

**Das Multi-PAM2-Protein Upa2 als neue
Komponente des endosomalen
mRNA-Transports in *Ustilago maydis***

Inaugural-Dissertation

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

vorgelegt von

Silke Jankowski

aus Düren

Düsseldorf, Juli 2019

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

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

Berichterstatter:
Herr Prof. Dr. Michael Feldbrügge
Frau Prof. Dr. Ursula Nicole Fleig

Tag der mündlichen Prüfung: 25. September 2019

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 vergleichbaren Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht. Ich habe zuvor keine erfolglosen Promotionsversuche unternommen.

Ort, Datum

Silke Jankowski

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht in:

S. Jankowski*, T. Pohlmann*, S. Baumann, K. Müntjes , S. K. Devan, S. Zander, M. Feldbrügge (2019)

The multi PAM2 protein Upa2 functions as novel core component of endosomal mRNA transport.

Die Publikation erschien in:

EMBO Reports (2019) 20: e47381; doi: <https://doi.org/10.15252/embr.201847381>

* geteilte Erstautorenschaft

Die Untersuchungen zur vorliegenden Arbeit wurden von Oktober 2013 bis April 2019 in Düsseldorf an der Heinrich-Heine-Universität im Institut für Mikrobiologie unter Betreuung von Herrn Prof. Dr. Michael Feldbrügge durchgeführt.

Abkürzungen und Fachbegriffe

°C	Grad Celsius	mM	millimolar
AD	Aktivierungsdomäne	µm	Mikrometer
AK	Antikörper	M	molar
AS	Aminosäure(n)	mRNA	<i>messenger RNA</i> (Boten-RNA)
BD	Bindedomäne	mRNP	<i>messenger</i> Ribonukleoprotein
bp	Basenpaar(e)	MT	Mikrotubuli
BSA	Bovines Serumalbumin	nm	Nanometer
C-	carboxy-	N-	amino-
Cbx	Carboxin	Nat	Nourseothrizin
CM	Vollmedium	nt	Nukleotid(e)
Δ	Delta = Deletion	p.i.	nach Induktion
DIC	<i>differential interphase contrast</i>	PABP	Poly(A)-bindendes Protein
DNA	Desoxyribonukleinsäure	PAM2	PABP-interagierendes Motiv 2
DUF	Domäne unbekannter Funktion	OD	optische Dichte
et al.	und andere	ORF	<i>open reading frame</i>
g	Gramm	PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
G418	Genetizin	Rfp	<i>red fluorescent protein</i>
(e)Gfp	<i>(enhanced) green fluorescent protein</i>	RRM	<i>RNA recognition motif</i>
-Gfp	C-terminale Fusion mit Gfp	RT	Raumtemperatur
h	Stunde	RNA	Ribonukleinsäure
Hyg	Hygromyzin	-Rfp	C-terminale Fusion mit Rfp
H ₂ O _{bid.}	zweifach destilliertes Wasser	SGD	<i>Saccharomyces Genome Database</i>
kDa	Kilodalton	s.u.	siehe unten
l	Liter	U	Unit (Einheit Enzymaktivität)
-mCherry	C-terminale Fusion mit mCherry	UMAG	Zugangsnummer Ensembl Fungi
min	Minute	UpM	Umdrehungen pro Minute
mg	Milligramm	UTR	nicht-translatierte Region
ml	Milliliter	UV	ultraviolettes Licht
MLLE	entspricht PABC-Domäne	v/v	Volumenprozent
µg	Mikrogramm	wt	Wildtyp
µM	mikromolar	w/v	Gewichtsprozent

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen und Fachbegriffe	IV
Inhaltsverzeichnis	V
Zusammenfassung	VII
Summary	VIII
1 Einleitung	1
1.1 Intrazellulärer Transport	1
1.2 mRNA-Transport und Lokalisierung	1
1.2.1 Aktin-abhängiger mRNP-Transport	4
1.2.2 Mikrotubuli-abhängiger mRNP-Transport	6
1.3 Der Modellorganismus <i>Ustilago maydis</i>	9
1.3.1 Mikrotubuli-abhängiger mRNP-Transport in <i>U. maydis</i>	12
1.3.2 PAM2-Proteine und die Interaktion mit der MLLE-Domäne	15
1.4 Zielsetzung dieser Arbeit	20
2 Ergebnisse	21
2.1 Untersuchung weiterer potentieller PAM2-Proteine	21
2.2 Weiterführende Untersuchung des Proteins Upa9	27
2.2.1 Upa9 wird gelegentlich aktiv transportiert	27
2.2.2 Upa9 kolokalisiert mit dem Peroxisomenmarker Gfp-SKL sowie mit Komponenten des endosomalen mRNA-Transports	28
2.2.3 Das PAM2-Motiv in Upa9 hat keine Bedeutung für die Lokalisierung des Proteins	31
2.3 Weiterführende Untersuchungen des Proteins Upa2	33
2.3.1 Das Protein Upa2 ist wichtig für unipolares, filamentöses Wachstum	33
2.3.2 Das Protein Upa2 lokalisiert auf frühen Endosomen	35
2.3.3 Die PAM2-Motive von Upa2 sind funktionell und interagieren mit der MLLE-Domäne von Pab1	37
2.3.4 Die PAM2-Motive in Upa2 sind für die Funktionalität des Proteins ohne Bedeutung	40
2.3.5 Eine N-terminal befindliche Domäne vermittelt Funktionalität von Upa2, bestimmt aber nicht dessen Lokalisierung	42
2.3.6 Das Tripeptid GWW ist notwendig für endosomale Lokalisierung von Upa2	46
2.3.7 Die Mutation von GWW hat keinen Einfluss auf das Expressionslevel von Upa2	49
2.3.8 Eine N-terminale Verkürzung von Upa2 führt zu einer starken Akkumulation des Proteins	51
2.3.9 Die endosomale Lokalisierung von Upa2 ist mRNA-abhängig	57
2.3.10 Der Verlust von Upa2 beeinflusst die Funktion von mRNPs	59
3 Diskussion	66
3.1 Die Rolle von PAM2-Motiv-tragenden Proteinen im Rrm4-abhängigen Langstreckentransport	67
3.2 Der Verlust von Upa9 führte zu einer erhöhten Bipolaritätsrate, welche jedoch nicht auf eine direkte Involvierung in den endosomalen mRNA-Transport zurückzuführen ist	71
3.3 Weitergehende Charakterisierung des Multi-PAM2-Proteins Upa2	75

3.3.1	Upa2 ist eine Komponente des endosomalen mRNA-Transports und gelangt über ein C-terminales Motiv zur Transportmaschinerie	75
3.3.2	Die Funktion von Upa2 hängt von einem N-terminalen Bereich, jedoch nicht von PAM2-Motiven ab	77
3.3.3	Die Akkumulation von Upa2 ²⁸⁴⁻²¹²¹ -Gfp könnte durch Phasentransition ausgelöst werden	80
3.3.4	Die Rekrutierung von Upa2 ist mRNA-abhängig und bedingt gleichzeitig die Formierung von mRNPs	81
3.3.5	Aktuelles Modell des endosomalen mRNA-Transports in <i>U. maydis</i>	83
3.3.6	Ausblick	85
4	Addendum	87
5	Material und Methoden	90
	<i>5.1 Materialien und Bezugsquellen</i>	90
5.1.1	Chemikalien, Puffer, Lösungen, Medien, Enzyme und Kits	90
5.1.2	Zentrifugen	93
5.1.3	Oligonukleotide	94
5.1.4	Plasmide und Plasmidkonstruktionen	95
5.1.5	Stämme	109
	<i>5.2 Mikrobiologische, zellbiologische und genetische Methoden</i>	111
5.2.1	Arbeiten mit <i>E. coli</i>	111
5.2.2	Arbeiten mit <i>S. cerevisiae</i>	113
5.2.3	Arbeiten mit <i>U. maydis</i>	114
	<i>5.3 Molekularbiologische Methoden</i>	116
5.3.1	Isolierung von Nukleinsäuren	116
5.3.2	Arbeiten mit Nukleinsäuren	117
5.3.3	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	120
5.3.4	Auftrennung und Nachweis von Nukleinsäuren	121
5.3.5	Sequenzanalyse	123
	<i>5.4 Proteinbiochemische Methoden</i>	125
	<i>5.5 Mikroskopie und Bildverarbeitung</i>	128
5.5.1	Mikroskop-Aufbau und Steuerung	128
5.5.2	Kolokalisationsstudien und deren Auswertung	128
5.5.3	Analyse von Phänotypen und Untersuchung subzellulärer Lokalisationen	129
5.5.4	FM4-64-Färbung und Benomyl-Behandlung	129
	<i>5.6 Computerprogramme</i>	129
6	Publikation	131
7	Literaturverzeichnis	133

Zusammenfassung

Das Wachstum eukaryotischer Zellen hängt stark von der Etablierung von Zellpolarität durch lokale Proteinaktivität ab. Ein zentraler Mechanismus hierbei ist der Transport von mRNA und deren lokale Translation. Der Langstreckentransport von mRNA in dem Basidiomyzeten *Ustilago maydis* ist essentiell für effizientes Längenwachstum der Hyphen. Im Gegensatz zu anderen beschriebenen Prozessen beruht der zugrundeliegende Mechanismus in diesem Modellorganismus auf dem Ko-Transport der mRNA auf Rab5a-positiven Endosomen. Zentrale Komponenten des transportierten *messenger* Ribonukleoproteinkomplexes (mRNP) sind das RNA-bindende Protein Rrm4, welches die Ziel-Transkripte selektiv erkennt, sowie das Poly(A)-bindende Protein Pab1, welches den Poly(A)-Anhang jeder mRNA bindet. Sowohl Rrm4 als auch Pab1 besitzen MLLE-Domänen, welche durch Bindung sogenannter PAM2-Motive Protein-Protein-Interaktionen vermitteln. So wurde das PAM2-Protein Upa1 als Adapterprotein ermittelt, welches die Ladung von Rrm4-mRNPs auf frühe Endosomen begünstigt. In der vorliegenden Arbeit wurde die zelluläre Rolle des PAM2-Proteins Upa2 genauer charakterisiert. Mit den mindestens vier vorhergesagten PAM2-Motiven stellt Upa2 eine Besonderheit dar. Gezielte Mutationen zeigten jedoch, dass die PAM2-Motive in Upa2 zwar funktionell sind und eine Interaktion mit dem Poly(A)-Bindeprotein Pab1 vermitteln, aber für die Funktion von Upa2 im mRNP unter den getesteten Bedingungen nicht wichtig sind. Stattdessen wurden zwei weitere interessante Domänen in diesem Protein identifiziert: Zum einen konnte eine N-terminale Region eingegrenzt werden, welche für die Funktionalität von Upa2 notwendig ist. Zum anderen zeigte sich, dass diese Funktion nur erfüllt wird, wenn Upa2 mithilfe des C-terminalen Tripeptids GWW an endosomale Transport-mRNPs rekrutiert wird. Ein starker Rückgang des Pab1-Transports in *upa2*-defizienten Mutanten verdeutlicht die zentrale Rolle dieses Proteins im Rrm4-abhängigen mRNA-Transport. In systematischen Deletionsstudien wurde zudem die Rolle von weiteren potentiellen PAM2-Proteinen untersucht. Dabei wurde die peroxisomale Komponente Upa9 identifiziert. Stämme mit einer Deletion von *upa9* weisen einen zu *rrm4*-defizienten Mutanten ähnlichen Phänotyp beim filamentösen Wachstum auf. Upa9 lokalisiert in Peroxisomen, zeigt aber auch eine partielle Kolokalisierung mit Rrm4-positiven Partikeln. Aus der transienten Kolokalisierung konnte geschlossen werden, dass Upa9 keine direkte Komponente des endosomalen mRNA-Transports darstellt. Jedoch zeigen die hier durchgeführten Analysen eine Verbindung zwischen der Bewegung von frühen Endosomen und Peroxisomen in *U. maydis*.

Summary

Growth of eukaryotic cells strongly depends on the establishment of cellular polarity via local protein activity. An important mechanism to achieve polarity is the active transport of mRNAs to specific sites for local translation. In the basidiomycete *U. maydis*, the establishment of cellular polarity is achieved by active long-distance transport of mRNAs. In contrast to other transport processes, the mechanism in *U. maydis* relies on co-transport of mRNA on Rab5a-positive endosomes. Two key components of the transported messenger ribonucleoprotein particle (mRNP) are the RNA-binding protein Rrm4, which is binding selectively to target mRNAs, and the poly(A)-binding protein Pab1 that is associated to the poly(A) tail of every mRNA. Both Rrm4 and Pab1 possess MLE domains for protein-protein interaction with PAM2 motif-containing proteins. An example of such interactions is the PAM2 protein Upa1, which has been identified as an adapter-like protein, mediating the connection of Rrm4-mRNPs to early endosomal surfaces. In the present work, further investigations of the PAM2 protein Upa2 were carried out to determine its cellular role. Mutational analysis led to the validation of PAM2 functionality. Nevertheless, the interaction of PAM2 motifs with Pab1 appeared to be unnecessary for the function of Upa2. Instead, two new interesting regions were found: functionality of Upa2 is mediated via an N-terminal region of the protein, while its localization to early endosomes depends on the C-terminal tripeptide GWW. Additionally, *upa2* deficient mutants showed a strong reduction in Pab1 shuttling, indicating impaired mRNA transport. A systemic deletion survey of additional PAM2-containing proteins led to the identification of the peroxisomal component Upa9. Mutant strains harboring an *upa9* deletion show a similar morphological phenotype as *rrm4* deficient hyphae. Upa9 mainly localizes to peroxisomes, although a co-localization to moving Rrm4-positive particles can occasionally be observed. Since co-localizing events are rare, it has been concluded that Upa9 is not incorporated into mRNPs directly. Nevertheless, results indicate a connection between early endosomal transport and the distribution of peroxisomes in *U. maydis*.

1 Einleitung

1.1 Intrazellulärer Transport

Innerhalb kompartimentalisierter eukaryotischer Zellen ist der Transport von Makromolekülen essentiell. Das Zytoskelett einer Zelle spielt hierbei eine fundamentale Rolle für die Etablierung einer definierten Zellform sowie für deren Wachstum und Bewegung. Komponenten des Zytoskeletts übernehmen häufig den intrazellulären Transport von Makromolekülen, Vesikeln und auch Organellen. Ein gut untersuchtes Beispiel für in Transportprozesse involvierte Komponenten des Zytoskeletts sind die aus Aktin aufgebauten Mikrofilamente und die aus Tubulinen bestehenden Mikrotubuli. Aktin ist das abundanteste Protein in den meisten eukaryotischen Zellen und dementsprechend hoch konserviert (Pollard 2016). Es zeigt eine starke Tendenz zur Polymerisierung, welche zur Bildung von sogenannten polymeren Mikrofilamenten führt (Li et al. 2015). Entlang dieser Mikrofilamente erfolgt der Kurzstreckentransport, beispielsweise von Vesikeln zur Plasmamembran unter ATP-Hydrolyse mithilfe der Aktin-spezifischen Motorproteine der Myosin-Klasse (Titus 2018). Im Gegensatz zum durch Aktin und Myosin vermittelten Transport dienen Mikrotubuli und die mit diesen interagierenden Motorproteine der Kinesin- und Dyneinklasse eher dem Langstreckentransport von Molekülen (Schuster et al. 2011). Mikrotubuli werden aus α - und β -Tubulin-Untereinheiten aufgebaut und polymerisieren am Mikrotubuli-organisierenden Zentrum (*microtubule organising center*, MTOC) (Song und Brady 2015). Während Kinesine in Richtung der sogenannten Plus-Enden der Mikrotubuli wandern, bewegen sich Dyneine in die Minus-Richtung (Wittmann et al. 2001). Somit vermittelt das regulierte Zusammenspiel beider Proteine den Transport von Makromolekülen in beide Richtungen und ermöglicht dadurch eine bestmögliche Verteilung der Fracht. Ein wichtiges Beispiel für den intrazellulären Transport entlang des Mikrotubuli-Zytoskeletts ist der aktive Transport von mRNAs.

1.2 mRNA-Transport und Lokalisierung

Eine asymmetrische Verteilung von mRNAs innerhalb einer Zelle ist ein grundlegender Mechanismus zur Regulation der Genexpression auf post-transkriptioneller Ebene sowie zur effektiven räumlichen und zeitlichen Regulation der Proteinexpression. Durch

die spezifische Lokalisierung von Transkripten kann die ortsgebundene Proteinsynthese eine höhere Konzentration eines kodierten Proteins erreichen, welche für die Assemblierung von Proteinkomplexen eine wichtige Rolle spielen kann (Holt und Bullock 2009). Für eine Zelle ist es von Vorteil, mRNAs anstatt synthetisierter Proteine zu bestimmten Bereichen zu transportieren. Durch die Lokalisierung von Transkripten ist es der Zelle möglich, schneller auf Stimuli zu reagieren und durch Translation große Mengen benötigter Faktoren herzustellen. Zudem ist es energieeffizienter, eine lokalisierte mRNA mehrfach zu translatieren und das erforderliche Translationsprodukt direkt am Ort des Stimulus anzusammeln, anstatt mRNAs an anderer Stelle in der Zelle zu translatieren und fertige Proteine transportieren zu müssen. Durch eine lokal beschränkte Translation wird zudem verhindert, dass Proteine Stellen in der Zelle erreichen, an denen sie toxische oder sogar letale Auswirkungen haben könnten (Martin und Ephrussi 2009; Macdonald 2011). Der erste Nachweis einer solchen asymmetrischen Verteilung gelang im Jahre 1983 durch Markierung der Aktin-mRNA in der Seescheide *Styela plicata*, in der die untersuchte mRNA vor Befruchtung im Myoplasma vorliegt, nach der Befruchtung und während der Embryogenese jedoch differentiell verteilt wird (Jeffery 1989). Während anfänglich davon ausgegangen wurde, dass eine derartige asymmetrische mRNA-Verteilung nur in polarisierten Zellen oder Embryonen notwendig ist und sich sogar auf einige wenige Transkripte beschränkt, ist heute bekannt, dass sie in vielen diversen Zelltypen vorkommt (Martin und Ephrussi 2009; Blower 2013). Spezifische Lokalisierungen von mRNAs sind gut bekannt aus stark polarisierten Zellen wie Neuronen oder großen Zellen wie Oozyten (Blower 2013). Ein sehr intensiv untersuchter Modellorganismus für eine subzelluläre Regulation der mRNA-Lokalisation ist die Taufliege *Drosophila melanogaster*. In diesem Falle hängt die korrekte Entwicklung des Embryos von der korrekten Lokalisierung diverser mRNAs ab (Barr et al. 2016). Untersuchungen in frühen Embryonen von *D. melanogaster* zeigten spezifische mRNA-Verteilungsmuster für über 70 % der exprimierten Gene (Lécuyer et al. 2007). Diese enorme Anzahl zeigt deutlich, dass eine regulierte Lokalisierung von Transkripten für die Entwicklung einer Zelle oder eines Organismus von großer Bedeutung ist. Außerdem kann eine fehlerhafte mRNA-Lokalisierung klar mit Erkrankungen des Menschen in Verbindung gebracht werden, insbesondere mit neurodegenerativen Erkrankungen wie Alzheimer oder Parkinson (Jeibmann und Paulus 2009; Costa und Willis 2018). Die Regulation der Lokalisierung kann dabei über diverse Mechanismen erreicht werden. Dazu zählt der Schutz lokalisierter mRNA vor Abbau sowie die Fixierung der mRNA an subzellulären Strukturen. Außerdem spielt der gerichtete Transport von Transkripten entlang des

Zytoskeletts eine große Rolle (St Johnston 2005; Medioni et al. 2012). Ein Beispiel hierfür findet sich in *D. melanogaster*, wo ungespleißte *oskar*-mRNA mit der lokalisierungskompetenten, gespleißten Variante „per Anhalter“ transportiert wird (Jambor et al. 2011). Der aktive zielgerichtete Transport von mRNA ist somit ein sehr gut untersuchter Prozess und findet sich in diversen Organismen wieder (Buxbaum et al. 2015), wobei das grundlegende Transportprinzip trotz Organismen-spezifischer Komponenten ähnlich ist. Für eine spezifische Lokalisierung an der gewünschten subzellulären Position muss eine mRNA verschiedene Kriterien erfüllen. Wichtig ist, dass sie einen sogenannten *Zipcode* (auch Lokalisierungselement genannt) enthält, welcher sich häufig in der 3' untranslatierten Region (3'UTR) einer mRNA befindet (Jambhekar und Derisi 2007). Ein solcher *Zipcode* kann aus über 1000 Nukleotiden bestehen und vermittelt die Information über das Ziel der mRNA. *Zipcodes* zählen zu den sogenannten *cis*-aktiven Elementen, können als solche als Bindestellen für RNA-Bindeproteine dienen und über eine Interaktion mit diesen an Transportkomplexe gekoppelt werden (Mowry 1996; Jambhekar und Derisi 2007). Ein Beispiel für einen bekannten *Zipcode* ist eine 28 Nukleotide lange Sequenz in β -Aktin-mRNA, in der zwei Zielsequenzen von ZBP1 (*zipcode binding protein 1*) mithilfe von KH3- und KH4-Domänen erkannt werden (KH3: (5')CGGAC(3'); KH4: (5')ACAC(3')); (Nicastro et al. 2017). Die RNA-bindenden Proteine im Komplex mit ihren Ziel-mRNAs, zusammen mit zusätzlichen Faktoren wie Translationsrepressoren oder Ribosomen, werden als *messenger* Ribonukleoproteinkomplexe (mRNPs) bezeichnet. Sie können direkt oder indirekt mithilfe von Motorproteinen entlang des Zytoskeletts transportiert werden, bis die geladenen mRNAs an ihrem Zielort translatiert werden können (Besse und Ephrussi 2008; Vollmeister et al. 2012b). Dazu müssen die Transkripte während des Transports translationell inhibiert und erst am Zielort zur Translation freigegeben werden (Di Liegro et al. 2014). Eine Möglichkeit zur translationellen Inhibierung ist die Assoziation von translationellen Repressoren wie Dhh1p oder Khd1p in *Saccharomyces cerevisiae*, die das Transkript stilllegen und erst nach ihrer Phosphorylierung die Translation zulassen (Niessing et al. 2017). Zur Aktivierung der Translation kann am Zielort einer mRNA zytoplasmatische Polyadenylierung durchgeführt werden (Wu et al. 1998; Mendez et al. 2000). Der durch Motorproteine der Myosin- sowie Kinesin- und Dynein-Proteinklassen vermittelte, aktive Transport von mRNA wird im Folgenden näher beschrieben.

1.2.1 Aktin-abhängiger mRNP-Transport

Das bestuntersuchte Beispiel des Aktin-abhängigen mRNA-Transports ist der Transport der *ASH1*-mRNA in der Bäckerhefe *S. cerevisiae* (Abbildung 1). Dieser Mikroorganismus reproduziert sich durch asexuelle Knospung, wobei an einer Mutterzelle die zunächst kleinere Tochterzelle gebildet wird (Porro et al. 2009). Dabei ist die Mutterzelle in der Lage, ihren Paarungstyp zu verändern, indem der entsprechende Locus durch die HO-Endonuklease verändert wird. Die Tochterzelle dagegen kann eine solche Veränderung des Erbguts nicht vornehmen (Strathern und Herskowitz 1979; Bobola et al. 1996). Die spezifische Regulation zwischen Mutter- und Tochterzelle wird erreicht, indem die Expression der HO-Endonuklease in der Tochterzelle reprimiert wird (Cosma 2004). Diese Repression wird durch das Protein Ash1p erreicht, welches an den HO-Promoter bindet (Maxon und Herskowitz 2001). Die *ASH1*-mRNA wird dazu mithilfe des Myosins Myo4p von der Mutter- in die Tochterzelle transportiert (Bertrand et al. 1998; Niessing et al. 2017). Dieses für die *ASH1*-mRNA spezifische Motorprotein gehört zu den Klasse-V-Myosinen und ermöglicht den Transport entlang des Aktin-Zytoskeletts (Haarer et al. 1994). Nach der Transkription erkennt das RNA-Bindeprotein She2p die *cis*-aktiven Elemente (E1, E2A/B, E3) in der 3'UTR und im offenen Leserahmen der *ASH1*-mRNA und bindet diese (Chartrand et al. 1999; Böhl et al. 2000). Dieser Vorkomplex ist in kooperativer Bindung mit dem Adapterprotein She3p in der Lage, mithilfe von Myo4p aktiv transportiert zu werden. Dabei kann She3p als Gerüstprotein angesehen werden (Long et al. 2000; Takizawa und Vale 2000; Edelmann et al. 2017). Damit die *ASH1*-mRNA während des Transports translationell inaktiv bleibt, sind unter anderem die Repressoren Puf6p und Khd1p nötig. Dabei interagiert Puf6p beispielsweise mit dem konservierten UUGU-Element im *cis*-aktiven Element E3 in der 3'UTR der mRNA (Gu et al. 2004), während Khd1p mit dem Element E1 interagiert. Zur Aktivierung der Translation wird der Repressor Khd1p durch die am Zielort in der Plasmamembran verankerten Caseinkinase Yck1p phosphoryliert (Babu et al. 2002; Paquin et al. 2007), wodurch die RNA-Bindekapazität von Khd1p reduziert wird (Gu et al. 2004). Ein ähnliches Transportsystem wurde im opportunistischen Humanpathogen *Candida albicans* gefunden. In diesem Pilz wurde ein She3p-Homolog identifiziert, welches einen Einfluss auf die Lokalisierung von Ash1 hat (Elson et al. 2009). In Wildtyp-Zellen lokalisierte Ash1 während des Hefe-artigen Wachstums in der Tochterzelle und an der Spitze infektiöser Hyphen. In *she3Δ*-Mutanten wurde Ash1 sowohl in Mutter- als auch in Tochterzellen beobachtet. Zudem lokalisierte es nicht nur an der Spitze von Hyphen (Inglis und Johnson 2002; Elson et al. 2009). Diese Fehllokalisierung führte zu einer

Reduktion der Virulenz und beeinflusste das Hyphenwachstum (Inglis und Johnson 2002). Da es in *C. albicans* kein She2p-Homolog gibt, wird davon ausgegangen, dass entweder ein bisher unbekanntes RNA-Bindeprotein an der *ASH1*-Lokalisierung beteiligt oder She3 selbst für RNA-Bindung verantwortlich ist (Ariyachet et al. 2017). Der Transport von Makromolekülen entlang des Aktin-Zytoskeletts ist auch in höheren und mehrzelligen Eukaryoten von Bedeutung. Es ist beispielsweise bekannt, dass die Lokalisierung von Staufr-1-mRNA durch RNPs zum somatodendritischen Kompartiment durch ein intaktes Aktinfilamentsystem und das Aktin-abhängige Motorprotein Myosin Va erreicht wird (Balasanyan und Arnold 2014). Dadurch wird das mRNA-Bindeprotein Staufr 1 zum Zellkörper von Neuronen und deren Dendriten lokalisiert, während es nicht im Axon vorkommt. Wird die Funktion des Motorproteins Myosin Va inhibiert, kommt es zu einer Anreicherung von Staufr 1 auch im Axon (Balasanyan und Arnold 2014), wodurch Lokalisierung und Abbau sowie translationelle Kontrolle von mRNAs beeinträchtigt werden (Lebeau et al. 2008).

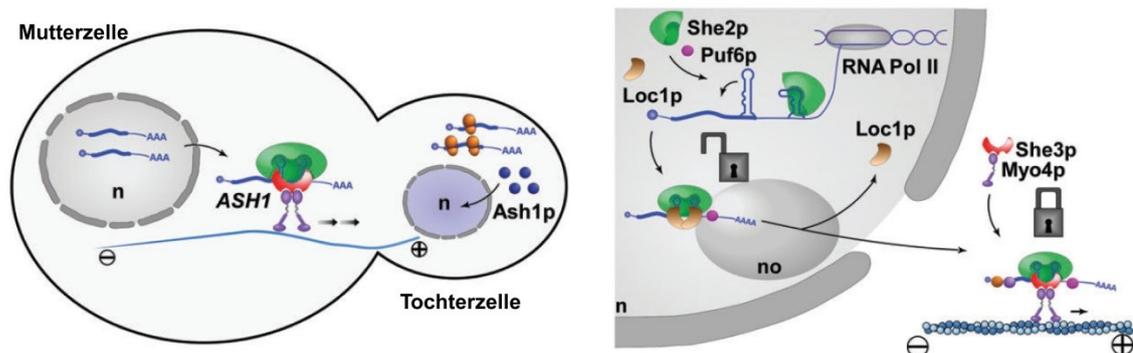


Abbildung 1: Aktin-abhängiger Transport der *ASH1*-mRNA in *S. cerevisiae*. Links: Schematische Darstellung des *ASH1*-mRNA-Transports. Die mRNA wird Aktin-abhängig in die Tochterzelle zur dortigen Translation transportiert. Rechts: Detaillierte Darstellung der Prozesse im Nukleus während des She2p-abhängigen mRNA-Transports. She2p wird ko-transkriptionell an die mRNA-Erkennungsstrukturen gebunden; eine mäßige Stabilisierung dieser Interaktion wird durch Loc1p vermittelt. Loc1p wird außerhalb des Kerns von She3p verdrängt, es kommt zur Bildung eines stabilen Transportkomplexes. Abbildung mit Genehmigung und modifiziert nach (Niessing et al. 2017).

1.2.2 Mikrotubuli-abhängiger mRNP-Transport

In polarisierten Zellen sowie Embryonen und Oozyten müssen Transkripte oft über weite Distanzen bewegt werden, wofür der Aktin-abhängige Transport seltener eingesetzt wird. In solchen Zellen findet sich hauptsächlich ein mRNA-Transport entlang von Mikrotubuli (Evans et al. 2014). Dieser Transport wird in Abhängigkeit der Richtung durch verschiedene Motorproteine vermittelt: In Richtung der Plus-Enden geschieht der Transport mithilfe von Kinesinen, während Dyneine den Transport in Richtung der Minus-Enden der Mikrotubuli übernehmen (Gennerich und Vale 2009). Wichtige Beispiele für einen Mikrotubuli-abhängigen Transport finden sich in diversen Organismen wie der Taufliege *D. melanogaster*, dem Krallenfrosch *Xenopus laevis* und in Neuronen der Säugetiere (Abbildung 2). Zudem ist viel bekannt über diese Art des mRNA-Transports während des polaren filamentösen Wachstums einiger Pilze (Holt und Bullock 2009; Vollmeister et al. 2012b)

In der Oozyte der Taufliege *D. melanogaster* ist eine Regulation maternal kodierter mRNAs von großer Bedeutung für die initiale Entwicklung. Die Oozyten entwickeln sich bei der Taufliege in sogenannten Eikammern, welche ein Synzytium aus 16 Keimzellen beinhalten (Sanghavi et al. 2016). Von diesen 16 Zellen entwickelt sich nur eine zur Oozyte, während die anderen Zellen als sogenannte Ammenzellen (*nurse cells*) mRNAs und Proteine bereitstellen sowie gegen Ende der Entwicklung ihr beinahe vollständiges Zytoplasma zur Oozyte transferieren (Guild et al. 1997; Poulton und Deng 2007). Durch die spezifische Lokalisierung der *oskar*-, *nanos*-, *gurken*- und *bicoid*-mRNA werden dabei die Körperachsen des Embryos festgelegt (Kim-Ha et al. 1991; Irion und St Johnston 2007; Weil 2014; Derrick und Weil 2017). Dabei ist die Lokalisierung der *oskar*- und *bicoid*-mRNA wichtig für die Etablierung des anterioposterioren Musters, und die Lokalisierung der *gurken*-mRNA trägt zur Etablierung des dorsoventralen Musters und der Segmentierung des Embryos bei (Shav-Tal und Singer 2005). Der Transport der *oskar*-mRNA erfolgt durch aktiven Transport entlang der Mikrotubuli in alle Richtungen (Abbildung 2, **B**), jedoch mit einer leichten Anreicherung zum posterioren Pol der Zelle (Zimyanin et al. 2008). Dazu wird es durch RNA-Bindeproteine wie Staufen sowie durch Bruno, einem translationellen Repressor, gebunden und mithilfe von Kinesinen transportiert. Erreicht die mRNA ihren Zielort am posterioren Pol, wird die Translation durch Bindung des Aktivators Orb ermöglicht (Brendza et al. 2000; Zimyanin et al. 2008; Yang et al. 2015). Der Transport der mRNAs ist abhängig von einem Dynein-vermittelten Transport zu den Minus-Enden der Mikrotubuli sowie dem Proteinkomplex aus Egalitarian (Egl) und Bicaudal-D (Bic-D; Abbildung 2, **C**) (Kugler und Lasko 2009; Vazquez-Pianzola et al. 2017). Egl ist trotz

fehlender kanonischer RNA-Bindemotive in der Lage, aktive *cis*-aktive Elemente beispielsweise in *gurken*-mRNA zu binden und interagiert zudem mit einem konservierten Bereich des Proteins Bic-D, wodurch stabile Transportmultimere gebildet werden können (Bullock et al. 2003; Dienstbier et al. 2009). Ein weiteres gut untersuchtes Beispiel für den Mikrotubuli-abhängigen Transport von mRNAs findet sich im Krallenfrosch *X. laevis*. Die Entwicklung der Oozyten hängt von der asymmetrischen Verteilung spezifischer mRNAs ab. So wird beispielsweise der Wachstumsfaktor Vg1 für eine korrekte Entwicklung von Meso- und Ektoderm benötigt (Shav-Tal und Singer 2005). Die maternale Vg1-mRNA muss dazu an eine spezifische Stelle am vegetativen Kortex der Oozyte lokalisieren (Melton 1987). Dies wird durch ein 340 Nukleotide umfassendes Lokalisierungselement in der 3'UTR der mRNA vermittelt (Mowry und Melton 1992), welches am repetitiven Motiv E2 durch das RNA-Bindeprotein Vera gebunden wird (Abbildung 2, **A**). Vera, ein mit dem Endoplasmatischen Retikulum assoziiertes Protein, enthält zwei RRM- (*RNA recognition motif*) sowie vier KH-Domänen (*hnRNP K-homology domain*) und bewegt sich dabei vermutlich entlang der Mikrotubuli zum vegetativen Kortex. Da das Protein Vera aus *X. laevis* stark homolog zu dem RNA-Bindeprotein ZBP-1 aus dem Huhn ist, kann eine Konservierung der RNA-Lokalisierungsmechanismen in Vertebraten angenommen werden (Deshler 1997). In Neuronen der Säugetiere spielt der aktive mRNA-Transport eine wichtige Rolle zur Etablierung neuronaler Plastizität (Abbildung 2, **D**). Aktuell wird angenommen, dass mRNA-Lokalisierung den Hauptfaktor für Lokalisierung von Proteinen in Neuronen darstellt und für mindestens die Hälfte aller Proteinlokalisationen im Neuronenproteom ursächlich ist (Zappulo et al. 2017). Ein Beispiel für ein in Neuronen lokalisiertes Protein ist tau. Dabei handelt es sich um ein mit Mikrotubuli assoziiertes Protein, welches deren Assemblierung stimuliert und stabilisiert (Avila 2018). Tau wird hauptsächlich im Zellkörper und im Axon exprimiert (Binder et al. 1985; Brion et al. 1988). Die *tau*-mRNA-Lokalisierung hängt hierbei von *cis*-aktiven Elementen in der 3'UTR ab. Diese Elemente werden von HuD gebunden, einem mRNA-stabilisierenden Protein. Zudem findet sich in den *tau*-mRNA-Granula, neben ribosomalen Komponenten, das Kinesin KIF3A. Es wird angenommen, dass sowohl KIF3A als auch HuD an der Bewegung und anschließenden Verankerung der *tau*-Granula an Mikrotubuli beteiligt sind. Zudem konnte gezeigt werden, dass *tau*-mRNA lokal im Axon translatiert wird (Aronov et al. 2001; Aronov et al. 2002; Aranda-Abreu et al. 2014).

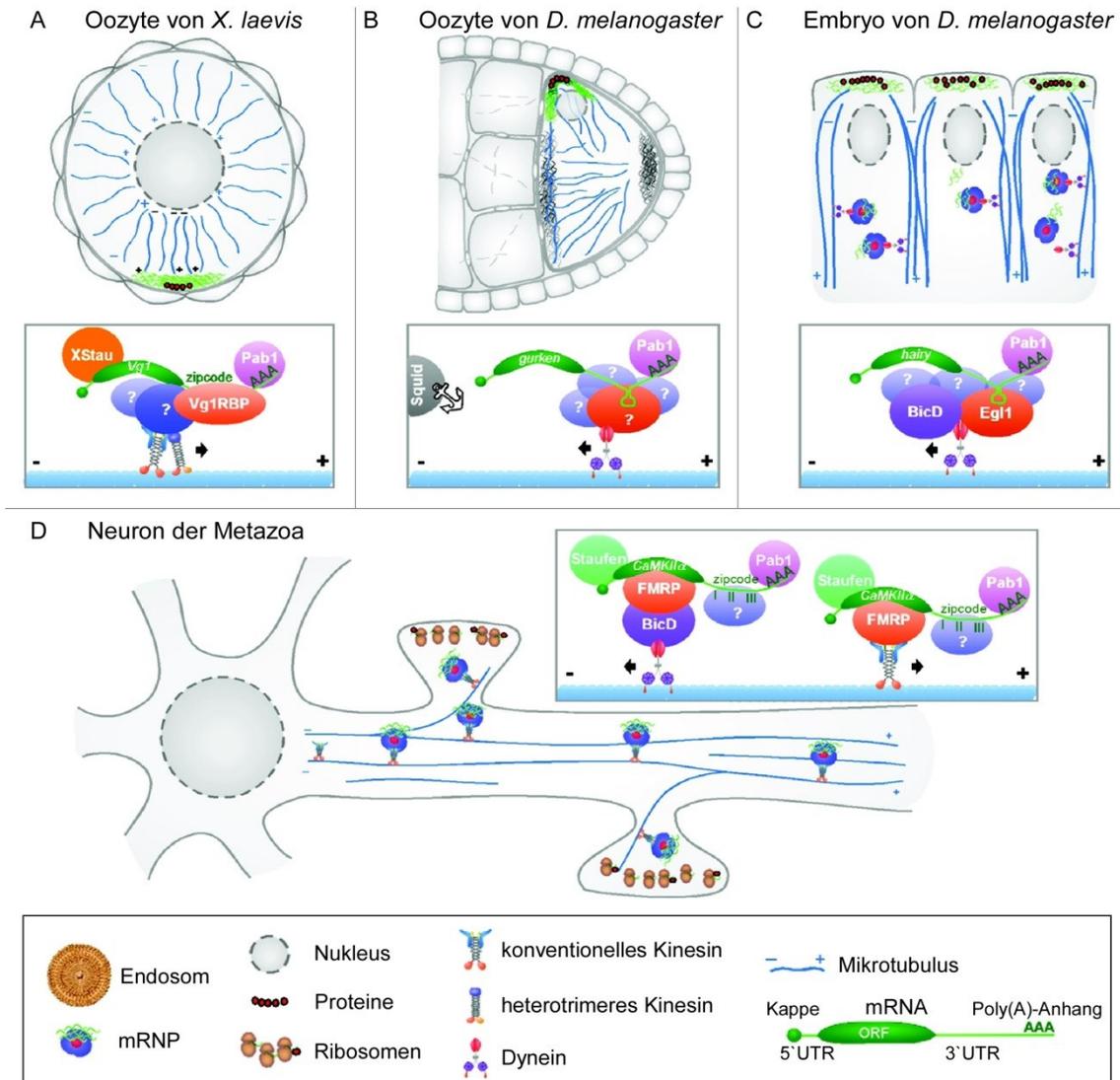


Abbildung 2: Mikrotubuli-abhängiger mRNA-Transport in verschiedenen Modellorganismen. **A** Während der Oogenese in *X. laevis* wird der Transport der *Vg1*-mRNA durch konventionelles sowie heterotrimeres Kinesin vermittelt. Die mRNA wird durch Faktoren wie Vera (auch *Vg1RBP* genannt) und *Staufen* gebunden. **B** In Oozyten von *D. melanogaster* wird die *gurken*-mRNA durch Dynein transportiert. **C** Im Embryo von *D. melanogaster* bilden mRNAs zusammen mit den Proteinen *Egl1* und *Bic-D* Transportkomplexe, welche durch Dynein bewegt werden. **D** In Neuronen der Metazoa sind die Motorproteine Dynein und konventionelles Kinesin am Transport von mRNA zu ihrer subzellulären Lokalisation beteiligt. Die Abbildung ist modifiziert nach (Vollmeister et al. 2012b).

Der Transport von mRNA geschieht jedoch nicht nur über direkte Interaktionen mit Motorproteinen, sondern ist in vielen Fällen auch an Membransysteme gekoppelt. Ein Beispiel dazu findet sich ebenfalls in *S. cerevisiae*. Hier wurde gezeigt, dass der Transportkomplex aus *She3p/Myo4p* nicht nur Membranprotein-kodierende mRNAs, sondern auch kortikales Endoplasmatisches Retikulum über das Aktin-Zytoskelett in die wachsende Knospe befördert. Die Deletion von *she3* oder *myo4* verhindert diesen

Prozess, während das Vorhandensein des kortikalen Endoplasmatischen Retikulums in der Tochterzelle für die Lokalisierung von mRNA nicht essentiell ist (Estrada et al. 2003). Durch diesen Transportprozess könnte die *de novo* Bildung des kortikalen Endoplasmatischen Retikulums in der sich neu formenden Zelle erleichtert werden (Haag et al. 2015). In *C. albicans* kommt es während des polaren Wachstums zu einem kontinuierlichen Transport von sekretorischen Vesikeln vom Golgi-Apparat zum Wachstumspol. Hier zeigte sich, dass der für den Vesikeltransport notwendige Faktor Sec2p mit seiner eigenen mRNA auf der Oberfläche der Vesikel interagiert und dadurch vermutlich seine eigene Translation und somit Funktion regulieren kann (Caballero-Lima et al. 2014). Der Membran-gekoppelte mRNA-Transport spielt auch in weiteren filamentös wachsenden Pilzen wie dem Modellorganismus *U. maydis* eine wichtige Rolle zur Etablierung der Zellpolarität (Zarnack und Feldbrügge 2010; Vollmeister et al. 2012b).

1.3 Der Modellorganismus *Ustilago maydis*

U. maydis ist ein pflanzenpathogener Basidiomyzet, welcher zur Ordnung der *Ustilaginales* gehört und Auslöser des sogenannten Maisbeulenbrands ist. Zur Komplettierung seines Lebenszyklus befällt dieser Pilz neben dem heute domestizierten Mais (*Zea mays mays*) dessen lateinamerikanische Urform Teosinte (*Zea mays parviglumis*) (Bölker 2001; Kellner et al. 2011). Dabei werden durch die Proliferation von *U. maydis* in den pflanzlichen Zellen tumorartige Gallen gebildet (Banuett 1995), die unter anderem in Mexiko als die Delikatesse „Huitlacoche“ bekannt sind (Juárez-Montiel et al. 2015). Der Lebenszyklus (Abbildung 3) kann in eine saprophytische und eine parasitische Phase unterteilt werden, bei dem *U. maydis* einen dimorphen Wechsel von haploid wachsenden Hefen zu diploiden filamentös wachsenden Zellen durchläuft (Banuett 1995; Banuett und Herskowitz 2002; Matei und Doehlemann 2016). Dabei vermehren sich die zylindrischen Hefen, die auch Sporidien genannt werden, in der saprophytischen Phase durch Knospung und zeigen keine Pathogenität (Kahmann und Kämper 2004). Erst durch die Paarung kompatibler Sporidien beginnt die parasitäre Lebensweise: Die kompatiblen Zellen müssen sich zunächst erkennen, durch sogenannte Konjugationshyphen aufeinander zuwachsen und fusionieren. Zur Erkennung potentieller Partnerzellen wird ein komplexes Paarungssystem eingesetzt, welches aus dem biallelischen *a*-Lokus und dem multiallelischen *b*-Lokus besteht. Hierbei kodiert der *a*-Lokus für ein Pheromon und einen Pheromonrezeptor (García-Muse et al. 2003). Dieser Rezeptor erkennt spezifisch nur das sekretierte Pheromon des anderen Allels, welches nicht in derselben

Zelle produziert wird (Bölker et al. 1992). Sobald zwei Sporidien, welche jeweils ein anderes *a*-Allel besitzen, sich erkannt haben, kommt es zu einem Arrest des Zellzyklus in der G₂-Phase. Durch Bildung sogenannter Konjugationshyphen wachsen die kompatiblen Zellen entlang der entstehenden Pheromongradienten aufeinander zu und fusionieren nach Zell-Zell-Kontakt (Spellig et al. 1994). Eine Besonderheit bei Basidiomyzeten ist hierbei, dass es zunächst nur zur Plasmogamie der Zellen kommt, also nur zu einer Fusion der beiden Zytoplasmen. Die Nuklei der beiden kompetenten Zellen bleiben separiert, es entsteht also ein stabiles Dikaryon (Kruzel und Hull 2010). Das Hyphenwachstum wird anschließend durch Expression des *b*-Lokus erreicht. Dieser Locus, der mit circa 25 verschiedenen Allelen eine große genetische Vielfalt aufweist (Schulz et al. 1990; Gillissen et al. 1992), kodiert die beiden Untereinheiten eines heterodimeren Homöodomänen-Transkriptionsfaktors, welche *bEast* (*bE*) und *bWest* (*bW*) genannt werden. Nur wenn beide Untereinheiten von Zellen mit unterschiedlichen Paarungstypen stammen, kann ein funktioneller Transkriptionsfaktor gebildet werden. Somit wird verhindert, dass das Heterodimer aus *bE* und *bW* in haploiden Zellen gebildet werden kann (Kämper et al. 1995). Dieses Wissen wurde zur Herstellung des Stamms AB33 genutzt, welcher einen funktionalen Transkriptionsfaktor unter Kontrolle eines induzierbaren Promoters exprimieren kann. Deshalb kann dieser Laborstamm ohne vorangehende Paarung kompatibler Sporidien Hyphen bilden (Brachmann et al. 2001). Der aktive Transkriptionsfaktor *bE/bW* reguliert anschließend die Expression jener Gene, welche für die Etablierung der Pathogenität der dikaryotischen Hyphe notwendig sind (Bölker 2001; Brefort et al. 2009). Während des filamentösen Wachstums kommt es zur Elongation der Zelle zum apikalen Pol hin, während am basalen Pol Septen eingezogen werden. Diese Barrieren trennen die wachsende Hyphe von Bereichen, in denen kein Zytoplasma enthalten ist. Durch Bildung mehrerer solcher Septen in regelmäßigen Abständen gelingt es der Zelle, ein unipolares Wachstum aufrechtzuerhalten, ohne dass eine *de novo* Generierung von Zytoplasma notwendig wird (Steinberg et al. 1998; Freitag et al. 2011). Erkennt die Hyphe auf der Oberfläche des Wirts bestimmte chemische und physikalische Signale, kommt es zur Ausbildung einer spezialisierten Struktur, dem sogenannten Appressorium, mit dessen Hilfe die Hyphe in das pflanzliche Gewebe eindringen kann (Kolattukudy et al. 1995; Lanver et al. 2010; Castanheira und Pérez-Martín 2015). Im pflanzlichen Gewebe kommt es zur Aufhebung des G₂-Arrests und zu massiver Proliferation von *U. maydis* in allen oberirdischen Geweben der Maispflanze. Typische Symptome einer Infektion sind zunächst Chlorosen und Anreicherungen von Anthocyanen in den Blättern, im späteren Verlauf der Infektion kommt es zur Bildung der typischen tumorartigen Gallen, meist an meristematischem Gewebe (Gold et al.

1997; Scherer et al. 2006; Horst et al. 2010; Vollmeister et al. 2012a). In diesen Gallen kommt es zur Karyogamie und im Anschluss zur Bildung Melanin-pigmentierter Teliosporen (Kojic et al. 2013). Diese können sich nach ihrer Freisetzung durch die Luft verteilen und unter passenden Umweltbedingungen auskeimen. Dabei kommt es durch Meiose zur Bildung von vier haploiden Sporidien, welche den Lebenszyklus komplettieren (Bölker 2001; Vollmeister et al. 2012a). Durch jahrzehntelange Forschung entwickelte sich *U. maydis* auch aufgrund seiner kurzen Generationszeit und der Möglichkeit zur Kultivierung unter Laborbedingungen zu einem gut untersuchten Modellorganismus für die Zellbiologie. An *U. maydis* konnte eine Vielzahl verschiedener zellulärer Prozesse untersucht werden. So wurde beispielsweise bereits in den 1960er Jahren die homologe DNA-Rekombination durch Holliday aufgeklärt, was den Grundstein für die genetische Manipulation in diesem Organismus legte (Holliday 1964). In *U. maydis* ist es des Weiteren dank der Verfügbarkeit eines komplett sequenzierten und annotierten Genoms möglich, gezielte Genmanipulationen vorzunehmen und somit beispielsweise Signalwege sowie zelluläre Transportmechanismen und RNA-Prozesse zu untersuchen (Kämper 2004; Brachmann et al. 2004; Kämper et al. 2006; Feldbrügge et al. 2008; Vollmeister et al. 2012b; Langner et al. 2015; Langner und Göhre 2016). Neben seiner Rolle in der grundlegenden Forschung entwickelte sich *U. maydis* in den letzten Jahren zudem immer mehr zu einem für biotechnologische Anwendungen geeigneten Modellorganismus, mit dem durch Ausnutzung seines unkonventionellen Sekretionssystems der Export von heterologen Proteinen möglich ist. Zudem eignet sich der Pilz zur Herstellung von Antikörpern sowie zur Synthese von Sekundärmetaboliten (Bölker et al. 2008; Stock et al. 2012; Sarkari et al. 2014; Terfrüchte et al. 2017; Terfrüchte et al. 2018).

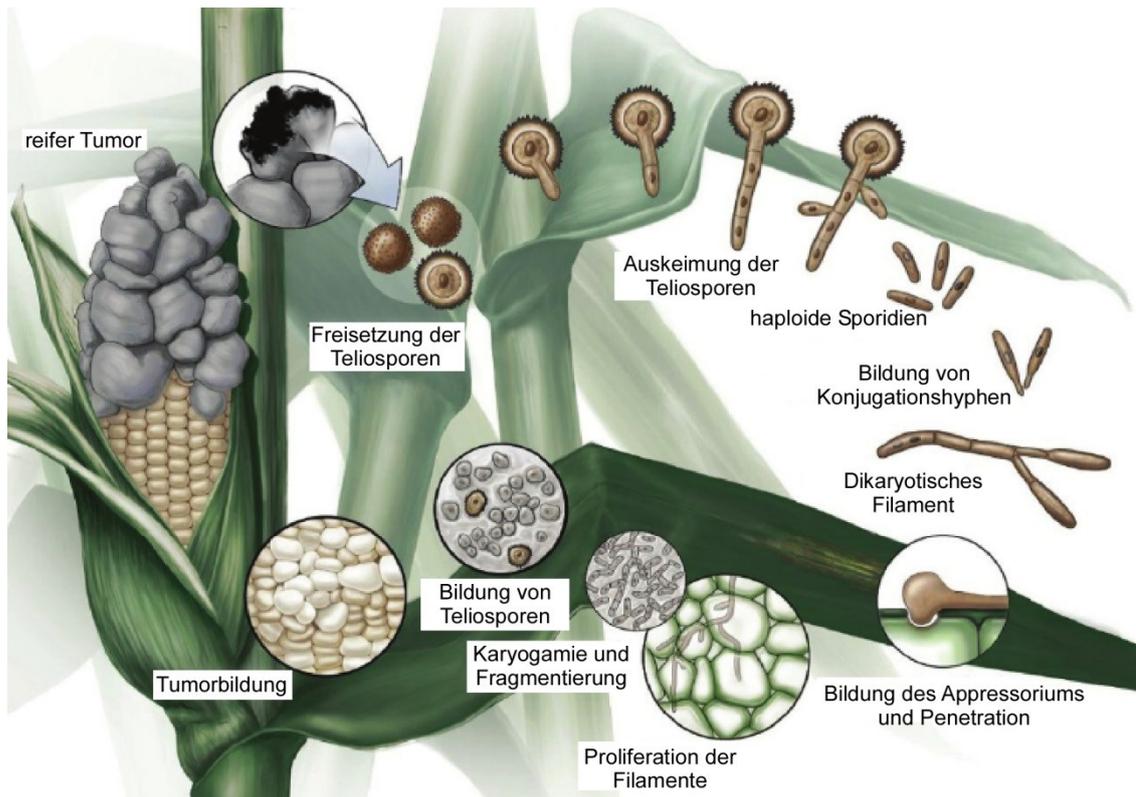


Abbildung 3: Der Lebenszyklus des Modellorganismus *U. maydis*. Zur Komplettierung seines Lebenszyklus muss *U. maydis* den Wechsel vom apathogenen, saprophytisch lebenden Sporidium zum infektiösen, parasitär lebenden Filament vollziehen. Dazu erkennen sich haploide Sporidien mit unterschiedlichem Paarungstyp und fusionieren zum dikaryotischen Filament. Dieses penetriert die Pflanzenoberfläche mithilfe des Appressoriums und proliferiert im Inneren der Pflanze. Nach Karyogamie kommt es zur Bildung von melanisierten Teliosporen, welche nach Reifung aus den tumorartigen Gallen freigesetzt werden. Die Abbildung ist modifiziert nach (Saville et al. 2012).

1.3.1 Mikrotubuli-abhängiger mRNP-Transport in *U. maydis*

Eine effiziente Etablierung der Zellpolarität in *U. maydis* hängt stark von einem intakten Mikrotubuli-Zytoskelett ab. Dabei müssen Zytoskelett-Komponenten beim Übergang vom hefeartigen zum hyphalen Wachstum neu organisiert werden (Fuchs et al. 2005). Die Mikrotubuli in *U. maydis* zeigen eine Antipolarität mit Ausrichtung der Plus-Enden zum Zellpol. Wird die Polymerisierung der Mikrotubuli inhibiert, kommt es in späteren Phasen des filamentösen Wachstums zu einem bipolaren Auswachsen der Hyphen, also zur Elongation an zwei Polen der Initialzelle, sowie Defekten bei der Bildung von Septen (Fuchs et al. 2005; Steinberg 2007). Die Depolymerisierung von Mikrotubuli kann durch Inkubation der Zellen mit dem Inhibitor Benomyl erreicht werden (Gupta et al. 2004; Rathinasamy und Panda 2006). Dieses Benzimidazol ist ein Fungizid und

zeigt eine höhere Affinität zu Tubulin in Pilzen als zu Tubulin der Säugetiere (Kilmartin 1981). Durch Einsatz von Benomyl in *U. maydis* konnte die Bewegung der Tubuli des Endoplasmatischen Retikulums beinahe vollständig unterbunden werden (Wedlich-Söldner et al. 2002). Unter Beteiligung des Mikrotubuli-Zytoskeletts werden frühe Endosomen durch die gesamte Hyphe transportiert. Die Endosomen spielen eine Rolle während der Endozytose und können zum Transport von Molekülen dienen, die über die Plasmamembran von der Zelle aufgenommen worden sind oder zum Recycling von Membran-ständigen Rezeptoren verwendet werden (Jovic et al. 2010). Sie enthalten kleine Rab-GTPasen, welche dafür bekannt sind, Membrantransportprozesse in tierischen Zellen zu regulieren (Wandinger-Ness und Zerial 2014). Die frühen Endosomen enthalten unter anderem das für sie charakteristische Markerprotein Rab5a, welches weitere endosomale Komponenten zur Fusion mit anderen frühen Endosomen rekrutiert (Plemel et al. 2011). Der Transport der frühen Endosomen wird durch die Motorproteine Dynein (Dyn1/2) sowie dem Kinesin Kin3 entlang der Mikrotubuli ermöglicht. Dynein übernimmt dabei den Transport in Richtung der Minus-Enden der Mikrotubuli-Bündel (Karki und Holzbaur 1999), welcher besonders an der Zellspitze wichtig ist. Dort liegen die Mikrotubuli nur in unidirektionaler Richtung vor, und ohne Dynein könnten frühe Endosomen nicht mehr zurücktransportiert werden. Den Transport in Richtung der Plus-Enden auf unidirektionalen sowie antiparallel aufgebauten Mikrotubuli-Bündeln übernimmt Kin3. Für den Rücktransport von Dynein von den Minus-Enden ist das Kinesin Kin1 zuständig, welches sich wie Kin3 zu den Plus-Enden der Bündel bewegt (Vollmeister et al. 2012b). Die frühen Endosomen können im Laufe ihrer Lebenszeit zu späten Endosomen weiterreifen, wobei sie ihre Mobilität verlieren und durch Rab-Umwandlung andere Markerproteine wie Rab7 anreichern (Rink et al. 2005). Späte Endosomen können schlussendlich mit Lysosomen fusionieren, in denen proteolytische Degradierungen stattfinden können (Huotari und Helenius 2011).

Eine weitere wichtige Aufgabe der frühen Endosomen besteht im aktiven Langstreckentransport von mRNA in *U. maydis*. Dabei dienen die Endosomen als Plattformen zur Bewegung von mRNPs, die aus diversen RNA-Bindeproteinen, gebundenen mRNAs und zusätzlichen Faktoren bestehen (Vollmeister et al. 2012b). Zwei wichtige RNA-Bindeproteine in diesen Komplexen sind Rrm4 und Pab1 (Abbildung 4). Das Protein Rrm4 wird als eine Schlüsselkomponente des mRNA-Transports angesehen und zeigt Ähnlichkeiten zu den konservierten ELAV (*embryonic lethal abnormal vision*)-Proteinen. Rrm4 besitzt drei RNA-Bindedomänen am N-Terminus (*RNA recognition motifs*, RRM) sowie zwei konservierte MLLE-Domänen am C-Terminus. Die Domänenarchitektur des Poly(A)-bindenden

Proteins Pab1 ist sehr ähnlich und weist vier RRM-Domänen am N-Terminus und eine MLE-Domäne am C-Terminus auf. Beide Proteine besitzen somit die Fähigkeit, RNA zu binden und Protein-Protein-Interaktionen einzugehen (Becht et al. 2006). Der Verlust von Rrm4 führt zu morphologischen Defekten in Hyphen, während Sporidien keine Wachstumsdefekte aufweisen. Dabei zeigt eine erhöhte Anzahl an Hyphen ein bipolares Wachstum, bei dem die Etablierung einer Polaritätsachse fehlschlägt, sowie Probleme bei der Insertion von Septen. Durch die C-terminale Fusion von Gfp an Rrm4 konnte gezeigt werden, dass ein bidirektionaler Transport von Rrm4 in distinkten Partikeln entlang von Mikrotubuli durch die gesamte Hyphe stattfindet (König et al. 2009). Die RNA-Bindfähigkeit von Rrm4 konnte *in vivo* durch UV-Kreuzvernetzungsexperimente und eine darauffolgende Immunpräzipitation (*UV-crosslinking and immune precipitation*, CLIP) bestätigt werden. Zudem wurde gezeigt, dass Rrm4 mithilfe der dritten RRM-Domäne das Motiv (5')UAUG(3') bindet. Dieses Motiv konnte in Rrm4-Ziel-mRNAs häufig an Start-Codons und im offenen Leserahmen gefunden werden. In vielen Fällen interagierte Rrm4 jedoch auch mit Stopp-Codons der mRNAs. Dieses differentielle Bindeverhalten ließ vermuten, dass Rrm4 eine Rolle bei der Regulierung der Translation spielen könnte, eventuell in Zusammenarbeit mit weiteren RNA-Bindeproteinen wie Grp1 (Olgeiser et al. 2019). Die Mutation der ersten RRM-Domäne von Rrm4 führt zu einer starken Reduktion der mobilen Pab1-Partikel, während Rrm4 selbst weiterhin auf Endosomen transportiert wird. Auch die Deletion aller RRM-Domänen hatte keinen Einfluss auf die Bewegung von Rrm4. Die Mutation der C-terminalen MLE-Domäne dagegen führte zu einem vollständigen Verlust der endosomalen Lokalisierung von Rrm4 (Becht et al. 2006). Somit schien der Transport von Rrm4 auf dessen MLE-Domäne und einen entsprechenden Interakteur zurückführbar zu sein. Ein wichtiges Protein, welches mit der MLE-Domäne von Rrm4 interagieren kann, ist das PAM2-Protein Upa1, welches über seine Lipid-bindende FYVE-Domäne die Kopplung von Rrm4 an das frühe Endosom begünstigt (Pohlmann et al. 2015). Eine der durch CLIP identifizierten Rrm4-Ziel-mRNAs kodiert für das Septin Cdc3, eines von insgesamt vier Septinen (Cdc3, Cdc10, Cdc11, Cdc12), die in *U. maydis* kodiert sind (König et al. 2009). Diese Komponenten bilden heteromere Strukturen aus, die innerhalb der gesamten Zelle Filamentstrukturen sowie einen Konzentrationsgradienten am Zellpol bilden, und zudem auf frühen Endosomen transportiert werden. Die Deletion von *rrm4* führt zu einer drastischen Reduktion der Spitzenlokalisierung der Septine und zum Verlust mobiler Partikel (Baumann et al. 2014). Der aktive Transport der *cdc3*-mRNA konnte mithilfe von RNA-Echtzeit-Mikroskopie gezeigt werden, indem Gfp über das RNA-Bindeprotein λ N an die mRNA rekrutiert wurde. Zudem konnten ribosomale

Komponenten der großen (Rpl25) und kleinen Untereinheiten (Rps2, Rps3, Rps19) mit der Transportmaschinerie in Verbindung gebracht werden (Baumann et al. 2012; Baumann et al. 2014; Higuchi et al. 2014). Ein indirekter Nachweis transportierter mRNAs gelingt ebenfalls über eine C-terminale Fusion von Fluoreszenzproteinen an das Poly(A)-bindende Protein Pab1 (Baumann et al. 2012; Baumann et al. 2014). Pab1 weist eine stark konservierte, zu Rrm4 ähnliche Domänenstruktur auf und bindet an wahrscheinlich alle in der Zelle vorkommenden mRNAs (Hogan et al. 2008). Es besitzt vier durch flexible Abschnitte (*linker*) miteinander verbundene RNA-Bindedomänen (RRM) und eine C-terminale MLLE-Domäne, welche für Protein-Protein-Interaktionen eingesetzt wird (König et al. 2009). Pab1 kann somit gleichmäßig verteilt im Zytoplasma beobachtet werden, befindet sich aber ebenfalls auf durch die Zelle transportierten frühen Endosomen. Kollokalisationsstudien mit Rrm4 zeigten, dass beide Proteine in denselben Strukturen enthalten sind, was für eine Involvierung beider Proteine in den mRNA-Langstreckentransport spricht (Becht et al. 2006). Pab1 markiert dabei höchstwahrscheinlich durch Rrm4 gebundene Transkripte. Kommt es zum Verlust von Rrm4, zeigt sich innerhalb der Zelle ein Pab1-Gradient. Dieser Gradient nimmt vom Zellkern aus zu den Zellpolen hin ab und deutet auf Probleme bei der Verteilung von mRNAs hin.

