlubek *et al.*, 2008; Mahlert *et al.*, 2006). Namensgebend für Don1 als auch für Don3 ist die Beobachtung, dass kultivierte Stämme mit Deletionen in den entsprechenden Genen auf Grund der fehlenden sekundären Septenbildung und des damit einhergehenden Teilungsdefekts auf festem Kulturmedium Donut-förmige Zellkolonien ausbilden. Ausgeprägt wird der Phänotyp wahrscheinlich durch das periphere Wachstum der Kolonie, wodurch die zusammenhängenden Zellen aus dem Zentrum der Kolonie gezogen werden (Weinzierl *et al.*, 2002). Innerhalb der Tochterzelle wird Don1 über Mikrotubuli-abhängigen Transport an die Seite des sekundären Septums lokalisiert. Die Interaktion der intramolekularen FYVE-Domäne von Don1 mit dem endosomalen Lipid Phosphatidylinositol 3-Phosphat (PI3P) deutet auf eine Endosomenbindung von Don1 hin. Zudem konnte mit Hilfe fluoreszenzmikroskopischer Aufnahmen die intrazelluläre Bewegung von Don1 enthaltenden Partikeln Richtung Teilungszone visualisiert werden. Bestätigt werden die

Beobachtungen zusätzlich durch die ausbleibende Bewegung bei der Deletion des Gens für das Motorproteins Kin3, welches den endosomalen Transport entlang von Mikrotubuli vermittelt (Schink und Bölker, 2009). Nach Bildung des sekundären Septums werden die zusammenhaltenden Zellwände der durch Endosomenanreicherung vakuolisierten Fragmentierungszone lysiert und die Mutterzelle von der Tochterzelle getrennt (Weinzierl *et al.*, 2002).

1.2.2 Die Chitinase 1 als Beispiel für unkonventionelle Sekretion in *U. maydis*

Die erfolgreiche Separation von Mutter- und Tochterzelle benötigt die unabhängige Funktionalität zweier Chitinasen in *U. maydis* (Langner *et al.*, 2015). In koordinierter Wirkungsweise mit Chitinsynthasen, die Chitin für die aus Chitinschichten, Glukanen und Glykoproteinen aufgebaute pilzliche Zellwand synthetisieren, regulieren die Chitin-degradierenden Chitinasen durch Auf- und Abbau von Chitin die Plastizität der Zellwand während des Wachstums von Pilzen (Bowman und Free 2006; Langner *et al.*, 2015). Insgesamt kodiert das Genom von *U. maydis* für vier chitinolytische Enzyme, von denen Einzeldelationen der entsprechenden Gene in Sporidien keinen morphologischen Phänotyp aufzeigen. Allerdings führt die Doppeldelation der Gene für die Chitinase 1 (Cts1) und Chitinase 2 (Cts2) in Sporidien des Pilzes zu einem Zellteilungdefekt, was auf die Beteiligung der beiden Chitinasen in der Separation von Mutter- und Tochterzelle im Zuge der Zytokinese hindeutet, mutmaßlich durch Degradierung der zusammenhaltenden Zellwände in der Fragmentierungszone (Langner *et al.*, 2015). Entsprechend klassifiziert eine GH18 Domäne in den Aminosäuresequenzen von Cts1 und Cts2 die Proteine zu Chitinasen der Glykosylhydrolase 18-Familie, welche Chitinpolymere in kurzkettenige Oligomere spalten (Langner *et al.*, 2015; Seidl, 2008).

Während die Aminosäuresequenzen der Chitinasen 2 bis 4 je ein N-terminales Signalpeptid für die konventionelle Sekretion aufweisen, wird für Cts1 bioinformatisch kein Signalpeptid vorhergesagt (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>). Dennoch wurde zunächst in Filamenten und später auch in Sporidien von *U. maydis* die Sekretion von aktivem Cts1 ins extrazelluläre Milieu anhand enzymatischer Aktivitätstests nachgewiesen (Koepke *et al.*, 2011; Stock *et al.*, 2012). In Filamenten des Brandpilzes konnte gezeigt werden, dass die *messenger* Ribonukleinsäure (mRNS) von Cts1 mit dem mRNS-bindenden Protein Rrm4 interagiert. Rrm4 ist an dem Mikrotubuli-abhängigen Transport von mRNSn, beispielsweise von Polaritäts- und Translationsfaktoren, beteiligt und somit entscheidend für das polare Wachstum und die Virulenz des Filaments (Becht *et al.*, 2005; Koepke *et al.*, 2011; König *et al.*, 2009).

Die Deletion des Gens für Rrm4 führt zu einer deutlich reduzierten extrazellulären Enzymaktivität von Cts1 in Filamenten von *U. maydis*. Kontrollen, in denen im Deletionsstamm die Zellmembran permeabilisiert, dadurch intrazellulär akkumuliertes Cts1 freigesetzt und die Enzymaktivität wieder gesteigert wurde, belegen, dass unabhängig von der Anwesenheit von Rrm4 funktionales Cts1 gebildet, aber in Abhängigkeit von Rrm4 die Chitinase in Filamenten sekretiert wird. Zudem unterstützt die Beobachtung einer reduzierten enzymatischen Aktivität bei Behandlung der Filamente mit dem Mikrotubuli-Inhibitor Benomyl oder der Deletion des Gens für das Motorprotein Kin1 die Annahme, dass Mikrotubuli-abhängiger mRNA-Transport durch Rrm4 die Sekretion von Cts1 in Filamenten vermittelt.

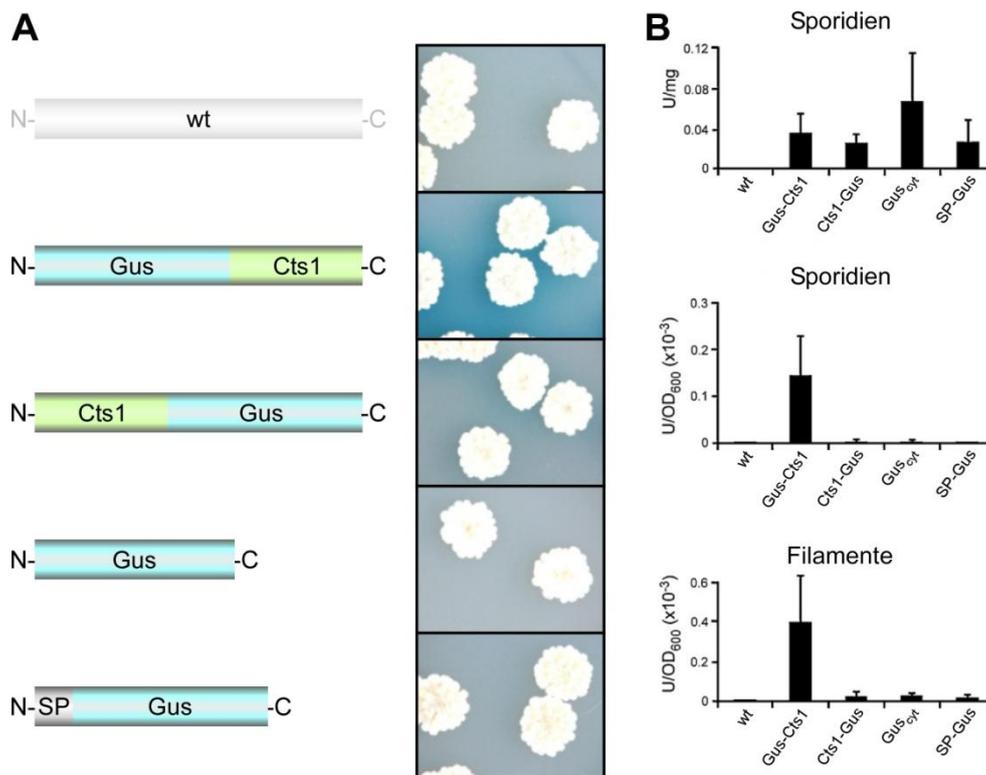


Abb. 1.7: Die Chitinase Cts1 wird in *U. maydis* unkonventionell sekretiert. Mittels N-terminaler Fusion der bakteriellen β -Glukuronidase Gus an Cts1 und der Messung extrazellulärer Gus-Aktivität wurde die unkonventionelle Sekretion der Chitinase nachgewiesen. **(A)** Gensequenzen von unterschiedlichen Fusionsproteinen wurden im Laborstamm AB33 ektopisch überexprimiert. Auf Festmedium mit 5-Brom-4-chlor-3-indolyl- β -D-glucuronsäure (X-Gluc) wurden Sporidien der Reporterstämme angezogen. Als Negativkontrolle diente der Stamm AB33 (wt) ohne Fusionsprotein (oben). Anhand der Umwandlung des farblosen Substrats zum blauen Produkt wurde die extrazelluläre Gus-Aktivität im Stamm mit N-terminaler Fusion von Gus an Cts1 deutlich (2. von oben). Im Stamm mit C-terminaler Fusion von Gus an Cts1 ist lediglich eine geringe Blaufärbung wahrnehmbar (Mitte). In Stämmen mit cytoplasmatischen Gus (2. von unten) und N-terminaler Fusion eines Signalpeptids (SP) einer intrinsischen Invertase an Gus (unten) ist anhand der fehlenden Blaufärbung keine extrazelluläre Gus-Aktivität sichtbar. Mit Fusion des Signalpeptids einer endogenen Invertase wurde artifizell die konventionelle Sekretion von Gus angestrebt, was durch N-Glykosylierung im ER zur Inaktivierung des Enzyms führen sollte. **(B)** Ergebnisse enzymatischer Aktivitätstests der o.g. Reporterstämme mit unterschiedlichen Fusionsproteinen in Gesamtzellextrakten (oben) und zellfreien Kulturüberständen (Mitte) von Sporidien, sowie in zellfreien Kulturüberständen von Filamenten (unten). Die Bestimmung der intrazellulären Gus-Aktivität zeigte, dass Gus in allen Fusionskonstrukten aktiv ist (oben). In den zellfreien Kulturüberständen von Sporidien und Filamenten sind lediglich in Stämmen mit N-terminalen Gus extrazelluläre Gus-Aktivitäten messbar (Mitte und unten). Abbildungen der Ergebnisse modifiziert nach Stock *et al.* (2012).

Entgegen der Erkenntnisse in Filamenten erfolgt die Sekretion in Sporidien unabhängig von Rrm4 (Koepke *et al.*, 2011; Stock *et al.*, 2012). Untersuchungen in Sporidien des Pilzes konnten jedoch einen zusätzlichen Hinweis erbringen, dass Cts1 unkonventionell sekretiert wird (Abb. 1.7 A). Neben den Indizien, dass Cts1 kein vorhergesagtes Signalpeptid für die konventionelle Sekretion besitzt und dennoch funktional im extrazellulären Milieu lokalisiert, wurde mit der N-terminalen Fusion der β -Glukuronidase Gus an Cts1 gezeigt, dass das Fusionsprotein auf dem Sekretionsweg keiner ER-vermittelten und für den konventionellen Transportweg charakteristischen *N*-Glykosylierung unterliegt (Stock *et al.*, 2012). Das bakterielle Reporterprotein Gus besitzt in der Aminosäuresequenz eine Erkennungssequenz für die *N*-Glykosylierung, würde allerdings bei einer auf Grund des prokaryotischen Ursprungs untypischen *N*-Glykosylierung in der enzymatischen Aktivität stark reduziert (Iturriaga *et al.*, 1989; Jefferson *et al.*, 1986; Stock *et al.*, 2012).

Die detektierte extrazelluläre enzymatische Gus-Aktivität des Konstrukts Gus-Cts1 lässt einerseits auf eine ausbleibende ER-vermittelte *N*-Glykosylierung und andererseits auf die Redundanz eines freiliegenden N-Terminus von Cts1 für die effektive Sekretion der Chitinase schließen. Enzymtests mit C-terminaler Fusion von Gus an Cts1 zeigen anhand intrazellulärer, aber extrazellulär fehlender Aktivität in Sporidien, dass die katalytische Funktion von Gus unabhängig von der Orientierung im Fusionsprotein vorliegt, hingegen der C-Terminus von Cts1 für die effektive Sekretion notwendig zu sein scheint (Abb. 1.7 B). Weitere Messungen mit verkürzten Aminosäuresequenzen von Cts1 im Fusionsprotein bestätigen die Redundanz des N-Terminus und die Relevanz des C-Terminus für die Sekretion von Cts1 (Stock *et al.*, 2012). Neben der erwähnten Beteiligung von Cts1 in der Separation von Mutter- und Tochterzelle, die jedoch durch die komplementierende Funktion von Cts2 evolutionär nicht essentiell zu sein scheint, ist über die exakte Wirkungsweise von Cts1 wenig bekannt. In Filamenten von *U. maydis* führt die Deletion der Chitinase zur Bildung von filamentösen Aggregaten in Flüssigkultur und deutet eine Assoziation mit der Zellwand an, zeigt aber keinen Einfluss in der Infektion von Maiskeimlingen (Koepke *et al.*, 2011; Langner *et al.*, 2015). Lokalisationsstudien in Sporidien belegen die spezifische Akkumulation der Chitinase im Teilungsbereich zwischen Mutter- und Tochterzelle (Langner, *et al.*, 2015; Langner und Göhre 2016). Hinsichtlich der Lokalisation außerhalb der Zelle wird in Ökmen *et al.* (2018) dargelegt, dass Cts1 für die extrazelluläre Aktivität durch die Protease Fly1 posttranslational prozessiert und aktiviert wird. Interessanterweise ist diese Aktivierung von Cts1 durch Fly1 intrazellulär nicht relevant (Ökmen *et al.*, 2018).

1.3 Zielsetzung dieser Arbeit

Mit der Signalpeptid-unabhängigen Sekretion, die eine Translokation in das ER vermeidet, repräsentiert der Export der Chitinase Cts1 ein Beispiel für unkonventionelle Sekretion im Maisbeulenbrandpilz *U. maydis*. Abgesehen von der intrazellulären Lokalisation der Chitinase existieren bisher keine Informationen, um den Sekretionsmechanismus von Cts1 detailliert nachzuvollziehen.

Die Zielsetzung dieser Arbeit war es daher, nachhaltige Erkenntnisse zum unkonventionellen Sekretionsmechanismus von Cts1 zu generieren. Die Aufmerksamkeit lag dabei vorrangig auf Sporidien. Einen weitverbreiteten unkonventionellen Sekretionsmechanismus in Pilzen und darüber hinaus stellt die sekretorische Autophagie dar, weshalb zunächst potentielle homologe Gene dieses Exportprozesses in *U. maydis* identifiziert werden sollten. Mittels reverser Genetik sollte der Einfluss dieser potentiellen Homologe auf die Sekretion von Cts1 untersucht werden.

In vorangegangenen Studien konnte bereits eine Lokalisation von Cts1 im Teilungsbereich zwischen Mutter- und Tochterzelle festgestellt werden, die auf eine mögliche tochterzellspezifische Expression von *cts1* hinweist und mit der Freisetzung der Chitinase über die Fragmentierungszone assoziiert werden könnte. Diesbezüglich sollten mittels weitergeführter Lokalisationsstudien die intrazelluläre Verteilung von Cts1 während des Zellzyklus ergänzend charakterisiert und durch Promotorstudien die tochterzellspezifische Expression analysiert werden. Co-Lokalisationsstudien von Cts1 mit zellulären Markern sollten Aufschluss über den intrazellulären Transport zur Fragmentierungszone geben. Ein weiteres Ziel bestand darin, eine mögliche Abhängigkeit der Cts1-Sekretion vom Zellzyklus zu ermitteln. Hierzu sollte die Sekretion von aktivem Protein bei artifiziellem Arrest des Zellzyklus quantifiziert werden. Um den Einfluss der physischen Trennung von Mutter- und Tochterzelle zu analysieren, sollte die unkonventionelle Sekretion in unterschiedlichen Zellteilungsmutanten untersucht werden.

Die Septierungsproteine Don1 und Don3 lokalisieren in der Fragmentierungszone und zeigen damit Analogien zur intrazellulären Verteilung von Cts1. Diesbezüglich sollte eine mögliche Verbindung der beiden Proteine zur Sekretion der Chitinase sowie deren potentielle unkonventionelle Sekretion untersucht werden.

2. Ergebnisse

2.1 Homologe Gene der sekretorischen Autophagie sind nicht am Export von Cts1 beteiligt

Um den bisher unbekanntem Mechanismus der unkonventionellen Sekretion der Chitinase Cts1 in *U. maydis* aufzudecken, wurden mögliche Parallelen zu einem in den Hefen *S. cerevisiae* und *P. pastoris* etablierten und unter Nährstoffmangel induzierten unkonventionellen Sekretionsmechanismus untersucht (Duran *et al.*, 2010; Manjithaya *et al.*, 2010). Das Acetyl-Coenzym A bindende Protein Acb1 wird im Prozess der sekretorischen Autophagie in sogenannten Kompartimenten der unkonventionellen Proteinsekretion (*engl.*: compartments for unconventional protein secretion; CUPS) internalisiert und vermutlich über die Biogenese der CUPS zu sekretorischen Autophagosomen an die Plasmamembran rekrutiert und extrazellulär freigesetzt. Außerhalb der Zelle wird Acb1 mittels einer Protease zum Sporulationsdifferenzierungsfaktor SDF-2 prozessiert (Bruns *et al.*, 2011; Cruz-Garcia *et al.*, 2014; Malhotra, 2013). Arbeiten zur sekretorischen Autophagie konnten zeigen, dass für die unkonventionelle Sekretion des Proteins Acb1 bestimmte Proteine essentiell sind. Folglich führten entsprechende Gendelektionen zu einer ausbleibenden enzymatischen Aktivität des aus Acb1 extrazellulär prozessierten SDF-2 (Duran *et al.*, 2010; Manjithaya *et al.*, 2010). Für die Analyse eines potentiell vergleichbaren Sekretionsmechanismus bei der unkonventionellen Sekretion von Cts1 wurden zunächst homologe Gene der sekretorischen Autophagie in *U. maydis* ermittelt.

2.1.1 Identifizierung homologer Gene der sekretorischen Autophagie in *U. maydis*

In der Recherche nach Genen, für die Homologe in *U. maydis* identifiziert werden sollten, wurden zwei Bedingungen berücksichtigt: Zum einen mussten die kodierten Proteine eine essentielle Funktionen in der sekretorischen Autophagie besitzen, und zum anderen sollten diese an unterschiedlichen Zwischenschritten der sekretorischen Autophagie beteiligt sein und somit möglichst den gesamten Prozess der sekretorischen Autophagie abdecken. Die Nomenklatur für Gene bzw. Proteine der Hefe *S. cerevisiae* wurde im Folgenden auf die Kandidaten in *U. maydis* übertragen.

Im Hinblick auf die eingangs formulierte Bedingung handelt es sich bei den Proteinen Grh1, Pex3, Atg8 und Spo14 zum einen um essentielle Komponenten der sekretorischen Autophagie von Acb1 und zum anderen werden durch die Lokalisation an CUPS, Peroxisomen, Autophagosomen und Plasmamembran unterschiedliche Zwischenschritte im Prozess berücksichtigt (Abschnitt 1.1.2.2). Auf Grund der Tatsache, dass die sekretorische Autophagie im Organismus *S. cerevisiae* ausführlich beschrieben worden ist, wurde sich bei

der Identifizierung homologer Gene der sekretorischen Autophagie in *U. maydis* an dem Modellorganismus orientiert. Mittels einer Online-Datenbank für das Genom von *S. cerevisiae* (<https://www.yeastgenome.org/>) wurden die Proteinsequenzen für Grh1, Pex3, Atg8 und Spo14 ermittelt. Anhand des Online-Angebots des „National Center for Biotechnology Information“ (NCBI; <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) erfolgte der Abgleich der ermittelten Proteinsequenzen von *S. cerevisiae* mit den Proteinen des Genoms des *U. maydis*-Stamms 521. Das Resultat des Abgleichs war die Identifizierung je eines Proteins in *U. maydis* für die Kandidaten Grh1, Pex3 und Atg8 mit unterschiedlichen Relationen der Proteinidentitäten (Tab. 2.1). Für die Proteinsequenz von Spo14 wurden insgesamt drei Proteine zugeordnet, jedoch entsprach nur eins davon einer Phospholipase, welche für Spo14 charakteristisch ist (Xie *et al.*, 1998). Die vergleichsweise geringen Werte in der Proteinidentität beim Abgleich der Proteinsequenzen von *S. cerevisiae* mit *U. maydis* deuten die phylogenetische Divergenz der beiden pilzlichen Vertretern der Ascomyceten (*S. cerevisiae*) und Basidiomyceten (*U. maydis*) an.

Tab. 2.1: Abgleich essentieller Proteine der sekretorischen Autophagie in *U. maydis* 521

Protein	Lokalisation in <i>S. cerevisiae</i>	Genkennung in <i>U. maydis</i>	Proteinidentität zu <i>S. cerevisiae</i> Homologen ¹
Grh1	CUPS	umag01076	28 %
Pex3	Peroxisomen	umag06200	25 %
Atg8	Autophagosomen	umag05567	76 %
Spo14	Plasmamembran	umag00370	46 %

¹ NCBI; <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

2.1.2 Deletionen von homologen Genen der sekretorischen Autophagie zeigen keinen Einfluss auf die unkonventionelle Sekretion von Cts1

Nach der Identifizierung homologer Gene der sekretorischen Autophagie in *U. maydis* wurden Deletionsstämme im Laborstamm AB33 hergestellt, um den Einfluss auf die unkonventionelle Sekretion von Cts1 zu untersuchen. Der Fokus wurde dabei auf die Sekretion in Sporidien gelegt. Deletiert wurden jeweils die homologen Gene für Grh1 (*grh1Δ*), Pex3 (*pex3Δ*), Atg8 (*atg8Δ*) und Spo14 (*spo14Δ*) im Hintergrund eines *U. maydis*-Stammes mit der genomisch kodierten Gensequenz für ein Fusionsprotein aus der N-terminalen β -Glukuronidase Gus und Cts1 (AB33gus-cts1, Sarkari *et al.*, 2014). Mittels des Fusionsproteins Gus-Cts1 konnte in früheren Arbeiten anhand der Gus-Aktivität die unkonventionelle Sekretion von Cts1 in den extrazellulären Raum nachgewiesen werden.

Das Reporterprotein Gus ist bakteriellen Ursprungs und enthält eine Erkennungssequenz für die N-Glykosylierung in der Aminosäuresequenz. Bei potentieller N-Glykosylierung im ER

während des konventionellen Sekretionswegs würde die enzymatische Aktivität von Gus reduziert werden (Iturriaga *et al.*, 1989; Jefferson *et al.*, 1986; Stock *et al.*, 2012).

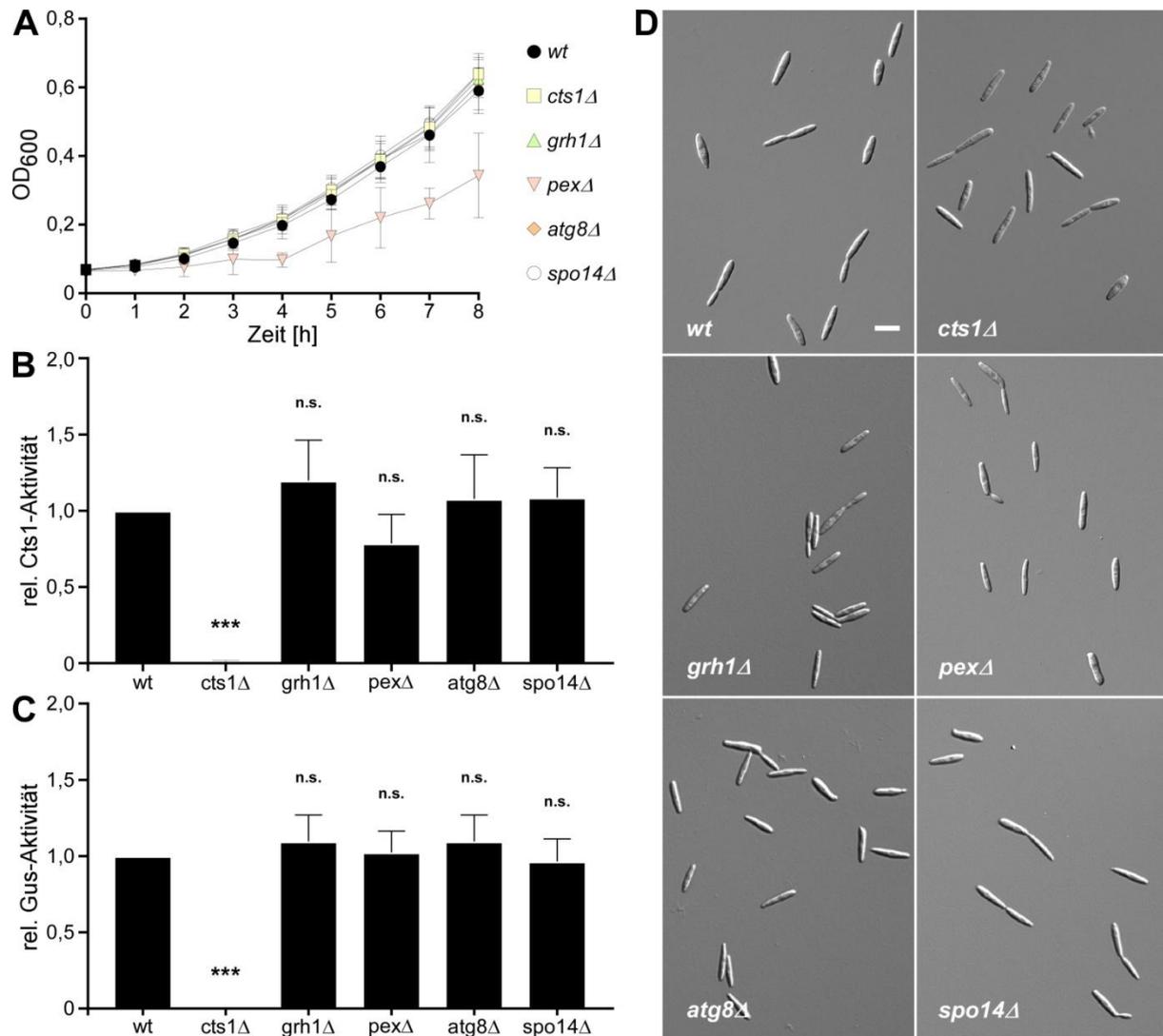


Abb. 2.1: Deletionen von homologen Genen der sekretorischen Autophagie zeigen keinen Einfluss auf die Cts1-Sekretion. Analyse der AB33-Stämme mit dem Reporter Gus-Cts1 und Deletionen in den homologen Genen für Grh1 (*grh1Δ*), Pex3 (*pex3Δ*), Atg8 (*atg8Δ*) und Spo14 (*spo14Δ*) während des hefeartigen Wachstums. **(A)** Wachstumsanalyse anhand der OD₆₀₀ über eine Inkubationszeit von 8 h von AB33gus-cts1 (wt), AB33cts1Δ, AB33gus-cts1/grh1Δ, AB33gus-cts1/atg8Δ, AB33gus-cts1/pex3Δ und AB33gus-cts1/spo14Δ. Inokuliert wurde mit einer OD₆₀₀ von 0,05. Fehlerbalken: Standardabweichung von mind. 8 biologischen Replikaten. **(B)** Relative extrazelluläre Cts1-Aktivitäten von AB33gus-cts1/grh1Δ, AB33gus-cts1/atg8Δ, AB33gus-cts1/pex3Δ und AB33gus-cts1/spo14Δ. Als Referenz für Cts1-Sekretion wurde der Stamm AB33gus-cts1 (wt) verwendet. Der Stamm AB33cts1Δ diente als Negativkontrolle. Die Bestimmung erfolgte anhand der Umwandlung des Substrats MUC. Fehlerbalken: Standardabweichung von mind. 8 biologischen Replikaten. n.s., nicht signifikant, p-Wert > 0,05; ***, p-Wert > 0,001 (1-way ANOVA, Kontrolle: wt) **(C)** Relative Gus-Aktivitäten in den zellfreien Kulturüberständen von AB33gus-cts1/grh1Δ, AB33gus-cts1/atg8Δ, AB33gus-cts1/pex3Δ und AB33gus-cts1/spo14Δ. Als Referenz für die unkonventionelle Sekretion von Gus-Cts1 wurde der Stamm AB33gus-cts1 (wt) verwendet, AB33cts1Δ diente als Negativkontrolle. Die Bestimmung erfolgte anhand der Umwandlung des Substrats MUG. Fehlerbalken: Standardabweichung von mind. 8 biologischen Replikaten. n.s., nicht signifikant, p-Wert > 0,05; ***, p-Wert > 0,001 (1-way ANOVA, Kontrolle: wt) **(D)** Mikroskopische Analyse der Sporidienmorphologie von AB33gus-cts1 (wt), AB33cts1Δ, AB33gus-cts1/grh1Δ, AB33gus-cts1/atg8Δ, AB33gus-cts1/pex3Δ und AB33gus-cts1/spo14Δ. Größenmaßstab: 10 μm.

Extrazelluläre enzymatische Gus-Aktivität von konstitutiv synthetisiertem Gus-Cts1 verweist demnach auf die unkonventionelle Sekretion von Cts1. Zusätzlich kann die unkonventionelle Sekretion von Cts1 in den Deletionsstämmen durch das endogen kodierte Gen für Cts1 bemessen werden. Als Referenz für die Cts1-Sekretion diente der Stamm AB33gus-cts1 (wt) und als Negativkontrolle ein Stamm ohne genomisch kodierter Gensequenz für Gus-Cts1 und mit Deletion des Gens von Cts1 (AB33cts1 Δ).

Das Wachstumsverhalten der jeweiligen Stämme zeigte für AB33gus-cts1/grh1 Δ , AB33gus-cts1/atg8 Δ und AB33gus-cts1/spo14 Δ keine Abweichungen zu AB33gus-cts1 (wt) oder AB33cts1 Δ (Abb. 2.1 A). Wie in Koepke *et al.* (2011) bereits beschrieben, erzeugt die Deletion des Gens von Cts1 erwartungsgemäß keinen morphologischen Phänotypen in Sporidien und Cts1 scheint nicht für das hefeartige Wachstum benötigt zu werden. Hingegen ist die Wachstumsrate von AB33gus-cts1/pex3 Δ etwas verzögert (Abb. 2.1 A).

Reduziertes Wachstum durch eine verminderte Teilungsrate könnte auf einen verlangsamten Metabolismus und eine gleichzeitig geringere Expression des Gens für Cts1 nach vergleichbarer Inkubationszeit hinweisen. Um Artefakte dieser Art zu vermeiden, wurden die enzymatischen Aktivitätstests für die relative Cts1-Aktivität bzw. die relative Gus-Aktivität in dieser Arbeit bei möglichst gleichen optischen Dichten (OD₆₀₀ von 1,0) durchgeführt und die Werte zusätzlich in Relation zur OD₆₀₀ gesetzt. Gemäß vorangegangener Experimente wurde die extrazelluläre Cts1-Aktivität auf der Zelloberfläche bzw. im Flüssigmedium durch Messung ganzer Zellen bestimmt, da eine Assoziation von extrazellulärem Cts1 mit der Zellwand angenommen wird (Koepke *et al.*, 2011). Hingegen scheint die Bindung von Cts1 an die Zellwand bei N-terminaler Fusion mit Gus beeinträchtigt, weshalb für die Bestimmung der extrazellulären Gus-Aktivität zellfreier Kulturüberstand verwendet wurde (Stock *et al.*, 2012).

Die Messungen der extrazellulären Cts1-Aktivität in den Stämmen mit Deletionen in homologen Genen der Autophagie zeigten in Relation zu AB33gus-cts1 (wt) keine signifikante Reduktion und schlussfolgernd keine verringerte Cts1-Sekretion (Abb. 2.1 B). Ebenso verweist die Bestimmung der extrazellulären Gus-Aktivität anhand nicht signifikant veränderter Messwerte in den Stämmen mit Deletionen in homologen Genen der Autophagie auf eine gleichbleibende Sekretion von Cts1 (Abb. 2.1 C). Da die Expression der Gene *cts1* bzw. *gus-cts1* unter der Kontrolle jeweils identischer Promotoren erfolgte, kann von einer gleichen Proteinsynthese von Cts1 bzw. Gus-Cts1 in den einzelnen Ansätzen ausgegangen werden. Den Ergebnissen der Aktivitätstests zufolge scheinen die Deletionen der homologen Gene von Grh1, Pex3, Atg8 und Spo14 folglich keinen Einfluss auf die Sekretion von Cts1 in Sporidien zu haben und somit für die unkonventionelle Sekretion von Cts1 in *U. maydis* entgegen der unkonventionellen Sekretion von Acb1 in *S. cerevisiae* nicht essentiell zu sein. Dies deutet daraufhin, dass die Cts1-Sekretion alternativ zum Prozess der sekretorischen

Autophagie erfolgt. Die Beteiligung einzelner Zwischenschritte der sekretorischen Autophagie, wie Fusionsereignisse von Membranen, sind allerdings nicht auszugeschließen bzw. kein exklusives Merkmal der sekretorischen Autophagie.

2.2 Die Sekretion von Cts1 erfolgt zellzyklusabhängig

Da die Untersuchung einer potentiellen sekretorischen Autophagie zur Sekretion von Cts1 keine Erkenntnisse zum Exportmechanismus lieferte, wurden weitere Studien angestrebt, um den unkonventionellen Sekretionsmechanismus von Cts1 aufzudecken. Anhand zeitlich parallel durchgeführter Lokalisationsstudien wurde ein Sekretionsmodell für Cts1 entwickelt, das zunächst die Akkumulation von Cts1 in der Fragmentierungszone zwischen Mutter- und Tochterzelle beschreibt (Dissertation T. Langner, 2015). Anschließend könnte die Freisetzung von Cts1 durch Auflösung der Fragmentierungszone mit der Trennung von Mutter- und Tochterzelle einhergehen (Langner, *et al.*, 2015; Langner und Göhre 2016). Im Folgenden wurden zunächst die Lokalisationsstudien von Cts1 fortgeführt und durch Zellzyklus-Inhibitor-Studien ergänzt.

2.2.1 Cts1 akkumuliert während des Zellzyklus in der Fragmentierungszone

Cts1 repräsentiert ein Protein aus 502 Aminosäuren und ist eine von vier Chitinasen, die in *U. maydis* sekretiert werden (Langner *et al.*, 2015). Im Gegensatz zu den anderen Chitinasen besitzt Cts1 kein vorhergesagtes N-terminales Signalpeptid, weshalb Cts1 als unkonventionell sekretiertes Protein klassifiziert wird (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>). Als Vertreter der Chitinasen der Glykosylhydrolase 18-Familie, welche Chitinpolymere in kurzkettige Oligomere spalten, enthält Cts1 innerhalb der Aminosäuresequenz von Position 115 bis 457 eine GH18-Domäne (Abb. 2.2 A, Langner *et al.*, 2015; Seidl, 2008). Zudem deutet eine PEST-Motiv-Vorhersage („pepst-find“; <http://emboss.bioinformatics.nl/cgi-bin/emboss/pepstfind>) von Position 34 bis 104 eine potentielle PEST-Sequenz an (Abb. 2.2 A). PEST-Sequenzen entsprechen Prolin (P), Glutaminsäure (E), Serin (S) und Threonin (T) angereicherten Polypeptid-Sequenzen und dienen als proteolytisches Signal für den schnellen Abbau der Proteine mit besagten PEST-Sequenzen (Rechsteiner und Rogers, 1996). Es sind bisher keine weiteren bioinformatischen Daten bekannt, die Rückschlüsse auf die Cts1-Sekretion ermöglichen würden.

Um die Lokalisation von Cts1 in *U. maydis* näher zu charakterisieren, wurde ein AB33-Stamm verwendet, der *cts1G* vom nativen *cts1*-Lokus exprimiert (AB33cts1G; Dissertation J. Koepke, 2010). Dadurch wurde ein Fusionsprotein aus Cts1 und C-terminalen Gfp

generiert. (Cts1G, Abb. 2.2 A). Um einen möglichen negativen Einfluss von Gfp auf die Funktionalität bzw. Sekretion von Cts1 zu analysieren, wurde die extrazelluläre Cts1-Aktivität auf der Zelloberfläche von Sporidien gemessen. Als Negativkontrolle diente der Stamm AB33cts1 Δ . Die enzymatische Aktivität des Stamms AB33cts1G in Relation zum Vorgängerstamm AB33 (wt) zeigte keinen signifikanten Unterschied (Abb. 2.2 B). Ein möglicher Einfluss von C-terminalem Gfp auf die Enzymaktivität bzw. Sekretion von Cts1 konnte damit in nachfolgenden Experimenten vernachlässigt werden.

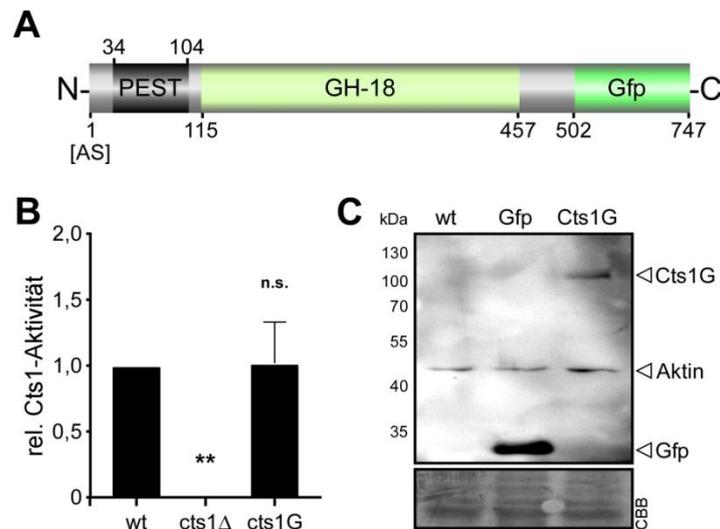


Abb. 2.2: Cts1G zeigt keine beeinträchtigte extrazelluläre Enzymaktivität und wird stabil synthetisiert. (A) Modell des Fusionsproteins aus Cts1 und C-terminalen Gfp. Cts1 besitzt kein N-terminales Signalpeptid für die Sekretion, aber eine potentielle PEST-Sequenz und eine GH18-Domäne. AS, Aminosäuren. **(B)** Relative extrazelluläre Cts1-Aktivitäten von Sporidien der Stämme AB33 (wt), AB33cts1 Δ (cts1 Δ) und AB33cts1G (cts1G). Die Bestimmung erfolgte anhand der Umwandlung des Substrats MUC. Fehlerbalken: Standardabweichung von 3 biologischen Replikaten. n.s., nicht signifikant, p-Wert > 0,05; **, p-Wert 0,001 bis 0,01 (1-way ANOVA, Kontrolle: wt) **(C)** Western Blot der Gesamtzellextrakte von AB33 (wt)-Derivaten mit cytoplasmatischen Gfp (Gfp) und Cts1G. Pro Ansatz wurden 10 μ g Gesamtzellextrakt aufgetragen. Detektion erfolgte mittels der Antikörper α Gfp und α Aktin. Pfeilspitzen markieren Signalbanden der detektierten Proteine. CBB, Coomassie Brilliant Blue gefärbte Membran (Ladekontrolle).

Des Weiteren wurde mittels Western Blot-Analyse die Proteinsynthese von Cts1G im Gesamtzellextrakt überprüft. Die Laufspur mit Cts1G zeigt für das Fusionsprotein ein Signal bei einem Molekulargewicht von ca. 110 kDa. (Abb. 2.2 C, Cts1G). Anhand der Aminosäuresequenz des Fusionsproteins würde ein Molekulargewicht von 82 kDa erwartet werden, allerdings konnte die Diskrepanz bereits in vorangegangenen Arbeiten festgestellt werden und könnte auf mutmaßliche posttranslationale Modifikationen zurückzuführen sein (Koepke *et al.*, 2011; Stock *et al.*, 2012, Dissertation T. Langner, 2015). Bei der mitgeführten Kontrolle für die Detektion von freiem Gfp wurde der Gesamtzellextrakt eines Stammes (AB33P_{otef}-gfp) verwendet, bei dem das Gen für Gfp unter Kontrolle des konstitutiven Promotors *P_{otef}* (Spellig *et al.*, 1996) exprimiert wird. Das starke Signal der Gfp-Kontrolle ist demnach sehr wahrscheinlich auf eine erhöhte Menge an cytoplasmatischem Gfp auf Grund der starken Expression des Gens zurückzuführen (Abb. 2.2 C, Gfp). Als Negativkontrolle

wurde der Vorgängerstamm AB33 (wt) verwendet (Abb. 2.2 C, wt). Zusätzlich diente die Detektion von Aktin (42 kDa) als Ladekontrolle bzw. Nachweis für die Verwendung von identischen Mengen Gesamtzellextrakt. Die Überprüfung der Proteinsynthese von Cts1G zeigte folglich die Bildung eines intrazellulär stabilen Fusionsproteins, welches keine Signale für Abbauprodukte aufweist. Dies ermöglicht bei nachfolgenden Lokalisationsstudien die Detektion des Vollängenproteins. Der Nachweis eines stabilen Fusionsproteins Cts1G wird durch die Ergebnisse vorangegangener Arbeiten zusätzlich bestätigt (Koepke *et al.*, 2011, Langner *et al.*, 2015).

Mittels des Fusionsproteins Cts1G wurde im Laborstamm AB33 die Lokalisation in Sporidien während unterschiedlicher Phasen des Zellzyklus untersucht. Die im Zellzyklus von *U. maydis* initiierte Trennung von Mutter- und Tochterzelle setzt zunächst die primäre und anschließend die sekundäre Septenbildung voraus. Mit dem Aufbau der primären und sekundären Septen zwischen Mutter- und der wachsenden Tochterzelle entsteht mit der Fragmentierungszone ein interzellulärer Raum, der bei der physischen Trennung von Mutter- und Tochterzelle aufgelöst wird (Altamirano *et al.*, 2017; Böhmer *et al.*, 2008; Weinzierl *et al.*, 2002). Die in vorangegangenen Arbeiten (Langner *et al.*, 2015, Dissertation T. Langner, 2015) durchgeführten Untersuchungen zur Lokalisation von Cts1G wurden hier fortgeführt. Die Verwendung der Farbstoffe (i) Calcofluor-White (CW) und (ii) FM4-64 ermöglichten dabei die Visualisierung von (i) Zellwänden und Septen sowie die Darstellung von (ii) Plasmamembranen bzw. bei fortschreitender Endozytose des Farbstoffs von intrazellulären Lipidstrukturen (Fischer-Parton *et al.*, 2000; Gull und Trinci, 1974). Bestätigt werden konnte die cytoplasmatische Verteilung von Cts1G in Einzelzellen (Daten nicht gezeigt) und in teilenden Zellen mit wachsender Tochterzelle, die noch nicht durch ein Septum getrennt sind (Abb. 2.3 A, links). Mit Bildung des primären Septums akkumuliert Cts1G in Richtung der späteren Fragmentierungszone und weist eine kortikale Lokalisation auf der Seite der Tochterzellen auf (Abb. 2.3 A, Mitte).

Mit Einzug des sekundären Septums und Bildung der Fragmentierungszone akkumuliert Cts1G deutlich innerhalb der Fragmentierungszone (Abb. 2.3 A, rechts). Mit Ausbildung der beiden Septen bzw. durch die vorherige Wirkungsweise des jeweiligen kontraktiven Aktomyosinrings wird die Plasmamembran zweifach invaginiert und die zuvor Mutter- und Tochterzelle umspannende Plasmamembran eingeschnürt (Böhmer *et al.*, 2009). Sichtbar wird dies durch die Anfärbung einer die Fragmentierungszone begrenzenden membranösen Struktur.

Detailaufnahmen der Fragmentierungszone mittels konfokaler Mikroskopie, die in dieser Arbeit im 'Center for Advanced Imaging' (CAi, HHU Düsseldorf) ergänzend durchgeführt wurde, verdeutlichen eine gleichmäßige, kortikale Lokalisation von Cts1G in der Fragmentierungszone (Abb. 2.3 B). Die CW-Färbung des primären und sekundären Septums

visualisiert in den Detailaufnahmen die Grenzen der Fragmentierungszone. Mittels konfokaler Mikroskopie und anhand der Färbung mit FM4-64 wurden zudem neben der membranösen Struktur im Randbereich der Fragmentierungszone zentral gelegene Lipidstrukturen sichtbar. Vermutlich sind diese auf endosomale Vesikel zurückzuführen, die während der Entstehung der Fragmentierungszone angereichert werden und u.a. essentielle Proteine für die Ausbildung des sekundären Septums transportieren (Schink und Böcker, 2009).

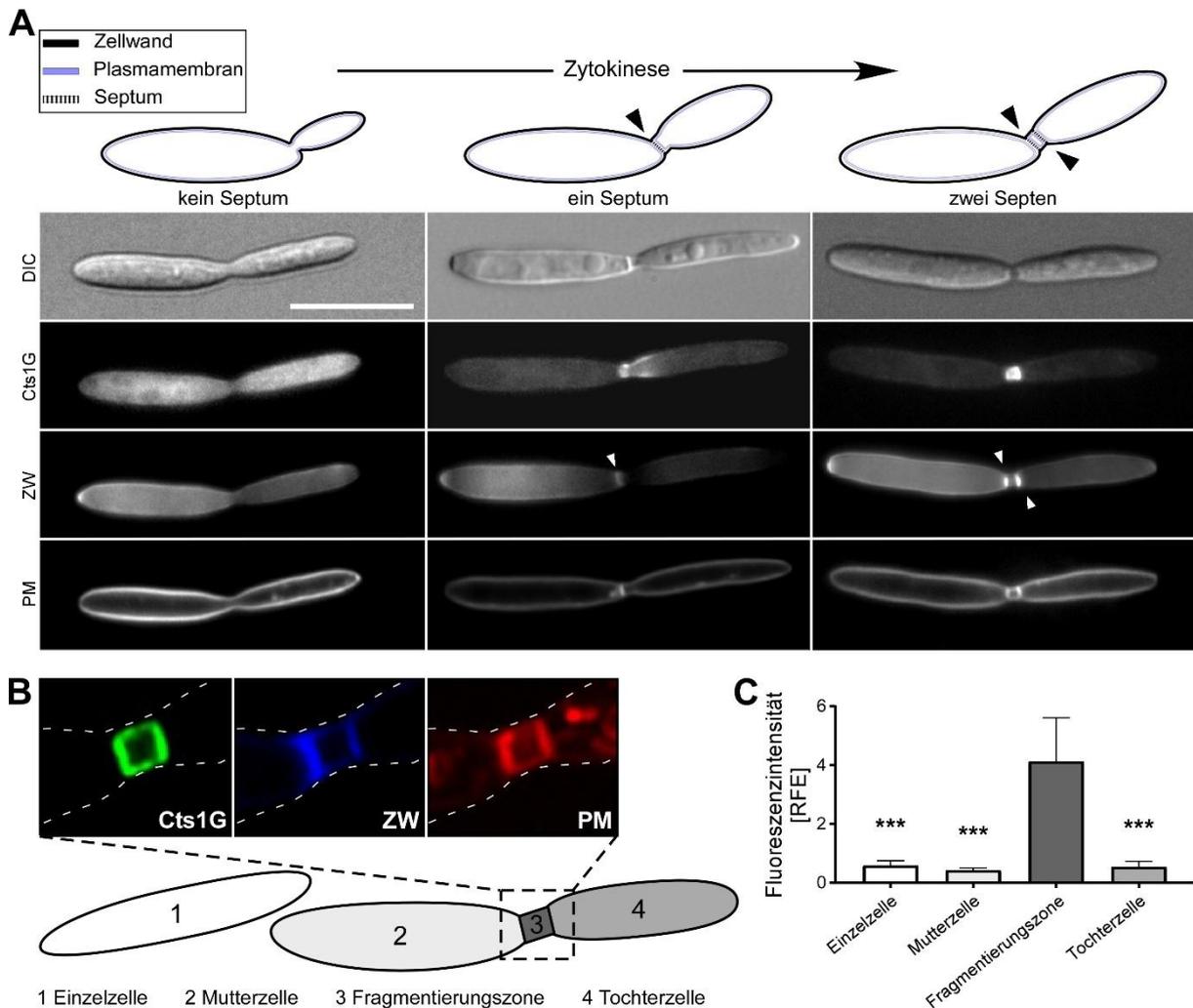


Abb. 2.3: Cts1 akkumuliert während des Zellzyklus in der Fragmentierungszone. (A) Unterschiedliche Abschnitte des Zellzyklus des Cts1G synthetisierenden AB33-Stamms. Während des Verlaufs des Zellzyklus kommt es zur Bildung des primären und sekundären Septums mit vorangehender Invagination der Plasmamembran und somit zur Entstehung der Fragmentierungszone (Schema oben). Für die Mikroskopie wurden repräsentative Zellen für die entsprechenden Abschnitte des Zellzyklus abgebildet. DIC, differential interference contrast. Zellwände (ZW) und Plasmamembranen (PM) wurden mittels der Farbstoffe Calcofluor-White und FM4-64 visualisiert. Pfeilspitzen markieren Septen. Größenmaßstab: 10 μ m. **(B)** Konfokale Mikroskopie für die detaillierte Aufnahme von Cts1G in der Fragmentierungszone. Zellwände (ZW) und Plasmamembranen (PM) wurden mittels der Farbstoffe Calcofluor-White und FM4-64 visualisiert. Experimentelle Durchführung der Konfokalmikroskopie in Zusammenarbeit mit Dr. S. Hänsch im 'Center for Advanced Imaging' (CAi, HHU Düsseldorf) **(C)** Messung der durchschnittlichen Fluoreszenzintensitäten [relative Fluoreszenzeinheiten; RFE] in nicht teilenden Einzelzellen (1), Mutterzellen (2), Fragmentierungszonen (3) und Tochterzellen (4). Fehlerbalken: Standardabweichung aus einem Experiment mit einer Kultur und jeweils mind. 31 Zellen. ***, p-Wert < 0,001 (1-way ANOVA, Kontrolle: Fragmentierungszone).

Die Lokalisationsstudie von Cts1G führte in Langner und Göhre (2016) zur Modellvorstellung, dass in Mutter- und wachsender Tochterzelle cytoplasmatisch gleichmäßig verteiltes Cts1 mit Einzug des primären Septums zur späteren Fragmentierungszone rekrutiert werde. Nach Bildung des sekundären Septums lokalisiere Cts1 vollständig in der Fragmentierungszone. Um die These nachträglich zu überprüfen, wurde in dieser Arbeit von Einzelzellen und Mutter- und Tochterzellen nach sekundärer Septenbildung sowie von der jeweils zugehörigen Fragmentierungszone die durchschnittliche Fluoreszenzintensität gemessen. Mittels Cts1G wurde die emittierte Fluoreszenz in Relation zur Fläche gesetzt. Interessanterweise zeigen die Messdaten, dass in Einzelzellen (0,5 RFE), Mutter- (0,4 RFE) und Tochterzellen (0,5 RFE) eine etwa gleichbleibende durchschnittliche Fluoreszenzintensität vorliegt (Abb. 2.3 C). Hingegen ist die durchschnittliche Fluoreszenzintensität in der jeweiligen Fragmentierungszone (4,1 RFE) ca. um den Faktor 8 signifikant erhöht. Dies bestätigt die Annahme und die Beobachtungen in den Lokalisationsstudien, dass Cts1 in der Fragmentierungszone stark akkumuliert. Dass die Fluoreszenz in Einzelzellen, Mutter- und Tochterzellen eventuell nicht auf Cts1G, sondern auf Hintergrundfluoreszenz zurückzuführen ist, wurde in vorangegangenen Arbeiten durch den Vergleich mit dem Laborstamm AB33 bereits widerlegt (Dissertation T. Langner, 2015). Das Resultat der Messung der durchschnittlichen Fluoreszenzintensitäten lässt auf ein gleichbleibendes Level an cytoplasmatischem Cts1 während des Verlaufs der Zytokinese schließen.

2.2.2 Der Promotor von Cts1 deutet keine tochterzellspezifische Genexpression an

Durch die in den Lokalisationsstudien detektierte kortikale Lokalisation von Cts1G seitens der Tochterzelle nach Bildung des primären Septums (Abb. 2.3 A, Mitte) wurde eine zumindest temporäre, tochterzellspezifische Expression des Gens für Cts1 vermutet. Konsistent dazu wäre die oben beschriebene Modellvorstellung in Langner und Göhre (2016), die eine ausschließliche Relokalisation von Cts1 nach Bildung des primären Septums in die Fragmentierungszone durch die Tochterzelle einschließt. Zur Verifizierung einer potentiellen tochterzellspezifischen Genexpression von Cts1 in *U. maydis* wurden Experimente in Analogie zur Untersuchungen in *S. cerevisiae* durchgeführt. In Colman-Lerner *et al.*, (2001) wurde durch Fusion eines Reportergens (*YFP*) an den nativen Promotor der Gensequenz für das Protein CTS1 die spezifische Aktivität des Promotors in Tochterzellen nachgewiesen. Ähnlich wie Cts1 in *U. maydis* ist CTS1 in *S. cerevisiae* an der Trennung von Mutter- und Tochterzelle beteiligt (Kurandas und Robbins, 1991).

Zur Untersuchung der tochterzellspezifischen Expression von *cts1* wurde im Stamm AB33 am *cts1*-Lokus die Gensequenz von Gfp am 3'-Ende des Promoters als Reporter eingefügt

(AB33P_{cts1}gfp, Abb. 2.4 A). Vergleichbar mit der Deletion *cts1*Δ wurde für den Stamm AB33P_{cts1}gfp trotz ausbleibender Proteinsynthese des endogenen Cts1 auf Grund der Klonierung am *cts1*-Promotor kein morphologischer Phänotyp erwartet. Dies wurde durch die mikroskopischen Aufnahmen bestätigt (Abb. 2.4 B und D). Zur Unterscheidung des Zytokinesestadiums wurden die Zellen mit CW gefärbt, um die Bildung des primären Septums zu dokumentieren. Einzelzellen wurden als Referenz für die entstehende Fluoreszenz durch Promotoraktivität von *P_{cts1}* verwendet. Die Analyse des Vorgängerstammes AB33 (*wt*) diente als Negativkontrolle, um darzustellen, dass die emittierte Fluoreszenz nicht auf möglicher Hintergrundfluoreszenz basierte.

Die Visualisierung der Promotoraktivität von *P_{cts1}* mittels Fluoreszenzmikroskopie zeigte sowohl für Einzelzellen (Abb. 2.4 B, blaue Pfeilspitze) sowie für die jeweiligen Mutter- und Tochterzellen mit primärem Septum (Abb. 2.4 B, rote Pfeilspitze) und ohne primäres Septum (Abb. 2.4 B, gelbe Pfeilspitze) eine vergleichbare Fluoreszenzintensität. Bei einer angenommenen tochterzellspezifischen Genexpression von Cts1 würde ein deutlicheres Fluoreszenzsignal in den Tochterzellen teilender Zellen mit primäres Septum erwartet, als in der zugehörigen Mutterzellen. Tochterzellen teilender Zellen ohne primäres Septum würden ggf. einen Gradienten aufweisen, dessen Fluoreszenzsignal sich von der Tochterzellen bis zur Mutterzelle erstreckt, in Abhängigkeit vom Zeitpunkt der einsetzenden, tochterzell-spezifische Genexpression von Cts1.

Neben der Schlussfolgerung, dass keine tochterzellspezifische Genexpression vorliegt, könnte die gleichsam identische Fluoreszenzstärke jedoch auch auf die Stabilität von Gfp zurückgeführt werden. Auf Grund einer hohen Halbwertszeit des Fluoreszenzsignals der bereits bestehenden Gfp-Moleküle würde die Fluoreszenz von neusynthetisiertem Gfp seitens der Tochterzelle eventuell überlagert und nicht wahrgenommen werden. In Colman-Lerner *et al.*, (2001) wurden die Zellen von *S. cerevisiae* in Raffinose statt Glukose angezogen, um die Wachstumsrate zu reduzieren. Dadurch wurde das in der späten M-/frühen G1-Phase des Zellzyklus synthetisierte Reporterprotein YFP degradiert, bevor die nächste Zellteilung einsetzte. Um dies auf die Untersuchung in *U. maydis* zu übertragen, wurden die zuvor in Vollmedium (CM-Flüssigmedium) kultivierten Zellen des entsprechenden Stamms zur erneuten Analyse der tochterzellspezifische Genexpression von Cts1 in Minimalmedium (AM-Flüssigmedium) angezogen. Zuvor wurde mittels einer Wachstumsanalyse die Wachstumsrate des Stamms AB33P_{cts1}gfp in CM- und AM-Flüssigmedium verglichen (Abb. 2.4 C). Das Mitführen des Vorgängerstammes AB33 (*wt*) lieferte Vergleichswerte. Am Kurvenverlauf im Graphen sichtbar wurde die verringerte Wachstumsrate der beiden Stämme in AM-Flüssigmedium. Zudem weist der Stamm AB33P_{cts1}gfp sowohl in CM-Flüssigmedium als auch in AM-Flüssigmedium eine vergleichbare Wachstumsrate zu *wt* auf, was darauf schließen lässt, dass es keine

Beeinträchtigung in der Teilungsrate durch die genetische Manipulation am *cts1*-Promotor gibt.

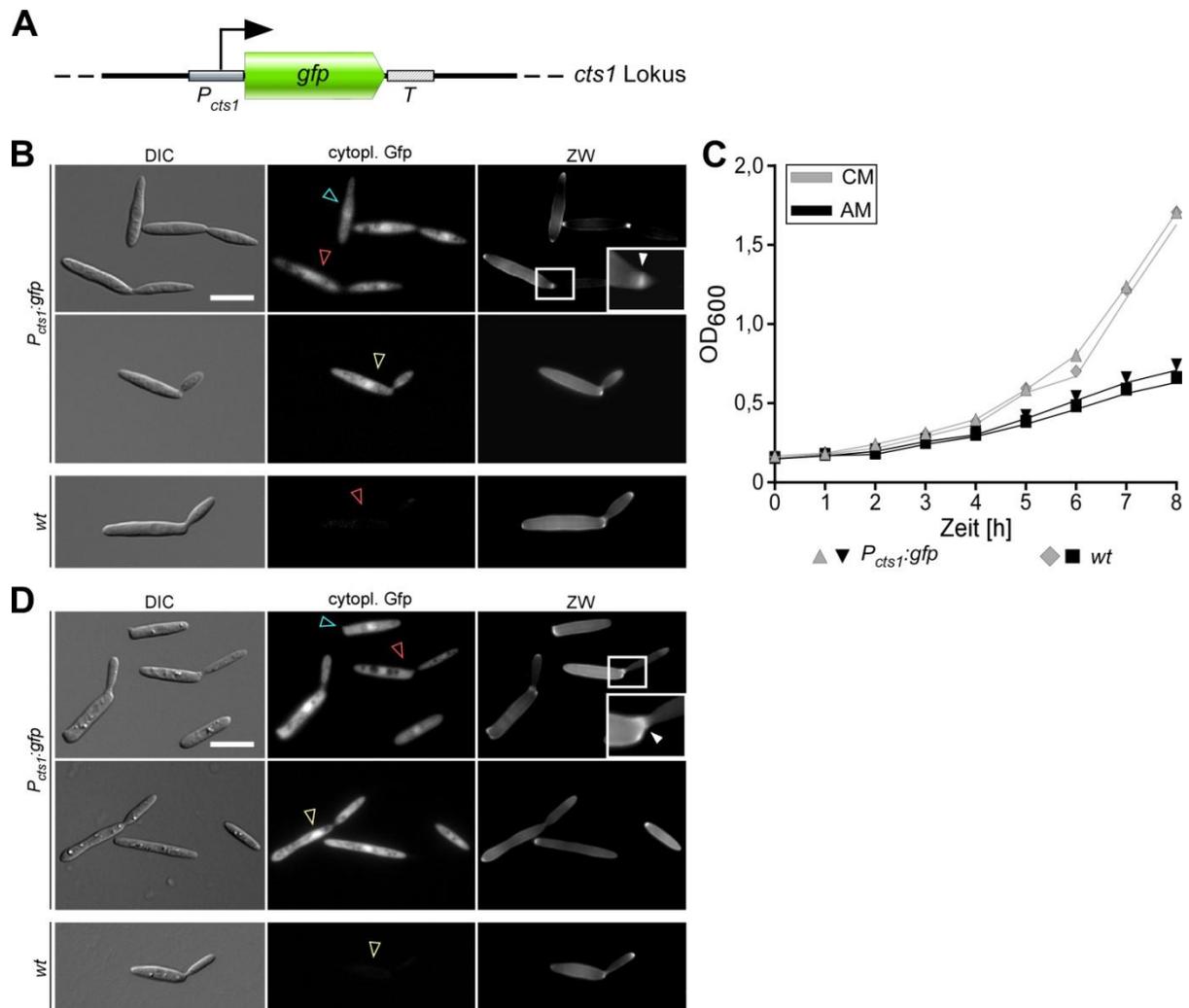


Abb. 2.4: Der Promotor von Cts1 zeigt unter den getesteten Bedingungen keine tochterzellspezifische Genexpression. Analyse der Aktivität des *cts1*-Promotors (P_{cts1}) in Sporidien. **(A)** Schematische Darstellung des *cts1*-Lokus im AB33 $P_{cts1:gfp}$ nach Einfügen der Gensequenz von Gfp am 3'-Ende des *cts1*-Promotors (P_{cts1}). Die Transkription wird durch eine Terminationssequenz (T) beendet. **(B)** Fluoreszenzmikroskopische Analyse repräsentativer Zellen von AB33 $P_{cts1:gfp}$ in CM-Flüssigmedium. DIC, differential interference contrast. Zellwände (ZW) wurden mittels des Farbstoffs Calcofluor-White visualisiert. Pfeilspitzen markieren Einzelzellen (blau), Mutter- und Tochterzellen mit primärem Septum (rot), Mutter- und Tochterzellen ohne primäres Septum (gelb) und Septen (weiß). Ausschnitte vergrößern die Knospungszone zwischen Mutter- und Tochterzelle. Der Vorgängerstamm AB33 (*wt*) wurde als Negativkontrolle verwendet. Größenmaßstab: 10 μm . **(C)** Wachstumsanalyse in CM- und AM-Flüssigmedium anhand der OD_{600} über eine Inkubationszeit von 8 h. Inokuliert wurde mit einer OD_{600} von 0,125. Der Vorgängerstamm AB33 (*wt*) wurde zum Abgleich verwendet. Ergebnisse nach einmaliger Durchführung. **(D)** Fluoreszenzmikroskopische Analyse repräsentativer Zellen von AB33 $P_{cts1:gfp}$ in AM-Flüssigmedium. DIC, differential interference contrast. Zellwände (ZW) wurden mittels des Farbstoffs Calcofluor-White visualisiert. Pfeilspitzen markieren Einzelzellen (blau), Mutter- und Tochterzellen mit primärem Septum (rot), Mutter- und Tochterzellen ohne primäres Septum (gelb) und Septen (weiß). Ausschnitte vergrößern die Knospungszone zwischen Mutter- und Tochterzelle. Der Vorgängerstamm AB33 (*wt*) wurde als Negativkontrolle verwendet. Größenmaßstab: 10 μm .

Ob durch die reduzierte Wachstumsrate eine mögliche Genexpression in der Tochterzellen visualisiert werden konnte, wurde in der anschließenden fluoreszenzmikroskopischen

Analyse in AM-Flüssigmedium überprüft: Diese bestätigte die zuvor erhaltenen Resultate in CM-Flüssigmedium mit gleichbleibender Fluoreszenzintensitäten in Einzelzellen (Abb. 2.4 D, blaue Pfeilspitze) und in den jeweiligen Mutter- und Tochterzellen mit primärem Septum (Abb. 2.4 D, rote Pfeilspitze) und ohne primärem Septum (Abb. 2.4 D, gelbe Pfeilspitze).

Anhand dieser Ergebnisse ist sowohl in CM- als auch in AM-Flüssigmedium keine spezifische Genexpression von Cts1 in der Tochterzelle zu detektieren und es ist vorerst von einer kontinuierlichen Expression in Mutter- und Tochterzelle im Verlauf des Zellzyklus auszugehen. Allerdings kann eine tochterzellspezifische Genexpression von Cts1 nicht ausgeschlossen werden. Weiterhin kann die Ursache für die gegenwärtige Fluoreszenz in den Zellen zu unterschiedlichen Zytokinesphasen durch ein zu stabiles Fluoreszenzprotein Gfp begründet sein. Ein möglicher Ansatz, um die Stabilität des Fluoreszenzproteins zu reduzieren, wäre das Anhängen von terminalen PEST-Sequenzen, um einerseits durch die terminale Positionierung die Fluoreszenz des Proteins weiterhin zu gewähren, und andererseits einen durch die PEST-Sequenzen vermittelten schnelleren Umsatz von Gfp zu erreichen (Rechsteiner und Rogers, 1996). Für die Untersuchung dynamischer zellulärer Prozesse konnte in Säugerzellen durch die C-terminale bzw. N-terminale Fusion einer PEST-Sequenz an Gfp die Halbwertszeit des Fusionsproteins zum Beispiel um mehr als 50 % bzw. 75 % reduziert werden (Corish und Tyler-Smith, 1999).