1.3.2 PAM2-Proteine und die Interaktion mit der MLLE-Domäne

Das Poly(A)-bindende Protein spielt eine essentielle Rolle beim mRNA-Metabolismus einer Zelle und interagiert mit dem Anhang aus mehreren Adenin-Nukleotiden, welcher posttranskriptionell an mRNAs angefügt wird. Das Polyadenylierungssignal in der mRNA umfasst die Sequenz (5')AAUAAA(3'), welches zum Beispiel durch das multimere Protein CPSF (*cleavage and polyadenylation specificity factor*) erkannt wird (Jenny et al. 1996; Glisovic et al. 2008). Bereits während der Polyadenylierung des Transkripts erkennt und bindet das Poly(A)-bindende Protein mithilfe der RRM-Domänen den Poly(A)-Anhang. Dabei sind vor allem RRM1 und RRM2 spezifisch für die Bindung der Polyadenylierung verantwortlich (Gorgoni und Gray 2004). Durch diese Bindung ermöglicht Pab1 die Interaktion von der 7-Methylguanosin-Kappe (m⁷G) am 5'-Ende der mRNA mit dem sich am 3'-Ende befindenden Poly(A)-Anhang, was zu einem Ringschluss der mRNA führt. Dadurch kommt es aufgrund von Interaktion der Kappenstruktur mit dem Kappenbindekomplex (*cap binding complex*, CBC) und Translationsinitiationsfaktoren wie eIF4G und eIF4E zur Rekrutierung des Ribosoms (*closed loop model of translation*) (Tomek und Wollenhaupt 2012). Neben dieser Rolle bei der Steigerung der Translationseffizienz

trägt ein durch PABP gebundener Poly(A)-Anhang zur Stabilität der mRNA bei, und wird mit fortschreitendem Alter des mRNA-Moleküls immer weiter reduziert. Damit wird die Halbwertszeit der mRNA reguliert, bevor es zum Abbau des Moleküls durch das Exosom kommt (Geisberg et al. 2014). Bei den RNA-bindenden RRM-Domänen handelt es sich um eine Sequenz mit zwei konservierten Bereichen. RNP-2 besteht aus sechs Aminosäuren, welche ein hydrophobes Segment bilden, während RNP-1 ein Octapeptid darstellt. Beide enthalten aromatische Aminosäuren, welche für die primäre RNA-Bindung wichtig sind (Le et al. 1997). Neben der essentiellen Aufgabe der Bindung der Polyadenylierung mithilfe der RRM-Domänen übernimmt PABP auch wichtige Funktionen, die über die konservierte C-terminale MLLE-Domäne vermittelt werden. Diese Domäne umfasst circa 70 Aminosäuren und bildet fünf α -Helices aus. Der Name MLLE leitet sich von vier konservierten Aminosäuren in der Peptidbindestelle dieser Domäne ab, welche auch als PABC (*PABP c-terminal domain*) bekannt ist. Die MLLE-Domäne kann in allen eukaryotischen Reichen gefunden werden, wurde aber bislang nur in drei verschiedenen Proteinen entdeckt. Dazu zählen Poly(A)-Bindepoteine, die E3 Ubiquitin-Ligase UBR5 sowie Rrm4. Die MLLE-Domäne erkennt ein ebenfalls konserviertes Peptidmotiv mit einer Länge von 12-15 Aminosäuren, welches PAM2 (*PABP-interacting motif 2*) genannt wird. Auch dieses Motiv wurde in Proteinen aus diversen Organismen gefunden oder zumindest vorhergesagt, und befindet sich oft in unstrukturierten Proteinregionen (Kozlov et al. 2001; Albrecht und Lengauer 2004; Huang et al. 2013). Die Konsensussequenz des PAM2-Motivs ist xxLNxxAxEE \underline{x} P, und die beiden hydrophoben Aminosäuren Leuzin und Phenylalanin stellen die für die Interaktion mit MLLE wichtigsten Komponenten der Sequenz dar. Das Ersetzen dieser beiden Aminosäuren durch Alanine reduziert die Affinität der MLLE-Interaktion um über das Tausendfache (Kozlov et al. 2004). PAM2-Motive interagieren über Leuzin und Tryptophan hauptsächlich mit zwei hydrophoben Taschen in der MLLE-Domäne, welche durch die Helices α 2 und α 5 gebildet werden. Dabei legt sich das Peptid um die mittlere Helix α 3 (Xie et al. 2014). Es wird angenommen, dass PAM2-Proteine untereinander um die Bindestellen in Proteinen mit MLLE-Domäne konkurrieren. Im Falle vom Poly(A)-Bindepotein könnte über die Länge des Poly(A)-Anhangs einer mRNA die Anzahl der PABP-Moleküle variiert werden, wodurch eine Rekrutierung verschiedener PAM2-Proteine reguliert werden könnte. Zudem gibt es Hinweise auf eine Regulierung der MLLE/PAM2-Interaktion durch Modifizierungen an PABP oder in der Nähe von PAM2-Motiven, wodurch eine feinere Regulation der Interaktion, abhängig vom Zelltyp oder von physiologischen Bedingungen, erfolgen könnte (Brook et al. 2012; Huang et al. 2013; Xie et al. 2014).

Viele der PAM2-Proteine können mit Poly(A)-bindenden Proteinen interagieren, wie beispielsweise das Protein Ataxin-2 (ATXN2), welches unter anderem in *Homo sapiens* vorkommt und beispielsweise mit der neurodegenerativen Krankheit Spinocerebelläre Ataxie des Typs 2 korreliert wird (Wang et al. 2014; Bakthavachalu et al. 2018). Ein in diesem Fall erweiterter Polyglutamin-Bereich stört die normale Morphologie des Golgi-Komplexes und führt zu einem häufiger auftretenden Zelltod (Huynh et al. 2003). Obwohl die genaue Funktion von ATXN2 bislang nicht bekannt ist, wird eine Beteiligung am zytoplasmatischen RNA-Metabolismus als besonders wahrscheinlich erachtet (Ciosk et al. 2004). ATXN2 besitzt neben einem PAM2-Motiv zur Interaktion mit PABP zwei weitere interessante Domänen (Lsm, *like-Sm*; und LsmAD, *Lsm associated motif*), von denen mindestens die Lsm-Domäne zur RNA-Bindung dient. Die Lsm-Domäne ist bekannt aus RNA-Bindeproteinen, welche eine Rolle beim Spleißen der Prä-mRNA sowie beim mRNA-Abbau spielen (He & Parker, 2000; Albrecht et al., 2004). Bei der Translationskontrolle in Säugetieren durch PABP spielen die beiden PAM2-Proteine Paip1 und Paip2 eine Rolle bei der Regulation. Paip1 (*PABP interacting protein 1*) bewirkt eine Steigerung der Translation. Dazu interagiert es mit dem C-Terminus von PABP über das PAM2-Motiv, während ein PAM1-Motiv die Interaktion mit den Domänen RRM1 und RRM2 vermittelt. Das sehr ähnliche Paip2 (*PABP interacting protein 2*) reprimiert die Translationsinitiierung vermutlich durch eine Verringerung der PABP-Bindeaffinität zum Poly(A)-Anhang (Khaleghpour et al. 2001; Karim et al. 2006). Dazu interagiert es ebenfalls über PAM2 mit dem C-Terminus, jedoch über PAM1 mit den PABP-Domänen RRM2 und RRM3. Die daraus resultierende Konkurrenz der beiden Proteine Paip1 und Paip2 wird dabei über Ubiquitinierung reguliert (Watts et al. 2014).

Ein weiteres interessantes Beispiel für Regulation durch kompetitive Interaktion mit der MLLE-Domäne findet sich bei der zum Abbau von mRNA wichtigen Deadenylierung, welche durch die zytoplasmatischen Proteinkomplexe Pan2-Pan3 sowie Caf1-Ccr4 vermittelt wird. Vorher kommt es zunächst zur Erkennung der MLLE-Domäne durch den Faktor eRF3 (*eukaryotic release factor*) aus dem Translationsterminationskomplex eRF1-eRF3. Vermutlich wird durch die Interaktion von eRF3 mit PABP die Bindestelle der MLLE-Domäne derart freigelegt, dass die Komponenten der Deadenylierungsmaschinerie mit ihr in Kontakt treten können. Durch diese Interaktion mit PABP und der daraus resultierenden Nähe zum Poly(A)-Anhang wird die katalytische Aktivität der Deadenylase-Komplexe gesteigert, es kommt zum Abbau der Polyadenylierung (Funakoshi et al. 2007; Osawa et al. 2012).

Die hier beschriebenen Beispiele zeigen auf, dass das PAM2-Motiv eine wichtige Rolle für die Interaktion mit PABP sowie für dessen Regulation übernimmt. Auch in Zellen

des in dieser Arbeit untersuchten Modellorganismus *U. maydis* sind PAM2-Motiv-tragende Proteine eine wichtige Komponente des mRNA-Transports (Abbildung 4). So wurden durch bioinformatische Analysen 14 potentielle PAM2-Motiv-tragende Proteine (Abbildung 5) im Genom von *U. maydis* vorhergesagt (Thomas Pohlmann 2013). Eines dieser Proteine ist Upa1 (*Ustilago PAM2 protein 1*), welches ein der Konsensussequenz entsprechendes PAM2-Motiv an seinem N-Terminus (Aminosäure-Positionen 127-142) besitzt. Zudem enthält Upa1 Ankyrin-Wiederholungen und eine C-terminale RING-Domäne, welche zur Protein-Protein-Interaktion dienen könnten, sowie eine FYVE-Domäne zur Interaktion mit Endosomen-spezifischen Phosphatidyl-3-Phosphaten (PI3P) (Pohlmann et al. 2015). Die Deletion von *upa1* führt, ähnlich wie der Verlust von *rrm4*, zu einer gesteigerten Bipolaritätsrate und Defekten bei der Septenbildung in Hyphen. Zudem kommt es zu einer Reduktion der Sekretion von Cts1, einer sekretierten Endochitinase. Diese wird auf unkonventionellem Wege in die Teilungszone zwischen einer Mutter- und einer Tochterzelle sekretiert, indem sie das Endoplasmatische Retikulum sowie den Golgi-Apparat umgeht (Aschenbroich et al. 2018). Mithilfe von Hefe-Zwei-Hybrid-Analysen wurde nachgewiesen, dass das PAM2-Motiv in Upa1 funktionell ist und eine Interaktion mit der MLLE-Domäne von Pab1 vermittelt. Interessanterweise zeigte die Arbeit von Pohlmann et al. (2015), dass Upa1 zudem mit Rrm4 interagieren konnte, diese Interaktion aber nicht vom PAM2-Motiv ermöglicht wurde. Für die spezifische Interaktion mit Rrm4 besitzt Upa1 zwei PAM2L-Sequenzen (PAM2-like), welche sich in ihrer Sequenz von PAM2-Motiven nur geringfügig unterscheiden. Während das generische PAM2-Motiv die Sequenz EFXP enthält, weist das PAM2L-Motiv die Sequenz EFxxP auf, wobei x eine beliebige Aminosäure darstellt. Die jeweilige Spezifität dieser beiden Motive wurde mithilfe von Hefe-Zwei-Hybrid-Analysen sowie GST-Pulldown-Verfahren (Glutathion-S-Transferase-Pulldown) bestätigt. Eine C-terminal mit Gfp fusionierte Upa1-Variante konnte wie Rrm4-Gfp in distinkten Partikeln beobachtet werden, welche durch die gesamte Zelle transportiert werden. Trotz der erwiesenen Funktionalität des PAM2-Motivs zeigte sich durch Expression der PAM2-mutierten Variante Upa1^{mP}-Gfp, dass der Verlust dieses Motivs keinen negativen Einfluss auf die Zellmorphologie und die Sekretion der Chitinase Cts1 hat. Im Gegensatz dazu führt die Mutation beider PAM2L-Motive in Upa1 zu einem Verlust der Proteinfunktion: Sowohl die Anzahl bipolar auswachsender Hyphen sowie die Defekte bei der Cts1-Sekretion entsprechen einer *upa1*-Deletionsmutante. Somit scheint die Upa1-vermittelte Interaktion mit der MLLE-Domäne von Rrm4 wichtiger für endosomalen mRNA-Transport zu sein als die Interaktion mit dem Poly(A)-Bindepotein Pab1. Zudem führt auch der Verlust der

Lipid-bindenden FYVE-Domäne zu einem Deletionsphänotyp, weil Upa1 nicht mehr seine natürliche subzelluläre Lokalisierung erreichen kann. Fehlt Upa1, kann zudem eine drastische Veränderung des Rrm4-Transports beobachtet werden: Rrm4 wird hierbei seltener prozessiv transportiert, und zeigt häufig nur eine eingeschränkte Bewegung über kurze Distanzen (*corralled movement*). Interessanterweise werden Rab5a-positive Endosomen selbst nicht durch die *upa1*-Deletion in ihrer Bewegung durch die Hyphe eingeschränkt. Somit hat das Fehlen von mRNPs auf Rab5a-positiven Endosomen keinen Einfluss auf deren generellen Transport durch die Hyphe. Aufgrund dieser Erkenntnisse wird angenommen, dass Rrm4 in diesem genetischen Hintergrund durch das Fehlen von Upa1 nur ineffizient an die endosomale Oberfläche rekrutiert werden kann. Stattdessen wird Rrm4 oft nur transient gebunden und dissoziiert somit schneller von frühen Endosomen als in Wildtypzellen. Durch eine fehlerhafte Rekrutierung von Rrm4 an Transportendosomen kommt es ebenfalls zu einem Einfluss auf die Ladung von mRNAs. In Abwesenheit von Upa1 können aufgrund der Fehllokalisierung von Rrm4 weniger mRNAs transportiert und somit weniger prozessive Pab1-Partikel beobachtet werden. Damit einhergehend werden im *upa1*-Deletionshintergrund geringere Mengen der ribosomalen Proteine Rps2, Rps19 und Rpl25 ko-transportiert (Pohlmann et al. 2015). Ein weiteres, initial charakterisiertes Protein ist Upa2, welches interessanterweise vier PAM2-Motive enthält (Thomas Pohlmann 2013). Alle bisher in der Literatur beschriebenen PAM2-Proteine wie beispielsweise Ataxin-2 oder Tob1 aus dem Menschen enthalten nur ein bis maximal zwei dieser Motive (Albrecht und Lengauer 2004). Somit stellte Upa2 von Anfang an ein besonderes Protein dar, dessen Verlust zu einem Filamentbildungsdefekt führt. Vergleichbar zu Upa1 kann auch Upa2 mithilfe einer C-terminalen Gfp-Fusion in distinkten, beweglichen Partikeln in der gesamten Zelle beobachtet werden. In einer vorangegangenen Arbeit konnte bereits gezeigt werden, dass die PAM2-Motive in Upa2 funktional sind und mit der MLLE-Domäne von Pab1 interagieren können. Eine Interaktion mit Rrm4 konnte, im Gegensatz zu Upa1, nicht nachgewiesen werden. Außerdem zeigte sich, dass Upa2 in Abhängigkeit von Mikrotubuli mit Rrm4 ko-transportiert wird. Dies geschieht unabhängig von der Präsenz der PAM2-Motive, da eine N-terminale Verkürzung des Proteins, welche keine PAM2-Motive mehr enthält, auf frühen Endosomen beobachtet werden kann. Der Verlust von Upa2 führt zu Problemen beim mRNA-Langstreckentransport, was durch eine drastische Reduktion der transportierten Pab1-Signale deutlich wurde.

Die hier beschriebenen Funktionen des PAM2-Proteins Upa1 und die initiale Charakterisierung von Upa2 in *U. maydis* zeigen auf, dass PAM2-Proteine eine

wichtige Rolle beim Transport sowie bei der Assemblierung funktioneller mRNPs und deren Regulation innehaben.

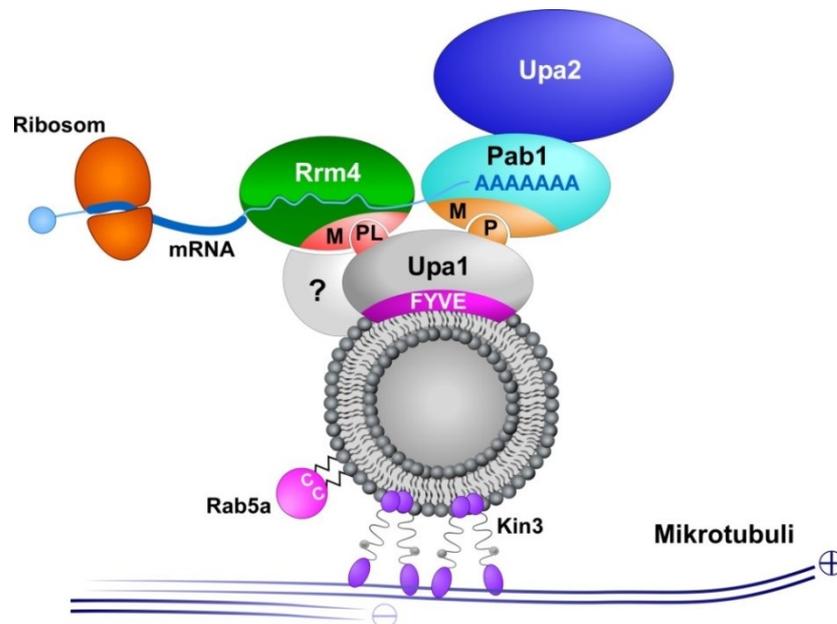


Abbildung 4: Zu Beginn der vorliegenden Arbeit postuliertes Modell des Endosomen-gekoppelten mRNA-Transports in *U. maydis*. Über mit Membranbestandteilen interagierenden Adapterproteinen wie Upa1 wird der Komplex aus mRNA, RNA-Bindeproteinen und weiteren Faktoren an frühe Endosomen gekoppelt, die den Transport mithilfe von Motorproteinen vermitteln. Bislang unbekannte Faktoren werden durch das Fragezeichen schematisiert.

1.4 Zielsetzung dieser Arbeit

In vorangegangenen Studien konnte gezeigt werden, dass der Aufbau von Rrm4-abhängigen mRNPs und deren Transport entlang der Mikrotubuli stark mit Faktoren zusammenhängt, die ein oder mehrere PAM2-Motive enthalten. Zwar erwies sich das PAM2-Motiv in Upa1 als nicht funktionell wichtig, jedoch gab es noch weitere PAM2-Motiv-tragende Kandidaten, deren Einfluss auf den endosomalen mRNA-Transport bisher nicht untersucht worden ist. Daher sollte zum einen untersucht werden, ob weitere der insgesamt 14 in *U. maydis* vorhergesagten Kandidaten in einem Zusammenhang mit mRNA-Transport stehen könnten. Außerdem sollten weiterführende Untersuchungen zum Protein Upa2 unternommen werden. In der Vorgängerstudie wurde bereits deutlich, dass Upa2 eine wichtige Rolle beim mRNA-Langstreckentransport übernimmt. Jedoch waren funktionell wichtige Regionen nicht weiter definiert worden. In der vorliegenden Arbeit sollten somit die Aufgaben von Upa2 und dessen Einfluss auf die Zusammenstellung von mRNPs genauer erfasst werden.

2 Ergebnisse

2.1 Untersuchung weiterer potentieller PAM2-Proteine

Zur Identifikation neuer endosomaler Komponenten, die am Mikrotubuli-abhängigen mRNA-Transport in *U. maydis* beteiligt sind, wurden bereits in einer vorangegangenen Arbeit bioinformatische Analysen des Genoms vorgenommen (Thomas Pohlmann 2013). Dabei wurde ein besonderes Augenmerk auf PAM2-tragende Proteine gelegt, um mögliche neue Interaktionspartner der beiden Proteine Rrm4 und Pab1 zu finden. Insgesamt wurden 14 potentielle PAM2-tragende Proteine vorhergesagt (Tabelle 2.1; Abbildung 5). Vier dieser Proteine (Upa1, Upa2, Upa3 und Upa5) wurden im Rahmen dieser vorangegangenen Arbeit bereits charakterisiert. Um sicherzustellen, dass keine möglichen neuen endosomalen Komponenten vernachlässigt werden, wurden in der vorliegenden Arbeit alle bisher nicht überprüften potentiellen PAM2-Proteine untersucht. Zunächst wurden mithilfe bioinformatischer Werkzeuge erneute Homologiestudien durchgeführt. Homologe Proteine zu Upa4 konnten nicht gefunden werden. Ein aus *D. melanogaster* bekanntes Ortholog zu Upa6 ist das Protein THOC7, welches mit weiteren Komponenten unter Hitzestress den THO-Komplex aufbaut und für den Export von Hitzeschock-mRNAs zuständig ist (Rehwinkel et al. 2004). Upa7 zeigt Homologien zu dem Protein CID7 aus *Arabidopsis thaliana*, welches ein PABP-interagierendes Protein ist (Bravo et al. 2005). Ein Ortholog zu Upa9 ist das peroxisomale Protein Pex3p in *S. cerevisiae*, und im selben Organismus findet sich der mRNA-Exportfaktor Sac3p als Homolog zu Upa10 (Fischer et al. 2002; Matsuzaki und Fujiki 2008). Als Ortholog zu Upa13 konnte Pan3 in *S. cerevisiae* und *H. sapiens* identifiziert werden, welches im Deadenylierungskomplex Pan2-Pan3 agiert (Wahle und Winkler 2013). Einige der gefundenen Orthologe erfüllen also Funktionen, welche für PAM2-Motiv-tragende Proteine typisch sind. Zu den aufgeführten Proteinen wurden über homologe Rekombination Deletionsmutanten hergestellt, welche mikroskopisch untersucht und phänotypisch charakterisiert und quantifiziert wurden (Abbildung 6). Die Herstellung der Deletionen von *upa8* und *upa14* waren nicht erfolgreich, ebenso wie die Deletionen der Gene *upa11* und *upa12*. Für die übrigen zu untersuchenden Kandidaten wurden erfolgreich Deletionsmutanten generiert. Zur mikroskopischen Analyse wurden Kulturen verwendet, bei denen das filamentöse Wachstum durch einen Wechsel der Stickstoffquelle induziert wurde (Brachmann et al. 2001).

Tabelle 2.1: Vorhergesagte PAM2-Proteine in *U. maydis*.

Die in dieser Tabelle aufgelisteten Proteine wurden von Thomas Pohlmann in Kooperation mit Mario Albrecht vorhergesagt (Thomas Pohlmann 2013). NV: Nicht vorhersagbar. S.c.: *Saccharomyces cerevisiae*. H.s.: *Homo sapiens*. D.m.: *Drosophila melanogaster*. A.t.: *Arabidopsis thaliana*. A.o.: *Aspergillus oryzae*.

* UMAG-Nummer; Genom-Zugriffsnummer (<https://fungi.ensembl.org/index.html>)

Protein	UMAG*	Ortholog	Anzahl PAM2-Motive
Upa1	12183	Pib1p (S.c.)	1
Upa2	10350	NV	4
Upa3	02637	Ataxin-2 (H.s.)	1
Upa4	03521	NV	1
Upa5	00427	NV	1
Upa6	00859	THOC7 (D.m.)	1
Upa7	04609	CID7 (A.t.)	1
Upa8	05695	Sup35 (S.c.); eRF3 (H.s.)	1
Upa9	06200	Pex3p (S.c.)	1
Upa10	03505	Sac3p (S.c.)	1
Upa11	01657	NV	1
Upa12	00883	KCS1 (A.o.)	2
Upa13	02501	Pan3 (H.s.)	1
Upa14	05540	Not1p (S.c.)	1

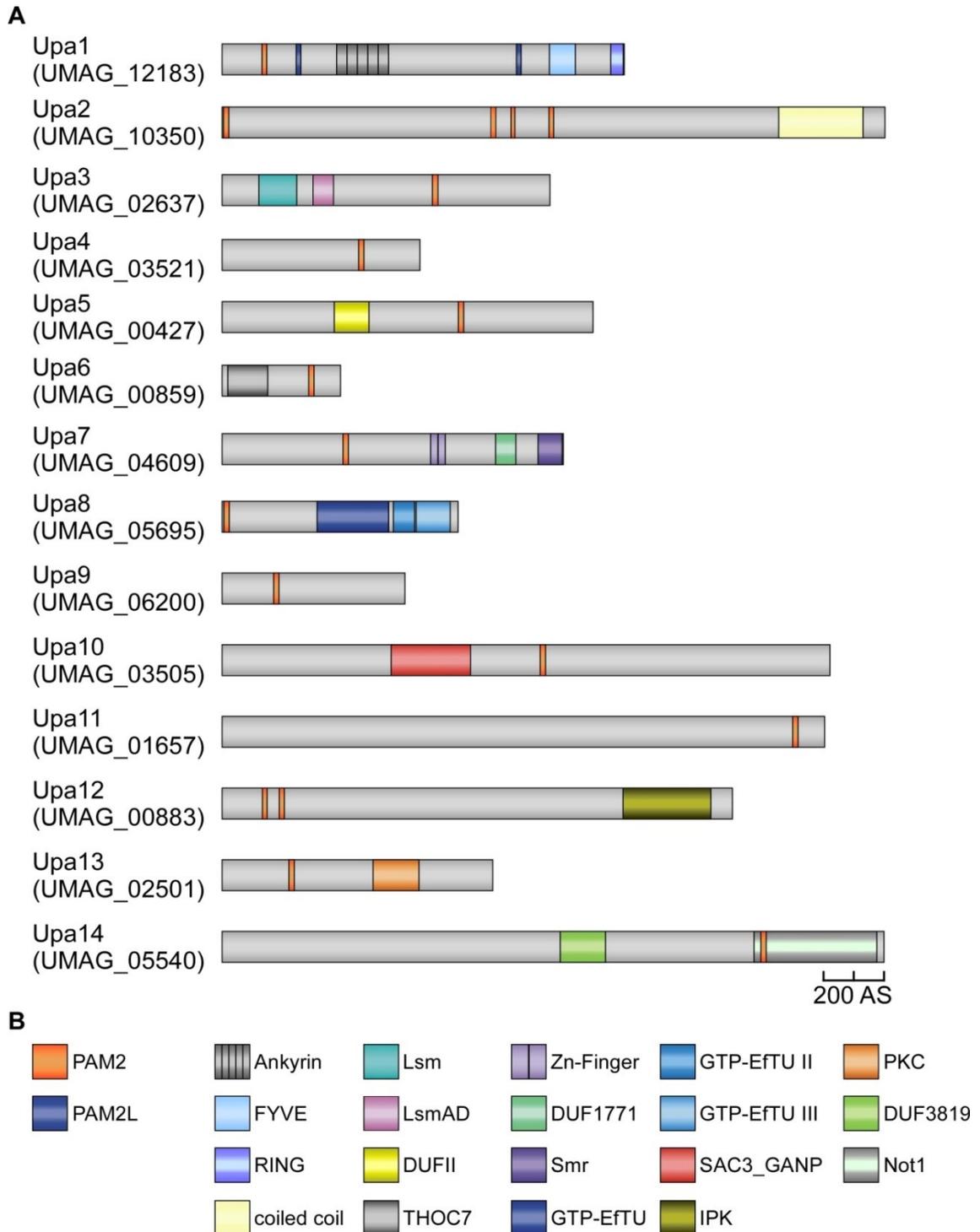


Abbildung 5: *U. maydis* kodiert für 14 potentielle PAM2-Motiv-tragende Proteine. **A** Schematische Darstellung der bereits zuvor identifizierten PAM2-Proteine. Größenangabe 200 Aminosäuren (AS). Mithilfe der UMAG-Nummern können die Proteine in einer Datenbank gefunden werden (<http://bioinformatik.wzw.tum.de/index.php?id=63>). **B** Legende zu den in den potentiellen PAM2-Proteinen identifizierten Domänen. Die Abbildung ist modifiziert aus (Thomas Pohlmann 2013).

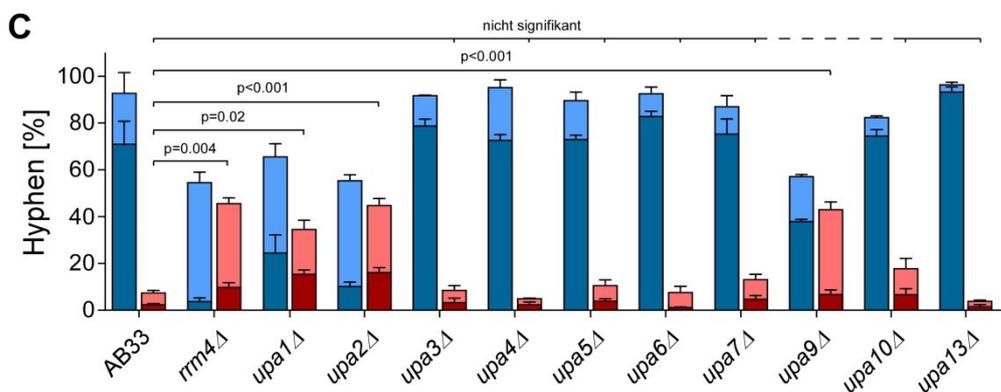
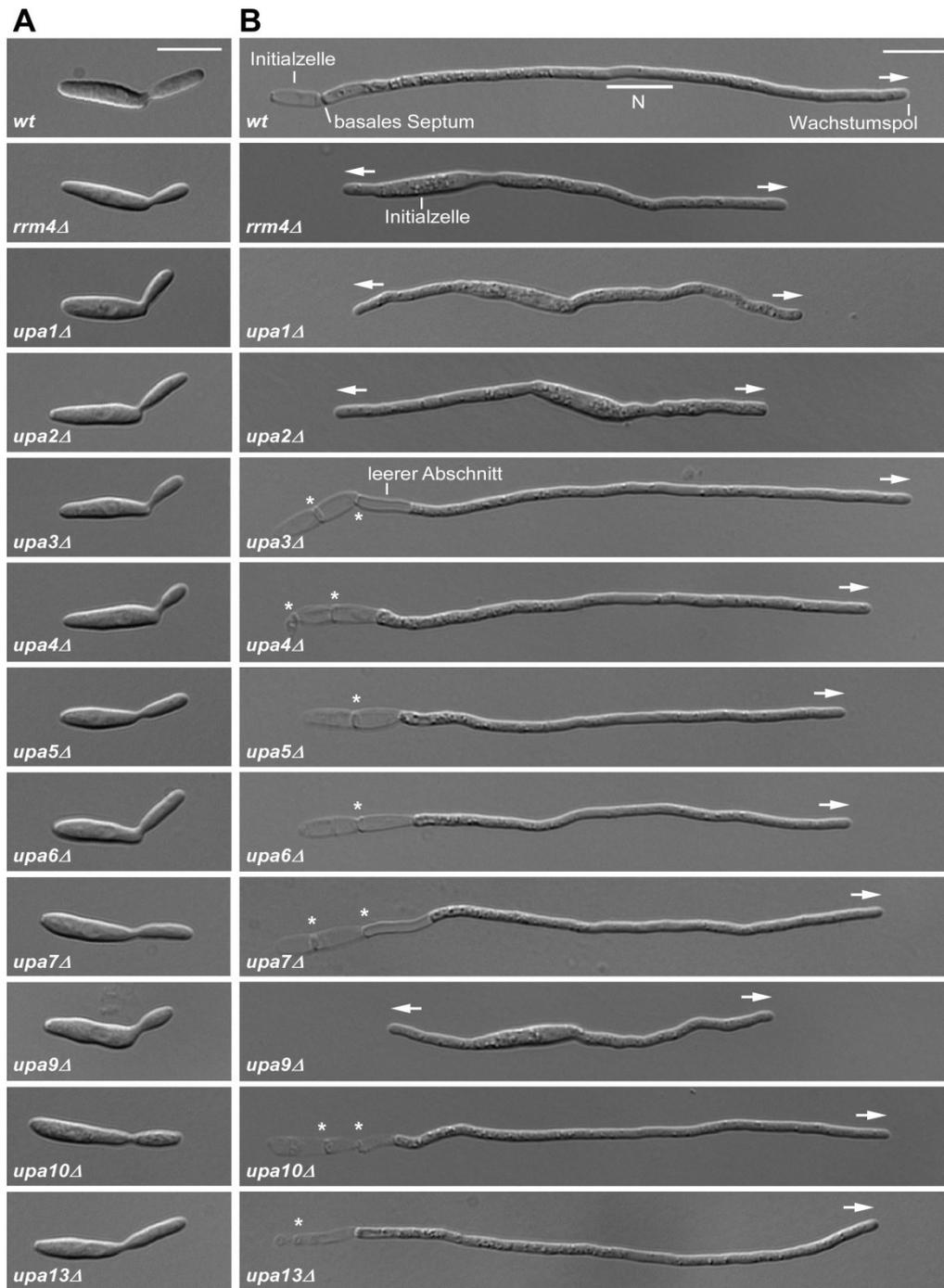


Abbildung 6: Nur die Deletion des potentiellen PAM2-Proteins Upa9 führt zu deutlichen Defekten der Zellmorphologie. A B Mikroskopische Aufnahmen von Sporidien (A) und

Hyphen nach mindestens 6 Stunden des filamentösen Wachstums (**B**) der in dieser Arbeit hergestellten Deletionsmutanten *upa4* bis *upa13*. Die Stämme AB33*upa1* Δ , AB33*upa2* Δ , AB33*upa3* Δ und AB33*upa5* Δ wurden während vorangegangener Arbeiten hergestellt (Thomas Pohlmann 2013) und dienten als Kontrollstämmen. Größenstandard in **A** und **B** 10 μ m. **C** Balkendiagramm zur Darstellung der prozentualen Anteile von unipolar und bipolar wachsenden Zellen nach mindestens 6 Stunden des filamentösen Wachstums, unter Berücksichtigung der Septenbildung in Kulturen der Stämme AB33 (*wt*), AB33*rrm4* Δ (*rrm4* Δ), AB33*upa1* Δ (*upa1* Δ), AB33*upa2* Δ (*upa2* Δ), AB33*upa3* Δ (*upa3* Δ), AB33*upa4* Δ (*upa4* Δ), AB33*upa5* Δ (*upa5* Δ), AB33*upa6* Δ (*upa6* Δ), AB33*upa7* Δ (*upa7* Δ), AB33*upa9* Δ (*upa9* Δ), AB33*upa10* Δ (*upa10* Δ) und AB33*upa13* Δ (*upa13* Δ). Die Daten stammen aus drei unabhängigen Experimenten. Pro Experiment und Stamm wurden mindestens 100 Hyphen ausgewertet. Zur statistischen Analyse wurden die Bipolaritätsraten aller Stämme mit der Bipolaritätsrate des Stamms AB33 verglichen. Ungepaarter zweiseitiger t-Test, Signifikanzniveau $p = 0,05$.

In der mikroskopischen Analyse von Sporidien und induzierten Filamenten der Deletionsmutanten diente der Laborstamm AB33, welcher als Ausgangsstamm für die hergestellten Deletionsstämmen verwendet wurde, als Kontrollstamm (Abbildung 6, **A** und **B**). AB33 wies nach mindestens 6 Stunden filamentösen Wachstums zu insgesamt 93,3% unipolar wachsende Zellen auf. 77,6 % der Hyphen wuchsen unipolar und waren fähig, Septen einzuziehen (Abbildung 6, **C**). Somit sind im Wildtyp die meisten Zellen zu einem effizienten Hyphenwachstum in der Lage. Die Deletionen der Gene *upa1* und *upa2* führte zu einem verstärkt bipolaren Phänotyp, vergleichbar zum Verlust von *rrm4*, welcher eine durchschnittliche Bipolaritätsrate von 44,0 % aufwies. 35,0 % der *rrm4*-defizienten Zellen wuchsen dabei bipolar aus, ohne Septen zu bilden. Der Verlust von *upa1* führte zu 64,1 % und der Verlust von *upa2* zu 55,4 % unipolaren Zellen. In AB33*upa1* Δ bildeten dabei nur 21,4 % der untersuchten Hyphen bei unipolarem Wachstum Septen aus (Abbildung 6, **C**). Dagegen zeigte sich ein erhöhter Anteil an bipolaren Zellen von 35,9 % ohne und 15,6 % mit Septenentwicklung. Die Deletion von *upa2* verursachte einen Bipolarenanteil von 44,6 %. In diesem Stamm wuchsen 16,2 % aller Zellen bipolar und zogen Septen ein. Der Verlust von *upa3* dagegen bewirkte keine derartigen morphologischen Defekte, wie bereits in der vorangegangenen Studie von Pohlmann (2013) erfasst worden ist. Die Hyphen des entsprechenden Stammes etablierten insgesamt zu 91,2 % unipolares Wachstum und zogen zu 78,4 % Septen ein. Ähnliche Werte ergaben sich für den Stamm AB33*upa4* Δ , welcher insgesamt zu 95,1 % unipolar auswuchs und zu 72,6 % Septen ausbildete. Ebenfalls vergleichbar zu AB33*upa3* Δ verhielt sich der Stamm AB33*upa6* Δ , der 93,4 % unipolar wachsende Hyphen aufwies, wobei 82,9 % Septen zur Zellseparierung einzogen. Die Deletion des CID7-Orthologs *upa7* führte zu insgesamt 12,6 % bipolaren

Zellen, wobei 8,0 % der Zellen bipolar wuchsen und keine Septen etablieren konnten (Abbildung 6, **C**). Interessanterweise bewirkte der Verlust von Upa9, dem Homolog zu Pex3p aus *S. cerevisiae*, einen zur *rrm4*-Deletion vergleichbaren morphologischen Defekt: Die Quantifizierungen ergaben einen Bipolarenanteil von durchschnittlich 41,8 %. Von den quantifizierten Hyphen wiesen 33,9 % bipolares Wachstum ohne Septenbildung auf. Auch die Deletion von *upa10* erhöhte den Anteil bipolarer Zellen im Vergleich zum Wildtyp auf 17,9 %. Von diesen Hyphen konnten 7,2 % trotz bipolarer Morphologie Septen etablieren. Die Auswirkung der *upa10*-Deletion war jedoch deutlich geringer als die Auswirkungen der Deletionen von *rrm4* sowie *upa1*, sodass eine weitere Analyse von Upa10 nicht erfolgte. In Kulturen des Stamms AB33upa13 Δ wurden zu 95,9 % unipolar wachsende Zellen quantifiziert, und 92,5 % der Hyphen waren zur Septenbildung in der Lage (Abbildung 6, **C**).

Anhand der geschilderten morphologischen Untersuchungen wurde deutlich, dass neben den Stämmen AB33upa1 Δ und AB33upa2 Δ nur noch der Stamm AB33upa9 Δ einen auffälligen Phänotyp aufwies, welcher der *rrm4*-Deletion ähnelte: Auch der Verlust von *upa9* führte zu einem deutlichen Anstieg bipolar auswachsender Zellen im Vergleich zu AB33 auf 41,8 %. Alle anderen hier untersuchten Deletionen führten zu keinem oder zu einem nur milden Phänotyp mit unter 20 % Bipolarenanteil, welcher keinen eindeutigen Hinweis auf eine Beteiligung am endosomalen mRNA-Transport lieferte. Daher beschränkten sich die weiteren Untersuchungen auf das bis dahin nicht charakterisierte Protein Upa9 und das geringfügig untersuchte Protein Upa2.

2.2 Weiterführende Untersuchung des Proteins Upa9

2.2.1 Upa9 wird gelegentlich aktiv transportiert

Um das Protein Upa9 (UMAG_06200), dessen Verlust zu einem Anstieg der Bipolaritätsrate auf 41,8 % führt, näher zu untersuchen, wurden zunächst bioinformatische Analysen durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass Upa9 starke Homologien zu peroxisomalen Proteinen aufwies. Das Ortholog zu Upa9 aus *S. cerevisiae* ist Pex3p (SGD:S000002737), ein peroxisomales integrales Membranprotein, welches in die peroxisomale Membranbiogenese involviert ist (Sato et al. 2008). In einer Studie von Matsuzaki und Fujiki (2008) wurde für Pex3p gezeigt, dass eine C-terminale Fusion die Funktionalität des Proteins nicht negativ beeinflusst. Deshalb wurde auch in der vorliegenden Arbeit davon ausgegangen, dass C-terminale Fusionen von Fluoreszenzproteinen an Upa9 wahrscheinlich funktionell sind. Eine lichtmikroskopische Analyse des Stammes AB33Upa9-mCherry zeigte hauptsächlich unipolar wachsende Zellen, was die Annahme der Funktionalität unterstützte (Abbildung 7, DIC-Aufnahme, oberes Paneel). Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen zeigten, dass Upa9-mCherry gleichmäßig in der gesamten Hyphe in distinkten Partikeln verteilt vorliegt (Abbildung 7, mittiges Paneel). Interessanterweise konnten gelegentlich Bewegungen dieser Partikel beobachtet werden, welche bei Darstellung in Kymographen an den endosomalen mRNA-Transport erinnerten (Abbildung 7, unteres Paneel). Jedoch zeigte sich nicht in allen untersuchten Hyphen ein vergleichbares Bewegungsmuster: Während in einigen Zellen mehrere bewegliche Upa9-mCherry-Signale nachgewiesen werden konnten, zeigten andere Zellen nur ein oder zwei sich bewegendes Signale. Auch ein völliges Fehlen eines Upa9-mCherry-Transports konnte beobachtet werden.

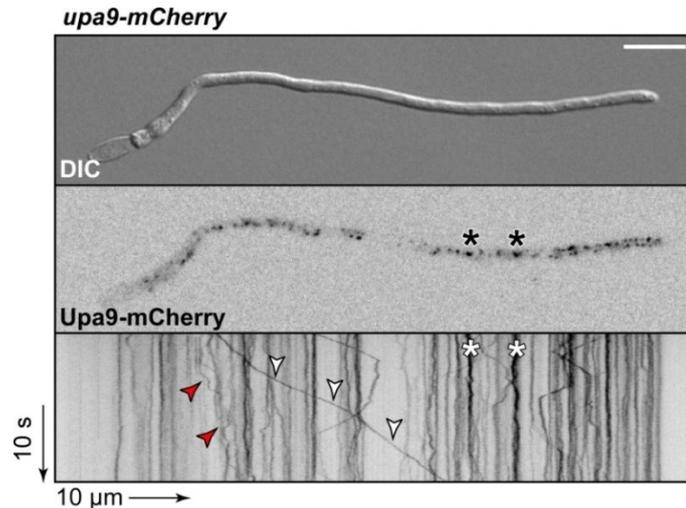


Abbildung 7: Upa9-mCherry liegt vor allem in statischen Partikeln vor, wird jedoch fallweise aktiv transportiert. Oberes Paneel: DIC-Aufnahme einer Upa9-mCherry-exprimierenden Hyphe. Mittleres Paneel: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme derselben Upa9-mCherry-exprimierenden Hyphe. Upa9-mCherry liegt hauptsächlich über die gesamte Hyphe verteilt in statischen Akkumulationen vor (schwarze Sterne). Unterer Paneel: Der Kymograph zeigt die Bewegung von Upa9-mCherry in derselben Hyphe. Vereinzelt zeigt Upa9-mCherry eine oszillierende (rote Pfeile) oder gerichtete Bewegung durch die Zelle (weiße Pfeile), wobei die Strecke unterschiedlich lang sein kann. Bewegliche Partikel werden meist nicht dauerhaft transportiert, sondern bleiben nach einer gewissen Transportdistanz wieder stationär. Stationäre Partikel sind im Kymographen mit weißen Sternen markiert. Größenstandard 10 µm.

2.2.2 Upa9 kolokalisiert mit dem Peroxisomenmarker Gfp-SKL sowie mit Komponenten des endosomalen mRNA-Transports

In AB33 wurde Upa9-mCherry größtenteils nicht aktiv transportiert und lag in zytoplasmatisch lokalisierten Akkumulationen vor, jedoch wurden vereinzelt bewegliche Partikel beobachtet. Dabei unterschied sich nicht nur die zurückgelegte Distanz der transportierten Partikel teilweise gravierend, auch deren Anzahl pro Hyphe unterlag gewissen Schwankungen. Während in manchen Hyphen kein Upa9-Transport nachzuweisen war, zeigten sich in anderen Hyphen mehrere mobile Signale gleichzeitig. Um zu überprüfen, dass Upa9 tatsächlich das Homolog zum peroxisomalen PEX3p aus *S. cerevisiae* darstellt, wurde zum einen das Fluoreszenzprotein Gfp im Stammhintergrund AB33Upa9-mCherry als Fusion mit dem Tripeptid SKL exprimiert (Abbildung 8). SKL fungiert hierbei als peroxisomales Signalpeptid (PTS1, *peroxisomal targeting sequence 1*), sorgt also für eine Lokalisierung von Gfp an Peroxisomen und ermöglicht Kolokalisationsstudien (Brown

und Baker 2003; Brocard und Hartig 2006). Zur Überprüfung einer etwaigen Involvierung endosomaler Komponenten wurden zum anderen Kolokalisationsstämme hergestellt, in denen Upa9 und das endosomale Schlüsselprotein Rrm4 gleichzeitig untersucht werden konnten (Abbildung 9).

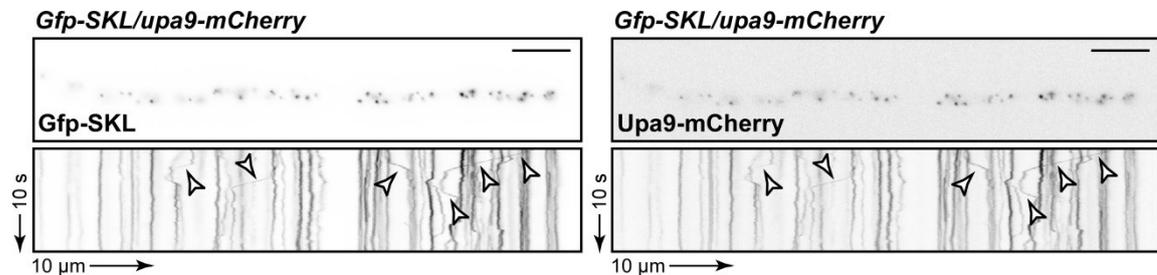


Abbildung 8: Upa9-mCherry und der Peroxisomenmarker Gfp-SKL kolokalisieren.

Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen und dazugehörige Kymographen einer Hyphe des Stamms AB33Gfp-SKL/Upa9-mCherry. Die Aufnahmen sowie Kymographen wurden durch simultane Zweifarbaufnahmen erstellt, um eine Kolokalisierung von GFP-SKL und Upa9-mCherry nachzuweisen. Weiße Pfeile zeigen eine Kolokalisierung an. Die fallweise Bewegung von Upa9-mCherry konnte mit einem Transport des Peroxisomenmarkers Gfp-SKL korreliert werden. Größenstandard 10 µm.

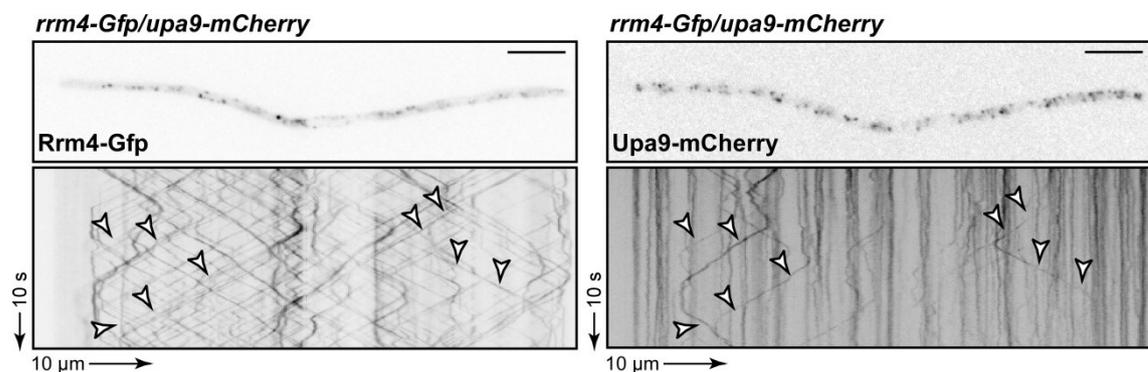


Abbildung 9: Upa9-mCherry und das endosomale RNA-Bindeprotein Rrm4 kolokalisieren.

Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen und dazugehörige Kymographen einer Hyphe des Stamms AB33Rrm4-Gfp/Upa9-mCherry. Die Aufnahmen sowie Kymographen wurden durch simultane Zweifarbaufnahmen erstellt, um eine Kolokalisierung von Rrm4-Gfp und Upa9-mCherry nachzuweisen. Weiße Pfeile zeigen eine Kolokalisierung an. Die fallweise Bewegung von Upa9-mCherry konnte mit einem Transport des endosomalen Proteins Rrm4-Gfp korreliert werden. Größenstandard 10 µm.

Mikroskopische Analysen zeigten auf, dass Upa9-mCherry tatsächlich eine peroxisomale Komponente darstellt, da ein Ko-Transport mit dem Peroxisomenmarker Gfp-SKL bestätigt werden konnte (Abbildung 8). Durch simultane Betrachtung von Upa9-mCherry und Rrm4-Gfp konnte zudem beobachtet werden, dass Upa9 mit dem endosomalen Protein Rrm4 kolokalisiert, sobald es vom statischen in den

transportierten Zustand übergeht. Nach Beendigung der aktiven Bewegung kolokalisierten Upa9 und Rrm4 nicht mehr (Abbildung 9). Obwohl Upa9 eine peroxisomale Komponente darstellt und somit in andere intrazelluläre Prozesse eingebunden sein sollte, schien folglich eine Verbindung zwischen der Bewegung von Peroxisomen und Rrm4-positiven Endosomen zu bestehen. Daher wurde untersucht, ob die Bewegung von Upa9-mCherry in Abhängigkeit der Mikrotubuli stattfindet (Abbildung 10).

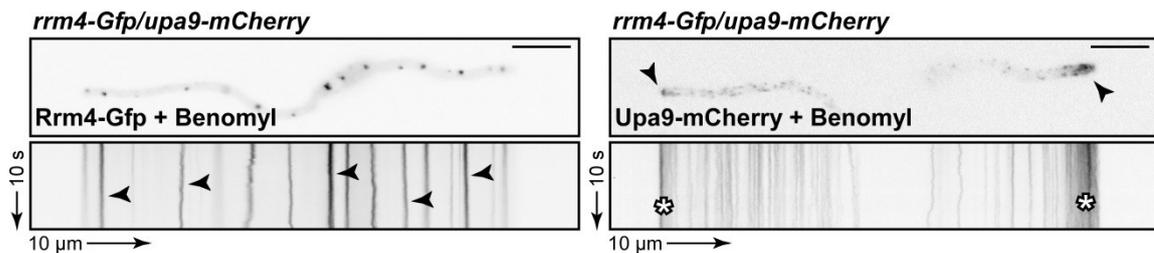


Abbildung 10: Rrm4-Gfp und Upa9-mCherry fehllokalisieren unter Einwirkung eines Mikrotubuli-Inhibitors. Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen und dazugehörige Kymographen einer mit Benomyl behandelten Hyphe des Stamms AB33Rrm4-Gfp/Upa9-mCherry. Die Aufnahmen sowie Kymographen wurden durch simultane Zweifarbaufnahmen erstellt. Schwarze Pfeile zeigen statische Signale auf. Weiße Sterne im Kymographen deuten die Spitzenakkumulation von Upa9-mCherry an. Größenstandard 10 µm.

Um den Einfluss eines destabilisierten Mikrotubuli-Zytoskeletts auf den Transport von Upa9 zu untersuchen, wurde der Mikrotubuli-Inhibitor Benomyl verwendet. Dieser führt zu einer Depolymerisierung von Mikrotubuli-Bündeln (Fuchs et al. 2005; Rathinasamy und Panda 2006). Durch den Abbau dieses Zytoskeletts kann der endosomale mRNA-Transport gestoppt werden (Vollmeister et al. 2012b). Die in Abbildung 10 gezeigten Hyphen exprimierten gleichzeitig Rrm4-Gfp und Upa9-mCherry und wurden für mindestens 30 Minuten mit Benomyl behandelt. Die direkt im Anschluss durchgeführte Mikroskopie zeigte, dass sich Rrm4-Gfp in charakteristischen Akkumulationen in der gesamten Hyphe verteilte, jedoch konnte hier keine Kolokalisierung mit Upa9-mCherry festgestellt werden. Im Gegensatz zu der endosomalen Komponente zeigte Upa9-mCherry eine deutliche Lokalisierung an den Hyphenspitzen (Abbildung 10). Trotzdem konnte beobachtet werden, dass beide Proteine wieder in der Lage waren, miteinander zu kolokalisieren, sobald der inhibierende Effekt des Benomyls aufgehoben war (Daten nicht gezeigt). Somit wurde vermutet, dass der scheinbar simultane Transport von endosomalen und peroxisomalen Komponenten auf unterschiedlichen grundlegenden Mechanismen beruhte. Zur Überprüfung eines Einflusses von Upa9 auf den endosomalen mRNA-Transport wurde mit Fluoreszenzprotein markiertes Rrm4 in einem

upa9-Deletionshintergrund untersucht. Hierbei zeigte sich, dass die endosomale Komponente Rrm4 unabhängig von der *upa9*-Deletion weiterhin transportiert werden konnte (Abbildung 11). Trotz des weitgehend bipolaren Phänotyps der Deletionsmutanten konnte also nicht geschlossen werden, dass Upa9 einen direkten Einfluss auf den endosomal vermittelten mRNA-Transport hat. Vielmehr schien es eine strukturelle Verbindung des Transports von Peroxisomen und frühen Endosomen zu geben.

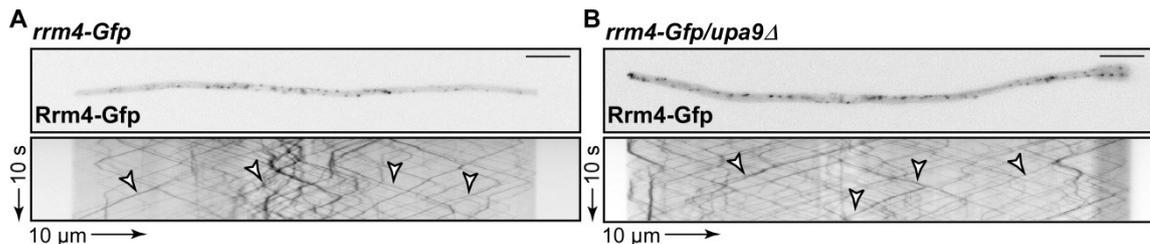


Abbildung 11: Die *upa9*-Deletion hat keinen Einfluss auf den Transport von Rrm4.
A Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme und dazugehöriger Kymograph einer AB33-Hyphe, welche Rrm4-Gfp exprimiert. **B** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme und dazugehöriger Kymograph einer AB33-Hyphe, welche Rrm4-Gfp exprimiert und eine *upa9*-Deletion trägt. Weiße Pfeile zeigen die Bewegung von Rrm4-Gfp. Die Deletion von *upa9* hatte keinen Effekt auf den Transport von Rrm4-Gfp.

2.2.3 Das PAM2-Motiv in Upa9 hat keine Bedeutung für die Lokalisierung des Proteins

Der Verlust von Upa9 führte zu einem bipolaren Phänotyp, welcher wahrscheinlich nicht auf einen Einfluss auf den endosomalen mRNA-Transport zurückzuführen ist, da das endosomale Schlüssel-Protein Rrm4 durch die *upa9*-Deletion nicht in seinem Transport beeinträchtigt wurde. Dennoch wurde untersucht, ob das PAM2-Motiv in Upa9 (Abbildung 12, **A**) einen Einfluss auf die Bewegung des Proteins hat, womöglich durch eine Interaktion mit den MLLE-Domänen in Rrm4 oder Pab1. Es wurde vermutet, dass eine solche Interaktion peroxisomale Komponenten an die Transportmaschinerie auf frühen Endosomen rekrutiert, um so den kurzzeitigen Ko-Transport zu gewährleisten. Um dies zu überprüfen, wurde das PAM2-Motiv mutiert, um dessen Funktionalität zu unterbinden. Dazu wurden die Aminosäuren Isoleuzin (Position 225), Asparagin (Position 228) und Alanin (Position 229) durch Alanin bzw. Leuzin substituiert (Abbildung 12, **B**).

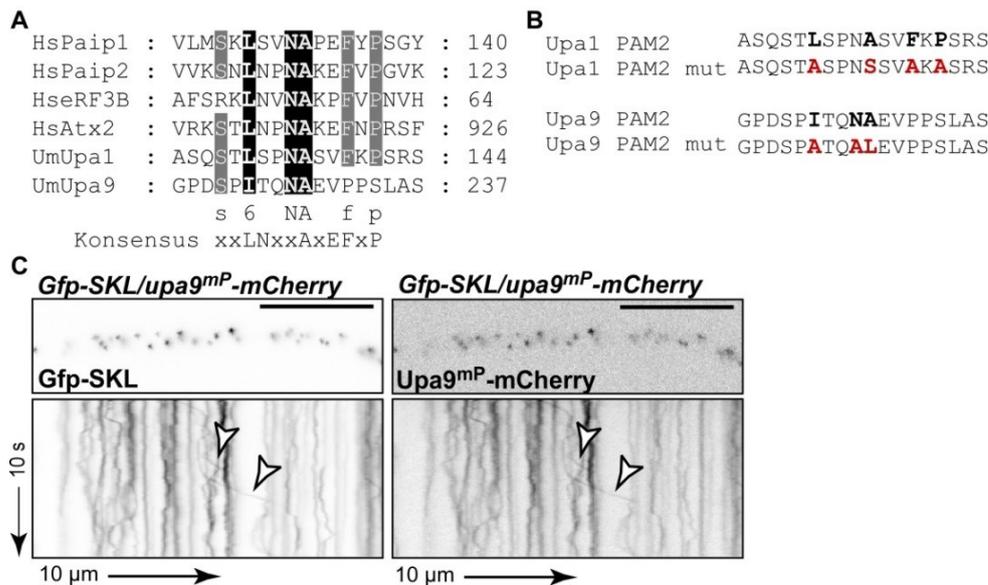


Abbildung 12: Die Mutation des PAM2-Motivs in Upa9 hat keine Auswirkungen auf dessen gelegentlichen Transport. **A** Sequenzvergleich zwischen PAM2-Motiven aus *H. sapiens* sowie dem PAM2-Motiv in Upa1 und dem PAM2-Motiv in Upa9. Schwarz hinterlegte Aminosäuren sind stärker konserviert als grau hinterlegte Aminosäuren. Das Motiv ist in Upa9 weniger konserviert als in den anderen gezeigten PAM2-Proteinen und weist kein charakteristisches FxP in seiner Sequenz auf. **B** Vergleich der in der vorangegangenen Arbeit von Thomas Pohlmann (2013) durchgeführten PAM2-Mutation in Upa1 mit der in der vorliegenden Arbeit hergestellten PAM2-Mutation in Upa9. **C** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen und dazugehörige Kymographen einer Hyphe des Stamms AB33Gfp-SKL/Upa9^{mp}-mCherry. Die Aufnahmen sowie Kymographen wurden durch simultane Zweifarbaufnahmen erstellt, um eine Kolokalisierung von Gfp-SKL und Upa9^{mp}-mCherry nachzuweisen. Weiße Pfeile zeigen eine Kolokalisierung an. Größenstandard 10 μ m.

In einer vorangegangenen Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Mutation des PAM2-Motivs in Upa1 keinen Effekt auf den endosomalen Transport hat: Upa1^{mp}-Gfp zeigte eine mit Upa1-Gfp vergleichbare bidirektionale Bewegung (Thomas Pohlmann 2013). Eine ähnliche Mutation des PAM2-Motivs in Upa9 wurde überprüft, um einen Einfluss auf den Transport von Upa9-Gfp zu untersuchen. Durch fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen konnte jedoch gezeigt werden, dass trotz der Mutation eine gelegentlich stattfindende Bewegung von Upa9^{mp}-Gfp nachzuweisen ist (Abbildung 12, **C**). Somit kann davon ausgegangen werden, dass Upa9 keinen direkten Effekt auf den endosomalen mRNA-Transport ausübt. Gleichwohl konnte gezeigt werden, dass offenbar eine Verbindung zwischen dem gerichteten Transport früher Endosomen mit assoziierten mRNPs und der eher zufällig wirkenden Bewegung peroxisomaler Kompartimente besteht. Ob diese Verbindung über eine weitere endosomale Komponente reguliert wird, wurde im weiteren Verlauf dieser Arbeit ebenfalls untersucht (siehe Addendum).

2.3 Weiterführende Untersuchungen des Proteins Upa2

2.3.1 Das Protein Upa2 ist wichtig für unipolares, filamentöses Wachstum

Ein gestörtes filamentöses Wachstum bei Hyphen ist häufig ein Indiz für eine Störung des mRNA-Transports (Baumann et al. 2012). Zur Verifizierung einer Involvierung des Proteins Upa2 in diesen wichtigen Transportmechanismus wurde die entsprechende Deletionsmutante untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass weder der Verlust von *rrm4* und *upa1*, noch der Verlust von *upa2* einen Einfluss auf die Morphologie von Sporidien hat (Abbildung 13, **A**). Zudem wurde über eine Sporidien-Wachstumskurve belegt, dass alle Stämme ungefähr gleiche Wachstumsraten aufweisen (Abbildung 13, **C**). Wurde jedoch das filamentöse Wachstum durch einen Wechsel des Nährmediums induziert, konnten deutliche morphologische Defekte beobachtet werden. Es zeigte sich bei AB33*rrm4* Δ , AB33*upa1* Δ und AB33*upa2* Δ ein signifikant höherer Anteil bipolarer Zellen als bei AB33, welcher hauptsächlich unipolare Filamente bildete und in der Lage war, Septen einzuziehen (Abbildung 13, **B** und **D**). In Kulturen des Stammes AB33 konnten im Durchschnitt 4 % bipolare Zellen gefunden werden. Bei AB33*rrm4* Δ wurde eine Bipolaritätsrate von circa 60 % beobachtet. 38 % der Zellen wuchsen bipolar und konnten keine Septen herstellen. Der Stamm AB33*upa1* Δ wies ebenfalls insgesamt einen höheren Anteil bipolarer Filamente von circa 60 % auf (Abbildung 13, **D**). Ein morphologischer Defekt dieses Stamms wurde bereits in einer vorangegangenen Studie beschrieben (Thomas Pohlmann 2013). Der Verlust von Upa2 führte ebenfalls zu Defekten in der Filamentbildung: Die Zellen wuchsen zu circa 80 % bipolar aus, und unipolare Filamente hatten Probleme, Septen einzuziehen (Abbildung 13, **D**). Diese Ergebnisse zeigten auf, dass die Anwesenheit von Upa2 für ein normales unipolares Wachstum von Filamenten wichtig ist. Der Stamm AB33Upa2-Gfp hingegen zeigt ein mit AB33 vergleichbares Wachstumsverhalten mit nur 1,5 % bipolaren Zellen, weshalb angenommen werden konnte, dass die C-terminale Fusion von Gfp an Upa2 funktionell ist und die Deletion komplementiert (Abbildung 13, **D**).

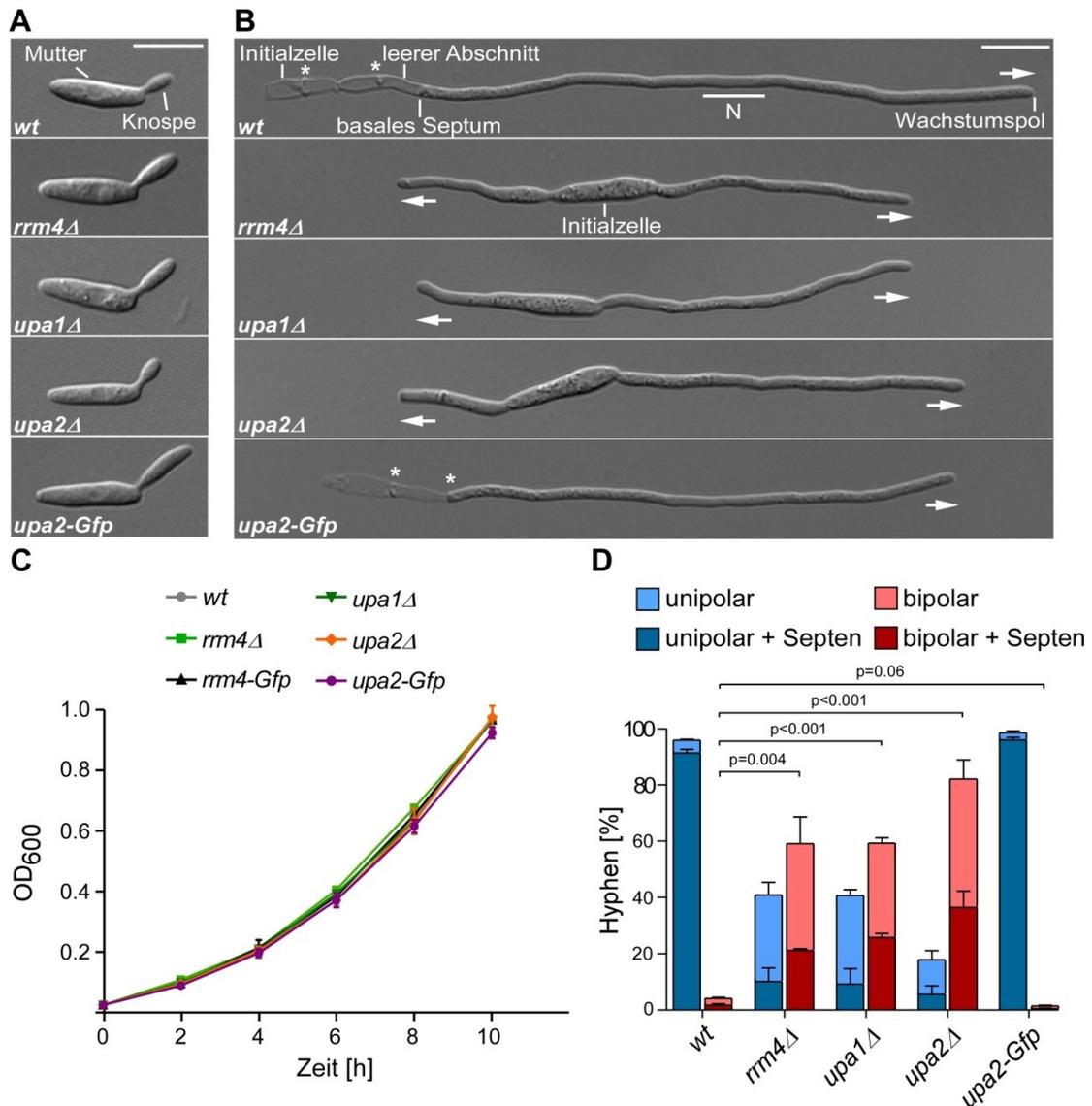


Abbildung 13: Die *upa2*-Deletion führt zu morphologischen Defekten in Filamenten.

A DIC-Aufnahmen von Sporidien der Stämme AB33 (*wt*), AB33*rrm4Δ* (*rrm4Δ*), AB33*upa1Δ* (*upa1Δ*), AB33*upa2Δ* (*upa2Δ*) und AB33*Upa2-Gfp* (*upa2-Gfp*). In keinem der untersuchten Stämme fielen phänotypische Defekte auf. Größenstandard 10 μ m.

B DIC-Aufnahmen von Hyphen der Stämme AB33 (*wt*), AB33*rrm4Δ* (*rrm4Δ*), AB33*upa1Δ* (*upa1Δ*), AB33*upa2Δ* (*upa2Δ*) und AB33*Upa2-Gfp* (*upa2-Gfp*). AB33 (*wt*) wächst von der Initialzelle unipolar aus. Dazu werden durch Septenbildung leere Abschnitte gebildet. Das basale Septum trennt das Zytoplasma von den leeren Abschnitten. AB33*rrm4Δ*, AB33*upa1Δ* und AB33*upa2Δ* zeigen vermehrt bipolares Wachstum, bei dem der Wachstumspol der Hyphe von der Initialzelle aus in zwei anstatt nur einer Richtung proliferiert. N, Nukleus. * markiert eingezogene Septen zur Abtrennung leerer Abschnitte. Der Pfeil zeigt die Wuchsrichtung. Größenstandard 10 μ m.

C Wachstumskurve für Sporidien der Kontroll- und einzelnen Deletionsstämme. Die Sporidien aller Stämme AB33 (*wt*), AB33*rrm4Δ* (*rrm4Δ*), AB33*upa1Δ* (*upa1Δ*), AB33*upa2Δ* (*upa2Δ*) und AB33*Upa2-Gfp* (*upa2-Gfp*) zeigen untereinander ein vergleichbares Wachstumsverhalten. Die Daten stammen aus drei unabhängigen

Experimenten. **D** Anteil der unipolar und bipolar wachsenden Zellen unter Berücksichtigung der Septenbildung nach mindestens 6 Stunden des filamentösen Wachstums der Stämme AB33 (*wt*), AB33rrm4 Δ (*rrm4\Delta*), AB33upa1 Δ (*upa1\Delta*), AB33upa2 Δ (*upa2\Delta*) und AB33Upa2-Gfp (*upa2-Gfp*). Fehlerbalken zeigen Standardfehler. Die Daten stammen aus drei unabhängigen Experimenten. Pro Experiment und Stamm wurden mindestens 100 Hyphen ausgewertet. Zur statistischen Analyse wurden die Bipolaritätsraten der Stämme AB33rrm4 Δ , AB33upa1 Δ , AB33upa2 Δ und AB33Upa2-Gfp mit der Bipolaritätsrate des Stamms AB33 verglichen. Ungepaarter zweiseitiger t-Test, Signifikanzniveau $p = 0,05$. Abbildung modifiziert aus Jankowski et al., 2019 (Fig. 2A, 2B, EV2A, EV2B).

2.3.2 Das Protein Upa2 lokalisiert auf frühen Endosomen

Durch fluoreszenzmikroskopische Analysen konnte bereits in einer vorangegangenen Arbeit (Thomas Pohlmann 2013) gezeigt werden, dass das Multi-PAM2-Protein Upa2 am endosomalen mRNA-Transport beteiligt ist. Besonders interessant war bei diesem Protein zunächst, dass es vier konservierte PAM2-Motive (Abbildung 5, **A**; Aminosäure-Positionen 2-18; 858-875; 924-936; 1046-1061) aufwies. Dies stellte eine Besonderheit dar, da bis dato nur PAM2-Proteine beschrieben wurden, die eines oder maximal zwei dieser Motive tragen (Satterfield und Pallanck 2006; Ruan et al. 2010; Katzenellenbogen et al. 2010; Osawa et al. 2012). Zur initialen Charakterisierung von Upa2 wurde zunächst die subzelluläre Lokalisation des Proteins bestimmt und eine mögliche Kolokalisation mit anderen, bereits bekannten mRNP-Komponenten untersucht.

Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen zeigten, dass Upa2-Gfp eine zu Rrm4-Gfp vergleichbare subzelluläre Lokalisation aufweist. Es bewegte sich in anterograder sowie retrograder Richtung durch die gesamte Hyphe (Abbildung 14, **A**). Rrm4-Gfp und Upa2-Gfp unterschieden sich von Pab1-Gfp durch eine nahezu ausschließliche Verteilung auf beweglichen Endosomen. Pab1-Gfp wurde ebenfalls aktiv transportiert, jedoch konnte zusätzlich eine deutliche zytoplasmatische Lokalisierung beobachtet werden. Upa2-Gfp wurde dabei in Abhängigkeit von einem intakten Mikrotubuli-Zytoskelett transportiert. Bei Behandlung der Zellen mit dem Inhibitor Benomyl zeigten sich anstatt beweglicher nur statische Partikel, welche gleichmäßig in der gesamten Hyphe vorlagen (Abbildung 14, **A**). Somit wurde bereits vermutet, dass eine etwaige Interaktion von Upa2 mit Rrm4 und/oder Pab1 nur auf den frühen Endosomen stattfindet und nicht im Zytoplasma. Upa2-Gfp und Rrm4-Gfp zeigten eine vergleichbare Anzahl prozessiv transportierter Partikel, während bewegliches Pab1-Gfp etwas weniger häufig beobachtet werden konnte.

Durchschnittlich konnten 6,5 Rrm4-Gfp-Partikel und 6,3 Upa2-Gfp-Partikel auf 10 µm Hyphenlänge detektiert werden. Für Pab1-Gfp wurden 5,4 Partikel auf 10 µm Zelllänge gezählt (Abbildung 14, **B**). Diese geringere Anzahl sichtbarer Pab1-Gfp-positiver Transportendosomen wurde höchstwahrscheinlich durch den zytoplasmatischen Hintergrund verursacht, welcher eine Detektion aller Partikel erschwerte. Alle drei Proteine wurden mit vergleichbaren Geschwindigkeiten von circa 2,5 µm/s durch die Zelle transportiert (Abbildung 14, **C**). Kollokalisationsstudien zeigten zudem, dass sich Upa2-Gfp und Rrm4-mCherry bzw. Pab1-mCherry tatsächlich auf denselben Partikeln befinden. Auch lag eine nahezu vollständige Kollokalisierung zwischen Upa2-Gfp und dem lipophilen Farbstoff FM4-64 vor (Vida und Emr 1995), welcher unter anderem Lipidbestandteile früher Endosomen bindet (Abbildung 14, **D** und **E**).

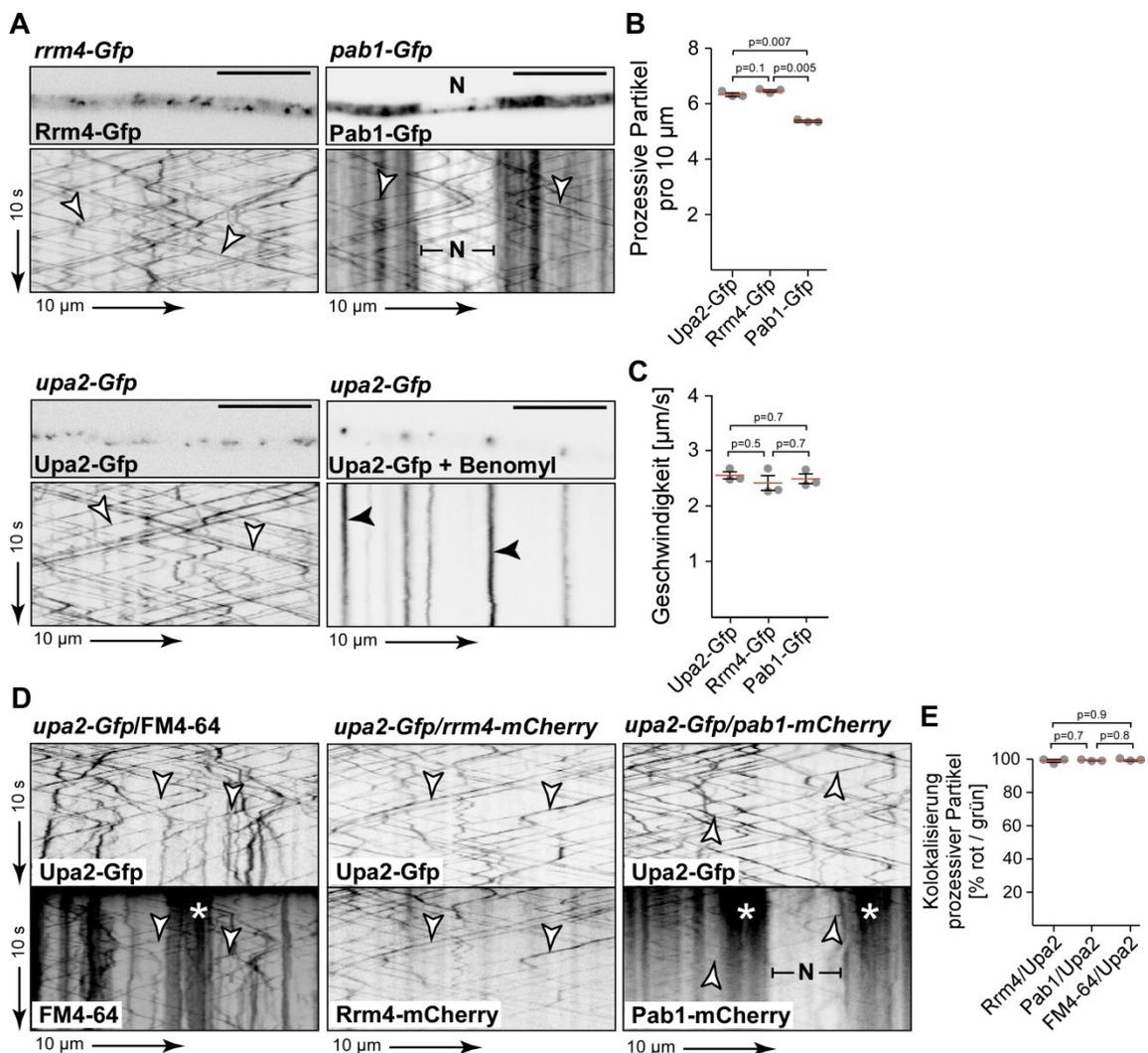


Abbildung 14: Upa2-Gfp wird in Partikeln bidirektional durch die Hyphe transportiert.

A Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen und Kymographen von Zellen der Stämme AB33Rrm4-Gfp, AB33Pab1-Gfp und AB33Upa2-Gfp. Alle untersuchten Proteine lokalisieren in transportierten Einheiten. Pab1-Gfp zeigt neben der Lokalisierung auf beweglichen Partikeln eine starke zytoplasmatische Lokalisierung unter Aussparung des Nukleus. Der Transport von

Upa2-Gfp geschieht in Abhängigkeit intakter Mikrotubuli. N, Nukleus. Größenstandard 10 μm . Weiße Pfeile zeigen mobile Signale. Schwarze Pfeile zeigen statische Partikel nach Behandlung der Zellen mit Benomyl. **B** Anzahl der prozessiven Upa2-Gfp-, Rrm4-Gfp-, sowie Pab1-Gfp-Partikel pro 10 μm Hyphenlänge. Die Daten stammen aus drei unabhängigen Experimenten. Pro Experiment und Stamm wurden 10 Hyphen analysiert. Die Fehlerbalken stellen den Standardfehler dar. Die rote Linie repräsentiert den Mittelwert. Ungepaarter zweiseitiger t-Test, Signifikanzniveau $p = 0,05$. **C** Gemessene Transportgeschwindigkeiten der Upa2-Gfp-, Rrm4-Gfp-, sowie Pab1-Gfp-Partikel. Die Daten stammen aus drei unabhängigen Experimenten. Pro Experiment und Stamm wurden 10 Hyphen analysiert. Die Fehlerbalken stellen den Standardfehler dar. Die rote Linie repräsentiert den Mittelwert. Ungepaarter zweiseitiger t-Test, Signifikanzniveau $p = 0,05$. **D** Kymographen zur Kolo-kalisierung von Upa2-Gfp mit dem Farbstoff FM4-64 oder den endosomalen Komponenten Rrm4-mCherry bzw. Pab1-mCherry. Die Kymographen wurden durch simultane Zweifarbaufnahmen erstellt. N, Nukleus. Weiße Pfeile zeigen eine Kolo-kalisierung an. Weiße Sterne zeigen Bereiche, in denen statische Signale aus dem Zytoplasma die Quantifizierung erschweren. **E** Prozentualer Anteil der Kolo-kalisierung von Upa2-Gfp mit dem Farbstoff FM4-64 sowie den endosomalen Komponenten Rrm4-mCherry bzw. Pab1-mCherry. Alle prozessiven roten Signale wurden auf Kolo-kalisierung mit grünen Signalen hin geprüft. Die Daten stammen aus drei unabhängigen Experimenten, pro Experiment und Stamm wurden 10 Hyphen untersucht. Die Fehlerbalken stellen den Standardfehler dar. Die rote Linie repräsentiert den Mittelwert. Ungepaarter zweiseitiger t-Test, Signifikanzniveau $p = 0,05$. Abbildung modifiziert aus Jankowski et al., 2019 (Fig. 3).

Aufgrund der gewonnenen Erkenntnisse zur subzellulären Lokalisierung konnte bestätigt werden, dass Upa2 tatsächlich eine Komponente des endosomalen mRNA-Transports ist. Es wurde angenommen, dass Upa2 aufgrund seiner vier PAM2-Motive einen wichtigen Interakteur darstellt, um mit den MLLE-Domänen der RNA-Bindeproteine Rrm4 und/oder Pab1 zu interagieren. Um die PAM2-Motive von Upa2 auf deren Funktionalität hin zu untersuchen, wurden in Zusammenarbeit mit Thomas Pohlmann Hefe-Zwei-Hybrid-Analysen durchgeführt (Abbildung 15).

2.3.3 Die PAM2-Motive von Upa2 sind funktionell und interagieren mit der MLLE-Domäne von Pab1

Da die vorab durchgeführten zellbiologischen Analysen bestätigten, dass Upa2 ein endosomales Protein ist, wurde untersucht, ob die in Upa2 vorhandenen PAM2-Motive eine Rolle beim mRNA-Transport spielen. Es wurde zunächst vermutet, dass Upa2 über die PAM2-Motive mit der MLLE-Domäne in Pab1 interagieren kann. Diese

Vermutung wurde durch die Kolokalisation beider Proteine auf Endosomen bestärkt. Zur Überprüfung, ob die PAM2-Motive tatsächlich funktionell sind, wurden Hefe-Zwei-Hybrid-Analysen durchgeführt. Mit dieser Technik konnte bereits die Funktionalität des PAM2-Motivs in Upa1 gezeigt werden (Thomas Pohlmann 2013). Da Upa2 über keine PAM2L-Motive wie Upa1 verfügt (Pohlmann et al. 2015), wurde eine Interaktion mit Rrm4 nicht angenommen. Diese Möglichkeit wurde dennoch ebenfalls mit verschiedenen Upa2-Varianten im Hefe-Zwei-Hybrid-System überprüft. Zudem wurde getestet, ob Upa1 und Upa2 miteinander interagieren können, und ob Selbstinteraktionen von Upa2 bei der Assemblierung des mRNP eine Rolle spielen könnten (Abbildung 15, C).

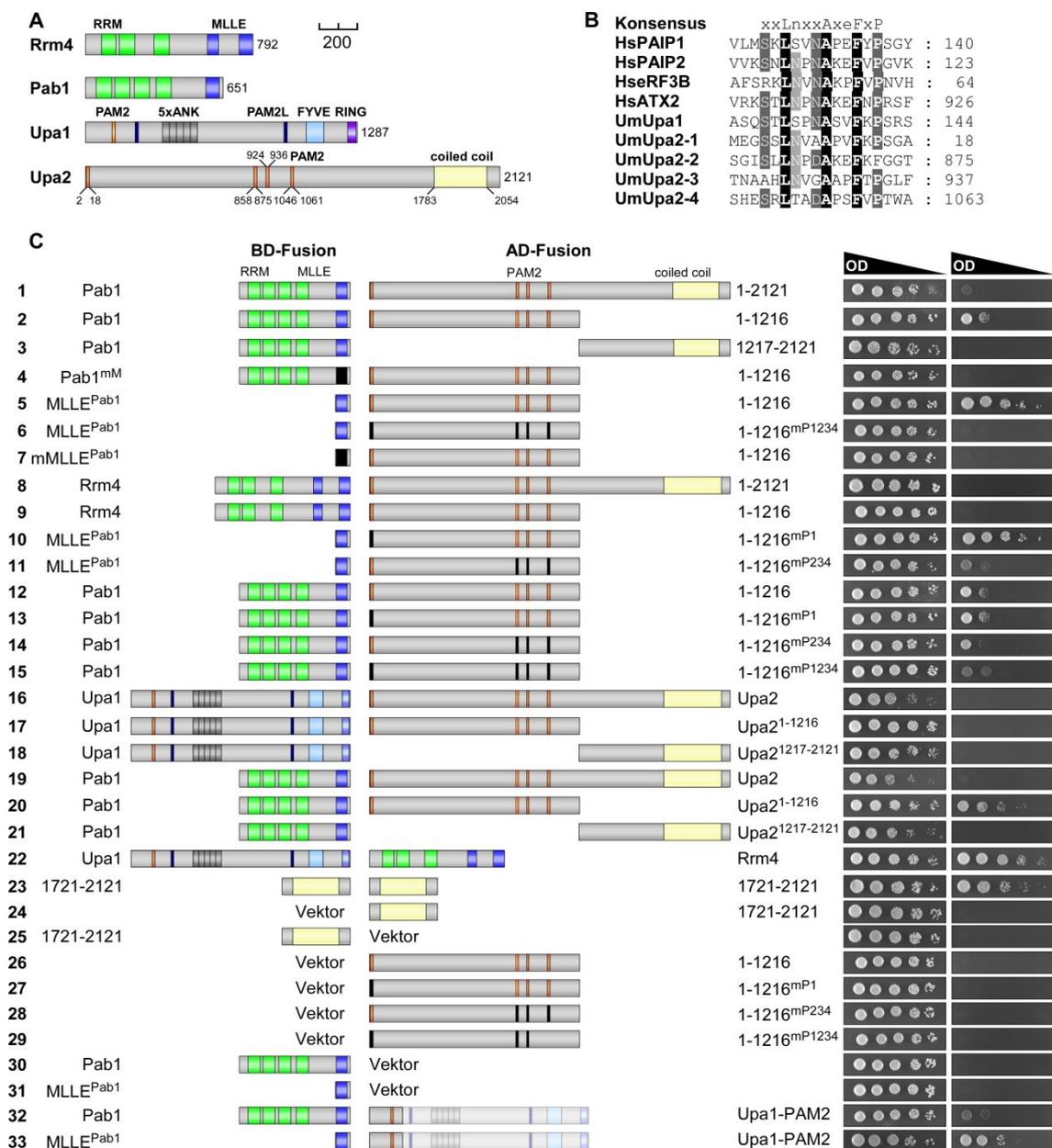


Abbildung 15: Die PAM2-Motive in Upa2 interagieren mit der MLE-Domäne von Pab1.

A Schematische Darstellung der Domänenarchitektur der getesteten Proteine Rrm4, Pab1,

Upa1 und Upa2. Grün, *RNA recognition motif*, RRM; blau, MLE-Domäne in Rrm4 bzw. Pab1; grau, Ankyrin-Wiederholungen; hellblau, FYVE-Domäne; violett, RING-Domäne; gelb, *coiled coil*-Bereich; orange, PAM2-Motive; dunkelblau, PAM2L-Motive. Größenstandard 200 Aminosäuren. **B** Sequenzvergleich zwischen PAM2-Motiven aus Proteinen in *H. sapiens* im Vergleich zum PAM2-Motiv in Upa1 und den vier PAM2-Motiven in Upa2. Schwarz hinterlegte Aminosäuren sind stark konserviert, Grauabstufungen zeigen schwächere Konservierung an. **C** Schematische Darstellung der auf Interaktion überprüften Proteine, ohne Darstellung der N-terminalen Fusionen mit BD oder AD, sowie Wachstumsanalysen der auf Interaktion getesteten Proteine auf Kontroll- und Selektionsplatten. Abbildung modifiziert aus Jankowski et al., 2019 (Fig. 1A-C, 1E, EV1A, EV1B).

Durch Hefe-Zwei-Hybrid-Analysen konnte die Funktionalität der PAM2-Motive in Upa2 bestätigt werden. Eine Interaktion von Vollängen-Upa2 bzw. der Variante Upa2¹⁻¹²¹⁶ war mit Vollängen-Pab1 sowie der MLE-Domäne aus Pab1 möglich (Abbildung 15, **C**, Reihen 1, 2 und 5), jedoch nicht mit Rrm4 (Abbildung 15, **C**, Reihen 8 und 9). Der C-Terminus von Upa2 (Aminosäuren 1217-2121) konnte nicht mit Pab1 interagieren. Eine Interaktion mit der MLE-Domäne von Pab1 war ebenfalls nicht nachweisbar, wenn alle vier PAM2-Motive in Upa2^{1-1216mP1234} verändert oder wenn die MLE-Domäne von Pab1 mutiert wurden (Abbildung 15, **C**, Reihe 3, 6 und 7). Wurde in Upa2^{1-1216mP1} nur das erste PAM2-Motiv an Aminosäure-Position 2-18 mutiert, ergaben sich keine erkennbaren Interaktionsverluste mit Pab1 oder der MLE-Domäne von Pab1 (Abbildung 15, **C**, Reihen 10 und 13). Im Vergleich dazu zeigte sich eine abgeschwächte Interaktion zwischen Vollängen-Pab1 und der Variante Upa2^{1-1216mP234}, welche Mutationen in den PAM2-Motiven an den Aminosäure-Positionen 858-875, 924-936 sowie 1046-1061 trug (Abbildung 15, **C**, Reihe 15). Interessanterweise zeigte sich, dass Upa2^{1-1216mP1234} zwar nicht mit der MLE-Domäne von Pab1 alleine interagiert (Abbildung 15, **C**, Reihe 6), jedoch konnte eine schwache Interaktion dieses Allels mit Vollängen-Pab1 nachgewiesen werden (Abbildung 15, **C**, Reihe 15). Eine weitere interessante Beobachtung war, dass die C-terminale *coiled coil*-Region in Upa2¹²¹⁷⁻²¹²¹ eine Selbstinteraktion zu ermöglichen scheint (Abbildung 15, **C**, Reihe 23). Weiterhin konnte mithilfe der Hefe-Zwei-Hybrid-Untersuchungen gezeigt werden, dass ein Zusammenspiel von Upa2 mit Upa1 für die Assemblierung der mRNPs keine Rolle zu spielen scheint: weder Vollängen-Upa2 noch die Varianten Upa2¹⁻¹²¹⁶ und Upa2¹²¹⁷⁻²¹²¹ zeigten eine Interaktion mit Upa1 in den in dieser Arbeit durchgeführten Analysen (Abbildung 15, **C**, Reihe 16-18). Somit wurde bestätigt, dass die PAM2-Motive in Upa2 funktionell sind und das Protein zudem wahrscheinlich mit sich selbst interagieren kann. Jedoch wurde auch deutlich, dass es noch weitere Regionen geben musste, mit deren Hilfe Upa2 schwach mit Pab1 interagieren kann.

2.3.4 Die PAM2-Motive in Upa2 sind für die Funktionalität des Proteins ohne Bedeutung

Nachdem gezeigt werden konnte, dass die konservierten PAM2-Motive in Upa2 funktionell sind und mit Pab1 bzw. der MLL- Domäne von Pab1 interagieren, sollte überprüft werden, welchen Einfluss der Verlust einzelner, mehrerer oder aller vier Motive *in vivo* hat. Trotz der Tatsache, dass in weiterführenden bioinformatischen Analysen drei weitere, kryptische PAM2-Motive (PAM2x; PAM2x-1: Aminosäuren 74-83; PAM2x-2: Aminosäuren 344-363; PAM2x-3: Aminosäuren 500-512) in Upa2 gefunden werden konnten (siehe Addendum), wurde aufgrund ihrer geringeren Konservierung nicht angenommen, dass ihr alleiniges Vorhandensein eine vollkommene Funktionalität vermittelt. Es wurden also die entsprechenden Stämme AB33Upa2^{mP1}-Gfp, AB33Upa2^{mP23}-Gfp, AB33Upa2^{mP234}-Gfp und AB33Upa2^{mP1234}-Gfp hergestellt, welche verschiedene Kombinationen von PAM2-Mutationen im Volllängen-Upa2-Gfp trugen, und mikroskopisch analysiert (Abbildung 16, **A**). Dabei wurden Bipolaritätsraten ermittelt sowie die Zellmorphologie betrachtet (Abbildung 16, **A** und **B**) und mithilfe der Gfp-Fusionen Transportereignisse untersucht (Abbildung 16, **C**). Dabei zeigte sich, dass der Verlust einzelner PAM2-Motive wie in AB33Upa2^{mP1}-Gfp keinen Effekt auf die Morphologie der Zellen oder den Transport der Upa2-Variante hatte. In diesem Stamm war jedoch nur das erste PAM2-Motiv an Aminosäure-Position 2-18 mutiert. Interessanterweise hatte aber selbst der Verlust aller vier konservierten Motive in Upa2^{mP1234}-Gfp keinen Einfluss auf die Etablierung der Zellpolarität oder auf den Transport des Proteins (Abbildung 16).

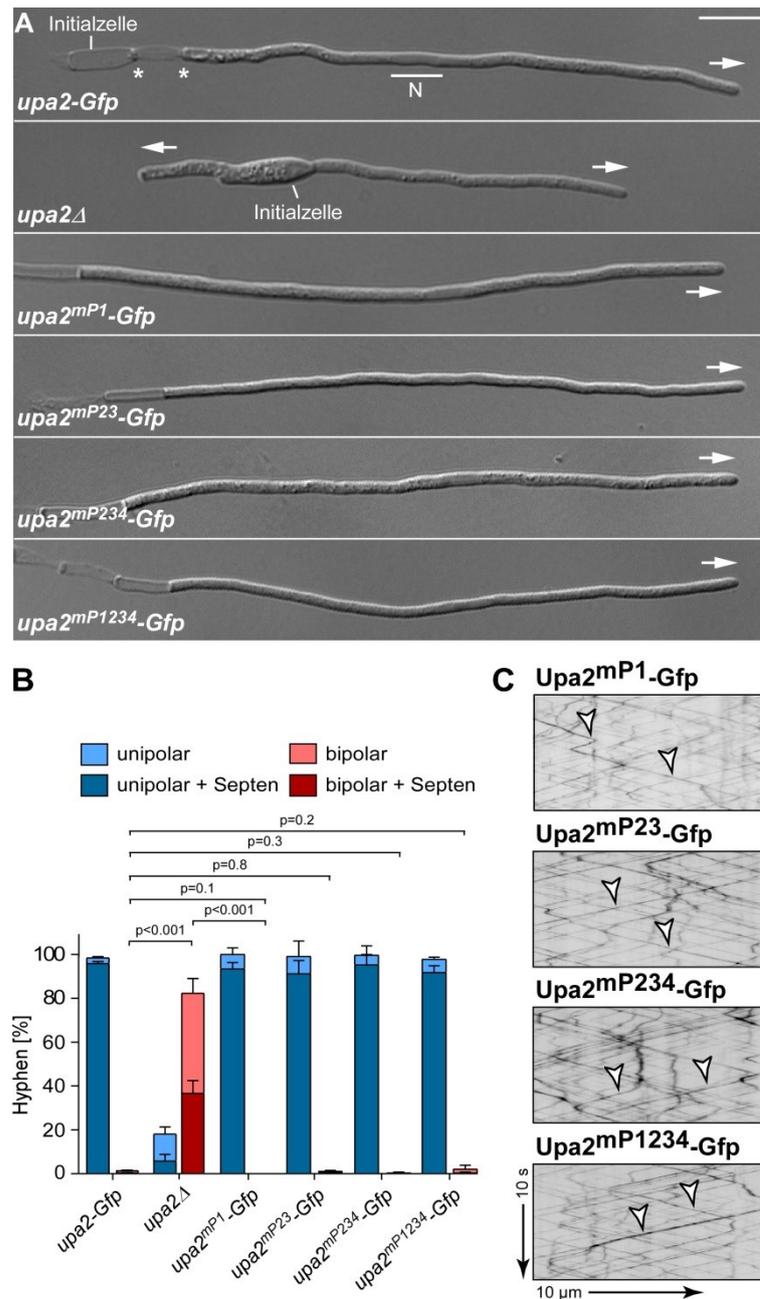


Abbildung 16: Der Verlust der vier konservierten PAM2-Motive in Upa2 führt zu keinen Defekten in der Zellmorphologie und beim endosomalen Transport des Proteins.
A DIC-Aufnahmen von Hyphen der Stämme AB33Upa2-Gfp, AB33upa2Δ, AB33Upa2^{mP1}-Gfp, AB33Upa2^{mP23}-Gfp, AB33Upa2^{mP234}-Gfp und AB33Upa2^{mP1234}-Gfp. AB33Upa2-Gfp wächst von der Initialzelle unipolar aus. Dazu werden durch Septenbildung leere Abschnitte gebildet. AB33upa2Δ zeigt ein vermehrt bipolares Wachstum, bei dem der Wachstumspol der Hyphe von der Initialzelle aus in zwei anstatt nur einer Richtung proliferiert. N, Nukleus. * markiert eingezogene Septen zur Abtrennung leerer Abschnitte. Der Pfeil zeigt die Wuchsrichtung. **B** Anteil der unipolar und bipolar wachsenden Zellen unter Berücksichtigung der Septenbildung nach mindestens 6 Stunden des filamentösen Wachstums der Stämme AB33Upa2-Gfp, AB33upa2Δ, AB33Upa2^{mP1}-Gfp, AB33Upa2^{mP23}-Gfp, AB33Upa2^{mP234}-Gfp und AB33Upa2^{mP1234}-Gfp. Fehlerbalken zeigen Standardfehler. Die Daten stammen aus drei

unabhängigen Experimenten. Im Vergleich zu AB33 wiesen die Filamente der Stämme AB33^{mP1}-Gfp, AB33^{mP23}-Gfp, AB33^{mP234}-Gfp und AB33^{mP1234}-Gfp keine morphologischen Defekte auf. Pro Experiment und Stamm wurden mindestens 100 Hyphen ausgewertet. Zur statistischen Analyse wurden die Bipolaritätsraten der Stämme AB33upa2 Δ , AB33Upa2^{mP1}-Gfp, AB33Upa2^{mP23}-Gfp, AB33Upa2^{mP234}-Gfp und AB33Upa2^{mP1234}-Gfp mit der Bipolaritätsrate des Stamms AB33Upa2-Gfp verglichen. Ungepaarter zweiseitiger t-Test, Signifikanzniveau $p = 0,05$. **C** Die Kymographen zeigen die Transportbewegung der verschiedenen Upa2-Gfp-Varianten auf. Der bidirektionale Transport aller getesteten Varianten entlang der gesamten Hyphe wurde durch die eingefügten Mutationen nicht gestört. Weiße Pfeile zeigen mobile Partikel. Abbildung modifiziert aus Jankowski et al., 2019 (Fig. 5A, 5B, EV3A).

Trotz der zuvor nachgewiesenen Funktionalität der PAM2-Motive aus Upa2 und deren Interaktion mit Pab1 im Hefe-Zwei-Hybrid-System konnte somit kein negativer Effekt einer Mutation dieser Motive auf den endosomalen mRNA-Transport nachgewiesen werden. Folglich musste angenommen werden, dass das Protein Upa2 weitere, bisher nicht bekannte funktionell wichtige Domänen enthalten muss. Um diese Hypothese zu untersuchen, wurden N-terminale Verkürzungen des Proteins Upa2 mit C-terminalen Gfp-Fusionen hergestellt.

2.3.5 Eine N-terminal befindliche Domäne vermittelt Funktionalität von Upa2, bestimmt aber nicht dessen Lokalisierung

Um funktionelle Regionen in Upa2 genauer kartieren zu können, wurden N-terminale Verkürzungen hergestellt und im endogenen *upa2*-Lokus unter Kontrolle des nativen Promoters exprimiert. Damit der Transport dieser Proteinvarianten untersucht werden konnte, wurden alle Verkürzungen C-terminal mit Gfp fusioniert. Hierbei entstanden die im Folgenden beschriebenen und in Abbildung 17, **A** gezeigten Proteinvarianten (Gfp-Fusion am C-Terminus nicht gezeigt).

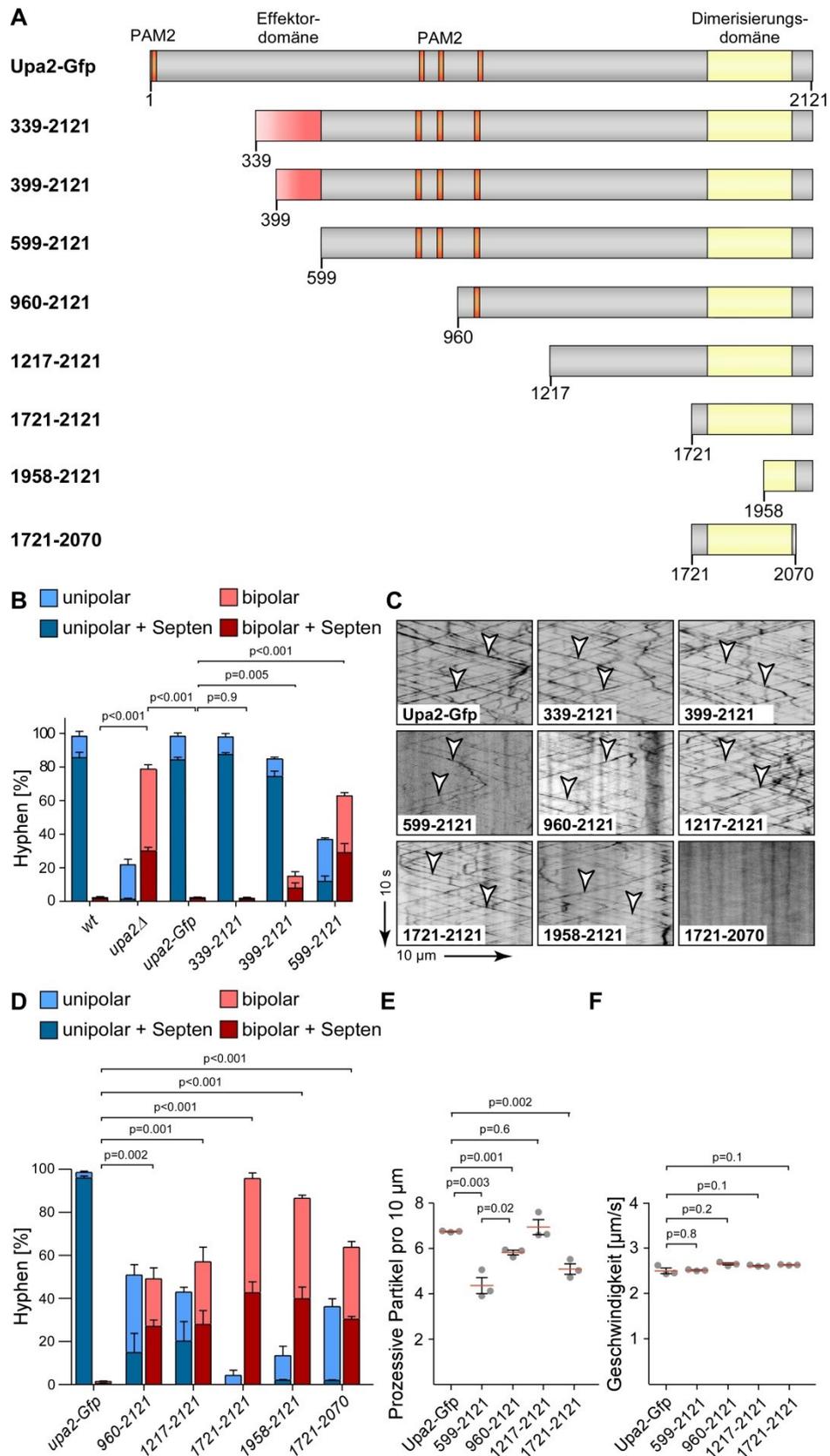


Abbildung 17: Eine funktionell wichtige Region befindet sich am N-Terminus von Upa2, welche jedoch nicht die Lokalisation auf Endosomen vermittelt. A Schematische Darstellung der N-terminalen Verkürzungen von Upa2. Orange, PAM2. Hellrot mit Farbverlauf, Effektor-domäne. Gelb, Dimerisierungs-domäne. **B** Anteil der unipolar und bipolar wachsenden

Zellen unter Berücksichtigung der Septenbildung nach sechs Stunden des filamentösen Wachstums der Stämme AB33 (*wt*), AB33*upa2* Δ , AB33Upa2-Gfp, AB33Upa2³³⁹⁻²¹²¹-Gfp, AB33Upa2³⁹⁹⁻²¹²¹-Gfp und AB33Upa2⁵⁹⁹⁻²¹²¹-Gfp. Fehlerbalken zeigen Standardfehler. Die Daten stammen aus drei unabhängigen Experimenten. Pro Experiment und Stamm wurden mindestens 100 Hyphen quantifiziert. Zur statistischen Analyse wurden die Bipolaritätsraten der Stämme AB33*upa2* Δ , AB33Upa2-Gfp, AB33Upa2³³⁹⁻²¹²¹-Gfp, AB33Upa2³⁹⁹⁻²¹²¹-Gfp und AB33Upa2⁵⁹⁹⁻²¹²¹-Gfp mit der Bipolaritätsrate des Stamms AB33 verglichen. Ungepaarter zweiseitiger t-Test, Signifikanzniveau $p = 0,05$. **C** Kymographen zur Darstellung der Bewegung der einzelnen Upa2-Gfp-Varianten. Weiße Pfeile zeigen mobile Partikel an. Nur die verkürzte Variante Upa2¹⁷²¹⁻²⁰⁷⁰ zeigte keine endosomale Lokalisierung. **D** Anteil der unipolar und bipolar wachsenden Zellen unter Berücksichtigung der Septenbildung nach sechs Stunden des filamentösen Wachstums der Stämme AB33Upa2-Gfp, AB33Upa2⁹⁶⁰⁻²¹²¹-Gfp, AB33Upa2¹²¹⁷⁻²¹²¹-Gfp, AB33Upa2¹⁷²¹⁻²¹²¹-Gfp, AB33Upa2¹⁹⁵⁸⁻²¹²¹-Gfp und AB33Upa2¹⁷²¹⁻²⁰⁷⁰-Gfp. Fehlerbalken zeigen Standardfehler. Die Daten stammen aus drei unabhängigen Experimenten. Pro Experiment und Stamm wurden mindestens 100 Hyphen quantifiziert. Zur statistischen Analyse wurden die Bipolaritätsraten der Stämme AB33Upa2⁹⁶⁰⁻²¹²¹-Gfp, AB33Upa2¹²¹⁷⁻²¹²¹-Gfp, AB33Upa2¹⁷²¹⁻²¹²¹-Gfp, AB33Upa2¹⁹⁵⁸⁻²¹²¹-Gfp und AB33Upa2¹⁷²¹⁻²⁰⁷⁰-Gfp mit der Bipolaritätsrate des Stamms AB33Upa2-Gfp verglichen. Ungepaarter zweiseitiger t-Test, Signifikanzniveau $p = 0,05$. **E** Anzahl der prozessiven Upa2-Gfp-Partikel pro 10 μm Hyphenlänge. Die Daten stammen aus drei unabhängigen Experimenten. Pro Experiment und Stamm wurden 10 Hyphen analysiert. Die Fehlerbalken stellen den Standardfehler dar. Die rote Linie repräsentiert den Mittelwert. Ungepaarter zweiseitiger t-Test, Signifikanzniveau $p = 0,05$. **F** Gemessene Transportgeschwindigkeiten der prozessiven Upa2-Gfp-Partikel. Die Daten stammen aus drei unabhängigen Experimenten. Pro Experiment und Stamm wurden 10 Hyphen analysiert. Die Fehlerbalken stellen den Standardfehler dar. Die rote Linie repräsentiert den Mittelwert. Ungepaarter zweiseitiger t-Test, Signifikanzniveau $p = 0,05$. Abbildung modifiziert aus Jankowski et al., 2019 (Fig. 5C, 5D-F, EV3B, EV3D, EV3F).

Die in Abbildung 17, **A** gezeigten Verkürzungen von Upa2 ließen Rückschlüsse auf die Funktion des Proteins zu. Der Stamm AB33Upa2³³⁹⁻²¹²¹-Gfp wies mit unter 3 % bipolarer Zellen Bipolaritätsraten auf Wildtypniveau auf und konnte deshalb als funktionelle Variante eingestuft werden (Abbildung 17, **B**). Die weitere Verkürzung im Stamm AB33Upa2³⁹⁹⁻²¹²¹-Gfp führte zu einem geringen Anstieg der Bipolarität auf circa 15 %. Dies entsprach nicht dem prozentualen Anteil bipolarer Zellen einer Mutante mit essentiellen Defekten beim endosomalen mRNA-Transport, ließ aber bereits vermuten, dass eine weitere N-terminale Verkürzung von Upa2 die Funktion erheblich einschränken oder aufheben wird. Dies war bereits im Stamm AB33Upa2⁵⁹⁹⁻²¹²¹-Gfp der Fall, dessen Bipolarität sich mit um die 60 % auf einem zur *rrm4*- oder *upa2*-Deletion vergleichbaren Niveau befand. Die weiteren Varianten wiesen eine

vergleichbare Bipolaritätsrate zum Stamm AB33upa2 Δ auf, womit deutlich wurde, dass sich ein funktionell wichtiger Bereich nahe dem N-Terminus zwischen den Aminosäurepositionen 339 und 599 befinden muss (Abbildung 17, **A**, **B** und **D**). Aufgrund dessen wird dieser Bereich in Upa2 als Effektordomäne bezeichnet. Die in Abbildung 17, **A** gezeigten Verkürzungen wurden zusätzlich quantifiziert, und es zeigte sich eine nicht signifikant unterschiedliche Transportgeschwindigkeit aller Varianten. Es ließen sich aber Unterschiede bezüglich der Partikelanzahl beobachten (Abbildung 17, **E** und **F**). Wie in den entsprechenden Kymographen in Abbildung 17, **C** zu erkennen ist, zeigen die Varianten Upa2⁵⁹⁹⁻²¹²¹-Gfp, Upa2⁹⁶⁰⁻²¹²¹-Gfp und Upa2¹⁷²¹⁻²¹²¹-Gfp etwas schwächere Fluoreszenzsignale in der Mikroskopie. Trotz eines offensichtlichen Verlusts der Funktionalität des Proteins konnte mithilfe der C-terminalen Gfp-Fusionen gezeigt werden, dass sich sogar die stark verkürzten Upa2-Varianten wie im Stamm AB33Upa2¹⁹⁵⁸⁻²¹²¹-Gfp noch immer auf Transportendosomen befinden. Dies galt auch für Upa2¹²¹⁷⁻²¹²¹-Gfp, einer Variante, die keine PAM2-Motive mehr enthielt (Abbildung 17, **C**). Somit wurde auch an dieser Stelle deutlich, dass PAM2-Motive für die endosomale Lokalisierung von Upa2 unerheblich sind. Die Variante Upa2⁵⁹⁹⁻²¹²¹-Gfp ließ ebenfalls den Rückschluss zu, dass die Interaktion mit Pab1 nicht wichtig für die Funktion von Upa2 ist, da sie noch drei der vier PAM2-Motive des natürlichen Allels enthielt, die Zellen aber bereits einen mit der Deletionsmutante vergleichbaren Bipolarenanteil aufwiesen. Die zuvor aufgestellte Hypothese, dass die *coiled coil*-Domäne am C-Terminus von Upa2 durch Selbstinteraktion eine Rolle beim Beladen auf mobile Partikel spielt (Abbildung 15, **C**, Reihe 23), wurde durch den Stamm AB33Upa2¹⁷²¹⁻²⁰⁷⁰-Gfp überprüft. Diese Variante enthielt keine wesentliche zusätzliche Sequenzinformation neben der *coiled coil*-Domäne aus Upa2 und war im Gegensatz zu den anderen bislang beschriebenen Varianten nicht in der Lage, durch die Hyphe transportiert zu werden. Durch Vergleich mit der im Stamm AB33Upa2¹⁷²¹⁻²¹²¹-Gfp exprimierten Proteinvariante wurde deutlich, dass sich ein interessanter Bereich am C-Terminus von Upa2 befinden muss. Daraufhin wurden die letzten C-terminalen 51 Aminosäuren aus Upa2 einem genauen Sequenzvergleich mit Homologen aus nahen und entfernteren Verwandten von *U. maydis* unterzogen.

<i>U. maydis</i>	KQKTGAWAS SMHAP RVHI	<i>U. maydis</i>	GSQGKKEVEVDEG GWWS *
<i>U. hordei</i>	QPPTGAWAS SMHAP KLSK	<i>U. hordei</i>	STGSRKEVEVDEG GWWS *
<i>U. bromivora</i>	QPPTGAWAS SMHAP RLSK	<i>U. bromivora</i>	STGSRKEVEVDEG GWWS *
<i>S. reilianum</i>	QPPTGAWAS SMHAP RIHV	<i>S. reilianum</i>	GSHGKREVEVDEG GWWS *
<i>S. scitamineum</i>	QPRTGVWAS SMHAP QIRV	<i>S. scitamineum</i>	TASHGKEVEVDEG GWWS *
<i>M. antarcticus</i>	TPRTGAWAS SMHAP RAPA	<i>M. antarcticus</i>	TAGSRKQVEVDEG GWWS *
<i>T. thlaspeos</i>	QARSGTWSS SMHAP SLVT	<i>T. thlaspeos</i>	ASSVLRVEVQDDG GWWS *
<i>P. carnososa</i>	SPQQSVWDS SMHAP TARQ	<i>P. carnososa</i>	PSTVSAAPTLGDD GWWQ *
<i>T. versicolor</i>	PPQASVRDS SMHAP WRQA	<i>T. versicolor</i>	PSTVSVAPTLGDD GWWQ *
<i>S. indica</i>	ATYNGVWQSR SMHAP SKPN	<i>S. indica</i>	QSVVSQAPTLRENG GWWE *
<i>P. strigosozonata</i>	AYQQSVRDS SMHAP KRYP	<i>P. strigosozonata</i>	PSVVSNAPTLGDD GWWA *
<i>C. cinerea</i>	PPQGSVWDS SMHAP SNGI	<i>C. cinerea</i>	PSIVSAAPTQGED GWWS *
<i>A. ostoyae</i>	PPQPSVWDS SMHAP KSNG	<i>A. ostoyae</i>	PSTVSLAPTVDEG GWWT *
konserviertes Motiv	SMHAP	konserviertes Motiv	GWWS
Mutation mSMHAP	AAAAA	Mutation mGWW	AAA

Abbildung 18: Der Sequenzvergleich des C-Terminus von Upa2 zeigt eine größere konservierte Region sowie ein stark konserviertes Tripeptid. Gezeigt sind die Aminosäuren an der Position 2066-2082 sowie die letzten 17 Aminosäuren am C-Terminus von Upa2 im Vergleich zu Homologen aus verwandten Organismen. Der Stern * markiert das Ende der Proteinsequenz. Grau hinterlegte Aminosäuren sind weniger konserviert. Die schwarze Hinterlegung zeigt eine starke Konservierung der Aminosäuren. Beide Motive wurden in *U. maydis* Upa2 durch Einfügen von Alaninen mutiert. Abbildung modifiziert aus Jankowski et al., 2019 (Fig. 5G).

Durch den Vergleich mehrerer C-Termini verschiedener homologer Proteine aus anderen verwandten Organismen wurde deutlich, dass es eine größere konservierte Region (Aminosäuren 2074-2078) gab, die die Aminosäuren SMHAP einschloss, sowie einen konservierten Bereich (Aminosäuren 2118-2120), der das Tripeptid GWW umfasste (Abbildung 18). Zur Überprüfung, ob eine dieser beiden konservierten Regionen für eine endosomale Lokalisierung verantwortlich ist, wurden diese Bereiche in verschiedenen Upa2-Varianten durch Substitutionen mutiert (Abbildung 19).

2.3.6 Das Tripeptid GWW ist notwendig für endosomale Lokalisierung von Upa2

Die extrem verkürzte Upa2-Variante Upa2²⁰⁷⁰⁻²¹²¹-Gfp enthielt weder PAM2-Motive oder sonstige vorhergesagte Domänen, wurde aber trotzdem auf distinkten Partikeln durch die Hyphe transportiert (Abbildung 19, **A** und **B**). Sie enthielt jedoch zwei konservierte Bereiche, die in mehreren Varianten mutiert worden sind (Abbildung 18). Der erste konservierte Bereich, der die Aminosäuren SMHAP (Serin, Methionin, Histidin, Alanin, Prolin; Aminosäure-Positionen 2074-2078) einschließt, wurde in dem Stamm AB33Upa2^{1958-2121mSMHAP}-Gfp vollständig durch Alanine substituiert. Ein Einfügen eines solchen Alanin-Stretches in das Konstrukt Upa2²⁰⁷⁰⁻²¹²¹-Gfp resultierte in einem vollständigen Fehlen von Gfp-Fluoreszenzsignalen (Daten nicht gezeigt),

weshalb angenommen wurde, dass das Konstrukt zu instabil war. Es konnte im Folgenden nachgewiesen werden, dass die Variante Upa2^{1958-2121mSMHAP}-Gfp genau wie die nicht-mutierte Variante Upa2¹⁹⁵⁸⁻²¹²¹-Gfp auf Endosomen transportiert wurde (Abbildung 19, **B**). Somit konnte der erste konservierte Bereich am C-Terminus von Upa2 als Vermittler für endosomale Assoziation ausgeschlossen werden. Den zweiten konservierten Bereich stellte das Tripeptid GWW (Glyzin, zwei Tryptophane) dar. Dieser Bereich wurde im Stamm AB33Upa2^{1958-2121mGWW}-Gfp mutiert, indem anstelle des GWW drei Alanine exprimiert wurden. Durch Fluoreszenzmikroskopie konnte gezeigt werden, dass diese Substitution von GWW dazu führte, dass keine distinkten transportierten Partikel mehr zu detektieren waren (Abbildung 19, **B**). Somit wurde die Hypothese aufgestellt, dass GWW das notwendige Motiv zur Lokalisation von Upa2 auf der endosomalen Transportmaschinerie darstellte. Es war jedoch wichtig, die Mutation des Tripeptids GWW auch im Kontext des Vollängenproteins zu testen, da die Möglichkeit bestand, dass es noch weitere, bisher nicht bekannte Assoziationsdomänen in Upa2 gab. Diese könnten im Vollängenprotein trotz der Mutation von GWW für eine Lokalisierung von Upa2 auf frühen Endosomen sorgen. Um dies zu überprüfen, wurde der Stamm AB33Upa2^{mGWW}-Gfp hergestellt, welcher das vollständige Protein Upa2 mit den drei veränderten Aminosäuren am C-Terminus, fusioniert mit Gfp, exprimiert. Die mikroskopischen Analysen dieses Stammes ergaben einen stark bipolaren Phänotyp mit circa 80 % bipolaren Zellen, das Protein war also aufgrund der Mutation nicht funktionell (Abbildung 18; Abbildung 19, **D**). Die Fluoreszenzmikroskopie bestätigte, dass Upa2^{mGWW}-Gfp nicht endosomal transportiert wurde (Abbildung 19, **C**). Somit konnte die Wichtigkeit von GWW für die korrekte Lokalisierung des Proteins auch im Vollängenkontext gezeigt werden.