2.2.3 Cts1 wird in Filamenten über frühe Endosomen transportiert

Durch die Lokalisationsstudien konnte gezeigt werden, dass Cts1 in der Fragmentierungszone zwischen Mutter- und Tochterzelle akkumuliert, nachdem das sekundäre Septum gebildet worden ist. Die Lokalisation von Cts1G zeigt eine kortikale Akkumulation von Cts1 seitens der Tochterzelle in Richtung des primären Septums. Nach Bildung des sekundären Septums ist dieses Verteilungsmuster nicht mehr sichtbar (Abb. 2.3 A). Dies könnte als ein Hinweis für den gerichteten Transport zur Fragmentierungszone gewertet werden. Um den Mechanismus der unkonventionellen Sekretion von Cts1 weiter aufzuklären, wurde nachfolgend untersucht, wie Cts1 zur Fragmentierungszone gelangt.

In Filamenten von *U. maydis* konnte gezeigt werden, dass die Cts1-Sekretion vom mRNS-bindenden Protein Rrm4 abhängig ist, welches entlang von Mikrotubuli, gebunden an Endosomen, zur Hyphenspitze transportiert wird. Ein Interaktionspartner von Rrm4 ist die mRNS von Cts1 und es wird vermutet, dass das Protein während des Transports translatiert wird (Göhre *et al.*, 2012; Koepke *et al.*, 2011). Somit erscheint ein Mikrotubuli-abhängiger, endosomaler Transport von Cts1 nicht unwahrscheinlich. Um diese Hypothese explizit zu untersuchen, wurde zunächst in Sporidien anhand von Kymogrammen die potentielle Bewegung von fluoreszierender Partikel über die Zeit ermittelt.

Zunächst wurde dazu in einem AB33-Stamm die Gensequenz für ein Fusionsprotein aus Cts1 und C-terminalem, dreifachem Gfp (Cts1G³) am *cts1*-Lokus exprimiert, sowie die Gensequenz für ein Fusionsprotein aus N-terminalen mCherry und Rab5a (C-Rab5a) unter Kontrolle des konstitutiven Promotors *P_{tef}* exprimiert (AB33P_{tef}C-rab5a/cts1G³). Das Protein Rab5a repräsentiert einen Schlüsselfaktor für frühe Endosomen, der als GTPase sowohl Membranbindung vermittelt und dadurch verschiedene Effektorproteine an Endosomen rekrutiert, als auch in Koordination mit SNARE-Proteinen für Endosomen-Fusionen benötigt wird (Christoforidis *et al.*, 1999; McBride *et al.*, 1999; Rink, *et al.*, 2005; Zerial und McBride, 2001). Entlang von Mikrotubuli ist die Wanderung der Rab5a-haltigen Endosomen in anterograder und retrograder Richtung zu beobachten (Steinberg, 2007b). Durch die verwendeten Fluoreszenzproteine war es möglich, eventuelle parallele Bewegungen von Cts1 und durch Rab5a markierte frühe Endosomen zeitgleich nachzuvollziehen. Eine Co-Lokalisation der beweglichen Partikel von Cts1G³ und C-Rab5a würden auf einen endosomalen Transport von Cts1 verweisen.

Um möglichst den gesamten Verlauf von der anfänglichen, cytoplasmatischen Lokalisation über die kortikalen Akkumulation seitens der Tochterzelle und der finalen Akkumulation in der Fragmentierungszone von Cts1 abzudecken, wurden Mutter- und Tochterzelle ohne Septum (Abb. 2.5 A), mit einem Septum (Abb. 2.5 B) und zwei Septen (Abb. 2.5 C) untersucht. Die Kymographen belegen für die Distanz zwischen den distalen Zellpolen von Mutter- und Tochterzelle anhand der detektierten Fluoreszenzsignale die erwartete anterograde und retrograde Bewegung von Endosomen bzw. C-Rab5a zu den unterschiedlichen Zeitpunkten der Zytokinese (Abb. 2.5 A-C). Ab der Bildung des primären Septums scheint der Transfer von Mutter- zu Tochterzelle bzw. Tochter- zu Mutterzelle, vermutlich durch die septale Barriere, unterbrochen. Für Cts1G³ kann im Gegensatz zu C-Rab5a zu den unterschiedlichen Zeitpunkten der Zytokinese keine Bewegung in den jeweiligen Kymographen ermittelt werden (Abb. 2.5 A-C). Mit Bildung des primären Septums ist in den Kymographen ein zunehmendes, statisches Fluoreszenzsignal sichtbar, welches auf die sukzessive Akkumulation von Cts1G³ in dem interzellulären Bereich zwischen Mutter- und Tochterzelle hindeutet, jedoch konnte diesbezüglich kein Fluoreszenzsignal wahrgenommen werden, das auf den gerichteten Transport in die Zone verweist (Abb. 2.5 B-C). Die etwas verstärkt „rauschenden“ Signale seitens der Tochterzelle im Kymographen deuten die spezifische Relokalisation von Cts1G³ in der Tochterzelle an und könnten als Indiz für eine potentielle tochterzellspezifische Genexpression der Chitinase interpretiert werden (Abb. 2.5 A-B). Mit Bildung des sekundären Septums waren abseits der Fragmentierungszone in Relation kaum Fluoreszenzsignale wahrzunehmen, was die vorherige Auswertung der Fluoreszenzintensitäten nach sekundärer Septenbildung (Abb. 2.3 C) widerspiegelte.

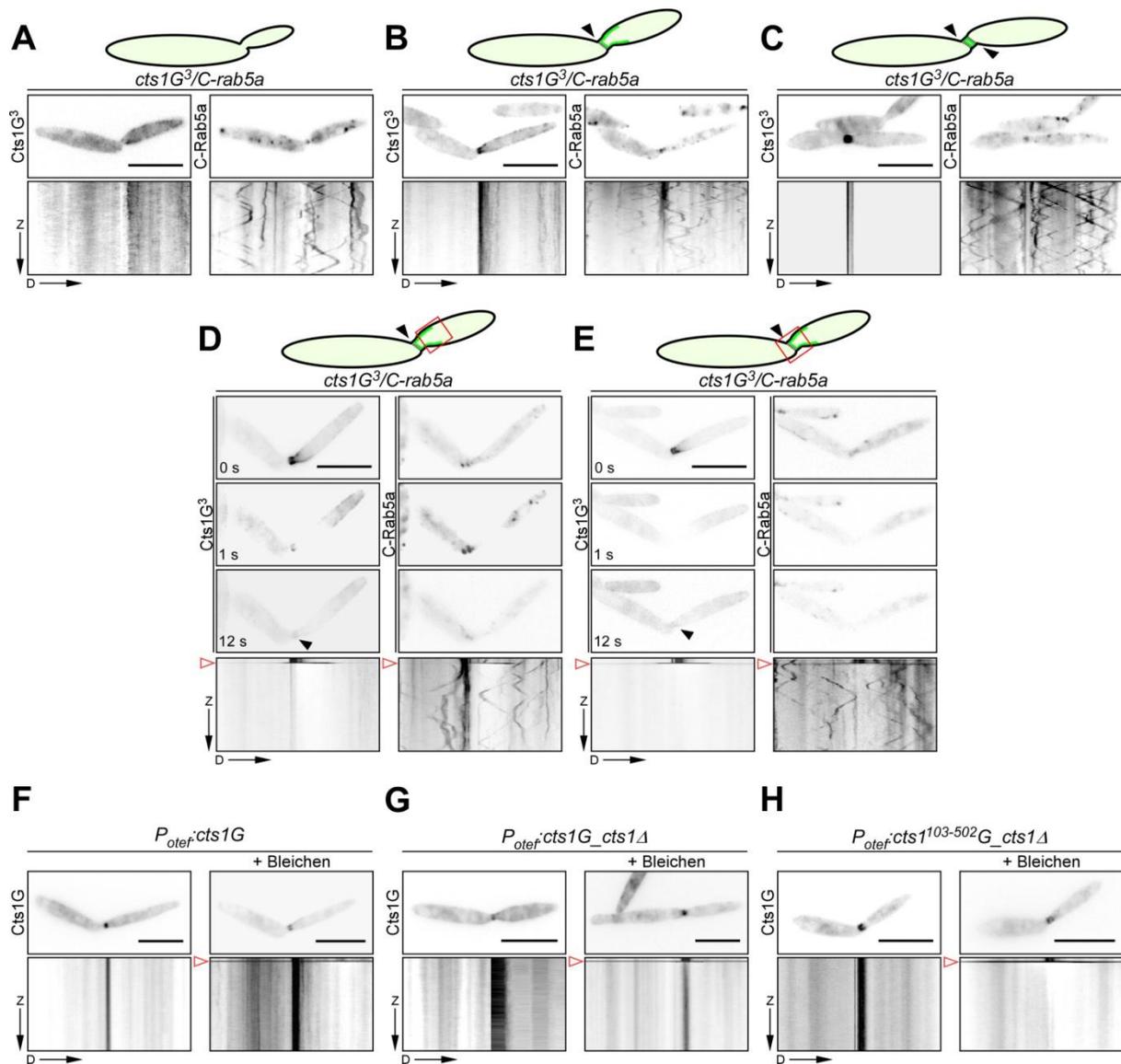


Abb. 2.5: Ein endosomaler Transport von Cts1 kann in Sporidien nicht nachgewiesen werden. Analyse der Bewegung fluoreszierender Partikel von Cts1G und C-Rab5a in Sporidien. Kymographen veranschaulichen die Bewegung über die Parameter Zeit (Z) und Distanz (D). Für einen verbesserten Kontrast wurden die Fluoreszenzsignale invertiert. **(A-C)** Fluoreszenzmikroskopie und Kymographen repräsentativer Zellen von $AB33P_{\text{tef}}C\text{-rab5a}/\text{cts1G}^3$ während der cytoplasmatischen Lokalisation (A), der kortikalen Akkumulation seitens der Tochterzelle (B) und der Akkumulation in der Fragmentierungszone zwischen Mutter- und Tochterzelle (C) von Cts1G. Schemata veranschaulichen die entsprechenden Stadien von Mutter- und Tochterzelle. Größenmaßstab: 10 μm . **(D-E)** Fluoreszenzmikroskopie und Kymographen repräsentativer Zellen von $AB33P_{\text{tef}}C\text{-rab5a}/\text{cts1G}^3$ mit Photobleichen der Abschnitte vor (D) und um die Knospungszone (E) während der kortikalen Akkumulation seitens der Tochterzelle. Schemata veranschaulichen die entsprechenden Stadien von Mutter- und Tochterzelle. Rote Kästen grenzen photogebliche Abschnitte ein. Rote Pfeilspitzen markieren Zeitpunkt des Photobleichens im Kymographen. Schwarze Pfeilspitzen markieren Relokalisation von Cts1G nach Photobleichen. Größenmaßstab: 10 μm . **(F-H)** Fluoreszenzmikroskopie und Kymographen repräsentativer Zellen von $AB33P_{\text{otef}}C\text{ts1G}$ (F), $AB33P_{\text{otef}}C\text{ts1G}/\text{cts1}\Delta$ (G) und $AB33P_{\text{otef}}C\text{ts1}^{103-502}\text{G}/\text{cts1}\Delta$ (H) mit und ohne Photobleichen der Abschnitte um die Knospungszone. Rote Pfeilspitzen markieren Zeitpunkt des Photobleichens im Kymographen. Größenmaßstab: 10 μm . Experimentelle Durchführung der Fluoreszenzmikroskopie in Zusammenarbeit mit Dr. S. Zander und K. Müntjes.

Im weiteren Verlauf der Untersuchung wurde das Potential auf Rückgewinnung von Fluoreszenzsignalen nach Photobleichen (*engl.*: fluorescence recovery after photobleaching; FRAP) analysiert. Mittels Photobleichen durch einen Laser konnten Fluoreszenzsignale im

ausgewählten Bereich getilgt und mögliche neue, migrierende Partikel deutlicher visualisiert werden. Da die kortikale Akkumulation seitens der Tochterzelle am vielversprechendsten auf einen gerichteten Transport hinweisen könnte, wurden speziell Mutter- und Tochterzelle mit primärem Septum ausgewählt. Als FRAP-Zonen wurden mit Abschnitten vor (Abb. 2.5 D, roter Kasten) und um die Knospungszone (Abb. 2.5 E, roter Kasten) zelluläre Bereiche gewählt, die zu diesem Zellstadium die stärkste Akkumulation von Cts1G³ aufwiesen und in denen eine potentielle Migration erwartet werden konnte. Die eingangs generierten Ergebnisse wurden durch die FRAP-Experimente bestätigt: Für C-Rab5a konnte sowohl in den zellulären Bereichen vor der Knospungszone, als auch um die Knospungszone die Bewegung neu einmigrierender, fluoreszierender Partikel mittels Kymographen detektiert werden (Abb. 2.5 D-E). Hingegen waren in den Kymographen für Cts1G³ keine Bewegungen fluoreszierender Partikel wahrzunehmen (Abb. 2.5 D-E). Interessanterweise wurde anhand der invertierten Mikroskopie-Abbildungen deutlich, dass ca. 12 Sekunden nach dem Photobleichen Fluoreszenzsignale für Cts1G³ in den betreffenden zellulären Bereich relokalisieren (Abb. 2.5 D-E, schwarze Pfeilspitzen). Fluoreszierendes Protein von Cts1G³ migriert demzufolge in voraussagbarem Lokalisationsmuster, ohne dass der Transport mittels Kymographen sichtbar wird.

Um auszuschließen, dass die Genexpression des Fusionsproteins am *cts1*-Lokus zu schwach für die Lokalisation fluoreszierender Partikel ist, wurde in einem weiteren AB33-Stamm die Gensequenz für Cts1G unter Kontrolle des konstitutiven Promotors P_{otef} am *ip*-Lokus überexprimiert (AB33 P_{otef} cts1G). Trotz Überexpression konnte wie zuvor keine Bewegung von Cts1G in Sporidien von *U. maydis* detektiert werden, obwohl die typische Lokalisation in den fluoreszenzmikroskopischen Abbildungen visualisiert wurde. Ebenfalls war mittels FRAP-Experimenten keine Migration in den photogeblichen Abschnitten um die Knospungszone zu beobachten (Abb. 2.5 F). Die theoretische Möglichkeit, dass das überexprimierte, fluoreszierende Genprodukt Cts1G in Konkurrenz zum endogen exprimiertem Genprodukt Cts1 steht und somit die detektierbare Intensität der Fluoreszenz reduziert sein könnte, konnte mit einem weiteren analysierten Stamm widerlegt werden: Im Stamm AB33 P_{otef} cts1G/*cts1*Δ mit überexprimierter Gensequenz von Cts1G und zusätzlicher Deletion von *cts1* wurde ebenfalls keine Bewegung von Cts1G festgestellt bzw. war in FRAP-Experimenten die Migration fluoreszierender Partikel nicht sichtbar (Abb. 2.5 G).

In Schink und Bölker (2009) wurde gezeigt, dass durch Entfernung von PEST-Sequenzen in Fluoreszenz-markierten Proteinen die Proteinstabilität und Fluoreszenzintensität gesteigert werden konnte, so dass der Nachweis von endosomalem Transport ermöglicht wurde. Da die Cts1 Aminosäuresequenz am N-Terminus zumindest eine putative PEST-Sequenz aufweist (Abb. 2.2 A), wurde eine N-terminal verkürzte Variante von Cts1G verwendet, um potentiell die Stabilität des Fusionsproteins und damit die Fluoreszenzintensität zu erhöhen.

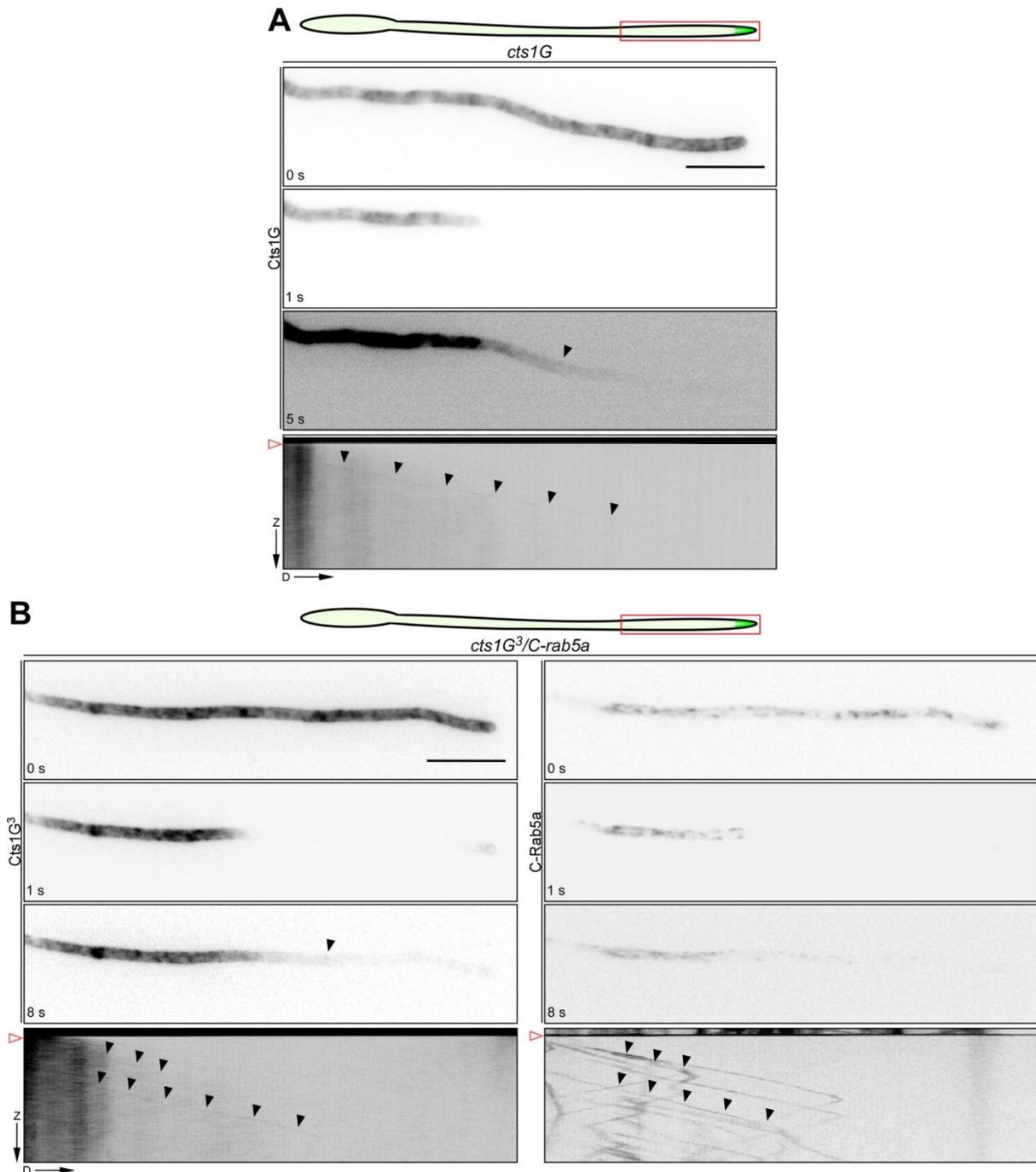


Abb. 2.6: Cts1 wird in Filamenten über frühe Endosomen transportiert. Analyse der Bewegung fluoreszierender Partikel von Cts1G und C-Rab5a in Filamenten. Kymographen veranschaulichen die Bewegung über die Parameter Zeit (Z) und Distanz (D). Für einen verbesserten Kontrast wurden die Fluoreszenzsignale invertiert. **(A)** Fluoreszenzmikroskopie und Kymographen repräsentativer Zellen von AB33*cts1G* mit Photobleichen des Abschnitts der Hyphenspitze (Schema). Roter Kasten grenzt photogeblichen Abschnitt ein. Rote Pfeile markieren Zeitpunkt des Photobleichens im Kymographen. Schwarze Pfeilspitzen markieren Relokalisation von Cts1G nach Photobleichen. Größenmaßstab: 10 μm . **(B)** Fluoreszenzmikroskopie und Kymographen repräsentativer Zellen von AB33*P_{ter}C-rab5a/cts1G³* mit Photobleichen des Abschnitts der Hyphenspitze (Schema). Roter Kasten grenzt photogeblichen Abschnitt ein. Rote Pfeilspitzen markieren Zeitpunkt des Photobleichens im Kymographen. Schwarze Pfeilspitzen markieren Relokalisation von Cts1G und C-Rab5a nach Photobleichen. Größenmaßstab: 10 μm . Experimentelle Durchführung der Fluoreszenzmikroskopie in Zusammenarbeit mit Dr. S. Zander.

Dazu wurde im Stamm AB33cts1 Δ die Gensequenz für ein Fusionsprotein aus verkürztem Cts1 und C-terminalen Gfp (Cts1¹⁰³⁻⁵⁰²G) unter Kontrolle des konstitutiven Promotors P_{otef} am ip -Lokus überexprimiert (AB33P_{otef}Cts1¹⁰³⁻⁵⁰²G/cts1 Δ). Einen nachteiligen Einfluss auf den Transport von Cts1 durch die N-terminale Verkürzung konnte weitestgehend ausgeschlossen werden, da die dem intrazellulären Transport nachfolgende unkonventionelle Sekretion von Cts1 durch diese verkürzte Variante nicht beeinträchtigt wird (Stock *et al.*, 2012). Des Weiteren wurde im Stamm AB33P_{otef}Cts1¹⁰³⁻⁵⁰²G/cts1 Δ mittels Fluoreszenzmikroskopie die zu erwartende Lokalisation dargelegt (Abb. 2.5 H). Durch Kymographen wurden in diesem Stamm jedoch abermals keine Bewegungen von Cts1¹⁰³⁻⁵⁰²G visualisiert oder migrierende, fluoreszierende Partikel in FRAP-Experimente nachgewiesen (Abb. 2.5 H).

Insgesamt konnten in den unterschiedlichen Ansätzen auf Grund der fehlenden Lokalisation beweglicher Partikel von Cts1G³ bzw. Cts1G und Cts1¹⁰³⁻⁵⁰²G keine Rückschlüsse auf den intrazellulären Transport von Cts1 in Sporidien getroffen werden. Eine mögliche Beteiligung von Endosomen am Prozess der Akkumulation von Cts1 in der Fragmentierungszone konnte für das hefeartige Wachstum von *U. maydis* nicht belegt werden und es ist daher anzunehmen, dass der Transport anderweitig erfolgt.

Weiterführend wurde die eingangs erläuterte Hypothese des endosomalen Transports von Cts1 für Filamente von *U. maydis* geprüft: Dabei wurde für die Darstellung der potentiellen Bewegung von Cts1G im Stamm AB33cts1G das filamentöse Wachstum des Pilzes durch Wechsel der Stickstoffquelle im Flüssigmedium induziert. Da Cts1 in Filamenten in der Hyphenspitze akkumuliert (Koepke *et al.*, 2011), wurde dieser zelluläre Bereich primär hinsichtlich des Transports von Cts1G untersucht.

Entgegen der Beobachtung in Sporidien wurden bei FRAP-Experimenten in ca. 20 % der Fälle eine Migration fluoreszierender Partikel in den photogebleichten Abschnitt (Abb. 2.6 A, roter Kasten) beobachtet. Das seltene Ereignis konnte in den fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen und Kymographen lediglich anhand eines sehr schwachen Fluoreszenzsignals detektiert werden (Abb. 2.6 A, schwarze Pfeilspitzen). Um neben dem Transport von Cts1 in Filamenten auch eine mögliche Co-Lokalisation mit dem Endosomen-Marker Rab5a zu ermitteln, wurde auch im Stamm AB33P_{tef}C-rab5a/cts1G³ das filamentöse Wachstum induziert. Erwartungsgemäß konnte in FRAP-Experimenten die Einwanderung fluoreszierender Partikel zur Hyphenspitze, die auf Rab5a-markierte frühe Endosomen hinweisen, visualisiert werden (Abb. 2.6 B). Zudem wurden für Cts1G³ schwache, aber deckungsgleiche Fluoreszenzsignale mit C-Rab5a detektiert, die auf Co-Lokalisation hindeuten (Abb. 2.6 B, schwarze Pfeilspitzen). In Filamenten scheint daher der Transport von Cts1 zur Hyphenspitze gemäß der Hypothese über frühe Endosomen zu erfolgen.

2.2.4 Zellzyklusarrest inhibiert die unkonventionelle Sekretion von Cts1

Das eingangs erwähnte Modell zum Sekretionsmechanismus von Cts1 und die bisherigen Ergebnisse der Lokalisationsstudien weisen auf die Akkumulation der Chitinase in der Fragmentierungszone hin (Langner, *et al.*, 2015; Langner und Göhre 2016). Dies suggeriert die Freisetzung von Cts1 durch Auflösung der Fragmentierungszone während der Trennung von Mutter- und Tochterzelle. Folglich scheint der Mechanismus der unkonventionelle Sekretion von Cts1 mit der Trennung von Mutter- und Tochterzelle am Ende des Zellzyklus abgeschlossen zu werden. Um die Abhängigkeit der Cts1-Sekretion vom Zellzyklus zu belegen, wurden daher nachfolgend Zellzyklus-Inhibitor-Studien durchgeführt. Dabei wurden die extrazellulären Aktivitäten der Chitinase und eines konventionell sekretierten Proteins bei artifizierlicher Arretierung des Zellzyklus durch einen Inhibitor verglichen. Als Indikator für die unkonventionelle Sekretion von Cts1 wurde der eingangs beschriebene Reporterstamm AB33gus-cts1 (Abschnitt 2.1.2) verwendet. Zur Analyse des Inhibitor-Effekts auf konventionelle Sekretionsereignisse diente ein AB33-Stamm, der die konventionell sekretierende Arabinofuranosidase Afu2 synthetisiert. Vergleichbar zu Gus-Cts1 wird in diesem Stamm die Gensequenz für Afu2 unter Kontrolle des synthetischen und konstitutiven Promotors P_{oma} (Flor-Parra *et al.*, 2006; Hartmann *et al.*, 1999) am *ip*-Lokus überexprimiert. Zusätzlich besitzt der Reporterstamm für konventionelle Sekretion Gendeletionen für insgesamt fünf Proteasen ($P5\Delta$; $AB33P5\Delta/afu2$).

Durch die Zugabe von Hydroxyurea (HU) zu *U. maydis*-Zellen wird der Zellzyklus in der S-Phase arretiert (García-Muse *et al.*, 2003). In Sporidien wird während der S-Phase der haploide Chromosomensatz verdoppelt, um die Zelle auf die spätere Knospung vorzubereiten. Die Morphologie entspricht in der S-Phase Einzelzellen ohne Knospe, die sich erst mit Eintritt in die nachfolgende G2-Phase entwickeln (Snetselaar und McCann, 1997; Steinberg *et al.*, 2001).

Die zunächst in dieser Arbeit durchgeführte Mikroskopie von HU-behandelten Zellen konnte den Arrest in der S-Phase nicht eindeutig verifizieren. Für die fluoreszenzmikroskopische Analyse wurde ein AB33-Stamm verwendet, welcher zur Visualisierung des Zellkerns ein Fusionsprotein aus Gfp und einer C-terminalen Kernsignalsequenz (Gfp-NLS) synthetisiert ($AB33P_{oter}gfp-NLS$). Als Negativkontrolle dienten unbehandelte Zellen. Sporidien, denen die adäquate Menge HU [3 mg/ml] hinzugefügt wurde, zeigten nach 8-stündiger Inkubation neben den erwarteten Einzelzellen ebenfalls Zellzyklusstadien mit Mutter- und Tochterzelle (Abb. 2.7 A, links, rote Pfeilspitze). In diesen Fällen deuten die mit Gfp-NLS visualisierten Zellkerne aufgrund ihrer Migration in Mutter- und Tochterzelle auf eine erfolgte Mitose und die späte M-/G1-Phase im Zellzyklus hin, welche sich erst später nach der S- bzw. G2-Phase anschließt (Snetselaar und McCann, 1997; Steinberg *et al.*, 2001).

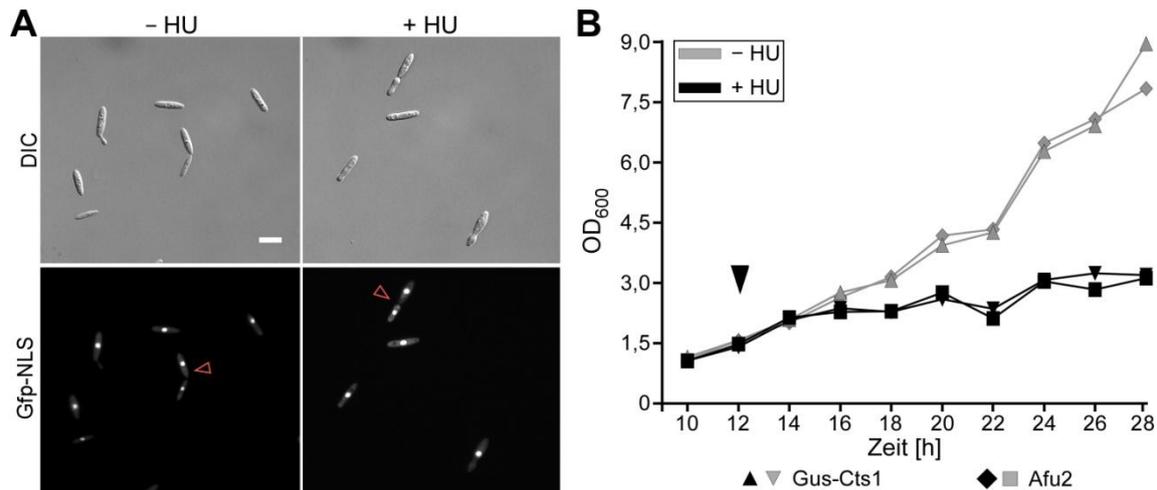


Abb. 2.7: Der Zellzyklus stagniert nach Behandlung mit Hydroxyurea. Untersuchung der Wirksamkeit von Hydroxyurea (HU). **(A)** Fluoreszenzmikroskopische Analyse repräsentativer Zellen von AB33P_{oterGfp-NLS}. Gfp-NLS visualisiert die Zellkerne. DIC, differential interference contrast. Pfeilspitzen (rot) markieren Zellzyklusstadien mit Mutter- und Tochterzelle. Größenmaßstab: 10 μ m. **(B)** Wachstumsanalyse anhand der OD₆₀₀ über eine Inkubationszeit von 10 bis 28 h. Inokuliert wurde mit einer OD₆₀₀ von 0,08. Vergleich von AB33-Stämmen mit (+ HU) und ohne (- HU) Zugabe von HU. Pfeilspitze markiert den Zeitpunkt der HU-Zugabe. Ergebnisse nach einmaliger Durchführung.

Mittels einer Wachstumsanalyse wurde die Funktionalität von HU als Zellzyklus-Inhibitor jedoch eindeutig nachgewiesen. Verglichen wurden die Wachstumsraten der zwei oben beschriebenen AB33-Stämme, die für spätere enzymatische Aktivitätstests (Abb. 2.8) eingesetzt wurden, mit und ohne Zugabe von HU. Nach 12 h Inkubation wurden beide Stämme mit HU behandelt (Abb. 2.7 B, schwarze Pfeilspitze). Unbehandelte Kulturen der beiden Stämme dienten als Kontrollen. Der inhibitorische Effekt wurde ca. 2 bis 4 h nach Behandlung mit HU sichtbar: Während die optischen Dichten in den Ansätzen ohne HU-Zugabe bis 28 h nach Inokulation exponentiell anstiegen, blieben diese Verläufe der Wachstumsrate in den Ansätzen mit HU-Zugabe aus. Die graphische Auftragung der optischen Dichten verdeutlicht, dass unter Einfluss von HU der Zellzyklus ca. 3 h nach Zugabe des Inhibitors stagniert.

Um die Abhängigkeit der unkonventionelle Cts1-Sekretion vom Zellzyklus zu belegen, wurden enzymatische Aktivitätstests nach Inkubation von Sporidien mit HU praktiziert. Analog zur Wachstumsanalyse (Abb. 2.7 B) erfolgte nach 12-stündiger Vorinkubation die Zugabe von HU zu den Kulturen der beiden Stämme (Abb. 2.8 A-B, schwarze Pfeilspitze). Unbehandelte Kulturen der beiden Stämme wurden als Kontrollen für unbeeinträchtigte Sekretion mitgeführt.

Die beiden Kontrollansätze zeigten wie erwartet über den Zeitraum der Probenentnahme einen kontinuierlichen Anstieg der jeweiligen Enzymaktivitäten im zellfreien Kulturüberstand (Abb. 2.8 A-B). Im Kontext mit der Wachstumsanalyse verwiesen die zunehmenden Enzymaktivitäten auf die akkumulierende Sekretion der aktiven Enzyme bei zunehmenden Zellmassen durch exponentielles Wachstum ohne Beeinträchtigung durch HU. Ein weniger

starker, aber ebenfalls kontinuierliche Anstieg der Enzymaktivität konnte im Ansatz mit der konventionell sekretierten Afu2 unter Zugabe von HU beobachtet werden (Abb. 2.8 A). Der geringere Anstieg der Enzymaktivität korrelierte mit der reduzierten Zellmasse auf Grund der wachstumsinhibierenden Wirkung von HU und verdeutlicht die fortgesetzte, konventionelle Sekretion von Afu2 durch bestehende Zellen unabhängig vom Zellzyklus. Hingegen war der Anstieg der Enzymaktivitäten im Ansatz mit Gus-Cts1 ca. 2 bis 4 h nach Zugabe von HU aufgehoben (Abb. 2.8 B). Dies bestätigt die Vermutung, dass die unkonventionelle Sekretion von Gus-Cts1 Zellzyklus-abhängig erfolgt.

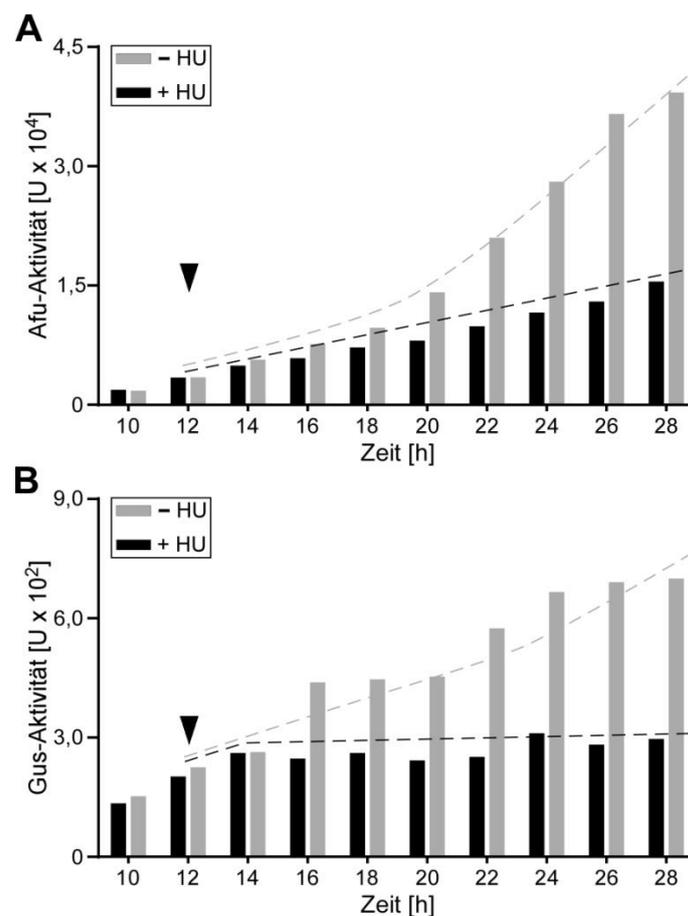


Abb. 2.8: Die unkonventionelle Sekretion von Cts1 ist Zellzyklus-abhängig. Enzymatische Aktivitätstests von konventionell sekretiertem Afu2 und unkonventionell sekretiertem Gus-Cts1 mit (+ HU) und ohne (- HU) Zugabe von Hydroxyurea. Probenentnahme über eine Inkubationszeit von 10 bis 28 h. Inokuliert wurde mit einer OD_{600} von 0,08. Pfeilspitze markiert den Zeitpunkt der Zugabe von 3 mg/ml HU (Endkonzentration). Gestrichelte Linien verdeutlichen Trends. **(A)** Absolute Afu2-Aktivität im zellfreien Kulturüberstand von Sporidien des Stamms AB33P5 Δ afu2. Bestimmung erfolgte anhand der Umwandlung des Substrats pNP-AF. Ergebnisse nach einmaliger Durchführung. **(B)** Absolute Gus-Aktivität im zellfreien Kulturüberstand von Sporidien des Stamms AB33gus-cts1. Bestimmung erfolgte anhand der Umwandlung des Substrats MUG. Ergebnisse nach einmaliger Durchführung.

Ein möglicher Einfluss von HU auf die gemessene Enzymaktivität von Gus kann weitestgehend ausgeschlossen werden. In enzymatischen Aktivitätstests mit zur Verfügung gestelltem, konzentriertem und gereinigtem Gus aus *E. coli* (Sarkari *et al.*, 2014) wurde keine Diskrepanz in den Messwerten zwischen Ansätzen mit und ohne Zugabe von

entsprechenden Konzentrationen HU festgestellt (einmalige Durchführung mit unterschiedlichen Verdünnungen, Daten nicht gezeigt). Im Bezug auf die Aufklärung des unkonventionellen Sekretionsmechanismus von Cts1 konnte mittels der Experimente zum Zellzyklusarrest dargelegt werden, dass die unkonventionelle Sekretion von Cts1 in Sporidien im Gegensatz zur konventionellen Sekretion in Abhängigkeit vom Zellzyklus stattfindet.

2.3 Cts1-Sekretion ist unabhängig von der physischen Zellteilung

Anhand der vorherigen Ergebnisse konnte die Abhängigkeit der unkonventionellen Cts1-Sekretion vom Zellzyklus in Sporidien belegt werden. Dadurch verfestigte sich die Annahme, dass Cts1 über die Fragmentierungszone bei der physischen Trennung von Mutter- und Tochterzelle in den extrazellulären Raum freigesetzt wird. Dies würde bedeuten, dass Zellen mit einem Teilungsdefekt keine Cts1-Sekretion aufweisen dürften. Um diese These zu überprüfen, wurden in nachfolgenden Experimenten verschiedene publizierte *U. maydis*-Mutanten mit einem Zellteilungsdefekt genauer charakterisiert und hinsichtlich der unkonventionellen Sekretion von Cts1 untersucht.

Als Kandidaten mit bekanntem Zellteilungsdefekt wurden Deletionssmutanten für die Gene *kex2*, *kin3*, *don1* und *don3* ausgewählt. Das Gen *kex2* kodiert für ein Protein, das 31 % Aminosäureidentität zu einer Pro-Konvertase aus *S. cerevisiae* aufweist, die im Golgi-Apparat lokalisiert und an der Aktivierung von Proteinen durch Entfernung von N-terminalen Pro-Sequenzen beteiligt ist. Die Deletion von *kex2* führt zu pleiotropen Effekten die u.a. die Ausbildung von Zellaggregaten während des hefeartigen Wachstums nach sich ziehen (Fuller, 1988; Sarkari *et al.*, 2014). Ebenso resultiert die Deletion des Gens für das Motorprotein Kin3 in einem morphologischen Phänotyp. Mutanten mit *kin3Δ* weisen Einschränkungen im endosomalen Transport an Mikrotubuli auf, was wahrscheinlich die Anreicherung von Endosomen in der Fragmentierungszone beeinträchtigt und somit ebenfalls in einem Zellteilungsdefekt resultiert. Ein Protein, welches endosomal zur Fragmentierungszone rekrutiert wird, und dort an der Bildung des sekundären Septums beteiligt ist, stellt Don1 dar (Schink und Bölker, 2009; Wedlich-Söldner *et al.*, 2002). Das Protein Don3 ist unabhängig von Don1 an der sekundären Septembildung beteiligt. Deletionen von *don1* oder *don3* führen ebenfalls zu einem Zellteilungsdefekt und verweisen auf den direkten Zusammenhang zwischen Bildung des sekundären Septums und der Zellteilung in Sporidien (Böhmer *et al.*, 2008; Weinzierl *et al.*, 2002).

2.3.1 Charakterisierung der ausgeprägten Zellteilungsdefekte

Als Vorbereitung für spätere Lokalisationsstudien wurden AB33-Stämme generiert, die am *cts1*-Lokus die Gensequenz für ein Fusionsprotein aus Cts1 und C-terminalen Gfp (Cts1G) unter Kontrolle des nativen Promotors exprimieren und bei denen jeweils die Gene *kex2* (AB33*kex2* Δ /*cts1G*), *kin3* (AB33*kin3* Δ /*cts1G*), *don1* (AB33*don1* Δ /*cts1G*) oder *don3* (AB33*don3* Δ /*cts1G*) deletiert worden waren.

Um die Ausprägung der beschriebenen Zellteilungsdefekte während des hefeartigen Wachstums zu charakterisieren, wurden das Sedimentationsverhalten von Flüssigkulturen und die Koloniemorphologie auf Festmedium untersucht (Abb. 2.9). Als Kontrolle wurde der bereits zuvor beschriebene AB33-Stamm verwendet, der Cts1G synthetisiert aber keine Gendeletionen aufweist (AB33*cts1G*, *wt*). Korrelierend mit der Größe der auf Grund des Zellteilungsdefekts gebildeten Zellaggregate wurde in Flüssigkulturen eine verstärkte Sedimentation der Zellen erwartet.

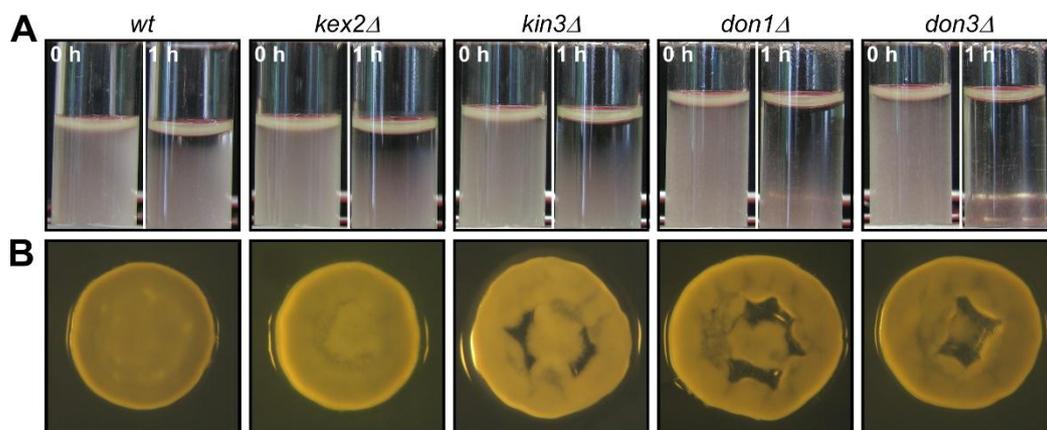


Abb. 2.9: Sedimentationstest und Analyse der Koloniemorphologie bestätigen Zellteilungsdefekte. Analyse der AB33-Stämme mit Cts1G und jeweiligen Deletionen der Gene *kex2*, *kin3*, *don1* bzw. *don3*. Der Stamm AB33*cts1G* wurde als Kontrolle verwendet (*wt*). **(A)** Sedimentationstest der Deletionsstämmen. Kulturen wurden in CM-Flüssigmedium auf eine OD₆₀₀ von 1,0 eingestellt, gut gemischt und dann für 1 h unbewegt stehen gelassen. Repräsentative Darstellung des Experiments von 3 biologischen Replikaten. **(B)** Koloniemorphologie der Deletionsstämmen auf YEPS_{light}-Festmedium. Kolonien wurden vereinzelt und nach Inkubation für 2 bis 3 Tage bei 28 °C abgebildet.

Der Verlust der Trübung nach einstündiger, ruhiger Inkubation in den Stämmen AB33*don1* Δ /*cts1G* und AB33*don3* Δ /*cts1G* deutet auf eine schnellere Sedimentation und somit größere Zellaggregate hin, als in den Stämmen AB33*kex2* Δ /*cts1G* und AB33*kin3* Δ /*cts1G*, in denen die Trübung nur wenig vom Kontrollstamm (*wt*) abweicht (Abb. 2.9 A). Die Ausprägung des Phänotyps spiegelt sich weitestgehend in der Koloniemorphologie auf speziellem YEPS_{light}-Festmedium wider. Auf diesem Festmedium konnte für die Stämme AB33*don1* Δ /*cts1G* und AB33*don3* Δ /*cts1G* der in vorangegangenen Arbeiten publizierte spezifische Donut-Phänotyp bestätigt werden (Abb 2.9 B). Durch das periphere Wachstum der Kolonie werden die zusammenhängenden Zellen aus dem Zentrum

der Kolonie gezogen und prägen damit den Phänotyp eines „Donuts“ (Weinzierl *et al.*, 2002). Abweichend vom Sedimentationstest konnte im Stamm AB33kin3Δ/cts1G der Zellteilungsdefekt anhand des Donut-Phänotyp detektiert werden, was die Beobachtung in vorangegangenen Arbeiten unterstützt (Göhre *et al.*, 2012; Wedlich-Söldner *et al.*, 2002). Im Stamm AB33kex2Δ/cts1G wurde, ähnlich zum Sedimentationstest, maximal eine geringe Ausprägung dieses morphologischen Phänotyps sichtbar.

Die bisherigen Ergebnisse weisen auf einen stärker ausgebildeten Phänotyp in den Stämmen AB33don1Δ/cts1G und AB33don3Δ/cts1G hin, als im Stamm AB33kin3Δ/cts1G und insbesondere in Stamm AB33kex2Δ/cts1G. Zur Quantifizierung der Größe der Zellaggregate in entsprechenden Kulturen wurde bei einer möglichst identischen optischen Dichte (OD₆₀₀ von 1,0) die Anzahl der Zellen in den Aggregaten bestimmt und klassifiziert (Abb. 2.10). Die Kategorie mit 1 bis 2 Zellen wurde als wildtypische Ausprägung eingeschätzt und schließt die Zellteilung von Sporidien ein. Als Kontrolle diente wiederum der Stamm AB33cts1G (*wt*).

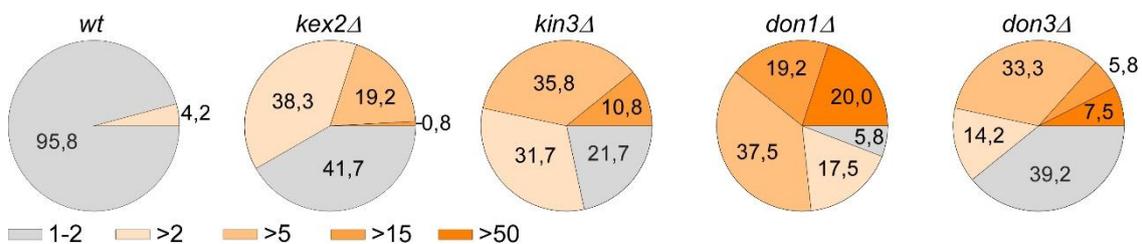


Abb. 2.10: Quantifizierung der Zellaggregate in Kulturen der Deletionsstämmen. Bestimmung der Anzahl unterschiedlicher Zellaggregate in Kulturen der AB33-Stämme mit Cts1G und jeweiligen Deletionen der Gene *kex2*, *kin3*, *don1* bzw. *don3*. Der Stamm AB33cts1G wurde als Kontrolle verwendet. Kategorien: 1 bis 2 Zellen (normale Zellteilung), 3 bis 5 Zellen, 6 bis 15 Zellen, 16 bis 50 Zellen und >50 Zellen pro Zellaggregat. Experiment erfolgte in 3 biologischen Replikaten mit insgesamt 120 analysierten Zellaggregaten. Angaben in % gesamt analysierter Zellaggregate.

Die Auswertung der Quantifizierung zeigte lediglich für die Stämme AB33don1Δ/cts1G und AB33don3Δ/cts1G große Zellaggregate mit mehr als 50 Zellen. Dabei ist der Anteil von Zellaggregaten mit mehr als 50 Zellen in den Kulturen vom Stamm AB33don1Δ/cts1G (20,0 %) mehr als doppelt so hoch als in Kulturen vom Stamm AB33don3Δ/cts1G (7,5 %). Interessanterweise enthalten Kulturen vom Stamm AB33don3Δ/cts1G eine vergleichsweise hohe Rate an Einzelzellen bzw. sich teilenden Zellen (39,2 %). Ein ähnliches Verhältnis von Einzelzellen und sich teilenden Zellen zu Zellaggregaten ist im Stamm AB33kex2Δ/cts1G (41,7 %) festzustellen. In den Kulturen von den Stämmen AB33kex2Δ/cts1G und AB33kin3Δ/cts1G ist der Zellteilungsdefekt durch anteilig mehr Zellaggregate als Einzelzellen bzw. sich teilenden Zellen ebenfalls eindeutig zu detektieren. Zellaggregate mit vergleichsweise geringer Expansion sind dabei vor allem für Kulturen vom Stamm AB33kex2Δ/cts1G charakteristisch. Die Möglichkeit, dass Einzelzellen

oder Zellaggregate durch Scherkräfte während der Kultivierung von größeren Zellaggregaten getrennt wurden, kann dabei nicht ausgeschlossen werden. Die Quantifizierung würde daher die Stabilität der Zellaggregate in den einzelnen Stämmen berücksichtigen, aber nicht einschätzen können. Insgesamt verweisen die Ergebnisse auf deutlich weniger große Zellaggregate in den Stämmen AB33kex2 Δ /cts1G und AB33kin3 Δ /cts1G, was auf einen weniger stark ausgeprägten Zellteilungsdefekt hindeutet und mit den vorherigen Ergebnissen zur Sedimentation und Koloniemorphologie korreliert.

2.3.2 In Stämmen mit Teilungsdefekt lokalisiert Cts1G an den Zellverbindungen

Nach der Untersuchung der Deletionsstämmen hinsichtlich der Ausprägung des Teilungsdefekts wurde mittels Fluoreszenzmikroskopie bei einer möglichst gleichen optischen Dichte (OD₆₀₀ von 1,0) die Lokalisation von Cts1G in den jeweiligen Stämmen während des hefeartigen Wachstums analysiert. Die Verwendung der Farbstoffe CW und FM4-64 ermöglichten dabei die Visualisierung von Zellwänden und Plasmamembranen.

Die Detektion von zusammenhängenden Zellen in der mikroskopischen Analyse ergänzt die vorherige Dokumentation der Zellteilungsdefekte in den Stämmen mit den einzelnen Deletionen der Gene *kex2*, *kin3*, *don1* bzw. *don3* (Abb. 2.11). Die Lokalisation von Cts1G konnte in allen Deletionsstämmen im Grenzbereich zwischen Mutter- und Tochterzelle detektiert werden (Abb. 2.11, oben). Diese Lokalisation an den Zellverbindungen korreliert, abgesehen vom Phänotyp des Zellteilungsdefekts, in etwa mit der abgebildeten Akkumulation von Cts1G in der zuvor durchgeführten Lokalisationsstudie ab der primären Septenbildung (Abb. 2.3). Der Transport von Cts1G in den Bereich zwischen Mutter- und Tochterzelle scheint durch die Deletionen von *kex2*, *kin3*, *don1* und *don3* demzufolge nicht beeinträchtigt zu sein. Die Visualisierung der Zellwand bzw. Septen zeigte, dass in allen Grenzbereichen zwischen den zwei Zellen mindestens ein Septum gebildet wurde (Abb. 2.11, Mitte). Die mikroskopische Analyse der Stämme AB33kex2 Δ /cts1G und AB33kin3 Δ /cts1G belegte zudem, dass zwischen zwei Zellen neben dem primären Septum teilweise auch das sekundäre Septum eingezogen wird und Cts1G in diesen Fällen in der entstandenen Fragmentierungszone lokalisiert. Im Stamm AB33don1 Δ /cts1G waren erwartungsgemäß keine sekundären Septen sichtbar. Die Lokalisation von Cts1G entsprach hier einer kortikalen Verteilung seitens der mutmaßlichen Tochterzelle. Entgegen den Erwartungen konnte im Stamm AB33don3 Δ /cts1G teilweise die Ausbildung eines sekundären Septums detektiert werden. Die Häufigkeit dieser Beobachtung konnte in einer später durchgeführten Quantifizierung der Septenbildung geklärt werden (Abb. 2.13). In allen Deletionsstämmen geht jegliche Septenbildung mit der Invagination der Plasmamembran einher (Abb. 2.11, unten). Mit der Visualisierung von Cts1G in den Zellteilungsmutanten

wurde deutlich, dass die Chitinase in den Zellaggregaten ähnlich zu teilenden Zellen und entsprechend der primären und sekundären Septenbildung im bekannten Erscheinungsbild zwischen Mutter- und Tochterzelle (Abb. 2.3) lokalisiert.

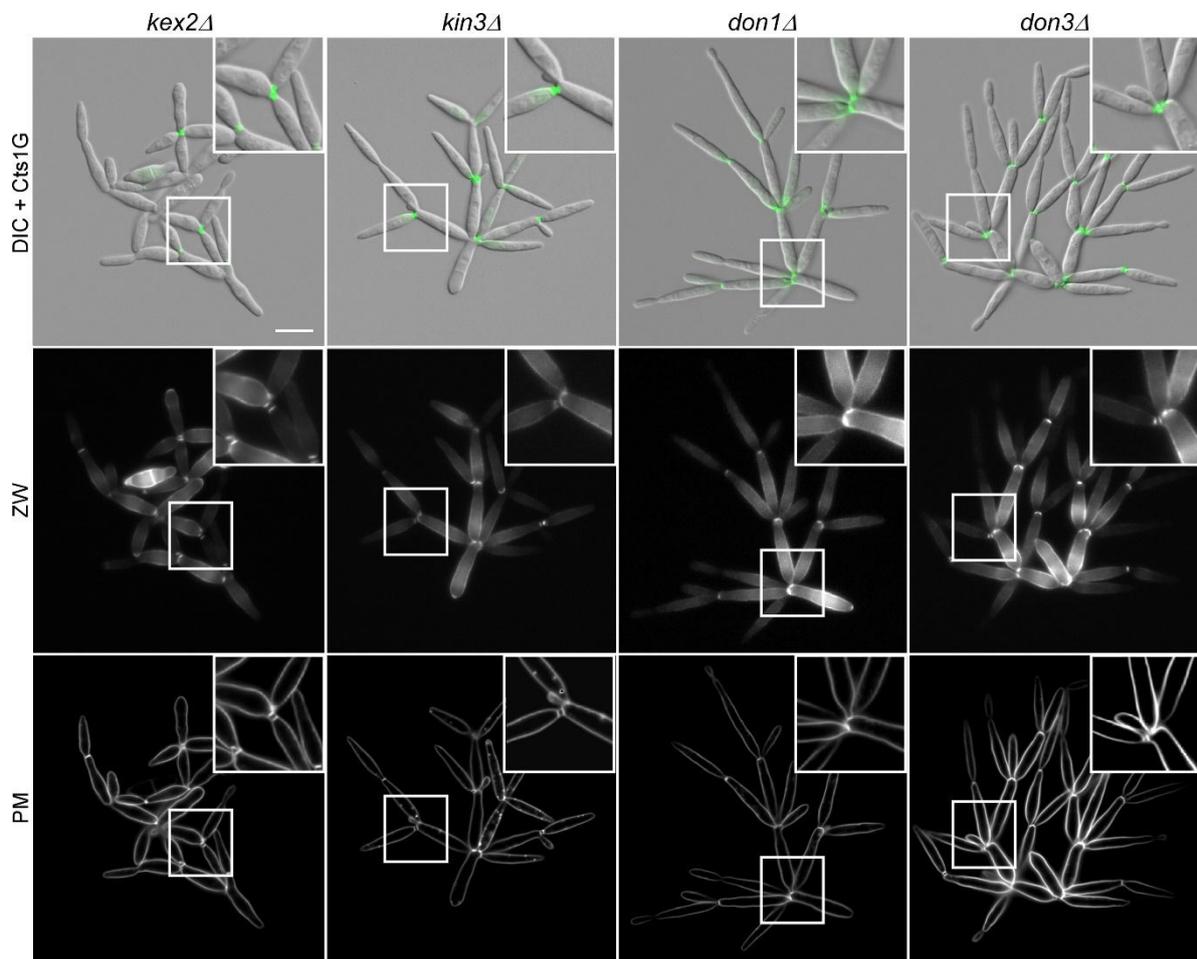


Abb. 2.11: Cts1G lokalisiert im Verbindungsbereich von Zellen mit Teilungsdefekt. Fluoreszenzmikroskopische Analyse der AB33-Stämme mit Cts1G-Synthese und jeweiligen Deletionen der Gene *kex2*, *kin3*, *don1* und *don3* während des hefeartigen Wachstums. Für die Mikroskopie wurden repräsentative Zellen der entsprechenden Stämme abgebildet. DIC, differential interference contrast mit überlagertem Fluoreszenzsignal von Cts1G (grün). Zellwände (ZW) und Plasmamembranen (PM) wurden mittels der Farbstoffe Calcofluor-White und FM4-64 visualisiert. Ausschnitte vergrößern Teile der Zellaggregate. Größenmaßstab: 10 μm .

2.3.3 Extrazelluläre Cts1G-Aktivität ist in *don*-Mutanten reduziert

Gemäß den zuvor durchgeführten Lokalisationsstudien scheint die Rekrutierung von Cts1 in den Bereich zwischen Mutter- und Tochterzelle bei den untersuchten Teilungsdefekten nicht eingeschränkt zu sein. Unter Berücksichtigung der eingangs erwähnten Annahme, dass Cts1 während der physischen Trennung von Mutter- und Tochterzelle freigesetzt wird, müsste die unkonventionelle Sekretion von Cts1 in den Deletionsstämmen mit Zellteilungsdefekt trotzdem deutlich reduziert sein. Um diese These zu überprüfen, wurde die extra- und

intrazelluläre Cts1-Aktivität in Sporidien der Cts1G produzierenden AB33-Stämme mit den jeweiligen Deletionen von *kex2*, *kin3*, *don1* bzw. *don3* verglichen. Als Referenz für die funktionelle Cts1-Sekretion wurde der Stamm AB33cts1G (*wt*) verwendet. Der Stamm AB33cts1 Δ (*cts1* Δ) diente als Negativkontrolle. Ein Einfluss von Gfp auf die Sekretion bzw. Aktivität von Cts1G war anhand der vorangegangenen Experimente nicht zu erwarten (Abb. 2.2. B).

Die Messung der relativen extrazellulären Cts1-Aktivität ergab, dass nicht in allen Deletionsstämmen die Sekretion von Cts1 reduziert ist. Für die Stämme AB33kex2 Δ /cts1G (116,4 %) und AB33kin3 Δ /cts1G (90,2 %) war keine signifikante Abweichung der Messwerte zum Vorgängerstamm (*wt*) festzustellen (Abb. 2.12 A). Eine deutliche signifikante Diskrepanz in den Messwerten bestand jedoch zwischen dem Vorgängerstamm (*wt*) und den *don*-Mutanten AB33don1 Δ /cts1G (5,3 %) und AB33don3 Δ /cts1G (19,1 %). Demnach scheint die Cts1-Sekretion ausschließlich in den *don*-Mutanten reduziert. Umgekehrt verweist die Messung der intrazellulären Cts1-Aktivität auf die Akkumulation von Cts1G in den Zellen der *don*-Mutanten, vermutlich durch ausbleibende Cts1-Sekretion. Die Messwerte der relativen intrazellulären Cts1-Aktivität waren für die Stämme AB33don1 Δ /cts1G (202,5 %) und AB33don3 Δ /cts1G (212,1 %) im Vergleich zum Vorgängerstamm (*wt*) signifikant höher, während sich die Werte für die Stämme AB33kex2 Δ /cts1G (114,3 %) und AB33kin3 Δ /cts1G (137,6 %) nicht signifikant unterschiedlich zum Vorgängerstamm (*wt*) verhielten (Abb. 2.12 B).

Die Einschätzung der intrazellulären Akkumulation von Cts1G in den Stämmen mit *don1* Δ und *don3* Δ wird durch die Überprüfung der Proteinsynthese von Cts1G mittels Western Blot-Analysen unterstützt. Der Western Blot der Gesamtzellextrakte zeigte, neben der Synthese eines stabilen Proteins (ca. 110 kDa) in allen Deletionsstämmen, ein deutlicheres Bandensignal für Cts1G für die Stämme AB33don1 Δ /cts1G und AB33don3 Δ /cts1G, was auf eine erhöhte Proteinmenge auf Grund intrazellulärer Akkumulation hindeutet (Abb. 2.12 D). Durch die in allen Stämmen identische Expression der Gensequenz für Cts1G am *cts1*-Lokus unter Kontrolle des nativen Promotors ist vorerst von einer identischen Menge an synthetisiertem Protein in den einzelnen Stämmen auszugehen. Die Detektion von Aktin (42 kDa) diente als Ladekontrolle bzw. Nachweis für die Verwendung von identischen Mengen Gesamtzellextrakt. Im Western Blot der zellfreien Kulturüberstände konnte kein stabiles Cts1G detektiert werden, was eine bekannte Problematik darstellt. Interessanterweise wurden für den Vorgängerstamm (*wt*), die Stämme AB33kex2 Δ /cts1G und AB33kin3 Δ /cts1G, sowie in äußerst schwacher Intensität auch für die *don*-Mutanten, Bandensignale sichtbar, die auf die Akkumulation von freiem Gfp hindeuten (Abb. 2.12 C).