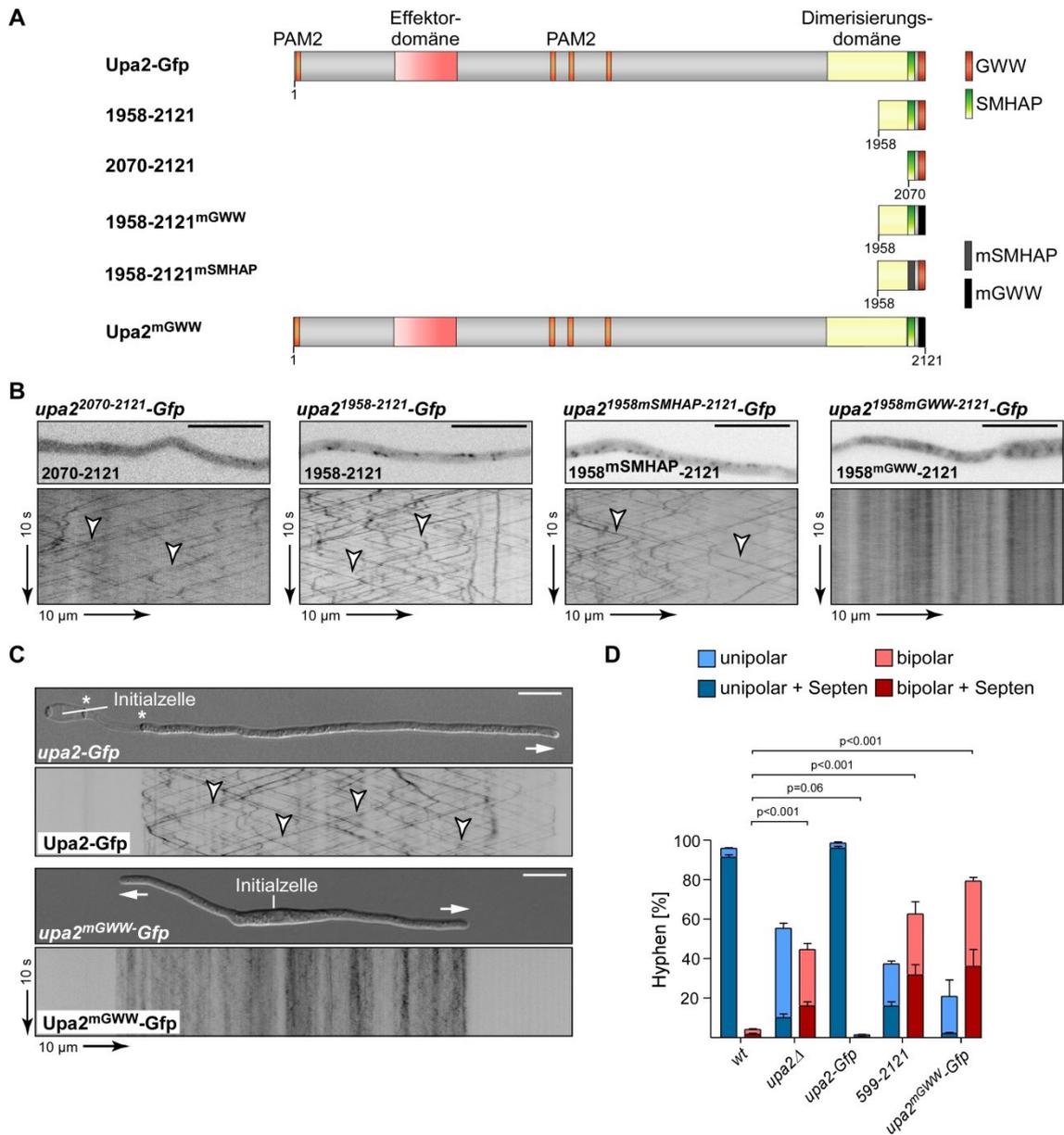


Abbildung 19: Upa2-Varianten mit mutiertem GWW-Motiv können nicht mehr auf Endosomen lokalisieren. **A** Schematische Darstellung der weiteren N-terminalen Verkürzungen von Upa2. Orange, PAM2. Hellrot mit Farbverlauf, Effektor-domäne. Gelb, Dimerisierungsdomäne. Rot, GWW. Grün, SMHAP. Schwarz, mutiertes GWW. Grau, mutiertes SMHAP. **B** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von Hyphen, welche verschiedene Upa2-Varianten exprimieren, und dazugehörige Kymographen. Weiße Pfeile markieren bewegliche Partikel. Größenstandard 10 μm. **C** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen einer Zelle, welche Upa2-Gfp exprimiert, im Vergleich zu einer Zelle, welche Upa2^{mGWW}-Gfp exprimiert, und dazugehörige Kymographen. Weiße Pfeile markieren bewegliche Partikel. Größenstandard 10 μm. **D** Anteil der unipolar und bipolar wachsenden Zellen unter Berücksichtigung der Septenbildung nach sechs Stunden des filamentösen Wachstums der Stämme AB33 (*wt*), AB33*upa2*Δ, AB33Upa2-Gfp, AB33Upa2⁵⁹⁹⁻²¹²¹-Gfp und AB33Upa2^{mGWW}-Gfp. Fehlerbalken zeigen Standardfehler. Die Daten stammen aus drei unabhängigen Experimenten. Pro Experiment und Stamm wurden mindestens 100 Hyphen

quantifiziert. Zur statistischen Analyse wurden die Bipolaritätsraten der Stämme AB33upa2 Δ , AB33Upa2-Gfp, AB33Upa2⁵⁹⁹⁻²¹²¹-Gfp und AB33Upa2^{mGWW}-Gfp mit der Bipolaritätsrate des Stamms AB33 verglichen. Ungepaarter zweiseitiger t-Test, Signifikanzniveau $p = 0,05$. Abbildung modifiziert aus Jankowski et al., 2019 (Fig. 5C, 5H, EV3G).

Es war im Folgenden wichtig zu überprüfen, ob die eingefügte Mutation einen Einfluss auf das Expressionslevel von Upa2 hatte. Wäre dies der Fall, hätte eine geringere Expression der Grund dafür sein können, dass keine beweglichen Partikel in den Stämmen AB33Upa2^{1958-2121mGWW}-Gfp und AB33Upa2^{mGWW}-Gfp detektiert werden konnten. Zu diesem Zweck wurden Western Blot-Analysen durchgeführt (Abbildung 20).

2.3.7 Die Mutation von GWW hat keinen Einfluss auf das Expressionslevel von Upa2

Das Protein Upa2-Gfp konnte zu Beginn dieser Arbeit nicht über einen Western Blot detektiert werden. In einem solchen Fall besteht die Möglichkeit, dass der Transfer auf die Membran nicht effizient ist oder dass das Protein infolge des Aufschlusses oder der weiteren Behandlung zu instabil wurde. Um den Zellaufschluss gezielt zu verbessern und Upa2 erfolgreich nachweisen zu können, wurde ein 8 M Urea-Lysepuffer eingesetzt. Gesamtzelllysate wurden vor einer SDS-PAGE für 10 min auf 80 °C erhitzt und nicht gekocht. Zudem mussten aufgetragene Proteinmengen erhöht sowie Transfer- und Waschzeiten verlängert werden (siehe Material und Methoden, Abschnitt 5.4). Als wichtig hatte sich auch die Benutzung von Nitrocellulose-Membran anstelle von PVDF-Membran erwiesen. Unter Verwendung dieses in Zusammenarbeit mit Thomas Pohlmann optimierten Protokolls war es erstmals möglich, Upa2-Gfp als Volllängenprotein zu detektieren.

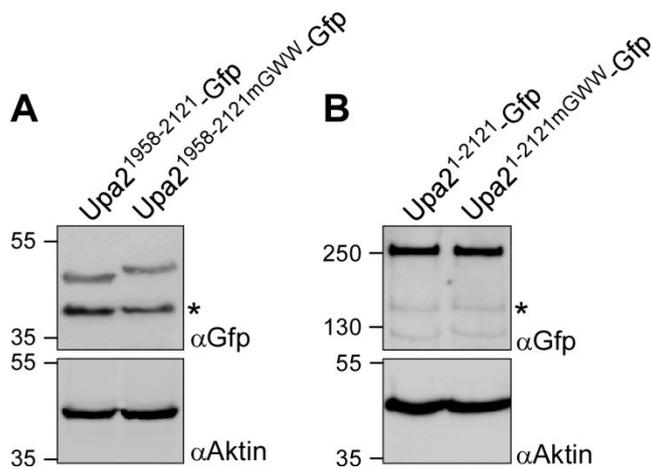


Abbildung 20: Western Blot zur Verifizierung der Upa2-Expression. **A** Western Blot-Analyse der beiden verkürzten Upa2-Varianten. Linke Spur, Upa2¹⁹⁵⁸⁻²¹²¹-Gfp; rechte Spur, Upa2^{1958-2121mGWW}-Gfp. Oberes Paneel: α-Gfp-Nachweis der Upa2-Varianten, 46,3 bzw. 46 kDa. Unterem Paneel: α-Aktin-Nachweis der Ladekontrolle Aktin, 41,8 kDa. **B** Western Blot-Analyse der beiden Vollängen-Upa2-Varianten. Linke Spur, Upa2¹⁻²¹²¹-Gfp; rechte Spur, Upa2^{1-2121mGWW}-Gfp. Oberes Paneel: α-Gfp-Nachweis der Upa2-Varianten, 259 bzw. 258 kDa. Unterem Paneel: α-Aktin-Nachweis der Ladekontrolle Aktin, 41,8 kDa. Mit * wurden Degradationsbanden markiert. Abbildung modifiziert aus Jankowski et al., 2019 (Fig. EV3F).

Durch Western Blot-Analysen wurden die Expressionslevel von Upa2¹⁹⁵⁸⁻²¹²¹-Gfp und Upa2^{1958-2121mGWW}-Gfp miteinander verglichen, da nicht klar war, ob der Verlust der Lokalisation auf die Mutation oder eine fehlerhafte Expression zurückzuführen war. Die beiden verkürzten Upa2-Varianten hatten vorhergesagte Molekulargewichte von 46,3 bzw. 46 kDa, welche sich in der Western Blot-Analyse bestätigten (Abbildung 20, **A**). Es fiel allerdings auf, dass die veränderte Variante Upa2^{1958-2121mGWW}-Gfp geringfügig höher lief als die wildtypische Variante. Zudem schienen diese kürzeren Varianten weniger stabil zu sein als das Vollängenprotein, da sich stärkere Degradationsbanden feststellen ließen (vergleiche Abbildung 20, **B**). Dennoch konnte anhand der Intensität der detektierten Banden gezeigt werden, dass zwischen Upa2¹⁹⁵⁸⁻²¹²¹-Gfp und Upa2^{1958-2121mGWW}-Gfp keine gravierenden Unterschiede im Expressionslevel vorlagen. Für das nicht fusionierte Protein Upa2¹⁻²¹²¹ wurde ein Molekulargewicht von 232 kDa vorhergesagt. Mit einer C-terminalem Gfp-Fusion in Upa2¹⁻²¹²¹-Gfp erhöhte sich das vorhergesagte molekulare Gewicht auf 259 kDa. Da in die Variante Upa2^{1-2121mGWW}-Gfp anstelle des Glyzins und der beiden Tryptophane nun drei Alanine eingebaut wurden, verringerte sich dessen Molekulargewicht auf 258 kDa. Als Ladekontrolle wurde Aktin detektiert, welches ein Molekulargewicht von 41,8 kDa aufweist. Wie in Abbildung 20, **B** zu sehen ist, konnte mithilfe eines α-Gfp-Antikörpers nachgewiesen werden, dass sich die Expressionslevel von Upa2¹⁻²¹²¹-Gfp und Upa2^{1-2121mGWW}-Gfp nicht

unterschieden. Zudem wiesen beide Varianten vergleichbare Degradationsbanden auf (Abbildung 20, **B**, siehe *). Dies spricht dafür, dass der Verlust der endosomalen Lokalisierung der mutierten Variante tatsächlich auf die Mutation des Tripeptids GWW zurückzuführen ist, und nicht auf eine Herabregulierung der Proteinexpression. Zudem zeigten sich für beide Varianten vergleichbare Degradationsbanden, sodass auch ein vermehrter Abbau von Upa2¹⁻²¹²mGWW-Gfp nicht der Grund für die fehlende Lokalisierung sein konnte. Der Nachweis von Aktin mithilfe eines α -Aktin-Antikörpers zeigte zusätzlich, dass vergleichbare Proteinmengen auf das SDS-Gel geladen worden sind. Somit konnte nicht nur zum ersten Mal das Volllängenprotein Upa2 in einem Western Blot detektiert werden, es wurde zudem bestätigt, dass die Mutation des Tripeptids GWW keinen negativen Einfluss auf die Expression und die Stabilität von Upa2 hat. Dieses Ergebnis belegte wiederum, dass GWW tatsächlich das für die endosomale Lokalisierung von Upa2 notwendige Motiv darstellt.

2.3.8 Eine N-terminale Verkürzung von Upa2 führt zu einer starken Akkumulation des Proteins

Durch die Herstellung verschiedener N-terminaler Verkürzungen von Upa2 fiel eine bisher in der vorliegenden Arbeit nicht vorgestellte Variante durch einen besonderen Phänotypen auf. Bei dieser Variante wurden die ersten 283 N-terminalen Aminosäuren entfernt und das Protein C-terminal mit Gfp fusioniert im endogenen Lokus exprimiert. Eine Analyse der Bipolaritätsrate ergab, dass die Variante Upa2²⁸⁴⁻²¹²¹-Gfp nur einen milden Einfluss auf die Zellmorphologie und die Etablierung einer Polaritätsachse hat, da im Vergleich zum Wildtyp nur circa 15 % der Zellen bipolar auswuchsen (Daten nicht gezeigt). Die durchgeführte Fluoreszenzmikroskopie machte jedoch deutlich, dass sich diese Proteinvariante deutlich von den anderen Varianten unterschied: In beinahe jeder untersuchten Zelle konnte, im Gegensatz zum Wildtyp, eine einzelne, sehr helle Akkumulation von Upa2²⁸⁴⁻²¹²¹-Gfp beobachtet werden (Abbildung 21, **B** und **C**). In wenigen Einzelfällen lagen zwei oder drei dieser Akkumulationen vor, welche entweder über einen längeren Zeitraum getrennt vorlagen (Abbildung 21, **D**) oder sich zu einem einzelnen Signal zusammenlagerten. In anderen Fällen konnte beobachtet werden, dass sich eine zunächst einzelne Akkumulation in mehrere Signale aufspaltete (Abbildung 21, **D**). Wurde der Kontrast während der Mikroskopie oder der nachfolgenden Auswertung stark verändert, konnten sich normal bidirektional bewegende Partikel erkannt werden (Abbildung 21, **C**). Diese wurden jedoch unter normalen Mikroskopiebedingungen von der sehr hell leuchtenden Akkumulation überlagert. Durch den nur geringen Anteil bipolarer Zellen und die weiterhin normal

beweglichen Partikel schien es, als hätte die ungewöhnliche Akkumulation von $\text{Upa2}^{284-2121}\text{-Gfp}$ einen nur schwachen Einfluss auf die Funktionalität dieser Proteinvariante. Um die Identität der Akkumulation genauer beschreiben zu können, wurden diverse Untersuchungen durchgeführt.

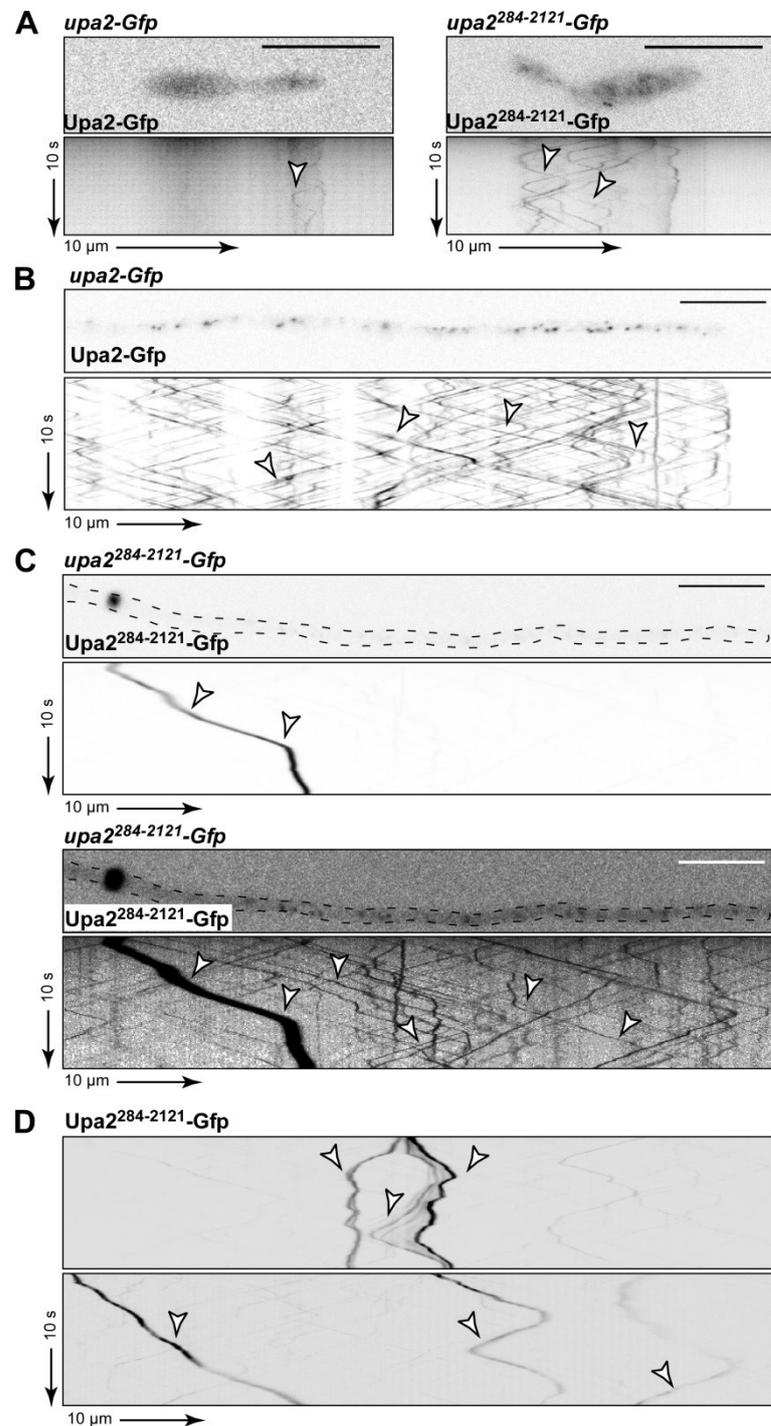


Abbildung 21: Die verkürzte Variante $\text{Upa2}^{284-2121}\text{-Gfp}$ löst eine starke Akkumulation in einzelnen Partikeln aus. A Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen und dazugehörige Kymographen von Sporidien der Stämme AB33Upa2-Gfp und AB33Upa2²⁸⁴⁻²¹²¹-Gfp. Weiße Pfeile zeigen bewegliche Partikel. Größenstandard 10 µm. **B** Fluoreszenzmikroskopische

Aufnahme und Kymograph einer Hyphe des wildtypischen Stammes AB33Upa2-Gfp. Weiße Pfeile zeigen bewegliche Partikel. Größenstandard 10 μm . **C** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen und Kymographen einer Hyphe des Stammes AB33Upa2²⁸⁴⁻²¹²¹-Gfp. Beide Aufnahmen und Kymographen zeigen dieselbe Zelle. Der obere Kymograph wurde nicht in Helligkeit oder Kontrast modifiziert. Der untere Kymograph verdeutlicht durch eine starke Veränderung des Kontrastes die Anwesenheit normal transportierter endosomaler Partikel trotz der Bildung der Akkumulation. Weiße Pfeile zeigen die Akkumulation sowie weitere bewegliche Partikel. Größenstandard 10 μm . **D** Zwei weitere beispielhafte Kymographen, welche die Akkumulation von Upa2²⁸⁴⁻²¹²¹-Gfp widerspiegeln. Oberes Paneel: Die Akkumulation spaltet sich in mehrere, kleinere Partikel auf. Unteres Paneel: In der Hyphe treten drei stärker fluoreszierende Signale gleichzeitig auf. Weiße Pfeile zeigen bewegliche Partikel.

Zunächst wurde untersucht, ob die beobachtete Akkumulation auch in Sporidien vorlag. Dies war nicht der Fall, jedoch entsprachen die Gfp-Signale in Sporidien nicht völlig denen in wildtypischen Upa2-Gfp-Sporidien. Im Vergleich zum Wildtyp zeigten sich deutlichere endosomale Einheiten (Abbildung 21, **A**). Trotzdem konnte in Sporidien keine derart große Akkumulation wie in filamentösen Zellen beobachtet werden. Um zu überprüfen, ob die Entstehung der Akkumulation abhängig vom Mikrotubuli-Zytoskelett geschieht, wurden die Zellen mit dem Inhibitor Benomyl inkubiert. Mikroskopische Analysen bestätigten eine Abhängigkeit der Akkumulation von einem intakten Mikrotubuli-System und zeigten wie bei Upa2-Gfp gleichmäßig in der Hyphe verteilte statische Signale. Die Anzahl der statischen Signale im Stamm AB33Upa2²⁸⁴⁻²¹²¹-Gfp schien jedoch geringer als deren Anzahl in wildtypischen Zellen (Abbildung 22, **A**). Wegen des Nachweises dieser Mikrotubuli-Abhängigkeit wurde vermutet, dass es sich um eine Akkumulation mit mRNP-Charakter handeln könnte. Um dies zu untermauern, wurden im Nachfolgenden Kolokalisationsstudien durchgeführt.

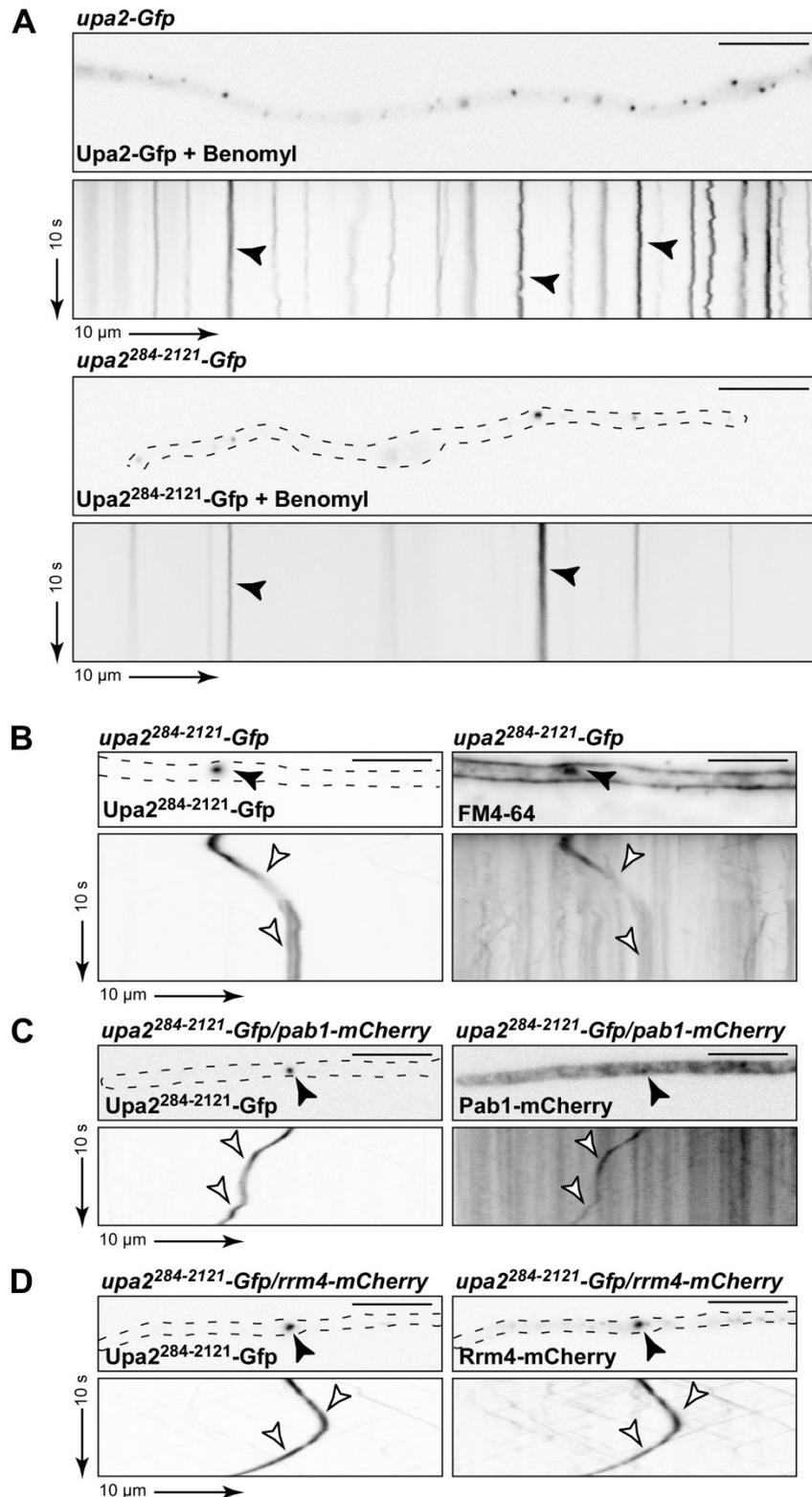


Abbildung 22: Die Akkumulation von Upa2²⁸⁴⁻²¹²¹-Gfp geschieht Mikrotubuli-abhängig und beeinflusst weitere Komponenten des endosomalen mRNA-Transports. **A** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen und dazugehörige Kymographen von Hyphen der Stämme AB33Upa2-Gfp und AB33Upa2²⁸⁴⁻²¹²¹-Gfp unter Einfluss des Inhibitors Benomyl. Schwarze Pfeile zeigen statische Partikel. Größenstandard 10 μm. **B** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen und Kymographen zur Kolokalisierung von Upa2-Gfp mit dem Farbstoff FM4-64. Die Aufnahmen und Kymographen wurden durch simultane

Zweifarbenaufnahmen erstellt. Weiße Pfeile zeigen eine Kollokalisierung an. Größenstandard 10 μm . **C** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen und Kymographen zur Kollokalisierung von Upa2-Gfp mit der endosomalen Komponente Pab1-mCherry. Die Aufnahmen und Kymographen wurden durch simultane Zweifarbenaufnahmen erstellt. Weiße Pfeile zeigen eine Kollokalisierung an. Größenstandard 10 μm . **D** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen und Kymographen zur Kollokalisierung von Upa2-Gfp mit der endosomalen Komponente Rrm4-mCherry. Die Aufnahmen und Kymographen wurden durch simultane Zweifarbenaufnahmen erstellt. Weiße Pfeile zeigen eine Kollokalisierung an. Größenstandard 10 μm .

Durch Einsatz des lipophilen Farbstoffs FM4-64 konnte gezeigt werden, dass Upa2²⁸⁴⁻²¹²¹-Gfp mit endosomalen Lipiden assoziiert vorlag (Abbildung 22, **B**). Ebenfalls wurde durch die Kollokalisierungsstämme Upa2²⁸⁴⁻²¹²¹-Gfp/Rrm4-mCherry und Upa2²⁸⁴⁻²¹²¹-Gfp/Pab1-mCherry nachgewiesen, dass die beiden endosomalen Proteine Rrm4 und Pab1 in den hell leuchtenden Partikeln vorkamen (Abbildung 22, **C** und **D**). Ob es sich um eine große vakuoläre Struktur handelte, wurde mithilfe des Farbstoffs CMAC (7-Amino-4-Chlormethylcumarin) überprüft. Dieser Farbstoff wird in der Zelle durch die S-Glutathion-Transferase mit Glutathion konjugiert und akkumuliert im Folgenden in Vakuolen (Shoji et al. 2006). Jedoch konnte keine Beteiligung vakuolärer Bestandteile erkannt werden (Daten nicht gezeigt). Somit wurde nachgewiesen, dass Upa2²⁸⁴⁻²¹²¹-Gfp eine große Akkumulation seiner selbst in den Hyphen auslöste, welche weitere nicht-veränderte mRNP-Bestandteile beeinflussen konnte. Trotz des auffälligen Phänotyps schien die Fehllokalisierung großer Proteinmengen keine starken negativen Auswirkungen auf den endosomalen mRNA-Transport zu haben.

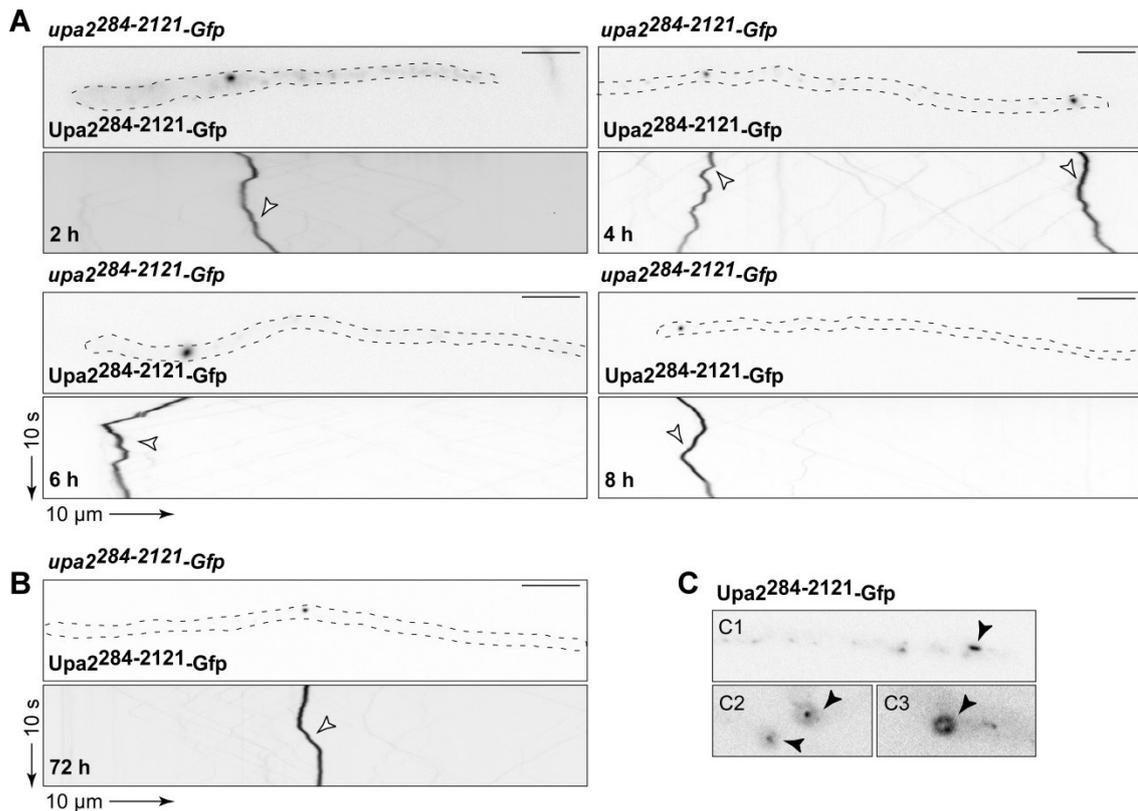


Abbildung 23: Bereits nach zwei Stunden des filamentösen Wachstums kann die Upa2²⁸⁴⁻²¹²¹-Gfp-Akkumulation beobachtet werden. **A** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen und dazugehörige Kymographen von Zellen, die Upa2²⁸⁴⁻²¹²¹-Gfp exprimieren, zu verschiedenen Zeitpunkten nach Induktion des filamentösen Wachstums. Weiße Pfeile zeigen die Akkumulation der Upa2-Variante. Größenstandard 10 µm. Der Kymograph nach 4 h zeigt zusätzlich ein Beispiel für das Vorhandensein zweier separater, größerer Upa2-Partikel. **B** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme und dazugehöriger Kymographen einer Zellen, die Upa2²⁸⁴⁻²¹²¹-Gfp exprimiert, 72 Stunden nach Induktion des filamentösen Wachstums. Weiße Pfeile zeigen die Akkumulation der Upa2-Variante. Größenstandard 10 µm. **C** Beispiele für optische Effekte, welche eine Größenbestimmung erschwert haben (schwarze Pfeile). **C1** elongierter Partikel. **C2** Lichthof um die Akkumulation. **C3** Ring-Effekt.

Es wurde zusätzlich untersucht, wie die Bildung der Akkumulation erfolgt. Zu diesem Zweck wurden Zeit-abhängige Experimente durchgeführt, bei denen induzierte Kulturen des Stammes AB33Upa2²⁸³⁻²¹²¹-Gfp nach 2, 4, 6 und 8 Stunden untersucht wurden. Mithilfe mikroskopischer Analysen wurde beobachtet, dass sich die Akkumulation bereits in jungen Filamenten bildete (Abbildung 23, **A**). Zudem wurde untersucht, ob sich die Akkumulation nach 72 Stunden des filamentösen Wachstums veränderte. Jedoch zeigte sich auch hier kein gravierender Unterschied (Abbildung 23, **B**). Die durchschnittliche Größe der Akkumulation sollte in dieser Arbeit ebenfalls ermittelt werden. Dies war jedoch nicht möglich, da es bei der Mikroskopie oft zu optischen Effekten kam (Abbildung 23, **C**): Die Akkumulation veränderte ihre

rundliche Erscheinung zu einer elongierten Form, oder es wurden Lichteffekte beobachtet, bei denen Bildbestandteile von helleren Rändern umgeben sind. Öfters fielen auch optische Effekte auf, bei denen die Akkumulation wie ein Ring aussah.

2.3.9 Die endosomale Lokalisierung von Upa2 ist mRNA-abhängig

Für ein besseres Verständnis der Rolle von Upa2 im mRNP-Komplex war es notwendig, die Wechselwirkungen zwischen Rrm4 und den Komponenten Upa1 und Pab1 im Vergleich zu Upa2 zu analysieren. Dazu wurden die Proteine Upa1-Gfp, Pab1-Gfp und Upa2-Gfp in Stämmen mit einem *rrm4Δ*-Hintergrund untersucht (Abbildung 24).

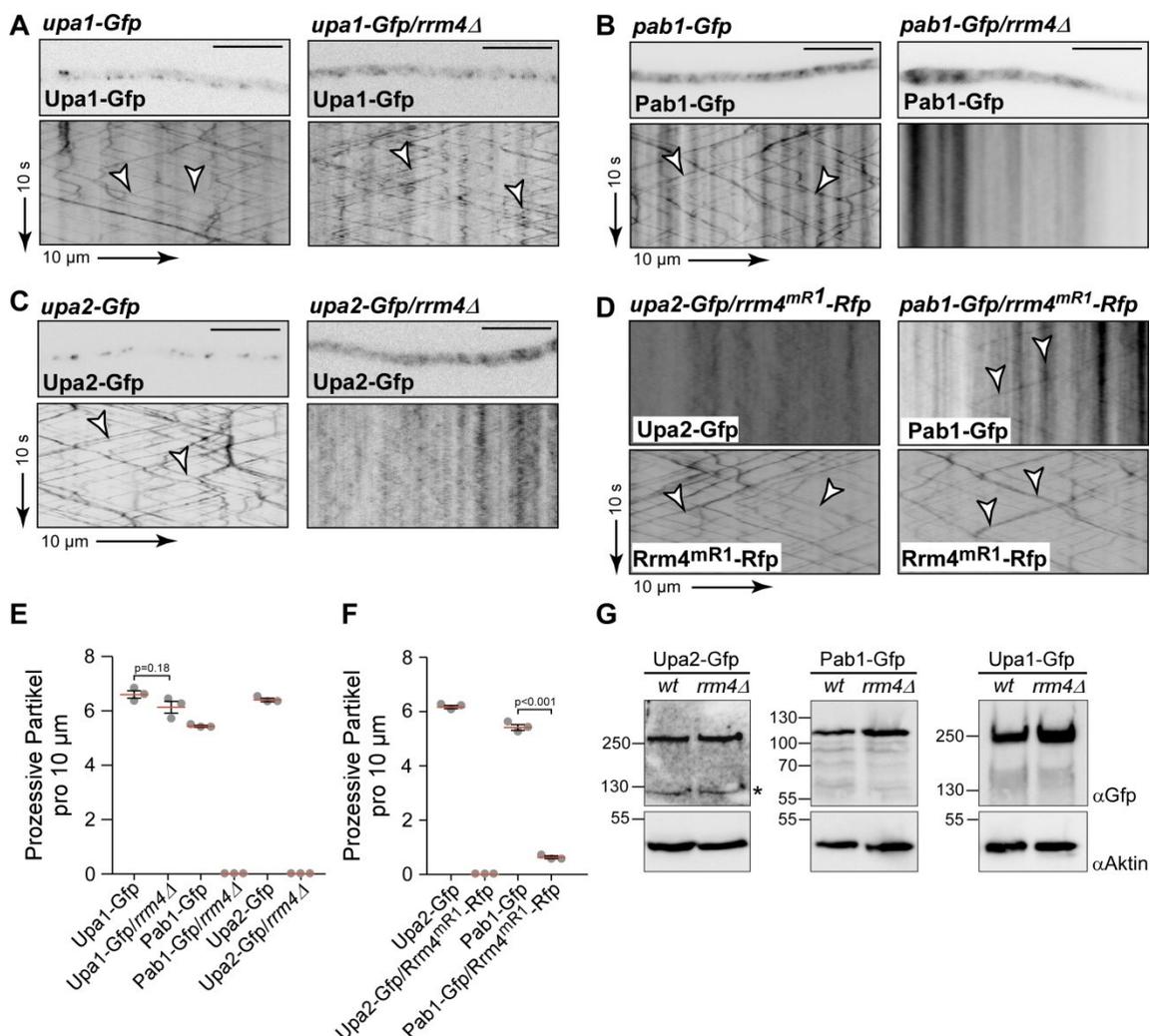


Abbildung 24: Die Upa2-Lokalisierung wird von der Anwesenheit eines funktionalen Rrm4 beeinflusst. A B C Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen und Kymographen von Zellen der Stämme AB33Upa1-Gfp, AB33Pab1-Gfp und AB33Upa2-Gfp, jeweils im Vergleich mit den entsprechenden *rrm4*-defizienten Stämmen. Alle untersuchten Proteine lokalisieren im

Wildtyp in transportierten Einheiten. Während die *rrm4*-Deletion den Transport von Upa1-Gfp nicht behindert, lassen sich bei Verlust von Rrm4 keine transportierten Pab1-Gfp- und Upa2-Gfp-Partikel beobachten. Größenstandard 10 μ m. Weiße Pfeile zeigen mobile Partikel. **D** Kymographen zur Kolkalisierung von Upa2-Gfp bzw. Pab1-Gfp mit Rrm4^{mR1}-Rfp. Die Kymographen wurden durch simultane Zweifarbaufnahmen erstellt. Weiße Pfeile zeigen bewegliche Partikel und im Falle von Pab1-Gfp und Rrm4^{mR1}-Rfp Kolkalisierungsereignisse an. **E** Anzahl der prozessiven Upa1-Gfp-, Pab1-Gfp-, sowie Upa2-Gfp-Partikel in wildtypischen und den entsprechenden *rrm4*-defizienten Stämmen pro 10 μ m Hyphenlänge. Die Daten stammen aus drei unabhängigen Experimenten. Pro Experiment und Stamm wurden 10 Hyphen analysiert. Die Fehlerbalken stellen den Standardfehler dar. Die rote Linie repräsentiert den Mittelwert. Ungepaarter zweiseitiger t-Test, Signifikanzniveau $p = 0,05$. **F** Anzahl der prozessiven Upa2-Gfp- und Pab1-Gfp-Partikel pro 10 μ m Hyphenlänge in Stämmen, welche Rrm4^{mR1}-Rfp exprimieren. Die Daten stammen aus drei unabhängigen Experimenten. Pro Experiment und Stamm wurden 10 Hyphen analysiert. Die Fehlerbalken stellen den Standardfehler dar. Die rote Linie repräsentiert den Mittelwert. Ungepaarter zweiseitiger t-Test, Signifikanzniveau $p = 0,05$. **G** Western Blot-Analyse zur Überprüfung der Expressionslevel in wildtypischen und *rrm4*-defizienten Stämmen. Linke Spur, Upa2-Gfp, Pab1-Gfp bzw. Upa1-Gfp im Wildtyp-Hintergrund; rechte Spur, Upa2-Gfp, Pab1-Gfp bzw. Upa1-Gfp im *rrm4*-defizienten Hintergrund. Oberes Paneel: α -Gfp-Nachweis von Upa2-Gfp, 259 kDa; Pab1-Gfp, 98 kDa; Upa1-Gfp, 166 kDa. Unteres Paneel: α -Aktin-Nachweis der Ladekontrolle Aktin, 41,8 kDa. Abbildung modifiziert aus Jankowski et al., 2019 (Fig. 4, EV2E).

Bereits in der früheren Arbeit von Thomas Pohlmann (2013) konnte gezeigt werden, dass Upa1-Gfp trotz des Verlusts von Rrm4 in der Lage ist, auf frühen Endosomen zu lokalisieren. Für Upa1 konnte also geschlussfolgert werden, dass es sich Rrm4- und somit mRNA-unabhängig auf Endosomen befindet (Abbildung 24, **A**). Damit übereinstimmend wurde in AB33Upa1-Gfp und AB33Upa1-Gfp/*rrm4* Δ eine vergleichbare Anzahl prozessiver Partikel beobachtet (Abbildung 24, **E**). Im Fall von Pab1 bewirkte dagegen der Verlust von Rrm4, dass Pab1 nicht mehr auf Endosomen mittransportiert wurde, da ohne das Schlüssel-RNA-Bindeprotein keine mRNA-Fracht gebunden wird (Abbildung 24, **E**). Stattdessen zeigte sich ein Pab1-Gfp-Gradient, welcher zu den Hyphenspitzen hin schwächer wurde (Abbildung 24, **B**). Auf Upa2-Gfp wirkte sich die *rrm4*-Deletion ebenfalls negativ aus. So konnten im Stamm AB33Upa2-Gfp/*rrm4* Δ keine beweglichen Upa2-Gfp-Signale detektiert werden (Abbildung 24, **C**). Es wurde vermutet, dass die Abwesenheit beweglicher Upa2-Partikel im *rrm4* Δ -Hintergrund durch eine Herabregulierung der *upa2*-Expression zustande kommen könnte. Um dies zu überprüfen, wurden Zellextrakte der Stämme AB33Upa2-Gfp und AB33Upa2-Gfp/*rrm4* Δ einer Western Blot-Analyse unterzogen. Als Kontrollen wurden zusätzlich die Stämme AB33Upa1-Gfp und AB33Pab1-Gfp mit den

entsprechenden *rrm4*-defizienten Stämmen verglichen. Bei diesen vergleichenden Analysen wurde für Upa2-Gfp eine molekulare Masse von 258 kDa erwartet, während Upa1-Gfp eine Größe von 166 kDa und Pab1-Gfp eine Größe von 98 kDa aufweisen sollten. Durch die Western Blot-Analytik (Abbildung 24, **F**) konnte mithilfe der den Vorhersagen entsprechenden Proteinbanden gezeigt werden, dass der Verlust von Rrm4 keine negativen Effekte auf die Expression der endosomalen Komponenten Upa1, Upa2 und Pab1 hatte, da sich in allen untersuchten Stämmen die Proteinmengen nicht gravierend voneinander unterschieden. Eine gleichmäßige Beladung der Blots wurde mithilfe eines α -Aktin-Antikörpers kontrolliert. Für eine noch genauere Analyse der Abhängigkeit von Rrm4 und Upa2 wurden zudem die Stämme AB33Upa2-Gfp/Rrm4^{mr1}-Rfp und AB33Pab1-Gfp/Rrm4^{mr1}-Rfp (S. Baumann, 2014) untersucht. Diese Stämme exprimieren neben Upa2-Gfp bzw. Pab1-Gfp ein C-terminal mit Rfp fusioniertes Rrm4, welches Mutationen in der ersten RRM-Domäne enthält. Hier wurden die konservierten Aminosäuren TVEF (Threonin, Valin, Glutamat, Phenylalanin; Aminosäure-Positionen 116-119) im RNP2-Motiv von RRM1 durch vier aufeinanderfolgende Alanine ersetzt. Durch diese Mutation wird die mRNA-Bindekapazität von Rrm4^{mr1} drastisch reduziert (Becht et al. 2006). Die Analyse der Stämme machte deutlich, dass keine Upa2-Gfp-Signale auf Endosomen aufzufinden waren. Im Vergleich dazu hatte die RRM1-Mutation einen geringeren Effekt auf die Bewegung von Pab1, da dieses noch auf Endosomen detektiert werden konnte (Abbildung 24, **D**). Jedoch war hier eine deutliche Reduktion der Pab1-Gfp-Signale im Vergleich zum Wildtypen zu sehen. Somit wurde gezeigt, dass Upa2 nicht nur Rrm4-abhängig auf Endosomen rekrutiert wird, sondern dass insbesondere die RNA-Bindfähigkeit von Rrm4 eine große Rolle bei diesem Prozess spielt.

2.3.10 Der Verlust von Upa2 beeinflusst die Funktion von mRNPs

Nachdem eine Beteiligung von Upa2 am endosomalen Transport und dessen mRNA-Abhängigkeit gezeigt worden war, sollte in weiteren Experimenten analysiert werden, welche Auswirkung die Deletion von *upa2* auf andere endosomale Komponenten hat. Während früherer Arbeiten zeigte sich, dass die Septine Cdc3, Cdc10, Cdc11 und Cdc12 auf den frühen Endosomen zusammen mit ihren mRNAs transportiert werden (Baumann et al. 2012; Baumann et al. 2014; Zander et al. 2016). Zudem konnten die Proteine in Filamenten und Ringstrukturen in Hyphen nachgewiesen werden, und eine graduell zunehmende Lokalisation an der Hyphenspitze zeigte die Involvierung der Septine in die Etablierung der Wuchsrichtung

der Zellen (Zander et al. 2016). Mithilfe der Stämme AB33Cdc3-Gfp und AB33Cdc3-Gfp/*upa2* Δ , welche Cdc3 N-terminal mit Gfp fusioniert exprimieren, konnte gezeigt werden, dass der Verlust von Upa2 zu einer gestörten Lokalisation von Cdc3-Gfp führt. Das Septin konnte zwar noch in Septinfilamenten nachgewiesen werden, diese zeigten jedoch ein im Vergleich zum Wildtyp schwächeres Fluoreszenzsignal. Außerdem konnte kein Septingradient zur Zellspitze beobachtet werden, und Cdc3-Gfp wurde nicht auf Endosomen transportiert (Abbildung 25, **A**). Durch Darstellung von Hyphenspitzen mit Falschfarben und durch Messung der relativen Fluoreszenzintensität in einem Bereich von 10 μ m von der Zellspitze ausgehend konnte der signifikante Verlust der normalerweise zur Wachstumszone hin zunehmenden Septinkonzentration bestätigt werden (Abbildung 25, **B**). Um zu überprüfen, ob diese Fehllokalisierung von Cdc3 in einem Zusammenhang mit einem gestörten Transport mit der *cdc3*-mRNA steht, wurden RNA-Lebendzell-Untersuchungen durchgeführt (Baumann et al. 2014). Die dazu erforderliche Stammherstellung, die Mikroskopie sowie deren Auswertung wurden im Rahmen der Publikation von Kira Müntjes durchgeführt. Zusätzlich wurden im Rahmen dieser Untersuchungen weitere Rrm4-spezifische mRNA-Zielsequenzen bezüglich ihrer Upa2-Abhängigkeit analysiert (Abbildung 25, **D-G**). Hierbei wurden in die 3'UTR der jeweiligen mRNA (*ubi1*, *rho3*, *cdc3*, *cdc12*) 16 RNA-Haarnadelstrukturen integriert (*boxB loops*). Gleichzeitig wurde λ N bzw. λ N*, ein (modifiziertes) RNA-Bindeprotein aus dem Phagen λ , exprimiert. Dieses Bindeprotein konnte die in die 3'UTR eingefügten Haarnadelstrukturen erkennen und mit ihnen interagieren. Durch die Fusion von drei Gfp an λ N bzw. λ N* wurde die gebundene mRNA indirekt mit Gfp markiert und konnte durch Fluoreszenzmikroskopie *in vivo* beobachtet werden. In den entsprechenden Stämmen wurde das Gen *upa2* deletiert und der mRNA-Transport vergleichend analysiert. Dazu wurde die Anzahl der beobachteten mRNAs, deren Transportgeschwindigkeit und ihre Transportreichweite untersucht. Für den Stamm AB33cdc3B¹⁶/ λ N*-Gfp³ ergab sich eine durchschnittliche Anzahl von 1,9 aktiv transportierten mRNAs pro 100 μ m Zelllänge, wohingegen in dem Stamm AB33cdc3B¹⁶/ λ N*-Gfp³/*upa2* Δ nur circa 1,0 mRNAs pro 100 μ m Zelllänge beobachtet werden konnten. Der Stamm AB33cdc12B¹⁶/ λ N*-Gfp³ enthielt durchschnittlich 1,1 bewegliche mRNA-Partikel, und die *upa2*-Deletion führte zu einer Reduktion der Anzahl auf 0,4 Partikel pro 100 μ m Hyphe (Abbildung 25, **E**). Im Stamm AB33rho3B¹⁶/ λ N-Gfp³ konnten 2,3 transportierte mRNAs beobachtet werden. Im Vergleich dazu fanden sich im Stamm AB33rho3B¹⁶/ λ N-Gfp³/*upa2* Δ nur 1,3 aktiv transportierte mRNAs pro 100 μ m. Im Stamm AB33ubi1B¹⁶/ λ N-Gfp³ wurden 2,4 mRNAs unter Wildtypbedingungen und nur 1,3 mRNAs im *upa2*-defizienten

Hintergrund ermittelt. Die Geschwindigkeiten aller untersuchten mRNAs, egal ob im Wildtyp- oder Deletionshintergrund, unterschieden sich nicht signifikant (Abbildung 25, **G**). Jedoch wurde gezeigt, dass im *upa2*-Deletionshintergrund die verbleibenden transportierten *rho3*- und *cdc3*-mRNAs über eine geringere Distanz transportiert wurden (Abbildung 25, **F**). Somit konnte zusammenfassend nachgewiesen werden, dass die Deletion von *upa2* eine Auswirkung auf den Transport diverser Rrm4-Ziel-mRNAs sowie auf die Lokalisation des Septins Cdc3 hat.

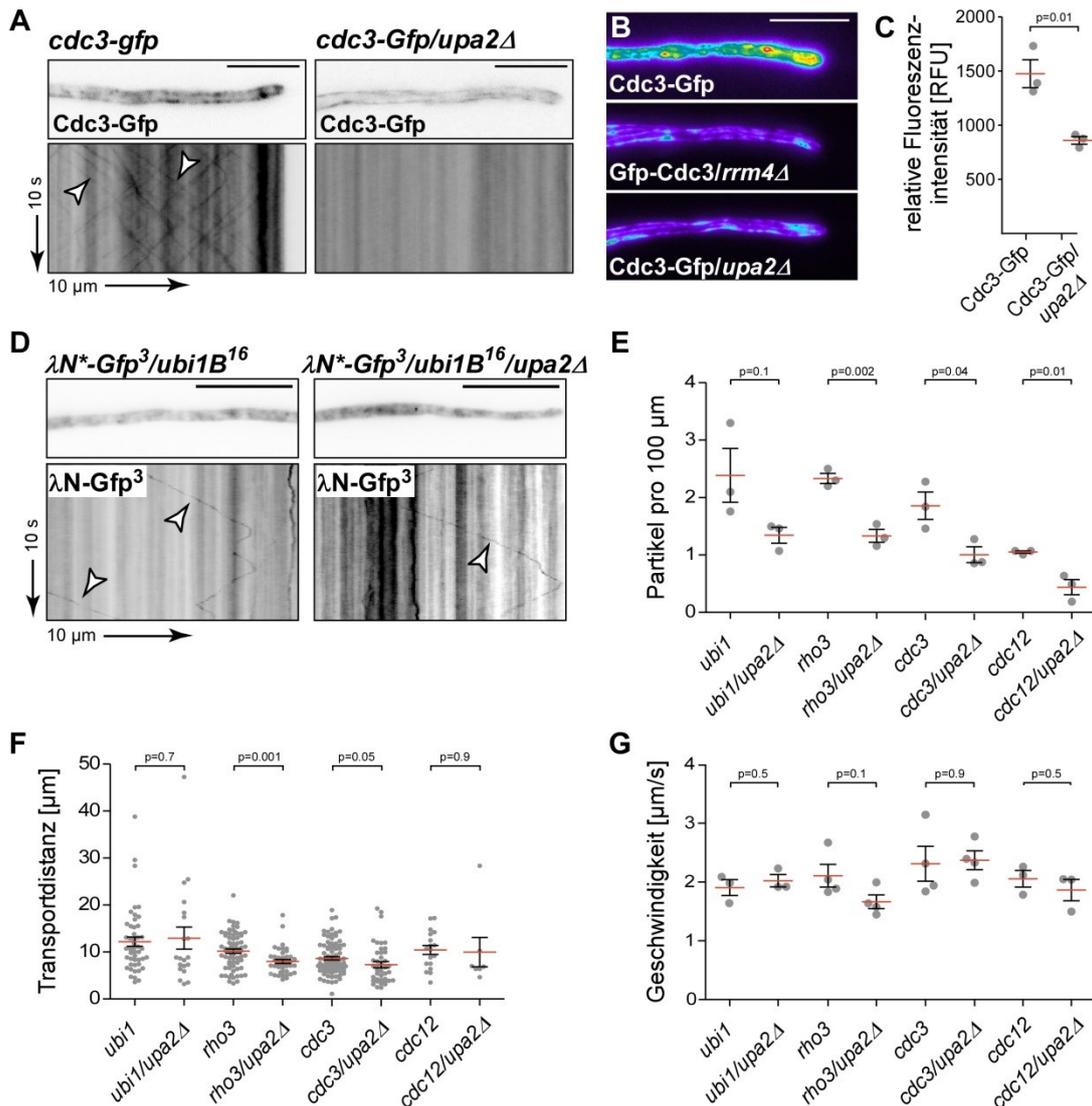


Abbildung 25: Die Deletion von *upa2* beeinflusst die Lokalisierung von Cdc3-Gfp sowie den Transport diverser mRNAs. **A** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen und dazugehörige Kymographen der Stämme AB33Cdc3-Gfp und AB33Cdc3-Gfp/*upa2Δ*. Größenstandard 10 µm. Weiße Pfeile zeigen bewegliche Partikel. **B** Darstellung von Hyphenspitzen in Falschfarben. Gezeigt sind die Stämme AB33Cdc3-Gfp, AB33Cdc3-Gfp/*upa2Δ* und AB33Cdc3-Gfp/*rrm4Δ*. Größenstandard 10 µm. **C** Relative Fluoreszenzintensität in einem 10 µm-Bereich von der Hyphenspitze. Die Daten stammen aus drei unabhängigen Experimenten. Pro Experiment und Stamm wurden 10 Hyphen analysiert. Die Fehlerbalken stellen den Standardfehler dar. Die rote

Linie repräsentiert den Mittelwert. Ungepaarter zweiseitiger t-Test, Signifikanzniveau $p = 0,05$.

D Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von Hyphen des Stamms AB33 λ N*-Gfp³/ubi1B¹⁶ und AB33 λ N*-Gfp³/ubi1B¹⁶/upa2 Δ und dazugehörige Kymographen. Weiße Pfeile markieren transportierte mRNA. Größenstandard 10 μ m. **E** Anzahl der prozessiven mRNA-Partikel in wildtypischen und den entsprechenden *upa2*-defizienten Stämmen pro 100 μ m Hyphenlänge. Die Daten stammen aus drei unabhängigen Experimenten. Pro Experiment und Stamm wurden mindestens 7 Hyphen analysiert. Die Fehlerbalken stellen den Standardfehler dar. Die rote Linie repräsentiert den Mittelwert. Ungepaarter zweiseitiger t-Test, Signifikanzniveau $p = 0,05$.

F Transportdistanz der beobachteten mRNA-Partikel in wildtypischen und den entsprechenden *upa2*-defizienten Stämmen. Die Daten stammen aus drei unabhängigen Experimenten. Pro Experiment und Stamm wurden mindestens 7 Hyphen analysiert. Die Fehlerbalken stellen den Standardfehler dar. Die rote Linie repräsentiert den Mittelwert. Ungepaarter zweiseitiger t-Test, Signifikanzniveau $p = 0,05$.

G Transportgeschwindigkeiten der beobachteten mRNA-Partikel in wildtypischen und den entsprechenden *upa2*-defizienten Stämmen. Die Daten stammen aus drei unabhängigen Experimenten. Pro Experiment und Stamm wurden mindestens 7 Hyphen analysiert. Es wurden die Geschwindigkeiten der Partikel in die Berechnung mit einbezogen, welche über eine Distanz von mindestens 3 μ m prozessive Bewegung zeigten. Die Fehlerbalken stellen den Standardfehler dar. Die rote Linie repräsentiert den Mittelwert. Ungepaarter zweiseitiger t-Test, Signifikanzniveau $p = 0,05$. Abbildung 25, **D-G** erstellt von Kira Müntjes, mit Genehmigung in der vorliegenden Arbeit gezeigt. Abbildung modifiziert aus Jankowski et al., 2019 (Fig. 6D-I, EV4E).

Die Deletion von *upa2* zeigte neben Effekten auf den mRNA-Transport ebenfalls Einflüsse auf die bereits beschriebenen endosomalen Komponenten Rrm4, Pab1, Upa1 und Rab5a. Durch den Vergleich der wildtypischen Stämme mit den entsprechenden *upa2*-defizienten Mutanten konnten über die Anzahl transportierter Partikel und deren Geschwindigkeit Aussagen über den Einfluss von Upa2 getroffen werden.

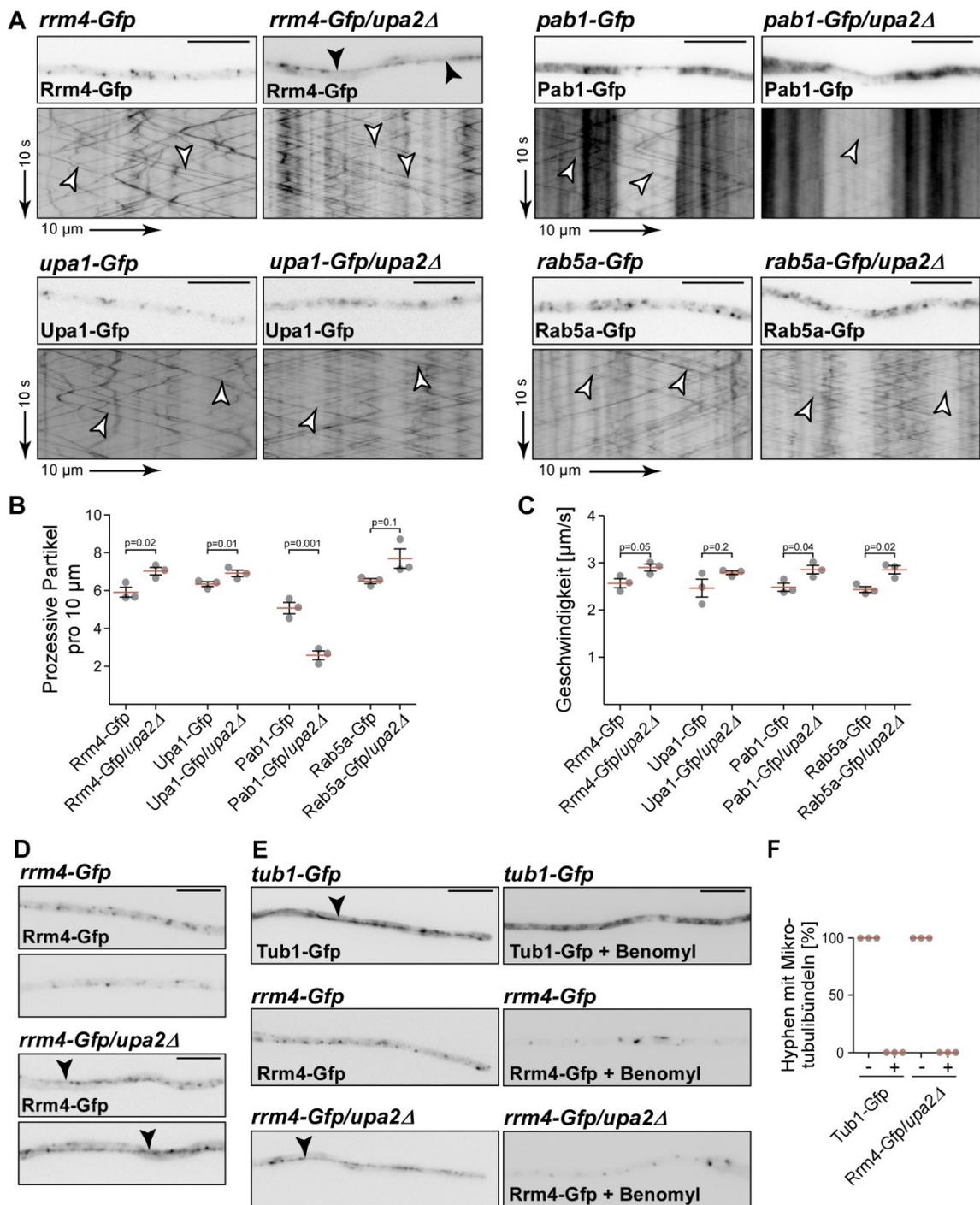


Abbildung 26: Die Deletion von *upa2* beeinträchtigt endosomale mRNP-Komponenten und deren Organisation. **A** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen und die dazugehörigen Kymographen von wildtypischen Stämmen im Vergleich zu den entsprechenden *upa2*-defizienten Mutanten. Weiße Pfeile zeigen bewegliche Partikel, schwarze Pfeile zeigen auffällig markierte Strukturen. Größenstandard 10 μm. **B** Anzahl der prozessiven Rrm4-Gfp-, Upa1-Gfp-, Pab1-Gfp- sowie Rab5a-Gfp-Partikel in wildtypischen und den entsprechenden *upa2*-defizienten Stämmen pro 10 μm Hyphenlänge. Die Daten stammen aus drei unabhängigen Experimenten. Pro Experiment und Stamm wurden 10 Hyphen analysiert. Die Fehlerbalken stellen den Standardfehler dar. Die rote Linie repräsentiert den Mittelwert. Ungepaarter zweiseitiger t-Test, Signifikanzniveau p = 0,05. **C** Transportgeschwindigkeiten der

prozessiven Rrm4-Gfp-, Upa1-Gfp-, Pab1-Gfp- sowie Rab5a-Gfp-Partikel in wildtypischen und den entsprechenden *upa2*-defizienten Stämmen. Die Daten stammen aus drei unabhängigen Experimenten. Pro Experiment und Stamm wurden 10 Hyphen analysiert. Die Fehlerbalken stellen den Standardfehler dar. Die rote Linie repräsentiert den Mittelwert. Ungepaarter zweiseitiger t-Test, Signifikanzniveau $p = 0,05$. **D** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von je zwei exemplarischen Hyphen der Stämme AB33Rrm4-Gfp und AB33Rrm4-Gfp/*upa2* Δ . Schwarze Pfeile markieren auffällige Strukturen. Größenstandard 10 μm . **E** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der Stämme AB33Tub1-Gfp, AB33Rrm4-Gfp und AB33Rrm4-Gfp/*upa2* Δ unter normalen Wachstumsbedingungen sowie unter Einfluss des Inhibitors Benomyl. Schwarze Pfeile markieren auffällige Strukturen. Größenstandard 10 μm . **F** Prozentualer Anteil der Hyphen, in denen die auffälligen Strukturen erkennbar waren. Die beiden Stämme AB33Tub1-Gfp und AB33Rrm4-Gfp/*upa2* Δ sind jeweils ohne (-) und mit (+) Benomyl inkubiert und analysiert worden. Die Daten stammen aus drei unabhängigen Experimenten. Pro Experiment und Stamm wurden 10 Hyphen analysiert. Abbildung modifiziert aus Jankowski et al., 2019 (Fig. 6A-C, EV4A-C).

Im Stamm AB33Rrm4-Gfp/*upa2* Δ zeigte sich eine leicht erhöhte Anzahl an transportierten Rrm4-Gfp-Signalen sowie eine leichte Zunahme der Transportgeschwindigkeit im Vergleich zu AB33Rrm4-Gfp (Abbildung 26, **A-C**). Zudem fiel auf, dass Rrm4-Gfp bei *Upa2*-Verlust offenbar dazu tendiert, stärker auf einzelnen Mikrotubuli-Bündeln zu akkumulieren als im Wildtyp (Abbildung 26, **D-F**). Pro Hyphe konnten ein bis zwei, durch mehr Rrm4-Gfp markierte Bündel beobachtet werden. Um zu bestätigen, dass es sich tatsächlich um Mikrotubuli handelte, wurden vergleichende Analysen der Stämme AB33Tub1-Gfp, AB33Rrm4-Gfp und AB33Rrm4-Gfp/*upa2* Δ durchgeführt (Abbildung 26, **E**). AB33Tub1-Gfp exprimiert hierbei ektoptisch im *ip*^S-Lokus eine N-terminale Fusion von Gfp an das Protein Tub1, welches einen Baustein der Mikrotubuli darstellt und auch als α -Tubulin bekannt ist (Fink und Steinberg 2006). Zusammen mit β -Tubulin bildet es Heterodimere, welche polymerisieren und sich schlussendlich zu helikalen Mikrotubuli zusammenlagern (Verhey und Gaertig 2007; Verhey und Hammond 2009). Durch die Gfp-Fusion konnten pro Hyphe bis zu vier Mikrotubuli-Bündel erkannt werden, welche nach 30-minütiger Behandlung mit Benomyl nicht mehr detektierbar waren. Genauso wurde im Kontrollstamm AB33Rrm4-Gfp die Mikrotubuli-Abhängigkeit des endosomalen Transports nachgewiesen. Im Stamm AB33Rrm4-Gfp/*upa2* Δ zeigte sich durch Verwendung von Benomyl, dass die abnormal starke Lokalisierung von Rrm4-Gfp tatsächlich auf Mikrotubuli basierte (Abbildung 26, **E** und **F**). Für die endosomale Komponente Upa1-Gfp zeigte sich wie für Rrm4-Gfp eine leicht erhöhte Anzahl prozessiver Partikel bei Verlust von *Upa2*, während sich die Geschwindigkeit der

Partikel nicht signifikant erhöhte. Im Falle von Rab5a-Gfp, einem Markerprotein für frühe Endosomen, konnte keine signifikante Veränderung der Partikelanzahl, jedoch eine leicht erhöhte Transportgeschwindigkeit festgestellt werden (Abbildung 26, **A-C**). Durch die in dieser Arbeit ermittelten Werte konnte keine klare statistische Signifikanz erkannt werden, jedoch wurden die Ergebnisse als Trend dafür gewertet, dass der Verlust von Upa2 die Bildung von mRNPs negativ beeinflusste. Für Pab1-Gfp dagegen zeigte sich eine stärkere Auswirkung der *upa2*-Deletion. Hier wurde nicht nur eine leicht erhöhte Geschwindigkeit fluoreszenzmarkierter Partikel ermittelt (Abbildung 26, **C**), sondern auch eine signifikante Reduktion der Partikelanzahl um circa 50 % im Vergleich zum Wildtyp (Abbildung 26, **B**). Prozessive Partikel zeigten zudem eine abgeschwächte Signalintensität. Die in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse unterstreichen somit zusammenfassend die Involvierung von Upa2 in den endosomalen mRNA-Langstreckentransport in *U. maydis* sowie dessen Beteiligung zur Gewährleistung eines stabilen und effizienten Transportvorgangs.

3 Diskussion

Der effiziente Langstreckentransport von mRNAs in *U. maydis* benötigt eine Vielzahl von Proteinen, die sich in funktionale Einheiten, die mRNPs genannt werden, organisieren. Darunter fallen RNA-Bindeproteine, deren mRNA-Fracht und weitere akzessorische Faktoren. Als zentrales Protein wurde hierbei das RRM- und MLLE-Domänen tragende Protein Rrm4 identifiziert. Als Transportvehikel für Rrm4-abhängige mRNPs dienen Rab5a-positive Endosomen, welche mithilfe von Motorproteinen durch die Zelle bewegt werden. Die beiden prägnant mit mRNPs assoziierten RNA-Bindeproteine Rrm4 und Pab1 besitzen MLLE-Domänen, welche für eine Interaktion mit PAM2-Motiven verantwortlich sind. Um den Einfluss von PAM2-Motiv-tragenden Proteinen auf den mRNA-Langstreckentransport zu untersuchen, wurden durch eine bioinformatische Vorhersage 14 potentielle PAM2-Proteine in *U. maydis* vorhergesagt. Bereits in der vorangegangenen Arbeit von (Thomas Pohlmann 2013) wurde das Protein Upa1 intensiv untersucht und es konnte ein Einfluss dessen auf den Rrm4-abhängigen mRNA-Transport aufgedeckt werden. Zudem ergaben Vorarbeiten mit Upa2 ebenfalls einen Hinweis auf eine Beteiligung an diesem Prozess.

In der vorliegenden Arbeit konnte diese Vermutung bestätigt und Upa2 näher charakterisiert werden. Aufgrund der Analyse entsprechender Deletionsmutanten wurde neben Upa2 ein weiterer interessanter Kandidat gefunden, der als peroxisomales Protein identifiziert werden konnte. Trotz der Inkorporierung in Peroxisomen konnte ein gelegentlicher Ko-Transport von Upa9 und Rrm4 gezeigt werden, welcher einen Hinweis auf eine strukturelle Verbindung zwischen dem Transport früherer Endosomen und dem Transport der Peroxisomen lieferte. Weitere potentielle PAM2-Proteine konnten in dieser Arbeit als wichtige Komponenten des mRNA-Transports in *U. maydis* ausgeschlossen werden.

Das Multi-PAM2-Protein Upa2 stellte aufgrund der Anzahl seiner PAM2-Motive eine Besonderheit dar und wurde in dieser Arbeit genauer charakterisiert. Trotz dieser bemerkenswerten Anzahl an PAM2-Motiven konnte gezeigt werden, dass sie für die Funktion von Upa2 nicht essentiell sind. Stattdessen wurde eine N-terminal gelegene Region identifiziert, welche Funktionalität von Upa2 im Komplex zu vermitteln scheint. Zusätzlich zeigte sich, dass das Tripeptid GWW am C-Terminus von Upa2 für die Rekrutierung des Proteins in den mRNP-Komplex essentiell ist. Somit konnten in Upa2 zwei wichtige Regionen bestimmt werden, welche unterschiedliche Aufgaben erfüllen. Zudem wurde deutlich, dass das Vorhandensein beider Regionen notwendig ist, um einen effizienten mRNA-Transport zu ermöglichen.

3.1 Die Rolle von PAM2-Motiv-tragenden Proteinen im Rrm4-abhängigen Langstreckentransport

Durch eine gezielte bioinformatische Suche nach PAM2-Motiv-tragenden Proteinen im Genom von *U. maydis* wurden 14 potentielle Kandidaten identifiziert. Für Upa1 konnte eine wesentliche Funktion im RNA-Langstreckentransport nachgewiesen werden (Pohlmann et al. 2015). Vorarbeiten gaben zudem Hinweise auf eine wichtige Rolle, die Upa2 in diesem Prozess einnimmt. Upa2 wurde somit in dieser Arbeit näher untersucht (siehe unten). Der dritte Kandidat Upa3 kann nach einer Deletionsanalyse und mikroskopischen Untersuchung der subzellulären Lokalisation als nicht am RNA-Transport beteiligt beschrieben werden (Marvin Korries und Thomas Pohlmann, unveröffentlicht). Dass Upa3 eine Rrm4-unabhängige Funktion hat, legt auch die Konservierung dieses Proteins in Organismen nahe, die keinen Rrm4-abhängigen mRNA-Transport besitzen. So sind das Upa3-Homolog Pbp1p aus *S. cerevisiae* sowie das humane Homolog Ataxin-2 in der Bildung von Stressgranula und *p-bodies* beteiligt (Nonhoff et al. 2007; Buchan et al. 2008). Interessanterweise besitzt Pbp1p im Gegensatz zu Ataxin-2 kein PAM2-Motiv (Albrecht und Lengauer 2004), obwohl es mit dem C-Terminus des Poly(A)-bindenden Proteins in *S. cerevisiae* interagiert (Mangus et al. 1998). Ebenso zeigte sich für den Kandidaten Upa5 nach einer Deletionsanalyse kein Hinweis auf eine Beteiligung am RNA-Transport. Obwohl Orthologe zu Upa5 nur in weiteren nah verwandten Spezies aus der Familie der Basidiomyceten gefunden wurden, scheint es keine Rolle beim Langstreckentransport zu spielen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die verbliebenen potentiellen PAM2-Proteine in *U. maydis* hinsichtlich einer möglichen Beteiligung am mRNA-Transport untersucht. Die Deletionen weiterer Kandidaten zeigte aufgrund des Fehlens einer erhöhten Bipolaritätsrate keine klaren Hinweise auf Störungen des mRNA-Transports. Da das potentielle PAM2-Protein Upa4 nicht in weiteren Phyla aufzufinden war, lag zunächst die Annahme nahe, dass dieses Protein Basidiomyceten-spezifisch eine Rolle beim Endosomen-gekoppelten mRNA-Transport spielen könnte. Die Deletion von *upa4* führte jedoch zu keinen morphologischen Auffälligkeiten, da 95,1 % der Hyphen unipolar auswuchsen. Orthologe zu Upa4 wurden, ähnlich wie im Fall von Upa5, nur in nah verwandten Spezies wie *Ustilago hordei* oder *Sporisorium reilianum* gefunden. Weiter definierbare, konservierte Domänen konnten mithilfe von bioinformatischen Werkzeugen und Datenbanken nicht ermittelt werden. Somit scheint Upa4 in *U. maydis* eine Rolle zu spielen, welche sich nicht in Defekten der Morphologie und des mRNA-Transports widerspiegelt. Deshalb schied es für eine weitere Analyse im Rahmen der vorliegenden Arbeit aus. Da für die Kandidaten Upa6, Upa7, Upa10 und

Upa13 Homologe in entfernteren Organismen aus verschiedenen Phyla gefunden werden konnten, erschien es ebenfalls unwahrscheinlich, dass diese Proteine eine spezifische Rolle im Rrm4-vermittelten endosomalen mRNA-Transport spielen würden, welcher für Basidiomyceten typisch ist. Der Verlust von Upa6 führte mit 93,4 % unipolaren Zellen ebenfalls zu einem dem Wildtyp entsprechenden Phänotyp. Das dazugehörige Homolog THOC7 aus *D. melanogaster* ist eine Untereinheit des THO-Komplexes, welcher für einen effizienten Export polyadenylierter RNA notwendig ist. Es ist jedoch nicht in *S. cerevisiae* auffindbar (Rehwinkel et al. 2004). Da der THO-Komplex in Metazoa zu finden ist, erschien es für *U. maydis* unwahrscheinlich, dass diese Komponente eine Verbindung zum endosomalen mRNA-Transport aufwies. Im Gegensatz zu den Deletionen von *upa4* und *upa6* führte der Verlust von Upa7 zu einem geringfügigen Anstieg der Bipolaritätsrate auf 12,6 %. Ein zu Upa7 auffindbares Homolog ist CID7 aus *Arabidopsis thaliana*, welches ebenfalls ein PAM2-Motiv besitzt und als PABP-interagierendes Protein 7 bekannt ist (Bravo et al. 2005). Sowohl CID7 als auch Upa7 besitzen eine Domäne unbekannter Funktion (DUF1771) wie auch eine SMR (*small mutS-related*)-Domäne (Jiménez-López et al. 2015). Letztere gibt Hinweise auf eine mögliche Beteiligung in der Rekombination sowie Reparatur von DNA (Fukui und Kuramitsu 2011). Es könnte somit möglich sein, dass dieser Anstieg der Bipolaritätsrate im Stamm mit einer *upa7*-Deletion im Zusammenhang mit einer möglichen Interaktion mit dem Poly(A)-Bindeprotein Pab1 oder einer Beteiligung an DNA-Reparaturprozessen steht. Jedoch sprach ein Anteil bipolarer Hyphen von 12,6 %, verglichen mit dem Verlust von *rrm4* oder *upa2*, gegen eine direkte Beteiligung von Upa7 am endosomalen mRNA-Transport, da diese einen höheren Anteil aufwiesen (Abbildung 6, **C**). Wäre dieser wichtige Prozess direkt betroffen gewesen, wären Bipolaritätsraten ab 40 % erwartet worden. Eventuell ist eine Interaktion von Upa7 mit dem MLLE-tragenden Protein Pab1 auf andere subzelluläre Bereiche beschränkt, beispielsweise auf das Zytoplasma oder den Nukleus, welcher von einer Subpopulation von Pab1 aufgesucht werden könnte (Brune et al. 2005). Interaktionsstudien wie zum Beispiel mit dem Hefe-Zwei-Hybrid-System könnten Aufschluss über eine eventuelle Interaktion dieser beiden Proteine liefern. Dies wurde im Rahmen dieser Arbeit jedoch nicht weiter untersucht, da spezifisch nach möglichen Komponenten des Endosomen-gekoppelten mRNA-Transports gesucht wurde. Ähnlich zum Verlust von Upa7 wirkte sich auch die Deletion von *upa10* aus. Der entsprechende Deletionsstamm wies eine Bipolaritätsrate von 17,9 % auf und zeigte somit in der Reihe der bislang nicht näher untersuchten PAM2-Proteine aus *U. maydis* den stärksten morphologischen Defekt. Das Homolog zu Upa10 aus *S. cerevisiae* ist das Protein Sac3p, welches eine Komponente des TREX-2-Komplexes darstellt. Dieser

Komplex wird für die Elongation während der Transkription und den Export fertiger mRNAs aus dem Nukleus benötigt. Die Deletion von Sac3p führt zu einem stark fehlerhaften mRNA-Export sowie einem verlangsamten Zellwachstum (Fischer et al. 2002). Sac3p scheint somit nicht mit zytoplasmatischen, sondern mit nukleären mRNPs zu interagieren (Chekanova et al. 2008). Es könnte sein, dass Upa10 in *U. maydis* eine ähnliche Rolle beim Export von mRNAs spielt, jedoch aufgrund der nicht sehr gravierenden Auswirkungen auf das generelle Wachstum der Zellen vermutlich in einem geringeren Ausmaß als Sac3p in Hefe. Im Gegensatz dazu verursachte der Verlust von *upa13* keine Defekte der Zellmorphologie, und 95,5 % der Hyphen wuchsen unipolar aus. Die zu Upa13 aus *U. maydis* passenden Homologen sind das Protein Pan3p aus *S. cerevisiae* sowie Pan3 aus *H. sapiens*. Pan3p (Poly(A)-spezifische Nuklease) bildet zusammen mit Pan2p einen Komplex zur Deadenylierung von mRNAs im Zusammenspiel mit Pab1p, wobei Pan2p die katalytische Einheit des Komplexes darstellt (Uchida et al. 2004). Wird das PAM2-Motiv in Pan3 mutiert, kommt es infolge der nicht mehr zustande kommenden Interaktion mit Pab1p zu einer Elongation der Poly(A)-Anhänge und einer fehlerhaften Deadenylierung (Siddiqui et al. 2007; Wahle und Winkler 2013). Solch eine wichtige Rolle erscheint für Upa13 in *U. maydis* aufgrund der dem Wildtyp entsprechenden Zellmorphologie weniger wahrscheinlich.

Die Deletionen von *upa8*, *upa11*, *upa12* und *upa14* sind im Rahmen dieser Arbeit nicht gelungen. Dies ist übereinstimmend mit Ergebnissen zu dem Upa8-Homolog Sup35p in *S. cerevisiae*, da Stämme mit einem Verlust des entsprechenden Gens in einem systematischen Deletionsgroßansatz als nicht lebensfähig beschrieben wurden (Giaever et al. 2002). Sup35p entspricht dabei dem Protein eRF3 (*eukaryotic release factor 3*), welches im Zusammenspiel mit Sup45p bzw. eRF1 einen wichtigen Faktor zur Translationsterminierung darstellt. Hierbei katalysiert der Komplex die Freisetzung der wachsenden Polypeptidkette, nachdem das Ribosom ein Terminationscodon erkannt hat. Zudem übernimmt eRF3 essentielle Funktionen bei der Deadenylierung und beim Abbau von mRNA durch die Interaktion mit PABP (Hosoda et al. 2003). Interessanterweise besitzt Sup35p keine eindeutig identifizierbaren PAM2-Motive (Roque et al. 2015), während Upa8 wie auch homologes eRF3 aus dem Menschen ein bzw. zwei überlappende PAM2-Motive aufweisen (Kozlov et al. 2004). *In vitro*-Untersuchungen mit humanem Poly(A)-Bindepotein und eRF3 haben gezeigt, dass die Interaktion beider Proteine über einen PAM2/MLE-Kontakt die effiziente Erkennung der Stopp-Codons sowie die Translationstermination stimulieren kann (Ivanov et al. 2016). Dies ist bemerkenswert, da transkriptomweite Analysen des Bindevhaltens von Rrm4 aufgezeigt haben, dass dieses zentrale RNA-bindende

Protein eine signifikante Anzahl an Ziel-mRNAs im Bereich des Stopp-Codons bindet (Olgeiser et al. 2019). Eine Besonderheit des Rrm4-abhängigen mRNA-Transports ist, zumindest im Fall von Septinen, ein mit der Translation gekoppelter Transport der Ziel-mRNAs (Baumann et al. 2014; Zander et al. 2016). Somit könnte die Interaktion zwischen Pab1 und Upa8 ein möglicher Schlüsselpunkt zur Regulation dieses Prozesses darstellen. Um weitere Untersuchungen in diese Richtung anzufertigen, würde sich die Verwendung konditionaler Mutanten empfehlen.

Auch das Upa14-Homolog Not1p konnte in *S. cerevisiae* nicht deletiert werden (Giaever et al. 2002). Bei Not1p handelt es sich um eine Komponente des Ccr4-Not1-Komplexes, welcher Aufgaben bei der Regulierung des mRNA-Levels und der Transkription sowie beim Abbau von mRNA übernimmt (Maillet et al. 2000; Collart 2016). Somit wurde auch für *U. maydis* angenommen, dass diese Gene essentiell sein könnten und eine Deletion sich als schwierig erweisen würde.

Ein Homolog zu Upa11 konnte nicht eindeutig identifiziert werden, und bioinformatische Analysen ergaben neben dem potentiellen PAM2-Motiv keine vorhergesagten Domänen. Da eine essentielle Rolle von Upa11 aufgrund der fehlgeschlagenen Deletion wahrscheinlich ist, stellt dieses Protein einen interessanten Kandidaten für zukünftige Grundlagenforschungen dar.

Ein mit Upa12 verwandtes Protein ist Kcs1 aus *Sporisorium*-Spezies und *S. cerevisiae*. *Kcs1* kodiert für ein Protein, welches Ähnlichkeiten zu Transkriptionsfaktoren der bZIP-Familie aufweist und für die Regulation von Inositol-Hexakisphosphat (InsP6) zuständig ist. Diese Moleküle sind wichtige sekundäre Botenstoffe für beispielsweise zelluläre Stressantworten auf bestimmte Umweltbedingungen (Irvine und Schell 2001; Dubois et al. 2002). In *S. cerevisiae* konnte nachgewiesen werden, dass InsP6 den mRNA-Export aus dem Nukleus durch eine Interaktion mit dem Nukleoporin Gle1p regulieren kann (York et al. 1999; Alcazar-Roman et al. 2006).

Einen genaueren Einblick in die Rolle der einzelnen potentiellen PAM2-Proteine in *U. maydis* könnten Untersuchungen zur subzellulären Lokalisation liefern. Mithilfe eines systematischen Großansatzes wurde in *S. cerevisiae* die subzelluläre Lokalisierung von 4156 Proteinen (entspricht 75 % des Proteoms) mit einer Gfp-Fusion untersucht. Die daraus gewonnenen Daten helfen, die Funktion der jeweiligen Proteine genauer einzugrenzen (Huh et al. 2003). Um ähnliche Erkenntnisse in *U. maydis* zu erlangen, könnten Fusionen mit Fluoreszenzproteinen hergestellt und über homologe Rekombination in den jeweiligen endogenen Locus eingebracht werden. Dazu wäre es von Wichtigkeit, Fusionen sowohl am C- als auch am N-Terminus der Proteine vergleichend zu exprimieren, da Fusionen manchmal die Lokalisierung und die Funktion der zu untersuchenden Proteine beeinflussen können (Palmer und Freeman

2004). Ein entsprechender Effekt zeigte sich bereits bei Septinen in *U. maydis*, beispielsweise bei dem Septin Cdc3. Septine bilden gepaarte Filamente aus, welche als weitere Komponente des Zytoskeletts angesehen werden können. Wurde Cdc3 N-terminal mit Gfp fusioniert, konnten sich weiterhin Filamente in Hyphen bilden. Bei einer C-terminalen Fusion fehlten die typischen filamentösen Strukturen, weshalb angenommen wurde, dass die C-terminale Fusion ein sterisches Hindernis darstellte (Zander et al. 2016). Ähnliche Effekte müssten bei der Fusion von Fluoreszenzproteinen an bislang nicht untersuchte Proteine berücksichtigt werden. Eine weitere Möglichkeit, mehr Informationen über die verbleibenden PAM2-Kandidaten in *U. maydis* zu erhalten, welche nicht deletiert werden konnten, wäre die Konstruktion regulierbarer Systeme. Ein denkbares und bislang etabliertes System stellen regulierbare Promotoren dar (Brachmann et al. 2004). Zudem könnten auf der Proteinebene wirkende optogenetische Methoden verwendet werden (Renicke et al. 2013). Derartige regulierbare Systeme wurden jedoch bisher nicht in *U. maydis* etabliert und könnten zudem zu artifiziellen Ergebnissen führen, falls regulierte Proteine einen globalen Einfluss auf den Zellmetabolismus haben.

3.2 Der Verlust von Upa9 führte zu einer erhöhten Bipolaritätsrate, welche jedoch nicht auf eine direkte Involvierung in den endosomalen mRNA-Transport zurückzuführen ist

Im Vergleich zu der Deletion von *rrm4*, welche bei Hyphen einen durchschnittlichen Bipolarenanteil von 44 % verursachte, zeigten *upa9*-defiziente Zellen eine Bipolaritätsrate von 41,8 %. Da auch der Verlust weiterer endosomaler mRNP-Komponenten zu ähnlichen Ergebnissen führte, wurde zunächst vermutet, dass Upa9 ein neuer wichtiger Bestandteil der endosomalen Transportmaschinerie sein könnte. Durch Sequenzvergleiche wurde deutlich, dass es sich bei Upa9 um das Homolog zu Pex3p aus *S. cerevisiae* handelt, einem peroxisomalen integralen Membranprotein (Hohfeld et al. 1991; Distel et al. 1996). Diese Erkenntnis wurde durch eine parallel zu dieser Arbeit veröffentlichten Studie bestätigt (Camões et al. 2015). Peroxisomen sind von einer einzelnen Membran umhüllte Organellen, die neben der Entgiftung von Peroxid und der β -Oxidation von Fettsäuren noch eine Vielzahl weiterer biologischer Prozesse ausführen, die sich jedoch stark von Organismus zu Organismus unterscheiden können (Gabaldón 2010). So wird die β -Oxidation der Fettsäuren in tierischen Zellen kooperativ von Peroxisomen und Mitochondrien vollzogen, während in *S. cerevisiae* und den meisten Pilzen nur die Peroxisomen an diesem Prozess beteiligt sind (Poirier et al. 2006). Die Verteilung von Peroxisomen von

der Mutter- in die Tochterzelle ist in *S. cerevisiae* dabei vom Aktin-Zytoskelett abhängig (Hoepfner et al. 2001).

Der vergleichbare Deletionsphänotyp von *rrm4* und *upa9* veranlasste weitere Untersuchungen, um eine neuartige Funktion von Upa9/Pex3 oder gegebenenfalls eine bisher nicht bekannte Verbindung von Endosomen und Peroxisomen aufzudecken. In vorangegangenen Studien wurde bereits die Funktionalität einer C-terminalen Fusion an Pex3p in *S. cerevisiae* beschrieben (Matsuzaki und Fujiki 2008), weshalb sie ebenfalls für Upa9 in *U. maydis* getestet wurde. Da die Hyphen der entsprechenden Stämme keinen morphologischen Phänotyp aufwiesen, wurde angenommen, dass das Fusionsprotein Upa9-Gfp/Upa9-mCherry funktionell ist. Weil die vereinzelt Bewegungen von Upa9 an endosomale Partikel erinnerten, wurden Kollokalisationsstudien durchgeführt, welche bestätigten, dass Upa9 mit dem endosomalen RNA-Bindeprotein Rrm4 kolokalisiert. Dies stellte eine überraschende Erkenntnis dar, da das erste Mal ein Zusammenhang zwischen endosomalem mRNA-Transport und der Verteilung von Peroxisomen hergestellt werden konnte. Diese Funktion war jedoch nicht abhängig von dem potentiellen PAM2-Motiv in Upa9, da eine Mutation von diesem keinen offensichtlichen Phänotypen zeigte. Dieses Ergebnis entspricht jedoch den zu Upa1 und Upa2 gewonnenen Erkenntnissen: Selbst bei diesen direkt am endosomalen Transport beteiligten Komponenten spielten die PAM2-Motive trotz nachgewiesener Funktionalität eine nur untergeordnete Rolle (Thomas Pohlmann 2013; Pohlmann et al. 2015). Zeitgleich zu den hier beschriebenen Arbeiten erschienen zwei interessante Veröffentlichungen, welche vergleichbare und darüber hinaus weiterreichende Ergebnisse zu der Biologie von Peroxisomen in *U. maydis* lieferten (Camões et al. 2015; Guimaraes et al. 2015). In der Arbeit von Camões et al. (2015) wurde der Einfluss von *pex3* auf das Wachstum von *U. maydis* untersucht. Mithilfe eines auch in dieser Arbeit verwendeten Gfp-SKL-Reporterproteins wurde nachgewiesen, dass eine Deletion von *pex3* zu einem vollständigen Verlust von Peroxisomen führt und einen erheblichen Einfluss auf die Verwertbarkeit von Fettsäuren als alleiniger Kohlenstoffquelle hat. Zwar wird berichtet, dass sich bei der Verwendung von Glukose als Kohlenstoffquelle kein Unterschied zwischen der Morphologie von wildtypischen und *pex3Δ*-Stämmen sowohl für Sporidien als auch für SG200-Filamente feststellen ließe, jedoch wurden keine detaillierten Bipolaritätsstudien mithilfe des Laborstamms AB33 durchgeführt (Camões et al. 2015). Zudem lieferte die Studie evolutionäre Erkenntnisse bezüglich Pex3, welches sowohl in *H. sapiens* als auch in *U. maydis*, jedoch nicht in *S. cerevisiae* konserviert ist. Da defekte peroxisomale Komponenten in *H. sapiens* an verschiedenen ernstesten Krankheiten wie beispielsweise dem Zellweger-Syndrom beteiligt sind (Waterham und Ebberink 2012;

Klouwer et al. 2015), könnten Studien der selbigen in einem einfacheren Modellorganismus zu wichtigen Erkenntnissen führen.

Sehr interessant sind zudem die Erkenntnisse, die Guimaraes et al. (2015) gewonnen haben. So konnte in *U. maydis* gezeigt werden, dass Peroxisomen, Lipid Droplets wie auch Endoplasmatisches Retikulum mit Rab5a-positiven Endosomen ko-transportiert werden. Somit zeigt sich, dass Rab5a-positive Endosomen nicht nur Plattformen für den mRNA-Transport darstellen, sondern vielmehr Dreh- und Angelpunkt verschiedenster Transportprozesse in *U. maydis* sind. In Übereinstimmung mit dieser Arbeit wurde das RNA-Bindeprotein Rrm4 als möglicher Interaktionspartner für peroxisomale Komponenten jedoch ausgeschlossen, da die Deletion von *rrm4* zu keinem Verlust peroxisomaler Bewegung führte (Guimaraes et al. 2015). Guimaraes und Mitarbeiter konnten zudem zeigen, dass frühe Endosomen bzw. das dazugehörige Motorprotein Kinesin-3 nicht direkt mit Peroxisomen kolokalisieren, sondern dass das Peroxisom dem Endosom in einem Abstand von circa 400 nm folgt. Somit erscheint eine strukturelle Verbindung über ein Adaptermolekül anstatt einer direkten funktionellen Verbindung als erwiesen. Ein vergleichbarer Mechanismus der Peroxisomenverteilung wurde durch Salogiannis et al. (2016) auch im Ascomyzeten *A. nidulans* nachgewiesen. In diesem Organismus konnte jedoch das entsprechende Adapterprotein PxdA (*peroxisome distribution mutant A*) beschrieben werden, welches an frühen Endosomen gebunden vorliegt und über einen putativen Peroxisomen-ständigen Rezeptor die Interaktion zwischen Endosomen und Peroxisomen vermittelt. PxdA konnte jedoch auf nur ungefähr der Hälfte der transportierten frühen Endosomen gefunden werden, was für die Existenz einer Subpopulation PxdA-positiver Endosomen spricht. Ein vergleichbares Adapterprotein wurde zudem kürzlich in Säugetierzellen identifiziert: Hier wird die direkte Brückenbildung zwischen Peroxisomen und Motorproteinen durch die Rho-GTPase Miro1 vermittelt (Castro und Schrader 2018).

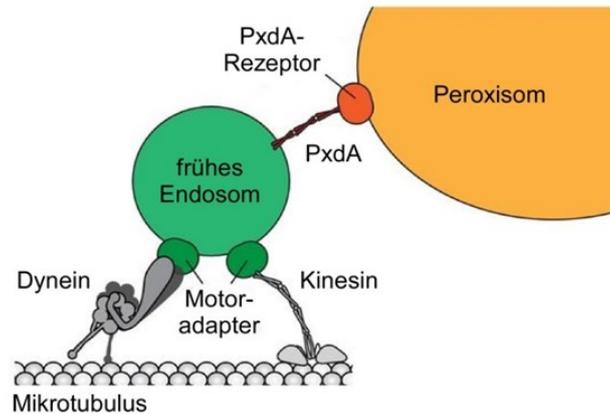


Abbildung 27: Mikrotubuli-abhängiger Transport von Peroxisomen in *A. nidulans*. Peroxisomen werden sowohl in *U. maydis* als auch in *A. nidulans* Mikrotubuli-abhängig mithilfe von Motorproteinen transportiert. In *A. nidulans* wurde PxdA als Endosom-interagierendes Protein identifiziert, welches die Verbindung zwischen frühen Endosomen und Peroxisomen zu vermitteln scheint. Abbildung modifiziert nach (Salogiannis und Reck-Peterson 2017).

Wie im Addendum beschrieben, wurde eine solche etwaige Adapterfunktion von Upa2 angenommen. Die Entdeckung, dass PxdA und Upa2 eine strukturelle, aber nicht durch Homologie zu begründende Ähnlichkeit aufweisen, und PxdA zudem sieben potentielle PAM2-Motive enthält, gab Grund für eine Untersuchung von Gfp-SKL in einer *upa2*-defizienten Mutante. Wäre Upa2 der Adapter, der ähnlich wie PxdA in *A. nidulans* die strukturelle Verbindung zwischen frühen Endosomen und Peroxisomen herstellte, wären in der *upa2*-Deletionsmutante fehlende prozessive Gfp-SKL-Partikel erwartet worden. Eventuell wäre es auch zu einer Fehlverteilung der Peroxisomen zu den Hyphenspitzen gekommen, wie sie bei Upa9-mCherry unter Einwirkung von Benomyl zu beobachten war. Da sich jedoch eine Transportbewegung von Gfp-SKL zweifelsfrei nachweisen ließ, konnte Upa2 als Adapter ausgeschlossen werden. Zudem findet sich in *U. maydis* kein vorhergesagtes Protein, welche eine Homologie zu PxdA aufweist. Somit bleibt die Frage nach einem vergleichbaren Adapterprotein in *U. maydis* weiterhin ungeklärt. Abschließend lässt sich aus den Ergebnissen in verschiedenen Pilzen der Ko-Transport „per Anhalter“ als ein verbreiteter Transportmechanismus erkennen (Salogiannis und Reck-Peterson 2017). Im Falle des mRNP-Transports in *U. maydis* konnte zudem gezeigt werden, dass die ESCRT-Komponente Did2 die verschiedenen Funktionen der Endosomen in Transport und Abbau regulieren kann (Haag et al. 2017). Es bleibt eine interessante Aufgabe für die zukünftige Grundlagenforschung, die Konservierung dieses Mechanismus in weiteren Organismen zu untersuchen.

3.3 Weitergehende Charakterisierung des Multi-PAM2-Proteins Upa2

3.3.1 Upa2 ist eine Komponente des endosomalen mRNA-Transports und gelangt über ein C-terminales Motiv zur Transportmaschinerie

Upa2 wurde durch bioinformatische Vorhersagen der PAM2-Motive und vorangegangenen Arbeiten als potentiell wichtiger Faktor des endosomalen mRNA-Transports identifiziert. Eine wichtige Erkenntnis lieferte ein Vergleich des Genexpressionsmusters von *upa2* mit dem von den bekannten Transportkomponenten *rrm4* und *upa1*. Die Transkriptmenge wird für alle drei Gene in Hyphen im Vergleich zu Sporidien hochreguliert. Die entsprechenden Daten sind unter dem Zugriffsschlüssel GSE109561 bei der NCBI GEO Datenbank einsehbar (Edgar et al. 2002; Olgeiser et al. 2019). Dementsprechend zeigten sich bei den entsprechenden Deletionsmutanten keine Defekte im Sporidienwachstum, sondern nur im polaren Wachstum der Hyphen. Es ist daher zu vermuten, dass der Mikrotubuli-abhängige Langstreckentransport von mRNA in Sporidien wahrscheinlich nur eine untergeordnete Rolle spielt und in diesem Stadium die intrazellulären Transportprozesse nicht notwendig sind oder von anderen Kompartimenten übernommen werden. Das Verständnis von Upa2 sollte durch eine Charakterisierung von funktionalen Proteinabschnitten vertieft werden. Da Upa2 exklusiv auf Endosomen lokalisiert, galt ein besonderes Interesse der Frage, wie dieses Protein zu den Transporteinheiten rekrutiert wird. Bioinformatisch konnten weder Endosomen-spezifische Membran-bindende Motive wie eine FYVE-, PX- oder PH-Domäne (Kutateladze 2007), noch kanonische RNA-bindende Domänen (Lunde et al. 2007) identifiziert werden. Jedoch kann die Anwesenheit RNA-bindender Domänen nicht ausgeschlossen werden, da neuesten Studien zufolge eine Vielzahl nicht-kanonischer RNA-Bindedomänen entdeckt worden ist und noch eine Vielzahl weiterer nicht-kanonischer Domänen vermutet wird (Hentze et al. 2018; Moore et al. 2018).

Durch N-terminale Verkürzungen von Upa2 konnte in der vorliegenden Arbeit ein C-terminales Motiv ermittelt werden, mit dem Upa2 mit den Rrm4-abhängigen mRNPs auf Endosomen lokalisiert. Dass nur drei C-terminale Aminosäuren für die Lokalisierung eines aus insgesamt 2121 Aminosäuren bestehenden Proteins verantwortlich gemacht werden konnten, war überraschend. Ein vergleichbares Tripeptid, welches für eine Interaktion zwischen zwei Proteinen zuständig ist, konnte in *Caulobacter crescentus* identifiziert werden. In diesem Prokaryoten interagiert die RNase E mithilfe eines C-terminal gelegenen GWW-Motivs mit der Peptidbindetasche der Exoribonuklease Polynukleotid-Phosphorylase (PNPase). Zusammen mit weiteren

Komponenten bilden diese Proteine in *C. crescentus* das RNA-Degradosom, einen Multi-Proteinkomplex, welcher eine wichtige Rolle beim RNA-Metabolismus spielt und somit global zur Genregulierung beiträgt (Hardwick et al. 2011). Weiterhin finden sich GW-Wiederholungen in dem nach diesen benannten Protein GW182. Mit den GW-Bereichen interagiert es direkt mit den zentralen Argonauten-Proteinen der RNA-Interferenz und spielt bei diesem Prozess eine zentrale Rolle (Eulalio et al. 2009). Interessanterweise besitzt GW182 ebenfalls ein PAM2-Motiv, welches die Interaktion mit dem Poly(A)-bindenden Protein vermittelt (Fabian et al. 2009; Jinek et al. 2010). GW-Bereiche finden sich auch N-terminal in den drei humanen GW182-Proteinen TNRC6A, TNRC6B und TNRC6C, die mit jenen Bereichen mit den vier im Menschen kodierten Argonaut-Proteinen AGO1-4 interagieren (Lazzaretti et al. 2009). Ein Homolog zu Argonaut-Proteinen und damit einhergehend der Mechanismus der RNA-Interferenz ist in *U. maydis* jedoch evolutionär verloren gegangen (Drinneberg et al. 2011), weshalb solche Komponenten nicht als Interaktionspartner von Upa2 in Frage kommen. Zudem finden sich stark konservierte GWW-Motive in den beiden SH3-Domänen in p47^{phox}. Diese Untereinheit ist eine von sechs Komponenten der NADPH-Oxidase, welche zur Pathogenabwehr reaktive Sauerstoffspezies generieren kann (Groemping et al. 2003). Durch flexible Glyzinreste und die beiden Tryptophane kann es bei diesem Proteinkomplex zu einer Interaktion zwischen den beiden SH3-Domänen kommen. Infolgedessen können verschiedene Liganden gebunden werden, und Liganden selbst sind in der Lage, die Affinität und Spezifität der SH3-Regionen zu beeinflussen. Dabei fungiert Glyzin als flexibler Linker, der die beiden für Ligandenbindung und Interaktion wichtigen Tryptophane in die korrekte Position bringen kann (Groemping et al. 2003). Vergleichbare Rollen können für Upa2 zwar nicht direkt angenommen werden, jedoch zeigt das Vorhandensein von GW(W)-Motiven in weiteren Multi-Proteinkomplexen die Fähigkeit dieses kleinen Motivs, für eine korrekte Assemblierung sorgen zu können. Zudem wird durch die Erkenntnisse aus *C. crescentus* deutlich, dass es sich bei GWW wahrscheinlich um ein Motiv zur Protein-Protein-Interaktion handelt, und nicht etwa um ein Lipid-bindendes Motiv. Diese Vermutung wird zudem dadurch unterstützt, dass die Lokalisierung von Upa2 von der mRNA-Bindfähigkeit von Rrm4 abhängig ist: Studien haben gezeigt, dass die Anwesenheit von Rrm4^{mR1}, welches durch eine Mutation des ersten RNA-Bindemotivs signifikant weniger mRNAs binden kann (Becht et al. 2006), nicht ausreichend ist, um Upa2 auf frühe Endosomen zu rekrutieren, obwohl es selbst mithilfe seiner intakten MLLE-Domäne und durch Interaktion mit Upa1 auf Endosomen zu finden ist (Thomas Pohlmann 2013). Somit scheint die Präsenz von durch Rrm4 gebundenen mRNAs im mRNP essentiell zu sein, um Upa2 zu seinem endosomalen

Interaktionspartner zu bringen. In der vorliegenden Arbeit wurde ebenfalls versucht, diesen potentiellen Interaktionspartner für das GWW-Motiv in Upa2 zu identifizieren, aber durchgeführte massenspektrometrische Analysen lieferten keine verlässlichen Ergebnisse (Daten nicht gezeigt). Somit gilt es als wahrscheinlich, dass ein Protein als Interaktionspartner im endosomalen Transport-Komplex existieren muss, dessen Identität in nachfolgenden Studien ermittelt werden sollte. Die Identifizierung dieses Interaktionspartners könnte neue wichtige Informationen über den Aufbau von mRNPs liefern und eventuell auch eine Interaktionsoberfläche für weitere Komponenten der Transportmaschinerie darstellen.

3.3.2 Die Funktion von Upa2 hängt von einem N-terminalen Bereich, jedoch nicht von PAM2-Motiven ab

Obwohl die Lokalisierung von Upa2 von dem sehr C-terminal gelegenen GWW-Motiv abhängig ist, zeigte sich durch Analyse der verkürzten Proteinvarianten, dass die Funktion von Upa2 nicht nur von dessen Anwesenheit auf Endosomen bestimmt wird. Vielmehr ist es notwendig, dass Upa2 nicht nur über das GWW-Motiv zum mRNP rekrutiert wird, sondern dass zusätzlich eine N-terminale Effektor-domäne vollständig vorliegt. Die Effektor-domäne konnte in der vorliegenden Arbeit zwischen den Aminosäurepositionen 339 und 598 eingegrenzt werden. Nachfolgende Studien könnten eine genauere Kartierung der besagten Region durch fein abgestufte Verkürzungen des Proteins ermöglichen. Eine vergleichbare Strategie wurde bereits bei Upa1 angewandt, um die zuvor unbekanntes PAM2L(PAM2-like)-Motive einzugrenzen (Pohlmann et al. 2015). Weitergehende Studien sollten analysieren, ob es sich bei der Effektor-domäne um eine RNA-bindende oder Proteininteraktionsdomäne handelt. Zur Untersuchung einer möglichen RNA-Bindung stehen heutzutage mehrere Protein-zentrische Methoden zur Verfügung, bei denen ein Protein von Interesse beispielsweise durch UV-Strahlung mit putativen RNA-Interaktoren kreuzvernetzt und im Folgenden aufgereinigt wird (Ramanathan et al. 2019). Jedoch wird im Falle von Upa2 eher von einer Interaktion mit weiteren Protein-Komponenten des mRNP ausgegangen. Eine Möglichkeit wäre eine Suche im Großansatz gegen eine genomische DNA-Bibliothek im Hefe-Zwei-Hybrid-System. Unter Verwendung dieser Methode konnten in *U. maydis* bereits zuvor unbekannte und teilweise völlig unerwartete Interaktionspartner, wie beispielsweise das Motorprotein Kinesin-1 für die Spleißkomponente Spf27, identifiziert werden (Mendoza-Mendoza et al. 2009; Kellner et al. 2014). Im Zusammenspiel mit mehreren PAM2-Motiven sowie einem C-terminalen Motiv zur korrekten subzellulären Lokalisierung erscheint eine

Rolle als Gerüstprotein in den mRNPs als wahrscheinlich. mRNA-Moleküle sind zu keinem Zeitpunkt ihres komplexen Lebenszyklus „nackt“, sie liegen also nie ohne akzessorische Proteine vor. Es findet sich eine Vielzahl von unterschiedlichen, direkt oder indirekt wirkenden Interaktionsproteinen auf einer mRNA, da sie reguliert und stabilisiert werden müssen (Singh et al. 2015). Um als Gerüstprotein wirken zu können, muss Upa2 zu einer komplexen Faltung in der Lage sein, was durch seinen Charakter als Multi-Domänenprotein als wahrscheinlich angesehen werden kann (Bhaskara und Srinivasan 2011). Wie im Modell in Abbildung 29 angedeutet, kann angenommen werden, dass Upa2 mithilfe des GWW-Motivs seinen Interaktionspartner in Abhängigkeit von durch Rrm4 gebundener mRNA-Fracht auf frühen Endosomen erkennt. Durch gleichzeitige transiente Interaktion mit Pab1-Molekülen, welche den Poly(A)-Anhang an jeder mRNA in eukaryotischen Zellen binden, könnte die Ladung von Upa2 in das mRNP unterstützt werden. Interessanterweise wird der Interaktionspartner Pab1 selbst als Gerüstprotein für eine Vielzahl von mRNA-bezogenen Prozessen gesehen (Mangus et al. 2003). Während die RRM-Domänen Interaktionen mit Poly(A)-Anhängen der mRNAs vermitteln, werden die unterschiedlichen Aufgaben von Pab1 durch die Interaktionen mit diversen PAM2-Motiv-tragenden Proteinen über die MLLD-Domäne reguliert (Xie et al. 2014). Somit scheint es möglich, dass ein Gerüstprotein mit mehreren PAM2-Motiven wie Upa2 eine weitere Dimension der Regulation bietet, die die gleichzeitig auf mehrere Pab1-Moleküle wirkt. Folglich scheint Upa2 einen stabilisierenden Effekt auf den Transport von Pab1-gebundener mRNA zu haben, da bei Upa2-Verlust circa 50 % weniger transportierte Pab1-Moleküle beobachtet werden konnten. Dies scheint allerdings im Widerspruch mit der Beobachtung zu stehen, dass die Mutation der vier PAM2-Motive keinen negativen Effekt *in vivo* hatte. Hier wäre es denkbar, dass die kryptischen, weniger konservierten PAM2-Motive in Upa2 einen Teil der Gerüstfunktionen übernehmen, oder dass weitere Faktoren den Verlust der PAM2-Motive ausgleichen können. Vergleichbare Beobachtungen wurden mit dem Protein GW182 aus *D. melanogaster* gemacht, da dieses sowohl mit einem PAM2-Motiv als auch mit dem sogenannten M2-Bereich mit dem Poly(A)-Bindepotein interagieren kann (Zekri et al. 2009; Huntzinger et al. 2010). Studien mit humanem eRF3 zeigten auf, dass nur eines der beiden in diesem Protein enthaltenen PAM2-Motive essentiell für die Interaktion mit PABP ist (Kononenko et al. 2010). In vielen Fällen zeigte sich jedoch, dass PAM2-Motive essentiell für Poly(A)-Bindepotein-Interaktionen sind. So wurde in *D. melanogaster* gezeigt, dass die Deletion des PAM2-Motivs die Interaktion von PABP mit ATX2 verhindert (Lim und Allada 2013). Ebenso zeigte sich, dass ein PAM2-ähnliches Motiv in einer kurzen Isoform des

RNA-Bindeproteins Makorin Ring Zinkfinger Protein 1 (MKRN1-short) eine RNA-abhängige Interaktion mit PABP vermittelt (Miroci et al. 2012). Sind die evolutionär stark konservierten PAM2-Motive tatsächlich nicht essentiell für endosomalen mRNA-Transport in *U. maydis*, könnte sich eine bislang nicht bekannte Domäne in Upa2 befinden, welche ähnlich zu der M2-Region aus *D. melanogaster* (Huntzinger et al. 2010) für eine Pab1-Interaktion zuständig ist. Dies wäre außerdem vergleichbar mit der Entdeckung der PAM2L-Motive in Upa1 (Pohlmann et al. 2015). Ein weiterer möglicher Grund für das Fehlen eines Wachstumsdefekts bei Mutation der vier PAM2-Motive in Upa2 könnte eine sehr starke Redundanz sein. Einen Hinweis darauf lieferte die Entdeckung, dass neben Upa1 auch Rrm4 zumindest kryptische PAM2-Sequenzen enthält, welche eventuell bei Verlust der PAM2-Motive in Upa2 Interaktionen mit Pab1-Molekülen eingehen könnten. Außerdem könnte die Wichtigkeit der PAM2-Motive erst unter gewissen Stressbedingungen offensichtlich werden, die unter normalen Laborbedingungen nicht zustande kommen. So wurde eine Rolle des RNA-bindenden Protein Grp1 beim Aufbau der Zellwand während des Wachstums auch erst unter Stressbedingungen deutlich (Olgeiser et al. 2019). Entsprechende Versuche unter Einsatz von physikalischen oder chemischen Faktoren wie Hitze oder osmotischem Stress könnten bezüglich der PAM2-Motive in Upa2 vergleichbare Erkenntnisse liefern.

Eventuell unterliegen die PAM2-Motive in Upa2 einer Regulation durch Phosphorylierungen benachbarter Aminosäuren, wodurch ihre Interaktion mit der MLLE-Domäne *in vivo* veränderbar ist. Dies trifft beispielsweise auf das PAM2-Protein Tob2 zu, welches PAM2-Motive in ungeordneten Proteinregionen besitzt. Diese PAM2-Motive sind erst nach Dephosphorylierung zu einer affinen Interaktion mit der MLLE-Domäne in der Lage (Huang et al. 2013). Interessanterweise befinden sich sowohl klassische als auch kryptische PAM2-Motive von Upa2 ebenfalls in unstrukturierten Proteinregionen.

Eine weitere Möglichkeit wäre, dass mithilfe des Gerüstproteins Upa2 stabile Ringschlüsse gebildet werden, die zur Translation der mRNA-Fracht auf der endosomalen Oberfläche nötig sind (Tomek und Wollenhaupt 2012). Dass es eine dort stattfindende lokale Translation gibt, wurde in der Vergangenheit durch mehrere Aspekte untermauert. Zum einen fanden sich auf frühen Endosomen die ribosomalen Komponenten Rpl25 sowie Rps2 und Rps19, welche zusammen mit Komponenten wie Rrm4 auf frühen Endosomen ko-transportiert wurden. Zum anderen konnte gezeigt werden, dass alle vier Septin-mRNAs *cdc3*, *cdc10*, *cdc11* und *cdc12*, die *U. maydis* kodiert, mit ihren eigenen Translationsprodukten auf den gleichen Endosomen kolokalisieren (Higuchi et al. 2014; Zander et al. 2016). Somit lässt sich die Hypothese

aufstellen, dass bei Verlust von Upa2 ein weniger effizienter bzw. weniger stabiler mRNA-Transport stattfindet, welcher sich in dem starken Rückgang beweglicher Pab1-Moleküle äußert. Zusätzlich könnte Upa2 eine Rolle bei der Regulation lokaler Translation spielen, sodass zum einen der mRNA-Transport selber als auch im nächsten Schritt die Translation der Rrm4-Ziel-mRNAs gestört wird. Schlussendlich kommt es also zu einer insgesamt gestörten Proteinbiosynthese und einer ineffizienten Verteilung von mRNA- sowie Proteinfrachten in der gesamten Hyphe. Durch eine Akkumulation dieser Effekte könnte es zu den typischen morphologischen Defekten kommen, die charakteristisch für eine *upa2*-Deletion sind.

3.3.3 Die Akkumulation von Upa2²⁸⁴⁻²¹²¹-Gfp könnte durch Phasentransition ausgelöst werden

Die N-terminale Verkürzung von Upa2 um 283 Aminosäuren löste in Filamenten eine starke Akkumulation der Proteinvariante aus, welche jedoch nur einen im Vergleich zur *upa2*-Deletion milden morphologischen Defekt verursachte. Da nur circa 15 % der Hyphen bipolar auswuchsen, kann angenommen werden, dass diese Proteinvariante zumindest teilweise funktionell ist, vergleichbar zu Upa2³⁹⁹⁻²¹²¹-Gfp. Diese Annahme wurde durch die Anwesenheit normal transportierter endosomaler Partikel untermauert, welche erst bei einer starken Kontrastveränderung sichtbar gemacht werden konnten. Ungeklärt bleibt weiterhin, warum es, bis auf wenige Ausnahmen, nur eine einzige dieser Akkumulationen pro Zelle gab. Anscheinend wurde der Großteil der Upa2-Moleküle in den meisten Fällen durch bestimmte, bisher unbekannte Wechselwirkungen zusammengehalten. Hierfür könnte ein aktuell immer wichtiger werdendes Phänomen verursachend sein, welches als Phasentransition bekannt ist. Dabei treten membranlose Organellen in den Vordergrund, wie beispielsweise die sogenannten *p granules* aus *C. elegans*, bei denen es sich um Formationen aus RNA und Proteinen in Embryos dieses Organismus handelt (Brangwynne et al. 2009). Diese Kompartimente bilden sich durch Phasenseparation, wie sie bei übersättigten Lösungen stattfinden kann. Dadurch entsteht innerhalb des membranlosen Organells sowohl eine dichte als auch eine verdünnte Phase, die stabil koexistieren können. Für diese Annahme sprechen sowohl eine rundliche Erscheinungsform, welche zur Minimierung von Oberflächenspannungen eingehalten wird, als auch Fusions- und Abspaltungseignisse sowie ein dynamischer Austausch von Bestandteilen (Brangwynne et al. 2011; Boeynaems et al. 2018). Interessanterweise stellt die Phasenseparierung nach neuesten Erkenntnissen ebenfalls eine Möglichkeit der mRNA-Lokalisierung dar, wobei sich RNA-interagierende Proteine wie Lipidtropfen

verhalten und dadurch die Translation gebundener mRNAs unterdrücken (Tsang et al. 2019). Eventuell wurde durch die Entfernung der ersten 283 Aminosäuren vom N-Terminus eine Upa2-Variante erstellt, welche zur Phasentransition in der Lage ist. Durch eine Selbstinteraktion oder Selbstassemblierung dieser Variante könnte eine Art „Pool“ entstehen, in welchem sich durch Einwirkung der in Upa2²⁸⁴⁻²¹²¹ vorhandenen Effektor-domäne und durch Interaktion über das GWW-Motiv weitere Komponenten des endosomalen mRNA-Transports ansammeln. Durch die Phasentransition könnte es dabei immer wieder zur Verschmelzung von Molekülen und gleichzeitig zu deren Freisetzung kommen, sodass ein einigermaßen effizienter endosomaler Transport immer noch möglich ist, auch wenn nicht die Gesamtheit aller mRNP-Komplexe der Zelle zu jedem Zeitpunkt zur Verfügung steht. Da die Variante Upa2²⁸⁴⁻²¹²¹ eine intakte Effektor-domäne enthält, wäre es möglich, dass die leichte Erhöhung der Bipolarenrate auf die Ansammlung und damit verbundene Rückhaltung der mRNP-Komponenten im „Pool“ zurückzuführen ist. Ob die Variante Upa2²⁸⁴⁻²¹²¹ tatsächlich zu einer Selbstinteraktion in der Lage ist, könnte durch Hefe-Zwei-Hybrid-Analysen überprüft werden. Hier würde sich jedoch die Frage stellen, ob es auch in *S. cerevisiae* zu einer Akkumulation der Proteinvariante wie in *U. maydis* kommen könnte. Dadurch könnte eine etwaige Interaktion verfälscht werden.

3.3.4 Die Rekrutierung von Upa2 ist mRNA-abhängig und bedingt gleichzeitig die Formierung von mRNPs

Untersuchungen zur Abhängigkeit der Upa2-Lokalisierung haben gezeigt, dass für eine korrekte subzelluläre Rekrutierung von Upa2 die Präsenz und Funktionalität des RNA-Bindeproteins Rrm4 entscheidend ist. In *rrm4*-defizienten Mutanten konnte gezeigt werden, dass Upa1 im Gegensatz zu Upa2 trotz des Fehlens von Rrm4 auf endosomalen Partikeln zu finden ist. Upa1 kann auch in diesem Fall mithilfe der FYVE-Domäne an Phosphatidylinositol-3-Phosphate in der Lipidoberfläche früher Endosomen binden. Durch den Verlust von Rrm4 befindet sich jedoch keine mRNA-Fracht mehr auf diesen Endosomen, weshalb dort ebenfalls ein Fehlen des Poly(A)-Bindeproteins Pab1 beobachtet werden konnte (Pohlmann et al. 2015). Interessanterweise konnte Upa2 in *rrm4*-defizienten Mutanten ebenfalls nicht auf Endosomen beobachtet werden, was den ersten Hinweis auf eine mRNA-Abhängigkeit der Lokalisierung des Proteins lieferte. Somit wird also nicht nur der Transport von mRNAs durch die Anwesenheit von Upa2 bedingt, sondern die mRNA bedingt gleichzeitig die Lokalisierung von Upa2. Es scheint hierbei also zu einer wechselseitigen Bedingung zu kommen. Unterstützt wird diese Annahme durch die

Analysen der Upa2-Lokalisierung in Stämmen, welche gleichzeitig die veränderte Rrm4^{mR1}-Variante exprimieren. Da diese Rrm4-Variante noch zu einem gewissen Anteil mRNA binden kann und sich auf frühen Endosomen befindet, lassen sich einige endosomale Pab1-Signale beobachten. In diesen Fällen zeigte sich jedoch ein vollständiges Fehlen von endosomalem Upa2. Somit deuten die Ergebnisse an, dass selbst eine geringe Subpopulation von Cargo-mRNAs nicht ausreichend ist, um Upa2 zu rekrutieren. Eventuell könnte dies mit einer Sequenzspezifität der einzelnen RRM-Motive in Rrm4 zusammenhängen (Olgeiser et al. 2019), und Upa2 benötigt die Anwesenheit bestimmter mRNAs auf frühen Endosomen, um mit dem mRNP zu assemblieren. Durch die in der vorliegenden Arbeit gewonnenen Erkenntnisse ist es jedoch eher unwahrscheinlich, dass Upa2 mit den mRNAs direkt interagieren kann. Wahrscheinlicher ist eine Interaktion von Upa2 mit einem sowohl Rrm4- als auch mRNA-abhängigen zusätzlichen Faktor. Beispiele für eine kooperative Bindung von Ziel-mRNAs finden sich beim *ASH1*-mRNA-Transport in *S. cerevisiae*. Hier konnte gezeigt werden, dass das zentrale RNA-Bindeprotein She2p RNA binden kann, jedoch sind für eine hochaffine Bindung weitere Interaktionspartner vonnöten. So findet eine spezifische Bindung der *ASH1*-mRNA durch She2p nur in Kooperation mit dem nukleären Protein Loc1p statt. Die Interaktion zwischen diesen beiden Proteinen ist jedoch RNA-unabhängig. Nach dem Export des mRNPs aus dem Nukleus wird Loc1p von She3p verdrängt, welches ebenfalls eine wichtige Rolle bei der hochaffinen RNA-Bindung darstellt (Müller et al. 2011; Niedner et al. 2013). Bemerkenswert ist hierbei, dass eine Interaktion mit She2p eher von der unstrukturierten Form von She3p unterstützt wird, wodurch es auch als Gerüstprotein angesehen werden kann (Edelmann et al. 2017). Im Gegensatz zu Upa2 ist She3p jedoch selbst ein RNA-bindendes Protein und kann in *C. albicans* die Funktion von She2p übernehmen, da der pathogene Pilz kein Homolog von letzterem besitzt (Elson et al. 2009). Demgegenüber hat sich in tierischen Zellen gezeigt, dass ein Vorhandensein von Ziel-mRNAs für einen effizienten Zusammenbau des Transport-mRNPs bestehend aus Bic-D und Egalitarian notwendig war (McClintock et al. 2018).