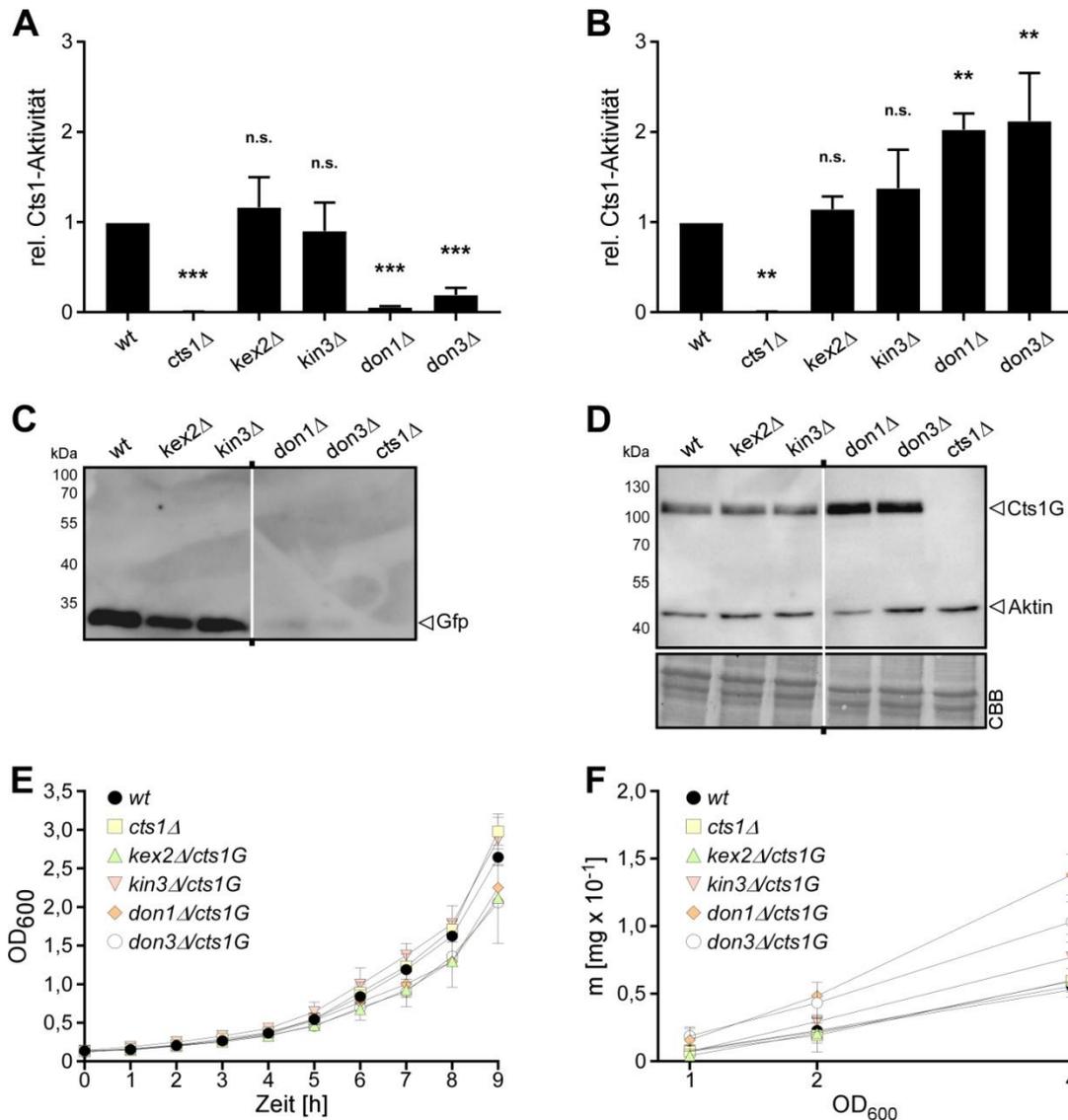


Abb. 2.12: Die extrazelluläre Cts1G-Aktivität ist in *don*-Mutanten reduziert. Analyse der Cts1-Sekretion in AB33-Stämmen mit Cts1G-Synthese und jeweiligen Deletionen der Gene *kex2*, *kin3*, *don1* bzw. *don3* während des hefeartigen Wachstums. **(A-B)** Relative Cts1-Aktivitäten auf den Zelloberflächen (A) und in den Gesamtzellextrakten (B) von AB33*kex2*Δ/*cts1G*, AB33*kin3*Δ/*cts1G*, AB33*don1*Δ/*cts1G* und AB33*don3*Δ/*cts1G*. Als Referenz für Cts1-Sekretion wurde der Stamm AB33*cts1G* (*wt*) verwendet. Der Stamm AB33*cts1*Δ diente als Negativkontrolle. Bestimmung erfolgte anhand der Umwandlung des Substrats MUC. Fehlerbalken: Standardabweichung von 5 (A) bzw. 3 (B) biologischen Replikaten. n.s., nicht signifikant, p-Wert > 0,05; **, p-Wert 0,001 bis 0,01; ***, p-Wert < 0,001 (1-way ANOVA, Kontrolle: *wt*). **(C-D)** Western Blots der zellfreien Kulturüberstände (C) und Gesamtzellextrakte (D) von AB33*cts1G* (*wt*), AB33*kex2*Δ/*cts1G*, AB33*kin3*Δ/*cts1G*, AB33*don1*Δ/*cts1G* und AB33*don3*Δ/*cts1G* und AB33*cts1*Δ. Pro Ansatz wurden gefällte Proteine einer Kultur (50 ml) mit einer OD₆₀₀ von 1,0 bzw. 10 µg Gesamtzellextrakt aufgetragen. Detektion erfolgte mittels der Antikörper αGfp und αAktin. Pfeilspitzen markieren Signale der detektierten Proteine. Laufspuren von jeweils einem einzigen Western Blot, der für eine bessere Übersicht neu angeordnet wurde. CBB, Coomassie Brilliant Blue gefärbte Membran (Ladkontrolle). **(E)** Wachstumsanalyse anhand der OD₆₀₀ über eine Inkubationszeit von 9 h. Inokuliert wurde mit einer OD₆₀₀ von 0,1. Vergleich von AB33*cts1G* (*wt*), AB33*cts1*Δ, AB33*kex2*Δ/*cts1G*, AB33*kin3*Δ/*cts1G*, AB33*don1*Δ/*cts1G* und AB33*don3*Δ/*cts1G*. Fehlerbalken: Standardabweichung von 3 biologischen Replikaten. **(F)** Bestimmung der Trockenzellmasse bei einer OD₆₀₀ von 1,0; 2,0 und 4,0 von AB33*cts1G* (*wt*), AB33*cts1*Δ, AB33*kex2*Δ/*cts1G*, AB33*kin3*Δ/*cts1G*, AB33*don1*Δ/*cts1G* und AB33*don3*Δ/*cts1G*. Fehlerbalken: Standardabweichung von 3 biologischen Replikaten.

Möglicherweise wird sekretiertes Cts1G proteolytisch prozessiert, was zur Abspaltung von C-terminal gebundenem Gfp führt. Konsistent dazu sind die Ausführungen in Ökmen *et al.* (2018), die eine extrazelluläre Prozessierung von Cts1 durch die Metalloprotease Fly1 beschreiben. Die Deletion des Gens der Protease ermöglichte die Detektion des Vollängenproteins Cts1G. Unter Voraussetzung der proteolytischen Spaltung von Cts1G kann die Detektion von freiem Gfp neben den enzymatischen Aktivitätstests hier als zusätzlicher Hinweis für die Sekretion von Cts1 interpretiert werden.

Die sehr schwachen Signale in den Überständen der *don*-Mutanten korrelieren mit den sehr geringen extrazellulären Cts1-Aktivitäten. Um die Sekretion anhand des Vollängenproteins nachzuweisen, könnte die zusätzliche Deletion des Gens der Metalloprotease eine Option darstellen.

Damit die extrazelluläre Cts1-Aktivität in den beschriebenen Versuchen auf vergleichbare Zellzahlen bezogen werden konnte, wurden die Messwerte anhand der optischen Dichte normalisiert. Da die Deletionsstämme untereinander und in Relation zum Vorgängerstamm (*wt*) unterschiedlich große Zellaggregate ausbilden (Abb. 2.10) musste geklärt werden, ob der Zusammenhang zwischen optischer Dichte und Zellzahl in Stämmen mit Zellteilungsdefekt konsistent ist. Analysen der Wachstumsrate der Deletionsstämme sowie des Vorgängerstamms (*wt*) und Kontrollstamms (*cts1Δ*) zeigten für alle Kandidaten einen exponentiellen Anstieg ohne große Abweichungen (Abb. 2.12 E). Die Bestimmung der Trockenzellmasse als Referenz für die Zellzahl verdeutlichte, dass die Stämme AB33don1Δ/*cts1G* und AB33don3Δ/*cts1G* zu den definierten optischen Dichten (OD₆₀₀ von 1,0; 2,0 und 4,0) tendenziell eine größere Zellmasse aufwiesen bzw. höhere Zellzahlen vorlagen, als bei den anderen Stämmen, die in etwa ein gleiches Level bildeten (Abb. 2.12 F). Für den Stamm AB33kin3Δ/*cts1G* war erst ab höheren optischen Dichten (OD₆₀₀ von 2,0 und 4,0) eine geringe Tendenz wie für die *don*-Mutanten zu beobachten. Durch diese Resultate ist davon auszugehen, dass bei vergleichbaren optischen Dichten in den Stämmen AB33don1Δ/*cts1G* und AB33don3Δ/*cts1G* mehr Zellen vorliegen, als bei den anderen Stämmen. Demnach bezog sich die extrazelluläre Cts1-Aktivität in den beiden Stämmen auf eine größere Zellmasse bzw. Zellzahl. Die aus dem Aktivitätstest (Abb. 2.12 A) geschlussfolgerte reduzierte Cts1-Sekretion in *don*-Mutanten wird somit in ihrer Ausprägung wahrscheinlich unterschätzt und dürfte tatsächlich noch geringer sein. Da bei der optischen Dichte (OD₆₀₀ von 1,0), bei der der Aktivitätstest durchgeführt wurde, im Stamm AB33kin3Δ/*cts1G* keine größere Zellmasse gemessen wurde, kann für diesen Stamm nicht auf eine Reduktion der Cts1-Sekretion geschlussfolgert werden.

Im Kontext der gesamten Ergebnisse verdeutlicht die Untersuchung der Cts1-Sekretion, dass von den Deletionsstämmen mit Teilungsdefekt entgegen den Erwartungen lediglich die *don*-Mutanten eine deutlich reduzierte Sekretion aufweisen bzw. die Stämme

AB33kex2 Δ /cts1G und AB33kin3 Δ /cts1G in der unkonventionellen Sekretion von Cts1 nicht beeinträchtigt sind. In Bezug auf die Quantifizierung der Zellaggregate (Abb. 2.10) wird zudem deutlich, dass die Trennung von Mutter- und Tochterzelle sehr wahrscheinlich keine Voraussetzung für die Cts1-Sekretion darstellt: Vergleichbare Verhältnisse an Einzelzellen bzw. teilenden Zellen in den Stämmen AB33kex2 Δ /cts1G (41,7 %) und AB33don3 Δ /cts1G (39,3 %) stehen deutlich unterschiedliche Sekretionsleistungen gegenüber. Zudem scheinen Einzelzellen bzw. teilende Zellen in den Stämmen AB33kex2 Δ /cts1G und AB33kin3 Δ /cts1G nicht ausschließlich für die Cts1-Sekretion verantwortlich zu sein, andernfalls müssten die Messwerte für die extrazelluläre Cts1-Aktivität stärker vom Vorgängerstamm (*wt*) abweichen, auf Grund des höchsten Anteils an Einzelzellen bzw. teilende Zellen in der *wt* Referenz (95,8 %). Die Trennung von Mutter- und Tochterzelle scheint demnach keine notwendige Bedingung zu sein und die unkonventionelle Sekretion von Cts1 erfolgt unabhängig von der physischen Zellteilung.

2.3.4 Sekundäre Septenbildung hat keinen Einfluss auf die Sekretion von Cts1G

Die anfängliche Annahme, dass Cts1 nach Lokalisation in der Fragmentierungszone durch die Trennung von Mutter- und Tochterzelle freigesetzt wird, konnte mit den vorherigen Ergebnissen widerlegt werden. Da die physische Zellteilung keinen Einfluss auf den Export der Chitinase besitzt, wurden weitere Voraussetzungen für die Sekretion von Cts1 eruiert. Während in den Stämmen mit Deletionen von *kex2* und *kin3* keine Auswirkung festgestellt wurde, war die Cts1-Sekretion in den *don*-Mutanten deutlich eingeschränkt. Eine Gemeinsamkeit der kodierten Proteine Don1 und Don3 ist die Beteiligung am Aufbau des sekundären Septums in Sporidien (Böhmer *et al.*, 2009; Weinzierl *et al.*, 2002). Dies ließ die Schlussfolgerung zu, dass die unkonventionelle Sekretion von Cts1 in Abhängigkeit von der sekundären Septenbildung erfolgen könnte. Um diese These zu prüfen, wurde der Anteil an sekundären Septen zwischen Mutter- und Tochterzelle innerhalb der Zellaggregate der Deletionsstämme quantifiziert. Da distale Zellen im Zellaggregat theoretisch noch durch Zellteilung separiert werden könnten, wurden die entsprechenden Grenzbereiche für die Quantifizierung der Septen nicht berücksichtigt und stattdessen ausschließlich Bereiche untersucht, die das Innere des jeweiligen Zellaggregats betrafen.

Die Quantifizierung der Septenbildung in den Grenzbereichen zwischen Mutter- und Tochterzelle ergab für die *don*-Mutanten das laut Vorgängerstudien erwartete niedrige Verhältnis an sekundären Septen (5,8 % und 2,5 %; Abb. 2.13). Die Detektion eines sekundären Septums im Stamm AB33don3 Δ /cts1G während der Lokalisationsstudie von Cts1G (Abb. 2.11, Mitte) scheint demzufolge eine Ausnahme darzustellen. Würde die Sekretion von Cts1 mit der sekundären Septenbildung einhergehen, müsste der Anteil an

sekundären Septen in den Stämmen ohne eingeschränkte Cts1-Sekretion entsprechend hoch sein. Diese Annahme konnte nicht bestätigt werden, da der Anteil an sekundären Septen in den Stämmen AB33kex2 Δ /cts1G (30,8 %) und AB33kin3 Δ /cts1G (45,8 %) vergleichsweise gering ausfiel. Eine Rückführung der gemessenen extrazellulären Cts1-Aktivität (Abb. 2.12 A) auf die wenigen Grenzregionen mit zwei Septen scheint eher unwahrscheinlich. Da gemäß der Bestimmung der Trockenzellmasse (Abb. 2.12 F) gleiche Zellzahlen ermittelt wurden, müsste die Sekretionsleistung der Stämme AB33kex2 Δ /cts1G und AB33kin3 Δ /cts1G im Vergleich zum Vorgängerstamm (*wt*), bei dem keine eingeschränkte Septenbildung anzunehmen ist, deutlich reduziert sein. Im Stamm AB33kex2 Δ /cts1G liegt der Anteil an sekundären Septen in den interzellulären Bereichen bei unter einem Drittel bezogen auf die Gesamtzahl analysierter Zellen (30,8 %).

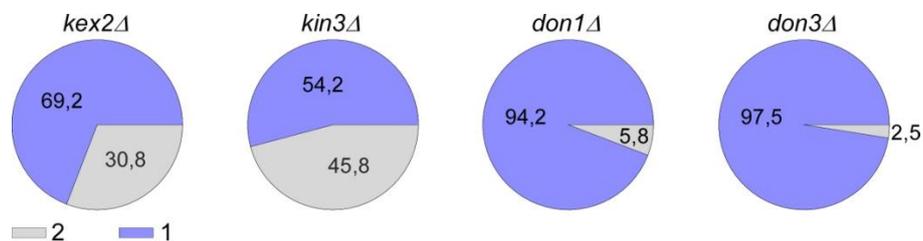


Abb. 2.13: Quantifizierung der sekundären Septen in den Grenzbereichen der Zellaggregate. Bestimmung der Anzahl an sekundären Septen in den Zellaggregaten der Cts1G produzierenden AB33-Stämme mit jeweiligen Deletionen der Gene *kex2*, *kin3*, *don1* bzw. *don3*. Kategorien: 2 Septen bzw. 1 Septum pro Grenzbereich zwischen Mutter- und Tochterzelle. Experiment wurde in 3 biologischen Replikaten mit insgesamt 120 analysierten Grenzbereichen durchgeführt. Angaben in % gesamt analysierter Grenzregionen.

Das Resultat der Quantifizierung lässt vermuten, dass die sekundäre Septenbildung keinen Einfluss auf die unkonventionelle Sekretion von Cts1 hat. Im Gegensatz zum primären Septum ist die Bildung des sekundären Septums nicht Zellzyklus-abhängig (Böhmer *et al.*, 2008). Folglich müsste der Zellzyklus trotz Abwesenheit des sekundären Septums fortgesetzt werden, was durch die Expansion der Zellaggregate in den *don*-Mutanten deutlich wird. Die dargelegte Abhängigkeit der Cts1-Sekretion vom Zellzyklus (Abschnitt 2.4.4) scheint daher nicht mit sekundärer Septenbildung bzw. auch nicht mit der physischen Zellteilung gleichzusetzen zu sein.

2.4 Don3 mit spezifischer Funktion in der Cts1-Sekretion

Die Analyse der unkonventionellen Sekretion von Cts1 in Stämmen mit Zellteilungsdefekt umfasste Mutanten, die pleiotrope Effekte aufweisen, in der Synthese eines Motorproteins inhibiert sind bzw. stark reduzierte sekundäre Septenbildung ausprägen. Lediglich die zwei Mutanten, die in der Bildung des sekundären Septums eingeschränkt sind, zeigten einen

Effekt auf die Sekretion von Cts1, ohne dass die sekundäre Septenbildung für die unkonventionelle Sekretion essentiell erscheint.

Interessanterweise ist mit der Auflösung der Kernhülle während der Zytokinese für die Kinase Don3 bereits eine weitere Funktion beschrieben worden (Sandrock *et al.*, 2006). Das Protein Don1 stellt einen Guaninaustauschfaktor (*engl.*: guanine exchange factor; GEF) dar, der das GTP-bindende Protein Cdc42 aktiviert, damit die Anordnung des kontraktiven Aktomyosinrings für den Aufbau des sekundären Septums erfolgt. Unabhängig voneinander initiieren Cdc42 und Don3 die sekundäre Septenbildung in Sporidien (Böhmer *et al.*, 2008; Hlubek *et al.*, 2008). Dabei lokalisieren beide Proteine, ähnlich wie Cts1, in der Fragmentierungszone von Mutter- und Tochterzelle (Sandrock *et al.*, 2006; Schink und Bölker, 2009). Eine mit Cts1 vergleichbare unkonventionelle Sekretion von Don1 und Don3 erschien daher plausibel und wurde nachfolgend untersucht.

2.4.1 Funktionelle Komplementation des *donΔ*-Phänotyps durch ektoxische Überexpression

Zur Überprüfung der unkonventionellen Sekretion von Don1 bzw. Don3 in Sporidien wurde analog zu Cts1 die β -Glukuronidase Gus verwendet und die Gensequenzen von Fusionsproteinen aus N-terminalem Gus und Don1 bzw. Don3 unter der Kontrolle des synthetischen, konstitutiven Promotors P_{oma} am *ip*-Lokus überexprimiert (AB33gus-don1 bzw. AB33gus-don3).

Die Funktionalität der jeweiligen Fusionsproteine Gus-Don1 bzw. Gus-Don3 konnte experimentell belegt werden: In AB33-Stämmen, in denen die Gene für Don1 (AB33don1 Δ) oder Don3 (AB33don3 Δ) deletiert wurden, führte die Überexpression des entsprechenden Fusionsproteins zur Aufhebung des typischen Zellteilungsdefekts in *don*-Mutanten (AB33don1 Δ /gus-don1 bzw. AB33don3 Δ /gus-don3). Sichtbar wurde dies in mikroskopischen Analysen durch die Detektion von Einzelzellen bzw. teilenden Zellen (Abb. 2.14 A), sowie auf YEPS_{light}-Festmedium anhand einer eher wildtypischen Kolonimorphologie an Stelle des Donut-Phänotyps (Abb. 2.14 B). Im Stamm AB33don3 Δ /gus-don3 konnte lediglich auf eine schwache Ausprägung des Donut-Phänotyps geschlossen werden. Mittels der Quantifizierung der Zellaggregate in den entsprechenden Kulturen wurde zudem deutlich, dass in den Ansätzen mit Gus-Don1 (87,5 %) bzw. Gus-Don3 (97,5 %) der Anteil an Einzelzellen bzw. teilenden Zellen im direkten Vergleich deutlich erhöht war (Abb. 2.14 C). Es konnte daher davon ausgegangen werden, dass die Gus-Fusionen weder die Don1 noch die Don3 Aktivität beeinträchtigen. Neben den morphologischen Untersuchungen wurde mittels enzymatischer Aktivitätstests zudem der Effekt der Proteinsynthese von Gus-Don1 und Gus-Don3 in *don*-Mutanten hinsichtlich der Sekretion von Cts1 analysiert.

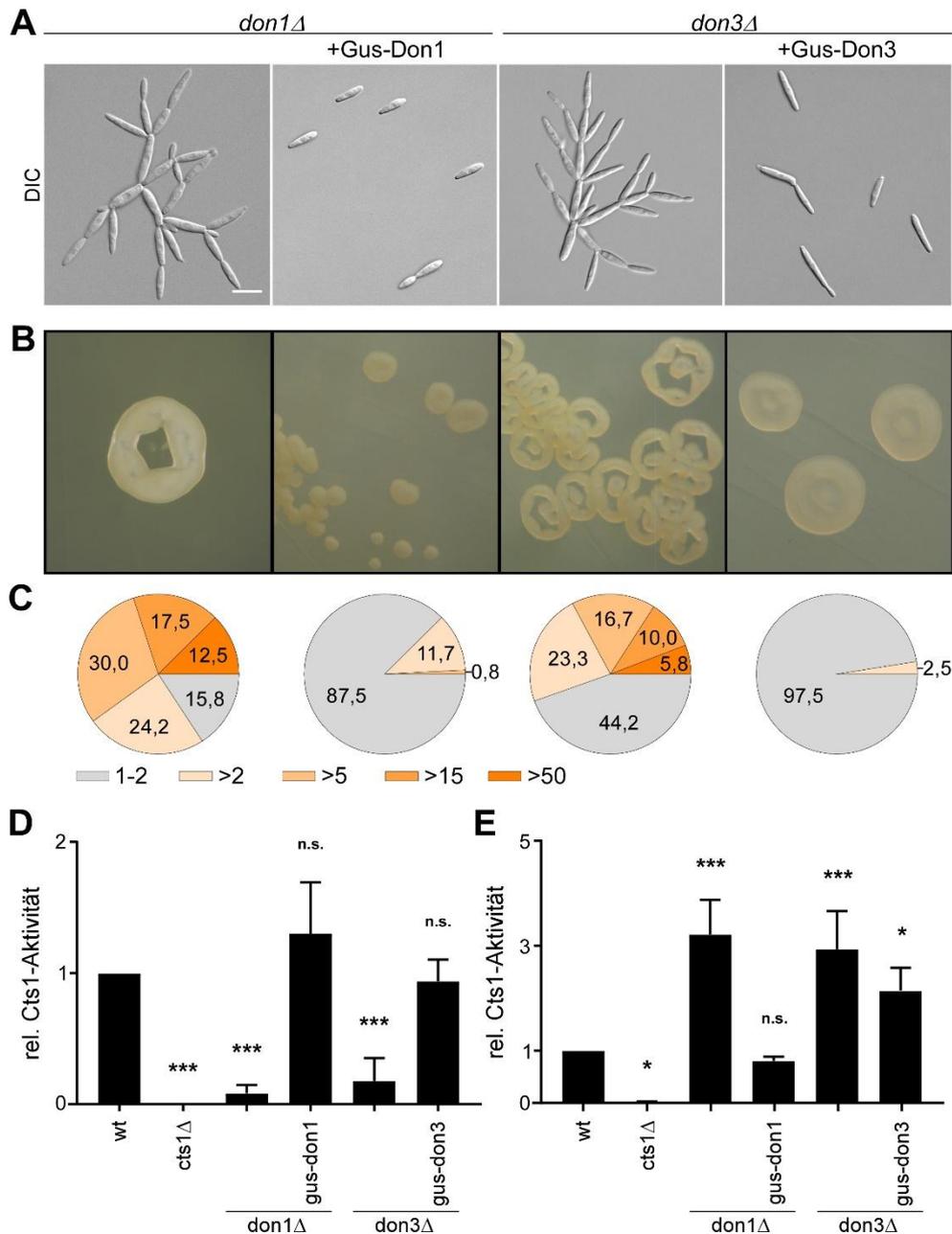


Abb. 2.14: Funktionelle Komplementation des *don*-Phänotyps bei Überexpression von *gus-don1* und *gus-don3*. Analyse der Funktionalität von Gus-Don1 und Gus-Don3 in AB33-Stämme mit *don1Δ* und *don3Δ* während des hefeartigen Wachstums. **(A)** Mikroskopische Analyse der Phänotypen von AB33*don1Δ*, AB33*don1Δ/gus-don1*, AB33*don3Δ* und AB33*don3Δ/gus-don3*. Größenmaßstab: 10 μ m. **(B)** Koloniemorphologie auf YEPS_{light}-Festmedium von AB33*don1Δ*, AB33*don1Δ/gus-don1*, AB33*don3Δ* und AB33*don3Δ/gus-don3*. Kolonien wurden vereinzelt und nach Inkubation für 2 bis 3 Tage bei 28 °C abgebildet. **(C)** Bestimmung der Verhältnisse unterschiedlich großer Zellaggregate in Kulturen von AB33*don1Δ*, AB33*don1Δ/gus-don1*, AB33*don3Δ* und AB33*don3Δ/gus-don3*. Kategorien: 1 bis 2 Zellen (normale Zellteilung), 3 bis 5 Zellen, 6 bis 15 Zellen, 16 bis 50 Zellen und >50 Zellen pro Zellaggregat. Das Experiment erfolgte in 3 biologischen Replikaten mit insgesamt 120 analysierten Zellaggregaten. Angaben in % gesamt analysierter Zellaggregate. **(D-E)** Relative Cts1-Aktivitäten auf den Zelloberflächen (D) und in den Gesamtzellextrakten (E) von AB33*don1Δ*, AB33*don1Δ/gus-don1*, AB33*don3Δ* und AB33*don3Δ/gus-don3*. Als Referenz für Cts1-Sekretion wurde der Stamm AB33 (wt) verwendet. Der Stamm AB33*cts1Δ* diente als Negativkontrolle. Bestimmung erfolgte anhand der Umwandlung des Substrats MUC. Fehlerbalken: Standardabweichung von je 3 biologischen Replikaten. n.s., nicht signifikant, p-Wert > 0,05; *, p-Wert 0,01 bis 0,05; ***, p-Wert < 0,001 (1-way ANOVA, Kontrolle: wt).

Als Referenz für die Cts1-Sekretion diente der Vorgängerstamm AB33 (*wt*). Der Stamm AB33cts1 Δ (*cts1* Δ) wurde als Negativkontrolle verwendet. Die Messung der relativen extrazellulären Cts1-Aktivitäten zeigte in den *don*-Mutanten ohne exprimierte Gensequenz der Fusionsproteine die erwartete signifikant reduzierte Cts1-Sekretion (8,2 % und 17,2 %; Abb. 2.14 D). In *don*-Mutanten, in denen die Fusionsproteine synthetisiert werden (130,3 % und 93,8 %), war diese Reduktion aufgehoben und die Cts1-Sekretion in etwa auf dem Level des Vorgängerstamms (*wt*). In der Messung der relativen intrazellulären Cts1-Aktivitäten konnte für die Stämme AB33don1 Δ (321,5 %) und AB33don3 Δ (293,4 %) die prognostizierte Cts1-Akkumulation anhand der signifikant erhöhten Cts1-Aktivitäten festgestellt werden (Abb. 2.14 E). In Übereinstimmung damit war die intrazelluläre Cts1-Aktivität im Stamm mit AB33don1 Δ /gus-don1 (80,2 %) in Relation zum Vorgängerstamms (*wt*) nicht signifikant erhöht. Entgegen der Erwartungen verweist die Cts1-Aktivität im Stamm mit AB33don3 Δ /gus-don3 (214,3 %) auf eine geringfügige Akkumulation von Cts1.

Zusammenfassend konnten die Auswirkungen der Gendeletionen von *don1* Δ und *don3* Δ auf die Cts1-Sekretion mittels der Synthese von Gus-Don1 vollständig und von Gus-Don3 teilweise egalisiert werden. Damit verweisen die Ergebnisse auf die funktionelle Komplementation des Phänotyps der *don*-Mutanten, detektierbar sowohl in Bezug auf die Morphologie als auch weitestgehend für die unkonventionelle Sekretion von Cts1.

2.4.2 Don3 wird unkonventionell sekretiert

Nach der Feststellung der funktionellen Komplementation erfolgte die Überprüfung der unkonventionellen Sekretion von Gus-Don1 und Gus-Don3. Neben den bereits verwendeten Stämmen AB33don1 Δ /gus-don1 bzw. AB33don3 Δ /gus-don3 wurde zusätzlich die unkonventionelle Sekretion der Fusionsproteine unabhängig der Deletionen von *don1* und *don3* im Stamm AB33 untersucht (AB33gus-don1 und AB33gus-don3). Um zu ermitteln, ob extrazelluläre Aktivitäten auf Sekretion oder Zellyse zurückzuführen sind, wurden zudem Lysekontrollen mit cytoplasmatischen Gus (Gus_{cyt}) in den passenden Stammhintergründen parallel mitgeführt (AB33gus_{cyt}, AB33don1 Δ /gus_{cyt}, AB33don3 Δ /gus_{cyt}). Für den Vergleich mit der unkonventionellen Sekretion von Cts1 diente der Stamm AB33gus-cts1.

Die Messung der relativen extrazellulären Gus-Aktivität zeigte für Stämme, die Gus-Fusionsproteine mit Don1 oder Don3 synthetisierten, messbare enzymatische Aktivitäten, was zunächst auf unkonventionelle Sekretion hinweist (Abb. 15 A). Des Weiteren verdeutlichen die gemessenen Aktivitäten absolut betrachtet für Gus-Cts1 eine deutlich höhere Sekretionsleistung als für Gus-Don1 (15,4 % und 18,0 %) bzw. Gus-Don3 (22,9 % und 21,4 %). Trotz anzunehmender identischer Überexpression anhand des verwendeten konstitutiven Promotors P_{oma} an identischen Insertionsloci ist zu diskutieren, ob die

Syntheserate oder Stabilität einer Chitinase (Cts1) möglicherweise höher bzw. der Proteinumsatz geringer ist, als von regulatorischen Proteinen wie einem Guaninaustauschfaktor (Don1) oder einer Kinase (Don3). Andernfalls ist die unkonventionelle Sekretion von Cts1 auch relativ gesehen im Vergleich zu Don1 und Don3 als deutlich stärker zu bewerten.

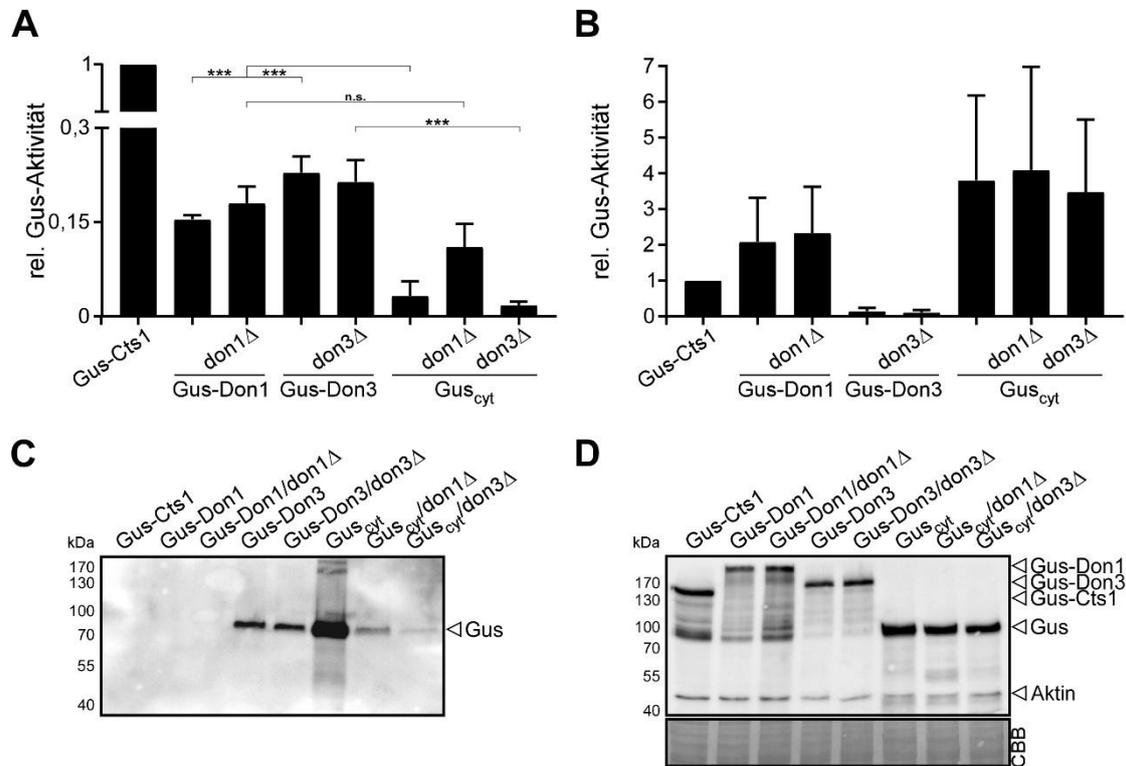


Abb. 2.15: Don3 wird unkonventionell sekretiert. Analyse der unkonventionellen Sekretion von Gus-Don1 und Gus-Don3 in AB33-Stämmen während des hefeartigen Wachstums. **(A-B)** Relative Gus-Aktivitäten in den zellfreien Kulturüberständen (A) und Gesamtzellextrakten (B) von AB33gus-don1, AB33don1Δ/gus-don1, AB33gus-don3 und AB33don3Δ/gus-don3. Zum Vergleich mit der unkonventionellen Sekretion von Cts1 wurde der Stamm AB33gus-cts1 verwendet. Die Stämme AB33gus_{cyt}, AB33don1Δ/gus_{cyt} und AB33don3Δ/gus_{cyt} dienen als Lysekontrollen. Bestimmung erfolgte anhand der Umwandlung des Substrats MUG. Fehlerbalken: Standardabweichung von je 3 biologischen Replikaten. n.s., nicht signifikant, p-Wert > 0,05; ***, p-Wert > 0,001 (1-way ANOVA). **(C-D)** Western Blots der zellfreien Kulturüberstände (C) und Gesamtzellextrakte (D) von AB33gus-cts1, AB33gus-don1, AB33don1Δ/gus-don1, AB33gus-don3, AB33don3Δ/gus-don3, AB33gus_{cyt}, AB33don1Δ/gus_{cyt} und AB33don3Δ/gus_{cyt}. Pro Ansatz wurden gefällte Proteine einer Kultur (50 ml) mit einer OD₆₀₀ von 1,0 bzw. 10 µg Gesamtzellextrakt aufgetragen. Die Detektion erfolgte mittels der Antikörper αHA und αAktin. Pfeilspitzen markieren Signale der detektierten Proteine. CBB, Coomassie Brilliant Blue gefärbte Membran (Ladekontrolle).

Unter Berücksichtigung der Lysekontrollen konnte für Don3 auf unkonventionelle Sekretion geschlossen werden: Die extrazelluläre Gus-Aktivität unterscheidet sich sowohl im Stamm AB33gus-don3 und im Stamm AB33don3Δ/gus-don3 signifikant von den entsprechenden Lysekontrollen (AB33gus_{cyt} und AB33don3Δ/gus_{cyt}). Für Don1 ist die Beurteilung der unkonventionellen Sekretion kritischer zu betrachten: Zwar wies der Stamm AB33gus-don1 einen signifikanten Unterschied zur passenden Lysekontrolle (AB33gus_{cyt}) auf, jedoch konnte keine Signifikanz im Stamm AB33don1Δ/gus-don1 im Vergleich mit der zugehörigen

Lysekontrolle (AB33don1 Δ /gus_{cyt}) festgestellt werden. Die Einschätzung der unkonventionellen Sekretion von Don1 ist daher nicht eindeutig möglich.

Die als Lysekontrollen fungierenden Stämme AB33gus_{cyt} (380,4 %), AB33don1 Δ /gus_{cyt} (409,3 %) und AB33don3 Δ /gus_{cyt} (347,8 %) belegen in der Messung der relativen intrazellulären Gus-Aktivität die Akkumulation von Gus in den Zellen auf Grund fehlender Sekretion (Abb. 2.15 B). In Relation dazu ist die intrazelluläre Gus-Aktivität für den Stamm AB33gus-don1 (208,5 %) und für den Stamm AB33don1 Δ /gus-don1 (233,1 %) etwas reduziert, was für den Export von Gus-Don1 spricht, allerdings dennoch eine hohe intrazelluläre Akkumulation belegt, im Vergleich zum unkonventionell sekretierten Konstrukt Gus-Cts1. Der Stamm AB33gus-don3 (14,7 %) und der Stamm AB33don3 Δ /gus-don3 (10,4 %) weisen kaum intrazelluläre Akkumulation auf, was auf die Freisetzung von Don3 durch unkonventionelle Sekretion schließen lässt. Hinsichtlich der Aussagekraft der intrazellulären Aktivitätsmessungen ist zu beachten, dass alle in Relation zum Stamm AB33gus-cts1 gesetzten Messwerte hohe Standardabweichungen aufwiesen und insgesamt keine Signifikanzen ermittelt werden konnten.

Zur weiteren Beurteilung der unkonventionellen Sekretion wurde der Nachweis über die Proteinsynthese mittels Western Blot-Analyse der Gesamtzellextrakte erbracht (Abb. 2.15 D). In dieser Arbeit wurden Fusionsproteine mit Gus stets mit einer intermediären Erkennungssequenz zwischen den Fusionspartnern synthetisiert, die aus Streptavidin (S), Hämmagglutinin- (H) und Histidinepitopen (H) bestand und die Detektion im Western Blot ermöglichte (vgl. Abb. 2.16 A). Die Detektion von Aktin (42 kDa) diente als Ladekontrolle bzw. Nachweis für die Verwendung von identischen Mengen Gesamtzellextrakt.

Die detektierten Signale weisen auf die Synthese der jeweiligen Proteine mit den erwarteten Größen für Gus-Cts1 (134 kDa), Gus-Don1 (225,5 kDa), Gus-Don3 (169,1 kDa) und Gus_{cyt} (78,6 kDa) hin. Zudem sind in allen Laufspuren Abbaubanden sichtbar, die auf proteolytische Spaltung schließen lassen und bereits in vorangegangenen Arbeiten für Fusionsproteine mit Gus festgestellt werden konnten (Stock *et al.*, 2012; Terfrüchte *et al.*, 2018). In diesem Zusammenhang könnten neben der putativen PEST-Sequenz in Cts1 insgesamt drei beschriebene PEST-Sequenzen in Don1 für eine feststellbar stärkere Degradierung von Gus-Cts1 bzw. Gus-Don1 (Schink und Bölker, 2009) verantwortlich sein. Neben dem deutlichen Signalen in den Laufspuren der Lysekontrollen, die auf erhöhte Proteinmengen auf Grund der intrazellulären Akkumulation schließen ließen, scheint für Gus-Cts1, einschließlich degradiertes Fragmente des Vollängenproteins, eine erhöhte Proteinmenge intrazellulär vorzuliegen. Dies könnte auf eine höhere Proteinstabilität hinweisen, weshalb eventuell für Gus-Cts1 eine höhere Sekretionsleistung vorliegt als für Gus-Don1 bzw. Gus-Don3.

Mittels Western Blot-Analysen der zellfreien Kulturüberstände konnte für Gus-Cts1, Gus-Don1 und Gus-Don3 kein Vollängenprotein detektiert werden (Abb. 2.15 C). Interessanterweise wurden jedoch Signale für Gus_{cyt} (78,6 kDa) deutlich. Diese scheinen nicht zwangsläufig für die gemessene extrazelluläre Aktivität verantwortlich, da das stärkste Signal im Ansatz mit sehr geringer Aktivität (Gus_{cyt}) bzw. kein Signal im Ansatz mit der höchsten Aktivität (Gus-Cts1) sichtbar wurde. Anzunehmen wäre eine zunächst intrazelluläre Akkumulation von fehlgefalteten oder aggregierten Protein auf Grund der übermäßigen Produktion durch die Überexpression der Gensequenzen und die anschließende Freisetzung mittels eines noch unbekanntes Mechanismus, um den zellulären Stress zu reduzieren. Die Annahme wird durch ähnliche Beobachtungen in Säugerzellen gestützt, welche die Sekretion inaktiver Proteine zur Zellaußenseite durch Endosomen beschreibt und als „misfolding-associated protein secretion“ (MAPS) bezeichnet wird (Lee *et al.*, 2016).

Zusammenfassend weisen die Ergebnisse auf die unkonventionelle Sekretion von Don3 hin, während für Don1 die Lyse der Zellen als potentielle Ursache für extrazelluläre Aktivität nicht auszuschließen ist und somit die Einschätzung der unkonventionellen Sekretion von Don1 erschwert wird. Die Western Blot-Analysen der zellfreien Kulturüberstände konnten in Bezug auf die extrazelluläre Anwesenheit von Don1 und Don3 keine Rückschlüsse liefern.

2.4.3 Eine nicht-funktionale FYVE-Domäne verringert die extrazelluläre Menge an Don1

Anhand der vorherigen Ergebnisse konnte für das Protein Don1 die unkonventionelle Sekretion nicht zweifelsfrei belegt werden. Dennoch war für Gus-Don1 extrazelluläre Aktivität messbar, was auf Freisetzung des Fusionsproteins oder zumindest der β -Glukuronidase in den extrazellulären Raum hindeutet. Zudem legt die Lokalisation von Don1 in der Fragmentierungszone nahe, dass es sich statt um Zellyse um einen gerichteten Prozess handelt.

Neben den für GEFs typischen katalytischen DBL Homologie (DH)- und lipidbindenden Pleckstrin Homologie (PH)-Domänen besitzt Don1 eine weitere bekannte Domäne (Rossman *et al.*, 2005; Schink und Bölker, 2009): Vorangegangene Arbeiten belegen den Transport von Don1 zur Fragmentierungszone mittels einer C-terminal positionierten FYVE-Domäne (Schink und Bölker, 2009). FYVE-Domänen entsprechen Cystein-haltige Zink-Finger-Regionen, die das endosomale Lipid Phosphatidylinositol 3-Phosphat (PI3P) binden (Gaulhier und Simonsen, 1998; Patki *et al.*, 1998). Für die FYVE-Domäne von Don1 konnte die spezifische Interaktion mit PI3P nachgewiesen werden und ergänzende Experimente, wie die Co-Lokalisation mit dem endosomalen tSNARE-Protein Yup1 oder die Gendeletion des Motorproteins Kin3, belegen den Transport von Don1 zur Fragmentierungszone mittels Bindung an Endosomen durch die FYVE-Domäne (Schink und Bölker, 2009). Im Zuge der

Untersuchungen konnte zudem festgestellt werden, dass der einzelne, die FYVE-Domäne betreffende Aminosäureaustausch von Arginin (R) zu Alanin (A) an Position 965 der Aminosäuresequenz von Don1 sowie eine verkürzte Aminosäuresequenz ohne FYVE-Domäne zu einer ausbleibenden Lokalisation in der Fragmentierungszone führt (Schink und Bölker, 2009).

Im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte fluoreszenzmikroskopische Analysen eines Stamms mit verkürzter Aminosäuresequenz von Don1 ohne FYVE-Domäne und Cts1 mit C-terminal fusioniertem Gfp (AB33don1^{FYVEΔ}/cts1G) belegten, vergleichbar mit der Deletion von *don1* (Abb. 2.11), erwartungsgemäß einen Zellteilungsdefekt und keinen Einfluss auf die Lokalisation von Cts1G (Daten nicht gezeigt).

Um die Relevanz der FYVE-Domäne in Don1 auf den Export des Fusionsproteins Gus-Don1 zu untersuchen, wurden jeweils in AB33-Stämmen die Gensequenzen für ein Fusionsprotein aus N-terminalem Gus und Don1 mit Punktmutation an Position 965 (Gus-Don1^{R965A}) bzw. verkürzter Aminosäuresequenz (Gus-Don1^{FYVEΔ}) unter Kontrolle des synthetischen und konstitutiven Promotors *P_{oma}* am *ip*-Lokus überexprimiert (AB33gus-don1^{R965A} bzw. AB33gus-don1^{FYVEΔ}). Die Genexpression der Fusionsproteine Gus-Don1^{R965A} und Gus-Don1^{FYVEΔ} erfolgte zusätzlich in AB33-Stämmen mit Deletion von *don1* (Abb. 2.16 A, AB33don1Δ/gus-don1^{R965A} und AB33don1Δ/gus-don1^{FYVEΔ}).

In letzteren Stämmen konnte die funktionelle Komplementation des *don1*-Phänotyps durch ektopische Überexpression (Abschnitt 2.4.1) lediglich für einen Stamm festgestellt werden: Die fluoreszenzmikroskopische Analyse veranschaulicht für den Stamm AB33don1Δ/gus-don1^{R965A} die Aufhebung des Zellteilungsdefekts sowie die Bildung des sekundären Septums, was auf die Funktionalität von Don1^{R965A} im Fusionsprotein verweist (Abb. 2.16 B). Für den Stamm AB33don1Δ/gus-don1^{FYVEΔ} blieb dagegen ein Zellteilungsdefekt sichtbar. Die dargestellte sekundäre Septenbildung konnte in geringer Anzahl auch in weiteren Zellaggregaten beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Die Färbung mit FM4-64 belegt, dass die Septenbildung mit einer Invagination der Plasmamembran korreliert. Die unterschiedlichen Phänotypen der beiden Komplementationsstämme konnten durch die Untersuchung der Koloniemorphologie auf YEPS_{light}-Festmedium und der Quantifizierung der Zellaggregate bestätigt werden. Der Zellteilungsdefekt des Stamms AB33don1Δ/gus-don1^{FYVEΔ} führte zu Kolonien mit dem typischen Donut-Phänotyp, während für den Stamm AB33don1Δ/gus-don1^{R965A} eine eher wildtypische Koloniemorphologie ermittelt wurde (Abb. 2.16 C). Mittels der Quantifizierung der Zellaggregate wurde in Kulturen des Stamms AB33don1Δ/gus-don1^{R965A} ein hoher Anteil an Einzelzellen bzw. teilenden Zellen festgestellt. Hingegen waren in Kulturen des Stamms AB33don1Δ/gus-don1^{FYVEΔ} anteilig mehr Zellaggregate vorzufinden (Abb. 2.16 D).

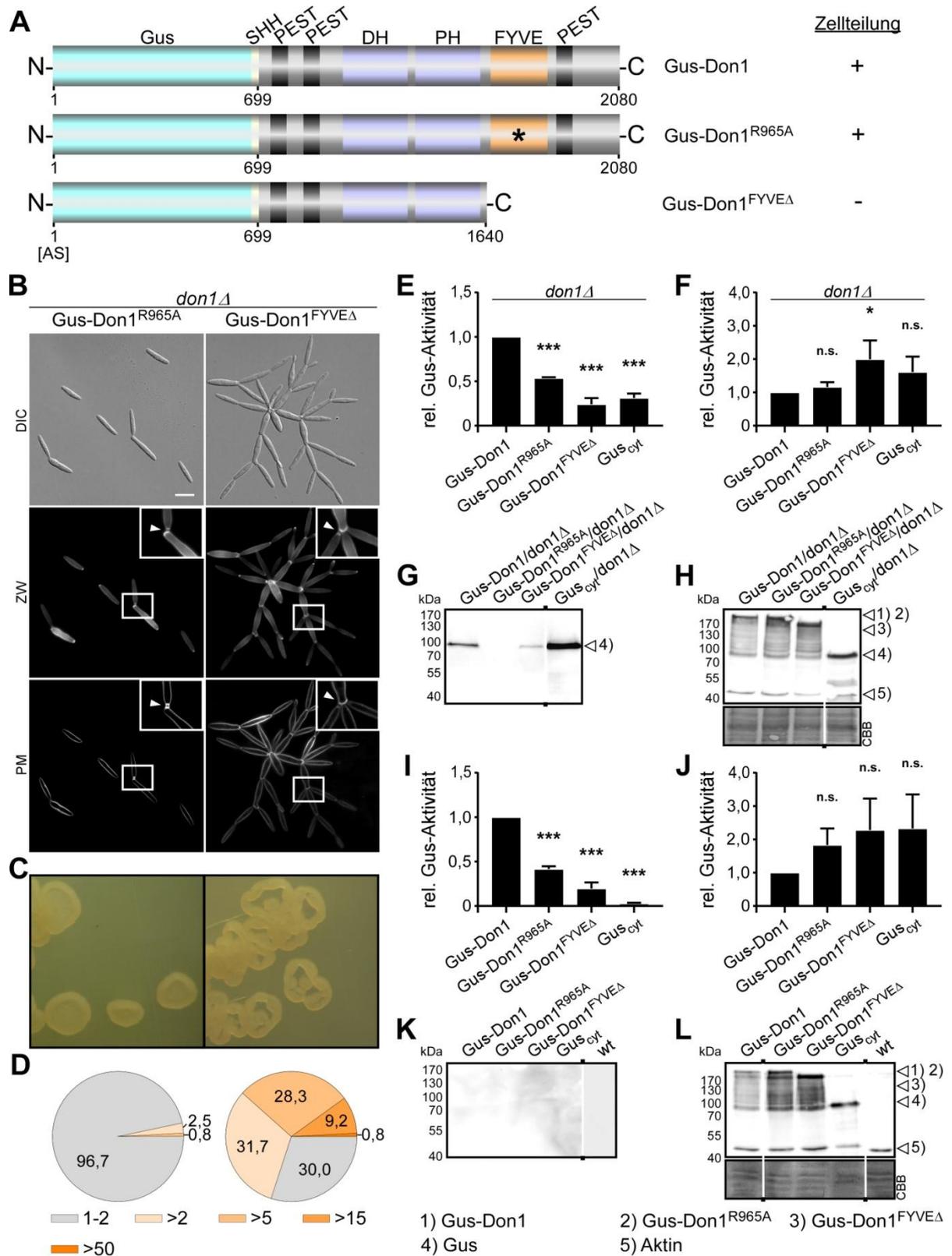


Abb. 2.16: Der Export von Gus-Don1 ist bei nicht-funktionaler FYVE-Domäne von Don1 reduziert. Analyse des Exports von Gus-Don1^{R965A} und Gus-Don1^{FYVEΔ} im *don1*-Deletionshintergrund während des hefeartigen Wachstums. **(A)** Schematische Darstellung der Fusionsproteine Gus-Don1, Gus-Don1^{R965A} und Gus-Don1^{FYVEΔ}. Don1 enthält insgesamt 3 PEST-Sequenzen, eine katalytische DBL Homologie (DH)-Domäne, eine Lipidbindende Pleckstrin Homologie (PH)-Domäne und eine FYVE-Domäne für die Interaktion mit endosomalen PI3P.

Abb. 2.16 (fortgesetzt) Der Stern markiert den für den Aktivitätsverlust der FYVE Domäne vorgenommenen Aminosäureaustausch. SHH entspricht Streptavidin (S)-, HA (H)- und His (H)-Erkennungssequenzen für die Detektion in Western Blot-Analysen. AS, Aminosäuren. **(B)** Fluoreszenzmikroskopische Analyse repräsentativer Zellen von AB33don1Δ/gus-don1^{R965A} und AB33don1Δ/gus-don1^{FYVEΔ}. DIC, differential interference contrast. Zellwände (ZW) und Plasmamembranen (PM) wurden mittels der Farbstoffe Calcofluor-White und FM4-64 visualisiert. Ausschnitte vergrößern Teile des Zellaggregats bzw. die Fragmentierungszone. Weiße Pfeilspitzen markieren sekundäre Septen und die Invagination der Plasmamembran. Größenmaßstab: 10 μm. **(C)** Kolonimorphologie von AB33don1Δ/gus-don1^{R965A} und AB33don1Δ/gus-don1^{FYVEΔ} auf YEPS_{light}-Festmedium. Kolonien wurden vereinzelt und nach Inkubation für 2 bis 3 Tage bei 28 °C abgebildet. **(D)** Bestimmung der Anzahl unterschiedlicher Zellaggregate in Kulturen von AB33don1Δ/gus-don1^{R965A} und AB33don1Δ/gus-don1^{FYVEΔ}. Kategorien: 1 bis 2 Zellen (normale Zellteilung), 3 bis 5 Zellen, 6 bis 15 Zellen, 16 bis 50 Zellen und >50 Zellen pro Zellaggregat. Experiment erfolgte in 3 biologischen Replikaten mit insgesamt 120 analysierten Zellaggregaten. Angaben in % gesamt analysierter Zellaggregate. **(E-F)** Relative Gus-Aktivitäten in den zellfreien Kulturüberständen (E) und Gesamtzellextrakten (F) von AB33don1Δ/gus-don1^{R965A} und AB33don1Δ/gus-don1^{FYVEΔ}. Als Referenz für den Export von Gus-Don1 bei Deletion von *don1* wurde AB33don1Δ/gus-don1 verwendet. Als Lysekontrolle diente AB33don1Δ/gus_{cyt}. Bestimmung erfolgte anhand der Umwandlung des Substrats MUG. Fehlerbalken: Standardabweichung von je 3 biologischen Replikaten. n.s., nicht signifikant, p-Wert > 0,05; *, p-Wert 0,01 bis 0,05; ***, p-Wert < 0,001 (1-way ANOVA, Kontrolle: don1Δ/Gus-Don1). **(G-H)** Western Blots der zellfreien Kulturüberstände (G) und Gesamtzellextrakte (H) von AB33don1Δ/gus-don1, AB33don1Δ/gus-don1^{R965A} AB33don1Δ/gus-don1^{FYVEΔ} und AB33don1Δ/gus_{cyt}. Pro Ansatz wurden gefällte Proteine einer Kultur (50 ml) mit einer OD₆₀₀ von 1,0 bzw. 10 μg Gesamtzellextrakt aufgetragen. Detektion erfolgte mittels der Antikörper αHA und αAktin. Pfeilspitzen markieren Signale der detektierten Proteine. Laufspuren von jeweils einem einzigen Western Blot, der für eine bessere Übersicht neu angeordnet wurde. CBB, Coomassie Brilliant Blue gefärbte Membran (Ladekontrolle). **(I-J)** Relative Gus-Aktivitäten in den zellfreien Kulturüberständen (I) und Gesamtzellextrakten (J) von AB33gus-don1^{R965A} und AB33gus-don1^{FYVEΔ}. Als Referenz für den Export von Gus-Don1 wurde AB33gus-don1 verwendet. Als Lysekontrolle diente AB33gus_{cyt}. Bestimmung erfolgte anhand der Umwandlung des Substrats MUG. Fehlerbalken: Standardabweichung von je 3 biologischen Replikaten. n.s., nicht signifikant, p-Wert > 0,05; ***, p-Wert < 0,001 (1-way ANOVA, Kontrolle: Gus-Don1). **(K-L)** Western Blots der zellfreien Kulturüberstände (G) und Gesamtzellextrakte (H) von AB33gus-don1, AB33gus-don1^{R965A} AB33gus-don1^{FYVEΔ} und AB33gus_{cyt}. Als Negativkontrolle diente der Stamm AB33 (wt). Pro Ansatz wurden gefällte Proteine einer Kultur (50 ml) mit einer OD₆₀₀ von 1,0 bzw. 10 μg Gesamtzellextrakt aufgetragen. Detektion erfolgte mittels der Antikörper αHA und αAktin. Pfeilspitzen markieren Signale der detektierten Proteine. CBB, Laufspuren von jeweils einem einzigen Western Blot, der für eine bessere Übersicht neu angeordnet wurde. CBB, Coomassie Brilliant Blue gefärbte Membran (Ladekontrolle).

In Übereinstimmung mit den Ergebnissen waren in Schink und Bölker (2009) trotz Verwendung eines anderen Stamms und Promotors durch Überexpression der Gensequenz des modifizierten Proteins Don1^{R965A} in *don1*-Mutanten bis zu 90 % Einzelzellen vorzufinden. Für die Überexpression der Gensequenz von Don1^{FYVEΔ} wurde der Zellteilungsdefekt teilweise aufgehoben. Dies verdeutlicht einerseits, dass die Funktion der beiden Proteine in Bezug auf sekundäre Septenbildung und der damit verbundenen Zellteilung trotz veränderter Aminosäuresequenz nicht gestört ist. Andererseits wirkt die Überexpression zumindest teilweise komplementierend zum inhibierten endosomalen Transport und der fehlenden, sichtbaren Lokalisation in der Fragmentierungszone, die in der Intensität offenbar nicht zwingend benötigt wird (Schink und Bölker, 2009).

Für die anschließende Analyse des Exports der Fusionsproteine Gus-Don1^{R965A} bzw. Gus-Don1^{FYVEΔ} dienten die Stämme AB33gus-don1 bzw. AB33don1Δ/gus-don1 als Positivkontrolle sowie die Stämme AB33gus_{cyt} bzw. AB33don1Δ/gus_{cyt} als Lysekontrolle. Die Bestimmung der relativen, extrazellulären Gus-Aktivität ergab für die Stämme AB33don1Δ/gus-don1^{R965A} (53,5 %) bzw. AB33don1Δ/gus-don1^{FYVEΔ} (24,0 %) eine

signifikante Reduktion der Messwerte im Vergleich zur Positivkontrolle AB33don1Δ/gus-don1, die für den Stamm AB33don1Δ/gus-don1^{FYVEΔ} stärker ausfiel (Abb. 2.16 E). Möglicherweise dürfte die reale Verminderung der Messwerte für den Stamm AB33don1Δ/gus-don1^{FYVEΔ} noch deutlicher ausfallen, da gemäß der Bestimmung der Trockenzellmasse (Abb. 2.12 F) in *don*-Mutanten mit Zellteilungsdefekt die extrazelluläre Aktivität tendenziell überschätzt wird.

Entgegen dem vorherigen enzymatischen Aktivitätstest zur unkonventionellen Sekretion von Gus-Don1 (Abb. 2.15 A) war in diesem Experiment ein signifikanter Unterschied zwischen den Werten des Stamms AB33don1Δ/gus-don1 (Positivkontrolle) und der zugehörigen Lysekontrolle festzustellen. In Stämmen mit Deletion von *don1* scheint der Export des Fusionsproteins mit Gus und Don1^{R965A} bzw. Don1^{FYVEΔ} dagegen eingeschränkt. Zumindest für den Stamm AB33don1Δ/gus-don1^{FYVEΔ} (199,2 %) belegten die Messungen der relativen, intrazellulären Gus-Aktivität zudem die Akkumulation des Fusionsproteins, vermutlich auf Grund des reduzierten Exports (Abb. 2.16 F).

Der Western Blot der Gesamtzellextrakte zeigt, dass die Proteinsynthese der Volllängenproteine in den erwarteten Größen für Gus-Don1 (225,5 kDa), Gus- Don1^{R965A} (225,5 kDa), Gus- Don1^{FYVEΔ} (183,4 kDa) und Gus_{cyt} (78,6 kDa) stattfindet, begleitet jedoch von Degradierungssignalen, die mutmaßlich auf die multiplen PEST-Sequenzen zurückzuführen sind (Abb. 2.16 H, Schink und Bölker 2009). Als Ladekontrolle bzw. Nachweis für die Verwendung von identischen Mengen Gesamtzellextrakts wurde Aktin (42 kDa) detektiert. Im Western Blot der zellfreien Kulturüberstände konnte kein Volllängenprotein der Fusionsproteine detektiert werden (Abb. 2.16 G). Die sichtbaren Banden in unterschiedlicher Intensität scheinen, wie zuvor diskutiert, auf inaktives Protein zu verweisen und unterstützen die Annahme eines MAPS-Mechanismus.

Die Bestimmung der relativen Gus-Aktivitäten und Analysen der Proteinsynthese in den Stämmen ohne Deletion von *don1* bestätigen die beschriebenen Resultate: In der Messung der relativen, extrazellulären Gus-Aktivität war für die Stämme AB33gus-don1^{R965A} (41,6 %) bzw AB33gus-don1^{FYVEΔ} (19,6 %) eine signifikante Reduktion der Messwerte zu beobachten (Abb. 2.16 I), während intrazellulär die Gus-Aktivitäten erhöht waren (Abb. 2.16 J). Die korrespondierenden Western Blots zeigten für die Gesamtzellextrakte die Proteinsynthese der Volllängenproteine mit den zu erwartenden Degradierungsbanden (Abb. 2.16 L) und für die zellfreien Kulturüberstände keine Bandensignale, die auf die Fusionsproteine hinweisen (Abb. 2.16 K). Ergänzend wurde als Kontrolle der Vorgängerstamm AB33-Stamm (*wt*) mitgeführt.

Die Ergebnisse deuten an, dass bei einer nicht-funktionalen FYVE-Domäne von Don1 der Export der Fusionsproteine mit Gus und Don1^{R965A} bzw. Don1^{FYVEΔ} eingeschränkt ist. Dies kann mutmaßlich durch den gestörten, endosomalen Transport zur Fragmentierungszone

erklärt werden, dessen Auswirkung bei Abwesenheit der gesamten FYVE-Domäne stärker zu sein scheint.

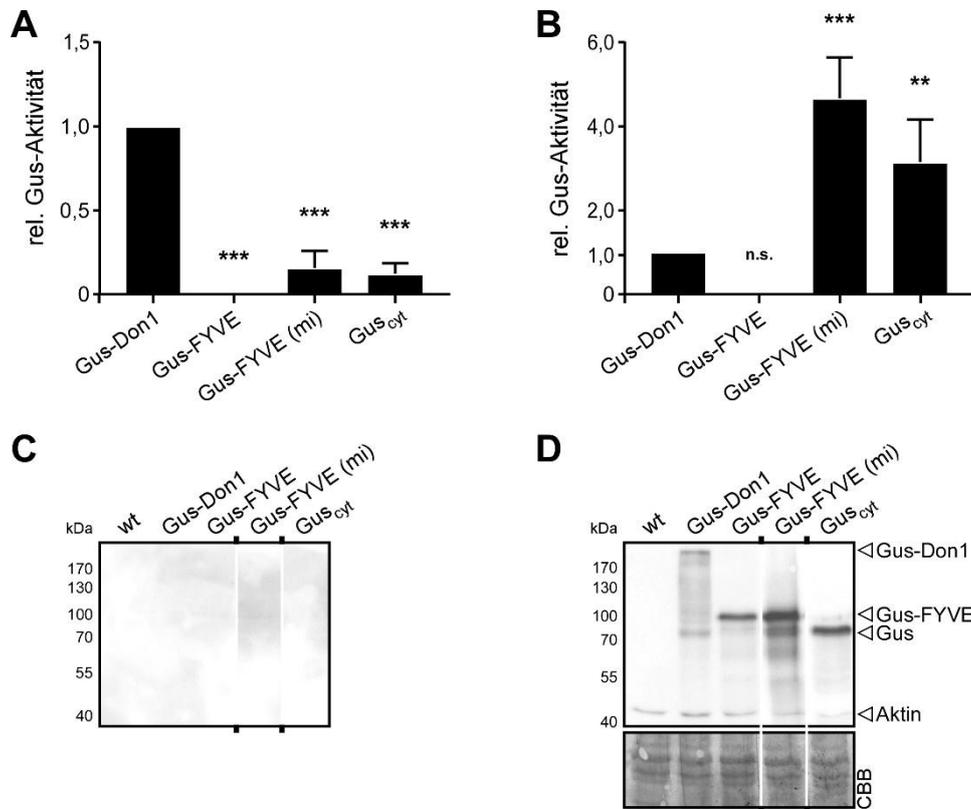


Abb. 2.17: Die C-terminale Fusion der FYVE-Domäne steigert den Export von Gus nicht. Analyse des Exports von Gus-FYVE und Gus-FYVE (mi). **(A-B)** Relative Gus-Aktivitäten in den zellfreien Kulturüberständen (A) und Gesamtzellextrakten (B) von von AB33gus-FYVE und AB33gus-FYVE (mi). Als Referenz für den Export von Gus-Don1 wurde AB33gus-don1 verwendet. Als Lysekontrolle diente AB33gus_{cyt}. Bestimmung erfolgte anhand der Umwandlung des Substrats MUG. Fehlerbalken: Standardabweichung von 3 (A) und 4 (B) biologischen Replikaten. n.s., nicht signifikant, p-Wert > 0,05; **, p-Wert < 0,001 bis 0,01; ***, p-Wert < 0,001 (1-way ANOVA, Kontrolle: Gus-Don1). **(C-D)** Western Blots der zellfreien Kulturüberstände (C) und Gesamtzellextrakte (D) von AB33gus-don1, AB33gus-FYVE, AB33gus-FYVE (mi) und AB33gus_{cyt}. Als Negativkontrolle diente der Stamm AB33 (wt). Pro Ansatz wurden gefällte Proteine einer Kultur (50 ml) mit einer OD₆₀₀ von 1,0 bzw. 10 µg Gesamtzellextrakt aufgetragen. Detektion erfolgte mittels der Antikörper αHA und αAktin. Pfeilspitzen markieren Signale der detektierten Proteine. Laufspuren von jeweils einem einzigen Western Blot, der für eine bessere Übersicht neu angeordnet wurde. CBB, Coomassie Brilliant Blue gefärbte Membran (Ladekontrolle).

Die erzielten Ergebnisse suggerieren die Notwendigkeit einer funktionalen FYVE für den endosomalen Transport zur Fragmentierungszone für die finale Freisetzung in den extrazellulären Raum. Nachfolgend wurde in diesem Zusammenhang untersucht, ob allein die FYVE-Domäne von Don1 für den Export ausreichend ist oder dadurch die Sekretionsleistung gesteigert werden könnte. Als Reporterprotein für unkonventionelle Sekretion diente abermals die β-Glukuronidase Gus. Dazu wurden in einem AB33-Stamm die Gensequenz für ein Fusionsprotein aus N-terminalen Gus und der FYVE-Domäne von Don1 unter Kontrolle des synthetischen und konstitutiven Promotors P_{oma} am *ip*-Lokus überexprimiert (AB33gus-FYVE). Die multiple Insertion der Gensequenz des Fusionsproteins

Gus-FYVE (mi) am *ip*-Lokus ermöglichte die Analyse bei zusätzlich erhöhter Genexpression. Als Positivkontrolle diente der Stamm AB33gus-don1 und als Lysekontrolle der Stamm AB33gus_{cyt}.

In der Messung der relativen, extrazellulären Gus-Aktivität konnte für den Stamm AB33gus-FYVE (0,0 %) mit einfacher Insertion des entsprechenden Konstrukts keine Aktivität und für den Stamm AB33gus-FYVE (mi) (15,7 %) signifikant reduzierte Aktivität auf dem Level der Lysekontrolle detektiert werden (Abb. 2.17 A). Dies deutete darauf hin, dass beide Stämme keine Sekretion aufweisen und die gemessene Aktivität im Stamm AB33gus-FYVE (mi) durch Zellyse zustande kam. Bei der Messung der relativen, intrazellulären Gus-Aktivität zeigte der Stamm AB33gus-FYVE (mi) (466,9 %) signifikant erhöhte Messwerte auf dem Level der Lysiskontrolle, was auf die intrazelluläre Akkumulation schließen ließ (Abb. 2.17 B). Für den Stamm AB33gus-FYVE (0,2 %) konnte erneut keine Aktivität gemessen werden.

Mittels Western Blot-Analyse wurde die Proteinsynthese der Vollängenproteine bei den erwarteten Größen für Gus-Don1 (225,5 kDa), Gus-FYVE (86,2 kDa) und Gus_{cyt} (78,6 kDa) nachgewiesen (Abb. 2.17 D). Ein schwächeres Signal in der Laufspur des Stamms AB33gus-don1 ist vermutlich auf geringere Proteinmengen zurückzuführen, die möglicherweise auf Grund der ausbleibenden, intrazellulären Akkumulation oder des gesteigerten Proteinabbaus durch die Don1-internen PEST-Sequenzen auftreten. Die Detektion von Aktin (42 kDa) diente als Ladekontrolle bzw. Nachweis für die Verwendung von identischen Mengen Gesamtzellextrakts. Der Western Blot des zellfreien Kulturüberstands zeigt wiederum keine Bandensignale (Abb. 2.17 C). Die Verwendung des Vorgängerstammes AB33 (*wt*) ohne detektierbares Fusionsprotein im Western Blot diente als Negativkontrolle.

Die Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass die FYVE-Domäne von Don1 allein nicht ausreichend für den Export aus der Zelle ist. Interessanterweise konnte für die einfache Insertion der Gensequenz von Gus-FYVE weder extrazellulär noch intrazellulär Aktivität gemessen werden. Die Annahme einer fehlenden Genexpression konnte anhand des Western Blots der Gesamtzellextrakte widerlegt werden. Die Möglichkeit der Synthese von nicht-funktionalem Gus durch Fusion mit der FYVE-Domäne scheint, abgesehen von spontanen Mutationen im Stamm, eher unwahrscheinlich, da die multiple Insertion der Gensequenz nachweislich Aktivität zeigt. FYVE-Domänen binden mit hoher Spezifität das Membranlipid PI3P (Gaulhier und Simonsen, 1998; Schink und Bölker, 2009). Die damit postulierte Interaktion an Endosomen könnte zur Internalisierung ins Lumen führen und Gus-FYVE für enzymatische Aktivitätstests somit nicht verfügbar sein. Bei multipler Insertion der Gensequenz von Gus-FYVE würde es, auf Grund erhöhter Expression und Proteinsynthese, zu einer Übersättigung mit Gus-FYVE kommen, weshalb nicht alle Proteine gebunden und internalisiert werden würden. Enzymatische Aktivitätstests, bei denen das Detergenz

TritonX-100 zu den Proben des zellfreien Kulturüberstands gegeben wurde, um endosomale Membranen zu permeabilisieren, führten jedoch zu keiner Steigerung der extrazellulären Aktivität (Daten nicht gezeigt).

Insgesamt scheint eine funktionale FYVE-Domäne von Don1 neben dem intrazellulären Transport zur Fragmentierungszone auch den Export aus der Zelle bei Fusionsproteinen mit Don1 zu begünstigen. Unklar bleibt weiterhin, ob es sich bei Don1 auf Grund der zuvor generierten Ergebnissen (Abschnitt 2.4.2) um unkonventionelle Sekretion oder eher um einen Don1-vermittelten Export handelt. Die hier erzielten Ergebnisse deuten einen schwachen Export von Don1 bzw. Gus-Don1 auf Grund von unkonventioneller Sekretion und abseits von Zellyse an.

2.4.4 Unkonventionelle Sekretion von Cts1 in *don*-Mutanten reduziert

Durch Gus-Fusionsproteine wurden in den vorherigen Experimenten Hinweise auf eine unkonventionelle Sekretion von Don3 und ggf. Don1 erhalten. Der Nachweis der unkonventionellen Sekretion mittels Gus konnte in Hinblick auf Cts1 bereits in vorangegangenen Experimenten gezeigt werden (Stock *et al.*, 2012). Für Cts1 wurde bei endogener Expression des Gens zudem festgestellt, dass die extrazelluläre Aktivität in *don*-Mutanten reduziert und folglich die Sekretion von Cts1 beeinträchtigt war (Abschnitt 2.3.3). Nachfolgend wurde analysiert, ob die beobachtete Beeinträchtigung der Sekretion ebenfalls bei Überexpression der Gensequenz für das Fusionsprotein Gus-Cts1 auftritt. Dazu wurden in einem AB33-Stamm die Gensequenz für Gus-Cts1 unter der Kontrolle des synthetischen und konstitutiven Promotors P_{oma} am *ip*-Lokus überexprimiert und jeweils die Gene *don1* und *don3* deletiert (AB33don1 Δ /gus-cts1 und AB33don3 Δ /gus-cts1). Die Auswirkung der Deletionen konnten einerseits durch die mikroskopische Beobachtung von Zellaggregaten (Abb. 2.18 A) und andererseits mittels der „Donut“-artigen Koloniemorphologie auf YEPS_{light}-Festmedium (Abb. 2.18 B) bemessen werden.

Für die enzymatischen Aktivitätstests wurde der Stamm AB33gus-cts1 als Positivkontrolle verwendet. Lysekontrollen mit cytoplasmatischem Gus (Gus_{cyt}) in den passenden AB33-Stammhintergründen dienten zur Überprüfung, ob extrazelluläre Aktivitäten auf Sekretion oder Zellyse beruhen (AB33gus_{cyt}, AB33don1 Δ /gus_{cyt}, AB33don3 Δ /gus_{cyt}). Die Messung der relativen, extrazellulären Gus-Aktivität zeigte sowohl bei Deletion von *don1*, als auch von *don3* eine signifikante Reduktion im Vergleich zum Stamm AB33gus-cts1 (Abb. 2.18 C). Allerdings war die Gus-Aktivität im Stamm AB33don1 Δ /gus-cts1 lediglich um die Hälfte (56,3 %) vermindert und fiel damit deutlich weniger stark aus, als bei der vorherigen Messung der Cts1-Aktivität im Stamm AB33don1 Δ /cts1G (5,3 %; Abb. 2.12 A). Der relative Wert der gemessenen Gus-Aktivität im Stamm AB33don3 Δ /gus-cts1 (19,3 %) stimmte mit

dem Verhältnis der Cts1-Aktivität im Stamm AB33don3 Δ /cts1G (19,1 %; Abb. 2.12 A) überein.

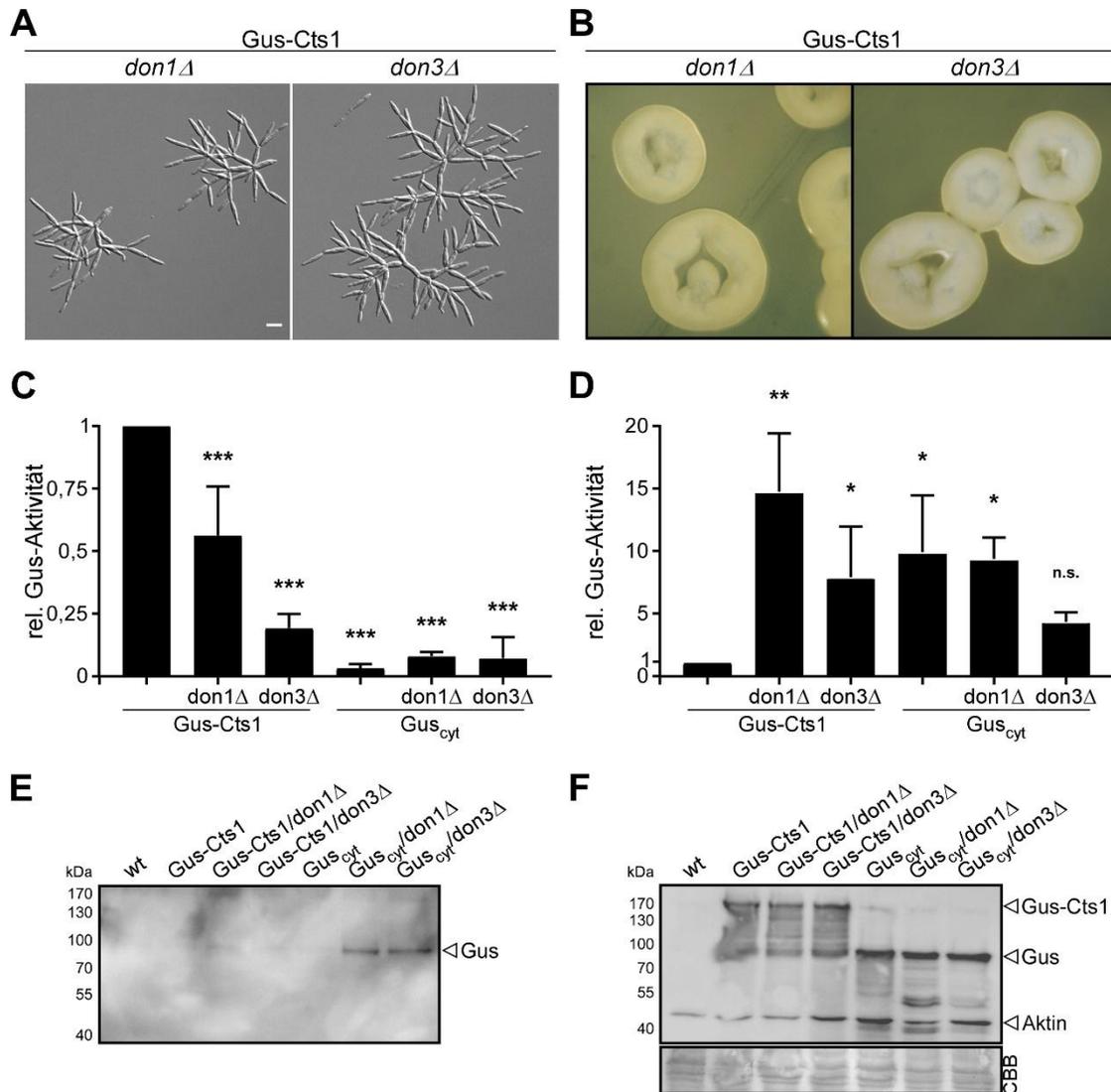


Abb. 2.18: Die unkonventionelle Sekretion von Gus-Cts1 ist in *don*-Mutanten reduziert. Analyse der unkonventionellen Sekretion von Gus-Cts1 in AB33-Stämmen mit Deletionen von *don1* und *don3* während des hefeartigen Wachstums. **(A)** Mikroskopische Analyse des Phänotyps von AB33don1 Δ /gus-cts1 und AB33don3 Δ /gus-cts1. Größenmaßstab: 10 μ m. **(B)** Koloniemorphologie von AB33don1 Δ /gus-cts1 und AB33don3 Δ /gus-cts1 auf YEPS_{light}-Festmedium. Kolonien wurden vereinzelt und nach Inkubation für 2 bis 3 Tage bei 28 °C abgebildet. **(C-D)** Relative Gus-Aktivitäten in den zellfreien Kulturüberständen (C) und Gesamtzellextrakten (D) von AB33don1 Δ /gus-cts1 und AB33don3 Δ /gus-cts1. Als Referenz für die unkonventionelle Sekretion von Gus-Cts1 wurde der Stamm AB33gus-cts1 verwendet. Die Stämme AB33gus_{cyt}, AB33don1 Δ /gus_{cyt} und AB33don3 Δ /gus_{cyt} dienen als Lysekontrollen. Bestimmung erfolgte anhand der Umwandlung des Substrats MUG. Fehlerbalken: Standardabweichung von je 3 biologischen Replikaten. n.s., nicht signifikant, p-Wert > 0,05; *, p-Wert 0,01 bis 0,05; **, p-Wert 0,001 bis 0,001; ***, p-Wert > 0,001 (1-way ANOVA, Kontrolle: Gus-Cts1). **(E-F)** Western Blots der zellfreien Kulturüberstände (E) und Gesamtzellextrakte (F) von AB33gus-cts1, AB33don1 Δ /gus-cts1 und AB33don3 Δ /gus-cts1, AB33gus_{cyt}, AB33don1 Δ /gus_{cyt} und AB33don3 Δ /gus_{cyt}. Als Negativkontrolle diente der Stamm AB33 (wt). Pro Ansatz wurden gefällte Proteine einer Kultur (50 ml) mit einer OD₆₀₀ von 1,0 bzw. 10 μ g Gesamtzellextrakt aufgetragen. Detektion erfolgte mittels der Antikörper α HA und α Aktin. Pfeilspitzen markieren Signale der detektierten Proteine. CBB, Coomassie Brilliant Blue gefärbte Membran (Ladekontrolle).

Parallel durchgeführte Messungen der extrazellulären Cts1-Aktivität belegen für die Stämme AB33don1 Δ /gus-cts1 (28,2 %) und AB33don3 Δ /gus-cts1 (31,4 %) ebenfalls reduzierte Werte (Daten nicht gezeigt).

Zu beachten ist, dass in Stämmen mit Zellteilungsdefekt durch die Deletionen von *don1* und *don3* gemäß der Bestimmung der Trockenzellmasse (Abb. 2.12 F) die extrazelluläre Aktivität bzw. Sekretion tendenziell überschätzt wird und tatsächlich niedriger zu sein scheint. Die signifikant niedrigen Werte der Lysekontrollen belegen, dass die gemessenen extrazellulären Gus-Aktivitäten auf Sekretion und nicht Zelllyse zurückzuführen waren. Im Einklang mit diesen Ergebnissen konnte mittels der Messung der relativen, intrazellulären Gus-Aktivität für die Stämme AB33don1 Δ /gus-cts1 (1349,6 %) bzw. AB33don3 Δ /gus-cts1 (725,1 %), sowie für die Lysekontrollen deutlich erhöhte Gus-Aktivitäten detektiert werden, die auf Akkumulation von überexprimierten Genprodukten in der Zelle auf Grund von reduzierter oder ausgesetzter Sekretion hindeuten (Abb. 2.18 D).

Der entsprechende Western Blot der Gesamtzellextrakte verweist auf eine vergleichbare Proteinsynthese von Gus-Cts1 und zeigt außerdem die bereits zuvor detektierten und charakteristischen Degradierungsbanden (Abb. 2.18 F). Der Vorgängerstamm AB33 (*wt*) wurde als Negativkontrolle mitgeführt. Mittels der Western Blot-Analyse der zellfreien Kulturüberstände konnte, wie in Experimenten zuvor, kein Vollängenprotein von Gus-Cts1 detektiert werden (Abb. 2.18 E). Jedoch deuten Bandensignale in den Lysekontrollen, für die kaum extrazelluläre Aktivität gemessen wurde, wiederholt auf den Export von inaktiven Gus_{cyt} hin, möglicherweise durch einen MAPS-ähnlichen Mechanismus.

Die Summe der Ergebnisse bestätigte, neben dem Nachweis des Zellteilungsdefekts, die Beeinträchtigung der unkonventionellen Sekretion von Cts1 in *don*-Mutanten von *U. maydis*. Konsistent zum Export von Cts1G, führt die Deletion des Gens *don3* zu einer deutlich reduzierten Sekretion von Gus-Cts1. Im Gegensatz dazu ist die Sekretion des Fusionsproteins bei Deletion von *don1* stärker ausgeprägt.

2.4.5 Induzierte Genexpression von Don3 führt zur unkonventionellen Sekretion in *don3*-Mutanten

Anhand des zuvor durchgeführten Experiments war festzustellen, dass die Sekretion des Fusionsproteins Gus-Cts1 in *don*-Mutanten während des hefeartigen Wachstums in *U. maydis* reduziert ist. Dabei führt die Deletion von *don3* zu einer ausgeprägten Inhibierung. Um eine direkte Abhängigkeit der Sekretion von Cts1 vom Genprodukt Don3 herauszuarbeiten, wurde nachfolgend mittels induzierter Genexpression untersucht, ob die beeinträchtigte Sekretion gezielt wieder hergestellt werden kann.

In Böhmer *et al.* (2008) konnte diesbezüglich bereits gezeigt werden, dass durch Induktion der Genexpression von funktionalem Don3 in Mutanten mit Deletion des Gens *don3* der Zellteilungsdefekt aufgehoben wird. Zur Induktion der Genexpression und Proteinsynthese von Don3 wurde der konstitutiv exprimierende Promotor P_{crg} (Bottin *et al.*, 1996) verwendet. Expressionsstudien des entsprechenden Gens *crg1*, welches vermutlich für ein sekretorisches Protein kodiert, verweisen bezüglich der Promotoraktivität von P_{crg} auf die starke Induktion bei Verfügbarkeit des Zuckers L-Arabinose und die effizient reprimierende Wirkung von D-Glukose und D-Xylose (Bottin *et al.*, 1996). Der Promotor P_{crg} ermöglichte somit den Einsatz eines effizient kontrollierbaren Genexpressions-Systems zur Untersuchung, ob die reduzierte unkonventionelle Sekretion bei Deletion von *don3* „gerettet“ werden kann. Die Experimente dazu erfolgten in enger Zusammenarbeit mit K. Hußnätter (Institut für Mikrobiologie, HHU Düsseldorf) und beinhalteten als Arbeit seinerseits die Stammherstellung, Analyse der induzierten Genexpression sowie Durchführung und Auswertung der enzymatischen Aktivitätstests (Abb. 2.19 C-D). Eigene Leistungen zu diesen Experimenten umfasste die fluoreszenzmikroskopische Analyse (Abb. 2.19 B).

Für den Nachweis der unkonventionellen Sekretion wurden in AB33-Stämmen mit Deletion von *don3* die Gensequenz für das Fusionsprotein aus N-terminalen Gus und Cts1 unter der Kontrolle des synthetischen und konstitutiven Promotors P_{oma} am *ip*-Lokus überexprimiert.

Zusätzlich wurde am Locus einer Protease (*upp1*) das Gen für Don3 oder die Gensequenz für ein Fusionsprotein aus Don3 und C-terminalen Gfp (Don3G) unter Kontrolle des konstitutiven und regulierbaren Promotors P_{crg} exprimiert (Abb. 2.19 A, AB33don3Δ/ P_{crg} don3/gus-cts1 und AB33don3Δ/ P_{crg} don3G/gus-cts1). Das Fusionsprotein Don3G ermöglichte die Lokalisation des Proteins mittels Fluoreszenzmikroskopie.

Zudem wurde in einem AB33-Stamm das Gen für Gfp unter Kontrolle des P_{crg} -Promotors am *upp1*-Lokus exprimiert, um die induzierte Expression zu analysieren. Als Vergleich diente ein AB33-Stamm mit *gfp* unter Kontrolle des konstitutiv überexprimierenden P_{otef} -Promotors am *ip*-Lokus. Um einen vergleichbaren Genotyp zu erhalten, wurde in beiden o.g. Stämmen zusätzlich *don3* deletiert und die Gensequenz von Gus-Cts1 unter der Kontrolle des synthetischen und konstitutiven Promotors P_{oma} am *ip*-Lokus eingebracht. In Flüssigmedium mit Arabinose als Kohlenstoffquelle konnte im Stamm mit *gfp* unter Kontrolle des P_{crg} -Promotors (AB33don3Δ/ P_{crg} gfp/gus-cts1) die Genexpression von Gfp fluoreszenzmikroskopisch nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Der Stamm mit konstitutiver Überexpression des Gens von Gfp (AB33don3Δ/ P_{otef} gfp/gus-cts1) zeigte ein vergleichbar intensives Fluoreszenzsignal (Daten nicht gezeigt). Mit dem Resultat wurde bestätigt, dass die Genexpression unter Kontrolle des P_{crg} -Promotors durch Arabinose induziert wird und das Expressionslevel annähernd vergleichbar mit der Überexpression mittels des P_{otef} -Promotors ist.

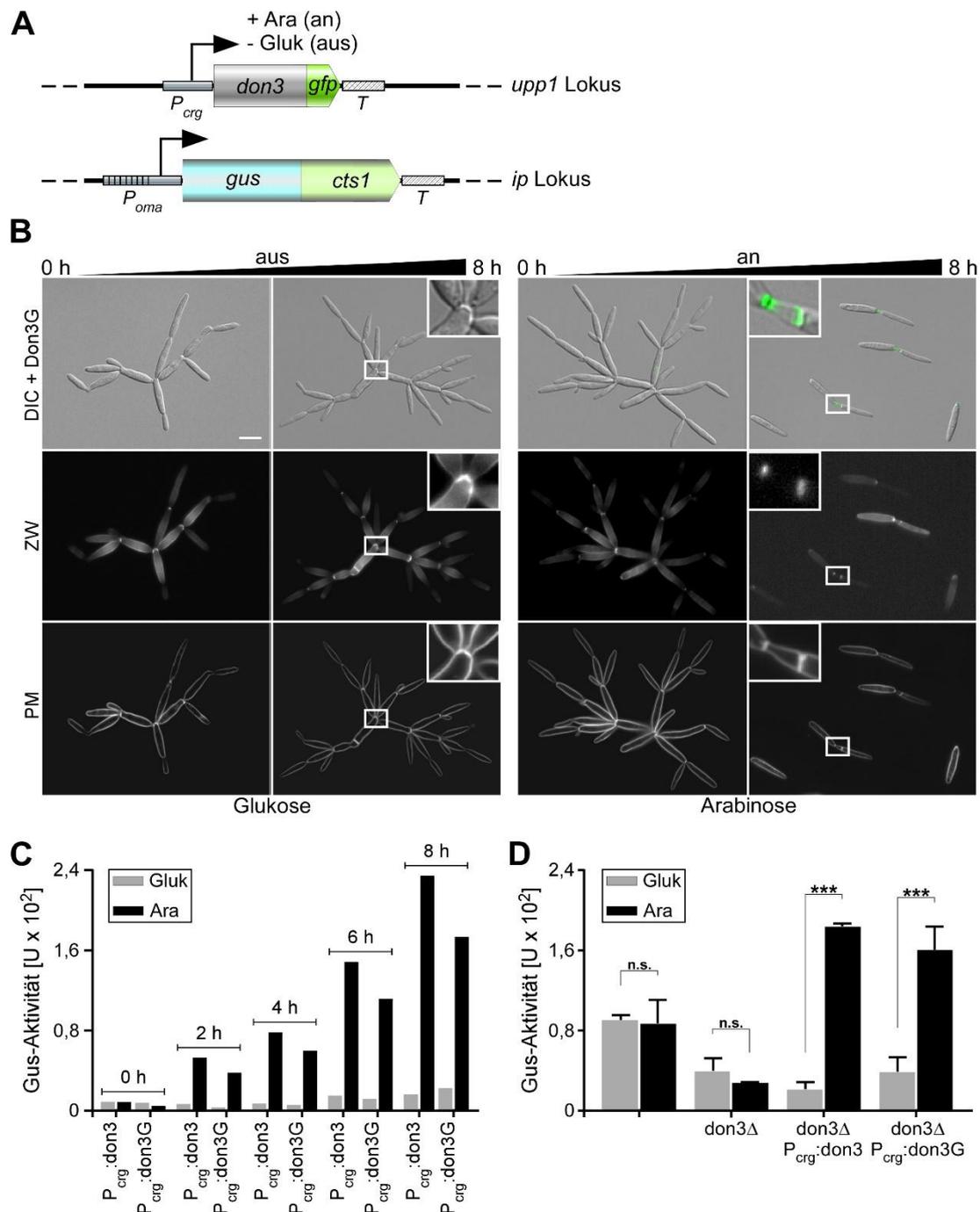


Abb. 2.19: Die induzierte Genexpression von *don3* komplementiert die unkonventionelle Sekretion von Gus-Cts1 in *don3Δ*. Analyse der regulierten Genexpression von *don3* und *don3G* während des hefeartigen Wachstums. **(A)** Schematische Darstellung des Teststammes AB33don3Δ/P_{crg}don3G/gus-cts1 mit entsprechenden Modifikationen des *upp1*-Lokus und *ip*-Lokus. Die Gensequenz von Don3G wird unter Kontrolle des konstitutiven und regulierbaren Promotors *P_{crg}* am *upp1*-Lokus exprimiert. Für den Nachweis der unkonventionellen Sekretion enthält der *ip*-Lokus die Gensequenz von Gus-Cts1 unter Kontrolle des konstitutiven und synthetischen Promotors *P_{oma}*. Die Transkription wird jeweils durch eine Terminationssequenz (*T*) beendet. **(B)** Fluoreszenzmikroskopische Analyse repräsentativer Zellen von AB33don3Δ/P_{crg}don3G/gus-cts1 in Flüssigmedium mit Glukose oder Arabinose zum Zeitpunkt 0 h und 8 h nach Inkubation. DIC, differential interference contrast mit überlagertem Fluoreszenzsignal von Don3G (grün). Zellwände (ZW) und Plasmamembranen (PM) wurden mittels der Farbstoffe Calcofluor-White und FM4-64 visualisiert. Ausschnitte vergrößern Teile des Zellaggregats bzw. die Fragmentierungszone. Größenmaßstab: 10 μm. **(C)** Absolute Gus-Aktivität in zellfreien Kulturüberständen von AB33don3Δ/P_{crg}don3/gus-cts1 und AB33don3Δ/P_{crg}don3G/gus-cts1 in Flüssigmedium mit Glukose oder Arabinose über den zeitlichen Verlauf von 0 bis 8 h. Bestimmung erfolgte anhand der Umwandlung des Substrats MUG. Ergebnisse nach einmaliger Durchführung.

Abb. 2.19 (fortgesetzt) (D) Absolute Gus-Aktivität in zellfreien Kulturüberständen von AB33don3Δ/P_{crG}don3/gus-cts1 und AB33don3Δ/P_{crG}don3G/gus-cts1 in Flüssigmedium mit Glukose oder Arabinose. Als Referenz für die unkonventionelle Sekretion von Gus-Cts1 wurde der Stamm AB33gus-cts1 verwendet. Der Stamm AB33don3Δ/gus-cts1 diente als Kontrolle für reduzierte unkonventionelle Sekretion. Bestimmung erfolgte anhand der Umwandlung des Substrats MUG. Fehlerbalken: Standardabweichung von 3 biologischen Replikaten. n.s., nicht signifikant, p-Wert > 0,05; ***, p-Wert < 0,001 (1-way ANOVA). Stammherstellung sowie experimentelle Durchführung und Auswertung der enzymatischen Aktivitätstests (C und D) durch K. Hußnätter.

Anschließend wurde die unkonventionelle Sekretion anhand der extrazellulären Gus-Aktivität in den Stämmen AB33don3Δ/P_{crG}don3/gus-cts1 und AB33don3Δ/P_{crG}don3G/gus-cts1 analysiert. In einem ersten Ansatz wurde der zeitliche Verlauf der extrazellulären Gus-Aktivität in Flüssigmedium mit Glukose oder Arabinose als Kohlenstoffquelle gemessen. Parallel dazu wurde der Stamm AB33don3Δ/P_{crG}don3G/gus-cts1 fluoreszenzmikroskopisch analysiert. Die Verwendung der Farbstoffe CW und FM4-64 ermöglichten die Visualisierung von Zellwänden und Plasmamembranen. Zum Zeitpunkt 0 h ist sowohl im Flüssigmedium mit Glukose, als auch im Flüssigmedium mit Arabinose der durch Deletion von *don3* verursachte Zellteilungsdefekt mit den typischen Zellaggregaten zu beobachten (Abb. 2.19 B). Ein deutliches Fluoreszenzsignal, welches auf die Lokalisation von Don3G hinweist, konnte nicht detektiert werden. Nach 8 h Inkubation der Zellen in Flüssigmedium zeigte sich ein deutlicher Unterschied: In Flüssigmedium mit Glukose waren weiterhin der Zellteilungsdefekt und mangelnde Lokalisation von Don3G sichtbar. Fehlende sekundäre Septen zwischen den Zellen im Zellaggregat verdeutlichten zusätzlich die Auswirkung der Deletion von *don3*. Hingegen waren in Flüssigmedium mit Arabinose vorwiegend Einzelzellen bzw. sich teilende Zellen zu sehen. Die Detektion eines Fluoreszenzsignals in räumlicher Nähe der Fragmentierungszone der Sporidien verwies auf die Genexpression von Don3G. Des Weiteren konnten primäres und sekundäres Septum in der Fragmentierungszone visualisiert werden. Anhand der visualisierten Plasmamembranen wurde eine Korrelation zwischen Membraninvagination und primärer bzw. sekundärer Septenbildung deutlich. Die Auflösung der Zellaggregate, die Lokalisation des Fluoreszenzsignals und die Anwesenheit des sekundären Septums entsprachen der Erwartungen bei Genexpression von Don3. Zudem konnte für den mikroskopierten Stamm mittels Western Blot-Analyse des Gesamtzellextrakts die Proteinsynthese von Don3G bei Verfügbarkeit von Arabinose bestätigt werden (persönliche Mitteilung von K. Hußnätter). Somit wurde die Genexpression von Don3G durch Arabinose gezielt „an-“ oder durch Glukose gezielt „aus-“ geschaltet.

Im Konsens mit der mikroskopischen Analyse steht die Messung der extrazellulären Gus-Aktivitäten der Stämme AB33don3Δ/P_{crG}don3/gus-cts1 und AB33don3Δ/P_{crG}don3G/gus-cts1 über den zeitlichen Verlauf: Im Flüssigmedium mit Arabinose konnte in den Proben des zellfreien Kulturüberstands für die Kulturen beider Stämme eine sukzessive Steigerung der extrazellulären Gus-Aktivitäten festgestellt werden (Abb. 2.19 C). Im Gegensatz dazu war dieser Anstieg vom Zeitpunkt 0 h bis 8 h im Flüssigmedium mit Glukose nicht wahrnehmbar.

Der Vergleich der extrazellulären Gus-Aktivitäten im Flüssigmedium mit Arabinose zu den jeweiligen Zeitpunkten der Probenentnahme zeigte im Stamm AB33don3 Δ /P_{crG}don3/gus-cts1 tendenziell höhere Messwerte, als im Stamm AB33don3 Δ /P_{crG}don3G/gus-cts1. Dies deutet darauf hin, dass die Komplementation mittels induzierter Genexpression von Don3 etwas effizienter erscheint als mit C-terminaler Fusion von Gfp, was möglicherweise die Funktion von Don3 stereometrisch beeinträchtigt.

In einem weiteren enzymatischen Aktivitätstest wurden die vorangegangenen Ergebnisse bestätigt. Bei der Bestimmung der extrazellulären Gus-Aktivität nach 8-stündiger Inkubation der Stämme in Flüssigmedium mit Arabinose oder Glukose als Kohlenstoffquelle wurde als Referenz für unbeeinträchtigte, unkonventionelle Sekretion der Stamm AB33gus-cts1 verwendet. Als Kontrolle für reduzierte, unkonventionelle Sekretion diente der Stamm AB33don3 Δ /gus-cts1.

Der enzymatische Aktivitätstest belegte für den Stamm AB33gus-cts1 erwartungsgemäß eine nahezu identische, nicht signifikant variierende Gus-Aktivität unabhängig von der Verfügbarkeit von Arabinose (90,5 U) oder Glukose (87,1 U; Abb. 2.19 D). Gleichmaßen war kein signifikanter Unterschied der reduzierten, unkonventionelle Sekretion von Gus-Cts1 im Stamm AB33don3 Δ /gus-cts1 bei Inkubation in Flüssigmedium mit Arabinose (39,8 U) oder Glukose (28,1 U) festzustellen. Dem entgegen standen die signifikant unterschiedlichen extrazellulären Gus-Aktivitäten der Stämme AB33don3 Δ /P_{crG}don3/gus-cts1 und AB33don3 Δ /P_{crG}don3G/gus-cts1 nach Inkubation in Flüssigmedium mit Arabinose oder Glukose: Beide Stämme zeigten bei Verfügbarkeit von Arabinose deutlich erhöhte Messwerte über dem Level vom Stamm AB33gus-cts1. Dabei verwies der Stamm AB33don3 Δ /P_{crG}don3/gus-cts1 (184,0 U) ähnlich wie beim enzymatischen Aktivitätstest über den zeitlichen Verlauf (Abb. 2.19 C) auf eine tendenziell stärkere Freisetzung von Gus-Cts1 als der Stamm AB33don3 Δ /P_{crG}don3G/gus-cts1 (160,8 U). Im Gegensatz dazu wurde in glukosehaltigem Flüssigmedium die Repression der Genexpression von Don3 bzw. Don3G anhand der reduzierten, unkonventionellen Sekretion deutlich: Beide Stämme zeigten in Flüssigmedium mit Glukose (21,5 U und 38,8 U) in Relation zu Arabinose jeweils signifikant reduzierte Gus-Aktivitäten auf dem Level des Kontrollstamms AB33don3 Δ /gus-cts1.

Die vorliegenden Resultate belegen die wiederhergestellte Sekretion von Gus-Cts1 bei Anwesenheit von Don3 und veranschaulichen dadurch, dass die unkonventionelle Sekretion von Cts1 in Abhängigkeit von Don3 steht.

3. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde der Mechanismus der unkonventionellen Sekretion der Chitinase Cts1 in *U. maydis* untersucht. Vorherige Untersuchungen belegten die unkonventionelle Sekretion von Cts1 durch den Export des Proteins trotz fehlendem Signalpeptid und einer vom konventionellen Sekretionsweg abweichenden, fehlenden Passage des ERs (Koepeke *et al.*, 2011; Stock *et al.*, 2012). Des Weiteren konnte für die Chitinase die Lokalisation in der Fragmentierungszone zwischen Mutter- und Tochterzelle ermittelt werden, weshalb der Sekretionsmechanismus mit der Akkumulation in der Fragmentierungszone und der anschließenden Freisetzung von Cts1 durch die Auflösung der Zone während der physischen Zellteilung assoziiert wurde (Langner *et al.*, 2015; Langner und Göhre 2016). Durch Anwendungen der reversen Genetik und mikroskopischer bzw. makroskopischer Beobachtungen, bioinformatischen Auswertungen, sowie enzymatischen Aktivitätstests wurde in dieser Arbeit weitere Aufklärungsarbeit zum unkonventionellen Sekretionsmechanismus von Cts1 geleistet. Wesentliche Erkenntnisse beinhalten die Zellzyklus-abhängige Freisetzung von Cts1, die allerdings unabhängig von der physischen Trennung von Mutter- und Tochterzelle erfolgt. Dabei wird die Sekretion von aktivem Cts1 durch die für die sekundäre Septenbildung essentiellen Proteine Don1 und Don3 beeinflusst, was in einer vorangegangenen Arbeit (Dissertation T. Langner, 2015) erstmalig festgestellt und dieser Arbeit intensiviert untersucht wurde. Für die Kinase Don3 wurden zudem Hinweise auf einen unkonventionellen Sekretionsmechanismus gefunden sowie eine essentielle Funktion der Kinase beim Export der Chitinase nachgewiesen.

3.1 Die Sekretion von Cts1 zeigt keine Analogien zu bekannten Sekretionsmechanismen

In *U. maydis* konnte während des filamentösen und hefeartigen Wachstums die enzymatische Aktivität von Cts1 außerhalb der Zelle belegt werden. Mit der extrazellulären Präsenz trotz fehlenden Signalpeptids und dem Nachweis, dass ein Fusionsprotein aus Gus und Cts1 nicht innerhalb des ERs glykosyliert wird, konnte bereits ein Export über den konventionellen Sekretionsmechanismus ausgeschlossen und die Freisetzung der Chitinase als unkonventionelle Sekretion klassifiziert werden (Koepeke *et al.*, 2011; Stock *et al.*, 2012). Diesbezüglich wurde ferner auf unterschiedliche Mechanismen während der filamentösen und der hefeartigen Morphologie des Pilzes hingedeutet (Dissertation T. Langner, 2015). In der vorliegenden Arbeit wurden dabei vorrangig Sporidien hinsichtlich der Freisetzung von Cts1 analysiert.

Im Gegensatz zur vorgegebenen, intrazellulären Route bei der konventionellen Sekretion zeichnen sich unkonventionelle Sekretionsereignisse durch eine Vielzahl an Variationen aus (Delic *et al.*, 2013; Nickel, 2010). Für den unbekanntem Exportprozess von Cts1 bietet der Vergleich mit bekannten, unkonventionellen Sekretionsmechanismen die Möglichkeit, potentielle Analogien zu ermitteln und somit den der Freisetzung des Enzyms zugrundeliegenden Prozess näher zu charakterisieren bzw. sekretions-relevante Komponenten zu identifizieren. Initial wurden in dieser Arbeit daher potentielle Gemeinsamkeiten mit einem konservierten und in den Hefen *S. cerevisiae* und *P. pastoris* sowie dem Schleimpilz *D. discoideum* gut beschriebenen, unkonventionellen Sekretionsmechanismus untersucht. Bei diesem Prozess der sekretorischen Autophagie entstehen aus sogenannten Kompartimenten der unkonventionellen Proteinsekretion (*engl.*: compartments for unconventional protein secretion; CUPS) durch Biogenese Autophagosomen, die an die Plasmamembran rekrutiert werden und dort internalisierte Proteine freisetzen (Duran *et al.*, 2010; Kinseth *et al.*, 2007; Manjithaya *et al.*, 2010; Ponpuak *et al.*, 2015).

Mittels eines revers-genetischen Ansatzes wurde getestet, ob die Homologe essentieller Gene für die sekretorische Autophagie in *S. cerevisiae* und *P. pastoris* Einfluss auf die unkonventionelle Sekretion von Cts1 in *U. maydis* besitzen. Weder phänotypisch noch in Bezug auf die Freisetzung von aktivem Cts1 sind bei Deletion der homologen Gene von Grh1, Pex3, Atg8 und Spo14 deutliche Auswirkungen festzustellen (Abb. 2.1). Für eine beschriebene Häufung lateraler Knospung in Stämmen bei Deletion von *atg8* in der exponentiellen Wachstumsphase konnten mikroskopisch ebenfalls keine Indizien gefunden werden (Abb. 2.1 D, Nadal und Gold 2010).

Die exakte Funktion von Grh1 während der sekretorischen Autophagie ist unbekannt, jedoch relokalisiert das Protein in *S. cerevisiae* vom Golgi-Apparat an die CUPS, was essentiell für die CUPS-Biogenese und den Sekretionsprozess zu sein scheint (Duran *et al.*, 2010; Malhotra, 2013). Für die extrazelluläre Freisetzung von Cts1 allerdings ist das Homolog von Grh1 und eine damit verbundene potentielle Bildung von CUPS in *U. maydis* nicht von Bedeutung. Ein Sekretionsmechanismus für Cts1 mittels Autophagosomen würde wahrscheinlich ebenfalls die Existenz und Funktionalität des Proteins Atg8 bzw. dessen funktionellen Homolog voraussetzen, da das an Phosphatidylethanolamin gebundene Protein für die Bildung der Autophagosomen benötigt wird und bei der Ausbreitung, Anbindung und Fusion von Autophagosomenmembranen involviert ist (Nakatogawa *et al.*, 2011; Xie *et al.*, 2017). Folglich erscheint der Sekretionsmechanismus von Cts1 auf Grund der Redundanz homologer Gene bzw. deren Proteine nicht im Zusammenhang mit einem Prozess ähnlich der sekretorischen Autophagie in *S. cerevisiae* und *P. pastoris* zu stehen. Die für die Sekretion von Cts1 irrelevante Funktion der homologen Gene von Pex3 und der Phospholipase Spo14 bestätigen in Bezug auf den Prozess der sekretorischen Autophagie

diese Annahme. Generell wird deutlich, dass hinsichtlich Pex3, welches mit weiteren Proteinen einem Multiuntereinheiten-Komplex zum Proteinimport in die peroxisomale Matrix entspricht, die Integrität der Peroxisomen und die durch Spo14 vermittelte Rekrutierung des t-SNARE Proteins Sso1 an die Plasmamembran für die unkonventionelle Sekretion von Cts1 vernachlässigt werden kann (Manjithaya und Subramani 2011; Neiman, 2005; Xie *et al.*, 1998). Die im nachfolgenden Abschnitt 3.2.2 diskutierte Sekretion durch die Plasmamembran scheint alternativ zur Funktion des Spo14 Homologs zu erfolgen.

Eine Voraussetzung der sekretorischen Autophagie in *S. cerevisiae* ist die Induktion des Sekretionsereignisses durch Nährstoffmangel (Duran *et al.*, 2010; Malhotra, 2013; Manjithaya *et al.*, 2010). Elektronenmikroskopische Aufnahmen von *U. maydis*-Zellen unter Kohlenstoffmangel belegen die Bildung von Autophagosomen, und die Quantifizierung spezifischer Transkripte mittels quantitativer, reverser Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR) deuten auf die induzierte Genexpression von *atg8* hin (Nadal und Gold, 2010). Für die in dieser Arbeit durchgeführten Analysen wurde auf einen vergleichbaren Stimulus verzichtet, was wahrscheinlich die Generierung von Autophagosomen verhindert hat und somit ggf. zu einer ausbleibenden, sekretorischen Autophagie geführt haben könnte. Die Beobachtung, dass der Export von Cts1 unabhängig von einem solchen Stimulus abläuft, ist ein weiteres Indiz für einen Autophagosomen-unabhängigen Sekretionsweg. Eine theoretisch verstärkte Cts1-Sekretion durch einen adäquaten Stimulus ist damit zwar nicht ausgeschlossen, stellt aber keine Mindestanforderung für den Sekretionsprozess dar. Auch wenn die sekretorische Autophagie neben *S. cerevisiae* ebenso in weiteren Organismen beschrieben wurde, so ist unklar, ob *U. maydis* generell mittels Autophagosomen Proteine aus der Zelle exportiert.

Neben der Erkenntnis, dass die sekretorische Autophagie bzw. entsprechende Komponenten des Prozesses nicht an der Freisetzung von Cts1 beteiligt zu sein scheinen, konnten durch die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse weitere, nachfolgend diskutierte Schlussfolgerungen getroffen werden, die auf die Unabhängigkeit des Cts1-Exports von diversen Faktoren bekannter, unkonventioneller Sekretionsereignisse hinweisen.

Abseits der sekretorischen Autophagie und der Bindung an den CUPS lokalisiert das Protein Grh1 in *S. cerevisiae* am Golgi-Apparat und ist in Kooperation mit Bug1 an der Anheftung der COPII-Vesikel am Organell beteiligt (Behnia *et al.*, 2007; Levi *et al.*, 2011). Hinsichtlich der Cts1-Sekretion weist die Deletion des homologen Gens in *U. maydis* auf keinen Effekt hin (Abb. 2.1 B-C). Unter der Voraussetzung funktioneller Homologie kann gemutmaßt werden, dass die Grh1-vermittelte Bindung von COPII-Vesikeln für den Export von Cts1 unbedeutend ist. Da COPII-Vesikel aus Membranabschürungen des ERs generiert werden, würde dies den ER-unabhängigen Transport von Cts1 widerspiegeln (Benham, 2012; Delic *et al.*, 2013). In diesem Zusammenhang gilt ein Sekretionsmechanismus mittels COPII-

Vesikeln wie für die Golgi-Apparat-unabhängige Sekretion des Chloridkanals CFTR (*engl.*: cystic fibrosis transmembrane conductance regulator) in die apikale Membran von Epithelzellen gleichermaßen als unwahrscheinlich (Gee *et al.*, 2018; Wang *et al.*, 2004; Yoo *et al.*, 2002). Ob Cts1 neben dem ER als weiteres Organell den Golgi-Apparat umgeht oder alternativ zu COPII-Vesikeln ins Lumen gelangt, bleibt unklar. Ein für den Golgi-Apparat-unabhängigen Transport essentielles Protein wäre ebenfalls Grh1 bzw. in Säugern dessen Homolog „Golgi Reassembly Stacking Protein“ (GRASP), allerdings betrifft dies im Gegensatz zu Cts1 vornehmlich Proteine mit Signalpeptid (Giuliani *et al.*, 2011; Nickel und Rabouille, 2008).

Neben Grh1 tritt die Protease Caspase 1 als weiterer wichtiger Regulator für unkonventionelle Proteinsekretion auf. Beispielsweise zeigen die Sekretionen des Fibroblasten-Wachstumsfaktors 2 (*engl.*: fibroblast growth factor 2; FGF2) und des Zytokins Interleukin-1 β (IL-1 β) in Säugerzellen Abhängigkeit von der Protease (Keller *et al.*, 2008; Ogura *et al.*, 2006; C. Rabouille *et al.*, 2012). Das Genom von *U. maydis* kodiert für eine Metacaspase (*umag_01408*), die möglicherweise ein funktionelles Homolog zur Caspase 1 darstellt. Ein entsprechendes Homolog der Metacaspase in *S. cerevisiae* (Aminosäure-identität: 51 %) wird analog zur Caspase 1 als Cystein-Protease beschrieben, deren proteolytische Aktivität während zellulären Stress induziert wird (<https://www.yeastgenome.org/>; Keller *et al.*, 2008; Lee *et al.*, 2008; Szallies *et al.*, 2002). Bei Deletion des Gens im Reporterstamm für unkonventionellen Sekretion in *U. maydis* deutete ein erster enzymatischer Aktivitätstest keine Reduktion der unkonventionellen Sekretion des Fusionsproteins Gus-Cts1 an (Daten nicht gezeigt). Unter der Prämisse der funktionalen Homologie erscheint die unkonventionelle Sekretion von Cts1 nicht nur von Grh1, sondern auch von der Caspase 1 unabhängig zu sein und die Funktion der beiden Regulatoren unterschiedlicher unkonventioneller Sekretionsmechanismen nicht erforderlich.

Ähnlich wie die durch Nährstoffmangel induzierte sekretorische Autophagie oder die Freisetzung von IL-1 β bei Entzündungsreaktionen ist für die meisten unkonventionellen Sekretionsereignisse die Induktion durch einen exogenen Reiz charakteristisch (Giuliani *et al.*, 2011). Hingegen ist für die Sekretion von Cts1 in *U. maydis* kein direkter Stimulus bekannt. In dieser Arbeit konnte aufgezeigt werden, dass der Export von Cts1 in den extrazellulären Raum Zellzyklus-abhängig erfolgt (Abb. 2.8). Dies deutet daraufhin, dass Cts1 während des Zellzyklus periodisch sekretiert wird. Intrinsische oder extrinsische Faktoren, die den Zellzyklus beeinflussen, dürften indirekt die Sekretion von Cts1 regulieren. Zu nennen wären dabei Zellzyklus-regulierende Cycline, wie das für die Zellseparation benötigte G1-Cyclin Cln1 als intrinsischer Faktor oder die Zellzyklus-arretierende Chemikalie Hydroxyurea als extrinsischer Faktor (Castillo Lluva und Pérez Martín, 2005; García-Muse *et al.*, 2003).

Die bisherigen und in nachfolgenden Abschnitten diskutierten Erkenntnisse zur unkonventionellen Sekretion von Cts1 in Sporidien mit der Verbindung zum Zellzyklus und der vorherigen Akkumulation in der Fragmentierungszone lassen auf keine Analogien zu bekannten, exemplarisch in der Einleitung erwähnten Sekretionsmechanismen schließen (Abschnitt 1.1.2). Insofern scheint die unkonventionelle Sekretion von Cts1 in *U. maydis* einen bis dato neuartigen Proteinexportmechanismus zu repräsentieren. Jedoch sind entscheidende Fragestellungen, wie die Einordnung als vesikulärer oder nicht-vesikulärer Transportmechanismus, weiterhin unbeantwortet. Eine direkte Rekrutierung von Cts1 an die Plasmamembran, wie beispielsweise für FGF2 oder die Sekretion mittels vesikulärer Strukturen durch sekretorische Lysosomen, Endosomen oder Exosomen aus multivesikulären Strukturen (*engl.*: multivesicular bodies; MVBs), sind nicht endgültig auszuschließen (Nickel, 2005, 2010; Nickel und Rabouille, 2008). In Bezug auf die in Abschnitt 3.2.2 diskutierte Durchquerung der Plasmamembran besteht zudem Unklarheit darüber, wie Cts1 die Doppellipidschicht als Barriere überwindet. Vesikelabschnürungen an der Plasmamembran oder der Durchtritt mittels eines ABC-Transporters wie bei Peptidpheromonen von *S. cerevisiae* und *S. pombe* könnten jedoch entsprechende Mechanismen darstellen (Christensen *et al.*, 1997; McGrath und Varshavsky, 1989; Rabouille *et al.*, 2012).

3.2 Cts1 akkumuliert in der Fragmentierungszone und wird Zellzyklus-abhängig sekretiert

Ergänzend zu vorangegangenen Arbeiten konnte die unterschiedliche Lokalisation und Akkumulation in der Fragmentierungszone von Cts1 mittels fluoreszenzmikroskopischer Analysen mit einem entsprechenden Gfp-Fusionsprotein während der Zytokinese hefeartiger Zellen von *U. maydis* bestätigt werden.

Nach der Migration des Zellkerns und der offenen Mitose in der M-Phase des Zellzyklus wird mit Eintritt in die G1-Phase die Septenbildung in *U. maydis* induziert (Altamirano *et al.*, 2017; Steinberg *et al.*, 2001; Theisen *et al.*, 2008). Zu diesem Zeitpunkt wird eine differenzielle, intrazelluläre Distribution von Cts1 deutlich: Beginnend mit der cytoplasmatischen Verteilung in Einzelzellen sowie in Mutter- und Tochterzellen ohne Septen, ist mit der Bildung des primären Septums nach der M-Phase des Zellzyklus eine kortikale Akkumulation seitens der Tochterzelle zur späteren Fragmentierungszone festzustellen, während aus Richtung der Mutterzelle die Rekrutierung durch die Bildung des primären Septums begrenzt erscheint. Mit Einzug des sekundären Septums geht eine deutliche Akkumulation von Cts1 innerhalb der Fragmentierungszone einher (Abb. 2.3; Langner *et al.*, 2015; Langner und Göhre 2016).

Durch die Messung der relativen Fluoreszenzintensitäten wurde erkennbar, dass sich die cytoplasmatische Verteilung von Cts1 in Einzelzellen gegenüber Mutter- und Tochterzelle nach sekundärer Septenbildung nicht unterscheidet (Abb. 2.3 C). Daraus erschließt sich die These, dass die Genexpression von Cts1 über den Verlauf der Zytokinese auf einem basalen Level liegt und die sichtbare Akkumulation von Cts1 auf verstärkte Expression des Gens in der G1-Phase des Zellzyklus zurückzuführen ist. Ob diesbezüglich eine tochterzellspezifische Genexpression stattfindet oder die cytoplasmatische Verteilung von Cts1 in Mutter- und Tochterzelle vor sekundärer Septenbildung von Einzelzellen bzw. Mutter- und Tochterzelle nach sekundärer Septenbildung abweicht, wurde nicht eindeutig belegt. Unter Vorbehalt lassen Experimente zur tochterzellspezifischen Genexpression für Mutter- und Tochterzelle vor sekundärer Septenbildung darauf schließen, dass die Promotoraktivität von *cts1* in beiden Zellen identisch ist (Abb. 2.4).

In *S. cerevisiae* ist die Chitinase CTS1, ähnlich zur prognostizierten Funktion von Cts1 in *U. maydis*, für die Degradierung von Chitin während der Zellteilung verantwortlich (Kurandas und Robbins, 1991). Für CTS1 konnte gezeigt werden, dass diese, neben der vergleichbaren Lokalisation zwischen Mutter- und Tochterzelle am primären Septum, während der Zellteilung mittels tochterzellspezifischer Genexpression synthetisiert wird (Colman-Lerner *et al.*, 2001). Unter der Prämisse, dass die cytoplasmatische Verteilung von Cts1 in Mutter- und Tochterzelle auf Protein, welches vor der G1-Phase synthetisiert wurde, zurückzuführen ist, wäre ein solches Expressionsmuster in *U. maydis* ebenfalls vorstellbar und könnte die Akkumulation von Cts1 seitens der Tochterzelle erklären. Interessant in diesem Zusammenhang wäre, ob Cts1 nach Bildung des primären Septums und Invagination der Plasmamembran von der Mutterzelle in die Fragmentierungszone gelangen kann. Alternativ könnte das *cts1*-Gen erst nach Bildung des sekundären Septums und als Vorbereitung für den anschließenden, neuen Zellzyklus sowohl in Tochter- als auch Mutterzelle exprimiert werden. Andererseits verweisen die hier erzielten Ergebnisse eher auf eine konstante Expression des Gens von Cts1 in Mutter- und Tochterzelle während des Verlaufs der Zytokinese.

Die Ursache, warum nicht gänzlich Cts1 in die Fragmentierungszone rekrutiert wird, ließe sich mit einer potentiellen Funktion von Cts1 auch abseits des Grenzbereichs zwischen Mutter- und Tochterzelle erklären. Chitin, welches mit bis zu 20 % in Zellwänden filamentöser Pilze vorkommt, repräsentiert ein rigides Polymer aus β -1,4-verbundenen N-Acetylglucosaminen und ist strukturgebend für die Morphologie der Zellen. Um eine gewisse Plastizität zu bewahren, ist das Zusammenspiel von Chitinaufbau durch Chitinsynthasen und Chitinabbau durch Chitinasen erforderlich (Bowman und Free, 2006; Klis *et al.*, 2006; Seidl, 2008). In basalen Mengen würde die Chitinase Cts1 die rigide Struktur der Zellwand lockern. Interessanterweise würde dies den Transfer durch die Plasmamembran voraussetzen und es

sich dadurch um einen Sekretionsmechanismus handeln, der entgegen der postulierten Modellvorstellung nicht ausschließlich über die Akkumulation in der Fragmentierungszone liefe. Die in dieser Arbeit dargelegte Abhängigkeit der Cts1-Sekretion von den Proteinen Don1 und Don3, welche die sekundäre Septenbildung induzieren und dadurch den Aufbau der Fragmentierungszone vermitteln (Weinzierl *et al.*, 2002), deuten jedoch an, dass die unkonventionelle Sekretion von Cts1 überwiegend im Zusammenhang mit der Akkumulation in der Fragmentierungszone steht. Zudem ist in wachsenden Knospen, die vorrangig auf das Zusammenspiel von Chitinaufbau und -abbau angewiesen sind (Bowman und Free, 2006), kein spezifisches Lokalisationsmuster von Cts1 sichtbar, welches auf eine erhöhte Akkumulation und Aktivität abseits der Fragmentierungszone schließen ließe.

3.2.1 Der Transport von Cts1 zur Fragmentierungszone scheint sich vom Transport in Filamenten zu unterscheiden

Eine wesentliche Fragestellung, die den Sekretionsmechanismus von Cts1 in Sporidien betrifft, bezieht sich auf den Transport der Chitinase zur Fragmentierungszone. Die Akkumulation von Cts1 nach der Bildung des primären Septums in der G1-Phase des Zellzyklus deutet dabei auf einen gerichteten Transport hin, der aber bislang unbekannt ist. In dieser Arbeit sollten Untersuchungen des Transportmechanismus die unkonventionelle Sekretion von Cts1 weiter charakterisieren. Zudem könnte dieser auch für andere Enzyme zutreffend sein, die möglicherweise für die Ausbildung einer funktionalen Fragmentierungszone benötigt werden.

Hervorzuheben wären Glukanasen, die zusammen mit Chitinasen die Organisation der Glukan- und Chitin-haltigen pilzlichen Zellwand während der Knospung vermitteln (Bowman und Free, 2006; Cabib, 2004; Kurandas und Robbins, 1991). In *S. cerevisiae* lokalisiert beispielsweise die Glukanase ENG1 im Grenzbereich zwischen Mutter- und Tochterzelle (Baladrón *et al.*, 2002). Tatsächlich weisen die Ergebnisse zu einer im Genom von *U. maydis* kodierten, potentiellen Glukanase (*umag_10211*), die, anders als das entsprechende *S. cerevisiae* Homolog (EXG1), kein vorhergesagtes N-terminales Signalpeptid besitzt und gemäß enzymatischer Aktivitätstests vermutlich unkonventionell sekretiert wird, Analogien zu Cts1 auf. Dies lässt auf einen ähnlichen Transportmechanismus schließen. Allerdings konnte die Lokalisation der *U. maydis*-Glukanase in der Fragmentierungszone bisher nicht belegt werden (Larriba *et al.*, 1995, Bachelorarbeit P. Rink, 2016). In Bezug auf Zellwandaufbauende Chitin- und Glukansynthasen wurde bereits der Transport mittels sekretorischer Vesikel beschrieben (Schuster *et al.*, 2016, 2012; Weber *et al.*, 2006).

Für den Guaninaustauschfaktor (*engl.*: guanine exchange factor; GEF) Don1 wurde gezeigt, dass das Protein durch die Bindung an motile Endosomen zur Fragmentierungszone

gelangt. Zudem belegen fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen, bei denen das endosomale t-SNARE Protein Yup1 detektiert wurde, die sukzessive Akkumulation von endosomalen Vesikeln in der Fragmentierungszone. Während des Prozesses der primären Septenbildung werden Endosomen seitens der Mutter- und Tochterzelle und nach der primären Septenbildung asymmetrisch ausschließlich seitens der Tochterzelle zum interzellulären Bereich transportiert (Schink und Bölker, 2009). Möglicherweise werden dadurch endosomal gebundene Zellteilungs-relevante Faktoren an die spätere Fragmentierungszone rekrutiert.

In Filamenten von *U. maydis* wird der Langstreckentransport von mRNA ebenfalls durch Endosomen vermittelt, welche durch die Motorproteine Kin3 und Dyn1/2 entlang von Mikrotubuli in anterograder und retrograder Richtung bewegt werden. Ein mRNA-bindendes Protein, welches über Endosomen transportiert wird, ist Rrm4. Bisherige Studien deuten an, dass in Filamenten die Translation der Endosomen-gebundenen mRNA während des Langstreckentransports entlang der Mikrotubuli erfolgt (Baumann *et al.*, 2012; Göhre *et al.*, 2012). Beispielsweise wird für alle acht Septine von *U. maydis* angenommen, dass diese, durch Interaktion mit Rrm4 an frühe Endosomen gebunden, während des Transports zur Hyphenspitze durch Ribosomen translatiert und anschließend die Septin-Proteine mittels Endosomen durch das Filament bewegt werden (Zander *et al.*, 2016). Septine werden in Filamenten des Pilzes sowohl für das unipolare Wachstum als auch für die unkonventionelle Sekretion von aktivem Cts1 benötigt. Die effiziente Bildung von Septinfilamenten am Wachstumsbereich wird dabei durch den apikal-gerichteten Langstreckentransport gewährleistet (Baumann *et al.*, 2014; Zander *et al.*, 2016).

Für Cts1 scheint dieser Transportmechanismus zumindest während des filamentösen Wachstums ebenso wahrscheinlich, zumal *in vivo* UV-Kreuzvernetzung und Immunopräzipitation (*engl.*: UV-crosslinking immune precipitation; CLIP) und Fluoreszenz *in situ* Hybridisierungs (FISH)-Experimente die Bindung der *cts1*-mRNA an Rrm4 belegen. Zudem akkumuliert Cts1 an der Hyphenspitze und die Sekretion in Filamenten ist Rrm4-abhängig, was durch die reduzierte extrazelluläre Cts1-Aktivität bei Deletion von *rrm4* deutlich wird (Koepke *et al.*, 2011). Die in dieser Arbeit in Zusammenarbeit mit Dr. S. Zander (Institut für Mikrobiologie, HHU Düsseldorf) durchgeführten Experimente zur Rückgewinnung von Fluoreszenzsignalen nach Photobleichen (*engl.*: fluorescence recovery after photobleaching; FRAP) verweisen auf die Migration von Cts1 zur Hyphenspitze (Abb. 2.6 A). Anhand der Co-Lokalisation von Cts1 und Rab5a, welches als Identitätsdeterminante für frühe Endosomen gilt (Fuchs und Steinberg, 2005; Rink *et al.*, 2005), konnte zudem eine Verbindung zum zuvor beschriebenen endosomalen Transport entlang von Mikrotubuli hergestellt werden (Abb. 2.6 B).

Allerdings war lediglich in ca. 20 % der untersuchten Hyphen die Lokalisation von Cts1 in geringer Intensität sichtbar. Die besagten UV-CLIP- und FISH-Experimente zeigten, dass

Rrm4 im Vergleich mit der mRNA von Cts1 weitere mRNA-Moleküle mit deutlich höherer Affinität bindet (Koepke *et al.*, 2011; König *et al.*, 2009; Olgeiser *et al.*, 2018). Möglicherweise scheint die geringere Affinität das mutmaßlich seltene Ereignis von migrierendem Cts1, welches potentiell durch Translation an Endosomen synthetisiert wird, zu begründen und die mRNA von Cts1 nicht als bevorzugtes Ziel von Rrm4 auszuweisen. Interessanterweise ist die Lokalisation von Cts1 in der Hyphenspitze von Filamenten bei Deletion von *rrm4* nicht beeinträchtigt, weshalb eventuell ein alternativer, Rrm4-unabhängiger Transportmechanismus vorliegen muss (Koepke *et al.*, 2011). Hinsichtlich der reduzierten Sekretion von Cts1 bei Deletion von *rrm4* könnten durch den verhinderten Rrm4-vermittelten Transport ggf. essentielle Komponenten für die funktionale Cts1-Sekretion, wie z.B. Septine, nicht an die Hyphenspitze gelangen und dadurch die verminderte Sekretion auslösen (Koepke *et al.*, 2011; Zander *et al.*, 2016). Interessant wäre daher, ob bei Deletion von *rrm4* die Migration von Cts1 weiterhin zu beobachten wäre und demnach entweder die *cts1*-mRNA anderweitig an Endosomen rekrutiert wird oder bereits synthetisiertes Cts1 endosomal bindet. Vorgegangene Arbeiten belegen die Translation zu funktionalem Cts1 unabhängig von Rrm4 (Koepke *et al.*, 2011). Inhibitorstudien mit der Mikrotubuli-beeinträchtigenden Chemikalie Benomyl, die bereits eine verminderte Cts1-Sekretion belegen (Koepke *et al.*, 2011), könnten Aufschluss über die Beteiligung von Mikrotubuli am intrazellulären Transport von Cts1 in Filamenten geben.

Neben Endosomen könnten zudem Peroxisomen als potentielles Transport-Organell der Chitinase fungieren. Während der Infektion von Maispflanzen sekretiert *U. maydis* geringe Mengen des peroxisomalen Sterolträgerproteins 1 (*engl.*: sterol carrier protein; Scp1), welches, wie Cts1, kein vorhergesagtes Signalpeptid besitzt, als Effektorprotein in den pflanzlichen Wirt. Essentiell für die Virulenzfunktion ist die durch eine C-terminale Aminosäuresequenz vermittelte peroxisomale Lokalisation des Proteins und es ist anzunehmen, dass Scp1 vermutlich mit Peroxisomen ausgeschleust wird. Die mögliche Beteiligung des Organells an der Sekretion von Scp1 muss dabei kein exklusives Merkmal des Virulenzfaktors darstellen und schließt Peroxisomen als zusätzliche mögliche Komponente für den Export weiterer unkonventionell sekretierter Proteine in *U. maydis* mit ein (Krombach *et al.*, 2018).

Für Sporidien von *U. maydis* konnten in dieser Arbeit anhand der in Zusammenarbeit mit Dr. S. Zander und K. Müntjes durchgeführten Untersuchungen zum potentiellen endosomalen Transport von Cts1 keine Hinweise auf den Mechanismus, der zur finalen Akkumulation von Cts1 in Fragmentierungszone führt, gefunden werden. Anders als in Filamenten ließen die Resultate weder zu unterschiedlichen Phasen des Zellzyklus (Abb. 2.5 A-C), noch bei FRAP-Experimenten von Zellen in der G1-Phase nach primärer Septenbildung (Abb. 2.5 D-E) oder

von Stämmen mit überexprimierter Gensequenz von Cts1 (Abb. 2.5 F-H) auf einen Endosomen-vermittelten Transportweg von Cts1 schließen.

Wie eingangs erläutert, scheint die Fragmentierungszone mit Endosomen angereichert zu werden. Für das Protein Don1, welches zur Etablierung des sekundären Septums in der Fragmentierungszone lokalisiert, konnte in Sporidien gezeigt werden, dass eine C-Terminale FYVE-Domäne die Bindung an das endosomale Lipid Phosphatidylinositol 3-phosphate (PI3P) vermittelt und dadurch das Protein über Endosomen transportiert wird (Schink und Bölker, 2009). Ein weiteres Protein, welches für die Bildung des sekundären Septums essentiell ist und in der Fragmentierungszone lokalisiert, stellt die Kinase Don3 dar. Die Kinase besitzt am C-Terminus ein konserviertes Motiv aus zwei Lysinen, einer aromatischen Aminosäure (Tyrosin oder Phenylalanin) und je einem Arginin und Tryptophan (LLyxRW), welches als T-Motiv definiert und für die Lokalisation in der Fragmentierungszone benötigt wird (Sandrock *et al.*, 2006). Im Gegensatz dazu ist für das Protein Cts1 bisher keine Domäne bekannt, welche essentiell für die Lokalisation in der Fragmentierungszone zwischen Mutter- und Tochterzelle ist und ggf. die Rekrutierung an Endosomen ermöglicht. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass Modifikationen in der Aminosäuresequenz der zentralen GH18-Domäne oder des konservierten C-Terminus der Chitinase zu Einschränkungen in der Sekretion führen (Stock *et al.*, 2012, Dissertation J Stock, 2013), weshalb eine potentielle Domäne für den intrazellulären Transport dort zu vermuten wäre. Der quantitative Vergleich der Sekretion mit C-terminal verkürzten Varianten von Cts1 oder mittels „Alaninscan“ könnten zusätzlich zu den bereits durchgeführten Strukturanalysen und Aminosäurenabgleichen mit anderen Organismen (Langner *et al.*, 2015; Dissertationen T. Langner, 2015 und J Stock, 2013) eine potentielle, transport- und sekretionsrelevante Domäne für Cts1 identifizieren.