Der Verlust von Upa2 selbst führt ebenfalls zu deutlichen Effekten innerhalb der Transportmaschinerie. Durch die von Kira Müntjes durchgeführten mikroskopischen RNA-Lebendzell-Analysen konnte gezeigt werden, dass der Transport verschiedener Ziel-mRNAs von Rrm4 durch den Verlust von Upa2 negativ beeinflusst wurde. Zwar konnten keine signifikanten Unterschiede bei der Transportgeschwindigkeit der untersuchten mRNAs in wildtypischen Zellen und entsprechenden *upa2*-defizienten Mutanten erkannt werden, aber es kam in den meisten Fällen zu einer Reduktion der Partikelanzahl und zu einer verringerten Transportdistanz. Diese Ergebnisse

korrelieren mit der Beobachtung, dass ungefähr 50 % weniger transportierte Pab1-Signale in *upa2Δ*-Stämmen auffindbar waren. Die Abhängigkeit einer korrekten mRNA-Ladung von der Anwesenheit einer funktionellen Upa2-Variante bestätigte sich somit. Dass Upa2 ein Stabilität-vermittelndes Gerüstprotein darstellen könnte, wurde zudem durch die Untersuchungen zu Cdc3-Gfp untermauert. Durch die fluoreszenzmikroskopischen Analysen wurde deutlich, dass der Verlust von Upa2 sich nicht nur auf den mRNA-Transport, sondern auch auf die Translation von *cdc3*-mRNA auswirkt. Es ist denkbar, dass ohne Upa2 nicht nur mRNAs mit einer geringeren Effizienz in der Zelle verteilt werden, sondern dass die postulierte lokale Translation dadurch eingeschränkt wird. Eventuell könnte Upa2 die Translation mithilfe der Effektor-domäne regulativ beeinflussen. Dadurch ließe sich die fehlerhafte Verteilung der Septine in Hyphen erklären. Somit konnte nachgewiesen werden, dass die *upa2*-Deletion einen globalen Einfluss auf die Zelle hat und deren Morphologie sowie den Transport und die Lokalisierung verschiedener Makromoleküle beeinflusst.

3.3.5 Aktuelles Modell des endosomalen mRNA-Transports in *U. maydis*

Aufgrund der in der vorliegenden Arbeit gewonnenen Erkenntnisse zu Upa2 kann das Modell zur Darstellung des Endosomen-gekoppelten mRNA-Transports in *U. maydis* erweitert werden (Abbildung 28). Aus diversen vorangegangenen Studien war bereits zu Beginn dieser Arbeit bekannt, dass Rrm4 ein wichtiges Schlüsselement der Transportmaschinerie darstellt und mithilfe seiner RNA-Bindemotive seine Zieltranskripte binden kann (Becht et al. 2006; König et al. 2009). Der Rrm4-mRNA-Komplex wird mithilfe des Adapterproteins Upa1 über eine Interaktion des PAM2L-Motivs mit der MLLE-Domäne in Rrm4 an die endosomale Oberfläche rekrutiert, indem Upa1 mit seiner FYVE-Domäne mit für frühe Endosomen charakteristischen Lipiden interagiert (Pohlmann et al. 2015). Das Vorhandensein weiterer Proteine zur Regulierung dieser Rekrutierung ist dabei als wahrscheinlich anzusehen. Zusätzlich kann Upa1 mit seinem PAM2-Motiv mit Pab1-Molekülen interagieren, jedoch zeigte sich auch in diesem Fall, dass diese Interaktion keine essentielle Rolle spielt (Pohlmann et al. 2015). Bewegt wird der auf Endosomen verankerte Komplex durch die Mikrotubuli-abhängigen Motorproteine Kin3 in Richtung der Plus-Enden sowie Dynein in Richtung der Minus-Enden (Baumann et al. 2012). Der Transport der Endosomen selbst findet dabei unabhängig von einem intakten mRNA-Transport statt, wodurch die Hierarchie der Komponenten deutlich wird (Baumann et al. 2012). Befinden sich Rrm4 und damit gebundene mRNA-Frachten auf den Endosomen, lokalisieren auch weitere Komponenten wie Pab1 und Grp1 auf der

endosomalen Oberfläche. Bei Grp1 handelt es sich dabei ebenfalls um ein RNA-bindendes Protein, welches (Becht et al. 2006; Olgeiser et al. 2019). In der vorliegenden Arbeit wurde deutlich, dass Upa2 mit seinen verschiedenen Domänen und Motiven mehrere Aufgaben zu erfüllen scheint. Dabei kann es zwar nachweislich mit seinen vier PAM2-Motiven mit Pab1-Molekülen Interaktionen eingehen, diese scheinen aber nur von untergeordneter Wichtigkeit zu sein. Als funktionell wichtig erwies sich dagegen die neu identifizierte Effektor-domäne am N-Terminus des Proteins, welche regulatorische Aufgaben übernehmen könnte. Für die Rekrutierung von Upa2 ist dagegen die Anwesenheit des ebenfalls neu identifizierten C-terminalen GWW-Motivs essentiell, ohne welches ein ansonsten unverändertes Protein nicht zur endosomalen Oberfläche gelangen kann. In der vorliegenden Arbeit konnten die genauen Aufgaben der Effektor-domäne und Interaktionspartner des GWW-Motivs nicht ermittelt werden. Es wird trotzdem angenommen, dass Upa2 mithilfe seiner diversen Regionen als Gerüst-bildendes Protein agiert, welches die generelle Stabilität des mRNPs und die Effizienz des mRNA-Transports entlang der Mikrotubuli garantiert. Da sich zudem ein Einfluss von Upa2 auf die lokal vermittelte Translation vermuten lässt, wurde im aktuellen Modell ein Ringschluss der mRNA in Folge der Anwesenheit aller mRNP-Komponenten unter Berücksichtigung von Upa2 angedeutet. Durch die Gerüstwirkung von Upa2 könnte somit nicht nur die mRNA-Fracht stabilisiert, sondern zusätzlich deren Translation reguliert werden. Da jedoch bisher die lokale Translation auf frühen Endosomen in *U. maydis* nicht direkt experimentell gezeigt werden konnte, beruht diese Annahme weiterhin auf der Beobachtung, dass ribosomale Komponenten mit Faktoren wie Rrm4 kolokalisieren (Pohlmann et al. 2015). Unterstützt wird diese Hypothese jedoch durch den kürzlich erbrachten Nachweis einer Endosomen-gekoppelten Translation in Neuronen: In diesem Fall dienen späte, Rab7-positive Endosomen als Plattformen für die Synthese von Mitochondrien-assoziierten Proteinen (Cioni et al. 2019).

Durch neuere phylogenetische Studien wurde zudem deutlich, dass die Schlüsselkomponenten des endosomalen mRNA-Transports in verschiedenen Pilz-Phyla konserviert sind (Müller et al. 2019). Obwohl keine Konservierung der Komponenten Rrm4, Upa1 oder Upa2 außerhalb des Reichs der Pilze zu erkennen ist, zeigen sich aktuell immer mehr Hinweise auf eine Kopplung von Endosomen und mRNA-Transport auch in tierischen und pflanzlichen Zellen (Konopacki et al. 2016; Béthune et al. 2019; Müller et al. 2019). Eine detailliertere Analyse der Funktionen von Upa2 sowie die Identifizierung weiterer Komponenten im mRNP würden in Zukunft neue Erkenntnisse zur Organisation dieses Transportmechanismus liefern.

wie viele mRNAs sich in einem Rrm4-positiven mRNP befinden können, oder wie viele mRNPs auf einem einzelnen frühen Endosom transportiert werden.

In der vorliegenden Arbeit konnten weitere vorhergesagte PAM2-Motiv-tragende Proteine als direkte Interaktoren an mRNPs ausgeschlossen werden. Jedoch könnten jene Proteine, deren Deletion innerhalb dieser Arbeit nicht gelungen ist, einen Einfluss auf den globalen RNA-Metabolismus und somit auf Endosomen-gekoppelte Transportprozesse in *U. maydis* haben. Diese Möglichkeit könnte in weiteren Arbeiten untersucht werden. Zudem finden sich immer wieder kryptische PAM2-Motive in Proteinen aus *U. maydis*. Ob diese, entgegen ihrer geringen Konservierung, eine Rolle bei Protein-Protein-Interaktionen spielen, ist zu überprüfen. Des Weiteren stellt sich die Frage nach direkten Interaktionspartnern von Upa2, mit deren Hilfe das Protein zur Transportmaschinerie rekrutiert wird. Eine Identifizierung jener Komponenten würde das Verständnis über die mRNP-Assemblierung erweitern und könnte zudem weitere Interaktionsflächen für endosomale Proteine aufdecken. Hierbei könnten BioID-Methoden, bei denen im Komplex befindliche Proteine in Abhängigkeit von der Entfernung mit Biotin markiert werden, und anschließende massenspektrometrische Analysen Aufschluss geben (Roux et al. 2013; Kim et al. 2016). Ebenso interessant ist es zu untersuchen, auf welche Weise die Effektor-domäne ihren Einfluss auf den mRNA-Transport ausübt. Detaillierte Kartierungen der entsprechenden Region und Interaktionsstudien könnten ihren Charakter näher beschreiben und die genaue Funktionsweise von Upa2 verdeutlichen. Dadurch könnte auch analysiert werden, ob Upa2 eine Rolle bei einer lokalen Translation auf der endosomalen Oberfläche spielt. In Anbetracht aktueller Forschungsergebnisse erscheint es als wahrscheinlich, dass in *U. maydis* nicht nur Septine, sondern auch weitere Proteine während des endosomalen Transports hergestellt werden. So gibt es in *U. maydis* Hinweise auf eine Kopplung von endosomalem mRNA-Transport und dem Import mitochondrialer Proteine (Olgeiser et al. 2019). Dies stellt eine vielversprechende Parallele zu der kürzlich gezeigten lokalen Translation auf Rab7-positiven Endosomen in Neuronen dar (Cioni et al. 2019). Durch weitere Untersuchungen des Endosomen-gekoppelten mRNA-Transports in *U. maydis* könnte, durch Kombination mit dem neu erlangten Wissen aus tierischen Neuronen und pflanzlichen Zellen, ein Organismen-übergreifendes tiefergehendes Verständnis des Transportprozesses erreicht werden.

4 Addendum

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde ein etwaiger Zusammenhang zwischen dem fallweisen Transport von Peroxisomen und dem endosomalen Protein Upa2 untersucht. Während sich in *A. nidulans* das Adapterprotein PxdA finden lässt, welches Peroxisomen an frühe Endosomen koppelt (Salogiannis et al. 2016), konnte kein klares Homolog zu diesem Protein in *U. maydis* gefunden werden. Durch Analyse der Domänenarchitektur von PxdA mithilfe der SMART-Datenbank fiel jedoch auf, dass PxdA und Upa2 eine sehr ähnliche Domänenstruktur aufwiesen: Beide Proteine haben vergleichbare Größen von 1919 Aminosäuren (PxdA.1; aspergillusgenome.org) bzw. 2236 Aminosäuren (PxdA.2; NCBI) und 2121 Aminosäuren (Upa2), enthalten eine vorhergesagte strukturelle SCOP-Domäne (d1eq1a_; PxdA.1: Aminosäuren 1346-1517; PxdA.2: Aminosäuren 1663-1834; Upa2: Aminosäuren 1873-2051) und weisen zudem C-terminale *coiled coil*-Regionen auf (PxdA.2: Aminosäuren 1466-2116; in Upa2 als Dimerisierungsdomäne identifiziert, Aminosäuren 1783-2054). In PxdA konnten mithilfe der SMART-Datenbank insgesamt sieben PAM2-Motive entdeckt werden, jedoch nur in der kürzeren der beiden annotierten Varianten (Abbildung 27, **A**). Salogiannis et al. arbeiteten mit einer C-terminalen Fusion der längeren annotierten Proteinvariante, bei welcher die PAM2-Motive nicht von der SMART-Datenbank erkannt wurden. Zusätzlich stellte sich durch die Arbeit von Salogiannis et al. heraus, dass die sich am C-Terminus von PxdA befindende Tandem *coiled coil*-Region die Motilität des Proteins vermittelt. Auch hierbei zeigte sich eine interessante Ähnlichkeit zu Upa2, welches ebenfalls über ein C-terminal gelegenes Motiv auf frühe Endosomen rekrutiert wird. Durch diese strukturellen Übereinstimmungen wurde vermutet, dass Upa2 einen mit PxdA verwandten Peroxisomenadapter in *U. maydis* darstellen könnte. Um dies zu überprüfen, wurde *upa2* in einem Stamm deletiert, welcher ektopisch Gfp-SKL exprimiert. Durch fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen konnte jedoch gezeigt werden, dass Gfp-SKL trotz der *upa2*-Deletion weiterhin durch die Hyphe transportiert wurde (Abbildung 27, **B**). Somit konnte ausgeschlossen werden, dass Upa2 einen Vermittler für Peroxisomenmotilität darstellt. Die Frage nach einem entsprechenden Molekül in *U. maydis* bleibt folglich weiterhin ungeklärt.

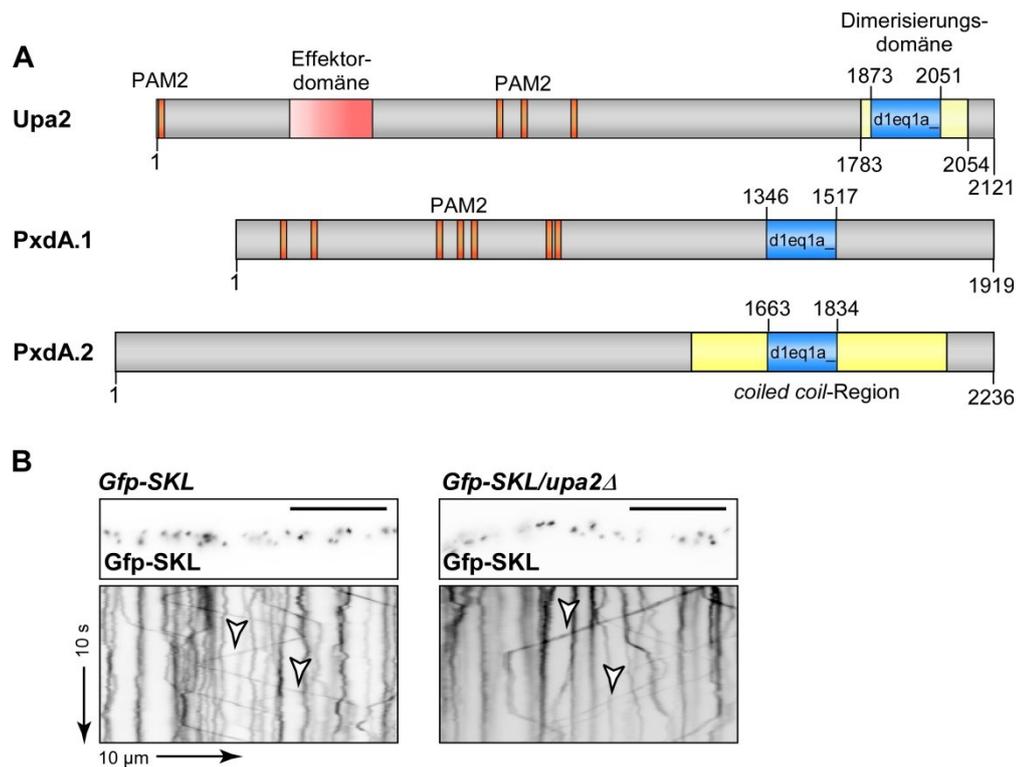


Abbildung 29: Upa2 und PxdA teilen eine ähnliche Domänenarchitektur, jedoch übernimmt Upa2 keine Aufgaben bei der Verteilung von Peroxisomen in *U. maydis*.
A Schematische Darstellung der Proteinstrukturen von Upa2 im Vergleich zu den beiden unterschiedlich annotierten PxdA-Varianten. Orange, PAM2. Hellrot mit Farbverlauf, Effektordomäne. Gelb, (hell) Dimerisierungsdomäne in Upa2 bzw. (dunkel) *coiled coil*-Region in der längeren Variante PxdA.2. Blau, vorhergesagte SCOP-Domäne (d1eq1a_).
B Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen und dazugehörige Kymographen von Hyphen der Stämme AB33Gfp-SKL und AB33Gfp-SKL/upa2Δ. Weiße Pfeile markieren Transportbewegungen. Größenstandard 10 μ m.

Eine weitere unerwartete Beobachtung war, dass Upa2 anscheinend mit dem Protein Num1 (*nuclear migration protein 1*) interagieren kann. Der Verlust von Num1 zeigt keinen Einfluss auf axenische Kulturen, wirkt sich jedoch negativ auf Filamente aus: Deletionshyphen sind kürzer, stärker verzweigt und gekrümmt, wachsen zudem bipolar aus und haben delokalisierte Septen. In früheren Studien wurde gezeigt, dass Num1 eine strukturelle Komponente des Spleißosoms darstellt und eine Rolle bei der Prä-mRNA-Prozessierung übernimmt. Aufgrund einer stark erhöhten Intronretentionsrate von circa 80 % wird angenommen, dass die morphologischen Defekte bei *num1*-defizienten Zellen auf Spleißdefekte zurückzuführen sind. Zusätzlich ist bekannt, dass Num1 mit Kinesin-1 interagieren kann, wodurch eine Verbindung zwischen der Spleißmaschinerie und intrazellulären Transportmechanismen entsteht (Kellner et al. 2014; Zhou et al. 2018). Ein Zusammenhang zwischen Num1 und Upa2 wurde zufällig entdeckt, als eine bestimmte Region aus Upa2 (Aminosäuren 1-598

bzw. Aminosäuren 284-598) in Hefe-Zwei-Hybrid-Experimenten eine Interaktion mit einem Kontrollvektor (Sfil MCS_1) zeigte (Abbildung 28, **B**). Genauere Analysen der Sequenz des Kontrollvektors zeigten, dass sich der gesamte offene Leserahmen von Num1 in diesem Vektor befand. Interessanterweise befand sich in der Upa2-Sequenz (Aminosäure 284-598), die die Interaktion mit Num1 zeigte, ein kryptisches PAM2-Motiv (PAM2x-2: Aminosäure 344-363), welches trotz fehlender Konsensussequenz in Upa2-Homologen aus nahen Verwandten von *U. maydis* stark konserviert ist (Abbildung 28, **A**). Ob dieses Motiv tatsächlich ein Num1-spezifisches Interaktionsmotiv darstellt, wurde in der vorliegenden Arbeit jedoch nicht überprüft.

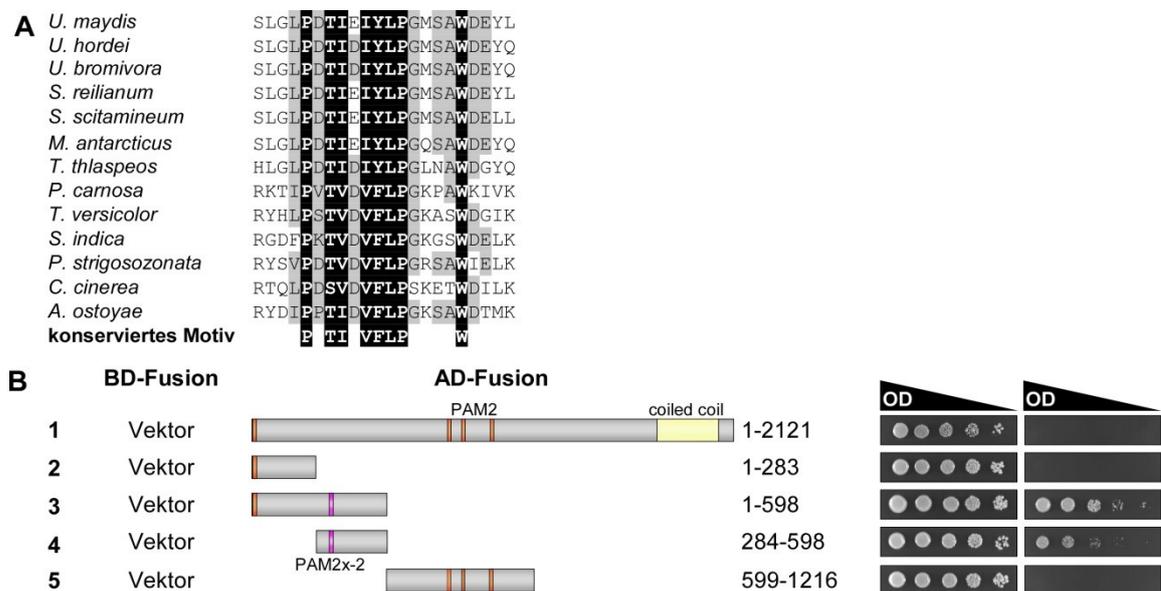


Abbildung 30: Ein N-terminaler Bereich von Upa2 vermittelt eine Interaktion mit dem Protein Num1. A Sequenzvergleich der Aminosäurepositionen 344-363 (PAM2x-2) in Upa2 im Vergleich zu den Homologen aus verwandten Organismen. Grau hinterlegte AS sind weniger konserviert. Die schwarze Hinterlegung zeigt eine starke Konservierung der Aminosäuren. **B** Schematische Darstellung der auf Interaktion überprüften Proteinfragmente, ohne Darstellung der N-terminalen Fusionen mit BD oder AD, sowie Wachstumsanalysen der auf Interaktion getesteten Proteinfragmente mit Kontroll- und Selektionsplatten.

5 Material und Methoden

Die hier beschriebenen Standardmethoden und/oder Medienzusammensetzungen sowie Informationen zu verwendeten Materialien sind zum Teil wörtlich oder leicht modifiziert aus der Methodensammlung der AG Feldbrügge übernommen worden.

5.1 Materialien und Bezugsquellen

5.1.1 Chemikalien, Puffer, Lösungen, Medien, Enzyme und Kits

Chemikalien

Alle in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien wurden von den hier aufgelisteten Firmen in *pro analysi* (p.a.)-Qualität bezogen:

Ambion, Amersham, AppliChem GmbH, BioRad, Biozym Scientific GmbH, Boehringer, Carl Roth, Difco, Duchefa Biochemicals, Fermentas, Finnzymes, Fisher BioReagents, Fluka Analytical, GE Healthcare, Gerbu, Invitrogen (Life Technologies), Merck, Promega, Riedel-de Haën, Roche, Serva, Sigma-Aldrich, Thermo Fisher Scientific, VWR Chemicals.

Puffer und Lösungen

Die in dieser Arbeit verwendeten Standard-Puffer und Lösungen wurden nach Ausubel und Sambrook hergestellt. Spezielle Puffer und Lösungen sind unter der jeweiligen Methode gesondert aufgeführt.

Medien

E. coli:

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

dYT-Flüssigmedium (Sambrook et al., 1989)

16 g Trypton
10 g Hefeextrakt
5 g NaCl
Mit H₂O_{bid.} auf 1 l auffüllen

YT-Festmedium (Sambrook et al., 1989)

8 g Trypton
5 g Hefeextrakt
5 g NaCl
20 g Bacto-Agar
Mit H₂O_{bid.} auf 1 l auffüllen

Antibiotika zur Selektion von *E. coli* wurden in den folgenden Konzentrationen verwendet:

Ampizillin (Amp) 100 µg/ml; Kanamycin (Kan) 50 µg/ml

***S. cerevisiae*:**

Zur Kultivierung von *S. cerevisiae* wurden die folgend aufgeführten Medien verwendet. Soweit nicht anders angegeben, wurden die Medien für 5 min bei 121 °C autoklaviert.

SD-Grundmischung

Je 10 g der folgenden Komponenten: Alanin, Arginin, Asparagin, Aspartat, Cystein, Glutamin, Glutamat, Glyzin, Methionin, myo-Inositol, Isoleuzin, Lysin, Phenylalanin, Prolin, Serin, Threonin, Tyrosin, Uracil, Valin
1 g p-Aminobenzoesäure

Selektives SD-Pulver

36,7 g SD-Grundmischung
2 g Histidin
4 g Leuzin
2 g Tryptophan
0,5 g Adenin
SD-leu-trp enthält kein Leuzin und kein Tryptophan; in SD-leu-trp-his-ade fehlen Leuzin, Tryptophan, Histidin und Adenin.

2x selektive SD-Lösung

5 g selektives SD-Pulver
16,75 g Yeast Nitrogen base w/o Amino Acids
Mit H₂O_{bid.} auf 1 l auffüllen. 30 Minuten rühren, pH 5,8 einstellen. In 200 ml Aliquots aufteilen und autoklavieren.

Flüssigmedium zur Inkubation für Hefe-Zwei-Hybrid-Experimente

200 ml 2x selektive SD-Lösung
50 ml 20 % Glucose-Lösung
7,5 ml 0,25 % Adeninhemisulfat
ad 250 ml steriles H₂O

Festmedium zur Inkubation für Hefe-Zwei-Hybrid-Experimente

200 ml Wasseragar (8 g Agar auf 200 ml H₂O)
200 ml 2x selektive SD-Lösung
50 ml 20 % Glucose-Lösung
7,5 ml 0,25 % Adeninhemisulfat (nur für SD-leu-trp)

***U. maydis*:**

Zur Kultivierung von *U. maydis* wurden die im Folgenden aufgeführten Medien verwendet. Soweit nicht anders angegeben, wurden die Medien für 5 min bei 121 °C autoklaviert.

CM (Vollmedium)

(Holliday, 1974b)

- 1,5 g NH₄NO₃
- 2,5 g Casein-Hydrolysat
- 0,5 g Heringssperma-DNA
- 1 g Hefeextrakt
- 10 ml Vitaminlösung (s.u.)
- 62,5 ml Salzlösung (s.u.)
- 0,5 ml Spurenelementlösung (s.u.)
- 20 g Bacto-Agar (für Festmedium)
- Mit H₂O_{bid.} auf 980 ml auffüllen,
- pH-Wert mit NaOH auf pH 7,0 einstellen.
- Nach Autoklavieren 2 % (v/v) 50 % sterile
- Glucose-Lösung (1 % f.c.) hinzufügen.

NM (Nitrat-Minimalmedium)

(Scherer et al. 2006)

- 62,5 ml Salzlösung (s.u.)
- 3,8 g KNO₃
- Mit H₂O_{bid.} auf 980 ml auffüllen,
- pH-Wert mit NaOH auf pH 7,0 einstellen.
- Nach Autoklavieren 2 % (v/v) 50 % sterile
- Glucose-Lösung (1 % f.c.) hinzufügen.

Spurenelementlösung (Holliday, 1974b)

- 60 mg H₃BO₃
- 191 mg MnCl₂
- 100 mg ZnCl₂
- 47 mg NaMoO₄ * 2 H₂O

Salzlösung (Holliday, 1974b)

- 8 g KH₂PO₄
- 2 g Na₂SO₄
- 1 g MgSO₄ * 7 H₂O
- Mit H₂O_{bid.} auf 1 l auffüllen und autoklavieren.

NSY-Glycerin (zur Kryokonservierung)

- 8 g Nutrient Broth
- 1 g Hefeextrakt
- 5 g Sucrose
- 800 ml 87% Glycerin
- Mit H₂O_{bid.} auf 1 l auffüllen und sterilfiltrieren.

Regenerationsagar (Schulz et al. 1990)

- Top-Agar:
- 182,2 g Sorbitol
- 10 g Hefeextrakt
- 4 g Bacto-Pepton
- 4 g Saccharose
- 15 g Agar
- Mit H₂O_{bid.} auf 1 l auffüllen und autoklavieren.
- Bottom-Agar:
- Wie Top-Agar, mit selektivem Antibiotikum (s.u.).

Vitamin-Lösung (Holliday, 1974b)

- 100 mg Thiamin
- 20 mg Calciumpanthothenat
- 50 mg Para-Aminobenzoensäure
- 20 mg Nikotinsäure
- 20 mg Cholinchlorid
- 40 mg Myo-Inositol
- 50 mg Folsäure
- Mit H₂O_{bid.} auf 1 l auffüllen und sterilfiltrieren.

Tab. 5.1: In dieser Arbeit eingesetzte Antibiotika und deren Konzentrationen.

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

Enzyme

Tab. 5.2: In dieser Arbeit verwendete Enzyme.

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

Größenstandards für die DNA-Gelelektrophorese

- λ -PstI
Mit dem Restriktionsenzym PstI hydrolysierte genomische DNA des Phagen λ . Die genomische DNA wurde bezogen von Thermo Fisher Scientific.
- Generuler 1 kb DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific)

Verwendete Kits

In dieser Arbeit wurden folgend aufgeführte Kits nach Herstellervorgaben verwendet.

Tab. 5.3: In dieser Arbeit verwendete Kits.

Name	Hersteller	Verwendungszweck
Plasmid Midi Kit (100)	Qiagen	Plasmidpräparation aus <i>E. coli</i>
Plasmid Mini Kit (250)	Qiagen	Plasmidpräparation aus <i>E. coli</i>
JETQUICK DNA Clean-Up Kit	Genomed	Aufreinigung Plasmide / PCR-Produkte
JETQUICK Gel Extraction Spin Kit	Genomed	Geextraktion von DNA-Fragmenten
PCR-DIG-Labeling Kit	Roche	Herstellung Digoxigenin-markierter DNA-Sonden
TOPO-TA Cloning Kit	Life Technologies	Zwischenklonierung von DNA-Fragmenten
SureClean	Bioline	Aufreinigung von DNA-Fragmenten

5.1.2 Zentrifugen

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

5.1.3 Oligonukleotide

In dieser Arbeit verwendete Oligonukleotide wurden von der Firma Metabion GmbH (Martinsried, Deutschland) synthetisiert. In Tabelle 4.4 sind für Klonierungen verwendete Oligonukleotide angegeben. Für Sequenzierungen eingesetzte Oligonukleotide sind nicht aufgeführt.

Tab. 5.4: In dieser Arbeit verwendete Oligonukleotide.

Name	Nukleotid-Sequenz (5' → 3')	Verwendungszweck
oRL1648	GGTCTCGCCTGCAATATTTGGCCAAGCACCCAATC	<i>upa11Δ</i> U2
oRL1649	GGTCTCCAGGCCAGTCGGGCTCTTGATCAGGAC	<i>upa11Δ</i> U3
oRL1650	GGTCTCCGGCCCTAGGCGATTGTATTCAATC	<i>upa11Δ</i> D1
oRL1651	GGTCTCGCTGCAATATTGCAGAGTTGGCTCGGCTCG	<i>upa11Δ</i> D2
oRL1696	GGTCTCGCTGCAATATTTGCAATGTCTAGCTGACC	<i>upa6Δ</i> U2
oRL1697	GGTCTCCAGGCCGATTGCTCTCTTTCTGTAGCTTG	<i>upa6Δ</i> U3
oRL1698	GGTCTCCGGCCTTGATGGGGTCGAGCGTAC	<i>upa6Δ</i> D1
oRL1699	GGTCTCGCTGCAATATTTGCTTCATGTCCGTCGCAGG	<i>upa6Δ</i> D2
oRL1704	GGTCTCGCTGCAATATTGCACGCGCTGTTGACG	<i>upa7Δ</i> U2
oRL1705	GGTCTCCAGGCCGGTTGCTCAGCAATGCTTG	<i>upa7Δ</i> U3
oRL1706	GGTCTCCGGCCCAAGACCGTAATGGATCGTAC	<i>upa7Δ</i> D1
oRL1707	GGTCTCGCTGCAATATTGCTCCTCACAGGTGAC	<i>upa7Δ</i> D2
oRL1815	GGTCTCGCCTGCAATATTGGAGAGATGCACTCTG	<i>upa11Δ</i> D1
oRL1816	GGTCTCCAGGCCCTTCGATGGACTGTAACCCCT	<i>upa12Δ</i> D2
oRL1817	GGTCTCCGGCCGACGCTGGCGACTACAAGC	<i>upa12Δ</i> U2
oRL1818	GGTCTCGCTGCAATATTGGCAAAGCCGAC	<i>upa12Δ</i> U3
oRL1921	GGTCTCGCCTGCAATATTTGATGGAGATCCGATC	<i>upa4Δ</i> U2
oRL1922	GGTCTCCAGGCCGCATCAAGAAGTTCTTCTTC	<i>upa4Δ</i> U3
oRL1923	GGTCTCCGGCCCAGTGACGATTCGTTTGACG	<i>upa4Δ</i> D1
oRL1924	GGTCTCGCTGCAATATTGAGATGCTCCTGCCTAGC	<i>upa4Δ</i> D2
oRL1925	GGTCTCGCCTGCAATATTCAACGATGCGACG	<i>upa9Δ</i> U2
oRL1926	GGTCTCCAGGCCAGTTGTGACAAGGGGCC	<i>upa9Δ</i> U3
oRL1927	GGTCTCCGGCCCCACAGAACCCTCCATCCAC	<i>upa9Δ</i> D1
oRL1928	GGTCTCGCTGCAATATTAGCGTCAAGCGCACCTGC	<i>upa9Δ</i> D2
oRL1971	GGTCTCGCCTGCAATATTGGCATCGATGAATGCTGG	<i>upa10Δ</i> U2
oRL1972	GGTCTCCAGGCCGGTATGATACCTTCGGCTGTG	<i>upa10Δ</i> U3
oRL1973	GGTCTCCGGCCCATCCAACATCGATACAGC	<i>upa10Δ</i> D1
oRL1974	GGTCTCGCTGCAATATTCCGCTGACGCGCGCA	<i>upa10Δ</i> D2
oRL1975	GGTCTCGTGTCTTCCCAGTCGCTACGATC	<i>upa10Δ</i> Bsal mut rev
oRL1976	GGTCTCGGACACCGTAGACAAGCGTGGTTAG	<i>upa10Δ</i> Bsal mut fw
oMB7	GTCGCTCTCCGTGAATATTAGCAGATGAGAAGCGATGCTC	<i>upa8Δ</i> U2
oMB8	ATAGCTCTTCCGGCCGTGACGCGAGAAAAGCCTGTTT	<i>upa8Δ</i> U3
oMB9	TACGCTCTTCCCCTGTCAACTAGGTAAGGGTCTCGGAA	<i>upa8Δ</i> D1
oMB10	GCGGCTCTTCCGACAATATTTCAATTTCTTCCACAAGTC	<i>upa8Δ</i> D2
oMB15	GGTCTCGCCTGAATATTGCTGAGCCGAATCACA	<i>upa13Δ</i> U2
oMB16	GGTCTCCAGGCTGCTGGTGATCCACATTTAT	<i>upa13Δ</i> U3
oMB17	GGTCTCCGGCCTCCACTAAGCGCCAGTGAGA	<i>upa13Δ</i> D1
oMB18	GGTCTCGCTGCAATATTCAACTCGCTCATCCCTG	<i>upa13Δ</i> D2
oMB23	GTAGCTCTTCCGTGCAATATTGCTGCGTCTGCTCTTGAG	<i>upa14Δ</i> U2
oMB24	TGTGCTCTTCCGGCCATTGGCCGCGTAGGCACACG	<i>upa14Δ</i> U3
oMB25	GATGCTCTTCCCCTTCGGTTTGACCCGCACAGGCTG	<i>upa14Δ</i> D1
oMB26	TCTGCTCTTCCGACAATATTACGCCATTACCGTTGAG	<i>upa14Δ</i> D2
oMB43	GGTCTCGCCTGGCTGAGGCAGGTCAAGCTGAAGCCGAG	Upa2mGWW precursor
oMB44	GGGTCTCGCGGCCTTCATCCACCTCGACCTCCTT	Upa2mGWW precursor
oMB45	GGTCTCGGCCGCGCTTCTGCCAAGCGCCGACCATGGTG	Upa2mGWW precursor
oMB46	GGTCTCGCTGCGGCGCGCCGGCCGCTTTACTTGTAACA	Upa2mGWW precursor
oMB935	GATCCCATGGTGAGCAAGGGCGAGGAG	Gfp-SKL fw
oMB936	GCGGCCGCTTTAGAGCTTGACTTGTACAGCTCGTCCAT	Gfp-SKL rev
oDD524	GGTCTCCTGGCCAGCGTTTGGAGCTTAGCTTCC	Upa2 DUF rev
oDD142	GGTCTCGGATCCATATGGAACTCAAGACCGAATGAG	Upa2 DUF fw
oDD160	GGTCTCGCCTGCAATATTTGTAGTCAACTGCCTCTTTG	Upa2_U2
oDD161	GGTCTCGGATCCTTGATGAGCTAGACAGGAAAC	Upa2_U3

oDD162	GGTCTCCGCCAGTGGTAATGATTGCAATGCC	Upa2_D1
oDD163	GGTCTCCCTGCAATATTCTCGGTATGCGTTAGAATG	Upa2_D2
oDD526	GGTCTCCTGGCAGACCACCACCCGCCTTC	Upa2 Ende Exon2 rev
oDD527	GGTCTCGCCTGCAATATTGCCAATGGCACTAC	Upa9mCherry U2
oDD603	GGTCTCGGATCCATATGGCTTGGGCGTCTATGCATGCC	Upa2G 2070 GWWm fw
oDD604	GGTCTCGGATCCATATGAAGGCTGAAGAGCTCGCCGAAG	Upa2G 1958 fw
oDD605	GGTCTCGTGGCCAAAGAAGACCAGGCAGCATAG	Upa9mCherry U3
oDD579	CGTGCGGCGATCGCCCCATCG	Upa2G 960-1215 rev
oDD581	ATAACATATGAATGCGGGCGCCCAACGGG	Upa2G 599-960 rev
oDD582	CGTTGGGCGCCGCATTCCGGAC	Upa2G 284-599 fw
oDD583	GTGCCATATGGAGGGCAGCAGTC	Upa2G 1-284 rev
oDD584	CGCGCATATGCGTGCTAGCGAACCAGGTTC	Upa2G 284-599 fw
oDD585	GAACCTGGTTGCTAGCACGTG	Upa2G 1-284 fw
oDD588	CGCGCATATGGTAACTAGTGCTGATGGTGGTG	Upa2G 960-1215 fw
oDD589	GCACCACATCAGCACTAGTTACTGCGATGC	Upa2G 599-960 rev
oDD603	GGTCTCGGATCCATATGGCTTGGGCGTCTATGCATGCC	Upa2 2070 fw
oDD604	GGTCTCGGATCCATATGAAGGCTGAAGAGCTCGCCGAAG	Upa2 1958 fw
oDD634	GGTCTCCGGCCTAGTAGGGTCCAACGTCTAC	Upa9mCherry D1
oDD635	GGTCTCCCTGCCAATATTCGACCTCGAGGCCGAG	Upa9mCherry D2
oDD741	GGTCTCCTGGCAGATGCAGCGGCCTTCATCCACCTCGACCTC	Upa2G 2070GWWm
oDD990	GGTCTCAGCTGCGGCTCGTGTTACATCGAGGATGTGGAGCTGGTCGGTC GT	Upa2G 1958 SMHAPm fw
oDD991	GGTCTCACAGCCGCCGCCCAAGCGCCCGTCTTTTGCTTTTCGACCGCC TCCCATCCATC	Upa2G 1958 SMHAPm rev
oUM6	CGCGCATATGGGTTTTACCTTTGATCGC	Upa2 399 fw
oUM255	CGCGCATATGCCTTGCCATATTCCTC	Upa2 399 fw

5.1.4 Plasmide und Plasmidkonstruktionen

Plasmide für Arbeiten mit *U. maydis* und *E. coli*

In dieser Arbeit verwendete Klonierungsvektoren und Ausgangsplasmide:

pCR[®]II-TOPO (Life Technologies)

Vektor zur Klonierung von PCR-Produkten mit Hilfe der Typ-I-Topoisomerase. Die Anwesenheit eines integrierten Fragmentes kann durch Blau/Weiß-Selektion überprüft werden.

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

Der Vektor enthält eine Hygromyzin-Resistenzkassette als 1884 bp langes SfiI/SfiI-Fragment. Die Kassette ist aus dem konstitutiven Promotor *Phsp70*, dem für die Hygromyzin-Phosphotransferase kodierenden *hph*-Gen aus *E. coli* (Wang et al. 1988) sowie dem heterologen Terminator *Tnos* aus *Agrobacterium tumefaciens* (Bevan et al., 1983) aufgebaut.

pMF1n (pUMa262); (Brachmann et al. 2004)

Der Vektor enthält eine Nourseothrizin-Resistenzkassette als 1437 bp langes SfiI/SfiI-Fragment. Die Kassette besteht aus dem *gap1*-Promotor, dem für die Nourseothrizin-N-Acetyltransferase kodierenden *nat*-Gen sowie dem Terminator des *iso-1-cytochrom c*-Gens aus *Saccharomyces cerevisiae* (*Tcyc1*).

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

Der Vektor enthält eine Genetizin-Resistenzkassette als 2073 bp langes SfiI/SfiI-Fragment. Die Kassette ist aus dem konstitutiv aktiven Promotor *Potef*, dem für die 3-Aminoglykosid-Phosphotransferase kodierenden *neo*-Gen sowie dem Terminator des *iso-1-cytochrom c*-Gens aus *Saccharomyces cerevisiae* (*Tcyc1*) aufgebaut.

pDest (pUMa1467); (Terfrüchte et al. 2014)

Das pUC57-Derivat für Golden-Gate-Klonierungen dient als Zielvektor für das finale Ligationsprodukt. Es enthält neben einer multiplen Klonierungsstelle mit BsaI-Erkennungssequenzen das Gen für das Enzym β -Laktamase zur Blau/Weiß-Selektion auf Ampicillin-haltigem Medium (AmpR).

pStorI (pUMa1506); (Terfrüchte et al. 2014)

Vektor für Golden-Gate-Klonierungen, welcher die Nourseothrizin-Resistenzkassette aus pMF1n (pUMa262) enthält.

pStorII (pUMa1507); (Terfrüchte et al. 2014)

Vektor für Golden-Gate-Klonierungen, welcher die Hygromyzin-Resistenzkassette aus pMF1hs (pUMa194) enthält.

pStorIII (pUMa1546); (Terfrüchte et al. 2014)

Vektor für Golden-Gate-Klonierungen, welcher das Gen zur Expression von eGfp und die Hygromyzin-Resistenzkassette aus pMF5-1h (pUMa317) enthält.

pUpa2 Δ -HygR (pUMa691); (J. Hohenner)

Plasmid zur Herstellung einer Deletionsmutante des *upa2*-Genes (UMAG_10350). Es enthält eine 2010 bp lange stromaufwärts des offenen Leserahmens von *upa2* gelegene Flanke sowie eine 1369 bp lange stromabwärts liegende Flanke. Zwischen beiden Flanken befindet sich ein 1884 bp langes SfiI/SfiI-Fragment aus pMF1hs (pUMa194) mit einer Hygromyzin-Resistenzkassette. Das Plasmid wurde für die homologe Integration in den *upa2*-Lokus verwendet.

pPab1-mCherry-HygR (pUMa1208); (König et al. 2009)

Plasmid zur Herstellung einer C-terminalen mCherry-Fusion an Pab1 (UMAG_03494). Es enthält ein 3,9 kb SfiI/SfiI-Fragment aus pUMa1093, welches den offenen Leserahmen für mCherry enthält mit einem dreifachen C-terminalen c-Myc-Epitop. Zudem enthält es den heterologen Terminator Tnos sowie eine Hygromyzin-Resistenzkassette.

pRrm4-mCherry-HygR (pUMa1468); (S. Baumann)

Plasmid zur Herstellung einer C-terminalen mCherry-Fusion an Rrm4 (UMAG_10836). Es enthält ein 3,7 kn Sfil/Sfil-Fragment aus pUMa1409, welches den offenen Leserahmen für mCherry enthält. Zudem trägt es den heterologen Terminator Tnos und eine Hygromycin-Resistenzkassette.

p123 otef-Gfp-Tnos-CbxR (pUMa43, Gerhardt Weinzierl)

Plasmid zur konstitutiven Überexpression von Gfp unter Kontrolle des otef-Promotors. Das Plasmid enthält den heterologen Terminator Tnos sowie eine Carboxin-Resistenz (CbxR) und wird zur homologen Integration in den *ip^s*-Lokus verwendet.

In dieser Arbeit eingesetzte Plasmide zur Hefe-Zwei-Hybrid-Analyse:

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

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

pGBKT7-Sfil MCS (pUMa1625; Clontech)

Plasmid zur Expression von Hybrid-Proteinen in N-terminaler Fusion mit der DNA-Bindedomäne von Gal4 (AS 1-147) sowie mit einem c-Myc-Epitop für eine Detektion in Western Blot-Analysen. Diese beiden Komponenten werden in der Arbeit mit der Abkürzung BD (Bindedomäne) zusammengefasst. Die Sequenz des zu testenden Proteins wird an einer MCS (*multiple cloning site*) als Sfil/Sfil-Fragment eingefügt. Das Gen steht unter Kontrolle des *ADH1*-Promotors PADH1 und wird terminiert durch TADH1. Das Plasmid trägt das *TRP1*-Gen zur Selektion in *S. cerevisiae* und eine Kanamycin-Resistenzkassette zur Selektion in *E. coli*.

pGBKT7-Rrm4 (pUMa1628; T. Pohlmann)

Plasmid zur Expression von BD-Rrm4.

pGADT7-Rrm4 (pUMa1629; T. Pohlmann)

Plasmid zur Expression von AD-Rrm4.

pGADT7-Upa2 (pUMa1631; T. Pohlmann)

Plasmid zur Expression von AD-Upa2.

pGBKT7-Pab1 (pUMa1632; T. Pohlmann)

Plasmid zur Expression von BD-Pab1.

pGADT7-T (pUMa1636; Clontech)

Plasmid zur Expression einer N-terminalen AD-Fusion an das große T-Antigen aus SV40. Aufgrund seiner Interaktion mit p53 wird es als Positivkontrolle zusammen mit pGBKT7-p53 verwendet.

pGBKT7-Lam (pUMa1637; Clontech)

Plasmid zur Expression einer N-terminalen BD-Fusion an humanes Lamin C. Aufgrund einer fehlenden Interaktion mit den meisten Proteinen wird es als Negativkontrolle verwendet.

pGBKT7-p53 (pUMa1638; Clontech)

Plasmid zur Expression einer N-terminalen BD-Fusion an murines p53. Aufgrund seiner Interaktion mit dem großen T-Antigen aus SV40 wird es als Positivkontrolle zusammen mit pGADT7-T verwendet.

pGBKT7-Upa1 (pUMa1730; T. Pohlmann)

Plasmid zur Expression von BD-Upa1.

pGBKT7-Pab1^{mm} (pUMa1998; T. Pohlmann)

Plasmid zur Expression von BD-Pab1^{mm}. Entspricht BD-Pab1, trägt aber die Mutationen Y580A, V583A, K593A und I598A in der MLLE-Domäne.

pGBKT7-onlyMLLE^{Pab1} (pUMa2000; T. Pohlmann)

Plasmid zur Expression von BD-MLLE^{Pab1}. Entspricht den letzten 86 AS aus BD-Pab1.

pGADT7-Upa1¹⁻¹⁹⁴ (pUMa2002; T. Pohlmann)

Plasmid zur Expression von AD-Upa1¹⁻¹⁹⁴. Die Aminosäuren 195-1287 wurden deletiert.

pGADT7-Upa2¹⁷²¹⁻²¹²¹ (pUMa3313; T. Pohlmann)

Plasmid zur Expression von AD-Upa2¹⁷²¹⁻²¹²¹. Die Aminosäuren 1-1720 wurden deletiert.

pGBKT7-Upa2¹⁷²¹⁻²¹²¹ (pUMa3380; T. Pohlmann)

Plasmid zur Expression von BD-Upa2¹⁷²¹⁻²¹²¹. Entspricht ansonsten dem Konstrukt pGADT7-Upa2¹⁷²¹⁻²¹²¹.

pGBKT7-mMLLE^{Pab1} (pUMa3420; T. Pohlmann)

Plasmid zur Expression von BD-mMLLE^{Pab1}. Entspricht den letzten 86 AS aus BD-Pab1, enthält aber zusätzlich die Aminosäuresubstitutionen Y580A, V583A, K593A und I598A in der MLLE-Domäne.

pGADT7-Upa2¹²¹⁷⁻²¹²¹ (pUMa3437; T. Pohlmann)

Plasmid zur Expression von AD-Upa2¹²¹⁷⁻²¹²¹. Die Aminosäuren 1-1216 wurden deletiert.

pGADT7-Upa2¹⁻¹²¹⁶ (pUMa3562; T. Pohlmann)

Plasmid zur Expression von AD-Upa2¹⁻¹²¹⁶. Die Aminosäuren 1217-2121 wurden deletiert.

pGADT7-Upa2^{1-1216mP1} (pUMa3563; T. Pohlmann)

Plasmid zur Expression von AD-Upa2^{1-1216mP1}. Die Aminosäuren 1217-2121 wurden deletiert. Zudem enthält es die Mutationen L6A, V8A sowie F13A im ersten PAM2-Motiv.

pGADT7-Upa2^{1-1216mP234} (pUMa3564; T. Pohlmann)

Plasmid zur Expression von AD-Upa2^{1-1216mP234}. Die Aminosäuren 1217-2121 wurden deletiert. Zudem enthält es die Mutationen L863A und F870A im zweiten PAM2-Motiv, L925A und F932A im dritten PAM2-Motiv sowie L1051A und F1058A im vierten PAM2-Motiv.

pGADT7-Upa2^{1-1216mP1234} (pUMa3565; T. Pohlmann)

Plasmid zur Expression von AD-Upa2^{1-1216mP1234}. Die Aminosäuren 1217-2121 wurden deletiert. Zudem enthält es die Mutationen L863A und F870A im zweiten PAM2-Motiv, L925A und F932A im dritten PAM2-Motiv sowie L1051A und F1058A im vierten PAM2-Motiv. Zudem enthält es die Mutationen L6A, V8A sowie F13A im ersten PAM2-Motiv, L863A und F870A im zweiten PAM2-Motiv, L925A und F932A im dritten PAM2-Motiv sowie L1051A und F1058A im vierten PAM2-Motiv.

In dieser Arbeit hergestellte Plasmide:

Alle Plasmide wurden unter Verwendung molekularbiologischer Standardmethoden hergestellt. Sie tragen eine Ampizillin-Resistenzkassette zur Selektion in *E. coli*. Klonierungsschritte wurden durch Restriktionsanalysen, verwendete Schnittstellen und PCR-Amplifikate durch Sequenzierungen auf Richtigkeit überprüft.

pDest_mNdeI (pUMa2416)

Das pUC57-Derivat für Golden-Gate-Klonierungen dient als Zielvektor für das finale Ligationsprodukt. Es entstand aus pDest (pUMa1467) und enthält neben einer multiplen Klonierungsstelle mit Bsal-Erkennungssequenzen das Gen für das Enzym β -Laktamase zur

Blau/Weiß-Selektion auf Ampicillin-haltigem Medium (AmpR). Zusätzlich wurde eine NdeI-Schnittstelle im Ursprungsvektor entfernt.

pStor_mNdeI (pUMa2418)

Vektor für Golden-Gate-Klonierungen, welcher das Gen zur Expression von eGfp und die Hygromycin-Resistenzkassette aus pMF5-1h (pUMa317) enthält. Der Vektor entspricht pStorIII (pUMa1546), jedoch wurde zusätzlich eine NdeI-Schnittstelle im Ursprungsvektor entfernt.

pUpa2Δ-NatR (pUMa2408)

Plasmid zur Herstellung einer Deletionsmutante des *upa2*-Genes (UMAG_10350). Es entspricht dem in dieser Arbeit verwendeten Plasmid pUMa691, nur dass die Hygromycin- gegen eine Nourseothrizin-Resistenzkassette aus pMF1n (pUMa262) ausgetauscht wurde. Das Plasmid wurde für die homologe Integration in den *upa2*-Lokus verwendet.

pUpa2Δ-G418R (pUMa3003)

Plasmid zur Herstellung einer Deletionsmutante des *upa2*-Genes (UMAG_10350). Es entspricht dem in dieser Arbeit verwendeten Plasmid pUMa2408, nur dass die Nourseothrizin- gegen eine Genetizin-Resistenzkassette aus pMF1g (pUMa1057) ausgetauscht wurde. Das Plasmid wurde für die homologe Integration in den *upa2*-Lokus verwendet.

pUpa4Δ-HygR (pUMa2350)

Plasmid zur Herstellung einer Deletionsmutante des *upa4*-Genes (UMAG_03521). Es enthält eine 1029 bp lange stromaufwärts sowie eine 713 bp lange stromabwärts von *upa4* liegende Flanke. Die Flanken wurden durch PCR mit den Oligonukleotid-Kombinationen oRL1921/oRL1922 und oRL1923/oRL1924 auf genomischer UM521-DNA hergestellt. Das Konstrukt wurde mittels Golden-Gate-Klonierung hergestellt. Dabei wurde pUMa1507 für die Hygromycin-Resistenzkassette und pUMa1467 als Zielvektor verwendet. Das Plasmid wurde für die homologe Integration in den *upa4*-Lokus verwendet.

pUpa6Δ-HygR (pUMa2266)

Plasmid zur Herstellung einer Deletionsmutante des *upa6*-Genes (UMAG_00859). Es enthält eine 940 bp lange stromaufwärts sowie eine 912 bp lange stromabwärts von *upa6* liegende Flanke. Die Flanken wurden durch PCR mit den Oligonukleotid-Kombinationen oRL1696/oRL1697 und oRL1698/oRL1699 auf genomischer UM521-DNA hergestellt. Das Konstrukt wurde mittels Golden-Gate-Klonierung hergestellt. Dabei wurde pUMa1507 für die Hygromycin-Resistenzkassette und pUMa1467 als Zielvektor verwendet. Das Plasmid wurde für die homologe Integration in den *upa6*-Lokus verwendet.

pUpa7Δ-HygR (pUMa2267)

Plasmid zur Herstellung einer Deletionsmutante des *upa7*-Genes (UMAG_04609). Es enthält eine 1019 bp lange stromaufwärts sowie eine 1298 bp lange stromabwärts von *upa7* liegende Flanke. Die Flanken wurden durch PCR mit den Oligonukleotid-Kombinationen oRL1704/oRL1705 und oRL1706/oRL1707 auf genomischer UM521-DNA hergestellt. Das Konstrukt wurde mittels Golden-Gate-Klonierung hergestellt. Dabei wurde pUMa1507 für die Hygromyzin-Resistenzkassette und pUMa1467 als Zielvektor verwendet. Das Plasmid wurde für die homologe Integration in den *upa7*-Lokus verwendet.

pUpa8Δ-HygR (pUMa2855)

Plasmid zur Herstellung einer Deletionsmutante des *upa8*-Genes (UMAG_05695). Es enthält eine 905 bp lange stromaufwärts sowie eine 827 bp lange stromabwärts von *upa8* liegende Flanke. Die Flanken wurden durch PCR mit den Oligonukleotid-Kombinationen oMB7/oMB8 und oMB9/oMB10 auf genomischer UM521-DNA hergestellt. Das Konstrukt wurde mittels Golden-Gate-Klonierung hergestellt. Dabei wurde pUMa1507 für die Hygromyzin-Resistenzkassette und pUMa1467 als Zielvektor verwendet. Das Plasmid wurde für die homologe Integration in den *upa8*-Lokus verwendet.

pUpa9Δ-HygR (pUMa2351)

Plasmid zur Herstellung einer Deletionsmutante des *upa9*-Genes (UMAG_06200). Es enthält eine 689 bp lange stromaufwärts sowie eine 1050 bp lange stromabwärts von *upa9* liegende Flanke. Die Flanken wurden durch PCR mit den Oligonukleotid-Kombinationen oRL1925/oRL1926 und oRL1927/oRL1928 auf genomischer UM521-DNA hergestellt. Das Konstrukt wurde mittels Golden-Gate-Klonierung hergestellt. Dabei wurde pUMa1507 für die Hygromyzin-Resistenzkassette und pUMa1467 als Zielvektor verwendet. Das Plasmid wurde für die homologe Integration in den *upa9*-Lokus verwendet.

pUpa9Δ-NatR (pUMa2939)

Plasmid zur Herstellung einer Deletionsmutante des *upa9*-Genes (UMAG_06200). Es entspricht dem Plasmid pUMa2351, nur wurde die Hygromyzin- durch eine Nourseothrizin-Resistenzkassette aus pMF1n (pUMa262) ausgetauscht. Das Plasmid wurde für die homologe Integration in den *upa9*-Lokus verwendet.

pUpa10Δ-HygR (pUMa2370)

Plasmid zur Herstellung einer Deletionsmutante des *upa10*-Genes (UMAG_03503). Es enthält eine 1158 bp lange stromaufwärts sowie eine insgesamt 1161 bp lange stromabwärts von *upa10* liegende Flanke. Innerhalb dieser Flanke wurde über Bsal-vermittelter Mutagenese mit den Oligonukleotid-Kombinationen oRL1973/oRL1976 und oRL1974/oRL1975 eine Bsal-Schnittstelle entfernt. Die stromaufwärts liegende Flanke wurde über die Oligonukleotide oRL1971 und oRL1972 hergestellt. Das Konstrukt wurde mittels Golden-Gate-Klonierung

hergestellt. Dabei wurde pUMa1507 für die Hygromyzin-Resistenzkassette und pUMa1467 als Zielvektor verwendet. Das Plasmid wurde für die homologe Integration in den *upa10*-Lokus verwendet.

pUpa11 Δ -HygR (pUMa2260)

Plasmid zur Herstellung einer Deletionsmutante des *upa11*-Genes (UMAG_01657). Es enthält eine 1447 bp lange stromaufwärts sowie eine 944 bp lange stromabwärts von *upa11* liegende Flanke. Die Flanken wurden durch PCR mit den Oligonukleotid-Kombinationen oRL1648/oRL1649 und oRL1650/oRL1651 auf genomischer UM521-DNA hergestellt. Das Konstrukt wurde mittels Golden-Gate-Klonierung hergestellt. Dabei wurde pUMa1507 für die Hygromyzin-Resistenzkassette und pUMa1467 als Zielvektor verwendet. Das Plasmid wurde für die homologe Integration in den *upa11*-Lokus verwendet.

pUpa12 Δ -HygR (pUMa2300)

Plasmid zur Herstellung einer Deletionsmutante des *upa12*-Genes (UMAG_00883). Es enthält eine 1016 bp lange stromaufwärts sowie eine 1055 bp lange stromabwärts von *upa12* liegende Flanke. Die Flanken wurden durch PCR mit den Oligonukleotid-Kombinationen oRL1817/oRL1818 und oRL1815/oRL1816 auf genomischer UM521-DNA hergestellt. Das Konstrukt wurde mittels Golden-Gate-Klonierung hergestellt. Dabei wurde pUMa1507 für die Hygromyzin-Resistenzkassette und pUMa1467 als Zielvektor verwendet. Das Plasmid wurde für die homologe Integration in den *upa12*-Lokus verwendet.

pUpa13 Δ -HygR (pUMa2856)

Plasmid zur Herstellung einer Deletionsmutante des *upa13*-Genes (UMAG_02501). Es enthält eine 1015 bp lange stromaufwärts sowie eine 709 bp lange stromabwärts von *upa13* liegende Flanke. Die Flanken wurden durch PCR mit den Oligonukleotid-Kombinationen oMB15/oMB16 und oMB17/oMB18 auf genomischer UM521-DNA hergestellt. Das Konstrukt wurde mittels Golden-Gate-Klonierung hergestellt. Dabei wurde pUMa1507 für die Hygromyzin-Resistenzkassette und pUMa1467 als Zielvektor verwendet. Das Plasmid wurde für die homologe Integration in den *upa13*-Lokus verwendet.

pUpa14 Δ -HygR (pUMa2857)

Plasmid zur Herstellung einer Deletionsmutante des *upa14*-Genes (UMAG_05540). Es enthält eine 1019 bp lange stromaufwärts sowie eine 1020 bp lange stromabwärts von *upa14* liegende Flanke. Die Flanken wurden durch PCR mit den Oligonukleotid-Kombinationen oMB23/oMB24 und oMB25/oMB26 auf genomischer UM521-DNA hergestellt. Das Konstrukt wurde mittels Golden-Gate-Klonierung hergestellt. Dabei wurde pUMa1507 für die Hygromyzin-Resistenzkassette und pUMa1467 als Zielvektor verwendet. Das Plasmid wurde für die homologe Integration in den *upa14*-Lokus verwendet.

pUpa9-mCherry-HygR (pUMa2722)

Plasmid für die Expression einer C-terminalen Fusion von Upa9 (UMAG_06200) mit mCherry unter Kontrolle des nativen Promotors. Es enthält eine 1142 bp lange stromaufwärts gelegene Flanke, inklusive 1116 bp des offenen Leserahmens von *upa9*, sowie eine 980 bp lange stromabwärts von *upa9* liegende Flanke. Die Flanken wurden durch PCR mit den Oligonukleotid-Kombinationen oDD527/oDD605 und oDD634/oDD635 auf genomischer UM521-DNA hergestellt. Das Konstrukt wurde mittels Golden-Gate-Klonierung hergestellt. Dabei wurde pUMa1557 für die Hygromyzin-Resistenzkassette und pUMa1467 als Zielvektor verwendet. Das Plasmid wurde für die homologe Integration in den *upa9*-Lokus verwendet.

pUpa9-mCherry-NatR (pUMa3135)

Plasmid für die Expression einer C-terminalen Fusion von Upa9 (UMAG_06200) mit mCherry unter Kontrolle des nativen Promotors. Es entspricht dem Plasmid pUMa2722, nur wurde die Hygromyzin- durch eine Nourseothrizin-Resistenzkassette aus pMF5-1n (pUMa389) ersetzt. Das Plasmid wurde für die homologe Integration in den *upa9*-Lokus verwendet.