Da der Transport endosomaler Vesikel entlang von Mikrotubuli in *U. maydis* durch das Motorprotein Kin3 erfolgt, führt die Deletion von *kin3* folglich zu einer weitestgehend ausbleibenden Bewegung Don1-positiver, endosomaler Vesikel (Schink und Bölker, 2009; Wedlich-Söldner *et al.*, 2002). Ursächlich ist die polare Anhäufung endosomaler Vesikel an den Mikrotubuli durch die alleinige Aktivität des Motorproteins Dyn1/2, welches, entgegen dem Kin3-vermittelten Transport zum Pluspol, frühe Endosomen an den Minuspol der Mikrotubuli rekrutiert (Wedlich-Söldner *et al.*, 2002). Allerdings ist die sekundäre Septenbildung von *kin3*-Mutanten trotz des eingeschränkten, endosomalen Transports von Don1 nicht vollständig beeinträchtigt, was durch die Quantifizierung der sekundären Septen der *kin3*-Mutante in dieser Arbeit (Abb. 2.13) gezeigt werden konnte und die Beobachtungen früherer Studien (Schink und Bölker 2009) bestätigt. Hinsichtlich der Sekretion von Cts1 wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass die Deletion von *kin3* keinen Einfluss auf die extrazelluläre Cts1-Aktivität hat (Abb. 2.12 A). Bei einem Sekretionsmechanismus, welcher

den Transport zur Fragmentierungszone voraussetzt, scheint die endosomale Mobilität keine notwendige Bedingung zu sein. Dies und die Resultate der Untersuchungen des Transports von Cts1 lassen auf einen Transportmechanismus in Sporidien schließen, welcher unabhängig von der Interaktion mit Endosomen ist.

Für die Exozytose sekretorischer Vesikel während der konventionellen Sekretion wird in filamentösen Pilzen wie *U. maydis* und *Aspergillus oryzae* der Langstreckentransport im Zentrum der Zelle über Mikrotubuli reguliert. In der Peripherie der Filamente erfolgt für den lokalen Transport der sekretorischen Vesikel an der Hyphenspitze der Wechsel auf Aktinfilamente (Hayakawa *et al.*, 2011; Steinberg, 2007). Die Beteiligung der Strukturen des Zytoskeletts am intrazellulären Transport zeigt sich gleichermaßen in tierischen Zellen und verdeutlicht die weit verbreitete Etablierung des Mikrotubuli-abhängigen Langstreckentransports und des lokalen, peripheren Transports mittels Aktinfilamenten (Ross *et al.*, 2008; Schuh, 2013). Für die unkonventionelle Sekretion von Cts1 in *U. maydis* gibt es ebenfalls Hinweise auf den Langstreckentransport mittels Mikrotubuli in Filamenten. Eine Beteiligung von Aktinfilamenten für den lokalen Transport an die Hyphenspitze ist dabei nicht ausgeschlossen. In Sporidien des Pilzes sind keine Indizien für den Mikrotubuli-vermittelten intrazellulären Transport existent, allerdings verweist die Lokalisation von Cts1 in der G1-Phase nach primärer Septenbildung auf die kortikale Akkumulation der Chitinase. Möglicherweise könnte dies auf den peripheren Transport durch Aktinfilamente zurückzuführen zu sein.

In Schuster *et al.* (2012) führt die Lokalisation von F-Aktin in *U. maydis* mittels eines Fusionsproteins aus *lifeact* und Gfp zur Visualisierung von F-Aktinkabeln, welche sich in der Zellperipherie von der Mutterzelle in die wachsende Knospe erstecken. In diesem Zusammenhang wird angenommen, dass die Zellwand-bildende Chitinsynthase Mcs1 für die polare Sekretion in der Wachstumszone zunächst mittels des Motorproteins Kin1 zentral über Mikrotubuli und anschließend durch das Myosin Myo5 kortikal an Aktinfilamenten in sekretorischen Vesikeln transportiert wird. Mikrotubuli und Aktin agieren kooperativ in der Sekretion von membranösen Vesikeln, repräsentieren aber unabhängige Wege (Schuster *et al.*, 2016, 2012). Ein solcher oder ähnlicher Transportmechanismus mit der Beteiligung von peripherem Aktin ist für den intrazellulären Transport von Cts1 in Sporidien nicht ausgeschlossen. Ob diesbezüglich eine Kooperation mit Mikrotubuli vorliegt oder der Kurzstreckentransport in Sporidien im Gegensatz zum Langstreckentransport in Filamenten exklusiv Aktin-abhängig ist, gilt es zusätzlich zu eruieren. In Maus-Oozyten wurde bereits der alleinige Aktin-abhängige Transport mittels Myo5 über ein umfangreiches Aktinnetzwerk über längere Distanzen beschrieben (Schuh, 2013). Hervorzuheben ist, dass der beschriebene Transport und Export von Mcs1 unabhängig von Kin3 erfolgt, was gemäß der in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse auch auf die Sekretion von Cts1 zutrifft (Abb. 2.12, Schuster *et al.*,

2012). Erste Ansätze zu Inhibitorstudien mit der Chemikalie Latrunculin A, welches die Polymerisation von Aktin verhindert (Schuster *et al.*, 2012), konnten auf Grund der unveränderten Lokalisation von Cts1 in der Fragmentierungszone bisher keinen Hinweis auf einen inhibierten, möglicherweise Aktin-abhängigen Transport von Cts1 liefern (Daten nicht gezeigt). Lokalisationsstudien von Stämmen mit Deletionen von *myo5* und wahlweise in Kombination mit Zugabe von Benomyl oder Deletion von *kin1* könnten Aufschluss über einen Myo5-vermittelten Transport an Aktinkabeln bzw. entlang von Mikrotubuli geben.

Hinsichtlich des Transports von Cts1 in Filamenten und Sporidien von *U. maydis* scheinen demnach, wie auch anderweitig für die Sekretion von Cts1 diskutiert (Dissertation T. Langner, 2015), unterschiedliche Mechanismen vorzuherrschen. Resultate dieser Arbeit deuten auf einen endosomalen Langstreckentransport entlang von Mikrotubuli in Filamenten hin. In Sporidien konnte diese Verbindung nicht hergestellt werden und in weiteren Arbeiten sollte diesbezüglich die Beteiligung von Aktin am Transport berücksichtigt werden.

3.2.2 Der Sekretionsmechanismus von Cts1 in Sporidien ist Zellzyklus-abhängig

Untersuchungen des Expressionsorganismus *P. pastoris* verwiesen erstmalig darauf, dass die konventionelle Sekretion rekombinanter Proteine in Hefen über die Knospenspitze von sich teilenden Zellen erfolgt (Puxbaum *et al.*, 2016). Im Vergleich dazu scheint die unkonventionelle Sekretion von endogenem Cts1 in *U. maydis* ebenfalls im Zusammenhang mit sich teilenden Zellen zu stehen, jedoch der Ursprung der Sekretion zellulär anders lokalisiert zu sein. Wie bereits beschrieben und durch die Lokalisationsstudie in dieser Arbeit bestätigt (Abb. 2.3), ist davon auszugehen, dass Cts1 nach interzellulärer Akkumulation zwischen Mutter- und Tochterzelle über die Fragmentierungszone exportiert wird (Langner *et al.*, 2015; Langner und Göhre 2016). Eine anfängliche Hypothese stellte dabei die Freisetzung durch Auflösung der Fragmentierungszone dar.

In dieser Arbeit durchgeführte Experimente, bei denen der Zellzyklus arretiert wurde, belegen eine Zellzyklus-abhängige Sekretion von Cts1 (Abb. 2.8). Im Gegensatz zur unkonventionellen Sekretion der Chitinase scheint anhand der Arabinofuranosidase 2 die konventionelle Sekretion in *U. maydis* kontinuierlich und unbeeinflusst vom Zyklus der Zelle zu erfolgen. Die zunehmende Akkumulation von Cts1 im Grenzbereich zwischen Mutter- und Tochterzelle setzt mit der primären Septenbildung ein und verweist auf einen Zellzyklus in der G1-Phase (Altamirano *et al.*, 2017; Steinberg *et al.*, 2001; Theisen *et al.*, 2008). Die anschließend vermutete Sekretion müsste demnach auf die G1-Phase des Zellzyklus determiniert sein. Das spezifische Lokalisationsmuster von Cts1 mit der Akkumulation in der Fragmentierungszone ist auch für weitere Proteine belegt. Hervorzuheben sind diesbezüglich die Septierungsproteine Don1 und Don3 (Sandrock *et al.*, 2006; Schink und

Bölker, 2009). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Don3 ebenfalls unkonventionell sekretiert wird und dies für Don1 unter Vorbehalt auch zuzutreffen scheint bzw. nicht auszuschließen ist (Abb. 2.15 – 2.16). Ein auf andere Proteine zu übertragender, vergleichbarer Sekretionsmechanismus wie für die Chitinase ist daher nicht unwahrscheinlich. Eine Zellzyklus-abhängige Sekretion solcher Proteine würde diese Annahme bekräftigen.

Durch Deletionsmutanten der Gene von *Cts1* und einer weiteren, konventionell sekretierten Chitinase (*Cts2*) wird deutlich, dass *Cts1* selbst an der physischen Zellteilung von Mutter- und Tochterzelle beteiligt ist: Während jeweils einzelne Deletionen von *cts1* und *cts2* keinen morphologischen Phänotypen hervorrufen, wird in Stämmen mit doppelter Deletion von *cts1* und *cts2* ein Zellteilungsdefekt sichtbar (Langner *et al.*, 2015). Als Chitinase und speziell als Vertreter der Glykosylhydrolase 18-Familie, dessen Mitglieder Chitinpolymere in kurz-kettige Oligomere spalten (Langner *et al.*, 2015; Seidl, 2008), dürfte *Cts1* die eigene Freisetzung durch Degradierung des Chitins in der verbindenden Zellwand zwischen Mutter- und Tochterzelle beschleunigen. Allerdings ist die physische Trennung der Zellen keine Notwendigkeit. Stämme mit Deletion der Gene *kex2* oder *kin3* zeigen trotz der Bildung von Zellaggregaten keine Einschränkung in der Sekretion von aktivem *Cts1* (Abschnitt 2.3). Auf Grund der in dieser Arbeit nachgewiesenen Sekretion von aktiver Chitinase in Deletionsmutanten mit Zellteilungsdefekt erscheint der Export aus der Fragmentierungszone heraus plausibel und die Trennung von Mutter- und Tochterzelle als hauptsächliche Ursache für die Freisetzung als unwahrscheinlich (Abb. 2.12). Das lässt den Schluss zu, dass die Sekretion der Chitinase durch die Plasmamembran die Trennung hervorrufen dürfte und *Cts1* in der Zellzyklusphase sekretiert werden müsste, bei der Mutter- und Tochterzelle noch über die Zellwand verbunden sind.

Detaillierte Aufnahmen der Fragmentierungszone nach sekundärer Septenbildung mit Hilfe konfokaler Mikroskopie belegen die kortikale Verteilung von *Cts1* in dem Bereich zwischen Mutter- und Tochterzelle und verweisen auf die Bindung an die Zellwand für die katalytische Funktion (Abb. 2.3 B). Gemäß der mikroskopischen Analyse scheint neben der potentiellen Bindung an die Zellwand, als Barriere zum äußeren Milieu, auch eine Assoziation mit dem primären und sekundären Septum vorzuliegen. Eine künftig zu klärende Frage wäre, wie der Abbau der nach außen abgrenzenden Zellwand koordiniert ist, ohne dass das Zellwandmaterial der Septen degradiert wird. Möglicherweise könnten Zellwandverdickungen an den Septen auf cytoplasmatischer Seite dem entgegenwirken oder eine andere Zellwandzusammensetzung, beispielsweise durch variierende Anteile an Chitin- und Glukan-Molekülen, den Abbau verhindern.

Zudem besteht Unklarheit darüber, ob *Cts1* durch die Septen in die Fragmentierungszone eintritt oder nach Akkumulation und lokaler Fixierung durch den Einzug der Septen in der

Fragmentierungszone eingeschlossen wird. In den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten mikroskopischen Analysen korrelierte die jeweilige Septenbildung mit der entsprechenden Invagination der Plasmamembran. Demzufolge würde der Transfer von Cts1 durch die Septen bereits ein erstes Durchqueren der Plasmamembran bedeuten und dem „klassischen Verständnis“ von Sekretion entsprechen. Bei Einschluss von Cts1 durch Septenbildung würde keine Sekretion über eine Membran im eigentlichen Sinne in die Fragmentierungszone stattfinden, sondern zunächst eine cytoplasmatische Konzentration von Cts1 im Bereich zwischen Mutter- und Tochterzelle erfolgen. Mit doppelter Invagination der Plasmamembran wird zeitgleich eine Membran-umspannende Struktur in der Fragmentierungszone generiert (Abb. 2.3 A). Das eigentliche unkonventionelle Sekretionsereignis, welches den Transfer an oder durch die Plasmamembran unabhängig vom konventionellen Sekretionsmechanismus beschreibt (Nickel, 2010), würde mit der mutmaßlichen Assoziation von Cts1 an die Zellwand der Fragmentierungszone passieren.

In einer kürzlich erschienenen Publikation wurde gezeigt, dass Cts1 für die extrazelluläre Aktivität durch die Metalloprotease Fly1 C-terminal prozessiert wird (Ökmen *et al.*, 2018). Eigene Leistungen zu dieser Publikation umfassten dabei die Messungen der intra- und extrazellulären chitinolytischen Aktivitäten. Im extrazellulären Raum konnte bei Deletion des *fly1*-Gens das Volllängenprotein für das Fusionsprotein aus Cts1 und C-terminalem Gfp mittels Western Blot-Analyse detektiert werden, während bei Anwesenheit von Fly1, wie auch in dieser Arbeit nachgewiesen, lediglich das Degradierungsprodukt Gfp sichtbar wurde (Abb. 2.12 C). Gleichzeitig konnten die eigenen Beiträge zu dieser Publikation zeigen, dass bei Abwesenheit von Fly1 eine geringere extrazelluläre Aktivität des Volllängenproteins festzustellen ist, was auf die Aktivierung durch Prozessierung schließen lässt. Interessanterweise ist die intrazelluläre Aktivität von Cts1 unabhängig von Fly1 und ergänzend zu Ökmen *et al.* (2018) weist die Detektion des Volllängenproteins von Cts1G im Gesamtzellextrakt in dieser Arbeit auf keine intrazelluläre Prozessierung hin (Abb. 2.12 D). Eine mögliche Umgebung für die C-terminale Cts1-Prozessierung könnte der Bereich um die Fragmentierungszone darstellen, damit Cts1 für die prognostizierte, extrazelluläre Funktion bei der Degradierung der Zellwand entweder erst kurz vor oder nach der Durchquerung der Plasmamembran aktiviert wird. Nennenswert dabei ist, dass die bioinformatische Analyse der Proteinsequenz der Protease ein Signalpeptid für Fly1 voraussagt (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>). Die dadurch anzunehmende konventionelle Sekretion der Protease liefert einen Hinweis auf die Prozessierungsreaktion nach der Sekretion von Cts1. Kontrovers bleibt, warum die Aktivierung von Cts1 durch Fly1 intrazellulär irrelevant ist bzw. weshalb bei Deletion des *fly1*-Gens die Chitinase im Gesamtzellextrakt aktiv und nur extrazellulär in der Aktivität reprimiert ist. Weiter bleibt offen,

wie die beiden Enzyme trotz scheinbar unterschiedlicher Sekretionsmechanismen für die Interaktion aufeinandertreffen.

Hinsichtlich einer N-terminalen Prozessierung von Cts1 konnte ein solcher Vorgang auf Grund der fehlende Detektion des Volllängenproteins von Cts1 mit N-terminal fusioniertem Gus im zellfreien Kulturüberstand mittels Western Blot-Analyse in dieser Arbeit nicht ausgeschlossen werden (Abb. 2.15 C und Abb. 2.18 E). Nach Langzeitkultivierungen von Gus-Cts1 sekretierenden Sporidien unter optimierten Bedingungen wurde das Volllängenprotein im Kulturüberstand bereits detektiert, allerdings wiesen die entsprechenden Western Blots zusätzlich deutliche Degradierungsbanden auf. Dies deutet insgesamt auf eine starke Prozessierung des sekretierten Proteins hin, obwohl durch die Optimierung mittels puffergestützter Stabilisierung des pH-Wertes und Deletionen mehrerer Proteasen eine Verringerung proteolytischer Einflüsse erreicht wurde (Terfrüchte *et al.*, 2018).

Zusammengefasst zeichnet sich der Sekretionsmechanismus von Cts1 in Sporidien durch die verstärkte Rekrutierung des Enzyms im Grenzbereich zwischen Mutter- und Tochterzelle nach primärer Septenbildung in der G1-Phase aus. In Abhängigkeit von der Zellzyklusphase wird Cts1 vermutlich über ein Sekretionsereignis an der Plasmamembran, unabhängig von der physischen Trennung von Mutter- und Tochterzelle, in den extrazellulären Raum transferiert. Für die prognostizierte, extrazelluläre Funktion bei der mit Cts2 koordinierten Degradierung von Zellwandmaterial zur Trennung von Mutter- und Tochterzelle unterliegt Cts1 der C-terminalen Prozessierung durch die Metalloprotease Fly1, die möglicherweise nach der Sekretion erfolgt.

In Filamenten des Pilzes lokalisiert Cts1 an den basalen Enden zwar ebenfalls an Septen (Langner *et al.*, 2015) und lässt auf eine Septen-gerichtete Sekretion schließen, allerdings ist u.a. auch auf Grund einer fehlenden Fragmentierungszone ein anderer Sekretionsmechanismus zu erwarten. Weitere Indizien, welche diese These begründen, zeigen sich darin, dass im Gegensatz zu Filamenten in Sporidien spezifische Proteine wie Rrm4 oder alle vier kodierten Kern-Septine Redundanz hinsichtlich der Notwendigkeit für die Sekretion von Cts1 zeigen (Koepeke *et al.*, 2011; Zander *et al.*, 2016). Allerdings könnte die anhand der Cts1-Lokalisation an der Hyphenspitze vermutete, apikale Sekretion des Proteins in Bezug auf die Durchquerung der Plasmamembran in einem zu Sporidien ähnlichen, bisher unbekanntem Prozess erfolgen (Koepeke *et al.*, 2011).

3.3 Die unkonventionelle Sekretion von Cts1 ist abhängig von der Kinase Don3

Eine wesentliche Erkenntnis dieser Arbeit ist, dass nicht alle Mutanten von *U. maydis* mit Zellteilungsdefekt essentiell in der Cts1-Sekretion beeinträchtigt sind. Festzumachen ist dies an Stämmen mit Deletionen von *kex2* und *kin3* (Abb. 2.12). Kritisch zu berücksichtigen ist, dass für Messungen von individuellem, aktivem Cts1 im extrazellulären Raum keine adäquate Lysekontrolle mitgeführt werden konnte und somit in der Theorie Zelllyse als Ursache für extrazelluläre Aktivität nicht gänzlich ausgeschlossen werden kann.

Die Funktion der Pro-Konvertase KEX2 in *S. cerevisiae*, welche 31 % Aminosäureidentität zum Protein in *U. maydis* aufweist (Sarkari *et al.*, 2014), wird u.a. anhand der Prozessierung des Vorläuferproteins Prepro- α -Faktor zum Peptidpheromon α -Faktor der Hefe dokumentiert. Dabei entfernt das im Golgi-Apparat lokalisierte Protein N-terminale Prosequenzen im Prepro- α -Faktor. Für den 165 Aminosäuren-langen Prepro- α -Faktor wird neben der Passage im Golgi-Apparat ebenso der vorherige Eintritt ins ER und die dadurch bedingte N-Glykosylierung beschrieben (Fuller, 1988). Anders als der Prepro- α -Faktor besitzt Cts1 bekanntlich kein Signalpeptid, welches die Assoziation ans Translokon des ERs vermittelt bzw. kann die temporäre Lokalisation im Organell auf Grund vorheriger Experimente ausgeschlossen werden (Fuller, 1988; Koepke *et al.*, 2011; Stock *et al.*, 2012). Ein Durchqueren des Golgi-Apparats seitens der Chitinase ist zwar ungeklärt, allerdings erscheint, wie zuvor diskutiert, ein vom ER aus gerichteter Transport mittels COPII-Vesikel zum Golgi-Apparat eher unwahrscheinlich (Abschnitt 3.1). Die offensichtlich vom Peptidpheromon α -Faktor abweichende intrazelluläre Route für Cts1 könnte eine Erklärung dafür liefern, dass Cts1 für das Erreichen biologischer Funktionalität scheinbar nicht mit Kex2 interagiert.

Gemäß dem Beispiel des Prepro- α -Faktors in *S. cerevisiae* besitzen Kex-ähnliche Proteasen allgemein vielfältige regulatorische Funktionen in Eukaryoten. Gendeletionen von pilzlichem Kex2 führen daher folglich zu pleiotropen Phänotypen, die wahrscheinlich auf fehlenden, posttranslationalen Prozessierungsereignissen bzw. mangelnden, proteolytischen Aktivierungen diverser Vorläuferproteine basieren (Bader *et al.*, 2008; Mizutani *et al.*, 2004). So werden bei entsprechender Gendeletion in den Pilzen *Candida albicans* (Newport und Agabian, 1997; Newport *et al.*, 2003), *C. glabrata* (Bader *et al.*, 2001), *P. pastoris* (Werten und Wolf, 2005), *Schizosaccharomyces pombe* (Ladds und Davey, 2000), *Yarrowia lipolytica* (Sohn *et al.*, 1998), *A. niger* (Punt *et al.*, 2003), *A. oryzae* (Mizutani *et al.*, 2004) oder *Trichoderma reesei* (Goller *et al.*, 1998) unterschiedliche, spezifische Phänotypen sichtbar. Neben dem Zellteilungsdefekt ist als Phänotyp in *kex2*-Mutanten von *U. maydis* zudem eine verringerte extrazelluläre proteolytische Aktivität festzustellen, die auf eine ausbleibende,

Kex2-vermittelte Aktivierung sekretorischer Proteasen hinweist (Sarkari *et al.*, 2014). In Bezug auf den Cts1-Export scheinen die durch *kex2*-Deletion fehlenden Prozessierungsereignisse jedoch keinen Einfluss auf die unkonventionelle Sekretion der Chitinase zu haben (Abb. 2.12). Eine potentielle Aktivierung der Metalloprotease Fly1, die für die extrazelluläre Cts1-Aktivität benötigt wird (Ökmen *et al.*, 2018), durch Kex2 ist demzufolge eher unwahrscheinlich.

Hinsichtlich Kin3 wurde die Verbindung des Motorproteins zum endosomalen Transport entlang von Mikrotubuli bereits erläutert (Abschnitt 3.2.1). Mit der Septenbildung in der späten Phase der Zellzyklus akkumulieren frühe Endosomen in der Fragmentierungszone. Die Deletion von *kin3* vermindert die Motilität der Endosomen um ca. ein Drittel und verhindert die Ansammlung von Endosomen an den distalen Zellpolen bzw. Septen von *U. maydis* (Schink und Bölker, 2009; Wedlich-Söldner *et al.*, 2002). Dies deutet darauf hin, dass der Zellteilungsdefekt in *kin3*-Mutanten möglicherweise auf einen gestörten, endosomalen Transport zurückzuführen ist, wodurch ggf. Endosomen-gebundene, zellteilungs-relevante Faktoren nicht in ausreichender Anzahl zur Fragmentierungszone gelangen. In Stämmen mit Deletion des Gens für Kin3 wird anhand der Lokalisation von Cts1 im Grenzbereich zwischen Mutter- und Tochterzelle der fehlende Einfluss von Kin3 auf den Transport und schlussendlich die Sekretion der Chitinase sichtbar, was zur Annahme des Endosomen-unabhängigen Cts1-Transports in Sporidien führt (Abb. 2.11 – 2.12, Abschnitt 3.2.1). Die effiziente Sekretion von aktivem Cts1 erscheint demnach auch unabhängig von der potentiellen Rekrutierung spezifischer Faktoren mittels Kin3-haltiger Endosomen zur Fragmentierungszone.

3.3.1 Die Septierungsproteine Don1 und Don3 beeinflussen die Sekretion von Cts1

Im Gegensatz zu den Deletionen von *kex2* und *kin3* zeigen die Deletion von *don1* und *don3* einen deutlichen, reduzierenden Effekt auf die Sekretion von aktivem Cts1 (Abb. 2.12). Eine offensichtliche Gemeinsamkeit der kodierten Proteine von *don1* und *don3*, welche sie von Kex2 und Kin3 abgrenzt, ist deren Funktion beim Aufbau des sekundären Septums (Böhmer *et al.*, 2009; Weinzierl *et al.*, 2002).

Nach der kragenförmigen Anordnung von Septinfilamenten an der Septierungsstelle vermittelt Don3 die zeitweise Auflösung der Septinstruktur und ermöglicht damit die anschließende Bildung des kontraktilen Aktomyosinrings (AMR). Die Synthese des AMRs wird durch das GTP-bindende Protein Cdc42 gesteuert, welches wiederum spezifisch durch den GEF Don1 aktiviert wird. Abschließend wird nach vollendeter AMR-Bildung und erneuter Anordnung von Septinfilamenten in ringförmiger Struktur seitens der Tochterzelle mit der

Einschnürung des AMRs das sekundäre Septum aufgebaut (Altamirano *et al.*, 2017; Böhmer *et al.*, 2008, 2009; Hlubek *et al.*, 2008).

Eine mögliche Abhängigkeit der Cts1-Sekretion von der Bildung des sekundären Septums wurde im Rahmen dieser Arbeit untersucht. Aufgrund der unbeeinträchtigten Sekretion in Stämmen mit eingeschränkter sekundärer Septenbildung konnte keine Korrelation zwischen der Existenz des sekundären Septums und effizienter Cts1-Sekretion festgestellt werden (Abb. 2.12 – 2.13). Schlussendlich ist durch die Quantifizierung der Septen in den Zellaggregaten der Stämme mit Deletion von *kex2*, *kin3*, *don1* und *don3* eine Abhängigkeit der sekundären Septenbildung auf die Sekretion von Cts1 als unwahrscheinlich zu betrachten. Damit übereinstimmend ist die Tatsache, dass die jeweiligen Gendelektionen aller vier Kern-Septine, welche zunächst in kragenförmiger und späterer ringförmiger Anordnung am Prozess der sekundären Septenbildung beteiligt sind, keine Auswirkungen auf die Sekretion von aktivem Cts1 in Sporidien von *U. maydis* haben (Zander *et al.*, 2016).

Abseits der Funktion bei der Bildung des sekundären Septums ist somit für Don1 und Don3 eine bisher unbekannte Aufgabe bezüglich der unkonventionellen Sekretion der Chitinase zu erwarten. Zusätzlich zur bekannten dualen Funktion von Don3 in der Auflösung der Kernhülle bei der offenen Mitose und der sekundären Septenbildung wird damit auf eine weitere Aktivität hingewiesen (Sandrock *et al.*, 2006). Für Don1 scheint ebenfalls eine weitere Funktion neben der spezifische Aktivierung der GTPase Cdc42 zur Anordnung des AMRs und der daraus resultierenden Initiierung des sekundären Septenaufbaus möglich (Böhmer *et al.*, 2008; Hlubek *et al.*, 2008; Mahler *et al.*, 2006). Dass eine der bekannten Funktionen von Don1 und Don3 den Zellzyklus beeinflusst bzw. die Deletionen von *don1* und *don3* den Zyklus der Zelle arretieren und die damit verbundene Abhängigkeit der Cts1-Sekretion zur Reduktion führt, kann ausgeschlossen werden. Die Charakterisierung der ausgeprägten Zellteilungsdefekte macht deutlich, dass insbesondere die Stämme der *don*-Mutanten vergleichsweise großflächige Zellaggregate mit hohen Zellzahlen ausbilden, was auf die Fortsetzung des Zellzyklus verweist (Abschnitt 2.3.1). Bezüglich der Septierung ist die sekundäre Septenbildung, anders als bei der primären Septenbildung, keine Voraussetzung für den Eintritt in einen neuen Zellzyklus (Böhmer *et al.*, 2008). Dies steht im Konsens mit der in dieser Arbeit ermittelten Zellzyklus-abhängigen Cts1-Sekretion, die aber unabhängig von der sekundären Septenbildung zu erfolgen scheint. Die Lokalisationsstudie von Cts1G in diversen Deletionsstämmen verdeutlicht zudem, dass der Transport der Chitinase zum Grenzbereich zwischen Mutter- und Tochterzelle nicht durch die Deletionen von *don1* und *don3* beeinträchtigt ist (Abb. 2.11).

Eine mögliche Bedingung, die für die effektive Cts1-Sekretion erreicht werden könnte, ist die Herstellung einer funktionalen Fragmentierungszone, welche sich in der Aktivität von Don1 und Don3 manifestiert. Die genauen Aufgaben von Don1 und Don3 und die exakten

Parameter, um eine funktionalen Fragmentierungszone zu definieren, sind zukünftig zu ermitteln. Mittels UV-Mutagenese mit anschließender Selektion auf *U. maydis*-Stämme mit reduzierter unkonventioneller Sekretion und Genomsequenzierung konnte in einem genetischen Screen bereits ein Kandidat identifiziert werden, der essentiell für die Cts1-Sekretion ist (Stock *et al.*, unveröffentlicht). Interessanterweise lokalisiert das Protein ebenfalls im Bereich zwischen Mutter- und Tochterzelle und bekräftigt damit die These des Aufbaus einer funktionalen Fragmentierungszone für die effektive Sekretion von aktivem Cts1. Dieses methodische Verfahren könnte in wiederholten Durchläufen weitere, sekretionsrelevante Komponenten identifizieren, deren Analysen Aufschluss über den spezifischen Sekretionsmechanismus in *U. maydis* liefern.

3.3.2 Die Kinase Don3 wird in geringen Mengen unkonventionell sekretiert

Da sowohl Don1 als auch Don3 innerhalb der Fragmentierungszone lokalisieren und damit Parallelen zur Cts1-Lokalisation aufweisen (Sandrock *et al.*, 2006; Schink und Bölker, 2009), kann über einen ähnlichen Sekretionsmechanismus der Don-Proteine wie für die Chitinase spekuliert werden. Nebenbei erscheint eine potentielle konventionelle Sekretion der Don-Proteine unwahrscheinlich, da für beide Aminosäuresequenzen kein N-terminales Signalpeptid vorhergesagt wird (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>). Das Charakteristikum der unkonventionellen Sekretion von Cts1 wurde mit der Generierung von Fusionsproteinen aus der β -Glukuronidase Gus und Don1 bzw. Don3 untersucht. Zuvor wurde die biologische Funktionalität der Proteine Don1 und Don3 hinsichtlich der sekundären Septenbildung bei N-terminaler Fusion von Gus nachgewiesen (Abb. 2.14).

Anhand der erzielten Ergebnisse kann auf eine unkonventionelle Sekretion von Don3 geschlossen werden. Für Don1 scheint es gleichermaßen möglich, jedoch kann Zellyse als Ursache für extrazelluläre Aktivität nicht vollständig ausgeschlossen werden, zumindest bei gleichzeitiger Deletion von intrinsischem *don1* (Abb. 2.15). Möglicherweise sind bei Stämmen mit *don1*-Deletion und Überproduktion der β -Glukuronidase die Zellen bzw. speziell die Zellaggregate der Lysekontrolle instabiler als beispielweise bei vergleichbaren Stämmen mit Deletion von *don3*. Durchgeführte Wachstumsanalysen mit den entsprechenden Stämmen zeigten diesbezüglich keine Auffälligkeiten in der Wachstumsrate (Daten nicht gezeigt). Die Einschätzung der unkonventionellen Sekretion ist zudem zu relativieren, da mittels Western Blot-Analyse keine Vollängenproteine für die Fusionsproteine mit Gus im zellfreien Kulturüberstand detektiert werden konnten. In Fusionsproteinen mit Gus könnte es zur Abspaltung der β -Glukuronidase kommen, die zur Freisetzung in den extrazellulären Raum führt, unabhängig vom restlichen Teil des Fusionsproteins.

Des Weiteren stellt die Präsenz von einzelner, vermutlich inaktivem Gus im zellfreien Kulturüberstand einen kritischen Punkt dar (Abb. 2.15 C, 2.16 G und 2.18 E). Die Freisetzung durch Zellyse erscheint dabei unwahrscheinlich, da dabei ebenso aktives Protein in den zellfreien Kulturüberstand gelangen würde und demzufolge jeweils extrazelluläre Gus-Aktivität messbar wäre (Tanudji, 2002). Der in Abschnitt 2.4.2 erwähnte Zusammenhang mit einem Sekretionsmechanismus, der ungefaltetes bzw. fehlgefaltetes und dadurch inaktives Protein aus der Zelle schleust, könnte hingegen einen Erklärungsansatz für extrazelluläres, freies Gus liefern: Der Prozess der „misfolding-associated protein secretion“ (MAPS) beschreibt einen unkonventionellen Exportmechanismus bei dem eine ER-assoziierte Deubiquitinase fehlgefaltete, cytosolische Proteine deubiquitiniert und an die ER-Membran rekrutiert. Mittels Einkapselung in späte Endosomen werden die deubiquitinierten Proteine zur Plasmamembran transferiert und in den extrazellulären Raum sekretiert (Lee *et al.*, 2016). Hinweise auf den in humanen Zelllinien erforschten MAPS-Mechanismus zeigen sich zudem in weiteren Säugerzellen. In Zelllinien aus Ovarien des Chinesischen Zwerghamsters (*engl.*: Chinese Hamster Ovary; CHO) deutet extrazelluläres, nicht-fluoreszierendes und demzufolge fehlgefaltetes Gfp, welches nachweislich nicht durch Zellyse, sondern mittels eines unkonventionellen Sekretionsereignisses exportiert wurde, ebenfalls auf den besagten Prozess hin, der zur Vermeidung von intrazellulärem Stress nicht-funktionale, cytosolische Proteine aus der Zelle entfernt (Lee *et al.*, 2016; Tanudji, 2002). Inwiefern dieser spezifische Sekretionsmechanismus zum Erhalt der Protein-Homöostase (Lee *et al.*, 2016) in *U. maydis* konserviert und auf die Freisetzung von vermutlich fehlgefaltetem Gus zurückzuführen ist, stellt eine zukünftig zu klärende Herausforderung dar.

Nachgewiesen scheint aber, dass die Fusion mit Cts1 und Don3 die unkonventionelle Sekretion von aktivem Gus vermittelt, da die entsprechenden Lysekontrollen kaum extrazelluläre Aktivitäten aufwiesen. Unter Vorbehalt kann dies auch für die Fusion mit Don1 angenommen werden. Eine Erklärung für die begünstigte, unkonventionelle Sekretion von Gus im Fusionsprotein wäre die Lokalisation der Fusionspartner in der Fragmentierungszone.

Des Weiteren müsste darauf geachtet werden, ob die gemessene Gus-Aktivität von unterschiedlichen Fusionsproteinen vergleichbar ist oder variierende Stabilitäten bzw. Anfälligkeiten für proteolytischen Abbau vorliegen. Ebenso sollten mögliche Inhibierungen, auf Grund der jeweiligen Stereometrie des Fusionspartners, berücksichtigt werden. Unterschiedliche, terminale Positionierungen von Gus im Fusionsprotein mit Cts1 konnten zumindest zeigen, dass die Gus-Aktivität hinsichtlich der Wahl des Terminus der Chitinase auf nahezu gleichem Level liegt und das Reporterprotein diesbezüglich nicht in der Aktivität inhibiert wird (Stock *et al.*, 2012). Dessen ungeachtet verweisen die gemessenen Aktivitäten vorläufig auf geringe Mengen an extrazellulären Don-Proteinen im Vergleich zu Cts1.

Eine Beobachtung, welche die Einschätzung der unkonventionellen Sekretion von Don1 befürwortet, stellt die Minderung der extrazellulären Aktivität bei Verwendung einer nicht-funktionalen FYVE-Domäne von Don1 dar. Bei nicht-funktionaler FYVE-Domäne scheint der Export des Fusionsproteins beeinträchtigt, was bei einem Prozess, der ausschließlich auf Zellyse beruht, nicht zu erwarten wäre (Abb. 2.16). Die Reduktion der potentiellen Don1-Sekretion ist vermutlich durch den gestörten, endosomalen Transport zur Fragmentierungszone, der durch die Bindung der FYVE-Domäne an Phosphatidylinositol 3-phosphate (PI3P) der Endosomen vermittelt wird, zu erklären (Schink und Bölker, 2009). Dabei wirkt sich die Abwesenheit der gesamten FYVE-Domäne etwas stärker aus als die gezielte Punktmutation in der FYVE-Domäne. Herauszustellen ist, dass die Überexpression von Don1 mit Punktmutation in der FYVE-Domäne, wie in Schink und Bölker (2009) beschrieben, anscheinend ausreichend ist, um den Zellteilungsdefekt aufzuheben (Abb. 2.16 B-D). Allerdings ist der Export des Fusionsproteins mit punktmutiertem Don1 dadurch scheinbar nicht effizient gewährleistet. Dies verdeutlicht einerseits, dass die Funktion in der sekundären Septenbildung von Don1 durch eine nicht-funktionale FYVE-Domäne nicht relevant gestört ist und lässt andererseits Spekulationen über weitere physiologische Prozesse zu, die neben der Lokalisation in der Fragmentierungszone für eine effiziente Sekretion benötigt werden.

Mögliche Gründe, warum Don3 und ggf. Don1 aus der Zelle exportiert werden, sind divers und nicht belegt. Wie auch anfangs für Cts1 gemutmaßt, kann es zum einen durch die Lokalisation in der Fragmentierungszone und der anschließenden Auflösung der Zone im Zuge der Trennung von Mutter- und Tochterzelle zur Anreicherung von Don1 und Don3 bzw. der Fusionsproteine mit Don1 und Don3 im extrazellulären Raum kommen. Bei einer solchen Freisetzung, die vorrangig als passives Ereignis und Nebenerscheinung zu bewerten ist, scheint eine Lokalisation von Don1 und Don3 außerhalb der Zelle keine funktionale Relevanz zu besitzen. Entgegen dieser Annahme würde sich eine weitere mögliche Begründung aus einer extrazellulären Funktion der Don-Proteine ergeben.

Als GEF enthält Don1 neben der typischen katalytischen DBL Homologie (DH)-Domäne und der Endosomen-bindenden FYVE Domäne eine lipidbindenden Pleckstrin Homologie (PH)-Domäne, die auf die Assoziation mit Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate der Plasmamembran hinweist (Harlan *et al.*, 1994; Lemmon, 2007; Rossman *et al.*, 2005; Schink und Bölker, 2009). Aufgrund der möglichen Verankerung an der Plasmamembran ist daher die Option einer zusätzlichen extrazellulären Funktion von Don1 zu relativieren.

Die Aminosäuresequenz von Don3 besitzt N-terminal eine Kinasedomäne und klassifiziert das Protein dadurch als Kinase (Böhmer *et al.*, 2008). Die Sekretion dieser Enzyme, welche extrazellulär agieren und Proteine phosphorylieren, wurde beispielsweise bei Säugerzellen beschrieben (Bordoli *et al.*, 2014; Tagliabracci *et al.*, 2012). Für das unkonventionell

sekretierte Protein Don3 könnte somit eine potentielle Kinase-Aktivität außerhalb der Zelle eine Ursache für die Freisetzung sein. Des Weiteren ist bekannt, dass das C-terminale T-Motiv zwar für die Lokalisation von Don3 in der Fragmentierungszone entscheidend ist, aber wie auch die FYVE-Domäne von Don1 nicht für die Funktion der sekundären Septenbildung benötigt wird (Sandrock *et al.*, 2006). Interessant in diesem Zusammenhang wäre, ob bei einem nicht funktionalen oder abwesenden T-Motiv neben der fehlenden Lokalisation in der Fragmentierungszone auch die unkonventionelle Sekretion von Don3 und damit die mögliche extrazelluläre Funktion beeinträchtigt werden.

Abschließend ist festzuhalten, dass die Sekretion von Don3 und potentiell von Don1 als unkonventionell klassifiziert werden kann. Die exakten Sekretionsmechanismen der Don-Proteine, die möglicherweise Parallelen zum Export von Cts1 aufweisen, sowie Gründe für die Freisetzung bleiben bis dato jedoch unklar.

3.3.3 Funktionales Don3 wird für die Sekretion von Cts1 benötigt

Neben der reduzierten chitinolytischen Aktivität wird der Einfluss von Don1 und Don3 auf die Sekretion von Cts1 ebenfalls durch die verringerte Aktivität der β -Glukuronidase in Fusionsproteinen mit Cts1 bei Deletion von *don1* und *don3* sichtbar (Abb. 2.18). Die Verwendung der Gus-Fusionsproteine verweist dabei unmittelbar auf die Eigenschaft des unkonventionellen Proteinexports, da die extrazellulär gemessene Gus-Aktivität als Indikator für die ER-unabhängigen Sekretion gilt (Abschnitt 1.2.2; Iturriaga *et al.*, 1989; Stock *et al.*, 2012). Der Effekt der *don3*-Deletion auf die Sekretion von freiem Cts1 und dem zugehörigen Gus-Fusionsprotein erscheint im Vergleich zur jeweiligen Positivkontrolle in etwa gleich stark, während die Deletion von *don1* Unterschiede in der Ausprägung der reduzierten Sekretion aufweist.

Mit enzymatischen Aktivitätstests nach induzierter Expression des Gens von Don3 wurde nachgewiesen, dass Don3 eine essentielle Komponente für die unkonventionelle Sekretion des Fusionsproteins mit Cts1 darstellt (Abb. 2.19). Durch Auflösung des Zellteilungsdefekts und Wiederherstellung der Sekretionsleistung im Stammhintergrund mit Deletion von *don3* zeigte sich die Proteinsynthese von funktionalem Don3 nach Induktion der Genexpression über einen induzierbaren Promotor. Die genaue Eigenschaft von Don3, welche zur Sekretion führt, ist dabei unbekannt. In vorherigen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die Don3-spezifische sekundäre Septenbildung zumindest keinen Einfluss auf die unkonventionellen Sekretion von freiem Cts1 hat (Abb. 2.13). Wie bereits erwähnt, scheint demnach eine weitere spezifische Funktion von Don3 zu existieren, um das Fusionsprotein mit Cts1 in *U. maydis* extrazellulär freizusetzen. Anhand des Lokalisationsmuster und der N-terminalen Kinasedomäne repräsentiert Don3 eine Kinase, die wahrscheinlich im

Grenzbereich zwischen Mutter- und Tochterzelle agiert. Es wird vermutet, dass die Kinase im Zuge der sekundären Septenbildung als eine Art Orientierungsprotein andere Proteine phosphoryliert (Böhmer *et al.*, 2008). Möglicherweise könnte durch die Kinaseaktivität in der räumlichen Nähe der Fragmentierungszone die unkonventionelle Sekretion von Cts1 ermöglicht werden. Ob Don3 einen direkten Interaktionspartner von Cts1 darstellt oder durch Phosphorylierung eine Signalkaskade initiiert wird, gilt es zu eruieren. Dazu existieren unterschiedliche Techniken, um Phosphorylierungsziele von Kinasen zu identifizieren und dadurch eine möglicherweise existierende direkte Interaktion von Don3 und Cts1 nachzuweisen (Xue und Tao, 2013).

Im Hinblick auf die Sekretion von freiem, aktivem Cts1 wurde zuvor die Durchquerung der Plasmamembran in der Fragmentierungszone diskutiert, die unabhängig von der physischen Trennung von Mutter- und Tochterzelle erfolgt (Abschnitt 3.2.2). Für die Sekretion des Fusionsproteins aus N-terminalem Gus und Cts1 ist ein ähnlicher Sekretionsprozess wahrscheinlich, aber nicht belegt. Theoretisch wären eine Lokalisation des Fusionsproteins in der Fragmentierungszone und eine, wie für freies Cts1 ursprünglich angenommene, Freisetzung durch Auflösung der Fragmentierungszone ebenfalls vorstellbar. Entscheidend ist, ob für Cts1 mit einem vergleichsweise großen Fusionspartner (Gus: 68 kDa) der aktive Durchtritt durch die Plasmamembran weiterhin gewährleistet ist, oder mit Auflösung der Fragmentierungszone eine eher passive Freisetzung vorherrscht, die von der physischen Zellteilung abhängt.

Um die Hypothese unterschiedlicher Freisetzungen zu überprüfen, sollte die Sekretion der Fusionsproteine in Mutanten mit Zellteilungsdefekt, aber funktionaler Sekretion von aktivem Cts1 untersucht werden. Stämme mit Deletion von *kex2* und *kin3* würden diesbezüglich einen passenden Stammhintergrund bieten. Der funktionale Co-Export eines scFv-Antikörperfragments (*engl.*: single-chain variable fragment; scFvs) mit Cts1 im *kex2*-Deletionshintergrund entkräftet die Annahme der Freisetzung durch Auflösung der Fragmentierungszone und bestärkt die Beobachtung der Sekretion unabhängig von physischer Trennung von Mutter- und Tochterzelle (Sarkari *et al.*, 2014). Allerdings gilt es bei Deletionen von *kex2* die damit einhergehende fehlende Aktivierung extrazellulärer Proteasen zu berücksichtigen. Interessant wäre zudem, ob die reduzierte, extrazelluläre Aktivität von Fusionsproteinen aus Cts1 und C-terminalen Gus (Stock *et al.*, 2012) in der eingeschränkten Durchquerung der Plasmamembran oder im ausbleibenden Transport und der fehlenden Lokalisation in der Fragmentierungszone begründet ist (Stock *et al.*, 2012). Sollte eine Zellteilungs-abhängige Freisetzung der Fusionsproteine nachgewiesen werden, würde der C-Terminus von Cts1 ähnlich wie für Don1 und Don3 wahrscheinlich eine Transport-relevante Funktion besitzen (Sandrock *et al.*, 2006; Schink und Bölker, 2009). Fluoreszenz-mikroskopische Analysen von Gus-Fusionsproteinen, die mit Fluoreszenzproteinen markiert

sind, könnten zusätzlich Aufschluss über die Lokalisation in der Fragmentierungszone geben.

3.4 Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die unkonventionelle Sekretion der Chitinase 1 aus *U. maydis* während des hefeartigen Wachstums in Abhängigkeit vom Zellzyklus, aber unabhängig von der physischen Trennung von Mutter- und Tochterzelle exportiert wird. Diesbezüglich scheint die Bildung des sekundären Septums keine essentielle Voraussetzung für die Sekretion darzustellen, obwohl die für die sekundäre Septenbildung benötigten Proteine Don1 und Don3 den Proteinexport beeinflussen. Zudem konnte für Don3 eine zusätzliche, bisher unbekannte, essentielle Funktion in der Sekretion von Cts1 nachgewiesen werden. Trotz dieser Zugewinne in der Charakterisierung der unkonventionellen Sekretion von Cts1 bleiben weitere Fragestellungen offen. Deren Beantwortungen stellen die zukünftigen Herausforderungen dar, um den unkonventionellen Sekretionsmechanismus von Cts1 vollständig aufzuklären. Weitere Erkenntnisse zum Export der Chitinase bieten in Bezug auf die biotechnologische Anwendbarkeit und die Etablierung des Pilzes als Expressionsplattform enormes Potential, um die bisher geringe Sekretionsleistung zu optimieren.

Eine zentrale Fragestellung beschäftigt sich damit, warum Cts1 ER-unabhängig sekretiert wird. In vorangegangenen Arbeiten wurden bereits unterschiedliche Argumente für das Vermeiden des ERs aufgeführt. Diese beinhalteten zum einen eine potentielle N-Glykosylierung von Cts1, auf Grund einer putativen Erkennungssequenz, und eine damit verbundene Inaktivierung des Enzyms. Zum anderen wurde als weiterer negativer Effekt die Bindung der Chitinase an ER-ständigen Glykoproteinen mit der Folge der Aggregatbildung bzw. deren Funktionsverlust durch Cts1-vermittelte Deglykosylierung thematisiert (Dissertationen J. Stock, 2013 und T. Langner, 2015). Für den unkonventionell sekretierten Fibroblasten-Wachstumsfaktor FGF2 wurde durch die Fusion mit einem Signalpeptid die extrazelluläre Freisetzung mittels des konventionellen Sekretionswegs artifiziell herbeigeführt. Das Fusionsprotein aus N-terminalem Signalpeptid und FGF2 wurde zwar effizient sekretiert, war aber in der Bindung an Heparansulfate auf der Zelloberfläche inhibiert. Der Funktionsverlust scheint auf künstlich herbeigeführte O-Glykosylierung während des konventionellen Sekretionswegs zurückzuführen sein (Wegehingel *et al.*, 2008). Um die Ursache für die unkonventionelle Sekretion und den Effekt der ER-/Golgi-Apparat-Lokalisation auf den Export von Cts1 zu ergründen, sollte durch Fusion mit einem Signalpeptid ebenfalls die konventionelle Sekretion der Chitinase angestrebt werden. Mittels enzymatischer Aktivitätstests und fluoreszenzmikroskopischer Analysen sollten diesbe-

zöglich vor allem die katalytische Funktionalität und zelluläre Lokalisation des Signalpeptid-enthaltenden Enzyms überprüft werden.

Auf Grund der Tatsache, dass Cts1 nicht im ER lokalisiert, entfällt die für konventionell sekretierte Proteine ER-assoziierte Proteinfaltung und Qualitätskontrolle (Hurtley und Helenius, 1989; Stock *et al.*, 2012). Daraus ergibt sich die zu klärende Thematik, wie und an welcher Stelle innerhalb der Zelle die Proteinfaltung und die anschließende Kontrolle des korrekten Faltungszustands für das sekretierte Protein sichergestellt werden. Möglicherweise könnten diese Mechanismen analog zu cytoplasmatischen Proteinen in einem Prozess erfolgen, der die direkte Kooperation von molekularen Chaperonen und dem Upiquitin/Proteasomen-System voraussetzt (Esser *et al.*, 2004). Für FGF2 wird die Translokation von gefaltetem Protein im Zusammenhang mit einem möglichen Kontrollmechanismus interpretiert, der lediglich korrekt gefaltetes Protein durch die Plasmamembran treten lässt. Anhand der Fusion einer Dihydrofolat-Reduktase (DHFR)-Domäne an FGF2, welche durch Zugabe eines Derivats der Folsäure irreversibel stabilisiert wird, konnte die Sekretion von gefaltetem Protein belegt werden (Backhaus *et al.*, 2004; Nickel, 2005). Ein vergleichbare Versuchsdurchführung, bei der DHFR an Cts1 fusioniert wird, könnte ebenfalls Aufschluss über den Faltungszustand der Chitinase bei Durchtritt der Plasmamembran geben.

Im Hinblick auf den Transportweg von Cts1 in Sporidien wird zwar eine Endosomen-unabhängige Route angedeutet, allerdings fehlen Hinweise auf alternative intrazelluläre Strukturen oder einen auf Diffusion basierenden Verlauf, die mit dem Sekretionsprozess verbunden sind. Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Makrophagen belegen für das unkonventionell sekretierte Zytokin IL-1 β die Internalisierung in endolysosomal-ähnlichen Vesikeln (Andrei *et al.*, 1999). Für *U. maydis* könnte mittels Elektronenmikroskopie die intrazelluläre Route von Cts1 abgebildet und ggf. Rückschlüsse auf vesikuläre und nicht-vesikuläre Transportmechanismen getroffen werden. Eine dadurch eventuell zu klärende Fragestellung wäre, ob Cts1 neben dem ER als weiteres Organell des konventionellen Sekretionswegs den Golgi-Apparat umgeht. Erste Versuche mit Immunogold-Markierungen von Cts1 verdeutlichten, dass es für den vielversprechenden Ansatz der Elektronenmikroskopie weiterer Etablierungsarbeit bedarf (Daten nicht gezeigt).

Des Weiteren bieten Inhibitorstudien das Potential zur Aufdeckung beteiligter Komponenten der unkonventionellen Sekretion. In Filamenten von *U. maydis* wurde durch die Verwendung von Benomyl darauf geschlossen, dass intakte Mikrotubuli für die Sekretion von Cts1 essentiell sind (Koepke *et al.*, 2011). Durch die Behandlung von Sporidien mit der Mikrotubuli-degradierenden Chemikalie würden die Sensitivität der Sekretion gegenüber Benomyl ähnliche Schlussfolgerungen zu lassen. Entsprechend würde bei einer festgestellten Insensitivität ein weiteres Indiz für einen alternativen Transportmechanismus

von Cts1 während des hefeartigen Wachstums gefunden werden. Zusätzlich könnte mit Hilfe des Aktin-Polymerisation-Inhibitors Latrunculin A eine weitere Struktur des Zytoskeletts auf eine Beteiligung an der Sekretion der Chitinase hin untersucht werden (Schuster *et al.*, 2012). Weitere Anwendungen mit Inhibitoren, wie Brefeldin A, welches den vesikulären Transport vom ER zum Golgi-Apparat blockiert, oder Bafilomycin A als spezifischer Inhibitor einer endosomalen Protonenpumpe und der Ansäuerung von Lysosomen könnten möglicherweise Erkenntnisse darüber liefern, welche zellulären Kompartimente für den Proteinexport benötigt werden (Grieve und Rabouille, 2011; Lee und Tannock, 2006; Yoshimori *et al.*, 1991). In *D. discoideum* wurde mittels pharmakologischer Inhibierung der Einsatz von ABC-Transportern für die unkonventionelle Sekretion des Acb1-Pendants AcbA ausgeschlossen (Kineth *et al.*, 2007). Die diesbezüglich im Schleimpilz verwendeten Pharmazeutika Vanadat, Verapamilhydrochlorid und Kortikosteron könnten in *U. maydis* hinsichtlich der für Cts1 prognostizierten Durchquerung der Plasmamembran im Bereich der Fragmentierungszone eine potentielle Beteiligung von ABC-Transportern ein- bzw. ausschließen.

Die Aussage der beeinträchtigten Sekretion in Stämmen mit Deletionen von *don1* und *don3* wurde anhand reduzierter extrazellulärer Aktivitäten getroffen und bezieht sich in der Analyse auf die Sekretion von aktivem Protein. Durch Western Blots der zellfreien Kulturüberstände wurden Vollängenproteine trotz intakter Sekretion nicht detektiert und lieferten somit keinen verlässlichen Vergleich zur Sekretion von aktivem und inaktivem Protein (Abb. 2.12 und 2.18). In einer massenspektrometrischen Sekretomanalyse der Stämme mit Deletion von *don1* und *don3* würde die Sekretion von sowohl aktivem als auch inaktivem Cts1 berücksichtigt werden. Dies könnte einerseits die beeinträchtigte Sekretion in *don*-Mutanten bestätigen oder ggf. auf eine fehlende Aktivierung von Cts1 schließen lassen. Mit der Metalloprotease Fly1 wurde bereits ein Faktor identifiziert, der für die Prozessierung und die dadurch hergestellte vollständige extrazelluläre Aktivität der Chitinase benötigt wird (Ökmen *et al.*, 2018). Allerdings steht der These einer Cts1-Aktivierung die intrazelluläre katalytische Funktionalität der Chitinase in *don*- und *fly1*-Mutanten gegenüber, weshalb die Durchführung der Massenspektrometrie zur Aufklärung umso mehr an Relevanz gewinnt. Diesbezüglich sollte zudem die Kinase-Aktivität von Don3, welche den möglichen Einfluss von Don3 auf die Sekretion von aktivem Cts1 erklärt, hinsichtlich der von der Kinase phosphorylierten Proteine näher untersucht werden.

Die vollständige Aufklärung der unkonventionellen Sekretion von Cts1 in *U. maydis* könnte dazu beitragen, ähnliche Mechanismen für Zellzyklus-abhängig exportierte Proteine aus anderen, durch Knospung vermehrende Pilze aufzudecken und damit eine potentiell konservierte Sekretionsstrategie zu identifizieren.

4. Material und Methoden

4.1 Material und Bezugsquellen

4.1.1 Chemikalien, Enzyme, Kits

Chemikalien

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien wurden in *pro analysi* (p.a.)-Qualität von nachfolgend genannten Firmen bezogen: Acros Organics, Alfa Aesar, Ambion, Amersham, Apollo Scientific, Applichem GmbH, Applied Biosystems, Biomol GmbH, BioRad, Biozym Scientific GmbH, Boehringer, Caelo, Calbiochem, Carl Roth, Chem Solute/T.H. Geyer, Chimica, Difco, Duchefa Biochemicals, Enzo Life Science, FALKON, Ferak Berlin, Fermentas, Finnzymes, Fisher BioReagents, Fisher Chemical, Fluka Analytical, GE Healthcare, Genomed, Gerbu, Grüssing GmbH, J.T. Baker, Janssen Chimica, LKB, Merck, MP Biomedicals, Novozymes, Oxoid, Perkins Elmer, Pharmacia Biotech, Promega, Riedel-de-Haën, Roche, Serva, Sigma-Aldrich, Thermo Fisher Scientific, VWR Chemicals.

Enzyme

Tabelle 4.1: In dieser Arbeit verwendete Enzyme

Name	Verwendungszweck	Bezugsquelle
Alkalische Phosphatase	Dephosphorylierung von DNS-Fragmenten (Klonierung)	Roche
Lysozym	Plasmidpräparation	Merck
Novozym 234	Protoplastierung von <i>U. maydis</i>	Novo Nordisc
Glucanex	Protoplastierung von <i>U. maydis</i>	Merck
Phusion DNS-Polymerase	Amplifikation von DNS (PCR)	Finnzymes
Restriktionsendonukleasen	Restriktion von DNS (Klonierung)	New England Biolabs (NEB)
RNase A	Degradierung von RNS (Plasmidisolierung, Isolierung genomischer DNS)	Boehringer Mannheim
T4-DNS-Ligase	Ligation von DNS-Fragmenten	Roche
Taq DNS-Polymerase	Amplifikation von DNS (PCR)	interne Laborproduktion
Quick-DNS-Ligase	Ligation von DNS-Fragmenten	New England Biolabs (NEB)

Kits

Tabelle 4.2: In dieser Arbeit verwendete Enzyme

Name	Verwendung	Bezugsquelle
AceGlow™ Chemiluminescence Substrat	Detektion im Western Blot (chemilumineszentes Substrat für Meerrettichperoxidase, HRP)	VWR
CDP-Star®	Detektion im Southern Blot (chemilumineszentes Substrat für alkalische Phosphatase, AP)	Roche
DNA, RNA, and protein purification	hochreine Plasmidpräparation	Macherey-Nagel
GeneJET Gel Extraction and DNA Cleanup Micro Kit	Reinigung von PCR-Produkten	Thermo Scientific
High Pure Plasmid Isolation Kit	hochreine Plasmidpräparation	Roche
High Pure PCR Product purification Kit	Reinigung von PCR-Produkten, Elution von DNS-Fragmenten aus Agarosegelen	Roche
JETsorb Gel Extraction Kit	Elution von DNS-Fragmenten aus Agarosegelen	Genomed
JETquick General DNA Clean-Up Kit	Reinigung von Plasmiden (z.B. für Sequenzierung)	Genomed
JETquick Plasmid Miniprep Spin Kit	hochreine Plasmidpräparation	Genomed
Monarch DNA Gel Extraction Kit	Elution von DNS-Fragmenten aus Agarosegelen	New England Biolabs (NEB)
PCR DIG Labeling Mix	Herstellung von PCR-Sonden durch Dioxigenin-Markierung (Southern Blot)	Roche
Plasmid Midi Kit (100)	hochreine Plasmidpräparation	Qiagen
SureClean	Reinigung von PCR-Produkten	Bioline
TOPO-TA Cloning Kit	Plasmidklonierung	Thermo Fisher Scientific

4.1.2 Lösungen, Puffer und Medien

Lösungen und Puffer

Die in dieser Arbeit verwendeten Standard-Lösungen und Standard-Puffer sind nach den Ausführungen in Ausubel *et al.* (1987) und Sambrook *et al.* (1989) hergestellt worden. Bei Verwendung von speziellen Lösungen oder Puffern ist deren Herstellung bei den jeweiligen Methoden beschrieben.

Medien

Um die Kultivierung der verwendeten Organismen unter sterilen Bedingungen zu gewährleisten, wurden die Nährmedien für 5 min bei 121°C autoklaviert.

Für die Anzucht von *Escherichia coli* (*E. coli*) wurden folgende Medien angesetzt:

dYT-Flüssigmedium

(Sambrook *et al.*, 1989)

1,6 % (w/v) Bacto Trypton
1,0 % (w/v) Hefeextrakt
0,5 % (w/v) NaCl
Mit H₂O_{bid.} auffüllen und autoklavieren.

Zugabe von Antibiotika erfolgte nach Autoklavieren und Abkühlen (ca. 60 °C) unter sterilen Bedingungen.

YT-Festmedium

(Sambrook *et al.*, 1989)

1,6 % (w/v) Bacto Trypton
1,0 % (w/v) Hefeextrakt
0,5 % (w/v) NaCl
1,5 % (w/v) Agar
Mit H₂O_{bid.} auffüllen und autoklavieren.

Zugabe von Antibiotika erfolgte nach Autoklavieren und Abkühlen (ca. 60 °C) unter sterilen Bedingungen.

Für die Kultivierung von *Ustilago maydis* (*U. maydis*) wurden folgende Medien verwendet:

AM-Flüssigmedium

0,3 % (w/v) (NH₄)₂SO₄
6,25 % (v/v) Salz-Lösung
Mit NaOH pH-Wert auf 7,0 einstellen, mit H₂O_{bid.} auffüllen und autoklavieren.

Zugabe von 50 % Glukose-Lösung [1 % Endkonz.] erfolgte nach Autoklavieren und Abkühlen (ca. 60 °C) unter sterilen Bedingungen.

NM-Flüssigmedium

(Holliday, 1974)

0,3 % (w/v) KNO₃
6,25 % (v/v) Salz-Lösung
Mit NaOH pH-Wert auf 7,0 einstellen, mit H₂O_{bid.} auffüllen und autoklavieren.

Zugabe von 50 % Glukose-Lösung [1 % Endkonz.] erfolgte nach Autoklavieren und Abkühlen (ca. 60 °C) unter sterilen Bedingungen.

CM-Festmedium

(Banuett und Herskowitz, 1989; Holliday, 1974)

0,25 % (w/v) Casaminosäuren
0,05 % (w/v) DNS degr. Free Acid
0,1 % (w/v) Hefeextrakt
1,0 % (v/v) Vitamin-Lösung
6,25 % (v/v) Salz-Lösung
2 % (w/v) Agar
Mit NaOH pH-Wert auf 7,0 einstellen, mit H₂O_{bid.} auffüllen und autoklavieren.

Zugabe von 50 % Glukose-Lösung [1 % Endkonz.] und ggf. Antibiotika erfolgte nach Autoklavieren und Abkühlen (ca. 60 °C) unter sterilen Bedingungen.

Regenerationsagar (light)

(Schulz *et al.*, 1990)

18,22 % (w/v) Sorbitol
1,0 % (w/v) Hefeextrakt
0,4 % (w/v) Bacto Pepton
0,4 % (w/v) Saccharose
Mit H₂O_{bid.} auffüllen und autoklavieren.

Zugabe von Antibiotika erfolgte nach Autoklavieren und Abkühlen (ca. 60 °C) unter sterilen Bedingungen.

CM-Flüssigmedium

(Banuett und Herskowitz, 1989; Holliday, 1974)

0,15 % (w/v) NH₄NO₃
0,25 % (w/v) Casaminosäuren
0,05 % (w/v) DNS degr. Free Acid
0,1 % (w/v) Hefeextrakt
1,0 % (v/v) Vitamin-Lösung
6,25 % (v/v) Salz-Lösung
Mit NaOH pH-Wert auf 7,0 einstellen, mit H₂O_{bid.} auffüllen und autoklavieren.

Zugabe von 50 % Glukose-Lösung [1 % Endkonz.] erfolgte nach Autoklavieren und Abkühlen (ca. 60 °C) unter sterilen Bedingungen.

Salz-Lösung

(Holliday, 1974)

1,6 % (w/v) KH₂PO₄
4 % (w/v) Na₂SO₄
0,8 % (w/v) KCl
0,4 % (w/v) MgSO₄ x 7 H₂O
0,132 % (w/v) CaCl₂ x 2 H₂O
0,8 % (v/v) Spurenelement-Lösung
Mit H₂O_{bid.} auffüllen und sterilfiltrieren

Spurenelement-Lösung

(Holliday, 1974)

0,00006 % (w/v) H₃BO₃
0,00014 % (w/v) MnCl₂ x 4 H₂O
0,0004 % (w/v) ZnCl₂
0,00004 % (w/v) NaMoO₄ x 2 H₂O
0,0001 % (w/v) FeCl₃ x 6 H₂O
0,00004 % (w/v) CuSO₄ x 5 H₂O
Mit H₂O_{bid.} auffüllen und sterilfiltrieren

NSY-Glycerin

0,8 % (w/v) Nutrient Broth
0,1 % (w/v) Hefeextrakt
0,5 % (w/v) Saccharose
80 % (v/v) 87 % Glycerin
Mit H₂O_{bid.} auffüllen und sterilfiltrieren

Vitamin-Lösung

(Holliday, 1974)

0,0001 % (w/v) Thiamin
 0,00002 % (w/v) Calciumpanthothenat
 0,00005 % (w/v) p-Aminobenzoessäure
 0,00002 % (w/v) Nikotinsäure
 0,00002 % (w/v) Cholinchlorid
 0,00004 % (w/v) myo-Inositol
 0,00005 % (w/v) Folsäure
 Mit H₂O_{bid.} auffüllen und sterilfiltrieren

YEPS_{light}-Festmedium

(modifiziert nach Tsukuda *et al.*, 1988)

1,0 % (w/v) Hefeextrakt
 0,4 % (w/v) Bacto Pepton
 0,4 % (w/v) Saccharose
 1,3 % (w/v) Agar
 Mit NaOH pH-Wert auf 7,0 einstellen, mit H₂O_{bid.} auffüllen und autoklavieren.

Zugabe von ggf. Antibiotika erfolgte nach Autoklavieren und Abkühlen (ca. 60 °C) unter sterilen Bedingungen.

4.1.3 Antibiotika

Tabelle 4.3: Zur Selektion in *E. coli* verwendete Antibiotika

Antibiotikum	Massenkonzentration im YT-Festmedium	Massenkonzentration im dYT-Flüssigmedium
Ampicillin	100 µg/ml	100 µg/ml
Kanamycin	50 µg/ml	25 µg/ml
Chloramphenicol	34 µg/ml	34 µg/ml

Tabelle 4.4: Zur Selektion in *U. maydis* verwendete Antibiotika

Antibiotikum	Massenkonzentration im CM/YEPS _{light} -Festmedium	Massenkonzentration im Regenerationsagar _{light} (untere Phase)
Hygromycin	200 µg/ml	400 µg/ml
Carboxin	2 µg/ml	4 µg/ml
Nourseothricin	150 µg/ml	300 µg/ml
Geneticin	500 µg/ml	1000 µg/ml

4.1.4 Oligonukleotide

Die in dieser Arbeit eingesetzten Oligonukleotide wurden als Auftragsarbeit von der Firma Metabion AG synthetisiert.

Tabelle 4.5: Zur Klonierung verwendete Oligonukleotide

Kennung	DNS-Sequenz (5' - 3' Orientierung)
DD284	CACGCTCTCCGTGCATTTAAATTTCTTGGCGGGCGTCGCGG
DD285	CACGCTCTCCGGCCCATGGTGGACAGCAGCCTCTAGC
DD286	CGCGCTCTCCCCTGAGTTTCAGTGCAGTTTCG

DD287	CGCGCTCTCCGACATTTAAATCAACCACGTCAAGTCTGAGGC
DD296	CACGCTCTCCGTGCAATATTCGTGCTGCTCAAACCACCACC
DD297	CACGCTCTCCGGCCGGTTGGACTTGCTTGTACGCGG
DD299	ACCGCTCTCCGACAATATTTGTTACGCTTTGCTAGACCGACCG
DD325	ATCTCGAGAATATTCGACGTACATCTGCTTTGC
DD326	TAGGCCATCTAGGCCAGTTGTGACAAGGGGCCAAGATGG
DD327	ATGGCCTGAGTGCCAGTAGGGTCCAACGTCTACG
DD328	ATGAGCTCAATATTGCACGACCTCGACATGGCC
DD333	GAAGCTCTCCCCTAACTCGTTCTTGGAGGCAGAAGACCACTCG
DD637	GGTCTCGCCTGCAATATTGCTCGCTGCATCCACGG
DD638	GGTCTCCAGGCCGATGGGTGGTGAGGCCAGAGAAAGC
DD639	GGTCTCCGGCCACTAAGCATCTCCCTACATTCG
DD640	GGTCTCGCTGCAATATTGCTGACTTTGGTCTGTCGAGGG
DD761	TTGGTCTCGTTTCGTTCTTCTTGGCCTGG
DD762	TTGGTCTCCGAAACCAACCCGTACCTACTGTCCATCG
DD878	GGTCTCGCCTGCAATATTCGTCAGCCGATCGACTTTGC
DD879	GGTCTCCAGGCCGATGATATATAGCGATGGAACGC
DD880	GGTCTCCGGCCATGTTTGGACGTAAGTACTCCAGG
DD881	GGTCTCGCTGCAATATTCCGAGAACGAGCTTGTGCG
MB76	TTGGCGCGCCATGGCTTCCGCCTCCAGG
MB77	CGGGCCCCTATTTGGAAGTGCTTTTCG
MB78	TTGGCGCGCCATGCCAACCTACCACTACC
MB79	CGGGCCCTCAGTAGCCCATCCATCG
MB436	CGGGCCCCTATGGTACCCACACGGGC
MB437	CGTAAGCATCATTGCGCACTTTGTGGTCAGG
MB448	CCTGACCACAAAGTGCGCAATGATGCTTACG
MB629	CATGCCATGGATGTTTGGACGTAAGTACTCCAGG
MB630	CATGCCATGGTGCCCGGTTGGCCGCCTTGAGGCCGTTCTTGACATTGTCC
MB767	GGTCTCGCCTGCAATATTCAGCCTCGCGAGTTTTTCCTTTTACC
MB768	GGTCTCCAGGCCCTATGGTACCCACACGGGCGC

MB769	GGTCTCCGGCCATGCTCGCAAGTCATGTGC
MB770	GGTCTCGCTGCAATATTGAAGCACTTCGCAAACGG
MB772	TTGGCGCGCCGACAGCCGTGCGGACAAGTGC
MB773	CGGGCCCCTAAAAGACACTGTCGTAGCATCC
MB877	TTTTCTTTTGCGGCCGCTTTACTTGTACAGCTCGTCCATGC
MB879	TCCCCCGGGGTGCAGGAATTCGATCCCATGGATGGGTACGATTCACCACCAATGG

Tabelle 4.6: Zur Sequenzierung verwendete Oligonukleotide

Kennung	DNS-Sequenz (5' - 3' Orientierung)
DD55	GGTCTCCAGGCCTGTATAATTGCGGGACTC
DD104	CGCTCGTTGTCCTGGAAG
DD105	CTCGATGCTGTCCTCGTC
DD763	GGTCTCGCCTGCAATATTTACCACCAATGGTGCGG
DD865	TCCTCGACCCAACCTGAGTCTCC
MB76	TTGGCGCGCCATGGCTTCCGCTCCAGG
MB80	TCTATCGTCGTCAACTGC
MB81	CTGCAACTGTCAAGAAGC
MB82	AAGATGCCGCGAAGACG
MB86	TTGGTGTGCGCACAGC
MB87	GCAGCCGCTTCCTCCACC
MB531	CGATCGCATCACTCGAAGCGC
MB532	GCAGCAGATCAATCCGTCGGG
MB772	TTGGCGCGCCGACAGCCGTGCGGACAAGTGC
MB773	CGGGCCCCTAAAAGACACTGTCGTAGCATCC
MF168	ACTAGATCCGATGATAAGCTG
MF434	CTACCTGAGCACCCAGTC
MF502	ACGACGTTGTAACGACGGCCAG
MF503	TTCACACAGGAAACAGCTATGACC
MF771	ACCTCGCTCGATGCTGAC

MF772	GCTCTCGAGATGGTGAGCAAGGGCGAG
MF964	GCGCAACTGTTGGGAAGG
RL20	GGA CTGGCATGAACTTCG
RL182	CACCCGCAGTTCGAGAAG
RL293	AAGTCTAGAGGTCACGATTCACCACC
RL301	CGTACGATGGCCACCAAGCCAACCTG
RL383	CACAGAAGCCTGCGCAAG
RL393	TCTGCGCGGCAGAGACG
RL405	AAGTCTAGAGAGAACGACGGTTGGATGG
RL406	AAGTCTAGAGATTTCCGCCGTTCTGTGG
RL701	GGTCTCGCTGCAATGGTGAGCAAGGGCGAGG
SL144	AACAAGGCGTCTGCTTCGAG
SL929	CCTGGAGGTGGTAACGTG

4.1.5 Plasmide

Die in dieser Arbeit verwendeten und hergestellten Plasmide werden in der Plasmidsammlung des Instituts für Mikrobiologie an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf unter der Leitung von Prof. Dr. Michael Feldbrügge gelagert und sind den Mitarbeitern frei zugänglich.

In dieser Arbeit verwendete Ausgangsplasmide

pCR2.1-TOPO (Thermo Fisher Scientific)

Das Plasmid wurde zur Integration von schwer zu klonierenden PCR-Produkten angewendet. PCR-Produkte, die mit der Taq-Polymerase hergestellt worden sind, können mittels Topoisomeraseaktivität in den Vektor eingebracht werden. Durch das Gen *lacZ* und den entsprechenden Promotor kann nach erfolgter *E. coli*-Transformation die blau/weiß-Selektion angewendet werden. Enthält zur weiteren Selektion auf *E. coli*-Transformaten Resistenzkassetten gegenüber den Antibiotika Ampicillin und Kanamycin.

pPotef:Gfp_CbxR (pUMa43)

Für die Insertion am *ip (cbx)*-Lokus von *U. maydis* enthält das Plasmid eine punktmutierte Gensequenz der Eisen-Schwefel-Proteinuntereinheit der Succinat-Dehydrogenase (*ip*), die

zur Resistenz gegenüber dem Antibiotikum Carboxin führt (Broomfield und Hargreaves, 1992). Durch Linearisierung des Plasmids im Gen mittels Restriktion mit *AgeI* oder *SspI* und homologe Rekombination am *ip (cbx)*-Lokus kann auf positive *U. maydis*-Transformanten selektiert werden. Das Plasmid enthält die Sequenz des konstitutiv überexprimierenden Promotors P_{otef} (Spellig *et al.*, 1996) und die Gensequenz von eGfp (720 bp) mit am 3'-Ende lokalisiertem T_{nos} -Terminator. Das Plasmid diente als Vektorrückgrat für das Plasmid pUMa3143. Zur Selektion auf *E. coli*-Transformaten besitzt das Plasmid eine Resistenzkassette gegenüber dem Antibiotikum Ampicillin.

pHygR (pUMa194, Kämper, 2004)

Das Plasmid enthält zur Selektion auf *U. maydis*-Transformanten eine Hygromycin-Resistenzkassette mit konstitutivem P_{hsp70} -Promotor und T_{nos} -Terminator (1884 bp). Mittels flankierenden *SfiI*-Restriktionsstellen wurde die Hygromycin-Resistenzkassette isoliert und zur Generierung des Plasmids pUMa2532 verwendet. Zusätzlich besitzt das Plasmid zur Selektion auf *E. coli*-Transformaten eine Resistenzkassette gegenüber dem Antibiotikum Ampicillin.

pCts1G_NatR (pUMa828, Koepke *et al.*, 2011)

Homologe Sequenzen stromaufwärts (3350 bp) vom 3'-Ende des offenen Leserahmens (*engl.*: open reading frame; ORF) und stromabwärts (1060 bp) der 3'-Untranslatierten Region (3'-UTR) von *cts1* (*umag_10419*) flankieren das Gen für eGfp (Clontech, Brachmann, 2004) im Plasmid und ermöglichen die C-terminale Fusion von eGfp an Cts1 am nativen Locus. Die Transkription des Fusionsgens wird durch eine T_{nos} -Sequenz terminiert. Zur Selektion auf positive Transformanten enthält das Plasmid die Resistenzkassetten gegenüber den Antibiotika Ampicillin (*E. coli*) und Nourseothrizin (*U. maydis*).

pDestI (pUMa1467, Terfrüchte *et al.*, 2013)

Derivat des kommerziell erwerblichen Plasmids pUC57 mit Resistenzkassette gegenüber dem Antibiotikum Ampicillin zur Selektion auf *E. coli*-Transformaten. Zusätzlich kann durch die kodierte Gensequenz von LacZ die blau/weiß-Selektion angewendet werden. Durch zwei *BsaI*-Restriktionsstellen im Gen wird bei *BsaI*-basierter Insertion des ORFs von LacZ zerstört und durch ausbleibende LacZ-Synthese das Substrat X-Gal nicht zum blauen Produkt umgesetzt. Das Plasmid diente bei Golden-Gate-Klonierungen mit *BsaI* vielfach als Vektorrückgrat.

pStorI (pUMa1507, Terfrüchte *et al.*, 2013)

Zur Selektion auf *U. maydis*-Transformanten besitzt das Plasmid eine Hygromycin-Resistenzkassette mit konstitutivem P_{hsp70} -Promotor und T_{nos} -Terminator (2424 bp). Mittels flankierenden *Bsal*-Restriktionsstellen wurde bei Golden-Gate-Klonierungen mit *Bsal* die Hygromycin-Resistenzkassette isoliert und vielfach zur Herstellung von Plasmiden eingesetzt. Das Plasmid enthält für die Selektion auf *E. coli*-Transformanten eine Resistenzkassette gegenüber dem Antibiotikum Geneticin.

pKex2 Δ _HygR (pUMa1530, Sarkari *et al.*, 2014)

Zur Deletion des Gens *kex2* (*umag_02843*) wurden homologe Sequenzen stromaufwärts (1006 bp) und stromabwärts (969 bp) des ORFs um die Resistenzkassette von Hygromycin kloniert. Für die Selektion auf *E. coli*-Transformanten besitzt das Plasmid eine Resistenzkassette gegenüber dem Antibiotikum Ampicillin.

pStor-Gfp_HygR (pUMa1779)

Das Plasmid enthält die Gensequenz für eGfp (Clontech, Brachmann 2004) mit der Transkriptions-Terminationssequenz T_{nos} und zur Selektion auf *U. maydis*-Transformanten die Hygromycin-Resistenzkassette aus pUMa1467. Mittels flankierender *Bsal*-Restriktionsstellen wurde das Konstrukt (3742 bp) zur Generierung des Plasmids pUMa2799 verwendet. Für die Selektion auf *E. coli*-Transformanten besitzt das Plasmid eine Resistenzkassette gegenüber dem Antibiotikum Geneticin.

pStorII (pUMa2074, Aschenbroich *et al.*, 2018)

Bei diesem Plasmid handelt es sich um ein Derivat des kommerziell erwerblichen Plasmids pUC57. Das Plasmid besitzt zur Selektion auf *E. coli*-Transformanten eine Resistenzkassette gegenüber dem Antibiotikum Ampicillin. Durch die kodierte Gensequenz von LacZ kann zudem die blau/weiß-Selektion angewendet werden. Mittels zwei *SapI*-Restriktionsstellen im Gen wird bei *SapI*-basierter Insertion der ORF von LacZ zerstört und durch ausbleibende LacZ-Synthese das Substrat X-Gal nicht zum blauen Produkt umgesetzt. Das Plasmid diente bei Golden-Gate-Klonierungen mit *SapI* vielfach als Vektorrückgrat.

pRabX1Poma:Gus-SHH-Cts1 ubi1 3'UTR_CbxR (pUMa2113, Sarkari *et al.*, 2014)

Für die Insertion am *ip* (*cbx*)-Lokus von *U. maydis* verfügt das Plasmid über eine punktmutierte Gensequenz der Eisen-Schwefel-Proteinuntereinheit der Succinat-Dehydrogenase (*ip*), die zur Resistenz gegenüber dem Antibiotikum Carboxin führt. Durch Linearisierung des Plasmids im Gen mittels Restriktion mit *AgeI* oder *SspI* und homologe Rekombination am *ip* (*cbx*)-Lokus kann auf positive *U. maydis*-Transformanten selektiert werden. Das Plasmid

trägt die Sequenz des konstitutiv überexprimierenden, synthetischen Promotors P_{oma} (8 x stromaufwärtsliegende Aktivierungssequenzen (*engl.*: upstream activating sequences; UAS) des *prf1*-Promotors mit *mfa1*-Promotors; Flor-Parra *et al.*, 2006; Hartmann *et al.*, 1999) sowie die Sequenzen für ein Fusionsprotein aus N-terminaler, bakterieller β -Glukuronidase (Gus, 1809 bp) und C-terminalem Cts1 (*umag_10419*, 1586 bp) mit intermediären Strep- (2 x 33 bp), HA- (3 x 24 bp) und His-Tag (30 bp). Am 3'-Ende der Sequenz des Fusionsgens sind Abschnitte mit der 3'-UTR von *ubi1* und eine T_{nos} -Sequenz lokalisiert. Durch Restriktion mit *Ascl* und *Apal* kann die Gensequenz von Cts1 entfernt werden. Das linearisierte Plasmid wurde zur Insertion der Gensequenz des Fusionsproteins Gus-Cts1 am *ip (cbx)*-Lokus von *U. maydis* verwendet und diente vielfach als Vektorrückgrat zur Herstellung von Plasmiden mit der Sequenz für Fusionproteine mit N-terminalem Gus. Zur Selektion auf *E. coli*-Transformaten enthält das Plasmid eine Resistenzkassette gegenüber dem Antibiotikum Ampicillin.

pDestII (pUMa2242, Aschenbroich *et al.*, 2018)

Das Plasmid enthält zur Selektion auf *U. maydis*-Transformanten eine Hygromycin-Resistenzkassette mit konstitutivem P_{hsp70} -Promotor und T_{nos} -Terminator. Durch die flankierenden *SapI*-Restriktionsstellen wurde die Hygromycin-Resistenzkassette bei Golden-Gate-Klonierungen mit *SapI* isoliert. Das Plasmid diente vielfach zur Herstellung von Plasmiden. Für die Selektion auf *E. coli*-Transformaten besitzt das Plasmid eine Resistenzkassette gegenüber dem Antibiotikum Geneticin.

pRabX1Poma:Gus-SHH_CbxR (pUMa2335, Aschenbroich *et al.*, 2018)

Die punktmutierte Gensequenz der Eisen-Schwefel-Proteinuntereinheit der Succinat-Dehydrogenase (*ip*), die zur Resistenz gegenüber dem Antibiotikum Carboxin führt, ermöglicht die Insertion des Plasmids am *ip (cbx)*-Lokus von *U. maydis*. Das Plasmid besitzt die Sequenz des konstitutiv überexprimierenden, synthetischen Promotors P_{oma} und die Gensequenz der bakteriellen β -Glukuronidase Gus (1809 bp) mit Strep- (2 x 33 bp), HA- (3 x 24 bp) und His-Tag (30 bp). Am 3'-Ende der Sequenz des Fusionsproteins sind Abschnitte mit der 3'-UTR von *ubi1* und eine T_{nos} -Sequenz lokalisiert. Zur Selektion auf *E. coli*-Transformaten besitzt das Plasmid eine Resistenzkassette gegenüber dem Antibiotikum Ampicillin.

pDon1 Δ _HygR (pUMa2412, Zander *et al.*, 2016)

Für die Deletion des Gens von Don1 (*umag_10125*) wurden homologe Sequenzen stromaufwärts (1274 bp) und stromabwärts (713 bp) des ORFs um die Resistenzkassette von Hygromycin kloniert. Mittels Golden-Gate-Klonierung wurde aus dem Plasmid

pUMa1507 die Hygromycin-Resistenzkassette zur Selektion auf *U. maydis* und die o.g. homologen Sequenzen in das Plasmid pUMa1467 integriert. Zur Selektion auf *E. coli*-Transformanten enthält das Plasmid die Resistenzkassette gegenüber dem Antibiotikum Ampicillin.

In dieser Arbeit hergestellte Plasmide

pGrh1Δ_HygR (pUMa2520)

Um die Deletion des Gens von Grh1 (*umag_01076*) zu erreichen, enthält das Plasmid die stromaufwärts (1563 bp) und stromabwärts (901 bp) flankierenden, homologen Sequenzen des ORFs. Mittels *SapI*-vermittelter Golden-Gate-Klonierung wurde aus dem Plasmid pUMa2242 die Hygromycin-Resistenzkassette zur Selektion auf *U. maydis* und die o.g. homologen Sequenzen in das Plasmid pUMa2074 integriert. Zur Selektion auf *E. coli*-Transformanten enthält das Plasmid die Resistenzkassette gegenüber dem Antibiotikum Ampicillin.

pSpo14Δ_HygR (pUMa2523)

Das Plasmid wurde zur Deletion des Gens von Spo14 (*umag_00370*) eingesetzt und besitzt die stromaufwärts (1283 bp) und stromabwärts (1211 bp) gelegenen Flanken des ORFs. Zur Selektion auf *U. maydis*-Transformanten wurde die Hygromycin-Resistenzkassette aus dem Plasmid pUMa2242 zusammen mit den o.g. Flanken mittels *SapI*-vermittelter Golden-Gate-Klonierung in das Plasmid pUMa2074 integriert. Zur Selektion auf *E. coli*-Transformanten enthält das Plasmid die Resistenzkassette gegenüber dem Antibiotikum Ampicillin.

pPex3Δ_HygR (pUMa2532)

Mittels dieses Plasmids wurde das Gen *pex3* (*umag_06200*) deletiert. Homologe Regionen stromaufwärts (1111 bp) und stromabwärts (885 bp) des ORFs wurden jeweils mit Sequenzen des Vektorrückgrats aus zuvor generierten pCR2.1®-TOPO-Derivaten isoliert und mit der Resistenzkassette für Hygromycin aus pUMa194 in einer 3-Fragment-Ligation zum Plasmid kloniert. Aus dem Plasmid pCR2.1-TOPO enthält das generierte Plasmid zur Selektion auf *E. coli*-Transformanten die Resistenzkassette gegenüber dem Antibiotikum Ampicillin.

pDon3Δ_HygR (pUMa2717, Aschenbroich et al., 2018)

Für die Deletion des Gens von Don3 (*umag_05543*) wurden die homologen Sequenzen stromaufwärts (928 bp) und stromabwärts (935 bp) des ORFs um die Resistenzkassette von Hygromycin kloniert. Mittels *BsaI*-vermittelter Golden-Gate-Klonierung wurde aus dem Plasmid pUMa1507 die Hygromycin-Resistenzkassette zur Selektion auf *U. maydis*-

Transformanten und die o.g. homologen Sequenzen in das Plasmid pUMa1467 integriert. Zur Selektion auf *E. coli*-Transformaten enthält das Plasmid die Resistenzkassette gegenüber dem Antibiotikum Ampicillin.

pPcts1:Gfp_HygR (pUMa2799)

Mittels dieses Plasmids wurde die Insertion von eGfp am 3'-Ende des Promotors von Cts1 (*umag_10419*) ermöglicht. Homologen Sequenzen stromaufwärts (1297 bp) des ORFs von Cts1 und stromabwärts in zwei Abschnitten zur Deletion einer *BsaI*-Restriktionsstellen (257 bp und 921 bp) vom 5'-Ende des ORFs wurden durch *BsaI*-vermittelter Golden-Gate-Klonierung mit der Hygromycin-Resistenzkassette aus dem Plasmid pUMa1779 im Plasmid pUMa1467 integriert. Für die Selektion auf *E. coli*-Transformaten besitzt das Plasmid eine Resistenzkassette gegenüber dem Antibiotikum Ampicillin.

pRabX1Poma:Gus-SHH-Don1_CbxR (pUMa2887, Aschenbroich et al., 2018)

Das Plasmid wurde zur Insertion der Sequenz des Fusionsproteins aus N-terminalen Gus und C-terminalen Don1 (*UMAG_10152*) mit intermediären Strep, HA- und His-Tag im *ip (cbx)*-Lokus von *U. maydis* generiert. Die Gensequenz von Don1 (4149 bp) wurde durch die Restriktion mit *Ascl* und *Apal* im Plasmid pUMa2113 integriert. Zur Selektion auf positive Transformanten enthält das Plasmid die Resistenzkassetten gegenüber den Antibiotika Ampicillin (*E. coli*) und Carboxin (*U. maydis*).

pRabX1Poma:Gus-SHH-Don3_CbxR (pUMa2888, Aschenbroich et al., 2018)

Die Insertion der Sequenz des Fusionsproteins aus N-terminalen Gus und C-terminalen Don3 (*UMAG_05543*) mit intermediären Strep, HA- und His-Tag im *ip (cbx)*-Lokus von *U. maydis* wurde mit diesem Plasmid erreicht. Durch Restriktion mit *Ascl* und *Apal* wurde die Gensequenz von Don3 (2531 bp) im Plasmid pUMa2113 integriert. Zur Selektion auf positive Transformanten enthält das Plasmid die Resistenzkassetten gegenüber den Antibiotika Ampicillin (*E. coli*) und Carboxin (*U. maydis*).

pRabX1Poma:Gus-SHH-Don1FYVE Δ _CbxR (pUMa3028)

Durch dieses Plasmid wurde die Sequenz des Fusionsproteins aus N-terminalen Gus und einer C-terminalen, verkürzten Variante von Don1 (*umag_10152*) ohne FYVE-Domäne im *ip (cbx)*-Lokus von *U. maydis* inseriert. Intermediär zu den Gensequenzen der Proteine sind Sequenzen für Strep, HA- und His-Tag lokalisiert. Mittels Restriktion mit *Ascl* und *Apal* wurde die verkürzte Gensequenz von Don1 (2829 bp) im Plasmid pUMa2113 integriert. Zur Selektion auf positive Transformanten enthält das Plasmid die Resistenzkassetten gegenüber den Antibiotika Ampicillin (*E. coli*) und Carboxin (*U. maydis*).

pRabX1Poma:Gus-SHH-Don1R965A_CbxR (pUMa3033)

Das Plasmid ermöglichte die Insertion der Sequenz des Fusionsproteins aus N-terminalen Gus und einer C-terminalen, punktmutierten Variante von Don1 (*umag_10152*) mit intermediären Strep, HA- und His-Tag im *ip (cbx)*-Lokus von *U. maydis*. Die punktmutierte Gensequenz von Don1 (4157 bp) wurde mittels Restriktion mit *Ascl* und *Apal* in das Plasmid pUMa2113 eingebracht. Zur Selektion auf positive Transformanten enthält das Plasmid die Resistenzkassetten gegenüber den Antibiotika Ampicillin (*E. coli*) und Carboxin (*U. maydis*).

pPotef:Cts1G_CbxR (pUMa3143)

Mittels dieses Plasmids wurde am *ip (cbx)*-Lokus von *U. maydis* die Insertion und konstitutive Überexpression der Sequenz von Cts1 (*umag_10419*) mit C-terminal fusioniertem eGfp erreicht. Die Gensequenz von Cts1 (1608 bp) wurde durch Restriktion mit *NcoI* im Plasmid pUMa43 integriert. Zur Selektion auf positive Transformanten enthält das Plasmid die Resistenzkassetten gegenüber den Antibiotika Ampicillin (*E. coli*) und Carboxin (*U. maydis*).

pDon1FYVE Δ _HygR (pUMa3200)

Mit diesem Plasmid wurde die Gensequenz einer C-terminal verkürzten Variante von Don1 (*umag_10152*) ohne FYVE-Domäne am nativen Lokus inseriert. Homologe Sequenzen stromaufwärts (939 bp) innerhalb des ORFs und stromabwärts (1125 bp) des ORFs wurden um die Resistenzkassette von Hygromycin kloniert. Mittels *BsaI*-vermittelter Golden-Gate-Klonierung wurde aus dem Plasmid pUMa1507 die Hygromycin-Resistenzkassette zur Selektion auf *U. maydis*-Transformanten und die o.g. homologen Sequenzen in das Plasmid pUMa1467 integriert. Zur Selektion auf *E. coli*-Transformaten enthält das Plasmid die Resistenzkassette gegenüber dem Antibiotikum Ampicillin.

pRabX1Gus-SHH-FYVE_CbxR (pUMa3207)

Das Plasmid wurde zur Insertion der Sequenz des Fusionsproteins aus N-terminalen Gus und C-terminaler FYVE-Domäne aus Don1 (*umag_10152*) am *ip (cbx)*-Lokus verwendet. Die Sequenz der FYVE-Domäne (206 bp) wurde mittels Restriktion mit *Ascl* und *Apal* im Plasmid pUMa2113 integriert. Zur Selektion auf positive Transformanten enthält das Plasmid die Resistenzkassetten gegenüber den Antibiotika Ampicillin (*E. coli*) und Carboxin (*U. maydis*).

pPotef:Cts1103-502G_CbxR (pUMa3227)

Durch das Plasmid wurde die Sequenz einer N-terminal verkürzten Variante von Cts1 (*umag_10419*) mit C-terminal fusioniertem eGfp am *ip (cbx)*-Lokus inseriert. Die Sequenz des Fusionsproteins (1971 bp) wurde mittels Restriktion mit *NotI* und *XmaI* im Plasmid

pUMa3143 integriert. Zur Selektion auf positive Transformanten enthält das Plasmid die Resistenzkassetten gegenüber den Antibiotika Ampicillin (*E. coli*) und Carboxin (*U. maydis*).

4.1.6 Stämme

E. coli

Für die Vervielfältigung von Plasmid-DNS in *E. coli* wurden Zellen des Stamms Top10 des Konzerns Thermo Fisher Scientific verwendet. Der Stamm stellt ein Derivat des Stamms DH10B dar, mit nachfolgend aufgeführten, genetischen Merkmalen: *F- mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80lacZΔM15 ΔlacX74 nupG recA1 araD139 Δ(ara-leu)7697 galE15 galK16 rpsL(StrR) endA1 λ-*. Die *E. coli*-Zellen werden bei -80 °C gelagert und sind den Mitarbeitern des Instituts für Mikrobiologie an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf unter der Leitung von Prof. Dr. Michael Feldbrügge frei zugänglich.

U. maydis

Die *U. maydis*-Stämme, die im Rahmen dieser Arbeit verwendet bzw. generiert worden und nachfolgend tabellarisch gelistet sind, werden bei -80 °C in der Stammsammlung des Instituts für Mikrobiologie an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf unter der Leitung von Prof. Dr. Michael Feldbrügge verwaltet und sind den Mitarbeitern frei zugänglich.

Tabelle 4.7: In dieser Arbeit verwendete Ausgangsstämme von *U. maydis*

Stamm	Relevanter Genotyp (Resistenz)	UMa ¹	Referenz	integriertes Plasmid (pUMa ¹)	Lokus	Ausgangsstamm
AB33	<i>a2 P_{nar}bW2bE1</i> (PhleoR)	133	Brachmann <i>et al.</i> (2001)		<i>b</i>	FB2
AB33cts1Δ	<i>a2 P_{nar}bW2bE1, umag_10419Δ</i> (PhleoR, HygR)	387	Koepke <i>et al.</i> (2011)	pCts1Δ_HygR (pUMa780)	<i>umag_10419 (cts1)</i>	UMa133
AB33cts1G	<i>a2 P_{nar}bW2bE1, umag_10419:egfp</i> (PhleoR, NatR)	388	Koepke <i>et al.</i> (2011)	pCts1G_NatR (pUMa828)	<i>umag_10419 (cts1)</i>	UMa133
AB33 P _{otef} gfp-NLS	<i>a2 P_{nar}bW2bE1, ip^r [P_{otef}egfp:NLS] ip^s</i> (PhleoR, CbxR)	404	<i>unbekannt</i>	pPotef:Gfp-NLS_CbxR	<i>ip (cbx)</i>	UMa133
AB33P _{otef} gfp	<i>a2 P_{nar}bW2bE1, ip^r [P_{otef}egfp] ip^s</i> (PhleoR, CbxR)	486	Baumann <i>et al.</i> (2014)	pPotef:Gfp_CbxR (pUMa43)	<i>ip (cbx)</i>	UMa133
AB33P _{ter} C-rab5a/cts1G ³	<i>a2 P_{nar}bW2bE1, ip^r [P_{ter}mcherry:rab5a] ip^s, umag_10419:egfp:egfp</i> (PhleoR, CbxR, HygR)	1093	Masterarbeit Jankowski (2013)	pCts1-3xG_HygR (pUMa1728)	<i>umag_10419 (cts1)</i>	UMa1052
AB33gus-cts1	<i>a2 P_{nar}bW2bE1, ip^r [P_{oma}gus:shh:cts1] ip^s</i> (PhleoR, CbxR)	1289	Sakari <i>et al.</i> (2014)	pRabX1Poma:Gus-SHH-Cts1 ubi1 3'UTR (pUMa2113)	<i>ip (cbx)</i>	UMa133
AB33don1Δ	<i>a2 P_{nar}bW2bE1, umag_10152Δ</i> (PhleoR, HygR)	1666	Zander <i>et al.</i> (2016)	pDon1Δ_Hyg (pUMa2412)	<i>umag_10152 (don1)</i>	UMa133

AB33gus _{cyt}	a2 <i>P_{nar}bW2bE1</i> , <i>ip^s</i> [<i>P_{oma}gus:shh</i>] <i>ip^s</i> (PhleoR, CbxR)	2014	Aschen- broich <i>et al.</i> (2018)	pRabX1Poma:Gus- SHH_CbxR (pUMa2335)	<i>ip (cbx)</i>	UMa133
AB33P5Δ/afu2	a2 <i>P_{nar}bW2bE1</i> , <i>FRT5[um04400</i> <i>Δ::hyg]FRT5</i> <i>FRT3[um11908Δ]</i> <i>FRT2[um00064 Δ]</i> <i>FRTwt[um02178Δ]</i> <i>FRT1[um04926Δ]</i> <i>P_{umag_00387:umag_0038}</i> <i>7Δ::P_{oma:umag_00387:}</i> <i>T_{nos}</i> (PhleoR, HygR, NatR)	2295	Aschen- broich <i>et al.</i> (2018)	pDest- Poma_umag00387_ NatR (pUMa3306)	<i>umag_00837</i> (<i>afu2</i>)	UMa1391
AB33don3Δ/ <i>P_{otef}gfp/gus-</i> <i>cts1</i>	a2 <i>P_{nar}bW2bE1</i> , <i>umag_05543Δ</i> , <i>ip^r</i> [<i>P_{oma}gus:shh:cts1</i>] <i>ip^s</i> , <i>umag_02178Δ::P_{otef}</i> <i>egfp:T_{nos}</i> (PhleoR, CbxR, NatR, HygR)	2300	Aschen- broich <i>et al.</i> (2018)	pDest- upp1Δ_Potef:Gfp- Tnos_NatR (pUMa3328)	<i>umag_02178</i> (<i>upp1</i>)	UMa1742
AB33don3Δ/ <i>P_{cr}gfp/gus-</i> <i>cts1</i>	a2 <i>P_{nar}bW2bE1</i> , <i>umag_05543Δ</i> , <i>ip^r</i> [<i>P_{oma}gus:shh:cts1</i>] <i>ip^s</i> , <i>umag_02178Δ::P_{cr}</i> <i>egfp:T_{nos}</i> (PhleoR, CbxR, NatR, HygR)	2301	Aschen- broich <i>et al.</i> (2018)	pDest- upp1Δ_Pcr:Gfp- Tnos_NatR (pUMa3329)	<i>umag_02178</i> (<i>upp1</i>)	UMa1742
AB33don3Δ/ <i>P_{cr}gdon3G/</i> <i>gus-cts1</i>	a2 <i>P_{nar}bW2bE1</i> , <i>umag_05543Δ</i> , <i>ip^r</i> [<i>P_{oma}gus:shh:cts1</i>] <i>ip^s</i> , <i>umag_02178Δ::P_{cr}um</i> <i>ag_05543:egfp:T_{nos}</i> (PhleoR, CbxR, NatR, HygR)	2302	Aschen- broich <i>et al.</i> (2018)	pDest-upp1Δ_ Pcr:Don3-Gfp- Tnos_NatR (pUMa3330)	<i>umag_02178</i> (<i>upp1</i>)	UMa1742
AB33don3Δ/ <i>P_{cr}gdon3/gus-</i> <i>cts1</i>	a2 <i>P_{nar}bW2bE1</i> , <i>umag_05543Δ</i> , <i>ip^r</i> [<i>P_{oma}gus:shh:cts1</i>] <i>ip^s</i> , <i>umag_02178Δ::P_{cr}</i> <i>umag_05543:T_{nos}</i> (PhleoR, CbxR, NatR, HygR)	2303	Aschen- broich <i>et al.</i> (2018)	pDest- upp1Δ_Pcr:Don3- Tnos_NatR (pUMa3331)	<i>umag_02178</i> (<i>upp1</i>)	UMa1742

¹ Interne Stamm (UMa) und Plasmid (pUMa) Kennung

Tabelle 4.8: In dieser Arbeit hergestellte *U. maydis* Stämme

Stamm	Relevanter Genotyp (Resistenz)	UMa ¹	Referenz	integriertes Plasmid (pUMa ¹)	Lokus	Ausgangsstamm
AB33gus-cts1/ grh1Δ	a2 <i>P_{nar}bW2bE1</i> , <i>ip^r</i> [<i>P_{oma}gus:shh:cts1</i>] <i>ip^s</i> , <i>umag_01076Δ</i> (PhleoR, CbxR, HygR)	1595	diese Arbeit	pGrh1Δ_Hyg (pUMa2520)	<i>umag_01076</i> (<i>grh1</i>)	UMa1289
AB33gus-cts1/ spo14Δ	a2 <i>P_{nar}bW2bE1</i> , <i>ip^r</i> [<i>P_{oma}gus:shh:cts1</i>] <i>ip^s</i> , <i>umag_00370Δ</i> (PhleoR, CbxR, HygR)	1598	diese Arbeit	pSpo14Δ_Hyg (pUMa2523)	<i>umag_00370</i> (<i>spo14</i>)	UMa1289
AB33gus-cts1/ atg8Δ	a2 <i>P_{nar}bW2bE1</i> , <i>umag_05567Δ</i> , <i>ip^r</i> [<i>P_{oma}gus:shh:cts1</i>] <i>ip^s</i> (PhleoR, CbxR, HygR)	1676	diese Arbeit	pRabX1Poma:Gus- SHH-Cts1 ubi1 3'UTR (pUMa2113)	<i>ip (cbx)</i>	UMa818
AB33gus-cts1/ pex3Δ	a2 <i>P_{nar}bW2bE1</i> , <i>ip^r</i> [<i>P_{oma}gus:shh:cts1</i>] <i>ip^s</i> , <i>umag_06200Δ</i> (PhleoR, CbxR, HygR)	1677	diese Arbeit	pPex3Δ_Hyg (pUMa2532)	<i>umag_06200</i> (<i>pex3</i>)	UMa1289

4. Material und Methoden

AB33don3Δ/ gus-cts1	<i>a2 P_{nar}bW2bE1, ip^f</i> [<i>P_{omagus:shh:cts1] ip^s}</i> , <i>umag_05543Δ</i> (PhleoR, CbxR, HygR)	1742	Aschen- broich <i>et al.</i> (2018)	pDon3Δ_HygR (pUMa2717)	<i>umag_05543</i> (<i>don3</i>)	UMa1289
AB33don1Δ/ gus-cts1	<i>a2 P_{nar}bW2bE1, ip^f</i> [<i>P_{omagus:shh:cts1] ip^s}</i> , <i>umag_10152Δ</i> (PhleoR, CbxR, HygR)	1745	Aschen- broich <i>et al.</i> (2018)	pDon1Δ_Hyg (pUMa2412)	<i>umag_10152</i> (<i>don1</i>)	UMa1289
AB33P _{cts1} gfp	<i>a2 P_{nar}bW2bE1,</i> <i>umag_10419::</i> <i>egfp::T_{nos}</i> (PhleoR, HygR)	1808	diese Arbeit	pPcts1:Gfp_HygR (pUMa2799)	<i>umag_10419</i> (<i>cts1</i>)	UMa133
AB33don1Δ/ cts1G	<i>a2 P_{nar}bW2bE1,</i> <i>umag_10419:egfp,</i> <i>umag_10152Δ</i> (PhleoR, NatR, HygR)	1838	Aschen- broich <i>et al.</i> (2018)	pDon1Δ_Hyg (pUMa2412)	<i>umag_10152</i> (<i>don1</i>)	UMa388
AB33don3Δ/ cts1G	<i>a2 P_{nar}bW2bE1,</i> <i>umag_10419:egfp,</i> <i>umag_05543Δ</i> (PhleoR, NatR, HygR)	1839	Aschen- broich <i>et al.</i> (2018)	pDon3Δ_HygR (pUMa2717)	<i>umag_05543</i> (<i>don3</i>)	UMa388
AB33Gus- Don1	<i>a2 P_{nar}bW2bE1, ip^f</i> [<i>P_{omagus:shh:don1] ip^s}</i> (PhleoR, CbxR)	1884	Aschen- broich <i>et al.</i> (2018)	pRabX1Poma:Gus- SHH-Don1_CbxR (pUMa2887)	<i>ip (cbx)</i>	UMa133
AB33gus-don3	<i>a2 P_{nar}bW2bE1, ip^f</i> [<i>P_{omagus:shh:don3] ip^s}</i> (PhleoR, CbxR)	1885	Aschen- broich <i>et al.</i> (2018)	pRabX1Poma:Gus- SHH-Don3_CbxR (pUMa2888)	<i>ip (cbx)</i>	UMa133
AB33don1Δ/ gus-don1	<i>a2 P_{nar}bW2bE1,</i> <i>umag_10152Δ, ip^f</i> [<i>P_{omagus:shh:don1] ip^s}</i> (PhleoR, HygR, CbxR)	1886	Aschen- broich <i>et al.</i> (2018)	pRabX1Poma:Gus- SHH-Don1_CbxR (pUMa2887)	<i>ip (cbx)</i>	UMa1666
AB33don3Δ	<i>a2 P_{nar}bW2bE1,</i> <i>umag_05543Δ</i> (PhleoR, HygR)	2028	Aschen- broich <i>et al.</i> (2018)	pDon3Δ_HygR (pUMa2717)	<i>umag_05543</i> (<i>don3</i>)	UMa133
AB33don3Δ/ gus-don3	<i>a2 P_{nar}bW2bE1,</i> <i>umag_05543Δ, ip^f</i> [<i>P_{omagus:shh:don3] ip^s}</i> (PhleoR, HygR, CbxR)	2029	Aschen- broich <i>et al.</i> (2018)	pDon3Δ_HygR (pUMa2717)	<i>umag_05543</i> (<i>don3</i>)	UMa1885
AB33gus- don1 ^{FYVEΔ}	<i>a2 P_{nar}bW2bE1,</i> <i>ip^f [P_{omagus:}</i> <i>umag_10152¹⁻⁹⁴³] ip^s</i> (PhleoR, CbxR)	2033	diese Arbeit	pRabX1Poma:Gus- SHH-Don1FYVEΔ _CbxR (pUMa3028)	<i>ip (cbx)</i>	UMa133
AB33don1Δ/ gus-don1 ^{FYVEΔ}	<i>a2 P_{nar}bW2bE1,</i> <i>umag_05543Δ</i> <i>ip^f [P_{omagus:}</i> <i>umag_10152¹⁻⁹⁴³] ip^s</i> (PhleoR, CbxR, HygR)	2034	diese Arbeit	pRabX1Poma:Gus- SHH-Don1FYVEΔ _CbxR (pUMa3028)	<i>ip (cbx)</i>	UMa1666
AB33gus- don1 ^{R965A}	<i>a2 P_{nar}bW2bE1,</i> <i>ip^f [P_{omagus:}</i> <i>umag_10152^{R965A}] ip^s</i> (PhleoR, CbxR)	2049	diese Arbeit	pRabX1Poma:Gus- SHH-Don1R965A _CbxR (pUMa3033)	<i>ip (cbx)</i>	UMa133
AB33don1Δ/ gus-don1 ^{R965A}	<i>a2 P_{nar}bW2bE1,</i> <i>umag_10152Δ</i> <i>ip^f [P_{omagus:}</i> <i>umag_10152^{R965A}] ip^s</i> PhleoR, CbxR, HygR)	2050	diese Arbeit	pRabX1Poma:Gus- SHH-Don1R965A _CbxR (pUMa3033)	<i>ip (cbx)</i>	UMa1666
AB33 P _{otef} cts1G	<i>a2 P_{nar}bW2bE1, ip^f</i> [<i>P_{otef:cts1:egfp] ip^s}</i> (PhleoR, CbxR)	2157	diese Arbeit	pPotef:Cts1G_CbxR (pUMa3143)	<i>ip (cbx)</i>	UMa133
AB33 P _{otef} cts1G/cts1Δ	<i>a2 P_{nar}bW2bE1,</i> <i>umag_10152Δ,</i> <i>ip^f [P_{otef:cts1:egfp] ip^s}</i> (PhleoR, HygR, CbxR)	2180	diese Arbeit	pPotef:Cts1G_CbxR (pUMa3143)	<i>ip (cbx)</i>	UMa1666
AB33 don1 ^{FYVEΔ} / cts1G	<i>a2 P_{nar}bW2bE1,</i> <i>umag_10419:egfp,</i> <i>umag_10152Δ::umag_</i> <i>10152¹⁻⁹⁴³</i> (PhleoR, NatR, HygR)	2197	diese Arbeit	pDon1FYVEΔ_HygR (pUMa3200)	<i>umag_10152</i> (<i>don1</i>)	UMa388
AB33gus- FYVE	<i>a2 P_{nar}bW2bE1, ip^f</i> [<i>P_{omagus:shh:FYVE] ip^s}</i> (PhleoR, HygR)	2198	diese Arbeit	pRabX1Gus-SHH- FYVE_CbxR (pUMa3207)	<i>ip (cbx)</i>	UMa133

AB33P ^{otef} cts1 ¹⁰³⁻⁵⁰² G /cts1Δ	a2 P _{nar} bW2bE1, umag_10152Δ, ip ^r [P _{2otef} cts1 ¹⁰³⁻⁵⁰² .egfp] ip ^s (PhleoR, HygR, CbxR)	2232	diese Arbeit	pPotef:Cts1103- 502G_CbxR (pUMa3227)	ip (cbx)	UMa1666
AB33kex2Δ/ cts1G	a2 P _{nar} bW2bE1, umag_10419:egfp, umag_02843Δ (PhleoR, NatR, HygR)	2282	Aschen- broich et al. (2018)	pKex2Δ_HygR (pUMa1530)	umag_02843 (kex2)	UMa388
AB33kin3Δ/ cts1G	a2 P _{nar} bW2bE1, umag_06251Δ, umag_10419:egfp (PhleoR, CbxR, NatR)	2284	Aschen- broich et al. (2018)	pCts1G_NatR (pUMa828)	umag_10419 (cts1)	UMa662
AB33don1Δ/ gus _{cyt}	a2 P _{nar} bW2bE1, umag_10152Δ, ip ^r [P _{oma} gus:shh] ip ^s (PhleoR, HygR, CbxR)	2287	Aschen- broich et al. (2018)	pRabX1Poma:Gus- SHH_CbxR (pUMa2335)	ip (cbx)	UMa1666
AB33don3Δ/ gus _{cyt}	a2 P _{nar} bW2bE1, umag_05543Δ, ip ^r [P _{oma} gus:shh] ip ^s (PhleoR, HygR, CbxR)	2288	Aschen- broich et al. (2018)	pRabX1Poma:Gus- SHH_CbxR (pUMa2335)	ip (cbx)	UMa2028

¹ Interne Stamm (UMa) und Plasmid (pUMa) Kennung

4.1.7 Computerprogramme und Bioinformatik

Die Auswertung von Daten und Erstellung von Abbildungen erfolgte in dieser Arbeit durch die Computerprogramme Canvas12/-15 (Canvas GFX), MetaMorph (Molecular Devices, Version 7), Microsoft Word, Excel und Powerpoint, sowie Prism7 (Graphpad). Mittels CloneManager 9 (Sci-Ed Software) wurden Klonierungen geplant und Sequenzierungsergebnisse verarbeitet. Bioinformatische Informationen wurden online auf folgenden Webseiten abgerufen: <http://mips.helmholtz-muenchen.de/genre/proj/ustilago> (*U. maydis* Genom Datenbank), <http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/> ('SignalP 4.1', Signalpeptidvorhersage), <https://www.yeastgenome.org/> (*S. cerevisiae* Genom Datenbank), <http://emboss.bioinformatics.nl/cgi-bin/emboss/epestfind> ('epest-find' PEST-Motiv Vorhersage) und <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> (Abgleich von Proteinsequenzen).

4.2 Mikrobiologische, genetische und zellbiologische Methoden

Die durchgeführten und hier beschriebenen Methoden entstammen, wenn nicht anders angegeben, aus der aktuellen Methodensammlung (Stand 2018) des Instituts für Mikrobiologie an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf unter der Leitung von Prof. Dr. Michael Feldbrügge.

4.2.1 Arbeiten mit *E. coli*

Kultivierung von *E. coli*

Unter sterilen Bedingungen wurden Zellen des Stammes TOP10 (Thermo Fisher Scientific) von *E. coli* wahlweise auf dYT-Festmedium oder in dYT-Flüssigmedium (Abschnitt 4.1.2) unter aeroben Konditionen bei 37 °C angezogen. Zur Aufrechterhaltung des Selektionsdrucks wurde entsprechendes Antibiotikum in den o.g. Konzentrationen (Abschnitt 4.1.3) hinzugegeben. Die Inkubation der Flüssigkulturen erfolgte für Volumen bis zu 5 ml im Reagenzglas auf Rotationsschüttlern oder bei größeren Volumen von 50 bis 500 ml im Schüttelkolben auf Horizontalschüttlern über Nacht bei 110 Upm. Dauerkulturen des Stammes wurden bei -80 °C gelagert und zur Transformation mit Nukleinsäuren eingesetzt.

Photometrische Bestimmung der Zelldichte

Um Zellzahlen in einer Flüssigkultur von *E. coli* zu ermitteln, wurde mit Hilfe eines Novospec II Photometers (Pharmacia Biotech) bei einer Wellenlänge von 600 nm die optische Dichte (OD_{600}) der Kultur bestimmt. Eine OD_{600} von 1,0 entspricht dabei einer Zelldichte von 10^9 Zellen/ml. Für die photometrische Messung wurde ein Aliquot der Kultur in einer Küvette passend verdünnt, damit die Bestimmung der OD_{600} im linearen Messbereich von 0,2 bis 0,8 erfolgt. Als Referenzwert diente eine vorherige Nullmessung mit dem passenden Kulturmedium. Anschließend wurde der Verdünnungsfaktor für die Kalkulation der Zelldichte berücksichtigt.

Herstellung von chemisch-kompetenten *E. coli*-Zellen

Auf Basis der Publikation von Cohen *et al.* (1972) wurde folgendes, modifiziertes Protokoll zur Herstellung von chemisch-kompetenten *E. coli*-Zellen angewendet: In dYT-Flüssigmedium wurde aus einer frisch angesetzten und über Nacht bei 37 °C schüttelnd inkubierten Vorkultur von *E. coli* des Stamms TOP10 (Thermo Fisher Scientific) eine Hauptkultur mit zusätzlich je 10 mM $MgCl_2$ und $MgSO_4$ inokuliert und bei 37 °C und einer

Umdrehungszahl von 200 Upm schüttelnd inkubiert, bis nach ca. 2 bis 2,5 h eine OD_{600} von 0,6 erreicht worden ist. Anschließend wurde die Kultur auf Eis gestellt und für 30 min ruhen gelassen. Mittels Zentrifugation (1006 x g, 8 min, 4 °C) wurden die Zellen in der Kultur sedimentiert und nach Verwerfen des Überstands durch Resuspension mit 1/3 des Volumens der Hauptkultur in gekühlter RF1-Lösung konzentriert. Nach erneuten 30 min Ruhezeit auf Eis und zentrifugieren (1006 x g, 8 min, 4 °C) der Suspension wurde der Überstand verworfen und die pelletierten Zellen in gekühlter RF2-Lösung mit 1/50 des Volumens der Hauptkultur gelöst. Die Suspension wurde abschließend nach einer weiteren Ruhezeit von 30 min in kleinen Volumina (50 bis 100 µl) in 1,5 ml Reaktionsgefäßen aliquotiert, mittels flüssigen Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

RF1-Lösung:

100 mM RbCl
50 mM $MnCl_2 \times 4 H_2O$
30 mM K-Acetat
10 mM $CaCl_2 \times 2 H_2O$
15% (v/v) Glycerin
in H_2O_{bid}
mit Essigsäure auf pH 5,8 einstellen und sterilfiltrieren.

RF2-Lösung:

10 mM MOPS
10 mM RbCl
75mM $CaCl_2 \times 2 H_2O$
15% (v/v) Glycerin.
in H_2O_{bid}
mit NaOH auf pH 5,8 einstellen und sterilfiltrieren

Transformation von *E. coli*

Um die Transformation von *E. coli*-Zellen mit genetischen Material zu erreichen, wurde zunächst ein Aliquot der chemisch-kompetenten Zellen für ca. 10 min auf Eis aufgetaut. Anschließend wurden die Zellen mit 1 µl Plasmidlösung (ca. 0,5 µg Plasmid-DNS) bzw. einem Ligationsansatz versetzt und für 2 min (Plasmidlösung) bzw. 30 min (Ligationsansatz) auf Eis inkubiert. Für die Permeabilisierung der Plasmamembranen und die Aufnahme der Nukleinsäure wurden die *E. coli*-Zellen gemäß des verwendeten Stammes (TOP10, Thermo Fisher Scientific) für 45 sec einem Hitzeschock bei 42 °C unterzogen. Nach 2 min Inkubation der Zellen auf Eis wurde bei Transformationen mit einem Ligationsansatz das 5-fache Volumen des Aliquots an dYT-Medium hinzugegeben. Zur Regeneration bzw. zum Aufbau der Vektor-vermittelten Antibiotika-Resistenz wurden die Zellen schüttelnd bei 37 °C inkubiert. Die Dauer der Regenerationszeit richtete sich nach den zur anschließenden Selektion eingesetzten Antibiotika und wurde für Ampicillin und Gentamicin auf 30 min und für Kanamycin auf 60 min festgelegt. Für die Selektion auf erfolgreich transformierte *E. coli*-Zellen mit Antibiotika-Resistenz wurde die Zellsuspension auf YT-Festmedium, das zuvor mit dem passenden Antibiotikum in den o.g. Konzentrationen (Abschnitt 4.1.3) versetzt wurde, ausplattiert und nach Trocknung der Agarplatten anschließend über Nacht bei 37 °C inkubiert. Bei ergänzender blau/weiß-Selektion mittels der Vektor-vermittelten Proteinsynthese des Enzyms LacZ wurde das YT-Festmedium zusätzlich mit 60 µl einer X-Gal-Substratlösung beschichtet. Vom Festmedium wurden einzelne, über Nacht gebildete

Kolonien ausgewählt und in 2 bis 5 ml dYT-Flüssigmedium überführt, welches zur Aufrechterhaltung des Selektionsdrucks mit dem passenden Antibiotikum in den o.g. Konzentrationen versetzt wurde. Für die Vervielfältigung des eingebrachten genetischen Materials durch Vermehrung der *E. coli*-Zellen wurden die Flüssigkulturen über Nacht bei 37 °C schüttelnd inkubiert und konnten anschließend für die Plasmidpräparation verwendet werden.

X-Gal-Substratlösung:

2 % (w/v) X-Gal (C₁₄H₁₅BrClNO₆)
in DMSO

4.2.2 Arbeiten mit *U. maydis*

Kultivierung von *U. maydis*

Lebende Zellen von *U. maydis* wurden unter sterilen und aeroben Bedingungen bei 28 °C entweder auf Festmedium oder in Flüssigmedium angezogen. Flüssigkulturen wurden dabei initial immer mit Zellmaterial von Festmedium inokuliert, welches maximal vier Wochen bei 4 °C gelagert worden ist. Wahlweise wurde das Festmedium zur Selektion mit Antibiotikum in den o.g. Konzentrationen (Abschnitt 4.1.3) versetzt. Flüssigkulturen wurden, wenn nicht anders angegeben, in CM-Medium (Abschnitt 4.1.2) bei Volumen bis 5 ml im Reagenzglas auf Rotationsschüttlern oder bei größeren Volumen ab 10 ml im Schüttelkolben auf Horizontalschüttlern über Nacht bei 200 Upm inkubiert. Um potentiell positive Transformanten von *U. maydis* zu sichern, wurden aus Flüssigkulturen 3 bis 5 µl der Zellsuspension auf Festmedium getropft (Tropfplatten), bevor genomische DNS aus den Kulturen isoliert wurden. Zur dauerhaften Lagerung von *U. maydis*-Stämmen wurde 1 ml einer dicht bewachsenen Kultur mit 1 ml 50%igem NSY-Glycerin-Medium versetzt und nach Invertieren des Gefriergefäßes bei -80 °C aufbewahrt (Kryokulturen). Bei Bedarf wurden die Kryokulturen zuerst auf Festmedium ausplattiert. Für die Überprüfung des Phänotyps der sogenannten Donut-Kolonien wurde Zellmaterial von *U. maydis* mittels Vereinzelausstrichen auf YEPS_{light}-Festmedium ausplattiert und für 2 bis 3 Tage bei 28 °C inkubiert.

Photometrische Bestimmung der Zelldichte

Mittels eines Novospec II Photometers (Pharmacia Biotech) wurde anhand der bei einer Wellenlänge von 600 nm gemessenen optische Dichte (OD₆₀₀) die Zellzahl in *U. maydis* Kulturen ermittelt. Dabei entspricht eine OD₆₀₀ von 1,0 einer Zelldichte von etwa 1 bis 5 x 10⁷ Zellen/ml. Durch geeignete Verdünnung eines Aliquots der Kultur in einer Küvette erfolgte die photometrische Messung im linearen Messbereich von 0,2 bis 0,8. Eine

vorherige Nullmessung mit dem passenden Kulturmedium diene als Referenzwert. Anschließend wurde der Verdünnungsfaktor für die Kalkulation der Zelldichte berücksichtigt.

Protoplastierung von *U. maydis*

Die Protoplastierung von *U. maydis* basiert auf dem in Schulz *et al.* (1990) beschriebenen Protokoll und wurde modifiziert wie folgt angewendet: In CM-Flüssigmedium (Abschnitt 4.1.2) wurde aus einer Vorkultur des zu protoplastierenden Stammes von *U. maydis* eine 50 ml Hauptkultur inokuliert. Ab einer OD₆₀₀ von 0,6 bis 0,8 wurde die Zellsuspension zentrifugiert (1006 x g, 5 min, RT), der Überstand verworfen und die pelletierten Zellen in 25 ml SCS-Puffer gelöst. Nach erneuter Zentrifugation (1006 x g, 5 min, RT) und Verwerfen des Überstands wurden die Zellen in 2 ml SCS mit 3,5 mg/ml Novozym (Novo Nordisc) oder Glucanex (Merck) resuspendiert. Der Fortschritt der Protoplastierung durch die Wirkung des Novozyms/Glucanex wurde lichtmikroskopisch verfolgt und, nachdem ca. 30 bis 40 % der Zellen eine kugelförmige Morphologie eingenommen hatten, mit weiteren Anwendungen fortgesetzt. Nachfolgende Schritte wurden auf Eis durchgeführt. Zu der Suspension mit den Protoplasten wurden 10 ml kalter (4 °C) SCS-Puffer hinzugegeben und die Zellen durch Zentrifugieren (643 x g, 5 min, 4 °C) pelletiert. Der Überstand wurde vorsichtig verworfen und das Sediment wiederholt in 10 ml kaltem (4 °C) SCS-Puffer gelöst und zentrifugiert (643 x g, 5 min, 4 °C). Nach letztmaligem vorsichtigem Verwerfen des Überstands, Resuspendieren in 10 ml kaltem (4 °C) SCS-Puffer und Zentrifugieren (643 x g, 5 min, 4 °C) wurde erneut der Überstand vorsichtig abgenommen und das Zellpellet in 10 ml kaltem (4 °C) STC-Puffer gelöst. Die Suspension wurde anschließend zentrifugiert (643 x g, 5 min, 4 °C), der Überstand vorsichtig abgenommen bzw. verworfen und das Pellet in 1 ml kaltem (4 °C) STC-Puffer resuspendiert. In Aliquots von je 100 µl wurde die Zellsuspension auf vorgekühlte (-20 °C) 1,5 ml Reaktionsgefäße verteilt. Die fertigen Protoplasten wurden entweder direkt zur Transformation eingesetzt oder bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

SCS-Puffer:

20 mM Na-Citrat (pH 5,8)
1 M Sorbitol
in H₂O_{bid.} sterilfiltriert

STC-Puffer:

50 % (v/v) 2 M Sorbitol
1,0 % (v/v) 1 M Tris/HCl (pH 7,5)
10 % (v/v) 1 M CaCl₂

Transformation von *U. maydis*

Ebenfalls auf dem in Schulz *et al.* (1990) beschriebenen Protokoll ist die Transformation von *U. maydis* zurückzuführen und wurde modifiziert wie beschrieben angewendet: Protoplasten des *U. maydis*-Stamms, bei dem mittels Transformation die genomische Insertion von Nukleinsäuren erreicht werden sollte, wurden für 10 min auf Eis aufgetaut. Anschließend wurde die Protoplastensuspension mit 1 µl Heparin-Lösung und dem Restriktionsansatz mit linearisierter Plasmid-DNS (1 bis 5 µg) versetzt. Nach erneuten 10 min Inkubation auf Eis

wurde der Suspension 500 µl einer STC/PEG-Lösung hinzugegeben und nach vorsichtigem Invertieren für weitere 15 min auf Eis gelagert. Abschließend wurden die transformierten Protoplasten von *U. maydis* vorsichtig auf Festmedium mit Regenerationsagar (Abschnitt 4.1.2) ausplattiert. Der Regenerationsagar besteht aus zwei Phasen, bei der die untere Schicht die o.g. Konzentration (Abschnitt 4.1.3) des zur Selektion auf erfolgreiche Transformanten eingesetzten Antibiotikums enthält, während die obere Schicht bis zur Diffusion des Antibiotikums kein Selektionsmittel besitzt. Die auf dem Festmedium ausplattierten Transformanten wurden für 5 bis 7 Tage bei 28 °C gelagert, bis die Bildung von Kolonien beobachtet und die Zellen auf CM-Festmedium vereinzelt werden konnten.

Heparin-Lösung:

15 mg/ml Heparin
in H₂O_{bid.} sterilfiltriert

STC/PEG-Lösung:

15 ml STC
10 g PEG 4000

Induktion des filamentösen Wachstums

Um die artifizielle Ausbildung von Filamenten in *U. maydis* zu erzielen, wurden in dieser Arbeit Derivate des Laborstamms AB33 verwendet. Durch Wechsel der Stickstoffquelle von Ammoniumnitrat (NH₄NO₃) auf Kaliumnitrat (KNO₃) wird die Aktivität des *P_{nar}*-Promotors induziert und die Expression der beiden Gene des bE/bW-Transkriptionsfaktors eingeleitet. Die Interaktion der Transkriptionsfaktoren bE und bW führt zum filamentösen Wachstum (Brachmann *et al.*, 2001). Zunächst wurde bei einer in CM-Flüssigmedium über Nacht als Sporidien gewachsenen 20 ml Kultur mittels photometrischer Messung die OD₆₀₀ bestimmt. Die 20 ml Hauptkultur wurde mit sterilem H₂O auf eine OD₆₀₀ von 0,5 eingestellt und die Zellen anschließend durch Zentrifugation (2790 x g, 3 min, RT) geerntet. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in gleichem Volumen der Hauptkultur in vorgewärmten NM-Medium (Abschnitt 4.1.2) resuspendiert. Nach wiederholtem Zentrifugieren (2790 x g, 3 min, RT), Verwerfen des Überstands und Resuspendieren der geernteten Zellen in selbigem Volumen an NM-Medium wurde die Zellsuspension für ca. 6 h schüttelnd bei 200 Upm und 28 °C inkubiert, bis die Ausbildung von Filamenten beobachtet werden konnte.

Erstellung von Wachstumskurven und Zellzyklus-Inhibitor-Studien

Für die Analyse der Teilungsrate von *U. maydis* wurden bei Übernachtskulturen durch photometrische Messung die OD₆₀₀ bestimmt. Anschließend wurden 20 ml Messkulturen auf definierte OD₆₀₀-Werte eingestellt und schüttelnd bei 200 Upm und 28 °C für mindestens 8 h inkubiert. In regelmäßigen zeitlichen Abständen von 1 bis 2 h wurden die OD₆₀₀ ermittelt und der Verlauf graphisch aufgetragen. Bei Wechsel des Flüssigmediums wurden die Zellen vor Beginn der Messreihe durch Zentrifugation (2790 x g, 3 min, RT) und Resuspension im neuen Nährmedium gewaschen. Für die Zellzyklus-Inhibitor-Studien wurden die Zellen in

vorgewärmten, 0,1 M MOPS gepuffertem CM-Medium (pH 7) auf eine OD₆₀₀ von 0,08 ionokuliert, um der beschriebenen Ansäuerung des Flüssigmediums bei Langzeitkultivierung von *U. maydis* entgegenzuwirken (Dissertation M. Terfrüchte, 2016). Die Analyse startete 10 h nach Inokulation und beinhaltete für 18 h in zeitlichen Abständen von 2 h zum einen die Dokumentation der OD₆₀₀ und zum anderen die Probenentnahme von 2 ml zellfreien Kulturüberständen, die für die spätere Messungen der enzymatischen Aktivitäten (Abschnitt 4.5.4) bei -20 °C gelagert worden sind. Zum Zeitpunkt 12 h nach Inokulation wurde durch Zugabe von Hydroxyurea [3 mg/ml] die Inhibition des Zellzyklus induziert. Flüssigkulturen ohne Zugabe von Hydroxyurea lieferten als Negativkontrolle Referenzwerte.