pUpa9-Gfp-NatR (pUMa2938)

Plasmid für die Expression einer C-terminalen Fusion von Upa9 (UMAG_06200) mit Gfp unter Kontrolle des nativen Promotors. Es entspricht dem Plasmid pUMa2722, nur wurde die Hygromyzin- durch eine Nourseothrizin-Resistenzkassette aus pMF5-1n (pUMa389) ersetzt. Das Plasmid wurde für die homologe Integration in den *upa9*-Lokus verwendet.

pUpa2¹⁻²¹²¹-Gfp-HygR (pUMa2654)

Plasmid für die Expression einer C-terminalen Fusion von Upa2 (UMAG_10350) an Gfp unter Kontrolle des nativen Promotors. Dazu wurden ein 937 bp langes NdeI/NheI-Fragment (hergestellt durch PCR mit den Oligonukleotiden oDD583 und oDD585 auf genomischer UM521-DNA), ein 8589 bp langes NdeI/NheI-Fragment und ein 5569 bp langes NdeI/NheI-Fragment aus pUpa2²⁸⁴⁻²¹²¹-Gfp (pUMa2653) ligiert. Das Plasmid wurde für die homologe Integration in den *upa2*-Lokus verwendet.

pUpa2²⁸⁴⁻²¹²¹-Gfp-HygR (pUMa2653)

Plasmid für die Expression einer C-terminalen Fusion von einer N-terminal um 283 Aminosäuren verkürzten Upa2-Variante (UMAG_10350) an Gfp unter Kontrolle des nativen Promotors. Dazu wurden ein 955 bp langes NdeI/KasI-Fragment (hergestellt durch PCR mit den Oligonukleotiden oDD582 und oDD584 auf genomischer UM521-DNA), ein 12013 bp langes NdeI/KasI-Fragment und ein 1198 bp langes NdeI/KasI-Fragment aus pUpa2⁵⁹⁹⁻²¹²¹-Gfp (pUMa2652) ligiert. Das Plasmid wurde für die homologe Integration in den *upa2*-Lokus verwendet.

pUpa2⁵⁹⁹⁻²¹²¹-Gfp-HygR (pUMa2652)

Plasmid für die Expression einer C-terminalen Fusion von einer N-terminal um 598 Aminosäuren verkürzten Upa2-Variante (UMAG_10350) an Gfp unter Kontrolle des nativen Promotors. Dazu wurden ein 1091 bp langes NdeI/Spel-Fragment (hergestellt durch PCR mit den Oligonukleotiden oDD581 und oDD589 auf genomischer UM521-DNA), und ein 12130 bp langes NdeI/Spel-Fragment aus pUpa2⁹⁶⁰⁻²¹²¹-Gfp (pUMa2651) ligiert. Das Plasmid wurde für die homologe Integration in den *upa2*-Lokus verwendet.

pUpa2⁹⁶⁰⁻²¹²¹-Gfp-HygR (pUMa2651)

Plasmid für die Expression einer C-terminalen Fusion von einer N-terminal um 959 Aminosäuren verkürzten Upa2-Variante (UMAG_10350) an Gfp unter Kontrolle des nativen Promotors. Dazu wurden ein 781 bp langes NdeI/AsiSI-Fragment (hergestellt durch PCR mit den Oligonukleotiden oDD579 und oDD588 auf genomischer UM521-DNA), ein 3434 bp langes AsiSI/BsrGI-Fragment und ein 12130 bp langes NdeI/BsrGI-Fragment aus pUpa2¹²¹⁷⁻²¹²¹-Gfp (pUMa2650) ligiert. Das Plasmid wurde für die homologe Integration in den *upa2*-Lokus verwendet.

pUpa2¹²¹⁷⁻²¹²¹-Gfp-HygR (pUMa2650)

Plasmid für die Expression einer C-terminalen Fusion von einer N-terminal um 1216 Aminosäuren verkürzten Upa2-Variante (UMAG_10350) an Gfp unter Kontrolle des nativen Promotors. Dazu wurden ein 606 bp langes NdeI/SacII-Fragment (hergestellt durch PCR mit den Oligonukleotiden oDD578 und oDD587 auf genomischer UM521-DNA), ein 2841 bp langes SacII/BsrGI-Fragment und ein 7923 bp langes NdeI/BsrGI-Fragment aus pUpa2¹⁴¹⁵⁻²¹²¹-Gfp (pUMa2649) ligiert. Das Plasmid wurde für die homologe Integration in den *upa2*-Lokus verwendet.

pUpa2¹⁴¹⁵⁻²¹²¹-Gfp-HygR (pUMa2649)

Plasmid für die Expression einer C-terminalen Fusion von einer N-terminal um 1414 Aminosäuren verkürzten Upa2-Variante (UMAG_10350) an Gfp unter Kontrolle des nativen Promotors. Dazu wurden ein 1185 bp langes NdeI/BbvCI-Fragment (hergestellt durch PCR mit den Oligonukleotiden oDD586 und oDD580 auf genomischer UM521-DNA) und ein 9591 bp langes NdeI/BbvCI-Fragment aus pUpa2¹⁷²¹⁻²¹²¹-Gfp (pUMa2394) ligiert. Das Plasmid wurde für die homologe Integration in den *upa2*-Lokus verwendet.

pUpa2¹⁷²¹⁻²¹²¹-Gfp-HygR (pUMa2394)

Plasmid für die Expression einer C-terminalen Fusion von einer N-terminal um 1720 Aminosäuren verkürzten Upa2-Variante (UMAG_10350) an Gfp unter Kontrolle des nativen Promotors. Es enthält eine 1036 bp lange stromaufwärts und eine 1201 bp lange stromabwärts liegende Flanke, welche mit den Oligonukleotid-Kombinationen oDD160/oDD161 bzw. oDD162/oDD163 durch PCR auf genomischer UM521-DNA hergestellt wurden. Ebenfalls

enthält es ein 1236 bp langes Fragment, welches durch PCR unter Verwendung der Oligonukleotide oDD144 und oDD526 auf genomischer UM521-DNA hergestellt wurde. Das Konstrukt wurde mittels Golden-Gate-Klonierung hergestellt. Dabei wurde pUMa2418 für die Hygromyzin-Resistenzkassette und pUMa2416 als Zielvektor verwendet. Das Plasmid wurde für die homologe Integration in den *upa2*-Lokus verwendet.

pUpa2¹⁷²¹⁻²⁰⁷⁰-Gfp-HygR (pUMa2432)

Plasmid für die Expression einer C-terminalen Fusion von einer N-terminal um 1720 Aminosäuren sowie C-terminal um 51 Aminosäuren verkürzten Upa2-Variante (UMAG_10350) an Gfp unter Kontrolle des nativen Promotors. Es enthält eine 1036 bp lange stromaufwärts und eine 1201 bp lange stromabwärts liegende Flanke, welche mit den Oligonukleotid-Kombinationen oDD160/oDD161 bzw. oDD162/oDD163 durch PCR auf genomischer UM521-DNA hergestellt wurden. Ebenfalls enthält es ein 1076 bp langes Fragment, welches durch PCR unter Verwendung der Oligonukleotide oDD144 und oDD525 auf genomischer UM521-DNA hergestellt wurde. Das Konstrukt wurde mittels Golden-Gate-Klonierung hergestellt. Dabei wurde pUMa2418 für die Hygromyzin-Resistenzkassette und pUMa2416 als Zielvektor verwendet. Das Plasmid wurde für die homologe Integration in den *upa2*-Lokus verwendet.

pUpa2¹⁹⁵⁸⁻²¹²¹-Gfp-HygR (pUMa2721)

Plasmid für die Expression einer C-terminalen Fusion von einer N-terminal um 1957 Aminosäuren verkürzten Upa2-Variante (UMAG_10350) an Gfp unter Kontrolle des nativen Promotors. Es enthält eine 1036 bp lange stromaufwärts und eine 1201 bp lange stromabwärts liegende Flanke, welche mit den Oligonukleotid-Kombinationen oDD160/oDD161 bzw. oDD162/oDD163 durch PCR auf genomischer UM521-DNA hergestellt wurden. Ebenfalls enthält es ein 520 bp langes Fragment, welches durch PCR unter Verwendung der Oligonukleotide oDD604 und oDD526 auf genomischer UM521-DNA hergestellt wurde. Das Konstrukt wurde mittels Golden-Gate-Klonierung hergestellt. Dabei wurde pUMa2418 für die Hygromyzin-Resistenzkassette und pUMa2416 als Zielvektor verwendet. Das Plasmid wurde für die homologe Integration in den *upa2*-Lokus verwendet.

pUpa2²⁰⁷⁰⁻²¹²¹-Gfp-HygR (pUMa2681)

Plasmid für die Expression einer C-terminalen Fusion von einer N-terminal um 2069 Aminosäuren verkürzten Upa2-Variante (UMAG_10350) an Gfp unter Kontrolle des nativen Promotors. Es enthält eine 1036 bp lange stromaufwärts und eine 1201 bp lange stromabwärts liegende Flanke, welche mit den Oligonukleotid-Kombinationen oDD160/oDD161 bzw. oDD162/oDD163 durch PCR auf genomischer UM521-DNA hergestellt wurden. Ebenfalls enthält es ein 181 bp langes Fragment, welches durch PCR unter Verwendung der Oligonukleotide oDD603 und oDD526 auf genomischer UM521-DNA hergestellt wurde. Das Konstrukt wurde mittels Golden-Gate-Klonierung hergestellt. Dabei wurde pUMa2418 für die

Hygromylin-Resistenzkassette und pUMa2416 als Zielvektor verwendet. Das Plasmid wurde für die homologe Integration in den *upa2*-Lokus verwendet.

pUpa2^{2070-2121mGWW}-Gfp-HygR (pUMa2750)

Plasmid für die Expression einer C-terminalen Fusion von einer N-terminal um 2069 Aminosäuren verkürzten Upa2-Variante (UMAG_10350) an Gfp unter Kontrolle des nativen Promotors. Es enthält eine 1036 bp lange stromaufwärts und eine 1201 bp lange stromabwärts liegende Flanke, welche mit den Oligonukleotid-Kombinationen oDD160/oDD161 bzw. oDD162/oDD163 durch PCR auf genomischer UM521-DNA hergestellt wurden. Ebenfalls enthält es ein 181 bp langes Fragment, welches durch PCR unter Verwendung der Oligonukleotide oDD603 und oDD741 auf genomischer UM521-DNA hergestellt wurde. Das Konstrukt wurde mittels Golden-Gate-Klonierung hergestellt. Dabei wurde pUMa2418 für die Hygromylin-Resistenzkassette und pUMa2416 als Zielvektor verwendet. Das Plasmid wurde für die homologe Integration in den *upa2*-Lokus verwendet.

pUpa2^{1958-2121mSMHAP}-Gfp-HygR (pUMa2841)

Plasmid für die Expression einer C-terminalen Fusion von einer N-terminal um 1957 Aminosäuren verkürzten Upa2-Variante (UMAG_10350) an Gfp unter Kontrolle des nativen Promotors. Es enthält eine 1036 bp lange stromaufwärts und eine 1201 bp lange stromabwärts liegende Flanke, welche mit den Oligonukleotid-Kombinationen oDD160/oDD161 bzw. oDD162/oDD163 durch PCR auf genomischer UM521-DNA hergestellt wurden. Ebenfalls enthält es ein 156 bp langes Fragment, welches durch PCR unter Verwendung der Oligonukleotide oDD990 und oDD526 hergestellt wurde, sowie ein 382 bp langes Fragment, welches mithilfe der Oligonukleotide oDD991 und oDD604 erstellt wurde. Das Konstrukt wurde mittels Golden-Gate-Klonierung hergestellt. Dabei wurde pUMa2418 für die Hygromylin-Resistenzkassette und pUMa2416 als Zielvektor verwendet. Das Plasmid wurde für die homologe Integration in den *upa2*-Lokus verwendet.

pUpa2^{precursor_mGWW}-HygR (pUMa3138)

Klonierungsvektor für die Herstellung von pUpa2^{1-2121mGWW}-Gfp (pUMa2862). Es enthält ein 956 bp langes über PCR amplifiziertes Fragment (oMB43/MB44) sowie ein 780 bp langes über PCR hergestelltes Fragment (oMB45/MB46) aus pUMa2649. Das Konstrukt wurde mittels Golden-Gate-Klonierung hergestellt. Dabei wurde pUMa1467 als Zielvektor verwendet.

pUpa2^{1-2121mGWW}-Gfp-HygR (pUMa2862)

Plasmid für die Expression einer C-terminalen Fusion von Upa2 (UMAG_10350) an Gfp unter Kontrolle des nativen Promotors. Dazu wurden ein 1687 bp langes AscI/BbvCI-Fragment aus pUpa2^{precursor_mGWW} (pUMa3138), ein 1173 bp langes SacII/EcoRV/BbvCI-Fragment, ein 9239 bp langes SacII/SfiI-Fragment und ein 2996 bp langes AscI/SfiI-Fragment aus pUpa2¹⁻²¹²¹-Gfp

(pUMa2654) ligiert. Das Plasmid wurde für die homologe Integration in den *upa2*-Lokus verwendet.

pPab1-mCherry-NatR (pUMa2963)

Plasmid für die Expression einer C-terminalen Fusion von Pab1 (UMAG_03494) an mCherry unter Kontrolle des nativen Promotors. Dazu wurden ein 9086 bp langes NotI/NotI-Fragment aus pPab1-mCherry-HygR (pUMa1208) und ein 1392 bp langes NotI/NotI-Fragment aus pMF1n (pUMa262) ligiert, sodass die Hygromylin- gegen eine Nourseothrizin-Resistenzkassette ausgetauscht wurde. Das Plasmid wurde für die homologe Integration in den *pab1*-Lokus verwendet.

pRrm4-mCherry-NatR (pUMa2964)

Plasmid für die Expression einer C-terminalen Fusion von Rrm4 (UMAG_10836) an mCherry unter Kontrolle des nativen Promotors. Dazu wurden ein 8193 bp langes SfiI/SfiI-Fragment aus pRrm4-mCherry-HygR (pUMa1468) und ein 2593 bp langes SfiI/SfiI-Fragment aus pMF5-5n (pUMa1379) ligiert, sodass die Hygromylin- gegen eine Nourseothrizin-Resistenzkassette ausgetauscht wurde. Das Plasmid wurde für die homologe Integration in den *rrm4*-Lokus verwendet.

pGfp-SKL-CbxR (pUMa3141)

Plasmid zur Expression von Gfp, welches mit einer peroxisomalen Zielsequenz fusioniert ist, unter Kontrolle des konstitutiven Promotors P_{otef} . Unter Kontrolle dieses Promotors befindet sich der 729 bp lange offene Leserahmen von Gfp, direkt gefolgt von dem Tripeptid SKL. Zur Herstellung wurden ein 733 bp langes NcoI/NotI-Fragment aus pUMa3269 (TOPO-Zwischenvektor) und ein 5568 bp langes NcoI/NotI-Fragment aus p123otef-gfp-nos-cbx (pUMa43) ligiert. Das Plasmid enthält eine Carboxin-Resistenz (CbxR) und wird zur homologen Integration in den *ip^S*-Lokus verwendet.

pUpa2^{1958-2121mGWW}-Gfp-HygR (pUMa3180)

Plasmid für die Expression einer C-terminalen Fusion von einer N-terminal um 1957 Aminosäuren verkürzten Upa2-Variante (UMAG_10350) an Gfp unter Kontrolle des nativen Promotors. Es enthält eine 1036 bp lange stromaufwärts und eine 1201 bp lange stromabwärts liegende Flanke, welche mit den Oligonukleotid-Kombinationen oDD160/oDD161 bzw. oDD162/oDD163 durch PCR auf genomischer UM521-DNA hergestellt wurden. Ebenfalls enthält es ein 520 bp langes Fragment, welches durch PCR unter Verwendung der Oligonukleotide oDD604 und oDD741 auf genomischer UM521-DNA hergestellt wurde. Das Konstrukt wurde mittels Golden-Gate-Klonierung hergestellt. Dabei wurde pUMa2418 für die Hygromylin-Resistenzkassette und pUMa2416 als Zielvektor verwendet. Das Plasmid wurde für die homologe Integration in den *upa2*-Lokus verwendet.

pGfp-SKL (TOPO-Zwischenvektor, pUMa3269)

TOPO-Zwischenvektor für die Klonierung von pUMa3141. Es enthält ein 744 bp langes Fragment, welches durch PCR mit den Oligonukleotiden oMB935 und oMB936 auf p123otef-gfp-nos-cbx (pUMa43) hergestellt worden ist. Zur weiteren Verwendung wurde das Fragment nach NcoI/NotI-Restriktion isoliert.

pUpa2^{AS399} (TOPO-Zwischenvektor, pUMa3717)

TOPO-Zwischenvektor für die Herstellung von pUMa3719. Es enthält ein 626 bp langes Fragment, welches durch PCR mit den Oligonukleotiden oUM6 und oDD582 auf genomischer UM521-DNA hergestellt worden ist. Zur weiteren Verwendung wurde das Fragment nach KasI/NdeI-Restriktion isoliert.

pUpa2³⁹⁹⁻²¹²¹-Gfp-HygR (pUMa3719)

Plasmid für die Expression einer C-terminalen Fusion von einer N-terminal um 338 Aminosäuren verkürzten Upa2-Variante (UMAG_10350) an Gfp unter Kontrolle des nativen Promotors. Es enthält ein 12 kb sowie ein 1,2 kb großes NdeI/KasI-Fragment aus pUpa2²⁸⁴⁻²¹²¹-Gfp-HygR (pUMa2653) und ein 610 bp langes NdeI/KasI-Fragment aus pUpa2^{AS399} (TOPO-Zwischenvektor, pUMa3717). Zur Herstellung des Konstrukts wurde das 12013 bp Fragment dephosphoryliert eingesetzt.

pUpa2^{AS339} (TOPO-Zwischenvektor, pUMa3895)

TOPO-Zwischenvektor für die Herstellung von pUMa3897. Es enthält ein 806 bp langes Fragment, welches durch PCR mit den Oligonukleotiden oUM255 und oDD582 auf pUpa2¹⁻²¹²¹-Gfp-HygR (pUMa2654) hergestellt worden ist. Zur weiteren Verwendung wurde das Fragment nach KasI/NdeI-Restriktion isoliert.

pUpa2³³⁹⁻²¹²¹-Gfp-HygR (pUMa3897)

Plasmid für die Expression einer C-terminalen Fusion einer N-terminal um 338 Aminosäuren verkürzten Upa2-Variante (UMAG_10350) an Gfp unter Kontrolle des nativen Promotors. Es enthält ein 12013 bp sowie ein 1198 bp großes NdeI/KasI-Fragment aus pUpa2²⁸⁴⁻²¹²¹-Gfp-HygR (pUMa2653) und ein 790 bp langes NdeI/KasI-Fragment aus pUpa2^{AS339} (TOPO-Zwischenvektor, pUMa3895). Zur Herstellung des Konstrukts wurde das 12013 bp Fragment dephosphoryliert eingesetzt.

5.1.5 Stämme

***E. coli*-Stämme**

Bei dem für Standardklonierungen verwendeten Stamm TOP10 (Invitrogen) handelt es sich um ein Derivat des *E. coli*-Stammes DH10B, welcher folgende genetische Marker beinhaltet: F-, *mcrA*, $\Delta(mrr-hsdRMS-mcrBC)$, $\phi 80lacZ\Delta M15$, $\Delta lacX74$, *nupG*, *recA1*, *araD139*, $\Delta(ara-leu)7697$, *galE15*, *galK16*, *rpsL*(StrR), *endA1*, λ -.

***S. cerevisiae*-Stämme**

In Hefe-Zwei-Hybrid-Experimenten wurde der Stamm AH109 verwendet (James et al. 1996), welcher folgende genetische Marker beinhaltet: *MATa*, *trp1-901*, *leu2-3*, *112*, *ura3-52*, *his3-200*, *gal4 Δ* , *gal80 Δ* , *LYS2::GAL1_{UAS}-GAL1_{TATA}-HIS3*, *GAL2_{UAS}-GAL2_{TATA}-ADE2*, *URA3::MEL1_{UAS}-MEL1_{TATA}-lacZ*

***U. maydis*-Stämme**

Die in Tabelle 4.5 aufgeführten Stämme lagen zu Beginn dieser Arbeit vor oder wurden zeitgleich zu dieser Arbeit von Mitarbeitern der Arbeitsgruppe hergestellt. Sie dienten als Ausgangsstämme bzw. Teststämme und sind allen Mitarbeitern frei zugänglich. Die in Tabelle 4.6 aufgeführten Stämme wurden im Rahmen dieser Arbeit hergestellt. Die Korrektheit aller hergestellten Stämme wurde über Southern Blot-Analysen überprüft.

Tab. 5.5: In dieser Arbeit verwendete Ausgangs- und/oder Kontrollstämme. * Alle in dieser Arbeit genutzten Stämme sind Derivate des Stammes AB33 und tragen zusätzlich den Genotyp *a2 P_{nar}:bW2 bW1*. ** Interne Labornummer.

Stamm	relevanter Genotyp	UMa**	Referenz
AB33	<i>a2,Pnar:bE1,Pnar:bW2*</i>	133	Brachmann et al. 2001
AB33rrm4 Δ	<i>rrm4Δ</i>	273	Becht et al. 2006
AB33Rm4-Gfp	<i>rrm4-Gfp</i>	274	Becht et al. 2006
AB33Rm4-Gfp/upa2 Δ	<i>rrm4-Gfp; upa2Δ</i>	329	S. Baumann; Jankowski et al. 2019
AB33Pab1-Gfp	<i>pab1-Gfp</i>	389	König et al. 2009
AB33ubi1B ¹⁶ / λ N-Gfp ³	<i>ubi1B¹⁶; λN-Gfp³</i>	415	König et al., 2009
AB33rho3B ¹⁶ / λ N-Gfp ³	<i>rho3B¹⁶; λN-Gfp³</i>	430	König et al., 2009
AB33Cdc3-Gfp	<i>cdc3-Gfp</i>	449	Baumann et al. 2014
AB33Upa2-Gfp	<i>upa2-Gfp</i>	453	S. Baumann, unveröffentlicht
AB33Pab1-Gfp/rrm4 Δ	<i>pab1-Gfp; rrm4Δ</i>	472	König et al. 2009
AB33tefGfp	<i>tefGfp</i>	487	Koepke et al. 2011
AB33Tub1-Gfp	<i>tub1-Gfp</i>	498	C. Haag; Jankowski et al. 2019
AB33Upa2-Gfp/rrm4 Δ	<i>upa2-Gfp; rrm4Δ</i>	515	S. Baumann; Jankowski et al. 2019
AB33Pab1-mCherry	<i>pab1-mCherry</i>	578	T. Pohlmann 2013
AB33Pab1-Gfp/rrm4 ^{mR1} -Rfp	<i>pab1-Gfp; rrm4^{mR1}-Rfp</i>	758	Baumann et al. 2014
AB33cdc3B ¹⁶ / λ N*-Gfp ³	<i>cdc3B¹⁶; λN*-Gfp³</i>	848	Baumann et al. 2014
AB33cdc12B ¹⁶ / λ N*-Gfp ³	<i>cdc12B¹⁶; λN*-Gfp³</i>	849	Zander et al. 2016

Material und Methoden

AB33upa1Δ	<i>upa1Δ</i>	859	Pohlmann et al. 2015
AB33Upa2-Gfp/rrm4 ^{mR1} -Rfp	<i>upa2-Gfp; rrm4^{mR1}-Rfp</i>	896	T. Pohlmann; Jankowski et al. 2019
AB33Gfp-Cdc3/upa2Δ	<i>Gfp-cdc3; upa2Δ</i>	941	S. Baumann; Jankowski et al. 2019
AB33Upa1-Gfp	<i>upa1-Gfp</i>	956	Pohlmann et al. 2015
AB33Upa1-Gfp/rrm4Δ	<i>upa1-Gfp; rrm4Δ</i>	1048	T. Pohlmann; Jankowski et al. 2019
AB33Upa1-Gfp/upa2Δ	<i>upa1-Gfp; upa2Δ</i>	1164	T. Pohlmann; Jankowski et al. 2019
AB33Pab1-Gfp/upa2Δ	<i>pab1-Gfp; upa2Δ</i>	1164	T. Pohlmann; Jankowski et al. 2019
AB33upa2Δ	<i>upa2Δ</i>	1176	T. Pohlmann 2013
AB33upa2Δ/upa1Δ	<i>upa2Δ; upa1Δ</i>	1343	T. Pohlmann; Jankowski et al. 2019
AB33Upa2mP1-Gfp	<i>upa2mP1-Gfp</i>	2373	T. Pohlmann; Jankowski et al. 2019
AB33Upa2mP234-Gfp	<i>upa2mP234-Gfp</i>	2375	T. Pohlmann; Jankowski et al. 2019
AB33Upa2mP1234-Gfp	<i>upa2mP1234-Gfp</i>	2376	T. Pohlmann; Jankowski et al. 2019
AB33ubi1B ¹⁶ /λN-Gfp ³ /upa2Δ	<i>ubi1B¹⁶; λN-Gfp³; upa2Δ</i>	2885	K. Müntjes; Jankowski et al. 2019
AB33rho3B ¹⁶ /λN-Gfp ³ /upa2Δ	<i>rho3B¹⁶; λN-Gfp³; upa2Δ</i>	2886	K. Müntjes; Jankowski et al. 2019
AB33cdc3B ¹⁶ /λN*-Gfp ³ /upa2Δ	<i>cdc3B¹⁶; λN*-Gfp³; upa2Δ</i>	2887	K. Müntjes; Jankowski et al. 2019
AB33cdc12B ¹⁶ /λN*-Gfp ³ /upa2Δ	<i>cdc12B¹⁶; λN*-Gfp³; upa2Δ</i>	2888	K. Müntjes; Jankowski et al. 2019

Tab. 5.6: In dieser Arbeit hergestellte Stämme. * Alle in dieser Arbeit hergestellten Stämme sind Derivate des Stammes AB33 und tragen zusätzlich den Genotyp *a2 P_{nar}:bW2 bW1*. ** Interne Labornummer.

Stamm	relevanter Genotyp	UMa**	integriertes Plasmid	Lokus	Ausgangsstamm	Referenz
AB33Upa2 ^{1958-2121mSMHAP} -Gfp	<i>upa2^{1958-2121mSMHAP}-Gfp</i>	847	pUpa2 ^{1958-2121mSMHAP} -Gfp-HygR	<i>upa2</i>	AB33upa2Δ	diese Arbeit
AB33upa6Δ	<i>upa6Δ</i>	1384	pUpa6Δ-HygR	<i>upa6</i>	AB33	diese Arbeit
AB33upa7Δ	<i>upa7Δ</i>	1385	pUpa7Δ-HygR	<i>upa7</i>	AB33	diese Arbeit
AB33Upa2 ¹⁷²¹⁻²⁰⁷⁰ -Gfp	<i>upa2¹⁷²¹⁻²⁰⁷⁰-Gfp</i>	1476	pUpa2 ¹⁷²¹⁻²⁰⁷⁰ -Gfp-HygR	<i>upa2</i>	AB33upa2Δ	Jankowski et al. 2019
AB33upa4Δ	<i>upa4Δ</i>	1482	pUpa4Δ-HygR	<i>upa4</i>	AB33Rrm4-Gfp	diese Arbeit
AB33upa9Δ	<i>upa9Δ</i>	1483	pUpa9Δ-HygR	<i>upa9</i>	AB33Rrm4-Gfp	diese Arbeit
AB33upa10Δ	<i>upa10Δ</i>	1484	pUpa10Δ-HygR	<i>upa10</i>	AB33	diese Arbeit
AB33Upa2 ¹⁷²¹⁻²¹²¹ -Gfp	<i>upa2¹⁷²¹⁻²¹²¹-Gfp</i>	1493	pUpa2 ¹⁷²¹⁻²¹²¹ -Gfp-HygR	<i>upa2</i>	AB33upa2Δ	Jankowski et al. 2019
AB33upa2Δ	<i>upa2Δ</i>	1505	pUpa2Δ-NatR	<i>upa2</i>	AB33upa2Δ-HygR	Jankowski et al. 2019
AB33Upa9-mCherry/Rrm4-Gfp	<i>upa9-mCherry</i>	1761	pUpa9-mCherry-HygR	<i>upa9</i>	AB33Rrm4-Gfp	diese Arbeit
AB33Upa2 ²⁰⁷⁰⁻²¹²¹ -Gfp	<i>upa2²⁰⁷⁰⁻²¹²¹-Gfp</i>	1762	pUpa2 ²⁰⁷⁰⁻²¹²¹ -Gfp-HygR	<i>upa2</i>	AB33upa2Δ	Jankowski et al. 2019
AB33Upa2 ¹⁹⁵⁸⁻²¹²¹ -Gfp	<i>upa2¹⁹⁵⁸⁻²¹²¹-Gfp</i>	1763	pUpa2 ¹⁹⁵⁸⁻²¹²¹ -Gfp-HygR	<i>upa2</i>	AB33upa2Δ	Jankowski et al. 2019
AB33Upa2 ^{2070-2121mGWW} -Gfp	<i>upa2^{2070-2121mGWW}-Gfp</i>	1781	pUpa2 ^{2070-2121mGWW} -Gfp-HygR	<i>upa2</i>	AB33upa2Δ	Jankowski et al. 2019
AB33Upa2 ¹⁴¹⁵⁻²¹²¹ -Gfp	<i>upa2¹⁴¹⁵⁻²¹²¹-Gfp</i>	1786	pUpa2 ¹⁴¹⁵⁻²¹²¹ -Gfp-HygR	<i>upa2</i>	AB33upa2Δ	diese Arbeit
AB33Upa2 ¹²¹⁷⁻²¹²¹ -Gfp	<i>upa2¹²¹⁷⁻²¹²¹-Gfp</i>	1787	pUpa2 ¹²¹⁷⁻²¹²¹ -Gfp-HygR	<i>upa2</i>	AB33upa2Δ	Jankowski et al. 2019
AB33Upa2 ⁹⁶⁰⁻²¹²¹ -Gfp	<i>upa2⁹⁶⁰⁻²¹²¹-Gfp</i>	1788	pUpa2 ⁹⁶⁰⁻²¹²¹ -Gfp-HygR	<i>upa2</i>	AB33upa2Δ	Jankowski et al. 2019
AB33Upa2 ⁵⁹⁹⁻²¹²¹ -Gfp	<i>upa2⁵⁹⁹⁻²¹²¹-Gfp</i>	1789	pUpa2 ⁵⁹⁹⁻²¹²¹ -Gfp-HygR	<i>upa2</i>	AB33upa2Δ	Jankowski et al. 2019
AB33Upa2 ²⁸⁴⁻²¹²¹ -Gfp	<i>upa2²⁸⁴⁻²¹²¹-Gfp</i>	1790	pUpa2 ²⁸⁴⁻²¹²¹ -Gfp-HygR	<i>upa2</i>	AB33upa2Δ	Jankowski et al. 2019
AB33Upa2 ¹⁻²¹²¹ -Gfp	<i>upa2¹⁻²¹²¹-Gfp</i>	1791	pUpa2 ¹⁻²¹²¹ -Gfp-HygR	<i>upa2</i>	AB33upa2Δ	Jankowski et al. 2019

AB33Rrm4-Gfp/upa13Δ	<i>upa13Δ</i>	1888	pUpa13Δ	<i>upa13</i>	AB33Rrm4-Gfp	diese Arbeit
AB33Upa2 ^{1-2121mGWW} -Gfp	<i>upa2^{1-2121mGWW}-Gfp</i>	1893	pUpa2 ^{1-2121mGWW} -Gfp-HygR	<i>upa2</i>	AB33upa2Δ	Jankowski et al. 2019
AB33Pab1-mCherry/upa9-Gfp	<i>upa9-Gfp</i>	1951	pUpa9-Gfp-NatR	<i>upa9</i>	AB33Pab1-mCherry	diese Arbeit
AB33Pab1-mCherry/upa9Δ	<i>upa9Δ</i>	1962	pUpa9Δ	<i>upa9</i>	AB33Pab1-mCherry	diese Arbeit
AB33Upa2 ²⁸⁴⁻²¹²¹ -Gfp/Pab1-mCherry	<i>upa2²⁸⁴⁻²¹²¹-Gfp</i>	2021	pPab1-mCherry-NatR	<i>pab1</i>	AB33Upa2 ²⁸⁴⁻²¹²¹ -Gfp	diese Arbeit
AB33Upa2 ²⁸⁴⁻²¹²¹ -Gfp/Rrm4-mCherry	<i>upa2²⁸⁴⁻²¹²¹-Gfp</i>	2022	pRrm4-mCherry-NatR	<i>rrm4</i>	AB33Upa2 ²⁸⁴⁻²¹²¹ -Gfp	diese Arbeit
AB33GfpSKL_ upa2Δ	<i>upa2Δ</i>	2045	pGfpSKL-CbxR	<i>cbx</i>	AB33upa2Δ	diese Arbeit
AB33Upa2 ¹⁻²¹²¹ -Gfp/ Pab1-mCherry	<i>upa2¹⁻²¹²¹-Gfp</i>	2131	pPab1-mCherry-NatR	<i>pab1</i>	AB33Upa2 ¹⁻²¹²¹ -Gfp	Jankowski et al. 2019
AB33Upa2 ¹⁻²¹²¹ -Gfp/ Rrm4-mCherry	<i>upa2¹⁻²¹²¹-Gfp</i>	2132	pRrm4-mCherry-NatR	<i>rrm4</i>	AB33Upa2 ¹⁻²¹²¹ -Gfp	Jankowski et al. 2019
AB33Upa2 ^{1958-2121mGWW} -Gfp	<i>upa2^{1958-2121mGWW}-Gfp</i>	2176	pUpa2 ^{1958-2121mGWW} -Gfp-HygR	<i>upa2</i>	AB33upa2Δ	Jankowski et al. 2019
AB33Pab1-mCherry/upa9Δ/Gfp-SKL	<i>upa9Δ</i>	2220	pGfp-SKL-CbxR	<i>cbx</i>	AB33Pab1-mCherry/upa9Δ	diese Arbeit
AB33Gfp-SKL	<i>Gfp-SKL</i>	2385	pGfp-SKL-CbxR	<i>cbx</i>	AB33	diese Arbeit
AB33Upa9mC/Gfp-SKL	<i>Gfp-SKL</i>	2386	pUpa9-mCherry-HygR	<i>upa9</i>	AB33Gfp-SKL	diese Arbeit
AB33upa2Δ/Rab5a-Gfp	<i>upa2Δ</i>	2405	pRab5a-Gfp-CbxR	<i>cbx</i>	AB33upa2Δ	Jankowski et al. 2019
AB33Upa9 ^{mPAM2} -mCherry/Gfp-SKL	<i>upa9^{mPAM2}-mCherry</i>	2411	pUpa9 ^{mPAM2} -mCherry-NatR	<i>upa9</i>	AB33Gfp-SKL	diese Arbeit
AB33Upa2 ³⁹⁹⁻²¹²¹ -Gfp	<i>upa2³⁹⁹⁻²¹²¹-Gfp</i>	2613	pUpa2 ³⁹⁹⁻²¹²¹ -Gfp-HygR	<i>upa2</i>	AB33upa2Δ	Jankowski et al. 2019
AB33Upa2 ³³⁹⁻²¹²¹ -Gfp	<i>upa2³³⁹⁻²¹²¹-Gfp</i>	2715	pUpa2 ³³⁹⁻²¹²¹ -Gfp-HygR	<i>upa2</i>	AB33upa2Δ	Jankowski et al. 2019

5.2 Mikrobiologische, zellbiologische und genetische Methoden

5.2.1 Arbeiten mit *E. coli*

Kultivierung von *E. coli*

Die Kultivierung von *E. coli* erfolgte in YT-Flüssigmedium und auf dYT-Festmedium (Sambrook et al., 1989). Ampizillin als selektives Antibiotikum wurde in einer Konzentration von 100 µg/ml eingesetzt. Die Stämme wurden in Flüssigmedium bei 200 UpM in Reagenzgläsern auf einem Drehrad bei 37 °C unter aeroben Bedingungen über Nacht inkubiert.

Bestimmung der Zelldichte von *E. coli*

Die Zelldichte von Flüssigkulturen wurde mit einem Novaspec II Photometer (Pharmacia Biotech) bei einer Wellenlänge von 600 nm bestimmt. Zur Sicherstellung einer linearen Abhängigkeit wurden Kulturen gegebenenfalls verdünnt, sodass die OD₆₀₀ zwischen 0,2 und 0,5 lag. Die OD₆₀₀ des verwendeten Mediums diente als Blindwert. Eine OD₆₀₀ von 1,0 entspricht ungefähr 10⁹ Zellen/ml.

Herstellung kompetenter Zellen nach der Rubidiumchlorid-Methode

Das verwendete Protokoll ist modifiziert nach (Cohen et al. 1972). Zur Herstellung wurden 100 ml dYT-Medium mit 10 mM MgCl₂ und 10 mM MgSO₄ versetzt. Aus einer Übernachtskultur des Stammes TOP10 wurde 1 ml entnommen und das Medium inokuliert. Die Inkubation erfolgte bei 37 °C und 200 UpM, bis eine OD₆₀₀ von ~0,5 erreicht worden ist. Die Zellen wurden durch Zentrifugation bei 1250 g für 15 Minuten bei 4 °C pelletiert. Das gewonnene Zellpellet wurde im Anschluss in 33 ml eiskalter RF1-Lösung gelöst und 30 bis 60 Minuten auf Eis inkubiert. Daraufhin erfolgte eine erneute Zentrifugation der Zellsuspension bei 1250 g für 15 Minuten bei 4 °C. Das Zellpellet wurde in 5 ml eiskalter RF2-Lösung aufgenommen und zu je 50 µl in 1,5-ml-Reaktionsgefäße aliquotiert, in flüssigem Stickstoff gefroren und bei -80 °C gelagert.

RF1-Lösung

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

RF2-Lösung

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

Transformation von Plasmid-DNA

50 µl chemisch (RbCl)-kompetente *E. coli*-Zellen wurden für circa 10 Minuten auf Eis aufgetaut. 1-10 µl Plasmidlösung (1-5 ng DNA) oder ein Ligationsansatz (10 µl) wurden zu den Zellen gegeben. Es folgte eine Inkubation auf Eis für 30 Minuten. Nach einem Hitzeschock für 45 Sekunden bei 42 °C wurde die Zellsuspension mit 150 µl dYT-Medium versetzt und für 30 Minuten schüttelnd bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde der Transformationsansatz auf YT-Festmedium mit Antibiotikum ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

5.2.2 Arbeiten mit *S. cerevisiae*

Kultivierung von *S. cerevisiae*

S. cerevisiae-Stämme wurden in Reagenzgläsern bei 200 UpM oder auf Festmedium unter aeroben Bedingungen bei 28 °C kultiviert. Kulturen auf Festmedien konnten bis zu einem Monat bei 4 °C gelagert werden. Von diesen Platten wurden Flüssigkulturen angeimpft und über Nacht auf einem Drehrad inkubiert.

Bestimmung der Zelldichte von *S. cerevisiae*

Die Zelldichte von Flüssigkulturen wurde mit einem Novospec II Photometer (Pharmacia Biotech) bei einer Wellenlänge von 600 nm bestimmt. Zur Sicherstellung einer linearen Abhängigkeit wurden Kulturen gegebenenfalls verdünnt, sodass die OD₆₀₀ zwischen 0,2 und 0,5 lag. Die OD₆₀₀ des verwendeten Mediums diente als Blindwert. Eine OD₆₀₀ von 1,0 entspricht ungefähr 2×10^7 Zellen/ml.

Hefe-Zwei-Hybrid-Analysen

Alle in Hefe-Zwei-Hybrid-Experimenten eingesetzten *S. cerevisiae*-Stämme wurden von Ute Gengenbacher gemäß der Planung durch Thomas Pohlmann hergestellt. Zur Hefe-Zwei-Hybrid-Analyse wurde das Matchmaker III System (Clontech) verwendet. Nach Transformation der Plasmid-DNA in den Stamm AH109 konnten nach drei bis vier Tagen einzelne Kolonien weiterverarbeitet werden. Fünf einzelne Kolonien wurden auf SD-leu-trp- sowie SD-leu-trp-his-ade-Festmedien ausgestrichen und zwei bis drei Tage bei 28 °C inkubiert. Ein Wachstum auf SD-leu-trp-his-ade zeigte eine Interaktion der getesteten Proteine. Für die weitere Analyse wurde Zellmaterial von SD-leu-trp-Festmedien in 5 ml SD-leu-trp-Flüssigmedium im Reagenzglas überführt und über Nacht bei 28 °C inkubiert. Jede Kultur wurde auf eine OD₆₀₀ von 0,5 eingestellt und in vier Verdünnungsstufen im Verhältnis 1:5 mit sterilem Wasser verdünnt. Von allen Verdünnungsstufen wurden 4 µl mit einer Mehrkanalpipette auf SD-leu-trp-Festmedium (Kontrolle) und auf SD-leu-trp-his-ade-Festmedium (Selektion) getropft und für zwei bis drei Tage bei 28 °C inkubiert. Das Wachstum der Zellen wurde mit dem Aufnahmesystem ImageQuant LAS 4000 (GE Healthcare Life Sciences) dokumentiert.

5.2.3 Arbeiten mit *U. maydis*

Kultivierung von *U. maydis*

U. maydis-Stämme wurden in Schikanekolben bei 200 UpM oder auf Festmedien unter aeroben Bedingungen bei 28 °C kultiviert. Kulturen auf Festmedien konnten bis zu einem Monat bei 4 °C gelagert werden. Von diesen Platten wurden Vorkulturen in einem Reagenzglas in 3 ml CM-Medium angeimpft und über Nacht auf einem Drehrad bei 28 °C inkubiert. Am nächsten Tag konnten Hauptkulturen in 20-30 ml CM-Medium mit der Vorkultur (meist 1:2000) inokuliert und über Nacht bei 200 UpM und 28 °C inkubiert werden.

Bestimmung der Zelldichte von *U. maydis*

Die Zelldichte von Flüssigkulturen wurde mit einem Novospec II Photometer (Pharmacia Biotech) bei einer Wellenlänge von 600 nm bestimmt. Zur Sicherstellung einer linearen Abhängigkeit wurden Kulturen gegebenenfalls verdünnt, sodass die OD₆₀₀ zwischen 0,2 und 0,5 lag. Die OD₆₀₀ des verwendeten Mediums diente als Blindwert. Eine OD₆₀₀ von 1,0 entspricht ungefähr $1-5 \times 10^7$ Zellen/ml.

Herstellung von Protoplasten und Transformation in *U. maydis*

Das verwendete Protokoll ist modifiziert nach (Schulz et al. 1990; Gillissen et al. 1992). Vom gewünschten *U. maydis*-Stamm wurde eine Vorkultur in 3 ml CM-Medium angelegt und über Nacht bei 28 °C inkubiert. Von dieser Vorkultur wurde am nächsten Tag eine Hauptkultur in 50 ml CM-Medium angeimpft und über Nacht bei 28 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Kultur nach Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,6 – 1,0 durch Zentrifugation bei 3000 g für 5 Minuten pelletiert und der Überstand verworfen. Das gewonnene Pellet wurde in 25 ml SCS resuspendiert, erneut durch Zentrifugation bei 3000 g für 5 Minuten pelletiert und der Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde in 2 ml SCS resuspendiert, welches 7 mg Novozym 234 enthielt (sterilfiltriert). Die Protoplastierung erfolgte bei Raumtemperatur und wurde mikroskopisch beobachtet. Sobald 30 – 40 % der Zellen nach circa 5 - 7 Minuten durch Lyse der Zellwand eine rundliche Form annahmen, wurden 10 ml eiskaltes SCS hinzugegeben und die Zellen durch Zentrifugation bei 2400 UpM für 5 Minuten pelletiert. Das Zellpellet wurde im Anschluss zweimal mit 10 ml eiskaltem SCS gewaschen (2400 UpM, 5 Minuten). Darauf folgte ein Waschschrift in 10 ml eiskaltem STC (2400 UpM, 5 Minuten). Danach wurde das Zellpellet in 1 ml eiskaltem STC vorsichtig suspendiert und zu je 100 µl in vorgekühlte 1,5-ml-Reaktionsgefäße aliquotiert. Die so hergestellten Protoplasten

konnten einige Stunden auf Eis gelagert oder bei -80 °C für mehrere Jahre aufbewahrt werden.

Zur integrativen Transformation wurden 100 µl Protoplasten mit 2-5 µg linearisierter Plasmid-DNA und 1 µl Heparinlösung für 15 Minuten auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 500 µl STC/PEG erfolgte eine weitere Inkubation auf Eis für 20 Minuten. Anschließend wurde der Transformationsansatz auf zwei kurz zuvor mit Top-Agar überschichtete Regenerationsagarplatten ausgestrichen. Nach 5 bis 7 Tagen Inkubation bei 28 °C wurden gewachsene Kolonien auf antibiotikahaltigen CM-Platten vereinzelt. Einzelne Kolonien wurden im Anschluss auf korrekte Integration des Zielkonstrukts ins Genom überprüft.

SCS	STC	STC/PEG
20 mM Natriumcitrat	10 mM Tris-HCl, pH 7,5	15 ml STC
1 M Sorbitol in H ₂ O _{bid.} , sterilfiltriert	100 mM CaCl ₂	10 g PEG 4000
	1 M Sorbitol in H ₂ O _{bid.} , sterilfiltriert	

Heparinlösung

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

Induktion des filamentösen Wachstums von AB33

Der Stamm AB33 besitzt die kompatiblen Allele bW2 und bE1 unter der Kontrolle des Stickstoff-kontrollierten Promotors *Pnar*. Um dessen Expression zu induzieren, wurden die Zellen von einem NH₄NO₃-haltigen Medium (CM) in ein KNO₃-haltiges Medium (NM) überführt. Die OD₆₀₀ einer Hauptkultur wurde gemessen und die entsprechende Menge Zellen für eine OD₆₀₀ von 0,5 durch Zentrifugation bei 5000 UpM für 3 Minuten pelletiert. Die Zellen wurden anschließend in 20 ml NM resuspendiert und erneut bei 5000 UpM für 5 Minuten zentrifugiert. Das Pellet wurde erneut in 20 ml NM aufgenommen und in einen Schikanekolben überführt. Die Kultur wurde für 6-8 Stunden bei 28 °C und 200 UpM inkubiert.

5.3 Molekularbiologische Methoden

Die in dieser Arbeit angewandten Standardtechniken, wie beispielsweise Aufreinigungen und Klonierungstechniken, wurden modifiziert nach Ausubel et al. (1987) und Sambrook et al. (1989) durchgeführt.

5.3.1 Isolierung von Nukleinsäuren

Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Die Isolation von Plasmid-DNA erfolgte nach der Methode der „kochenden Lyse“ (modifiziert nach Sambrook et al., 1989). Es wurde eine Übernachtskultur angezogen und 1,5 ml dieser Kultur durch Zentrifugation bei 13.000 UpM für 2 Minuten pelletiert. Das Zellpellet wurde in 200 µl STET und 20 µl Lysozymlösung aufgenommen. Es folgte eine Inkubation bei 95 °C für 1 Minute in einem Eppendorf-Heizblock. Der lysierte Zelldebris und die denaturierte genomische DNA wurden durch 15 Minuten Zentrifugation bei 13.000 UpM pelletiert und mithilfe eines sterilen Zahnstochers aus der wässrigen Lösung entfernt. Die Fällung der Plasmid-DNA erfolgte durch Zugabe von 20 µl 3 M Natriumacetat (pH 5,3) sowie 500 µl Isopropanol, mehrmaliger Invertierung und Zentrifugation bei 13.000 UpM für 10 Minuten. Das gewonnene DNA-Pellet wurde durch Zugabe von 200 µl 70 % Ethanol gewaschen und bei 50 °C für mindestens 10 Minuten getrocknet. Die DNA wurde in 100 µl TE / RNase A aufgenommen und schüttelnd gelöst.

STET

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

Lysozymlösung

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

TE / RNase A

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

Phenolfreie Präparation von genomischer DNA aus *U. maydis*

Die in dieser Arbeit verwendete Methode ist modifiziert nach (Bösch et al. 2016). Eine Vorkultur in 3 ml CM wurde mit einem Stamm inokuliert und über Nacht bei 28 °C oder für 2 Tage bei RT auf einem Drehrad inkubiert. 2 ml dieser Kultur wurden in ein 2 ml-Reaktionsgefäß überführt und für 2 Minuten bei 13.000 UpM pelletiert. Der Überstand wurde verworfen, zum Zellpellet wurden circa 0,3 g Glasperlen gegeben. 500 µl Lysepuffer (50:50 mit 1x TE-Puffer verdünnt) wurden zur Resuspension hinzugegeben. Es folgte eine Inkubation für 15 Minuten auf einem Vibrax (IKA Werke) bei 1400 UpM

sowie eine Inkubation bei 65 °C für 20 Minuten im Heizblock. Danach wurden 100 µl 8 M Kaliumacetat hinzugegeben und durch Invertieren vermischt, um Proteine aus der Suspension auszusalzen. Es folgte eine Zentrifugation bei 13.000 UpM für 15 Minuten. Der gewonnene Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß gegeben und mit 400 µl Isopropanol versetzt. Nach mehrfachem Invertieren wurde das Gemisch erneut für 15 Minuten bei 13.000 UpM zentrifugiert. Das daraus resultierende DNA-Pellet wurde durch Zugabe von 200 µl 70 % Ethanol und Zentrifugation für 5 Minuten bei 13.000 UpM gewaschen. Das Ethanol wurde abschließend entfernt und das DNA-Pellet für 3-5 Minuten bei 50 °C im Heizblock getrocknet. Es wurde nach Trocknung in 50 µl TE / RNase A aufgenommen und bei 400 UpM und 50 °C mindestens 30 Minuten gelöst. Die DNA konnte bei -20 °C gelagert werden.

Lysepuffer

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

TE-Puffer

10 mM Tris-HCl, pH 7,9
1 mM Na₂-EDTA in H₂O_{bid.}

5.3.2 Arbeiten mit Nukleinsäuren

Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäurelösungen

Die Konzentration von Nukleinsäuren in Lösungen wurde photometrisch mit einem NanoDrop ND-2000c Spectrophotometer (Thermo Scientific) bestimmt. Die Konzentration der Nukleinsäuren wurde anhand der Absorption bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt. Ihre Reinheit konnte aus dem Quotienten der OD₂₆₀/OD₂₈₀ ermittelt werden.

Restriktionsendonukleolytische Reaktionen

Für analytische sowie präparative endonukleolytische Reaktionen wurden Restriktionsenzyme der Firma NEB (New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main, Deutschland) eingesetzt. Das Volumen der Ansätze und eingesetzte DNA-Mengen variierten je nach Verwendungszweck. Die Inkubationstemperatur orientierte sich am Aktivitätsoptimum eingesetzter Enzyme. Analytische Reaktionen wurden für 1,5 Stunden, präparative Reaktionen für mindestens 4 Stunden und Reaktionen zur Transformation oder Southern-Analyse über Nacht durchgeführt.

Analytische Reaktion

0,5-2 µl Plasmid-DNA
4 µl 5x NEB-Puffer
0,5-1 U Restriktionsenzym
ad 20 µl H₂O_{bid.}

Präparative Reaktion

5-20 µl Plasmid-DNA
10 µl 5x NEB-Puffer
1-2 U Restriktionsenzym
ad 50 µl H₂O_{bid.}

Reaktion für Transformationsansatz

40 µl Plasmid-DNA (~2-5 ng)
10 µl 5x NEB-Puffer
3-6 U Restriktionsenzym
ad 50 µl H₂O_{bid.}

Reaktion für Southern-Analyse

10 µl genomische DNA
1,6 µl 10x NEB-Puffer
1-2 U Restriktionsenzym
ad 16 µl H₂O_{bid.}

Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten

Zur Vermeidung von Religationen von Plasmidfragmenten wurden Dephosphorylierungen durchgeführt. Dabei wurden 5'-terminale Phosphatgruppen mit Hilfe von Antarktischer Phosphatase abgespalten und so die Religation verhindert. Ein typischer Reaktionsansatz enthielt:

50 µl präparativer Restriktionsansatz (mindestens 2 Stunden inkubiert, siehe oben)
6 µl 10x Puffer
3 µl Antarktische Phosphatase
1 µl H₂O

Dieser Ansatz wurde für 1,5 Stunden bei 37 °C inkubiert und die Phosphatase im Anschluss bei 70 °C für 5 Minuten inaktiviert. Das benötigte Fragment wurde über eine Agarosegelelektrophorese aufgetrennt und zur Aufreinigung ausgeschnitten.

Golden-Gate-Klonierung

Die Golden-Gate-Klonierung ermöglicht den simultanen Einsatz von Restriktionsenzym und Ligase in einem Ansatz. Hierbei wurde entweder aufgrund ihrer besonderen Eigenschaften die Enzyme Bsal oder SapI (New England Biolabs) verwendet. Die Erkennungssequenz und die Schnittstelle dieser beiden Enzyme liegen räumlich voneinander getrennt vor, sodass die Erkennungssequenz während der Reaktion entfernt wird und variable Enden entstehen. Dies ermöglicht eine Klonierungsreaktion, bei der verschiedene Fragmente mit den sogenannten Speicher- und Ziel-Plasmiden kombiniert werden können, um ohne eine vorangehende Restriktion gezielt spezifische Ligationsprodukte zu erzeugen. Dabei werden alle Fragmente durch spezielles Design der Oligonukleotide in der gewünschten Orientierung vereint. Ein typischer Klonierungsansatz war wie folgt zusammengesetzt:

75 ng	Speicher-Plasmid
75 ng	Ziel-Plasmid
40 ng	Flanken (generiert über PCR, aufgereinigt)
(40 ng	weitere benötigte DNA-Fragmente (generiert über PCR, aufgereinigt))
0,75 µl	T4-DNA-Ligase
0,5 µl	BsaI-HF / SapI-HF (NEB)
ad 15 µl	H ₂ O _{bid.}

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

PCR-Programm: <Main>; <GOGATE>

37 °C	2 Minuten	} 50 Zyklen
16 °C	5 Minuten	
<hr/>		
37 °C	5 Minuten	
50 °C	5 Minuten	
80 °C	5 Minuten	
16 °C	∞	

Auftrennung von Nukleinsäuren mittels Gelelektrophorese

DNA-Fragmente wurden über eine Agarosegelelektrophorese der Größe entsprechend aufgetrennt. Hierzu wurde ein TAE-Puffersystem verwendet. Die Agarosekonzentration der Gele lag, abhängig von der Größe der zu analysierenden Fragmente, zwischen 0,8 % und 2 %. Die entsprechende Menge Agarose wurde in 1x TAE-Puffer aufgekocht und somit gelöst. War das flüssige Gel auf eine Temperatur von circa 60 °C abgekühlt, wurde Ethidiumbromidlösung (1 µg/ml Endkonzentration) hinzugegeben. Das Gel wurde in einen vorbereiteten Gelschlitten gegossen, die Taschen mit einem Kamm abgesteckt und nach circa 30 Minuten Aushärtungszeit verwendet. Das Gel wurde hierfür ohne Kamm in eine mit 1x TAE-Laufpuffer gefüllte Kammer gelegt. Nukleinsäuren wurden mit einem DNA-Auftragspuffer in die entstandenen Taschen gefüllt. Dauer und Stromspannung der Gelelektrophorese wurde individuell an die Proben angepasst. Der Verlauf der Elektrophorese konnte anhand der farbigen Lauffront des DNA-Auftragspuffers nachvollzogen werden.

TAE (50x)

2 M	Tris-Acetat
100 mM	Na ₂ -EDTA in H ₂ O _{bid.}

DNA-Auftragspuffer

30 % (v/v)	Glycerin
0,4 % (w/v)	Bromphenolblau in H ₂ O _{bid.}

Präparation von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Nach erfolgter Gelelektrophorese wurden DNA-Fragmente mit einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten. Die mit Ethidiumbromid gefärbten Fragmente wurden auf einem UV-Tisch (TCP-20.LM, Vilber Lourmat Deutschland GmbH, Eberhardzell, Deutschland) angeregt. Die ausgeschnittenen Fragmente wurden mit Hilfe des JETQUICK Gel Extraction Spin Kits (Genomed) nach Angaben des Herstellers aus dem Gel eluiert.

Ligation von Nukleinsäurefragmenten

DNA-Fragmente wurden mit Hilfe der T4-DNA-Ligase (Roche) oder der Quick Ligase (NEB) ligiert. Bei einer Ligation von zwei Fragmenten wurde ein Verhältnis von 1:3 zwischen dem Vektorrückgrat und dem Insert verwendet. Bei einer Ligation von mehreren Fragmenten wurden diese in einem Verhältnis von 1:1 eingesetzt. Die Ligation mit der T4-DNA-Ligase erfolgte bei 16 °C über Nacht, bei der Quick Ligase bei RT für 5-10 Minuten.

Ligationsansatz

X µl	Fragmente
2 µl	10x T4-DNA-Ligase-Puffer
1 µl	T4-DNA-Ligase
ad 20 µl	H ₂ O _{bid.}

5.3.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wurde modifiziert nach Innis et al., 1990 durchgeführt. Die Generierung von Fragmenten zu Klonierungszwecken erfolgte durch die Phusion DNA-Polymerase von NEB. Für verschiedene analytische PCRs, die nicht zur Klonierung verwendet wurden, wurde eine im Labor hergestellte Phusion DNA-Polymerase verwendet, welche weniger effizient arbeitet als die kommerziell erworbene Polymerase. Deshalb benötigt sie eine leicht verlängerte Elongationszeit. Ein typischer PCR-Ansatz ist im Folgenden aufgeführt.

10-100 ng	Matrizen-DNA
1,5 µl	DMSO
0,5 µl	25 mM dNTPs
je 0,5 µl	100 µM Oligonukleotid
0,5 µl	Phusion DNA-Polymerase
5 µl	10x Phusion-HF-Puffer
ad 50 µl	H ₂ O

Standardmäßig wurde folgendes PCR-Programm angewendet:

Initiale Denaturierung	98 °C / 30 Sekunden
Amplifikation (34 Zyklen):	
Denaturierung	98 °C / 10 Sekunden
Hybridisierung	65 °C / 20 Sekunden
Elongation	72 °C / 30 Sekunden pro 1 kb (NEB Phusion DNA-Polymerase) 45-60 Sekunden pro 1 kb (im Labor hergestellte Polymerase)
Finale Elongation	72 °C / 8 Minuten

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

5.3.4 Auftrennung und Nachweis von Nukleinsäuren

Transfer von DNA (Southern-Blot)

Diese Methode ist modifiziert nach Southern (1975). Die zuvor durch Restriktionsendonukleolyse geschnittene genomische DNA wurde bei 20 V über Nacht in einem TAE-Agarosegel aufgetrennt. Anschließend wurde das Agarosegel je 20 Minuten in 0,25 M HCl, DENAT- und RENAT-Lösung schüttelnd inkubiert, um durch die Auftrennung der DNA-Stränge einen besseren Transfer auf die Membran zu gewährleisten. Der Transfer der DNA-Fragmente auf eine Nylonmembran erfolgte durch einen Kapillar-Blot. Der Blot wurde folgendermaßen aufgebaut: Ein Behälter wurde mit Transferlösung (20x SSC) befüllt. Eine Glasplatte wurde auf den Behälter gelegt und eine Salzbrücke aus einem Streifen Whatman-Papier angefertigt. Die Salzbrücke wurde so über die Glasplatte gelegt, dass beide Enden in die Transferlösung hineinragen. Das Gel wurde mit den Taschenöffnungen nach unten zeigend auf die Salzbrücke platziert. Auf das Gel wurden anschließend eine zugeschnittene Nylonmembran (Hybond-N+, GE Healthcare Life Sciences) und zwei gleich große Whatman-Papiere gelegt. Ein Stapel Papiertücher mit einem Gewicht gewährleisteten einen durch Kapillarkräfte getriebenen Transfer des SSC-Puffers über die Salzbrücke durch das Gel und die Membran. Die DNA-Fragmente wurden durch den Pufferfluss aus dem Gel eluiert und banden in der darüber liegenden Membran. Der Kapillar-Blot erfolgte für mindestens 3,5 Stunden oder über Nacht. Nach dem Transfer der Nukleinsäuren wurde die DNA durch UV-Bestrahlung (120 mJ/cm²) in einer UV-Kammer (BLX-254, Vilber Lourmat) auf der Membran fixiert.