Bestimmung der Trockenzellmasse

Um die Trockenzellmasse von verschiedenen *U. maydis*-Stämmen zu definierten Werten der OD₆₀₀ zu determinieren, wurde initial die OD₆₀₀ dichtbewachsener Kulturen in CM-Medium (Abschnitt 4.1.2) gemessen. Für ein Gesamtvolumen von 25 ml wurden pro Stamm die OD₆₀₀-Werte 1,0; 2,0 und 4,0 in einem 50 ml zylindrischem Reaktionsgefäß eingestellt. Die jeweiligen Zellsuspensionen wurden zentrifugiert (2790 x g, ≥5 min, RT) und der Überstand soweit vorsichtig abgenommen und verworfen, dass keine Zellen aus dem Pellet gelöst wurden. Anschließend wurden die Zellen in den zylindrischen Reaktionsgefäßen für mindestens zwei Tage bei 50 °C inkubiert, bis restliche Flüssigkeit verdunstet war. Final wurde durch Wiegen die Masse des Reaktionsgefäßes mit Zellpellet bestimmt und durch Subtraktion mit dem vorher gemessenen Leergewicht des jeweiligen Reaktionsgefäß die Trockenzellmasse ermittelt.

4.3 Mikroskopische Analysen

4.3.1 Vorbereitung und Färbung von Präparaten

Für die mikroskopische Analyse von *U. maydis*-Zellen wurden Kulturen der entsprechenden Stämmen, wenn nicht anders angegeben, in CM-Flüssigmedium (Abschnitt 4.1.2) angezogen. Zur Dokumentation der Wachstumsphase wurde vor Beginn der Mikroskopie stets die OD₆₀₀ der Kulturen von *U. maydis* gemessen. Zudem wurde im Vorfeld 2 % (w/v) Agarose in H₂O_{bid.} angesetzt, aufgeköcht und zur Polymerisierung ca. 500 µl davon auf einen Objektträger gegeben. Um die *U. maydis*-Zellen für die Mikroskopie zu immobilisieren, wurde pro mikroskopischen Ansatz 1 µl der jeweiligen Kultur auf die erstarrte Agarose pipettiert, die Zellsuspension für ca. 1 min trocknen gelassen und ein Deckglas auf dem biologischen Präparat platziert. In Abhängigkeit vom verwendeten Objektiv wurde ggf. Immulsionsöl auf das Deckglas getropft. Zur Färbung zellulärer Strukturen wurden in dieser Arbeit die

Farbstoffe Calcofluor-White (CW) und FM4-64 eingesetzt. Zu 1 ml Zellsuspension wurden wahlweise 1 µl CW-Stammlösung und/oder 1 bis 3 µl FM4-64-Stammlösung gegeben und nach Invertieren 1 µl des Ansatzes unmittelbar für die mikroskopische Analyse verwendet.

Calcofluor-White

Massenkonzentration der Stammlösung:

1 mg/ml

Massenkonzentration im Präparat:

1 µg/ml

Fluoreszenzkanal:

DAPI

Bezugsquelle:

Fluka Analytical

Lokalisation:

Bindet an Chitin und Zellulose in Zellwänden. Ermöglicht die Visualisierung von Zellwand bzw. Septen in Pilzen (Gull und Trinci, 1974).

FM4-64

Stoffmengenkonzentration der Stammlösung:

8 mM

Stoffmengenkonzentration im Präparat:

8 - 24 µM

Fluoreszenzkanal:

RFP/mCherry

Bezugsquelle:

Thermo Fisher Scientific

Lokalisation:

Lipophiler Farbstoff, wird mittels Endozytose über die Plasmamembran in die Zelle aufgenommen. Ermöglicht die Visualisierung der Plasmamembran und intrazellulärer Lipidstrukturen (Fischer-Parton *et al.*, 2000).

4.3.2 Fluoreszenzmikroskopie

Mikroskopische Aufnahmen wurden in dieser Arbeit mittels Mikroskopen der Firma Visitron Systems (München, Deutschland) generiert. Technische Angaben sind nachfolgend aufgeführt:

Stativ:	Axio Imager M.1 (Zeiss, Oberkochen, Deutschland)
Kamera:	Spot-Pursuit CCD-Kamera (Diagnostic Instruments, Sterling Heights, MI, USA)
Objektive:	Plan Neofluar (40x, NA 1,3, Öl) Plan Neofluar (63x, NA 1,25, Öl) Plan Neofluar (100x, NA 1,4, Öl)
Lampe:	HPX Halogen Metall dampflampe (LEJ, Jena, Deutschland)
Stativ:	Axio Observer Z.1 (Zeiss, Oberkochen, Deutschland)
Kamera:	CoolSNAP HQ2 CCD-Kamera (Photometrics, Tucson, AZ, USA)
Objektive:	Plan Neofluar (40x, NA 1,3, Öl) Plan Aplanachromat (63x, NA 1,4, Öl) Plan Aplanachromat (100x, NA 1,4, Öl) α-Plan Aplanachromat (100x, NA 1,46, Öl)
Lampe:	HBO 103 Quecksilber Lampe (LEJ, Jena, Deutschland) CoolLED precisExcite (Andover, UK)

Die Steuerung der Mikroskope erfolgte durch die Software MetaMorph (Molecular Devices, Version 7, Sunnyvale, USA).

Zur Detektion von Fluoreszenzsignalen wurden wahlweise die o.g. HPX Halogen Metall-dampflampe und LED Lampe bzw. Laser für die Anregung von eGfp (488 nm/100 mW) und Rfp/mCherry (561 nm/150 mW) verwendet oder folgende Filtersätze genutzt:

DAPI:	AT350/50BP, ET400LP, ET460/50BP (Chroma, Bellow Falls, VT, USA)
GFP:	ET470/40BP, ET495LP, ET525/50BP (Chroma, Bellow Falls, VT, USA)
RFP/mCherry:	ET560/40BP, ET585LP, ET630/75BP (Chroma, Bellow Falls, VT, USA)

In Versuchen zur Rückgewinnung von Fluoreszenzsignalen nach Photobleichen (*engl.*: fluorescence recovery after photobleaching; FRAP) wurde in Zusammenarbeit mit Dr. Sabrina Zander und Kira Müntjes LASER-basierte Epifluoreszenz-Mikroskopie angewendet. Die Steuerung der Laserintensität erfolgte mittels der Software VisiFRAP 2D (Visitron Systems, München, Deutschland).

Detaillierte Aufnahmen der Teilungszone von *U. maydis* wurden im 'Center for Advanced Imaging' (CAI, HHU Düsseldorf) in Kooperation mit Dr. Sebastian Hänsch mittels des inversen Konfokalmikroskop-Systems Zeiss LSM 880 Airyscan angefertigt. Die Steuerung des Mikroskops geschah durch die Software ZEN-Black (Zeiss, Oberkochen, Deutschland). Für die Quantifizierung von Zellaggregaten und die sekundäre Septenbildung in den Zellaggregaten wurde eine Neubauer Zählkammer (0,0025 cm², Tiefe: 0,1 mm, Marienfeld Germany) benutzt. Bei der Bestimmung der Anzahl an sekundären Septen wurden distale Teilungszonen in den Zellaggregaten nicht berücksichtigt, um Artefakte durch potentielle Zellteilung in den Bereichen zu vermeiden.

4.3.3 Bearbeitung mikroskopischer Daten

Die Bearbeitung von Bild- und Filmaufnahmen mittels der Computerprogramme MetaMorph (Molecular Devices, Version 7, Sunnyvale, USA) und Canvas12/-15 (Canvas GFX) beinhaltete die Anpassung von Helligkeiten, Kontrasten und Farbintensitäten.

Messung der Fluoreszenzintensität

Die postmikroskopische Ermittlung der Intensität relativer Fluoreszenzeinheiten (*engl.*: relative fluorescence units; RFU) erfolgte mittels des Computerprogramms MetaMorph (Molecular Devices, Version 7, Sunnyvale, USA). Dazu wurde auf mikroskopischen Bildaufnahmen digital die zu messende Fläche eingegrenzt und die Fluoreszenzintensität im Verhältnis zur Fläche kalkuliert. Bei dem in dieser Arbeit angestellten Vergleich der durchschnittlichen Fluoreszenzintensität des Proteins Cts1G sowohl in Einzelzellen als auch

in sich teilenden Zellen von *U. maydis* wurden bei der Messung der Fragmentierungszone stets nur die dazugehörigen Mutter- und Tochterzellen in der Analyse berücksichtigt. Einzelzellen und Fragmentierungszonen von *U. maydis* wurden beliebig gewählt. Der gemittelte Wert für die Fluoreszenzintensität einer ausgewählten Fläche des Hintergrunds diente als Nullmessung und wurde von den gemittelten Werten für die Fluoreszenzintensität der Einzel-, Mutter- und Tochterzelle sowie Fragmentierungszone subtrahiert.

Erstellen von Kymographen

Mittels Kymographen wurde in dieser Arbeit die Bewegung von fluoreszierender Partikel über die Zeit dargestellt. Mittels des Computerprogramms MetaMorph (Molecular Devices, Version 7, Sunnyvale, USA) wurden auf mikroskopischen Filmaufnahmen digital Abstände bestimmt. Die potentielle Bewegung fluoreszierender Partikel konnte über den Zeitraum der Aufnahme innerhalb des gewählten Abstands ermittelt bzw. durch eine graphische Darstellung visualisiert werden. Analysiert wurden in dieser Arbeit die Distanz zwischen den distalen Zellpolen von Mutter- und Tochterzelle in teilenden *U. maydis*-Zellen sowie apikale Bereiche von filamentösen *U. maydis*-Zellen.

4.4 Molekularbiologische Standardmethoden

4.4.1 Isolierung von Nukleinsäuren

Präparation von Plasmiden aus *E. coli*

Die Plasmidpräparation aus *E. coli* wurde wahlweise durch die Anwendung von o.g. Kits (Abschnitt 4.1.1) vollzogen. Die Durchführung erfolgte dabei nach Herstellerangaben. Alternativ wurden Plasmide mittels „kochender Lyse“ nach Sambrook *et al.* (1989) isoliert. Plasmid tragende *E. coli*-Zellen aus einer 1,5 bis 2 ml Übernachtskultur wurden durch Zentrifugieren (22000 x g, 2 min, RT) pelletiert, der Überstand verworfen und das Sediment in 200 STET-Puffer und 20 µl einer Lysozym-Lösung durch starkes Schütteln gelöst. Anschließend wurde der Ansatz für 1 min bei 95 °C inkubiert. Die Suspension aus lysierten Zellen wurde zentrifugiert (22000 x g, 10 min, RT) und das Pellet, bestehend aus Zelltrümmern und denaturierter, genomischer DNS, mittels eines sterilen Zahnstochers aus dem Ansatz entfernt. Anhand der Zugabe von 20 µl einer 3 M Natriumacetat-Lösung (pH 4,8) und 500 µl Isopropanol und anschließendem Invertieren wurde die Plasmid-DNS gefällt und durch darauffolgendes Zentrifugieren (22000 x g, 10 min, RT) sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen und 200 µl einer Ethanol-Lösung (70 %) auf das Pellet gegeben und erneut invertiert. Nach weiterem Zentrifugieren (22000 x g, 5 min, RT) wurde der Überstand vollständig abgenommen und verworfen. Das Pellet aus Plasmid-DNS wurde nach kurzem

Trocknen durch Zugabe von 100µl TE/RNase A-Puffer und leicht schüttelnder Inkubation bei 50 °C gelöst. Zur Analyse wurde ein Aliquot der Plasmidlösung (2 bis 3 µl) einer Test-Restriktion unterzogen und die DNS-Fragmente mittels Agarosegelelektrophorese (Abschnitt 4.6.6) getrennt. Bei nicht direkter Verwendung wurde die Plasmidlösung bei -20 °C gelagert.

STET-Puffer:

10 mM Tris-HCl, pH 8,0
100 mM NaCl
1 mM Na₂-EDTA
5 % (v/v) Triton X-100.
in H₂O_{bid.}

Lysozym-Lösung:

10 mg/ml Lysozym
in 1 x TE-Puffer

TE/Rnase A-Puffer:

10 mM Tris
1 mM EDTA
20 µg/ml RNase A
in H₂O_{bid.}
auf pH 8,0 einstellen

Isolierung von genomischer DNS aus *U. maydis*

Die Methode basiert auf einem modifizierten Protokoll in Hoffman und Winston (1987). Um genomische DNS (gDNS) aus *U. maydis* zu gewinnen, wurden zunächst Zellen einer dichtbewachsenen 2 bis 5 ml Übernachtskultur mittels Zentrifugation (22000 x g, 2 min, RT) sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen und ca. 200 µl Glasperlen (150 bis 200 µm Ø) zum Zellpellet gegeben. Nach Zugabe von 400 µl Ustilago-Lysispuffer und 500 µl eines Phenol/Chloroform-Gemisches wurde der Ansatz zum Zellaufschluss für 15 min unter starkem Schütteln (Vibrax-Schüttler) inkubiert. Durch anschließende Zentrifugation (22000 x g, 15 min, RT) wurde die Trennung von organischer und wässriger Phase erreicht und 400 µl der oberen, wässrigen Phase zur weiteren Verwendung in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Der neue Ansatz wurde mit 1 ml 100 %igen Ethanol versetzt, invertiert und zentrifugiert (22000 x g, 15 min, RT). Alternativ zur Phenol/Chloroform-Extraktion der gDNS konnten die Ansätze durch Zugabe von 500 µl eines Gemisches aus *Ustilago*-Lysispuffers und TE-Puffer (Verhältnis 1:1) und 15 min Inkubation unter starkem Schütteln (Vibrax-Schüttler) für 15 min bei 65 °C inkubiert werden und nach 5 min Lagerung auf Eis 100 µl einer 8 M Kaliumacetat-Lösung hinzugegeben werden. Nach Invertieren und Zentrifugation (22000 x g, 15 min, RT) wurden 500 µl des Überstands abgenommen und in einem neuen Reaktionsgefäß mit 400 µl Isopropanol versetzt. Die Ansätze wurden invertiert und zentrifugiert (22000 x g, 15 min, RT). Sowohl bei der Phenol/Chloroform-Extraktion als auch bei der alternativen Extraktionsmethode wurde der Überstand verworfen und das Pellet in 500 µl einer Ethanol-Lösung (70 %) aufgenommen. Nach erneutem Zentrifugieren (22000 x g, 5 min, RT) wurde der gesamte Überstand abgenommen und verworfen. Das Pellet wurde für 3 bis 5 min bei 50 °C getrocknet und final in 50 µl TE/RNase A-Puffer (s.o.) unter leichtem Schütteln für ca. 20 min bei 50 °C gelöst. Bei nicht direkter Verwendung wurde die gDNS-Lösung bei -20 °C gelagert.

***Ustilago*-Lysispuffer:**

50 mM Tris-Cl, pH 7,5
50 mM Na₂-EDTA
1% (w/v) SDS
in H₂O_{bid}

TE-Phenol/Chloroform:

gleiche Teile aus Phenol
(mit TE-Puffer äquilibriert)
und Chloroform

TE-Puffer:

10 mM Tris
1 mM EDTA
in H₂O_{bid}.
auf pH 8,0 einstellen

4.4.2 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Mittels eines Nanodrop-2000 Spektralphotometers (Thermo Fisher Scientific) wurde die Massenkonzentration von Nukleinsäuren ermittelt. Der Absorptionswert von 1 entspricht bei einer Schichtdicke von 1 cm und Wellenlänge von 260 nm einer Nukleinsäurekonzentration von ca. 50 µg/ml bei doppelsträngigen und 33 µg/ml bei einzelsträngigen Molekülen. Die Reinheit der gemessenen Probe wurde durch den Quotient (A₂₆₀/A₂₈₀) der Absorptionswerte bei einer Wellenlänge von 260 nm (A₂₆₀) und 280 nm (A₂₈₀) ausgedrückt. Werte unterhalb bzw. oberhalb von 1,8 weisen auf Verunreinigungen mit Proteinen bzw. Salzen oder Zuckern hin.

4.4.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Zur Vervielfältigung von DNS wurde die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) nach einer modifizierten Methode in Innis *et al.* (1990) angewendet. Als Matrize für die synthetisierten DNS-Fragmente dienten genomische DNS oder Plasmide. Spezifisch an die Matrize bindende Oligonukleotide am 5'-Ende („forward Primer“; fwPrimer) und 3'-Ende („reverse Primer“; revPrimer) des zu amplifizierenden DNS-Abschnitts initiierten die enzymatische Aktivität der DNS-Polymerasen. Als DNS-Polymerasen wurden entweder die Taq-DNS-Polymerase (1 kb/min) oder Phusion-DNS-Polymerase (2 kb/min) eingesetzt. Die optionale Zugabe von DMSO (0,03 %) setzte die spezifische Hybridisierungstemperatur der Oligonukleotide herab und konnte ggf. die Amplifikation positiv beeinflussen. Einzelne Nukleotide der Basen Adenin, Thymin, Guanin und Cytosin (dATP, dTTP, dGTP, dCTP) wurden als Material zur Herstellung des neuen DNS-Strangs verwendet. Ein typischer Restriktionsansatz setzte sich wie folgt zusammen:

10 – 50 ng	Matrizen-DNS
0,5 µl	100 µM fwPrimer
0,5 µl	100 µM revPrimer
0,25 µl	25 mM dNTPs
0,75 µl	DMSO [0,03 %]
1 – 2 U	Taq-/Phusion-DNS-Polymerase
2,5 µl	10 x DNS-Polymerase-Puffer [1x]
auf 25 µl mit H ₂ O _{bid} . auffüllen	

Zur Generierung von DNS-Sonden (Nachweis genomischer DNS-Fragmente im Southern Blot) wurden Digoxigenin-11-dUTPs (DIG-markiert) als Nukleotide eingesetzt und der gesamte Reaktionsansatz auf ein Volumen von 50 µl vergrößert.

In der „Mutagenese-PCR“ wurde durch gegenläufige amplifizierende Oligonukleotide eine Kopie der Plasmid-Matrize hergestellt. Die Sequenzen der Oligonukleotide wurden verändert, um gezielt Mutationen im neu-synthetisierten Plasmid einzufügen. In einem weiteren Reaktionsschritt wurde die Matrizen-DNS mittels des Restriktionsenzym *DpnI* degradiert. Ein Anwendungsbeispiel für die „Mutagenese-PCR“ in dieser Arbeit war die Entfernung einer *BsaI*-Restriktionsstelle im Plasmid pUMa2287, um weitere Restriktion mit *BsaI* an anderen Restriktionsstellen zu ermöglichen.

PCR-Produkte wurde durch die zyklische Inkubation (34 x) bei unterschiedlichen Temperaturoptima für Denaturierung der DNS (98°C), Hybridisierung der Oligonukleotide (spezifisch, häufig 65 °C) und Elongation des Amplikons (72 °C) synthetisiert. Exemplarisch wurde in einem PCR-Thermocycler (Labcyler, SensoQuest) folgendes Programm angewendet und ggf. entsprechend angepasst:

Initiale Denaturierung	98 °C	1 min	
Denaturierung	98 °C	10 sec	
Hybridisierung	65 °C	20 sec	
Elongation	72 °C	30 – 60 sec/kb	
Finale Elongation	37 °C	8 min	
	4 °C	∞	

4.4.4 Anwendungen zur Klonierung

Restriktion von Nukleinsäuren

Die Restriktion von DNS wurde mit Restriktionsendonukleasen des Typs I (Erkennungssequenz entspricht der Restriktionsstelle) und Typs IIS (Erkennungssequenz abseits der Restriktionsstelle) durchgeführt. Die Reaktionsansätze aus Restriktionsenzym (ca. 0,5 U) und DNS-Fragmenten bzw. Plasmid (ca. 0,5 µg) wurden mit H₂O und empfohlenen Puffern im geeigneten Verhältnis aufgefüllt. Gemäß den Herstellerangaben wurden die Restriktionsansätze bei vorgeschlagenen Temperaturen für mindestens 1,5 h inkubiert. Ein typischer Restriktionsansatz setzte sich wie folgt zusammen:

0,5 µg	DNS
0,5 U	Restriktionsenzym (TypI)
2 µl	10 x Restriktionspuffer [1x]
auf 20 µl mit H ₂ O _{bid.} auffüllen	

Abschließend wurden die jeweiligen Restriktionsansätze zur Analyse bzw. späteren Elution der DNS auf ein Agarosegel aufgetragen und durch Elektrophorese getrennt (Abschnitt 4.6.6).

Plasmide, die bei einer „Mutagenese-PCR“ als Vorlage dienten, wurden mittels des Restriktionsenzym *DpnI*, welches aus *E. coli* isolierte, methylierte DNS degradiert, vollständig abgebaut. Nach Restriktion wurde das Enzym *DpnI* durch Inkubation des Restriktionsansatzes für 20 min bei 80 °C Hitze-inaktiviert.

Dephosphorylierung von linearen Plasmiden

Um die erneute Ligation kompatibler Enden von restringierten Plasmiden zu vermeiden, wurden die terminalen Phosphatgruppen des doppelsträngigen DNS-Moleküls am jeweiligen 5'-Ende mittels der Alkalischen Phosphatase entfernt. Der Reaktionsansatz wurde über Nacht bei 37 °C inkubiert. Ein typischer Dephosphorylierungsansatz setzte sich wie folgt zusammen:

0,5 µg	lineares Plasmid
0,5 U	Alkalische Phosphatase
3 µl	10 x Dephosphorylierungspuffer [1x]
auf 30 µl mit H ₂ O _{bid.} auffüllen	

Ligation von DNS-Fragmenten

Für die kovalente Verbindung von DNS-Fragmenten mit linearisierten Plasmiden wurde die enzymatische Aktivität der T4-DNS-Ligase genutzt. Das zu inserierende DNS-Fragment wurde in einem 3 bis 5-fachen molaren Überschuss zum linearen Plasmid gegeben. Die Masse des Vektorrückgrats wurde dabei auf 50 bis 250 ng festgelegt. Folgende Formel mit *f* als Faktor für den molaren Überschuss liegt der Berechnung der einzusetzenden Masse des DNS-Fragments zugrunde:

$$\text{Masse [ng] Vektor} \times \text{Länge [kb] Insert} \times f = \text{Masse [ng] Insert} \times \text{Länge [kb] Vektor}$$

Die Ligationsansätze wurden über Nacht bei 16 °C inkubiert. Ein typischer Reaktionsansatz setzte sich wie folgt zusammen:

150 ng	lineares Plasmid (Vektorrückgrat)
5 x molarer Überschuss	Insert (DNA-Fragment)
1 U	T4-DNS-Ligase
2 µl	10 x T4-DNS-Ligase-Puffer [1x]
auf 20 µl mit H ₂ O _{bid.} auffüllen	

Golden-Gate-Klonierung

Mittels der Technik der Golden-Gate-Klonierung (Engler *et al.*, 2008; Terfrüchte *et al.*, 2013) konnten die Anwendungen der Restriktion und Ligation in einer Reaktion („one-pot-reaction“) vereint werden, ohne bei zwischenzeitlichen Isolierungen der DNS Ausgangsmaterial zu verlieren. Durch Verwendung von Restriktionsendonukleasen des Typs IIS (Erkennungssequenz abseits der Restriktionsstelle) konnte durch die beabsichtigte Positionierung einer

terminalen Erkennungssequenz und proximalen Restriktionsstelle in den DNS-Fragmenten bzw. Plasmiden nach Restriktion und Ligation der DNS-Moleküle auf Grund der entfernten Erkennungssequenz eine erneute Restriktion vermieden werden. Ein typischer Restriktionsansatz setzte sich wie folgt zusammen:

75 ng	Donor-Plasmid (Resistenzkassette)
75 ng	Ziel-Plasmid (Vektorrückgrat)
40 ng	DNS-Fragment (stromaufwärts Flanke)
40 ng	DNS-Fragment (stromabwärts Flanke)
1,5 µl	T4-DNS-Ligase
0,5 µl	Restriktionsenzym (Typ IIS)
1,5 µl	10 x T4-DNS-Ligase Puffer [1x]

auf 15 µl mit H₂O_{bid.} auffüllen

Das neue Plasmid wurde durch die zyklische Inkubation (50 x) bei den Temperaturoptima für Restriktion (37 °C) und Ligation (16 °C) synthetisiert. Dazu wurde in einem PCR-Thermocycler (Labcyler, SensoQuest) folgendes Programm angewendet:

37 °C	2 min	
16 °C	5 min	
.....		
37 °C	5 min	
50 °C	5 min	
80 °C	5 min	
4 °C	∞	

4.4.5 Sequenzanalysen

Sequenzanalysen von Plasmiden wurden als Auftragsarbeit beim Institut für Genetik der Ludwig-Maximilians-Universität München durchgeführt. Die Sequenzierung erfolgte nach der Sanger-Methode in einem Abi 3730 96-Kapillarsequenzierer (Applied Biosystems) unter Verwendung des Sequenzier-Kits BigDye-Terminator v3.1 (Applied Biosystems). Plasmide wurden zuvor mittels geeigneter Kits (Abschnitt 4.1.1) gereinigt und anschließend je Sequenzierungsansatz mit 3,2 pmol Sequenzierungsoligonukleotid versendet. Die Auswertung der Sequenzierungsdaten wurde mit dem Computerprogramm CloneManager 9 (Sci-Ed Software) ausgeführt. Ein Ansatz zur Sequenzierung setzte sich wie folgt zusammen:

250 ng	gereinigtes Plasmid
0,64 µl	5 µM Oligonukleotid-Lösung [3,2 µmol]

auf 7 µl mit 10 mM Tris/HCl (pH 8,5) auffüllen

4.4.6 Auftrennung und Nachweis von Nukleinsäuren

Agarosegelelektrophorese

Mittels Agarosegelelektrophorese konnten Nukleinsäuren im reziprok-proportionalen Verhältnis von Moleküllänge [bp] zur Wanderungsgeschwindigkeit im Gel getrennt werden. Agarosegele wurden aus 1 x TAE-Puffer mit 0,8 % (w/v) Agarose angesetzt. Nach Aufkochen der Suspension und anschließendem Abkühlen auf ca. 60 °C wurden 0,01 % (v/v) einer Ethidiumbromidlösung [5 mg/ml] hinzugegeben. Das flüssige Agarosegel wurde zur Polymerisierung auf einen Elektrophoreseschlitten gegossen. DNS-Proben wurden zwischenzeitlich mit Auftragspuffer versetzt. Nach Positionierung des erstarrten Gels in 1 x TAE-Puffer innerhalb einer Elektrophoresekammer und Auftragen der DNS erfolgte die Auftrennung der negativ geladenen Nukleinsäuren im elektrischen Feld bei einer Spannung von 90 bis 120 V. Ein mitgeführter Größenstandard (Enterophagen DNS λ mit *Pst*I restringiert, interne Laborproduktion oder GeneRuler 1 kb DNA Ladder, Thermo Fisher Scientific) ermöglichte die späterer Zuordnung der Molekularlängen [bp]. Durch die Interkalation mit Nukleinsäuren und Lichtemission bei Anregung des zugegebenen Ethidiumbromids kann die Auftrennung der Nukleinsäure unter UV-Licht bei einer Wellenlänge von 254 nm mit einer Kamera (Stratagene) dokumentiert werden. Um einzelne, getrennte DNS-Fragmente, beispielsweise nach einer Restriktion, zu isolieren, wurden die Bereiche im Agarosegel mit einem sauberen Skalpell ausgeschnitten und mit o.g. Kits (Abschnitt 4.1.1) zur Elution von DNS-Fragmenten aus Agarosegelen nach Herstellerangaben extrahiert.

50 x TAE-Puffer:

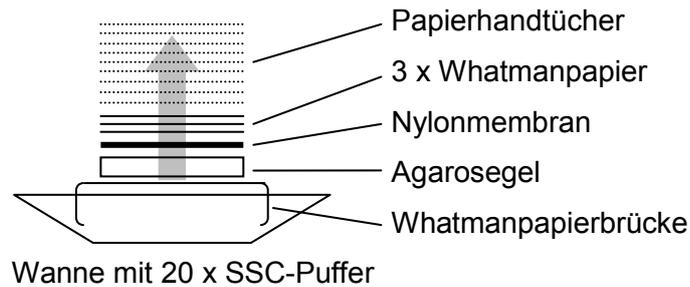
2 mM Tris-Base
2 mM Essigsäure (>99,7 %)
10 % (v/v) 0,5 M EDTA (pH 8,0)
in H₂O_{bid}

Auftragspuffer:

30 % (v/v) Glycerin
0,4 % (w/v) Bromphenolblau

Transfer von DNS auf eine Nylonmembran (Southern-Blot)

Die Durchführung des sogenannten Southern Blots basiert auf einer modifizierten Methode in Southern (1975). Restringierte gDNS wurde initial mittels Agarosegelelektrophorese (s.o.) getrennt und final durch einen Kapillar-Blot auf eine Nylonmembran übertragen. Nach der Agarosegelelektrophorese wurde das Gel mit der aufgetrennten Nukleinsäure zuerst in einer 0,25 M HCl-Lösung und anschließend in DENAT- und RENAT-Lösungen für je 15 bis 30 min leicht schüttelnd inkubiert. Zwischen den einzelnen Inkubationsschritten wurde das Agarosegel kurz mit H₂O gewaschen. Danach erfolgte auf einer Platte, die auf einer Wanne platziert wurde, der Aufbau des Kapillar-Blots aus Whatmanpapier (3 mm), Agarosegel, Nylonmembran (Amersham Hybond-N+, GE Healthcare) und Papierhandtüchern:



Als Transferflüssigkeit diente 20 x SSC-Puffer, der über Kapillarkräfte aus der Wanne über die Brücke aus Whatmanpapier durch das Agarosegel und die Membran in den Stapel aus Papierhandtüchern gesaugt wurde. Die DNS-Fragmente im Gel wurden durch den Pufferstrom aus dem Agarosegel gelöst und banden an die darüber liegende Nylonmembran. Der Transfer der Nukleinsäure erfolgte über Nacht. Nach Abbau des Kapillar-Blots wurde die die Nylonmembran kurz getrocknet und die gDNS durch UV-Bestrahlung (120 mJ/cm^2) mit einem UV-Strato-Crosslinker (Stratagene) auf der Membran fixiert.

20 x SSC-Puffer:

3 M NaCl
0,3 M Na-Citrat x 2 H₂O
in H₂O_{bid}
mit HCl auf pH 7,0 einstellen

DENAT-Lösung:

1,5 M NaCl
0,4 M NaOH
in H₂O_{bid}

RENAT-Lösung:

1,5 M NaCl
282 mM Tris/HCl
218 mM Tris-Base
in H₂O_{bid}.

Spezifischer Nachweis immobilisierter DNA

Für die Verifizierung von generierten *U. maydis*-Stämmen durch den Nachweis bestimmter DNS-Fragmente im Restriktionsmuster der gDNS wurden zuvor mittels PCR DNS-Sonden hergestellt. Die DNS-Sonden wurden zur Detektion mit Digoxigenin-11-dUTPs (DIG-markiert) synthetisiert und können durch spezifische Hybridisierung entsprechende DNS-Fragmente identifizieren.

Die im Southern Blot (s.o.) mit gDNS beladene Nylonmembran wurde in Hybridisierungspuffer für 30 min bei 65 °C rotierend äquilibriert. Währenddessen wurden die doppelsträngigen DNS-Sonden mit dem gesamten PCR-Ansatz in 15 ml Hybridisierungspuffer gelöst und für 10 min bei 95 bis 99 °C denaturiert. Anschließend wurden die in Hybridisierungspuffer gelösten, einzelsträngigen DNS-Sonden zur Nylonmembran gegeben und es folgte, zur Hybridisierung der DNS-Sonden mit den spezifischen DNS-Fragmenten der gDNA, eine weitere rotierende Inkubation bei 65 °C über Nacht. Nach der Hybridisierung wurde die Nylonmembran jeweils 15 min mit Waschpuffer I, Waschpuffer II und Waschpuffer III rotierend bei 65 °C inkubiert. Nachfolgende Schritte wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Die Nylonmembran wurde nach 5 min rotierender Inkubation mit DIG-Waschlösung für 30 bis 60 min mit DIG2-Blockierungslösung, zur Abdeckung freier Bindungsstellen auf der Membran, rotierend inkubiert. Anschließend erfolgte unter Rotation

die Bindung der DIG-markierten DNS-Sonden mit dem DIG-Antikörper mittels Inkubation mit der Antikörperlösung (1:10000 Anti-Digoxigenin-AB Fab-Fragmente (Roche) in DIG2-Blockierungslösung) für mindestens 60 min. Fortgesetzt wurde mit zweimaliger rotierender Inkubation in DIG-Waschlösung für je 10 min. Abschließend wurde die Nylonmembran für 5 min in DIG3-Lösung rotierend inkubiert und dann oberflächlich mit 8 ml der Detektionslösung (1:100 CDP-Star (Roche) in DIG3-Lösung) benetzt. Die Detektion der Chemilumineszenz durch die Reaktion der am Antikörper konjugierten Alkalischen Phosphatase mit dem Substrat in der Detektionslösung wurde in einem ImageQuant LAS4000 (GE Healthcare Life Science) nachgewiesen.

20 x SSPE

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

Denhardt-Lösung

2 % (v/v) BSA Fraktion V
2 % (v/v) Ficoll
2 % (v/v) PVP
in H₂O_{bid.}

DIG1-Lösung

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

DIG2-Blockierungslösung

2 % (w/v) Magermilchpulver
in DIG1-Lösung

DIG3-Lösung

1 M Tris/HCl
1 M NaCl
in H₂O_{bid.}
pH auf 9,5 einstellen

DIG-Waschlösung

0,3 % (v/v) Tween-20
in DIG1-Lösung

Hybridisierungspuffer

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

Waschpuffer I

2 x SSPE
0,1 % SDS
in H₂O_{bid.}

Waschpuffer II

1 x SSPE
0,1 % SDS
in H₂O_{bid.}

Waschpuffer III

0,1 x SSPE
0,1 % SDS
in H₂O_{bid.}

4.5 Biochemische Methoden

4.5.1 Herstellung von Gesamtzellextrakten

Der Aufschluss von Zellen zur Herstellung von Gesamtzellextrakten erfolgte in dieser Arbeit unter denaturierenden und nativen Konditionen. Native Gesamtzellextrakte konnten zur Bestimmung intrazellulärer Enzymaktivitäten eingesetzt werden, während in denaturierenden Gesamtzellextrakte mittels des Western Blot-Verfahrens spezifische, intrazelluläre Proteine

nachgewiesen wurden. Zur Herstellung der Gesamtzellextrakte wurde in CM-Flüssigmedium (Abschnitt 4.1.2) aus einer Vorkultur je Ansatz eine 50 ml Hauptkultur inokuliert und diese schüttelnd bei 28 °C inkubiert. Um den Zustand einer exponentiell wachsenden Kultur zu untersuchen und Konsistenz zu eventuellen enzymatischen Aktivitätstests zu bewahren, wurde die jeweilige Hauptkultur bei einer OD₆₀₀ von 1,0 durch Zentrifugation (2790 x g, ≥ 5 min, 4 °C) geerntet. Vom zellfreien Kulturüberstand wurde zur Präzipitation potentiell sekretierter Proteine wahlweise 1 ml abgenommen. Restlicher Überstand wurde verworfen und das jeweilige Zellpellet unter Kühlung auf Eis in 2 ml denaturierendem oder nativem Zellextraktionspuffer gelöst. Anschließend wurden die Zellsuspensionen mit zwei Metallkugeln in verschließbaren Metallzylindern überführt. Die Metallkugeln und Metallzylinder wurden zuvor mittels flüssigen Stickstoffs auf mindestens -196 °C abgekühlt. Der Zellaufschluss erfolgte unter starkem Schütteln in einer Kugelmühle (MM 400, Retsch GmbH, Haan, Deutschland) bei 30 Hz für 10 min und 4 °C. Die gefrorenen und aufgeschlossenen Zellen wurden über Nacht bei -80 °C gelagert. Nach langsamen Auftauen bei 4 °C für mindestens 1 h wurden die Suspensionen mit den aufgeschlossenen Zellen zentrifugiert (22000 x g, 30 min, 4 °C) und 1,5 ml des Überstands zur weiteren Verwendung abgenommen und auf Eis gelagert. Das Sediment aus Zelltrümmern wurde verworfen. Es folgte unmittelbar die Bestimmung des Proteingehalts der hergestellten Gesamtzellextrakte.

Denaturierender Zellextraktionspuffer:

1 % (v/v) 0,1 M PMSF-Lösung (in EtOH)
0,5 % (v/v) 0,5 M Benzamidin-Lösung (in H₂O_{bid.})
1 % (v/v) Proteaseinhibitor-Lösung
1 % (v/v) 1 M DTT-Lösung (in H₂O_{bid.})
in Lysispuffer

Lysispuffer:

10 mM Tris/HCl (pH 8,0)
8 M Harnstoff
in 0,1 M NaP_i (pH 8,0)

Nativer Zellextraktionspuffer:

1 % (v/v) 0,1 M PMSF-Lösung (in EtOH)
0,5 % (v/v) 0,5 M Benzamidin-Lösung (in H₂O_{bid.})
1 % (v/v) Proteaseinhibitor-Lösung
in 1 x PBS-Puffer

Proteaseinhibitor-Lösung:

1 Tablette Proteaseinhibitor-Mix (Roche)
in 500 µl H₂O_{bid.}

4.5.2 Präzipitation von Proteinen

Die aus einer Hauptkultur (Abschnitt 4.5.1) gewonnenen zellfreien Kulturüberstände wurden zur Fällung extrazellulärer Proteine mit 25 % (v/v) einer Trichloressigacetat (TCA)-Lösung [10 %] versetzt und nach Invertieren der jeweiligen Ansätze bei 4 °C auf Eis über Nacht gelagert. Die gefällten, zellfreien Kulturüberstände wurden zentrifugiert (22000 x g, 30 min, 4 °C), der Überstand verworfen und 1 ml an kaltem (-20 °C) Aceton hinzugegeben. Nach Invertieren der Ansätze wurde erneut zentrifugiert (22000 x g, 20 min, 4 °C), der Überstand verworfen und wiederholt 1 ml an kaltem (-20 °C) Aceton zum Pellet gegeben. Anschließend wurden die Ansätze wieder invertiert und zentrifugiert (22000 x g, 20 min, 4 °C). Nach letztmaligem Verwerfen des Überstands wurden die jeweiligen Pellets für mindestens 1 h bei

Raumtemperatur unter einem Abzug trocknen gelassen. Zur Vorbereitung auf die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Abschnitt 4.5.4) wurden 17 µl 3 x Laemmli-Auftragspuffer mit 0,1 M NaOH zu den gefällten Proteinen gegeben und das Pellet durch wiederholendes starkes Schütteln und kurzes Zentrifugieren (22000 x g, 30 sec, RT) vollständig resuspendiert.

50 % Trichloressigacetat-Lösung:

50 % (w/v) TCA
in H₂O_{bid}

3 x Laemmli-Auftragspuffer:

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

4.5.3 Bestimmung des Proteingehalts

Zur Bestimmung des Proteingehalts in Gesamtzellextrakten wurde die Methode in Bradford (1976) angewendet. Die Methode basiert auf einen Wechsel des Absorptionsmaximums von 465 nm auf 595 nm des Farbstoffs „Coomassie Brilliant Blue G-250“ bei Bindung mit Proteinen. Die Absorption bei 595 nm wurde an einem monochromatischen Fluoreszenzspektrometer (Tecan, Männedorf, Schweiz) gemessen. Zuvor wurden die Gesamtzell-extrakte je Ansatz 1:10 mit H₂O_{bid} verdünnt und davon 10 µl mit 200 µl Bradford-Reagenz (Biorad, vor der Anwendung 1:5 mit H₂O_{bid} verdünnt) in einer 96-Well Platte (96 Well, PS, F-Bottom, µCLEAR, transparent, CELLSTAR, Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland) vermischt. Je Ansatz wurden stets technische Triplikate angefertigt. Die 96-Well Platte mit den einzelnen Ansätzen wurde lichtgeschützt für 15 min inkubiert und anschließend die Absorption gemessen. Mittels Rinderserum-Albumin (BSA, Sigma A-6003) in unterschiedlichen Massenkonzentrationen (0 µg/ml, 50 µg/ml, 100 µg/ml, 150 µg/ml, 200 µg/ml) wurde eine Eichgerade erstellt und der Proteingehalt der Gesamtzellextrakte kalkuliert. Zur Vorbereitung auf die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (s.u.) wurde je Ansatz das Volumen für 10 µg Gesamtzellextrakt mit 8 bis 10 µl 3 x Laemmli-Auftragspuffer [1 x] versetzt und mit H₂O_{bid} auf ein Gesamtvolumen von 24 bis 30 µl aufgefüllt.

4.5.4 Auftrennung und Nachweis von Proteinen

SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page)

In dieser Arbeit wurden bei der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page) Proteinproben von Gesamtzellextrakten und zellfreien Kulturüberständen verwendet. Die Proteine wurden dabei im reziprok-proportionalen Verhältnis von absoluter Molekülmasse [kDa] zur Wanderungsgeschwindigkeit im SDS-Gel getrennt. Mit der Zugabe des Detergenz

SDS wurden die Proteine einheitlich negativ geladen und die Eigenladung egalisiert, wodurch die Wanderung im elektrischen Feld zur Anode ermöglicht wurde. In den vorbereiteten Ansätzen mit 3 x Laemmli-Auftragspuffer (Abschnitt 4.5.2 und 4.5.3) wurden die Proteine zunächst durch Inkubation für 10 min bei 95 °C denaturiert und anschließend die Suspension durch Zentrifugation (22000 x g, 5 min, RT) sedimentiert. Innerhalb einer mit Laufpuffer gefüllten Elektrophoresekammer wurden die einzelnen Ansätze auf ein SDS-Gel geladen und durch Anlegen einer Stromstärke von 35 mA/Gel die Wanderung der Proteine durch das SDS-Gel initiiert. Zur Konzentration der Proben bestand der obere Bereich des SDS-Gels aus dem sogenannten Sammelgel (5 %). Die eigentliche Trennung der Proteine erfolgte durch das darunterliegende Trenngel (10 %). Ein mitgeführter Größenstandard (PageRuler™ Prestained Protein Ladder (10 bis 180 kDa), Thermo Fisher Scientific) ermöglichte die spätere Zuordnung der absoluten Molekülmassen [kDa]. Sobald die sichtbare Lauffront der Proteinproben den untersten Bereich des SDS-Gels erreicht hatte, wurde die Elektrophorese gestoppt.

SDS-Sammelgel:

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

SDS-Trenngel (10 %):

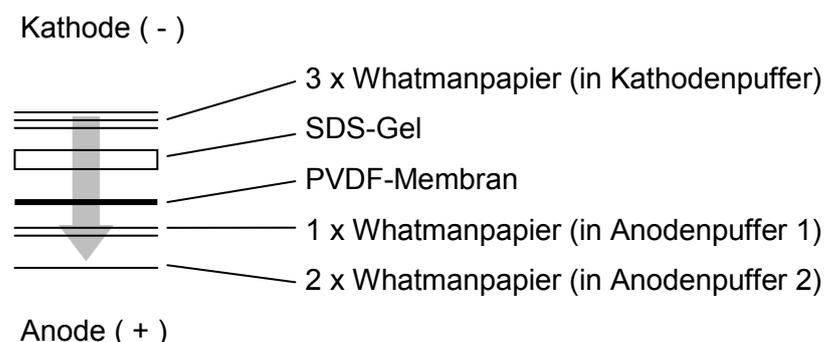
125m M Tris/HCl (pH 6,8)
 10 % Acrylamid
 0,1 % (w/v) SDS
 1,25 % (w/v) Glycerin
 0,05 % (w/v) APS
 0,001 % (v/v) TEMED
 in H₂O_{bid}

SDS-Laufpuffer:

1,5 M Tris/HCl (pH 8,4)
 192 mM Glycerin
 0,1 % (w/v) SDS
 in H₂O_{bid}.

Transfer von Proteinen auf eine PVDF-Membran (Western-Blot)

Im SDS-Gel aufgetrennte Proteine wurden für den spezifischen Nachweis mittels des Western Blot-Verfahrens auf eine PVDF-Membran (Amersham Hybond-P 0.45 PVDF, GE Healthcare) immobilisiert. Als Vorbereitung wurden je SDS-Gel drei Lagen Whatmanpapier in Kathodenpuffer, zwei Lagen Whatmanpapier in Anodenpuffer 2 und eine Lage Whatmanpapier in Anodenpuffer 1 getränkt. Die PVDF-Membran wurde für 1 min in Methanol aktiviert. Der Aufbau des Western Blots in einer ‚SemiDry‘-Elektroblot-Kammer (L/SC-280, Sigma oder 846-015-200, Biometra) setzte sich wie folgt zusammen:



In der Blot-Apparatur wurde eine Stromstärke von 70 mA/Membran angelegt und durch den Elektronenfluss vom negativen Pol (Kathode) zum positiven Pol (Anode) die Proteine für 1 h vom SDS-Gel auf die PVDF-Membran transferiert.

Anodenpuffer 1:

300 mM Tris/HCl (pH 10,4)
15 % (v/v) Methanol
in H₂O_{bid.}

Kathodenpuffer 1:

25 mM Tris/HCl (pH 9,4)
15 % (v/v) Methanol
40 mM ε-Aminocapronsäure
in H₂O_{bid.}

Anodenpuffer 2:

30 mM Tris/HCl (pH 10,4)
15 % (v/v) Methanol
in H₂O_{bid.}

Spezifischer Nachweis immobilisierter Proteine

Zum immunologischen Nachweis spezifischer Proteine auf der PVDF-Membran nach dem Transfer der Proteine vom SDS-Gel wurde diese leicht schüttelnd für 40 bis 60 min in Blockierungslösung inkubiert, um freie Bindungsstellen abzudecken. Anschließend wurde die PVDF-Membran zusammen mit der ersten Antikörperlösung eingeschweißt und es erfolgte die primäre Antikörperfärbung der immobilisierten Proteine auf einem Drehrad über Nacht bei 4 °C. Spezifische Erkennungssequenzen in zu detektierenden Proteinen sorgen für die Hybridisierung mit den primären Antikörpern. Unter leichtem Schütteln wurde die PVDF-Membran danach jeweils für 10 min zweimal in TBST-Puffer und einmal in TBS-Puffer gewaschen. Für die sekundäre Antikörperfärbung wurde die PVDF-Membran zusammen mit der zweiten Antikörperlösung eingeschweißt und auf einem Drehrad für mindestens 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Die sekundären Antikörper binden dabei an die primären Antikörper. Es folgte erneutes Waschen der PVDF-Membran durch leichtes Schütteln und zweimalige Inkubation in TBST-Puffer bzw. einmalige Inkubation in TBS-Puffer für jeweils 10 min. Abschließend wurde die PVDF-Membran mit 400 µl Detektionslösung (AceGlow™ Chemiluminescence, VWR) benetzt. Die sich entwickelnde Chemilumineszenz, welche durch die Reaktion der am sekundären Antikörper konjugierten Meerrettich-Peroxidase (*engl.*: horse radish peroxidase; HRP) mit dem Substrat in der Detektionslösung entstand, konnte in einem ImageQuant LAS4000 (GE Healthcare Life Science) visualisiert und somit Antikörper gefärbte Proteine auf der PVDF-Membran quantitativ nachgewiesen werden.

Tabelle 4.9: In dieser Arbeit verwendete Antikörper

primäre Antikörper	Verdünnung in der Antikörperlösung	Bezugsquelle
Anti-Gfp (monoklonal) aus Maus	1:1000	Roche
Anti-Aktin (monoklonal) aus Maus	1:1500	Roche
Anti-HA (monoklonal) aus Maus	1:3000	Roche

sekundärer Antikörper	Verdünnung in der Antikörperlösung	Bezugsquelle
Anti-Maus IgG HRP-konjugiert aus Ziege	1:4000	Promega

Als Kontrolle für die Beladung mit gleichmäßigen Proteinmengen wurde die PVDF-Membran nach Detektion der Chemilumineszenz unter leichtem Schütteln für jeweils 10 bis 20 min zuerst in Färbelösung und dann in Entfärbelösung inkubiert. Nach Waschen mit H₂O_{bid.} über Nacht und Trocknen der PVDF-Membran wurde das Muster der gefärbten Proteine durch visuelle Aufnahmen konserviert. Das charakteristische Färbemuster konnte dabei ausschließlich für Gesamtzellextrakte dokumentiert werden, da die Menge an Protein in Proben des zellfreien Kulturüberstands zu gering war.

Antikörperlösung:

primärer od. sekundärer Antikörper
in entsprechender Verdünnung
in Blockierungslösung

Färbelösung:

0,05 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue R250
9,0 % (v/v) Essigsäure
45,5 % (v/v) Methanol
in H₂O_{bid.}

Blockierungslösung:

3 % (w/v) Magermilchpulver
in TBST

TBS-Puffer:

20 mM Tris/HCl (pH 7,6)
136 mM NaCl
in H₂O_{bid.}

Entfärbelösung:

10 % (v/v) Essigsäure
10 % (v/v) Methanol
in H₂O_{bid.}

TBS-Puffer:

20 mM Tris/HCl (pH 7,6)
136 mM NaCl
0,05 % (v/v) Tween20
in H₂O_{bid.}

4.5.5 Enzymatische Aktivitätstests

Bestimmung der chitinolytischen Aktivität (Cts1-Assay)

Für die extrazelluläre Messung der Cts1-Aktivität im Kulturüberstand und auf der Zelloberfläche ganzer Zellen von *U. maydis* wurde in CM-Flüssigmedium (Abschnitt 4.1.2) aus einer Vorkultur eine 20 ml Hauptkultur inokuliert und diese schüttelnd bei 28 °C inkubiert. Um die extrazelluläre Aktivität in einer exponentiell wachsenden Kultur zu bestimmen, wurden ab einer OD₆₀₀ von 1,0 Aliquots der Hauptkultur entnommen und spätere Messwerte, wenn nicht anders angegeben, in Relation zur OD₆₀₀ gesetzt. Die Substratlösung mit dem Cts1-spezifischen Substrat 4-Methylumbelliferyl β-D-N,N',N"-triacetylchitotriosid (4-MUC, Sigma Aldrich) wurde für die enzymatischen Reaktionen im Aktivitätstest stets frisch angesetzt. Pro Reaktionsansatz wurden 30 µl der Aliquots mit 70 µl der Substratlösung in einer 96-Well Platte (96 Well, PS, F-Bottom, µCLEAR, schwarz, CELLSTAR, Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland) gemischt. Für die intrazelluläre Messung der Cts1-

Aktivität wurden zuvor generierte native Gesamtzellextrakte in PBS-Puffer (pH 7,2) auf eine Massenkonzentration von 33,33 µg/ml eingestellt und pro Reaktionsansatz 30 µl (ca. 1 µg) davon mit 70 µl der Substratlösung vermischt. Pro Ansatz wurden stets technische Triplikate angefertigt. Die 96-Well Platte mit den einzelnen Reaktionsansätzen wurde mit Parafilm als Verdunstungsschutz bedeckt und für 1 h bei 28 °C inkubiert. Die enzymatischen Reaktionen wurden durch jeweilige Zugabe von 200 µl einer 1 M Na₂CO₃-Lösung gestoppt und die relativen Fluoreszenzeinheiten (engl.: relative fluorescence units; RFU) des umgesetzten Produkts an einem monochromatischen Fluoreszenz-Spektrometer (Tecan, Männedorf, Schweiz) gemessen. Die Messung erfolgte bei einer definierten Sensitivität (gain100) und Extinktions-/Emissionswellenlängen von 360/450 nm. Ein Reaktionsansatz mit 30 µl des Kultivierungsmediums (CM-Flüssigmedium) und 70 µl Substratlösung diente als Nullmessung. Um die relativen Unterschiede der Messwerte der einzelnen Ansätze zu visualisieren, wurden die Werte für die entsprechenden Positivkontrollen bei der Auswertung der Messdaten auf 100 % gesetzt.

Substratlösung:

2 mg/ml 4-MUC in DMSO
1:10 in KHM-Puffer verdünnt

KHM-Puffer:

110 mM Kaliumacetat
20 mM HEPES
2 mM MgCl₂
in H₂O_{bid}

Bestimmung der β-Glukuronidase-Aktivität (Gus-Assay)

Die extrazelluläre Gus-Aktivität wurde in zellfreien Kulturüberständen ermittelt. In CM-Flüssigmedium (Abschnitt 4.1.2) wurde aus einer Vorkultur eine 20 ml Hauptkultur inokuliert und schüttelnd bei 28 °C inkubiert. Wenn nicht anders angegeben, wurde zur Bestimmung der extrazellulären Aktivität in einer exponentiell wachsenden Kultur ab einer OD₆₀₀ von 1,0 pro Ansatz 2 ml der Kultur entnommen und zentrifugiert (22000 x g, 5 min, RT). Spätere Messwerte wurden, wenn nicht anders angegeben, in Relation zur OD₆₀₀ gesetzt. Ein Volumen von 1,5 ml des zellfreien Überstands wurde zur weiteren Verwendung abgenommen. In den Experimenten zu Zellzyklus-Inhibitor-Studien wurden die zellfreien Überstände aus Kulturen, die in 0,1 M MOPS gepufferten CM-Flüssigmedium (pH 7,0) inkubiert wurden, zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Inokulation generiert. Die Substratlösung mit dem Gus-spezifischen Substrat 4-Methylumbelliferyl β-D-galactopyranoside (4-MUG, Bio World) wurde für die enzymatische Reaktion im Aktivitätstest stets frisch angesetzt. In einer 96-Well Platte (96 Well, PS, F-Bottom, µCLEAR, schwarz, CELLSTAR, Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland) wurden pro Reaktionsansatz 100 µl des zellfreien Überstands mit 100 µl der Substratlösung gemischt. Für die Bestimmung der intrazellulären Gus-Aktivität wurden zuvor generierte, native Gesamtzellextrakte mit PBS-Puffer (pH 7,2) auf eine Massenkonzentration von 100 µg/ml

eingestellt und je Reaktionsansatz 10 µl (1 µg) des Gesamtzellextrakts mit 90 µl Gus-Puffer und 100 µl Substratlösung vermischt. Pro Ansatz wurden stets technische Triplikate angefertigt. An einem monochromatischen Fluoreszenz-Spektrometer (Tecan, Männedorf, Schweiz) wurde die relative Fluoreszenz des umgesetzten Produkts in den jeweiligen Reaktionsansätzen der 96-Well Platte als Kinetik bei 37 °C dokumentiert. Die Messung erfolgte für einen Zeitraum von 70 min alle 10 min bei einer definierten Sensitivität (gain60) und Extinktions-/Emissionswellenlängen von 365/465 nm. Als Nullmessung wurde für Messungen des zellfreien Überstands ein Ansatz mit 100 µl des Kultivierungsmediums (CM-Flüssigmedium) und 100 µl Substratlösung bzw. für die Messung der intrazellulären Aktivität ein Ansatz mit 10 µl des Kultivierungsmediums (CM-Flüssigmedium), 90 µl Gus-Puffer und 100 µl Substratlösung verwendet. Messungen des Reaktionsprodukts 4-Methylumbelliferon (4-MU, Sigma-Aldrich) zu definierten Stoffmengenkonzentrationen (0 µM, 0,1 µM, 1,0 µM, 10 µM, 50 µM, 100 µM, 200 µM) dienten zur Erstellung einer Eichgeraden. Wahlweise wurde die entsprechende Positivkontrolle bei der Auswertung der Messdaten auf 100 % normalisiert, um die relativen Unterschiede der Messwerte der einzelnen Ansätze darzustellen.

Substratlösung:

2 mM 4-MUG
0,004 mg/ml BSA
in Gus-Extraktionspuffer

2 x Gus-Extraktionspuffer:

0,028 mM β-Mecaptoethanol
0,8 mM EDTA pH 8,0
10 mM NaPO₄-Puffer pH 7,0
0,004 % (w/v) Lauroyl-Sarcosin
0,004 % (v/v) Triton-X-100
in H₂O_{bid}

Bestimmung der Arabinofuranosidase-Aktivität (Afu2-Assay)

Um bei den Zellzyklus-Inhibitor-Studien die extrazelluläre Aktivität der konventionell sekretierten Arabinofuranosidase Afu2 zu messen, wurde auf Basis eines etablierten Protokolls (P. Stoffels, unveröffentlicht) folgende, experimentelle Durchführung realisiert: In 0,1 M MOPS gepufferten CM-Flüssigmedium (pH 7,0) wurde aus einer Vorkultur zunächst eine Hauptkultur inokuliert und schüttelnd bei 28 °C inkubiert. Zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Inokulation wurden pro Ansatz 2 ml Kultur entnommen und zentrifugiert (22000 x g, 5 min, RT). Vom zellfreien Überstand wurden 1,5 ml zur weiteren Verwendung abgenommen. Die Substratlösung mit dem Afu2-spezifischen Substrat p-Nitrophenyl-α-L-Arabinofuranosid (pNP-AF, Megazyme) wurde für die enzymatische Reaktion im Aktivitätstest frisch angesetzt. Als technische Triplikate wurden je Reaktionsansatz 75 µl des zellfreien Überstands mit 75 µl der Substratlösung in einer 96-Well Platte (96 Well, PS, F-Bottom, µCLEAR, schwarz, CELLSTAR, Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland) gemischt. Die Absorption des umgesetzten Produkts in den jeweiligen Reaktionsansätzen der 96-Well Platte wurde in einem monochromatischen Fluoreszenz-Spektrometer (Tecan,

Männedorf, Schweiz) als Kinetik bei 37 °C gemessen. Die Bestimmung der Absorption wurde für einen Zeitraum von 70 min alle 10 min bei einer Wellenlänge von 405 nm durchgeführt. Ein Ansatz mit 75 µl des Kultivierungsmediums (CM-Flüssigmedium) und 75 µl Substratlösung wurde als Nullmessung genutzt. Mittels des Reaktionsprodukts p-Nitrophenols (pNP, Merck) in unterschiedlichen Stoffmengenkonzentrationen (0 nM, 15,625 nM, 31,25 nM, 62,5 nM, 125 nM, 250 nM, 0,5 mM, 1,0 mM) wurde eine Eichgerade erstellt und die Menge an hydrolysiertem Substrat bestimmt.

Substratlösung:

1,25 mM pNP-AF
in 0,1 M Natriumacetat-Lösung (pH 5,5)

5. Literaturverzeichnis

- Aalto, M. K., Ronne, H. und Keranen, S.** (1993). Yeast syntaxins Ssolp and Sso2p belong to a family of related membrane proteins that function in vesicular transport. *EMBO J.*, **12**(1):4095–4104.
- Abrahamsen, H. und Stenmark, H.** (2010). Protein Secretion: Unconventional Exit by Exophagy. *Curr Biol.*, **20**(9):415–418.
- Akopian, D., Shen, K., Zhang, X. und Shan, S.** (2013). Signal Recognition Particle: An essential protein targeting machine. *Annu Rev Biochem.*, **82**:693–721
- Altamirano, S., Chandrasekaran, S. und Kozubowski, L.** (2017). Mechanisms of cytokinesis in basidiomycetous yeasts. *Fungal Biol Rev.*, **31**(2):73–87.
- Andrei, C., Dazzi, C., Lotti, L., Torrisi, M. R., Chimini, G. und Rubartelli, A.** (1999). The secretory route of the leaderless protein interleukin 1beta involves exocytosis of endolysosome-related vesicles. *Mol Biol Cell.*, **10**(5):1463–1475.
- Aschenbroich, J., Hussnaetter, K. P., Stoffels, P., Langner, T., Zander, S., Sandrock, B., Bölker, M., Feldbrügge, M. und Schipper, K.** (2018). The germinal centre kinase Don3 is crucial for unconventional secretion of chitinase Cts1 in *Ustilago maydis*. *Biochim Biophys Acta Proteins Proteom.*, S1570–9639(18)30176-6.
- Ausubel, F. M., Brenz, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A. und Strukl, K.** (1987). Current Protocols in Molecular Biology. *John Wiley & Sons, Inc., USA.*
- Backhaus, R., Zehe, C., Wegehingel, S., Kehlenbach, A., Schwappach, B. und Nickel, W.** (2004). Unconventional protein secretion: membrane translocation of FGF-2 does not require protein unfolding. *J Cell Sci.*, **117**(Pt 9):1727–1736.
- Bader, O., Krauke, Y. und Hube, B.** (2008). Processing of predicted substrates of fungal Kex2 proteinases from *Candida albicans*, *C. glabrata*, *Saccharomyces cerevisiae* and *Pichia pastoris*. *BMC Microbiol.*, **16**:1–16.
- Bader, O., Schaller, M., Klein, S., Kukula, J., Haack, K., Mühlischlegel, F., Korting, H. C., Schäfer, W. und Hube, B.** (2001). The KEX2 gene of *Candida glabrata* is required for cell surface integrity. *Mol Microbiol.*, **41**(6):1431–1444.
- Baladrón, V., Ufano, S., Dueñas, E., Martín-Cuadrado, A. B., Del Rey, F. und Vázquez De Aldana, C. R.** (2002). Eng1p, an endo-1,3- β -glucanase localized at the daughter side of the septum, is involved in cell separation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot Cell.*, **1**(5):774–786.
- Banuett, F.** (1992). *Ustilago maydis*, the delightful blight. *Trends Genet.*, **8**(5):174–180.
- Banuett, F. und Herskowitz, I.** (1989). Different alleles of *Ustilago maydis* are necessary for maintenance of filamentous growth but not for meiosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, **86**(15):5878–5882.
- Banuett, F. und Herskowitz, I.** (2002). Bud morphogenesis and the actin and microtubule cytoskeletons during budding in the corn smut fungus, *Ustilago maydis*. *Fungal Genet Biol.*, **37**(2):149–170.
- Banuett, F., Quintanilla Jr, R. H. und Reynaga-Peña, G. C.** (2009). The machinery for cell polarity, cell morphogenesis, and the cytoskeleton in the Basidiomycete fungus *Ustilago*

- maydis* a survey of the genome sequence. *Fungal Genet Biol.*, **45(Suppl 1)**:1–24.
- Barlowe, C., Orci, L., Yeung, T., Hosobuchi, M., Hamamoto, S., Salama, N., Rexach, M. F., Ravazzola, M., Amherdt, M. und Schekman, R.** (1994). COPII: A membrane coat formed by Sec proteins that drive vesicle budding from the endoplasmic reticulum. *Cell.*, **77(6)**:895–907.
- 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(1)**:94–102.
- Baumann, S., Pohlmann, T., Jungbluth, M., Brachmann, A. und Feldbrügge, M.** (2012). Kinesin-3 and dynein mediate microtubule-dependent co-transport of mRNPs and endosomes. *J Cell Sci.*, **125(11)**:2740–2752.
- Becht, P., Vollmeister, E., Feldbrügge, M. und Feldbrügge, M.** (2005). Role for RNA-Binding Proteins Implicated in Pathogenic Development of *Ustilago maydis* Role for RNA-Binding Proteins Implicated in Pathogenic Development of *Ustilago maydis*. *Eukaryot Cell.*, **4(1)**:121–133.
- Behnia, R., Barr, F. A., Flanagan, J. J., Barlowe, C. und Munro, S.** (2007). The yeast orthologue of GRASP65 forms a complex with a coiled-coil protein that contributes to ER to Golgi traffic. *J Cell Biol.*, **176(3)**:255–261.
- Benham, A. M.** (2012). Protein Secretion and the Endoplasmic Reticulum. *Cold Spring Harb Perspect Biol.*, **4(8)**:1–16.
- Böhmer, C., Böhmer, M., Bölker, M. und Sandrock, B.** (2008). Cdc42 and the Ste20-like kinase Don3 act independently in triggering cytokinesis in *Ustilago maydis*. *J Cell Sci.*, **121(Pt 2)**:143–148.
- 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(6)**:1484–1496.
- Bölker, M., Basse, C. W. und Schirawski, J.** (2008). *Ustilago maydis* secondary metabolism - From genomics to biochemistry. *Fungal Genet Biol.*, **45(Suppl 1)**:88–93.
- Bölker, M., Urban, M. und Kahmann, R.** (1992). The a mating type locus of *U. maydis* specifies cell signaling components. *Cell.*, **68(3)**:441–450.
- Boncompain, G. und Perez, F.** (2013). The many routes of Golgi-dependent trafficking. *Histochem Cell Biol.*, **140(3)**:251–260.
- Bordoli, M. R., Yum, J., Breitkopf, S. B., Thon, J. N., Italiano, J. E., Xiao, J., Worby, C., Wong, S. K., Lin, G., Edenius, M., Keller, T. L., Asara, J. M., Dixon, J. E., Yeo, C. Y. und Whitman, M.** (2014). A secreted tyrosine kinase acts in the extracellular environment. *Cell.*, **158(5)**:1033–1044.
- Bottin, A., Kämper, J. und Kahmann, R.** (1996). Isolation of a carbon source-regulated gene from *Ustilago maydis*. *Mol Gen Genet.*, **253(3)**:342–352.
- Bowman, S. M. und Free, S. J.** (2006). The structure and synthesis of the fungal cell wall. *BioEssays.*, **28(8)**:799–808.
- Braakman, I. und Hebert, D. N.** (2013). Protein folding in the endoplasmic reticulum. *Cold Spring Harb Perspect Biol.*, **5(5)**:1–17.
- 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(2)**:216–226.
- Brachmann, A., Weinzierl, G., Kämper, J. und Kahmann, R.** (2001). Identification of genes in the bW/bE regulatory cascade in *Ustilago maydis*. *Mol Microbiol.*, **42(4)**:1047–1063.
- Bradford, M. M.** (1976). A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal Biochem.*, **72**:248–254.
- Brefort, T., Doehlemann, G., Mendoza-Mendoza, A., Reissmann, S., Djamei, A. und Kahmann, R.** (2009). *Ustilago maydis* as a Pathogen. *Annu Rev Phytopathol.*, **47(1)**:423–445.
- Brefort, T., Schipper, K., Gunther, D. und Kahmann, R.** (2008). The Biotrophic Phase of *Ustilago maydis*: Novel Determinants for Compatibility. *Genomics of Disease.*, 173–181.
- Brodsky, J. L., Goeckeler, J. und Schekman, R.** (1995). BiP and Sec63p are required for both co- and posttranslational protein translocation into the yeast endoplasmic reticulum. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, **92(21)**:9643–9646.
- Broomfield, P. L. E. 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(2)**:117–121.
- Brough, D., Pelegrin, P. und Nickel, W.** (2017). An emerging case for membrane pore formation as a common mechanism for the unconventional secretion of FGF2 and IL-1 β . *J Cell Sci.*, **130**:3197–3202.
- Bruns, C., Mccaffery, J. M., Curwin, A. J., Duran, J. M. und Malhotra, V.** (2011). Biogenesis of a novel compartment for autophagosome-mediated unconventional protein secretion. *J Cell Biol.*, **195(6)**:979–992.
- Cabib, E.** (2004). The septation apparatus, a chitin-requiring machine in budding yeast. *Arch Biochem Biophys.*, **426(2)**:201–207.
- Caccuri, F., Iaria, M. L., Campilongo, F., Varney, K., Rossi, A., Mitola, S., Schiarea, S., Bugatti, A., Mazzuca, P., Giagulli, C., Fiorentini, S., Lu, W., Salmona, M. und Caruso, A.** (2016). Cellular aspartyl proteases promote the unconventional secretion of biologically active HIV-1 matrix protein p17. *Sci Rep.*, **6**:1–15.
- Carelli, S., Ceriotti, A., Cabibbo, A., Fassina, G., Ruvo, M. und Sitia, R.** (1997). Cysteine and Glutathione Secretion in Response to Protein Disulfide Bond Formation in the ER. *Science.*, **277(5332)**:1681–1684.
- Castillo Lluva, S. und Pérez Martín, J.** (2005). The Induction of the Mating Program in the Phytopathogen *Ustilago maydis* Is Controlled by a G1 Cyclin. *Plant Cell.*, **17(12)**:3544–3560.
- Chang, H. C., Samaniego, F., Nair, B. C., Buonaguro, L. und Ensoli, B.** (1997). HIV-1 Tat protein exits from cells via a leaderless secretory pathway and binds to extracellular matrix-associated heparan sulfate proteoglycans through its basic region. *Aids.*, **11(12)**:1421–1431.
- Christensen, P. U., Davey, J. und Nielsen, O.** (1997). The *Schizosaccharomyces pombe* mam1 gene encodes an ABC transporter mediating secretion of M-factor. *Mol Gen Genet.*, **255(2)**:226–236.
- Christoforidis, S., McBride, H. M., Burgoyne, R. D. und Zerial, M.** (1999). The rab5

- effector EEA1 is a core component of endosome docking. *Nature.*, **397(6720)**:621–625.
- Clark, S. A. und Theg, S. M.** (1997). A folded protein can be transported across the chloroplast envelope and thylakoid membranes. *Mol Biol Cell.*, **8(5)**:923–934.
- Cleves, A. E. und Kelly, R. B.** (1996). Protein translocation: Rehearsing the ABCs. *Curr Biol.*, **6(3)**:276–278.
- Cohen, S. N., Chang, A. C. Y. und Hsu, L.** (1972). Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. *Proc Natl Acad Sci.*, **69(8)**:2110–2114.
- Colman-Lerner, A., Chin, T. E. und Brent, R.** (2001). Yeast Cbk1 and Mob2 activate daughter-specific genetic programs to induce asymmetric cell fates. *Cell.*, **107(6)**:739–750.
- Corish, P. und Tyler-Smith, C.** (1999). Attenuation of green fluorescent protein half-life in mammalian cells. *Protein Eng.*, **12(12)**:1035–1040.
- Coughlan, C. M. und Brodsky, J. L.** (2005). Use of yeast as a model system to investigate protein conformational diseases. *Mol Biotechnol.*, **30(2)**:171–180.
- Cruz-Garcia, D., Curwin, A. J., Popoff, J. F., Bruns, C., Duran, J. M. und Malhotra, V.** (2014). Remodeling of secretory compartments creates CUPS during nutrient starvation. *J Cell Biol.*, **207(6)**:695–703.
- D’Arcangelo, J. G., Stahmer, K. R. und Miller, E. A.** (2013). Vesicle-mediated export from the ER: COPII coat function and regulation. *Biochim Biophys Acta.*, **1833(11)**:2464–2472.
- Dalbey, R. E. und Robinson, C.** (1999). Protein translocation into and across the bacterial plasma membrane and the plant thylakoid membrane. *Trends Biochem Sci.*, **24(1)**:17–22.
- Debaisieux, S., Rayne, F., Yezid, H. und Beaumelle, B.** (2012). The Ins and Outs of HIV-1 Tat. *Traffic.*, **13(3)**:355–363.
- Delic, M., Valli, M., Graf, A. B., Pfeffer, M., Mattanovich, D. und Gasser, B.** (2013). The secretory pathway : exploring yeast diversity. *FEMS Microbiol Rev.*, **37(6)**:872–914.
- Dempski, R. E. und Imperiali, B.** (2002). Oligosaccharyl transferase: Gatekeeper to the secretory pathway. *Curr Opin Chem Biol.*, **6(6)**:844–850.
- Doehlemann, G., Van Der Linde, K., Aßmann, D., Schwambach, D., Hof, A., Mohanty, A., Jackson, D. und Kahmann, R.** (2009). Pep1, a secreted effector protein of *Ustilago maydis*, is required for successful invasion of plant cells. *PLoS Pathog.*, **5(2)**:e1000290.
- Doehlemann, G., Wahl, R., Vranes, M., de Vries, R. P., Kämper, J. und Kahmann, R.** (2008). Establishment of compatibility in the *Ustilago maydis*/maize pathosystem. *J Plant Physiol.*, **165(1)**:29–40.
- Duran, J. M., Anjard, C., Stefan, C., Loomis, W. F. und Malhotra, V.** (2010). Unconventional secretion of Acb1 is mediated by autophagosomes. *J Cell Biol.*, **188(4)**:527–536.
- Ebert, A. D., Laußmann, M., Wegehangel, S., Kaderali, L., Erfle, H., Reichert, J., Lechner, J., Beer, H. D., Pepperkok, R. und Nickel, W.** (2010). Tec-Kinase-Mediated Phosphorylation of Fibroblast Growth Factor 2 is Essential for Unconventional Secretion. *Traffic.*, **11(6)**:813–826.

- Economou, A., Christie, P. J., Fernandez, R. C., Palmer, T., Greg, V. und Pugsley, A. P.** (2006). Secretion by numbers: protein traffic in prokaryotes. *Mol Microbiol.*, **62**(2):308-19.
- Engler, C., Kandzia, R. und Marillonnet, S.** (2008). A one pot, one step, precision cloning method with high throughput capability. *PLoS One.*, **3**(11):e3647.
- Ensoli, B., Barillari, G., Salahuddin, S. Z., Gallo, R. C. und Wong-Staal, F.** (1990). Tat protein of HIV-1 stimulates growth of cells derived from Kaposi's sarcoma lesions of AIDS patients. *Nature.*, **345**(6270):84–86.
- Esser, C., Alberti, S. und Höfeld, J.** (2004). Cooperation of molecular chaperones with the ubiquitin/proteasome system. *Biochim Biophys Acta.*, **1695**(1–3):171–188.
- Evangelista, M.** (2003). Formins: signaling effectors for assembly and polarization of actin filaments. *J Cell Sci.*, **116**(13):2603–2611.
- Feizi, A., Österlund, T., Petranovic, D., Bordel, S. und Nielsen, J.** (2013). Genome-Scale Modeling of the Protein Secretory Machinery in Yeast. *PLoS One.*, **8**(5):e63284.
- Feldbrügge, M., Kämper, J., Steinberg, G. und Kahmann, R.** (2004). Regulation of mating and pathogenic development in *Ustilago maydis*. *Curr Opin Microbiol.*, **7**(6):666–672.
- Feldbrügge, M., Kellner, R. und Schipper, K.** (2013). The biotechnological use and potential of plant pathogenic smut fungi. *Appl Microbiol Biotechnol.*, **97**(8):3253-3265.
- 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):40–46.
- Ferris, S. P., Kodali, V. K. und Kaufman, R. J.** (2014). Glycoprotein folding and quality-control mechanisms in protein-folding diseases. *Dis Model Mech.*, **7**(3):331–341.
- Fink, G. und Steinberg, G.** (2006). Dynein-dependent Motility of Microtubules and Nucleation Sites Supports Polarization of the Tubulin Array in the Fungus *Ustilago maydis*. *Mol Biol Cell.*, **17**(7):351–369.
- Fink, S. L. und Cookson, B. T.** (2006). Caspase-1-dependent pore formation during pyroptosis leads to osmotic lysis of infected host macrophages. *Cell Microbiol.*, **8**(11):1812–1825.
- Fischer-Parton, S., Parton, R. M., Hickey, P. C., Dijksterhuis, J., Atkinson, H. A. und Read, N. D.** (2000). Confocal microscopy of FM4-64 as a tool for analysing endocytosis and vesicle trafficking in living fungal hyphae. *J Microsc.*, **198**(Pt 3):246–259.
- Fitzgerald, I. und Glick, B. S.** (2014). Secretion of a foreign protein from budding yeasts is enhanced by cotranslational translocation and by suppression of vacuolar targeting. *Microb Cell Fact.*, **13**(1):125.
- Franklin, B. S., Bossaller, L., Nardo, D. De, Ratter, J. M., Stutz, A., Engels, G., Brenker, C., Nordhoff, M., Mirandola, S.R., Al-Amoudi, A., Mangan, M. S., Zimmer, S., Monks, B. G., Fricke, M., Schmidt, R. E., Espevik, T., Jones, B., Jarnicki, A. G., Hansbro, P. M., Busto, P., Marshak-Rothstein, A., Hornemann, S., Aguzzi, A., Kastentmüller, W. und Latz, E.** (2014). ASC has extracellular and prionoid activities that propagate inflammation. *Nat Immunol.*, **15**(8):727–737.
- Freitag, J., Lanver, D., Böhmer, C., Schink, K. O., Bölker, M. und Sandrock, B.** (2011). Septation of infectious hyphae is critical for appressoria formation and virulence in the smut fungus *Ustilago maydis*. *PLoS Pathog.*, **7**(5):e1002044.

- Fuchs, U. und Steinberg, G.** (2005). Endocytosis in the plant-pathogenic fungus *Ustilago maydis*. *Protoplasma.*, **226**(1–2):75–80.
- Fuller, R.** (1988). Enzymes Required For Yeast Prohormone Processing. *Annu Rev Physiol.*, **50**(1):345–362.
- Gaëlle, R., Bailey, J. A., Keon, J. P. R. und Hargreaves, J. A.** (1992). Development of a GUS reporter gene system for the maize pathogen *Ustilago maydis*. *Physiol Mol Plant Pathol.*, **40**:383–393.
- García-Muse, T., Steinberg, G. und Pérez-Martín, J.** (2003). Pheromone-Induced G 2 Arrest in the Phytopathogenic Fungus *Ustilago maydis*. *Eukaryot Cell.*, **2**(3):494–500.
- Gaullier, J., Simonsen, A., D'Arrigo, A., Bremnes, B., Stenmark, H., und Aasland, R.** (1998). FYVE fingers bind PtdIns(3)P. *Nature.*, **394**(6692):432–433.
- Gee, H. Y., Kim, J. und Lee, M. G.** (2018). Unconventional secretion of transmembrane proteins. *Semin Cell Dev Biol.*, **83**:59–66.
- Geiser, E., Reindl, M., Blank, L. M., Feldbrügge, M., Wierckx, N. und Schipper, K.** (2016). Activating Intrinsic Carbohydrate-Active Enzymes of the Smut Fungus. *Appl Environ Microbiol.*, **82**(17):5174–5185.
- Gentzsch, M. und Tanner, W.** (1996). The PMT gene family: protein O-glycosylation in *Saccharomyces cerevisiae* is vital. *EMBO J.*, **15**(21):5752–5759.
- Gerngross, T. U.** (2004). Advances in the production of human therapeutic proteins in yeasts and filamentous fungi. *Nat Biotechnol.*, **22**(11):1409–1414.
- Gilbert, H. F.** (1995). Thiol/Disulfide Exchange Equilibria and Disulfide Bond Stability. *Methods Enzymol.*, **251**(1978):8–28.
- Giuliani, F., Grieve, A., und Rabouille, C.** (2011). Unconventional secretion: A stress on GRASP. *Curr Opin Cell Biol.*, **23**(4):498–504.
- Glick, B. und Nakano, A.** (2009). Membrane traffic within the Golgi apparatus. *Annu Rev Cell Dev Biol.*, **25**:113–132.
- Göhre, V., Vollmeister, E., Bölker, M. und Feldbrügge, M.** (2012). Microtubule-dependent membrane dynamics in *Ustilago maydis*: Trafficking and function of Rab5a-positive endosomes. *Commun Integr Biol.*, **5**(5):485–490.
- Goller, S. P., Schoisswohl, D., Baron, M., Parriche, M. und Kubicek, C. P.** (1998). Role of Endoproteolytic Dibasic Proprotein Processing in Maturation of Secretory Proteins in *Trichoderma reesei*. *Appl Environ Microbiol.*, **64**(9):3202–3208.
- Gopaul, D. N., Guo, F. und Duyne, G. D. van.** (2013). Structure of the Holliday junction intermediate in Cre-loxP site-specific recombination. *EMBO J.*, **17**(14):4175–4187.
- Green, E. R. und Meccas, J.** (2016). Bacterial Secretion Systems: An Overview. *Microbiol Spectr.*, **4**(1):215–239.
- Grieve, A. G. und Rabouille, C.** (2011). Golgi bypass: Skirting around the heart of classical secretion. *Cold Spring Harb Perspect Biol.*, **3**(4):1–15.
- Groenendyk, J., Agellon, L. B. und Michalak, M.** (2013). Coping with Endoplasmic Reticulum Stress in the Cardiovascular System. *Annu Rev Physiol.*, **75**(1):49–67.
- Grote, E., Carr, C. M. und Novick, P. J.** (2000). Ordering the final events in yeast

- exocytosis. *J Cell Biol.*, **151**(2):439–451.
- Gull, K. und Trinci, A. P. J.** (1974). Detection of areas of wall differentiation in fungi using fluorescent staining. *Arch Microbiol.*, **96**(1):53–57.
- Hansen, J. S., Færgeman, N. J., Kragelund, B. B. und Knudsen, J.** (2008). Acyl-CoA-binding protein (ACBP) localizes to the endoplasmic reticulum and Golgi in a ligand-dependent manner in mammalian cells. *Biochem J.*, **410**(3):463–472.
- Harlan, J. E., Hajduk, P. J., Yoon, H. S. und Fesik, S. W.** (1994). Pleckstrin homology domains bind to phosphatidylinositol- 4,5-bisphosphate., *Nature.*, **371**(6493):168-170.
- Haskins, R. H. und Thorn, J. A.** (1951). Biochemistry of the ustilaginales. VII. Antibiotic activity of ustilagic acid. *Can J Microbiol.*, **29**(6):749–756.
- Hayakawa, Y., Ishikawa, E., Shoji, J. Y., Nakano, H. und Kitamoto, K.** (2011). Septum-directed secretion in the filamentous fungus *Aspergillus oryzae*. *Mol Microbiol.*, **81**(1):40–55.
- Hebert, D. N., Lamriben, L., Powers, E. T. und Kelly, J. W.** (2014). The intrinsic and extrinsic effects of N-linked glycans on glycoproteostasis. *Nat Chem Biol.*, **10**(1):1–23.
- Hewald, S., Linne, U., Scherer, M., Marahiel, M. A., Kämper, J. und Bölker, M.** (2006). Identification of a gene cluster for biosynthesis of mannosylerythritol lipids in the basidiomycetous fungus *Ustilago maydis*. *Appl Environ Microbiol.*, **72**(8):5469–5477.
- Hlubek, A., Schink, K. O., Mahlert, M., Sandrock, B. und Bölker, 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**(3):615–623.
- Hoffman, C. S. und Winston, F.** (1987). A ten-minute DNA preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformiaon of *Escherichia coli*. *Gene.*, **57**(2–3):267–272.
- Holland, I. B., Schmitt, L. und Young, J.** (2005). Type 1 protein secretion in bacteria, the ABC-transporter dependent pathway. *Mol Membr Biol.*, **22**(1–2):29–39.
- Holliday, R.** (1974). Molecular aspects of genetic exchange and gene conversion. *Genetics.*, **78**(1):273–287.
- Holliday, R.** (2004). Early studies on recombination and DNA repair in *Ustilago maydis*. *DNA Repair (Amst).*, **3**(6):671–682.
- Hurtley, S. M. und Helenius, A.** (1989). Protein oligomerization in the Endoplasmic Reticulum. *Annu Rev Cell Biol.*, **5**:277–307.
- Hutagalung, A. H. und Novick, P. J.** (2013). Role of Rab GTPases in Membrane Traffic and Cell Physiology. *Physiol Rev.*, **91**(1):119–149.
- Idiris, A., Tohda, H. und Kumagai, H.** (2010). Engineering of protein secretion in yeast: strategies and impact on protein production. *Appl Microbiol Biotechnol.*, **86**(2):403-417.
- Innis, M. A., Gelfand, D. H., Sninsky, J. J. and White, T. J.** (1990). PCR Protocols: a guide to methods and applications. *San Diego, USA, Acad Press.*, **6**(9):229.
- Iturriaga, G., Jefferson, R. A und Bevan, M. W.** (1989). Endoplasmic reticulum targeting and glycosylation of hybrid proteins in transgenic tobacco. *Plant Cell.*, **1**(3):381–390.
- Jahn, R. und Scheller, R. H.** (2006). SNAREs - Engines for membrane fusion. *Nat Rev Mol*

- Cell Biol.*, **7(9)**:631–643.
- Jankowski, S.** (2013). Charakterisierung der unkonventionell sekretierten Endochitinase Cts1 in *Ustilago maydis*. Masterarbeit. Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.
- Jeang, K. T., Xiao, H. und Rich, E. A.** (1999). Multifaceted activities of the HIV-1 transactivator of transcription, Tat. *J Biol Chem.*, **274(41)**:28837–28840.
- Jefferson, R. A., Burgess, S. M. und Hirsh, D.** (1986). beta-Glucuronidase from *Escherichia coli* as a gene-fusion marker. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, **83(22)**:8447–8451.
- Jin, Y., Sultana, A., Gandhi, P., Franklin, E., Hamamoto, S., Khan, A. R., Munson, M., Schekman, R. und Weisman, L. S.** (2011). Myosin V transports secretory vesicles via a Rab GTPase cascade and interaction with the exocyst complex. *Dev Cell.*, **21(6)**:1156–1170.
- Johnson, A. E. und van Waes, M. A.** (1999). The Translocon: A Dynamic Gateway at the ER Membrane. *Annu Rev Cell Dev Biol.*, **15(1)**:799–842.
- Johnson, K. A., Taghon, G. J. F., Scott, J. L. und Stahelin, R. V.** (2016). The Ebola Virus matrix protein, VP40, requires phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PI(4,5)P₂) for extensive oligomerization at the plasma membrane and viral egress. *Sci Rep.*, **6(19125)**:1–14.
- Kämper, J.** (2004). A PCR-based system for highly efficient generation of gene replacement mutants in *Ustilago maydis*. *Mol Genet Genomics.*, **271(1)**:103–110.
- Kämper, J., Kahmann, R., Bölker, M., Ma, L. J., Brefort, T., Saville, B. J., Banuett, F., Kronstad, J. W., Gold, S. E., Müller, O., Perlin, M. H., Wösten, H. A., de Vries, R., Ruiz-Herrera, J., Reynaga-Peña, C. G., Snetselaar, K., McCann, M., Pérez-Martín, J., Feldbrügge, M., Basse, C. W., Steinberg, G., Ibeas, J. I., Holloman, W., Guzman, P., Farman, M., Stajich, J. E., Sentandreu, R., González-Prieto, J. M., Kennell, J. C., Molina, L., Schirawski, J., Mendoza-Mendoza, A., Grellinger, D., Münch, K., Rössel, N., Scherer, M., Vranes, M., Ladendorf, O., Vincon, V., Fuchs, U., Sandrock, B., Meng, S., Ho, E. C., Cahill, M. J., Boyce, K. J., Klose, J., Klosterman, S. J., Deelstra, H. J., Ortiz-Castellanos, L., Li, W., Sanchez-Alonso, P., Schreier, P. H., Häuser-Hahn, I., Vaupel, M., Koopmann, E., Friedrich, G., Voss, H., Schlüter, T., Margolis, J., Platt, D., Swimmer, C., Gnirke, A., Chen, F., Vysotskaia, V., Mannhaupt, G., Güldener, U., Münsterkötter, M., Haase, D., Oesterheld, M., Mewes, H. W., Mauceli, E. W., DeCaprio, D., Wade, C. M., Butler, J., Young, S., Jaffe, D. B., Calvo, S., Nusbaum, C., Galagan, J. und Birren, B. W.** (2006). Insights from the genome of the biotrophic fungal plant pathogen *Ustilago maydis*. *Nature.*, **444(7115)**:97–101.
- Keller, M., Rüegg, A., Werner, S. und Beer, H. D.** (2008). Active Caspase-1 Is a Regulator of Unconventional Protein Secretion. *Cell.*, **132(5)**:818–831.
- Kineth, M. A., Anjard, C., Fuller, D., Guizzunti, G., Loomis, W. F. und Malhotra, V.** (2007). The Golgi-Associated Protein GRASP Is Required for Unconventional Protein Secretion during Development. *Cell.*, **130(3)**:524–534.
- Kitamoto, D., Akiba, S., Hioki, C. und Tabuchi, T.** (1990). Extracellular accumulation of mannosylerythritol lipids by a strain of *candida antarctica*. *Agric Biol Chem.*, **54(1)**:31–36.
- Kitamoto, D., Yanagishita, H., Shinbo, T., Nakane, T., Kamisawa, C. und Nakahara, T.** (1993). Surface active properties and antimicrobial activities of mannosylerythritol lipids

- as biosurfactants produced by *Candida antarctica*. *J Biotechnol.*, **29**(1–2):91–96.
- Klis, F. M., Boorsma, A. und De Groot, P. W. J.** (2006). Cell wall construction in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast.*, **23**(3):185–202.
- Koepke, J.** (2010). Die Rolle des RNA-bindenden Proteins Rrm4 während des polaren Wachstums von *Ustilago maydis*. *Dissertation. Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.*
- 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**(12):M1111.011213.
- 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**(13):1855–1866.
- Kosuri, P., Alegre-cebollada, J., Feng, J., Kaplan, A., Inglés-Prieto, Á., Badilla, C. L., Stockwell, B. R., Sanchez-Ruiz, J. M., Holmgren, A. und Fernández, J. M.** (2013). Protein folding drives disulfide formation. *Cell.*, **151**(4):794–806.
- Krombach, S., Reissmann, S., Kreibich, S., Bochen, F. und Kahmann, R.** (2018). Virulence function of the *Ustilago maydis* sterol carrier protein 2. *New Phytol.*, **220**(2):553–566.
- Kurandas, M. J. und Robbins, P. W.** (1991). Chitinase Is Required for Cell Separation during Growth of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem.*, **266**(29):19758–19767.
- Ladds, G. und Davey, J.** (2000). Identification of proteases with shared functions to the proprotein processing protease Krp1 in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Microbiol.*, **38**(4):839–53.
- Langner, T.** (2015). Charakterisierung der chitinolytischen Maschinerie aus *Ustilago maydis*. *Dissertation. Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.*
- Langner, T. und Göhre, V.** (2016). Fungal chitinases: function, regulation, and potential roles in plant/pathogen interactions. *Curr Genet.*, **62**(2):243–254.
- Langner, T., Öztürk, 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**(9):846–857.
- Lanver, D., Tollot, M., Schweizer, G., Lo Presti, L., Reissmann, S., Ma, L. S., Schuster, M., Tanaka, S., Liang, L., Ludwig, N. und Kahmann, R.** (2017). *Ustilago maydis* effectors and their impact on virulence. *Nat Rev Microbiol.*, **15**(7):409–421.
- Larriba, G., Andaluz, E., Cueva, R. und Basco, R. D.** (1995). Molecular biology of yeast exoglucanases. *FEMS Microbiol Lett.*, **125**(2–3):121–126.
- Lee, C. M. und Tannock, I. F.** (2006). Inhibition of endosomal sequestration of basic anticancer drugs: Influence on cytotoxicity and tissue penetration. *Br J Cancer.*, **94**(6):863–869.
- Lee, J.-G., Takahama, S., Zhang, G., Tomarev, S. I. und Ye, Y.** (2016). Unconventional secretion of misfolded proteins promotes adaptation to proteasome dysfunction in mammalian cells. *Nat Cell Biol.*, **18**(7):765–776.
- Lee, M. C. S., Miller, E. A., Goldberg, J., Orci, L. und Schekman, R.** (2004). Bi-Directional Protein Transport Between the Er and Golgi. *Annu Rev Cell Dev Biol.*, **20**(1):87–123.

- Lee, R. E. C., Puente, L. G., Kærn, M. und Megeney, L. A.** (2008). A non-death role of the yeast metacaspase: Yca1p alters cell cycle dynamics. *PLoS One.*, **3(8)**:1–9.
- Lemmon, M. A.** (2007). Pleckstrin Homology (PH) domains and phosphoinositides. *Biochem Soc Symp.*, **(74)**:81–93.
- Leveleki, L., Mahlert, M., Sandrock, B. und Bölker, M.** (2004). The PAK family kinase Cla4 is required for budding and morphogenesis in *Ustilago maydis*. *Mol Microbiol.*, **54(2)**:396–406.
- Levi, S. K., Bhattacharyya, D., Strack, R. L., Austin II, J. R. und Glick, B. S.** (2011). The Yeast GRASP Grh1 Colocalizes with COPII and Is Dispensable for Organizing the Secretory Pathway. *Traffic.*, **11(9)**:1168–1179.
- Liu, J. und Guo, W.** (2012). The exocyst complex in exocytosis and cell migration. *Protoplasma.*, **249(3)**:587–597.
- Mahlert, M., Leveleki, L., Hlubek, A., Sandrock, B. und Bölker, M.** (2006). Rac1 and Cdc42 regulate hyphal growth and cytokinesis in the dimorphic fungus *Ustilago maydis*. *Mol Microbiol.*, **59(2)**:567–578.
- Malhotra, V.** (2013). Unconventional protein secretion: an evolving mechanism. *EMBO J.*, **32(12)**:1660–1664.
- Manjithaya, R., Anjard, C., Loomis, W. F. und Subramani, S.** (2010). Unconventional secretion of *Pichia pastoris* Acb1 is dependent on GRASP protein, peroxisomal functions, and autophagosome formation. *J Cell Biol.*, **188(4)**:537–546.
- Manjithaya, R. und Subramani, S.** (2011). Autophagy: A broad role in unconventional protein secretion? *Trends Cell Biol.*, **21(2)**:67–73.
- Martínez-Espinoza, A. D., García-Pedrajas, M. D. und Gold, S. E.** (2002). The Ustilaginales as plant pests and model systems. *Fungal Genet Biol.*, **35(1)**:1–20.
- Matei, A. und Doehlemann, G.** (2016). Cell biology of corn smut disease - *Ustilago maydis* as a model for biotrophic interactions. *Curr Opin Microbiol.*, **34**:60–66.
- Matsuoka, K., Orci, L., Amherdt, M., Bednarek, S. Y., Hamamoto, S., Schekman, R. und Yeung, T.** (1998). COPII-coated vesicle formation reconstituted with purified coat proteins and chemically defined liposomes. *Cell.*, **93(2)**:263–275.
- McBride, H. M., Rybin, V., Murphy, C., Giner, A., Teasdale, R. und Zerial, M.** (1999). Oligomeric complexes link Rab5 effectors with NSF and drive membrane fusion via interactions between EEA1 and syntaxin 13. *Cell.*, **98(3)**:377–386.
- McGrath, J. P. und Varshavsky, A.** (1989). The yeast STE6 gene encodes a homologue of the mammalian multidrug resistance P-glycoprotein. *Nature.*, **340(6232)**:400–404.
- Mehul, B. und Hughes, R. C.** (1997). Plasma membrane targeting, vesicular budding and release of galectin 3 from the cytoplasm of mammalian cells during secretion. *J Cell Sci.*, **110(Pt 1)**:1169–1178.
- Meitinger, F. und Palani, S.** (2016). Actomyosin ring driven cytokinesis in budding yeast. *Semin Cell Dev Biol.*, **53**:19–27.
- Meldolesi, J. und Pozzan, T.** (1998). The endoplasmic reticulum Ca²⁺ store: A view from the lumen. *Trends Biochem Sci.*, **23(1)**:10–14.
- Mendgen, K. und Hahn, M.** (2002). Plant infection and the establishment of fungal

- biotrophy. *Trends Plant Sci.*, **7(8)**:352–356.
- Mizutani, O., Nojima, A., Yamamoto, M., Furukawa, K., Fujioka, T., Yamagata, Y., Abe, K. und Nakajima, T.** (2004). Disordered Cell Integrity Signaling Caused by Disruption of the *kexB* Gene in *Aspergillus oryzae*. *Eukaryot Cell.*, **3(4)**:1036–1048.
- Monteleone, M., Stow, J. L. und Schroder, K.** (2015). Mechanisms of unconventional secretion of IL-1 family cytokines. *Cytokine.*, **74(2)**:213–218.
- Morita, T., Ishibashi, Y., Hirose, N., Wada, K., Takahashi, M., Fukuoka, T., Imura, T., Sakai, H., Abe, M. und Kitamoto, D.** (2011). Production and Characterization of a Glycolipid Biosurfactant, Mannosylerythritol Lipid B, from Sugarcane Juice by *Ustilago scitaminea* NBRC 32730. *Biosci Biotechnol Biochem.*, **75(7)**:1371–1376.
- Mueller, O., Kahmann, R., Aguilar, G., Trejo-Aguilar, B., Wu, A. und de Vries, R. P.** (2008). The secretome of the maize pathogen *Ustilago maydis*. *Fungal Genet Biol.*, **45** (Suppl 1):63-70.
- Müller, H. M., Steringer, J. P., Wegehingel, S., Bleicken, S., Münster, M., Dimou, E., Unger, S., Weidmann, G., Andreas, H., García-Sáez, A. J., Wild, K., Sinning, I. und Nickel, W.** (2015). Formation of disulfide bridges drives oligomerization, membrane pore formation, and translocation of fibroblast growth factor 2 to cell surfaces. *J Biol Chem.*, **290(14)**:8925–8937.
- Münsterkötter, M. und Steinberg, G.** (2007). The fungus *Ustilago maydis* and humans share disease-related proteins that are not found in *Saccharomyces cerevisiae*. *BMC Genomics.*, **8**:1–10.
- Nadal, M. und Gold, S. E.** (2010). The autophagy genes *atg8* and *atg1* affect morphogenesis and pathogenicity in *Ustilago maydis*. *Mol Plant Pathol.*, **11(4)**:463–478.
- Nakatogawa, H., Ichimura, Y. und Ohsumi, Y.** (2011). Atg8, a Ubiquitin-like Protein Required for Autophagosome Formation, Mediates Membrane Tethering and Hemifusion. *Cell.*, **31(326)**:55–63.
- Neiman, A. M.** (2005). Ascospore Formation in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev.*, **69(4)**:565–584.
- Newport, G. und Agabian, N.** (1997). KEX2 Influences *Candida albicans* Proteinase Secretion and Hyphal Formation. *J Biol Chem.*, **272(46)**:28954–28961.
- Newport, G., Kuo, A., Flattery, A., Gill, C., Blake, J. J., Kurtz, M. B., Abruzzo, G. K., und Agabian, N.** (2003). Inactivation of Kex2p Diminishes the Virulence of *Candida albicans*. *J Biol Chem.*, **278(3)**:1713–1720.
- Ng, D. T. W., Brown, J. D. und Walter, P.** (1996). Signal sequences specify the targeting route to the endoplasmic reticulum membrane. *J Cell Biol.*, **134(2)**:269–278.
- Nickel, W.** (2005). Unconventional secretory routes: Direct protein export across the plasma membrane of mammalian cells. *Traffic.*, **6(8)**:607–614.
- Nickel, W.** (2010). Pathways of unconventional protein secretion. *Curr Opin Biotechnol.*, **21(5)**:621–626.
- Nickel, W.** (2011). The unconventional secretory machinery of fibroblast growth factor 2. *Traffic.*, **12(7)**:799–805.
- Nickel, W. und Rabouille, C.** (2008). Mechanisms of regulated unconventional protein secretion. *Nat Rev Mol Cell Biol.*, **10(2)**:148–155.

- Nickel, W. und Seedorf, M.** (2008). Unconventional Mechanisms of Protein Transport to the Cell Surface of Eukaryotic Cells. *Annu Rev Cell Dev Biol.*, **24(1)**:287–308.
- Nilsson, I. und Von Heijne, G.** (1993). Determination of the distance between the oligosaccharyltransferase active site and the endoplasmic reticulum membrane. *J Biol Chem.*, **268(8)**:5798–5801.
- Ogura, Y., Sutterwala, F. S. und Flavell, R. A.** (2006). The Inflammasome: First Line of the Immune Response to Cell Stress. *Cell.*, **126(4)**:659–662.
- Ökmen, B., Kemmerich, B., Hilbig, D., Wemhöner, R., Aschenbroich, J., Perrar, A., Huesgen, P. F., Schipper, K. und Doehlemann, G.** (2018). Dual function of a secreted fungalsin metalloprotease in *Ustilago maydis*. *New Phytol.*, **220(1)**:249–261.
- Olgeiser, L., Haag, C., Boerner, S., Ule, J., Feldbrügge, M. und Zarnack, K.** (2018). The key protein of endosomal mRNP transport binds translational landmark sites of cargo mRNAs. *EMBO J.*, **20(1)**:e46588.
- Parodi, A. J.** (2000). Protein Glucosylation and its role in protein folding. *Annu Rev Biochem.*, **69**:69–93.
- Patki, V., Lawe, D. C. und Corvera, S.** (1998). A functional PtdIns(3)P-binding motif. *Nature.*, **394(6692)**:433–434.
- Pérez-Martín, J., Castillo-Lluva, S., Sgarlata, C., Flor-Parra, I., Mielnichuk, N., Torreblanca, J. und Carbó, N.** (2006). Pathocycles: *Ustilago maydis* as a model to study the relationships between cell cycle and virulence in pathogenic fungi. *Mol Genet Genomics.*, **276(3)**:211–229.
- Plath, K. und Rapoport, T. A.** (2000). Spontaneous release of cytosolic proteins from posttranslational substrates before their transport into the endoplasmic reticulum. *J Cell Biol.*, **151(1)**:167–178.
- Ponpuak, M., Mandell, M. A., Kimura, T., Chauhan, S., Cleyrat, C. und Deretic, V.** (2015). Secretory autophagy. *Curr Opin Cell Biol.*, **35**:106–116.
- Potelle, S., Klein, A. und Foulquier, F.** (2015). Golgi post-translational modifications and associated diseases. *J Inherit Metab Dis.*, **38(4)**:741–751.
- Punt, P. J., Drint-Kuijvenhoven, A., Lokman, B. C., Spencer, J. A., Jeenes, D., Archer, D. A. und van den Hondel, C. A.** (2003). The role of the *Aspergillus niger* furin-type protease gene in processing of fungal proproteins and fusion proteins Evidence for alternative processing of recombinant (fusion-) proteins. *J Biotechnol.*, **106(1)**:23–32.
- Puxbaum, V., Gasser, B. und Mattanovich, D.** (2016). The bud tip is the cellular hot spot of protein secretion in yeasts. *Appl Microbiol Biotechnol.*, **100(18)**:8159–8168.
- Rabouille, C.** (2017). Pathways of Unconventional Protein Secretion. *Trends Cell Biol.*, **27(3)**:230–240.
- Rabouille, C., Malhotra, V. und Nickel, W.** (2012). Diversity in unconventional protein secretion. *J Cell Sci.*, **125(22)**:5251–5255.
- Rayne, F., Debaisieux, S., Yezid, H., Lin, Y. L., Mettling, C., Konate, K., Chazal, N., Arold, S. T., Pugnère, M., Sanchez, F., Bonhoure, A., Briant, L., Loret, E., Roy, C. und Beaumelle, B.** (2010). Phosphatidylinositol-(4,5)-bisphosphate enables efficient secretion of HIV-1 Tat by infected T-cells. *EMBO J.*, **29(8)**:1348–1362.
- Rechsteiner, M. und Rogers, S. W.** (1996). PEST sequences and regulation by proteolysis.

- Trends Biochem Sci.*, **21(7)**:267–271.
- Reindl, M., Hänsch, S., Weidtkamp-Peters, S. und Schipper, K.** (2019). A Potential Lock-Type Mechanism for Unconventional Secretion in Fungi. *Int J Mol Sci.*, **20(3)**:460.
- Rink, P.** (2015). Initiale Charakterisierung einer unkonventionell sekretierten potentiellen Glukanase aus *Ustilago maydis*. *Bachelorarbeit. Heinrich-Heine Universität Düsseldorf.*
- Rink, J., Ghigo, E., Kalaidzidis, Y. und Zerial, M.** (2005). Rab conversion as a mechanism of progression from early to late endosomes. *Cell.*, **122(5)**:735–749.
- Ritter, C. und Helenius, A.** (2000). Recognition of local glycoprotein misfolding by the ER folding sensor UDP-glucose:glycoprotein glucosyltransferase. *Nat Struct Biol.*, **7(4)**:278–280.
- Ross, J. L., Ali, M. Y. und Warshaw, D. M.** (2008). Cargo Transport: Molecular Motors Navigate a Complex Cytoskeleton. *Curr Opin Cell Biol.*, **20(1)**:41–47.
- Rossman, K. L., Der, C. J. und Sondek, J.** (2005). GEF means go: Turning on Rho GTPases with guanine nucleotide-exchange factors. *Nat Rev Mol Cell Biol.*, **6(2)**:167–180.
- Rubartelli, A., Cozzolino, F., Talio, M. und Sitia, R.** (1990). A novel secretory pathway for interleukin-1 beta, a protein lacking a signal sequence. *EMBO J.*, **9(5)**:1503–1510.
- Rutkowski, D. T. und Kaufman, R. J.** (2004). A trip to the ER: Coping with stress. *Trends Cell Biol.*, **14(1)**:20–28.
- 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.
- Sandrock, B., Böhmer, C. und Bölker, M.** (2006). Dual function of the germinal centre kinase Don3 during mitosis and cytokinesis in *Ustilago maydis*. *Mol Microbiol.*, **62(3)**:655–666.
- Sarkari, P., Reindl, M., Stock, J., Müller, O., Kahmann, R., Feldbrügge, M. und Schipper, K.** (2014). Improved expression of single-chain antibodies in *Ustilago maydis*. *J Biotechnol.*, **191**:165–175.
- Satterwhite, L. L. und Pollard, T. D.** (1992). Cytokinesis. *Curr Opin Cell Biol.*, **4(1)**:43–52.
- Schäfer, T., Zentgraf, H., Zehe, C., Brügger, B., Bernhagen, J. und Nickel, W.** (2004). Unconventional Secretion of Fibroblast Growth Factor 2 Is Mediated by Direct Translocation across the Plasma Membrane of Mammalian Cells. *J Biol Chem.*, **279(8)**:6244–6251.
- Schatz, M., Tong, P. B. V. und Beaumelle, B.** (2018). Unconventional secretion of viral proteins. *Semin Cell Dev Biol.*, **83**:8–11.
- Scherer, M., Heimel, K., Starke, V. und Kämper, J.** (2006). The Clp1 Protein Is Required for Clamp Formation and Pathogenic Development of *Ustilago maydis*. *Plant Cell.*, **18(9)**: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.*, **82(4)**:327–331.
- Schirawski, J., Mannhaupt, G., Münch, K., Brefort, T., Schipper, K., Doehlemann, G., Di Stasio, M., Rössel, N., Mendoza-Mendoza, A., Pester, D., Müller, O., Winterberg, B.,**

- Meyer, E., Ghareeb, H., Wollenberg, T., Münsterkötter, M., Wong, P., Walter, M., Stukenbrock, E., Güldener, U. und Kahmann, R.** (2010). Pathogenicity Determinants in Smut Fungi Revealed by Genome Comparison. *Science.*, **330(6010)**:1546-1548.
- Schmidt, F. R.** (2004). Recombinant expression systems in the pharmaceutical industry. *Appl Microbiol Biotechnol.*, **65(4)**:363–372.
- Schuh, M.** (2013). An actin-dependent mechanism for long range vesicle transport. *Nat Cell Biol.*, **13(12)**:1431–1436.
- Schulz, B., Banuett, F., Dahl, M., Schlesinger, R., Schäfer, W., Martin, T., Herskowitz, I. und Kahmann, R.** (1990). The b alleles of *U. maydis*, whose combinations program pathogenic development, code for polypeptides containing a homeodomain-related motif. *Cell.*, **60(2)**:295–306.
- Schuster, M., Martin-Urdiroz, M., Higuchi, Y., Hacker, C., Kilaru, S., Gurr, S. J. und Steinberg, G.** (2016). Co-delivery of cell-wall-forming enzymes in the same vesicle for coordinated fungal cell wall formation. *Nat Microbiol.*, **1(11)**:16149.
- Schuster, M., Treitschke, S., Kilaru, S., Molloy, J., Harmer, N. J. und Steinberg, G.** (2012). Myosin-5, kinesin-1 and myosin-17 cooperate in secretion of fungal chitin synthase. *EMBO J.*, **31(1)**:214–227.
- Seidl, V.** (2008). Chitinases of filamentous fungi: a large group of diverse proteins with multiple physiological functions. *Fungal Biol Rev.*, **22(1)**:36–42.
- Shao, S. und Hedge, R. S.** (2011). A calmodulin-dependent translocation pathway for small secretory proteins., *Cell.*, **147(7)**:1576-1588.
- Simonsen, A. und Tooze, S. A.** (2009). Coordination of membrane events during autophagy by multiple class III PI3-kinase complexes. *J Cell Biol.*, **186(6)**:773–782.
- Singh, P. und Cameotra, S. S.** (2004). Potential applications of microbial surfactants in biomedical sciences. *Trends Biotechnol.*, **22(3)**:142–146.
- Snetselaar, K. M. und McCann, M. P.** (1997). Using microdensitometry to correlate cell morphology with the nuclear cycle in *Ustilago maydis*. *Mycologia.*, **89**:689–697.
- Sohn, Y., Park, C. S. und Lee, S.** (1998). Disruption of PMR1, Encoding a Ca²⁺-ATPase Homolog in *Yarrowia lipolytica*, Affects Secretion and Processing of Homologous and Heterologous Proteins. *J Bacteriol.*, **180(24)**:6736–6742.
- Southern, E. M.** (1975). Detection of Specific Sequences Among DNA Fragments Separated by Gel Electrophoresis. *J Mol Biol.*, **98(3)**:503-517.
- Spellig, T., Bottin, A. und Kahmann, R.** (1996). Green fluorescent protein (GFP) as a new vital marker in the phytopathogenic fungus *Ustilago maydis*. *Mol Gen Genet.*, **252(5)**:503–509.
- Steinberg, G.** (2007a). Hyphal Growth: a Tale of Motors, Lipids, and the Spitzenkörper. *Eukaryot Cell.*, **6(3)**:351–360.
- Steinberg, G.** (2007b). On the move: Endosomes in fungal growth and pathogenicity. *Nat Rev Microbiol.*, **5(4)**:309–316.
- Steinberg, G. und Perez-Martin, J.** (2008). *Ustilago maydis*, a new fungal model system for cell biology. *Trends Cell Biol.*, **18(2)**:61–67.
- Steinberg, G., Wedlich-Soldner, 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**(Pt 3):609–622.
- Steringer, J. P., Bleicken, S., Andreas, H., Zacherl, S., Laussmann, M., Temmerman, K., Contreras, F. X., Bharat, T. A., Lechner, J., Müller, H. M., Briggs, J. A., García-Sáez, A. J. und Nickel, W.** (2012). Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PI(4,5)P₂)-dependent oligomerization of fibroblast growth factor 2 (FGF2) triggers the formation of a lipidic membrane pore implicated in unconventional secretion. *J Biol Chem.*, **287**(33):27659–27669.
- Steringer, J. P., Lange, S., Čujová, S., Šachl, R., Poojari, C., Lolicato, F., Beutel, O., Müller, H. M., Unger, S., Coskun, Ü., Honigmann, A., Vattulainen, I., Hof, M., Freund, C. und Nickel, W.** (2017). Key steps in unconventional secretion of fibroblast growth factor 2 reconstituted with purified components. *Elife.*, **6**:1–36.
- Steringer, J. P., Müller, H. M. und Nickel, W.** (2014). Unconventional Secretion of Fibroblast Growth Factor 2--A Novel Type of Protein Translocation across Membranes? *J Mol Biol.*, **427**(6):1202–1210.
- Stock, J.** (2013). Etablierung eines neuartigen Protein-Expressionssystems in *Ustilago maydis*. *Dissertation. Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.*
- 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**(2):80–91.
- Subramani, S. und Malhotra, V.** (2013). Non-autophagic roles of autophagy-related proteins. *EMBO Rep.*, **14**(2):143–151.
- Suzuki, K. und Ohsumi, Y.** (2010). Current knowledge of the pre-autophagosomal structure (PAS). *FEBS Lett.*, **584**(7):1280–1286.
- Szallies, A., Kubata, B. K. und Duszenko, M.** (2002). A metacaspase of *Trypanosoma brucei* causes loss of respiration competence and clonal death in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.*, **517**(1–3):144–150.
- Tagliabracci, V. S., Engel, J. L., Wen, J., Wiley, S. E., Worby, C. A., Kinch, L. N., Xiao, J., Grishin, N. V., und Dixon, J. E.** (2012). Secreted kinase phosphorylates extracellular proteins that regulate biomineralization. *Science.*, **336**(6085):1150–1153.
- Tanner, W. und Lehle, L.** (1987). Protein glycosylation in yeast. *Biochim Biophys Acta.*, **906**(1):81–99.
- Tanudji, M.** (2002). Improperly folded green fluorescent protein is secreted via a non-classical pathway. *J Cell Sci.*, **115**(19):3849–3857.
- Teichmann, B., Linne, U., Hewald, S., Marahiel, M. A. und Bölker, M.** (2007). A biosynthetic gene cluster for a secreted cellobiose lipid with antifungal activity from *Ustilago maydis*. *Mol Microbiol.*, **66**(2):525–533.
- Temmerman, K., Ebert, A. D., Müller, H. M., Sinning, I., Tews, I. und Nickel, W.** (2008). A direct role for phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate in unconventional secretion of fibroblast growth factor 2. *Traffic.*, **9**(7):1204–1217.
- Terfrüchte, M.** (2016) Expression of biopharmaceuticals in *Ustilago maydis*. *Dissertation. Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.*
- Terfrüchte, M., Joehnk, B., Fajardo-somera, R., Braus, G. H., Riquelme, M., Schipper, K. und Feldbrügge, M.** (2013). Establishing a versatile Golden Gate cloning system for

- genetic engineering in fungi. *Fungal Genet Biol.*, **62**:1–10.
- Terfrüchte, M., Wewetzer, S., Sarkari, P., Stollewerk, D., Franz-Wachtel, M., Macek, B., Schlepütz, T., Feldbrügge, M., Büchs, J. und Schipper, K.** (2018). Tackling destructive proteolysis of unconventionally secreted heterologous proteins in *Ustilago maydis*. *J Biotechnol.*, **284**:37–51.
- Theisen, U., Straube, A. und Steinberg, G.** (2008). Dynamic Rearrangement of Nucleoporins during Fungal “Open” Mitosis. *Mol Biol Cell.*, **19**(1):308–317.
- Tsukuda, T., Carleton, S., Fotheringham, S. und Holloman, W. K.** (1988). Isolation and characterization of an autonomously replicating sequence from *Ustilago maydis*. *Mol Cell Biol.*, **8**(9):3703–3709.
- Vey, M., Schäfer, W., Berghöfer, S., Klenk, H. D. und Garten, W.** (1994). Maturation of the trans-Golgi network protease furin: compartmentalization of propeptide removal, substrate cleavage, and COOH-terminal truncation. *J Cell Biol.*, **127**(6):1829–1842.
- Villeneuve, J., Bassaganyas, L., Lepreux, S., Chiritoiu, M., Costet, P., Ripoche, J., Malhotra V. und Schekman, R.** (2017). Unconventional secretion of FABP4 by endosomes and secretory lysosomes. *J Cell Biol.*, **217**(2):649–665.
- Vollmeister, E., Schipper, K., Baumann, S., Haag, C. und Pohlmann, T.** (2011). Fungal development of the plant pathogen *Ustilago maydis*. *FEMS Microbiol Rev.* **36**(1):59–77.
- Vollmeister, E., Schipper, K. und Feldbrügge, M.** (2012). Microtubule-dependent mRNA transport in the model microorganism *Ustilago maydis*. *RNA Biol.*, **9**(3):261–268.
- Walton, P. A.** (1996). Import of Stably-folded Proteins into Peroxisomes. *Ann N Y Acad Sci.*, **(804)**:76–85.
- Wang, X., Matteson, J., An, Y., Moyer, B., Yoo, J. S., Bannykh, S., Wilson, I. A., Riordan, J. R. und Balch, W. E.** (2004). COPII-dependent export of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator from the ER uses di-acidic exit code. *J Cell Biol.*, **167**(1):65–74.
- Weber, I., Assmann, D., Thines, E. und Steinberg, G.** (2006). Polar localizing class V myosin chitin synthases are essential during early plant infection in the plant pathogenic fungus *Ustilago maydis*. *Plant Cell.*, **18**(1):225–242.
- Wedlich-Söldner, R., Straube, A., Friedrich, M. W. und Steinberg, G.** (2002). A balance of KIF1A-like kinesin and dynein organizes early endosomes in the fungus *Ustilago maydis*. *EMBO J.*, **21**(12):2946–2957.
- Wegehingel, S., Zehe, C. und Nickel, W.** (2008). Rerouting of fibroblast growth factor 2 to the classical secretory pathway results in post-translational modifications that block binding to heparan sulfate proteoglycans. *FEBS Lett.*, **582**(16):2387–2392.
- Weinzierl, G., Leveleki, L., Hassel, A., Kost, G., Wanner, G. und Bölker, M.** (2002). Regulation of cell separation in the dimorphic fungus *Ustilago maydis*. *Mol Microbiol.*, **45**(1):219–231.
- Werten, M. W. T. und Wolf, F. A. De.** (2005). Reduced Proteolysis of Secreted Gelatin and Yps1-Mediated α -Factor Leader Processing in a *Pichia pastoris* *kex2* Disruptant. *Appl Environ Microbiol.*, **71**(5):2310–2317.
- Wormald, M. R. und Dwek, R. A.** (1999). Glycoproteins: Glycan presentation and protein-fold stability. *Structure.*, **7**(7):155–160.

- Xie, Z., Fang, M., Rivas, M. P., Faulkner, A. J., Sternweis, P. C., Engebrecht, J. A., und Bankaitis, V. A.** (1998). Phospholipase D activity is required for suppression of yeast phosphatidylinositol transfer protein defects. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, **95(21)**:12346–12351.
- Xie, Z., Nair, U. und Klionsky, D. J.** (2008). Atg8 Controls Phagophore Expansion during Autophagosome Formation. *Mol Biol Cell.*, **19(8)**:3290-3298.
- Xue, L. und Tao, W. A.** (2013). Current technologies to identify protein kinase substrates in high throughput. *Front Biol (Beijing)*., **8(2)**:216-227.
- Yoo, J. S., Moyer, B. D., Bannykh, S., Yoo, H. M., Riordan, J. R. und Balch, W. E.** (2002). Non-conventional Trafficking of the Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator through the Early Secretory Pathway. *J Biol Chem.*, **277(13)**:11401–11409.
- Yoshimori, T., Yamamoto, A., Moriyama, Y., Futai, M. und Tashiro, Y.** (1991). Bafilomycin A1, a Specific Inhibitor of Vacuolar-type H(+)-ATPase, Inhibits Acidification and Protein Degradation in Lysosomes of Cultured Cell. *J Biol Chem.*, **266(26)**:17707–17712.
- 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(14)**:2778–2792.
- Zapun, A., Darby, N. J., Tessier, D. C., Michalak, M., Bergeron, J. J. M. und Thomas, D. Y.** (1998). Enhanced catalysis of ribonuclease B folding by the interaction of calnexin or calreticulin with ERp57. *J Biol Chem.*, **273(11)**:6009–6012.
- Zehe, C., Engling, A., Wegehingel, S., Schafer, T. und Nickel, W.** (2006). Cell-surface heparan sulfate proteoglycans are essential components of the unconventional export machinery of FGF-2. *Proc Natl Acad Sci.*, **103(42)**:15479–15484.
- Zeitler, M., Steringer, J. P., Möller, H. M., Mayer, M. P. und Nickel, W.** (2015). HIV-Tat protein forms phosphoinositide-dependent membrane pores implicated in unconventional protein secretion. *J Biol Chem.*, **290(36)**:21976–21984.
- Zerial, M. und McBride, H.** (2001). Rab proteins as membrane organizers. *Nat Rev Mol Cell Biol.*, **2(2)**:107–119.

Publikationen

Nachfolgend verweise ich auf meine eigenen wissenschaftlichen Beiträge an den Publikationen, die im Rahmen dieser Arbeit entstanden. Aufgeführt werden die bibliographischen Informationen und eine kurze Beschreibung meines Anteils an den veröffentlichten Forschungsergebnissen.

Appendix A mit Aschenbroich *et al.* (2018), inhaltliche Bezüge in Abschnitt 2.2 – 2.4 und Abschnitt 3.1 – 3.4, modifizierte Graphiken in Abb. 2.2 – 2.3, Abb. 2.7 – 2.15 und Abb. 2.18 – 2.19.

Appendix B mit Ökmen *et al.* (2018), inhaltliche Bezüge in Abschnitt 1.2, Abschnitt 2.3 und Abschnitt 3.2 – 3.4.

A The germinal centre kinase Don3 is crucial for unconventional secretion of chitinase Cts1 in *Ustilago maydis*.

Aschenbroich, J., Hussnaetter, K. P., Stoffels, P., Langner, T., Zander, S., Sandrock, B., Bölker, M., Feldbrügge, M. und Schipper, K. (2018). The germinal centre kinase Don3 is crucial for unconventional secretion of chitinase Cts1 in *Ustilago maydis*. *Biochim Biophys Acta Proteins Proteom.*, S1570–9639(18)30176-6.

Fachzeitschrift: Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics

Einflussfaktor: 2,609 (Stand 2017)

Beitrag: Erstautor. Planung und Durchführung der Experimente [ca. 80 %]. Fluoreszenzmikroskopische Analysen zur intrazellulären Verteilung der Chitinase Cts1 und der Kinase Don3. Messungen zu intra- und/oder extrazellulären Enzymaktivitäten der Chitinase Cts1, der β -Glukuronidase Gus und der Arabinofuranosidase Afu2. Analysen zum Wachstumsverhalten, zur Kolonienmorphologie und Trockenzellmasse. Quantifizierung von Zellaggregaten und der Septenbildung sowie der Proteinsynthese mittels Western Blots. Erstellen der Graphiken und Einbringen von Ideen für das Manuskript.

B Dual function of a secreted fungalysin metalloprotease in *Ustilago maydis*.

Ökmen, B., Kemmerich, B., Hilbig, D., Wemhöner, R., Aschenbroich, J., Perrar, A., Huesgen, P. F., Schipper, K. und Doehlemann, G. (2018). Dual function of a secreted fungalysin metalloprotease in *Ustilago maydis*. *New Phytol.*, **220**(1):249–261.

Fachzeitschrift: New Phytologist

Einflussfaktor: 7,43 (Stand 2017)

Beitrag: Co-Autor. Wissenschaftliche Arbeit und Diskussion in Kooperation mit der Arbeitsgruppe Döhlemann (Botanisches Institut, Universität zu Köln). Messungen zur intra- und extrazellulären Enzymaktivität der Chitinase Cts1 in Deletionsstämmen. Einbringen von Ideen für das Manuskript.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich denjenigen danken, die mich während der Zeit meiner Promotion unterstützend begleitet und zur Anfertigung dieser Arbeit ihren Teil dazu beigetragen haben.

Zunächst danke ich Prof. Dr. Michael Feldbrügge für sein mir entgegengebrachtes Vertrauen, in seinem Institut meine Promotion durchführen zu dürfen sowie für seine Bereitschaft zur Übernahme des Erstgutachtens. Ich möchte mich zudem für die Bereitstellung des interessanten Forschungsprojekts und für seine Ratschläge und Ideen bedanken.

Ebenfalls danke ich Dr. Nicole Linka für die Bereitschaft, als Mentorin und Zweitgutachterin zu meiner Promotion beigesteuert zu haben.

Weiteren Dank möchte ich meiner Arbeitsgruppe „RabXpress“ unter der Leitung von Dr. Kerstin Schipper aussprechen. Kerstin danke ich für die Betreuung während meiner Promotion sowie für die Hilfsbereitschaft bei fachlichen Fragen und bei der Anfertigung der Dissertation. Bei meinen Arbeitsgruppenkollegen Kai Hußnätter und Peter Stoffels möchte ich mich für ihr Mitwirken an unserer gemeinsamen Publikation und Dr. Marius Terfrüchte für seinen starken Einsatz in der letzten Phase meiner Promotion bedanken. Bettina Axler danke ich für ihre großartige Leistung in der Stammherstellung, mit der sie mir meine Analysen enorm erleichtert hat. Generell möchte ich mich auch bei Michèle Reindl, Magnus Philipp und Philipp Rink für konstruktive Ratschläge, tatkräftige Unterstützung bei Experimenten und die allgemein positive Stimmung innerhalb und außerhalb des Labors bedanken.

Insgesamt danke ich allen Mitgliedern des Instituts für die stets freundliche und kollegiale Arbeitsatmosphäre und die beständige Hilfsbereitschaft im Laboralltag. Besonders hervorheben möchte ich dabei Dr. Sabrina Zander und Kira Müntjes für ihre Unterstützung bei der Fluoreszenzmikroskopie, ebenso wie Dr. Sebastian Hänsch vom ‘Center for Advanced Imaging’ (CAI, HHU Düsseldorf) für seine Leistungen am Konfokalmikroskop.

Abschließend möchte ich mich bei Freunden & Familie für motivierende Worte, moralische Unterstützung und gebotene Abwechslungen und Freuden bedanken:

Im Speziellen danke ich René & Moritz, “ppp” und “jour fixe” für generell schöne Zeiten, die hoffentlich nicht enden werden. Meinem Onkel Siegfried Olms gebührt großer Dank für seinen Einsatz beim Korrekturlesen.

Zu guter Letzt möchte ich die Gelegenheit nutzen, mich bei meinen Eltern Elisabeth und Gero, meinen Geschwistern Uli, Hannes und Jochen sowie meinen Schwägerinnen Claudia und Kerstin herzlich zu bedanken. Ihr wart und seid mir eine verlässliche Größe, auf deren Hilfe ich stets zählen kann; auch in schwierigen Phasen. Danke für eure anhaltende Unterstützung!

Lebenslauf

Persönliche Angaben

Geburtsdatum/-ort: 26.08.1988 in Ratingen
 Geschlecht: männlich
 Staatsangehörigkeit: deutsch
 Familienstand: ledig, keine Kinder

Ausbildung

Dez. 2014 – Apr. 2019 Promotion
 Institut für Mikrobiologie
 Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Dissertation: „Analyse des unkonventionellen Sekretionsmechanismus der Chitinase Cts1 aus *Ustilago maydis*“

Okt. 2012 – Sep. 2014 Masterstudium Biologie
 Schwerpunkt: Mikrobiologie und Biotechnologie
 Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Masterarbeit: „Screening und biochemische Charakterisierung mikrobieller Oxidoreduktasen für die Oxidation von Alkoholen“
 Institut für molekulare Enzymtechnologie (IMET)
 Forschungszentrum Jülich

Okt. 2009 – Sep. 2012 Bachelorstudium Biologie
 Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Bachelorarbeit: „Expression und Untersuchung fluoreszierender Markerproteine in *Trichomonas vaginalis*“
 Institut für Molekulare Evolution
 Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Aug. 1999 – Mai 2008 Abitur
 Carl-Friedrich-von-Weizsäcker-Gymnasium Ratingen

Berufliche Erfahrungen

Dez. 2014 – Dez. 2018 wissenschaftlicher Mitarbeiter
 Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
 - Laborarbeiten
 - Anleitung und Aufsicht für Labor- und Gerätenutzung
 - Verwaltung der Stammsammlung
 - Vor-/Nachbereitung und Durchführung von Praktika im Bereich der Mikrobiologie
 - Betreuung von Studenten auf Bachelor- und Masterlevel

Sep. 2008 – Sep. 2009 Freiwilliges Soziales Jahr
 Werkstatt für Menschen mit Behinderungen (WfB)
 Ratingen

- Hilfestellung bei täglicher Hygiene, Nahrungsaufnahme
- Pausen- und sonstige Aufsichtsführung
- Sicherstellung der Qualität von fertiggestellten Produkten

Wissenschaftliche Beiträge

- | | |
|------------|---|
| Okt. 2018 | Publikation: „The germinal Centre kinase Don3 is crucial for unconventional secretion of chitinase Cts1 in <i>Ustilago maydis</i> “ |
| Okt. 2018 | Publikation: „Dual function of a secreted fungalsin metalloprotease in <i>Ustilago maydis</i> “ |
| Sept. 2017 | Konferenz: CRC 1208 „Dynamics of Membrane Systems“
Düsseldorf |
| Okt. 2016 | Konferenz: UPMT meeting „Unconventional Proteins and Membranes traffic“
Lecce |
| Jan. 2016 | Poster: „The cytokinesis-related proteins Don1 and Don3 are involved in unconventional secretion of Cts1 in <i>Ustilago maydis</i> “

Konferenz: CIC „Bioeconomy – next steps into value creation“
Düsseldorf |
| Okt. 2015 | Konferenz: 11 th VAAM „Molecular Biology of Fungi“
Berlin |
| | Poster: „Investigating the contribution of autophagy to unconventional secretion of Cts1 in <i>Ustilago maydis</i> “ |

Seminare/Workshops

- | | |
|-----------|---|
| Nov. 2016 | „Gentechnische Arbeiten in gentechnischen Anlagen“
Fortbildungsveranstaltung nach §15 Abs.2 S.1 Nr.3 GenTSV |
| Sep. 2016 | „Führungskompetenz“ |
| Sep. 2016 | „Presenting (in) Science – How to own the stage on (international) conferences“ |
| Dez. 2015 | „Gute Wissenschaftliche Praxis für Promovierende“

(Interdisciplinary Graduate and Research Academy Düsseldorf) |

Weitere Qualifikationen und Interessen

- | | |
|--------------------|--|
| Sprachen | Deutsch (Muttersprache)
Englisch (fließend)
Französisch (Grundkenntnisse) |
| Computerkenntnisse | Microsoft Office (Excel, Word, Power Point)
Clone Manager 9
Canvas 12
MetaMorph |

Trainerlizenz	Übungsleiterschein C-Lizenz (Breitensport)
Ehrenamtliche Arbeit	Übungsleitertätigkeit beim Turnverein Ratingen e. V. Ersthelfer
Persönliche Interessen	Ausdauer- und Kraftsport, Wintersport, Fußball, Gitarre spielen, Lesen