20x SSC

3 M NaCl
 300 mM Natriumcitrat · 2 H₂O in H₂O_{bid.}
 Mit HCl auf pH 7,0 einstellen.

DENAT-Lösung

1,5 M NaCl
 400 mM NaOH in H₂O_{bid.}

RENAT-Lösung

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

Spezifischer Nachweis immobilisierter Nukleinsäuren (Southern-Analyse)

Für den Nachweis von DNA-Fragmenten wurden genspezifische Sonden eingesetzt. Diese wurden durch den Einbau von Digoxigenin-11-dUTP (DIG-dUTP) während einer PCR hergestellt. Ein typischer PCR-Ansatz enthielt:

5-25 ng linearisierte Plasmid-DNA
 5 µl 10x PCR-Puffer
 5 µl PCR-DIG-Labeling-Mix (DIG-Labeling Kit, Roche)
 1,5 µl DMSO
 20 pmol je Oligonukleotid
 0,5 µl Phusion DNA-Polymerase
 ad 50 µl H₂O_{bid.}

Die Reaktion erfolgte in einem Thermocycler PTC200 (MJ Research) analog einer normalen PCR (siehe 4.3.3). Die beim Southern-Blot verwendete Nylonmembran wurde mit Hybridisierungspuffer für mindestens 20 Minuten bei 65 °C in einer Hybridisierungsröhre prähybridisiert. Die DIG-markierte Sonde wurde in 15 ml Hybridisierungspuffer aufgenommen und für 8 Minuten bei 99 °C in einem Heizblock denaturiert. Nach dem Entfernen des zur Prähybridisierung verwendeten Hybridisierungspuffers wurde die Sonde zu der Membran gegeben. Die Hybridisierung selbst erfolgte bei 65 °C über Nacht oder für mindestens 4 Stunden. Im Anschluss wurde die Membran für jeweils 15 Minuten bei 65 °C in Southern-Waschpuffer I, Southern-Waschpuffer II und Southern-Waschpuffer III gewaschen. Alle nachfolgenden Waschschriffe wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Auf 5 Minuten Inkubation in DIG-Waschpuffer erfolgte die Blockierung der Membran in DIG2-Puffer für 30 Minuten. Zum Nachweis DIG-dUTP-markierter DNA-Fragmente wurde die Membran für mindestens 1 Stunde in einer DIG2-Antikörperlösung (Anti-Digoxigenin-AB Fab-Fragmente, Roche; 1:10.000 in DIG2) inkubiert. Anschließend wurde die Membran zweimal 15 Minuten mit DIG-Waschpuffer gewaschen und 5 Minuten in DIG3-Puffer äquilibriert. In einer Plastikfolie wurde die Membran 5 Minuten mit einer Chemilumineszenzlösung (CDP-Star, Roche; 1:100 in DIG3) inkubiert. Anschließend konnte das Chemilumineszenzsignal mit dem Detektionssystem ImageQuant LAS4000 (GE Healthcare Life Sciences) visualisiert werden.

20x SSPE

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

Denhardt-Lösung

2% (v/v) BSA Fraktion V (Sigma A-9647)
 2% (v/v) Ficoll
 2% (v/v) PVP (Sigma PVP-360)
 in H₂O_{bid.}

Southern-Hybridisierungspuffer

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

Southern-Waschpuffer I

2x SSPE
 0,1 % SDS
 in H₂O_{bid.}

Southern-Waschpuffer II

1x SSPE
 0,1 % SDS
 in H₂O_{bid.}

Southern-Waschpuffer III

0,1x SSPE
 0,1 % SDS
 in H₂O_{bid.}

DIG1

100 mM Maleinsäure
 150 mM NaCl
 in H₂O_{bid.}, pH-Wert 7,5

DIG2

1 % (w/v) Magermilchpulver in DIG1

DIG3

100 mM Tris-HCl
 100 mM CaCl
 in H₂O_{bid.}, pH-Wert 9,5

DIG-Waschpuffer

0,3 % Tween-20 in DIG1

5.3.5 Sequenzanalyse

Sequenzierungen

DNA-Sequenzierungen wurde vom Sequencing Service am Biozentrum der LMU München oder durch Eurofins Genomics (Eurofins MWG GmbH, Ebersberg, Deutschland) durchgeführt. Zur Sequenzierung an der LMU München wurde folgender Ansatz verwendet:

250 ng aufgereinigte Plasmid-DNA
 0,64 µl Oligonukleotid (5 pM)
 ad 7 µl Tris-HCl pH 8,5

Die Sequenzierung erfolgte unter Verwendung der BigDye v3.1-Methode.

Für Sequenzierungen durch Eurofins wurde folgender Ansatz verwendet (Mix2Seq Kit):

15 μ l aufgereinigte Plasmid-DNA (50-100 ng/ μ l)
2 μ l Oligonukleotid (10 μ M)

Erhaltene Sequenzierungsdaten wurden mit dem Programm CloneManager (Version 9, Scientific and Educational Software) ausgewertet.

5.4 Proteinbiochemische Methoden

Konzentrationsbestimmung von Proteinen nach Bradford

Diese Methode wurde modifiziert nach Bradford (1976). Zur Bestimmung von Proteinkonzentrationen wurden 10 µl einer Proteinlösung mit 200 µl Bradford-Färbelösung (1:5 mit H₂O_{bid.} verdünnt, Bio-Rad Laboratories, München, Deutschland) vermengt, in eine Mikrotiterplatte gegeben und anschließend deren Absorption mit einem Monochromator-basierten Fluoreszenzspektrometer (Infinite M200, Tecan) bei einer Wellenlänge von 595 nm bestimmt. Messungen einer Standardreihe aus Proben mit 0,05 / 0,1 / 0,15 und 0,2 µg/ml BSA (in H₂O_{bid.}) wurden zur Erstellung einer Standardreihe verwendet. Als Blindwert wurde H₂O_{bid.} genutzt. Vor der Messung wurden Proteinlösungen standardmäßig 1:20 mit H₂O_{bid.} verdünnt, um innerhalb des messbaren Bereichs der Standardkurve zu liegen. Gegebenenfalls mussten abweichende Verdünnungen vorgenommen werden.

Präparation von Proteinen aus *U. maydis*

Zur Proteinpräparation aus Filamenten wurden Hauptkulturen in 50 ml NM angelegt, welche nach 6 Stunden Induktion des filamentösen Wachstums durch Zentrifugation bei 7500 UpM für 10 Minuten geerntet wurden. Das Zellpellet wurde in 2 ml Lysepuffer aufgenommen und in Metallbehälter überführt, welche in flüssigem Stickstoff vorgekühlt waren. Zum Aufschließen der Zellen wurden pro Zellpellet zwei ebenfalls vorgekühlte Metallkugeln hinzugegeben. Die Metallbehälter wurden in einer Kugelmühle (MM 400, Retsch GmbH, Haan, Deutschland) eingesetzt und die Zellen zweimal für 10 Minuten bei 30 Hertz und 4 °C aufgeschlossen. Zwischen beiden Schritten wurden Proben in flüssigem Stickstoff gekühlt. Die aufgeschlossenen Suspensionen wurden bei 4 °C aufgetaut, in ein 2 ml-Reaktionsgefäß überführt und Zelldebris durch Zentrifugation bei 13.000 UpM für 20 Minuten bei 4 °C vom Überstand abgetrennt. Der Überstand wurde in ein neues, ebenfalls vorgekühltes 2 ml-Reaktionsgefäß überführt und konnte bei -80 °C mehrere Monate gelagert werden.

8 M Urea-Lysepuffer

9,61 g Urea
1 ml Tris-HCl, pH 8,0
ad 20 ml H₂O_{bid.}

Protease-Inhibitoren

400 µl 1 Tablette *complete protease inhibitor EDTA-free* (Roche) in
1 ml H₂O_{bid.}
200 µl Benzamidin (0,5 M Stock)
200 µl PMSF (0,1 M in EtOH)

SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Diese Methode wurde modifiziert nach (Laemmli 1970). Proteinextrakte wurden unter denaturierenden Bedingungen mit Hilfe einer SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt. Dazu wurde ein Gel zwischen zwei vertikal ausgerichteten Glasplatten auspolymerisiert, welches eine Schichtdicke von 1 mm aufwies und aus einem Sammel- und einem Trenngel bestand. Proben wurden mit 3x Laemmli-Probenpuffer für 5 Minuten bei 95 °C oder 10 Minuten bei 80 °C erhitzt und anschließend abgekühlt. Die Auftrennung erfolgte in einer Mini Protean II Aparatur (Bio-Rad) für 1 Stunde bei 30 mA pro Gel.

3x Laemmli-Probenpuffer

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

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.}

Trenngel

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

SDS-Laufpuffer

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

Alternativ wurden kommerziell erworbene, fertig auspolymerisierte Gele (8 %) für die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese eingesetzt (NuPAGE Bis-Tris Gele, Thermo Fisher Scientific).

Western Blot und Analyse (semi-trocken)

Die Methode wurde modifiziert nach Kyhse-Andersen (1984). Die durch die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennten Proteinproben wurden mit einem semi-trockenen Blot auf eine Nitrocellulose-Membran (Hybond-ECL, GE Healthcare Sciences) transferiert. Dazu wurde die Membran 1-2 Minuten in Anodenpuffer 2 äquilibriert. Der Aufbau des Blots von oben (Kathode) nach unten (Anode) erfolgte nach dem Schema:

Kathode

- Drei Lagen Whatman-Papier in Kathodenpuffer
- Polyacrylamid-Gel
- Nitrocellulose-Membran (Hybond-ECL, GE Healthcare Sciences)
- Zwei Lagen Whatman-Papier in Anodenpuffer 2
- Eine Lage Whatman-Papier in Anodenpuffer 1

Anode

Der Transfer erfolgte bei circa $1,5 \text{ mA/cm}^2$ für 2 Stunden. Der immunologische Nachweis von Proteinen erfolgte unter Verwendung einer an den sekundären Antikörper gekoppelten Meerrettich-Peroxidase (HRP, *horseradish peroxidase*). Die Membran wurde hierfür nach dem Blotten für 60 Minuten mit 3% Magermilchpulver in TBST blockiert. Im Anschluss wurde die Membran über Nacht mit dem primären Antikörper in TBST mit 3% Magermilchpulver (1:2000) inkubiert. Nach drei Waschschritten für jeweils 20 Minuten in TBST wurde die Membran für 1 Stunde mit dem sekundären Antikörper in TBST mit 3% Magermilchpulver (1:5000) inkubiert. Es folgten drei Waschschrritte für 20 Minuten in TBST und ein Waschschrtritt für 5 Minuten in TBS. In einer Plastikhülle wurde die Membran für 1-3 Minuten mit der Chemilumineszenz-Lösung AceGlow (VWR Peqlab) inkubiert. Anschließend wurde die Membran in eine Plastikhülle eingeschweißt und das Chemilumineszenzsignal mit dem Detektionssystem ImageQuant LAS 4000 (GE Healthcare Life Sciences) visualisiert.

Primärer Antikörper

- α -Gfp (Mischung der monoklonalen Antikörper 7.1 und 13.1, Maus IgG_{1k}; Roche)
- α -Aktin (monoklonaler Antikörper, Klon C4, Maus IgG₁; MP Biomedicals)

Sekundärer Antikörper

- α -Maus (Anti-Maus IgG-HRP-Konjugat aus der Ziege; Promega)

TBS

- 20 mM Tris-Hcl, pH 7,6
- 136 mM NaCl
- in H₂O_{bid.}

TBST

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

Kathodenpuffer

- 25 mM Tris-HCl, pH 9,4
- 40 mM ϵ -Aminocaprönsäure
- 15 % Methanol
- in H₂O_{bid.}

Anodenpuffer 1

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

Anodenpuffer 2

- 30 mM Tris-Hcl, pH 10,4
- 15 % Methanol
- in H₂O_{bid.}

5.5 Mikroskopie und Bildverarbeitung

5.5.1 Mikroskop-Aufbau und Steuerung

Für die Mikroskopie wurde das Weitfeldsystem Zeiss Axio Observer.Z1 System der Firma Visitron Systems (München, Deutschland) benutzt. Das System ist ausgestattet mit einer Orca Flash4.0-Kamera (Hamamatsu, Japan) und den Zeiss Objektivlinsen 40x Plan-Neofluar (NA 1,3), 63x Plan-Apochromat (NA 1,4), 100x EC Plan-Neofluar (NA 1,3) und 100x a-Plan-Apochromat (NA 1,46). Die Anregung von Fluoreszenzproteinen erfolgte mittels Lasern für die Anregung von eGfp (488 nm/100 W) oder Rfp/mCherry (561 nm/150 mW) in Kombination mit den Filtersets für eGFP (ET470/40x, ET525/50m, T495_PXR) oder für mCherry (ET569/40x, ET630/75m, T581p, AHF Analysetechnik, Tübingen, Deutschland). Die generelle Steuerung des Mikroskops erfolgte mit dem Programm MetaMorph (Version 7, Molecular Devices, Sunnyvale USA) oder mit dem Programm VisiView (Version 3.3.0.4, Visitron Systems, Puchheim, Deutschland). Diese Programme wurden ebenfalls zur Auswertung von Daten, Einstellungen an Kontrast und Helligkeit, Quantifizierungen und Erstellung von Kymographen genutzt.

5.5.2 Kolokalisationsstudien und deren Auswertung

Kolokalisationsstudien wurden mit Hilfe eines Zweikanal-Bildwandlers (DV2, Photometrics, Tucson, USA) durchgeführt. Dieser ermöglichte die simultane Detektion von eGfp und Rfp/mCherry. Ein dichroitischer Strahlteiler (dcxr565) und ein spezieller Anregungsfilter für eGfp und mCherry (Gfp/mCherry, Chroma Technology, USA) wurden zur simultanen Anregung und Detektion der Fluoreszenzproteine genutzt. Ein zweiter dichroitischer Strahlteiler innerhalb des Bildwandlers teilte die Fluoreszenzsignale in die jeweiligen Wellenlängen auf. Fluoreszenzsignale wurden durch Emissionsfilter (Gfp ET520/40; Rfp/mCherry ET632/60) gefiltert, bevor sie auf unterschiedlichen Bereichen des CCD-Chips detektiert werden konnten. Zur Quantifizierung von kolokalisierenden Proteinen in beweglichen Partikeln wurde in der Regel das schwächere Signal (meistens mCherry) mit dem stärkeren Signal verglichen. War in beiden Kanälen derselbe bewegliche Partikel erkennbar, galt dies als Kolokalisation. Es wurden mindestens 10 Hyphen pro Stamm und pro Experiment ausgewertet.

5.5.3 Analyse von Phänotypen und Untersuchung subzellulärer Lokalisationen

Zur phänotypischen Analyse von Stämmen wurden mindestens 100 Zellen pro Stamm quantifiziert und in die Kategorien unipolar oder bipolar sowie septenbildend und nicht-septenbildend eingestuft. Dabei wurden mindestens 3 voneinander unabhängige Experimente durchgeführt. Subzelluläre Lokalisationen wurden über Filme (bestehend aus 150 Einzelbildern) mit einer Belichtungszeit von 150 ms bestimmt. Aus den Filmen wurden Kymographen erstellt, mit deren Hilfe die Anzahl der Signale sowie deren Geschwindigkeit ermittelt wurden. Veränderten Signale während der Aufnahme ihre Geschwindigkeit und/oder Richtung, wurden sie als verschiedene Datenpunkte gewertet.

5.5.4 FM4-64-Färbung und Benomyl-Behandlung

Zur Färbung von Zellen mit dem lipophilen Farbstoff FM4-64 (Invitrogen, Darmstadt, Deutschland) wurde 1 ml einer Zellsuspension mit 0,8 μM FM4-64 für 30 Sekunden bei Raumtemperatur inkubiert (Baumann et al., 2012b). Im Anschluss wurden die Proben mikroskopiert. Benomyl (Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) wurde in einer finalen Konzentration von 50 μM zu Flüssigkulturen gegeben. Behandelte Kulturen wurden für mindestens 30 Minuten schütteln bei 28 °C und 200 UpM inkubiert, bevor sie mikroskopisch untersucht wurden (Becht et al. 2006).

5.6 Computerprogramme

Die Erstellung und Bearbeitung von Plasmid-Sequenzen und genomischen Loci wurde das Programm CloneManager 9 (Scientific and Educational Software, Cary, NC, USA) verwendet. Zudem wurden mit Hilfe dieses Programms Klonierungen geplant, Oligonukleotide entworfen und genetische Karten erstellt.

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

Die Erstellung von Abbildungen erfolgte mit dem Programm Canvas 12 (ACD Systems of America Inc., Seattle, WA, USA).

Die Identifizierung von homologen Proteinen oder Nukleinsäuresequenzen wurde NCBI BLAST verwendet (Altschul et al. 1990; States und Gish 1994).

Aminosäuresequenzen wurden mithilfe des Programms Clustal X erstellt (Larkin et al. 2007). Zur Analyse und Darstellung der Sequenzvergleiche wurde das Programm GeneDoc 2.6 verwendet (Nicolas et al. 1997).

Proteindomänen wurden mithilfe von SMART (Schultz et al. 1998; Letunic und Bork 2018) und NCBI CDD (Marchler-Bauer et al. 2009; Marchler-Bauer et al. 2011; Marchler-Bauer et al. 2015) identifiziert.

6 Publikation

Im Nachfolgenden wird auf die Anteile der vorliegenden Arbeit verwiesen, welche im Rahmen einer Publikation verwendet worden sind.

S. Jankowski*, T. Pohlmann*, S. Baumann, K. Müntjes , S. K. Devan, S. Zander, M. Feldbrügge (2019)

The multi PAM2 protein Upa2 functions as novel core component of endosomal mRNA transport.

Die Veröffentlichung erfolgte unter:

EMBO Reports (2019) 20: e47381; doi: <https://doi.org/10.15252/embr.201847381>

* geteilte Erstautorenschaft

Inhaltliche Bezüge in den Abschnitten 2.3 sowie 3.3

Modifizierte Grafiken:

Diese Arbeit	Publikation
Abbildung 13	Figure 2A, 2B, EV2A, EV2B
Abbildung 14	Figure 3
Abbildung 15	Figure 1A, 1B, 1C, 1E, EV1A, EV1B
Abbildung 16	Figure 5A, 5B, EV3A
Abbildung 17	Figure 5C, 5D, 5E, 5F, EV3B, EV3D, EV3E
Abbildung 18	Figure 5G
Abbildung 19	Figure 5H, EV3G
Abbildung 20	Figure EV3F
Abbildung 24	Figure 4, EV2E
Abbildung 25	Figure 6D, 6E, 6F , 6G, 6H, 6I, EV4E
Abbildung 26	Figure 6A, 6B, 6C, EV4A, EV4B, EV4C
Abbildung 28	Figure 7

Die **rot** markierten Abbildungen wurden von KM erstellt und mit ihrer Genehmigung in der vorliegenden Arbeit gezeigt. Das in der **grün** markierten Abbildung enthaltene Modell wurde von SJ und TP gemeinsam konzipiert. SJ, TP und MF haben die publizierte Studie geplant und die Daten analysiert. SJ und TP haben gleichermaßen zur genetischen und zellbiologischen Analyse von Upa2 beigetragen (Vorarbeiten aus

der Dissertation Thomas Pohlmann, 2013). SB hat zur Stammherstellung beigetragen und führte die ersten zellbiologischen Experimente zur Charakterisierung von Upa2 aus. SZ führte initiale RNA-Lebendzelluntersuchungen aus, die im späteren Verlauf von KM übernommen wurden. Zudem übernahm KM die Herstellung weiterer Stämme zu RNA-Lebendzelluntersuchungen, führte die mikroskopischen Analysen durch und wertete die gewonnenen Daten aus. SKD analysierte die Interaktion von PAM2-Motiven mit MLL-Äänen *in vitro*. TP plante die durchgeführten Hefe-Zwei-Hybrid-Analysen. Die entsprechenden Stämme wurden von Ute Gengenbacher (technische Assistenz) hergestellt.

7 Literaturverzeichnis

- Albrecht, Mario; Lengauer, Thomas (2004): Survey on the PABC recognition motif PAM2. In: *Biochemical and biophysical research communications* 316 (1), S. 129–138. DOI: 10.1016/j.bbrc.2004.02.024.
- Alcazar-Roman, Abel R.; Tran, Elizabeth J.; Guo, Shuangli; Wentz, Susan R. (2006): Inositol hexakisphosphate and Gle1 activate the DEAD-box protein Dbp5 for nuclear mRNA export. In: *Nature cell biology* 8 (7), S. 711–716. DOI: 10.1038/ncb1427.
- Altschul, S. F.; Gish, W.; Miller, W.; Myers, E. W.; Lipman, D. J. (1990): Basic local alignment search tool. In: *Journal of molecular biology* 215 (3), S. 403–410. DOI: 10.1016/S0022-2836(05)80360-2.
- Aranda-Abreu et al. (2014): Tau mRNA: A Brief History of its Localization. In: *Austin Alzheimers J Parkinsons Dis* (1(3):4).
- Ariyachet, Chaiyaboot; Beißel, Christian; Li, Xiang; Lorrey, Selena; Mackenzie, Olivia; Martin, Patrick M. et al. (2017): Post-translational modification directs nuclear and hyphal tip localization of *Candida albicans* mRNA-binding protein Slr1. In: *Molecular microbiology* 104 (3), S. 499–519. DOI: 10.1111/mmi.13643.
- Aronov, S.; Aranda, G.; Behar, L.; Ginzburg, I. (2001): Axonal tau mRNA localization coincides with tau protein in living neuronal cells and depends on axonal targeting signal. In: *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 21 (17), S. 6577–6587.
- Aronov, Stella; Aranda, Gonzalo; Behar, Leah; Ginzburg, Irith (2002): Visualization of translated tau protein in the axons of neuronal P19 cells and characterization of tau RNP granules. In: *Journal of cell science* 115 (Pt 19), S. 3817–3827. DOI: 10.1242/jcs.00058.
- Aschenbroich, Jörn; Hussnaetter, Kai P.; Stoffels, Peter; Langner, Thorsten; Zander, Sabrina; Sandrock, Björn et al. (2018): The germinal centre kinase Don3 is crucial for unconventional secretion of chitinase Cts1 in *Ustilago maydis*. In: *Biochimica et biophysica acta. Proteins and proteomics*. DOI: 10.1016/j.bbapap.2018.10.007.
- Avila, Jesús (2018): Our Working Point of View of Tau Protein. In: *Journal of Alzheimer's disease : JAD* 62 (3), S. 1277–1285. DOI: 10.3233/JAD-170600.
- Babu, Praveen; Bryan, Joshua D.; Panek, Heather R.; Jordan, Solomon L.; Forbrich, Brynn M.; Kelley, Shannon C. et al. (2002): Plasma membrane localization of the Yck2p yeast casein kinase 1 isoform requires the C-terminal extension and secretory pathway function. In: *Journal of cell science* 115 (Pt 24), S. 4957–4968. DOI: 10.1242/jcs.00203.
- Bakthavachalu, Baskar; Huelsmeier, Joern; Sudhakaran, Indulekha P.; Hillebrand, Jens; Singh, Amanjot; Petrauskas, Arnas et al. (2018): RNP-Granule Assembly via Ataxin-2 Disordered Domains Is Required for Long-Term Memory and Neurodegeneration. In: *Neuron* 98 (4), 754-766.e4. DOI: 10.1016/j.neuron.2018.04.032.

- Balasanyan, Varuzhan; Arnold, Don B. (2014): Actin and myosin-dependent localization of mRNA to dendrites. In: *PloS one* 9 (3), e92349. DOI: 10.1371/journal.pone.0092349.
- Banuett, F. (1995): Genetics of *Ustilago maydis*, a fungal pathogen that induces tumors in maize. In: *Annual review of genetics* 29, S. 179–208. DOI: 10.1146/annurev.ge.29.120195.001143.
- Banuett, Flora; Herskowitz, Ira (2002): Bud morphogenesis and the actin and microtubule cytoskeletons during budding in the corn smut fungus, *Ustilago maydis*. In: *Fungal genetics and biology : FG & B* 37 (2), S. 149–170.
- Barr, Justin; Yakovlev, Konstantin V.; Shidlovskii, Yulii; Schedl, Paul (2016): Establishing and maintaining cell polarity with mRNA localization in *Drosophila*. In: *BioEssays* 38 (3), S. 244–253. DOI: 10.1002/bies.201500088.
- Baumann, Sebastian; König, Julian; Koepke, Janine; Feldbrügge, Michael (2014): Endosomal transport of septin mRNA and protein indicates local translation on endosomes and is required for correct septin filamentation. In: *EMBO reports* 15 (1), S. 94–102. DOI: 10.1002/embr.201338037.
- Baumann, Sebastian; Pohlmann, Thomas; Jungbluth, Marc; Brachmann, Andreas; Feldbrügge, Michael (2012): Kinesin-3 and dynein mediate microtubule-dependent co-transport of mRNPs and endosomes. In: *Journal of cell science* 125 (Pt 11), S. 2740–2752. DOI: 10.1242/jcs.101212.
- Becht, Philip; König, Julian; Feldbrügge, Michael (2006): The RNA-binding protein Rrm4 is essential for polarity in *Ustilago maydis* and shuttles along microtubules. In: *Journal of cell science* 119 (Pt 23), S. 4964–4973. DOI: 10.1242/jcs.03287.
- Bertrand, E.; Chartrand, P.; Schaefer, M.; Shenoy, S. M.; Singer, R. H.; Long, R. M. (1998): Localization of ASH1 mRNA particles in living yeast. In: *Molecular cell* 2 (4), S. 437–445.
- Besse, Florence; Ephrussi, Anne (2008): Translational control of localized mRNAs: restricting protein synthesis in space and time. In: *Nature reviews. Molecular cell biology* 9 (12), S. 971–980. DOI: 10.1038/nrm2548.
- Béthune, Julien; Jansen, Ralf-Peter; Feldbrügge, Michael; Zarnack, Kathi (2019): Membrane-Associated RNA-Binding Proteins Orchestrate Organelle-Coupled Translation. In: *Trends in cell biology* 29 (2), S. 178–188. DOI: 10.1016/j.tcb.2018.10.005.
- Bhaskara, Ramachandra M.; Srinivasan, Narayanaswamy (2011): Stability of domain structures in multi-domain proteins. In: *Scientific reports* 1, S. 40. DOI: 10.1038/srep00040.
- Binder, L. I.; Frankfurter, A.; Rebhun, L. I. (1985): The distribution of tau in the mammalian central nervous system. In: *The Journal of cell biology* 101 (4), S. 1371–1378. DOI: 10.1083/jcb.101.4.1371.
- Blower, Michael D. (2013): Molecular insights into intracellular RNA localization. In: *International review of cell and molecular biology* 302, S. 1–39. DOI: 10.1016/B978-0-12-407699-0.00001-7.

- Bobola, N.; Jansen, R. P.; Shin, T. H.; Nasmyth, K. (1996): Asymmetric accumulation of Ash1p in postanaphase nuclei depends on a myosin and restricts yeast mating-type switching to mother cells. In: *Cell* 84 (5), S. 699–709.
- Boeynaems, Steven; Alberti, Simon; Fawzi, Nicolas L.; Mittag, Tanja; Polymenidou, Magdalini; Rousseau, Frederic et al. (2018): Protein Phase Separation: A New Phase in Cell Biology. In: *Trends in cell biology* 28 (6), S. 420–435. DOI: 10.1016/j.tcb.2018.02.004.
- Böhl, F.; Kruse, C.; Frank, A.; Ferring, D.; Jansen, R. P. (2000): She2p, a novel RNA-binding protein tethers ASH1 mRNA to the Myo4p myosin motor via She3p. In: *The EMBO journal* 19 (20), S. 5514–5524. DOI: 10.1093/emboj/19.20.5514.
- Bölker, M. (2001): *Ustilago maydis*--a valuable model system for the study of fungal dimorphism and virulence. In: *Microbiology (Reading, England)* 147 (Pt 6), S. 1395–1401. DOI: 10.1099/00221287-147-6-1395.
- Bölker, M.; Urban, M.; Kahmann, R. (1992): The a mating type locus of *U. maydis* specifies cell signaling components. In: *Cell* 68 (3), S. 441–450.
- Bölker, Michael; Basse, Christoph W.; Schirawski, Jan (2008): *Ustilago maydis* secondary metabolism-from genomics to biochemistry. In: *Fungal genetics and biology : FG & B* 45 Suppl 1, S88-93. DOI: 10.1016/j.fgb.2008.05.007.
- Bösch, Kristin; Frantzeskakis, Lamprinos; Vraneš, Miroslav; Kämper, Jörg; Schipper, Kerstin; Göhre, Vera (2016): Genetic Manipulation of the Plant Pathogen *Ustilago maydis* to Study Fungal Biology and Plant Microbe Interactions. In: *Journal of visualized experiments : JoVE* (115). DOI: 10.3791/54522.
- Brachmann, A.; König, J.; Julius, C.; Feldbrügge, M. (2004): A reverse genetic approach for generating gene replacement mutants in *Ustilago maydis*. In: *Molecular genetics and genomics : MGG* 272 (2), S. 216–226. DOI: 10.1007/s00438-004-1047-z.
- Brachmann, A.; Weinzierl, G.; Kämper, J.; Kahmann, R. (2001): Identification of genes in the bW/bE regulatory cascade in *Ustilago maydis*. In: *Molecular microbiology* 42 (4), S. 1047–1063.
- Brangwynne, Clifford P.; Eckmann, Christian R.; Courson, David S.; Rybarska, Agata; Hoege, Carsten; Gharakhani, Jöbin et al. (2009): Germline P granules are liquid droplets that localize by controlled dissolution/condensation. In: *Science (New York, N.Y.)* 324 (5935), S. 1729–1732. DOI: 10.1126/science.1172046.
- Brangwynne, Clifford P.; Mitchison, Timothy J.; Hyman, Anthony A. (2011): Active liquid-like behavior of nucleoli determines their size and shape in *Xenopus laevis* oocytes. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108 (11), S. 4334–4339. DOI: 10.1073/pnas.1017150108.
- Bravo, Jaime; Aguilar-Henonin, Laura; Olmedo, Gabriela; Guzmán, Plinio (2005): Four distinct classes of proteins as interaction partners of the PABC domain of *Arabidopsis thaliana* Poly(A)-binding proteins. In: *Molecular genetics and genomics : MGG* 272 (6), S. 651–665. DOI: 10.1007/s00438-004-1090-9.

- Brefort, Thomas; Doehlemann, Gunther; Mendoza-Mendoza, Artemio; Reissmann, Stefanie; Djamei, Armin; Kahmann, Regine (2009): *Ustilago maydis* as a Pathogen. In: *Annual review of phytopathology* 47, S. 423–445. DOI: 10.1146/annurev-phyto-080508-081923.
- Brendza, R. P.; Serbus, L. R.; Duffy, J. B.; Saxton, W. M. (2000): A function for kinesin I in the posterior transport of oskar mRNA and Stauf protein. In: *Science* 289 (5487), S. 2120–2122.
- Brion, J. P.; Guillemot, J.; Couchie, D.; Flament-Durand, J.; Nunez, J. (1988): Both adult and juvenile tau microtubule-associated proteins are axon specific in the developing and adult rat cerebellum. In: *Neuroscience* 25 (1), S. 139–146.
- Brocard, Cécile; Hartig, Andreas (2006): Peroxisome targeting signal 1: is it really a simple tripeptide? In: *Biochimica et biophysica acta* 1763 (12), S. 1565–1573. DOI: 10.1016/j.bbamcr.2006.08.022.
- Brook, Matthew; McCracken, Lora; Reddington, James P.; Lu, Zhi-Liang; Morrice, Nicholas A.; Gray, Nicola K. (2012): The multifunctional poly(A)-binding protein (PABP) 1 is subject to extensive dynamic post-translational modification, which molecular modelling suggests plays an important role in co-ordinating its activities. In: *The Biochemical journal* 441 (3), S. 803–812. DOI: 10.1042/BJ20111474.
- Brown, Laura-Anne; Baker, Alison (2003): Peroxisome biogenesis and the role of protein import. In: *Journal of cellular and molecular medicine* 7 (4), S. 388–400. DOI: 10.1111/j.1582-4934.2003.tb00241.x.
- Brune, Christiane; Munchel, Sarah E.; Fischer, Nicole; Podtelejnikov, Alexandre V.; Weis, Karsten (2005): Yeast poly(A)-binding protein Pab1 shuttles between the nucleus and the cytoplasm and functions in mRNA export. In: *RNA (New York, N.Y.)* 11 (4), S. 517–531. DOI: 10.1261/rna.7291205.
- Buchan, J. Ross; Muhlrad, Denise; Parker, Roy (2008): P bodies promote stress granule assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. In: *The Journal of cell biology* 183 (3), S. 441–455. DOI: 10.1083/jcb.200807043.
- Bullock, Simon L.; Zicha, Daniel; Ish-Horowicz, David (2003): The *Drosophila* hairy RNA localization signal modulates the kinetics of cytoplasmic mRNA transport. In: *The EMBO journal* 22 (10), S. 2484–2494. DOI: 10.1093/emboj/cdg230.
- Buxbaum, Adina R.; Haimovich, Gal; Singer, Robert H. (2015): In the right place at the right time: visualizing and understanding mRNA localization. In: *Nature reviews. Molecular cell biology* 16 (2), S. 95–109. DOI: 10.1038/nrm3918.
- Caballero-Lima, David; Hautbergue, Guillaume M.; Wilson, Stuart A.; Sudbery, Peter E. (2014): In *Candida albicans* hyphae, Sec2p is physically associated with SEC2 mRNA on secretory vesicles. In: *Molecular microbiology* 94 (4), S. 828–842. DOI: 10.1111/mmi.12799.
- Camões, Fátima; Islinger, Markus; Guimarães, Sofia C.; Kilaru, Sreedhar; Schuster, Martin; Godinho, Luis F. et al. (2015): New insights into the peroxisomal protein inventory: Acyl-CoA oxidases and -dehydrogenases are an ancient feature of peroxisomes. In: *Biochimica et biophysica acta* 1853 (1), S. 111–125. DOI: 10.1016/j.bbamcr.2014.10.005.

- Castanheira, Sónia; Pérez-Martín, José (2015): Appressorium formation in the corn smut fungus *Ustilago maydis* requires a G2 cell cycle arrest. In: *Plant signaling & behavior* 10 (4), e1001227. DOI: 10.1080/15592324.2014.1001227.
- Castro, Inês G.; Schrader, Michael (2018): Miro1 – the missing link to peroxisome motility. In: *Communicative & integrative biology* 11 (4). DOI: 10.1080/19420889.2018.1526573.
- Chartrand, P.; Meng, X. H.; Singer, R. H.; Long, R. M. (1999): Structural elements required for the localization of ASH1 mRNA and of a green fluorescent protein reporter particle in vivo. In: *Current biology : CB* 9 (6), S. 333–336.
- Chekanova, Julia A.; Abruzzi, Katharine C.; Rosbash, Michael; Belostotsky, Dmitry A. (2008): Sus1, Sac3, and Thp1 mediate post-transcriptional tethering of active genes to the nuclear rim as well as to non-nascent mRNP. In: *RNA* 14 (1), S. 66–77. DOI: 10.1261/rna.764108.
- Cioni, Jean-Michel; Lin, Julie Qiaojin; Holtermann, Anne V.; Koppers, Max; Jakobs, Maximilian A. H.; Azizi, Afnan et al. (2019): Late Endosomes Act as mRNA Translation Platforms and Sustain Mitochondria in Axons. In: *Cell* 176 (1-2), 56-72.e15. DOI: 10.1016/j.cell.2018.11.030.
- Ciosk, Rafal; DePalma, Michael; Priess, James R. (2004): ATX-2, the *C. elegans* ortholog of ataxin 2, functions in translational regulation in the germline. In: *Development (Cambridge, England)* 131 (19), S. 4831–4841. DOI: 10.1242/dev.01352.
- Cohen, S. N.; Chang, A. C.; Hsu, L. (1972): Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 69 (8), S. 2110–2114. DOI: 10.1073/pnas.69.8.2110.
- Collart, Martine A. (2016): The Ccr4-Not complex is a key regulator of eukaryotic gene expression. In: *Wiley interdisciplinary reviews. RNA* 7 (4), S. 438–454. DOI: 10.1002/wrna.1332.
- Cosma, Maria Pia (2004): Daughter-specific repression of *Saccharomyces cerevisiae* HO: Ash1 is the commander. In: *EMBO reports* 5 (10), S. 953–957. DOI: 10.1038/sj.embor.7400251.
- Costa, Christopher J.; Willis, Dianna E. (2018): To the end of the line: Axonal mRNA transport and local translation in health and neurodegenerative disease. In: *Developmental Neurobiology* 78 (3), S. 209–220. DOI: 10.1002/dneu.22555.
- Derrick, Christopher J.; Weil, Timothy T. (2017): Translational control of *gurken* mRNA in *Drosophila* development. In: *Cell cycle (Georgetown, Tex.)* 16 (1), S. 23–32. DOI: 10.1080/15384101.2016.1250048.
- Deshler, J. O. (1997): Localization of *Xenopus* Vg1 mRNA by Vera Protein and the Endoplasmic Reticulum. In: *Science* 276 (5315), S. 1128–1131. DOI: 10.1126/science.276.5315.1128.
- Di Liegro, Carlo Maria; Schiera, Gabriella; Di Liegro, Italia (2014): Regulation of mRNA transport, localization and translation in the nervous system of mammals (Review). In:

International journal of molecular medicine 33 (4), S. 747–762. DOI: 10.3892/ijmm.2014.1629.

Dienstbier, Martin; Boehl, Florian; Li, Xuan; Bullock, Simon L. (2009): Egalitarian is a selective RNA-binding protein linking mRNA localization signals to the dynein motor. In: *Genes & development* 23 (13), S. 1546–1558. DOI: 10.1101/gad.531009.

Distel et al. (1996): A unified nomenclature for peroxisome biogenesis factors. In: *The Journal of cell biology* 135 (1), S. 1–3.

Drinnenberg, Ines A.; Fink, Gerald R.; Bartel, David P. (2011): Compatibility with killer explains the rise of RNAi-deficient fungi. In: *Science (New York, N.Y.)* 333 (6049), S. 1592. DOI: 10.1126/science.1209575.

Dubois, Evelyne; Scherens, Bart; Vierendeels, Fabienne; Ho, Melisa M. W.; Messenguy, Francine; Shears, Stephen B. (2002): In *Saccharomyces cerevisiae*, the inositol polyphosphate kinase activity of Kcs1p is required for resistance to salt stress, cell wall integrity, and vacuolar morphogenesis. In: *The Journal of biological chemistry* 277 (26), S. 23755–23763. DOI: 10.1074/jbc.M202206200.

Edelmann, Franziska Theresia; Schlundt, Andreas; Heym, Roland Gerhard; Jenner, Andreas; Niedner-Boblenz, Annika; Syed, Muhammad Ibrahim et al. (2017): Molecular architecture and dynamics of ASH1 mRNA recognition by its mRNA-transport complex. In: *Nature structural & molecular biology* 24 (2), S. 152–161. DOI: 10.1038/nsmb.3351.

Edgar, Ron; Domrachev, Michael; Lash, Alex E. (2002): Gene Expression Omnibus: NCBI gene expression and hybridization array data repository. In: *Nucleic acids research* 30 (1), S. 207–210. DOI: 10.1093/nar/30.1.207.

Elson, Sarah L.; Noble, Suzanne M.; Solis, Norma V.; Filler, Scott G.; Johnson, Alexander D. (2009): An RNA transport system in *Candida albicans* regulates hyphal morphology and invasive growth. In: *PLoS genetics* 5 (9), e1000664. DOI: 10.1371/journal.pgen.1000664.

Estrada, Paula; Kim, Jiwon; Coleman, Jeff; Walker, Lee; Dunn, Brian; Takizawa, Peter et al. (2003): Myo4p and She3p are required for cortical ER inheritance in *Saccharomyces cerevisiae*. In: *The Journal of cell biology* 163 (6), S. 1255–1266. DOI: 10.1083/jcb.200304030.

Eulalio, Ana; Tritschler, Felix; Izaurralde, Elisa (2009): The GW182 protein family in animal cells: new insights into domains required for miRNA-mediated gene silencing. In: *RNA (New York, N.Y.)* 15 (8), S. 1433–1442. DOI: 10.1261/rna.1703809.

Evans, Richard D.; Robinson, Christopher; Briggs, Deborah A.; Tooth, David J.; Ramalho, Jose S.; Cantero, Marta et al. (2014): Myosin-Va and Dynamic Actin Oppose Microtubules to Drive Long-Range Organelle Transport. In: *Current Biology* 24 (15), S. 1743–1750. DOI: 10.1016/j.cub.2014.06.019.

Fabian, Marc R.; Mathonnet, Géraldine; Sundermeier, Thomas; Mathys, Hansruedi; Zipprich, Jakob T.; Svitkin, Yuri V. et al. (2009): Mammalian miRNA RISC recruits CAF1 and PABP to affect PABP-dependent deadenylation. In: *Molecular cell* 35 (6), S. 868–880. DOI: 10.1016/j.molcel.2009.08.004.

- Feldbrügge, Michael; Zarnack, Kathi; Vollmeister, Evelyn; Baumann, Sebastian; Koepke, Janine; König, Julian et al. (2008): The posttranscriptional machinery of *Ustilago maydis*. In: *Fungal genetics and biology : FG & B* 45 Suppl 1, S40-6. DOI: 10.1016/j.fgb.2008.03.013.
- Fink, Gero; Steinberg, Gero (2006): Dynein-dependent motility of microtubules and nucleation sites supports polarization of the tubulin array in the fungus *Ustilago maydis*. In: *MBoC* 17 (7), S. 3242–3253. DOI: 10.1091/mbc.e05-12-1118.
- Fischer, Tamás; Strässer, Katja; Rácz, Attila; Rodriguez-Navarro, Susana; Oppizzi, Marisa; Ihrig, Petra et al. (2002): The mRNA export machinery requires the novel Sac3p–Thp1p complex to dock at the nucleoplasmic entrance of the nuclear pores. In: *The EMBO journal* 21 (21), S. 5843–5852. DOI: 10.1093/emboj/cdf590.
- Freitag, Johannes; Lanver, Daniel; Böhmer, Christian; Schink, Kay Oliver; Bölker, Michael; Sandrock, Björn (2011): Septation of infectious hyphae is critical for appressoria formation and virulence in the smut fungus *Ustilago maydis*. In: *PLoS pathogens* 7 (5), e1002044. DOI: 10.1371/journal.ppat.1002044.
- Fuchs et al. (2005): Microtubules Are Dispensable for the Initial Pathogenic Development but Required for Long-Distance Hyphal Growth in the Corn Smut Fungus *Ustilago maydis*. In: *Molecular Biology of the Cell* (Vol. 16, June), S. 2746–2758. Online verfügbar unter <http://www.molbiolcell.org/cgi/doi/10.1091/mbc.E05-03-0176>.
- Fukui, Kenji; Kuramitsu, Seiki (2011): Structure and Function of the Small MutS-Related Domain. In: *Molecular biology international* 2011, S. 691735. DOI: 10.4061/2011/691735.
- Funakoshi, Yuji; Doi, Yusuke; Hosoda, Nao; Uchida, Naoyuki; Osawa, Masanori; Shimada, Ichio et al. (2007): Mechanism of mRNA deadenylation: evidence for a molecular interplay between translation termination factor eRF3 and mRNA deadenylases. In: *Genes & development* 21 (23), S. 3135–3148. DOI: 10.1101/gad.1597707.
- Gabaldón, Toni (2010): Peroxisome diversity and evolution. In: *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 365 (1541), S. 765–773. DOI: 10.1098/rstb.2009.0240.
- García-Muse, Tatiana; Steinberg, Gero; Pérez-Martín, José (2003): Pheromone-induced G2 arrest in the phytopathogenic fungus *Ustilago maydis*. In: *Eukaryotic cell* 2 (3), S. 494–500. DOI: 10.1128/ec.2.3.494-500.2003.
- Geisberg, Joseph V.; Moqtaderi, Zarnik; Fan, Xiaochun; Oszolak, Fatih; Struhl, Kevin (2014): Global analysis of mRNA isoform half-lives reveals stabilizing and destabilizing elements in yeast. In: *Cell* 156 (4), S. 812–824. DOI: 10.1016/j.cell.2013.12.026.
- Gennerich, Arne; Vale, Ronald D. (2009): Walking the walk: how kinesin and dynein coordinate their steps. In: *Current opinion in cell biology* 21 (1), S. 59–67. DOI: 10.1016/j.ceb.2008.12.002.
- Giaever, Guri; Chu, Angela M.; Ni, Li; Connelly, Carla; Riles, Linda; Véronneau, Steeve et al. (2002): Functional profiling of the *Saccharomyces cerevisiae* genome. In: *Nature* 418 (6896), S. 387. DOI: 10.1038/nature00935.

- Gillissen, B.; Bergemann, J.; Sandmann, C.; Schroeer, B.; Bölker, M.; Kahmann, R. (1992): A two-component regulatory system for self/non-self recognition in *Ustilago maydis*. In: *Cell* 68 (4), S. 647–657.
- Glisovic, Tina; Bachorik, Jennifer L.; Yong, Jeongsik; Dreyfuss, Gideon (2008): RNA-binding proteins and post-transcriptional gene regulation. In: *FEBS letters* 582 (14), S. 1977–1986. DOI: 10.1016/j.febslet.2008.03.004.
- Gold, S. E.; Brogdon, S. M.; Mayorga, M. E.; Kronstad, J. W. (1997): The *Ustilago maydis* regulatory subunit of a cAMP-dependent protein kinase is required for gall formation in maize. In: *The Plant cell* 9 (9), S. 1585–1594. DOI: 10.1105/tpc.9.9.1585.
- Gorgoni, Barbara; Gray, Nicola K. (2004): The roles of cytoplasmic poly(A)-binding proteins in regulating gene expression: a developmental perspective. In: *Briefings in functional genomics & proteomics* 3 (2), S. 125–141. DOI: 10.1093/bfgp/3.2.125.
- Groemping, Yvonne; Lapouge, Karine; Smerdon, Stephen J.; Rittinger, Katrin (2003): Molecular basis of phosphorylation-induced activation of the NADPH oxidase. In: *Cell* 113 (3), S. 343–355.
- Gu, Wei; Deng, Yingfeng; Zenklusen, Daniel; Singer, Robert H. (2004): A new yeast PUF family protein, Puf6p, represses *ASH1* mRNA translation and is required for its localization. In: *Genes & development* 18 (12), S. 1452–1465. DOI: 10.1101/gad.1189004.
- Guild, G. M.; Connelly, P. S.; Shaw, M. K.; Tilney, L. G. (1997): Actin filament cables in *Drosophila* nurse cells are composed of modules that slide passively past one another during dumping. In: *The Journal of cell biology* 138 (4), S. 783–797. DOI: 10.1083/jcb.138.4.783.
- Guimaraes, Sofia C.; Schuster, Martin; Bielska, Ewa; Dagdas, Gulay; Kilaru, Sreedhar; Meadows, Ben R. A. et al. (2015): Peroxisomes, lipid droplets, and endoplasmic reticulum "hitchhike" on motile early endosomes. In: *The Journal of cell biology* 211 (5), S. 945–954. DOI: 10.1083/jcb.201505086.
- Gupta, Kamlesh; Bishop, Jamie; Peck, Austin; Brown, Julie; Wilson, Leslie; Panda, Dulal (2004): Antimitotic antifungal compound benomyl inhibits brain microtubule polymerization and dynamics and cancer cell proliferation at mitosis, by binding to a novel site in tubulin. In: *Biochemistry* 43 (21), S. 6645–6655. DOI: 10.1021/bi036112v.
- Haag, Carl; Pohlmann, Thomas; Feldbrügge, Michael (2017): The ESCRT regulator Did2 maintains the balance between long-distance endosomal transport and endocytic trafficking. In: *PLoS genetics* 13 (4), e1006734. DOI: 10.1371/journal.pgen.1006734.
- Haag, Carl; Steuten, Benedikt; Feldbrügge, Michael (2015): Membrane-Coupled mRNA Trafficking in Fungi. In: *Annual review of microbiology* 69, S. 265–281. DOI: 10.1146/annurev-micro-091014-104242.
- Haarer, B. K.; Petzold, A.; Lillie, S. H.; Brown, S. S. (1994): Identification of *MYO4*, a second class V myosin gene in yeast. In: *Journal of cell science* 107 (Pt 4), S. 1055–1064.
- Hardwick, Steven W.; Chan, Vivian S. Y.; Broadhurst, R. William; Luisi, Ben F. (2011): An RNA degradosome assembly in *Caulobacter crescentus*. In: *Nucleic acids research* 39 (4), S. 1449–1459. DOI: 10.1093/nar/gkq928.

- Hentze, Matthias W.; Castello, Alfredo; Schwarzl, Thomas; Preiss, Thomas (2018): A brave new world of RNA-binding proteins. In: *Nature reviews. Molecular cell biology* 19 (5), S. 327–341. DOI: 10.1038/nrm.2017.130.
- Higuchi, Yujiro; Ashwin, Peter; Roger, Yvonne; Steinberg, Gero (2014): Early endosome motility spatially organizes polysome distribution. In: *The Journal of cell biology* 204 (3), S. 343–357. DOI: 10.1083/jcb.201307164.
- Hoepfner, D.; van den Berg, M.; Philippsen, P.; Tabak, H. F.; Hettema, E. H. (2001): A role for Vps1p, actin, and the Myo2p motor in peroxisome abundance and inheritance in *Saccharomyces cerevisiae*. In: *The Journal of cell biology* 155 (6), S. 979–990. DOI: 10.1083/jcb.200107028.
- Hogan, Daniel J.; Riordan, Daniel P.; Gerber, André P.; Herschlag, Daniel; Brown, Patrick O. (2008): Diverse RNA-binding proteins interact with functionally related sets of RNAs, suggesting an extensive regulatory system. In: *PLoS biology* 6 (10), e255. DOI: 10.1371/journal.pbio.0060255.
- Hohfeld, J.; Veenhuis, M.; Kunau, W. H. (1991): PAS3, a *Saccharomyces cerevisiae* gene encoding a peroxisomal integral membrane protein essential for peroxisome biogenesis. In: *The Journal of cell biology* 114 (6), S. 1167–1178. DOI: 10.1083/jcb.114.6.1167.
- Holliday, Robert (1964): THE INDUCTION OF MITOTIC RECOMBINATION BY MITOMYCIN C IN *USTILAGO* AND *SACCHAROMYCES*. In: *Genetics* 50, S. 323–335.
- Holt, Christine E.; Bullock, Simon L. (2009): Subcellular mRNA localization in animal cells and why it matters. In: *Science (New York, N.Y.)* 326 (5957), S. 1212–1216. DOI: 10.1126/science.1176488.
- Horst, Robin J.; Doehlemann, Gunther; Wahl, Ramon; Hofmann, Jörg; Schmiedl, Alfred; Kahmann, Regine et al. (2010): *Ustilago maydis* infection strongly alters organic nitrogen allocation in maize and stimulates productivity of systemic source leaves. In: *Plant physiology* 152 (1), S. 293–308. DOI: 10.1104/pp.109.147702.
- Hosoda, Nao; Kobayashi, Tetsuo; Uchida, Naoyuki; Funakoshi, Yuji; Kikuchi, Yoshiko; Hoshino, Shinichi; Katada, Toshiaki (2003): Translation termination factor eRF3 mediates mRNA decay through the regulation of deadenylation. In: *The Journal of biological chemistry* 278 (40), S. 38287–38291. DOI: 10.1074/jbc.C300300200.
- Huang, Kai-Lieh; Chadee, Amanda B.; Chen, Chyi-Ying A.; Zhang, Yueqiang; Shyu, Ann-Bin (2013): Phosphorylation at intrinsically disordered regions of PAM2 motif-containing proteins modulates their interactions with PABPC1 and influences mRNA fate. In: *RNA (New York, N.Y.)* 19 (3), S. 295–305. DOI: 10.1261/rna.037317.112.
- Huh, Won-Ki; Falvo, James V.; Gerke, Luke C.; Carroll, Adam S.; Howson, Russell W.; Weissman, Jonathan S.; O'Shea, Erin K. (2003): Global analysis of protein localization in budding yeast. In: *Nature* 425 (6959), S. 686–691. DOI: 10.1038/nature02026.
- Huntzinger, Eric; Braun, Joerg E.; Heimstädt, Susanne; Zekri, Latifa; Izaurralde, Elisa (2010): Two PABPC1-binding sites in GW182 proteins promote miRNA-mediated gene silencing. In: *The EMBO journal* 29 (24), S. 4146–4160. DOI: 10.1038/emboj.2010.274.

- Huotari, Jatta; Helenius, Ari (2011): Endosome maturation. In: *The EMBO journal* 30 (17), S. 3481–3500. DOI: 10.1038/emboj.2011.286.
- Huynh, Duong P.; Yang, Hai-Tao; Vakharia, Hema; Nguyen, Dung; Pulst, Stefan M. (2003): Expansion of the polyQ repeat in ataxin-2 alters its Golgi localization, disrupts the Golgi complex and causes cell death. In: *Human molecular genetics* 12 (13), S. 1485–1496. DOI: 10.1093/hmg/ddg175.
- Inglis, Diane O.; Johnson, Alexander D. (2002): Ash1 protein, an asymmetrically localized transcriptional regulator, controls filamentous growth and virulence of *Candida albicans*. In: *Molecular and cellular biology* 22 (24), S. 8669–8680. DOI: 10.1128/mcb.22.24.8669-8680.2002.
- Irion, Uwe; St Johnston, Daniel (2007): bicoid RNA localization requires specific binding of an endosomal sorting complex. In: *Nature* 445 (7127), S. 554–558. DOI: 10.1038/nature05503.
- Irvine, R. F.; Schell, M. J. (2001): Back in the water: the return of the inositol phosphates. In: *Nature reviews. Molecular cell biology* 2 (5), S. 327–338. DOI: 10.1038/35073015.
- Ivanov, Alexandr; Mikhailova, Tatyana; Eliseev, Boris; Yeramala, Lahari; Sokolova, Elizaveta; Susorov, Denis et al. (2016): PABP enhances release factor recruitment and stop codon recognition during translation termination. In: *Nucleic Acids Res* 44 (16), S. 7766–7776. DOI: 10.1093/nar/gkw635.
- Jambhekar, Ashwini; Derisi, Joseph L. (2007): Cis-acting determinants of asymmetric, cytoplasmic RNA transport. In: *RNA (New York, N.Y.)* 13 (5), S. 625–642. DOI: 10.1261/rna.262607.
- Jambor, Helena; Brunel, Christine; Ephrussi, Anne (2011): Dimerization of oskar 3' UTRs promotes hitchhiking for RNA localization in the *Drosophila* oocyte. In: *RNA (New York, N.Y.)* 17 (12), S. 2049–2057. DOI: 10.1261/rna.2686411.
- James, P.; Halladay, J.; Craig, E. A. (1996): Genomic libraries and a host strain designed for highly efficient two-hybrid selection in yeast. In: *Genetics* 144 (4), S. 1425–1436.
- Jeffery, W. R. (1989): Requirement of cell division for muscle actin expression in the primary muscle cell lineage of ascidian embryos. In: *Development (Cambridge, England)* 105 (1), S. 75–84.
- Jeibmann, Astrid; Paulus, Werner (2009): *Drosophila melanogaster* as a model organism of brain diseases. In: *International journal of molecular sciences* 10 (2), S. 407–440. DOI: 10.3390/ijms10020407.
- Jenny, A.; Minvielle-Sebastia, L.; Preker, P. J.; Keller, W. (1996): Sequence similarity between the 73-kilodalton protein of mammalian CPSF and a subunit of yeast polyadenylation factor I. In: *Science* 274 (5292), S. 1514–1517.
- Jiménez-López, Domingo; Bravo, Jaime; Guzmán, Plinio (2015): Evolutionary history exposes radical diversification among classes of interaction partners of the MLLE domain of plant poly(A)-binding proteins. In: *BMC Evolutionary Biology* 15 (1), S. 195. DOI: 10.1186/s12862-015-0475-1.

- Jinek, Martin; Fabian, Marc R.; Coyle, Scott M.; Sonenberg, Nahum; Doudna, Jennifer A. (2010): Structural insights into the human GW182-PABC interaction in microRNA-mediated deadenylation. In: *Nature structural & molecular biology* 17 (2), S. 238–240. DOI: 10.1038/nsmb.1768.
- Jovic, Marko; Sharma, Mahak; Rahajeng, Juliati; Caplan, Steve (2010): The early endosome: a busy sorting station for proteins at the crossroads. In: *Histology and histopathology* 25 (1), S. 99–112. DOI: 10.14670/HH-25.99.
- Juárez-Montiel, Margarita; Romero-Maldonado, Andrea; Monreal-Escalante, Elizabeth; Becerra-Flora, Alicia; Korban, Schuyler S.; Rosales-Mendoza, Sergio; Jiménez-Bremont, Juan Francisco (2015): The Corn Smut ('Huitlacoche') as a New Platform for Oral Vaccines. In: *PLoS one* 10 (7), e0133535. DOI: 10.1371/journal.pone.0133535.
- Kahmann, Regine; Kämper, Jörg (2004): Ustilago maydis: how its biology relates to pathogenic development. In: *New Phytologist* 164 (1), S. 31–42. DOI: 10.1111/j.1469-8137.2004.01156.x.
- Kämper, J. (2004): A PCR-based system for highly efficient generation of gene replacement mutants in Ustilago maydis. In: *Molecular genetics and genomics : MGG* 271 (1), S. 103–110. DOI: 10.1007/s00438-003-0962-8.
- Kämper, J.; Reichmann, M.; Romeis, T.; Böcker, M.; Kahmann, R. (1995): Multiallelic recognition: nonself-dependent dimerization of the bE and bW homeodomain proteins in Ustilago maydis. In: *Cell* 81 (1), S. 73–83.
- Kämper, Jörg; Kahmann, Regine; Böcker, Michael; Ma, Li-Jun; Brefort, Thomas; Saville, Barry J. et al. (2006): Insights from the genome of the biotrophic fungal plant pathogen Ustilago maydis. In: *Nature* 444 (7115), S. 97–101. DOI: 10.1038/nature05248.
- Karim, Muhammad M.; Svitkin, Yuri V.; Kahvejian, Avak; Crescenzo, Gregory de; Costa-Mattioli, Mauro; Sonenberg, Nahum (2006): A mechanism of translational repression by competition of Paip2 with eIF4G for poly(A) binding protein (PABP) binding. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103 (25), S. 9494–9499. DOI: 10.1073/pnas.0603701103.
- Karki, S.; Holzbaaur, E. L. (1999): Cytoplasmic dynein and dynactin in cell division and intracellular transport. In: *Current opinion in cell biology* 11 (1), S. 45–53.
- Katzenellenbogen, Rachel A.; Vliet-Gregg, Portia; Xu, Mei; Galloway, Denise A. (2010): Cytoplasmic poly(A) binding proteins regulate telomerase activity and cell growth in human papillomavirus type 16 E6-expressing keratinocytes. In: *Journal of virology* 84 (24), S. 12934–12944. DOI: 10.1128/JVI.01377-10.
- Kellner, Nikola; Heimel, Kai; Obhof, Theresa; Finkernagel, Florian; Kämper, Jörg (2014): The SPF27 homologue Num1 connects splicing and kinesin 1-dependent cytoplasmic trafficking in Ustilago maydis. In: *PLoS genetics* 10 (1), e1004046. DOI: 10.1371/journal.pgen.1004046.
- Kellner, Ronny; Vollmeister, Evelyn; Feldbrügge, Michael; Begerow, Dominik (2011): Interspecific sex in grass smuts and the genetic diversity of their pheromone-receptor system. In: *PLoS genetics* 7 (12), e1002436. DOI: 10.1371/journal.pgen.1002436.

- Khaleghpour, K.; Svitkin, Y. V.; Craig, A. W.; DeMaria, C. T.; Deo, R. C.; Burley, S. K.; Sonenberg, N. (2001): Translational repression by a novel partner of human poly(A) binding protein, Paip2. In: *Molecular cell* 7 (1), S. 205–216.
- Kilmartin, J. V. (1981): Purification of yeast tubulin by self-assembly in vitro. In: *Biochemistry* 20 (12), S. 3629–3633. DOI: 10.1021/bi00515a050.
- Kim, Dae in; Jensen, Samuel C.; Noble, Kyle A.; Kc, Birendra; Roux, Kenneth H.; Motamedchaboki, Khatereh; Roux, Kyle J. (2016): An improved smaller biotin ligase for BioID proximity labeling. In: *Molecular Biology of the Cell* 27 (8), S. 1188–1196. DOI: 10.1091/mbc.E15-12-0844.
- Kim-Ha, J.; Smith, J. L.; Macdonald, P. M. (1991): oskar mRNA is localized to the posterior pole of the Drosophila oocyte. In: *Cell* 66 (1), S. 23–35.
- Klouwer, Femke C. C.; Berendse, Kevin; Ferdinandusse, Sacha; Wanders, Ronald J. A.; Engelen, Marc; Poll-The, Bwee Tien (2015): Zellweger spectrum disorders: clinical overview and management approach. In: *Orphanet journal of rare diseases* 10, S. 151. DOI: 10.1186/s13023-015-0368-9.
- Kojic, Milorad; Sutherland, Jeanette H.; Pérez-Martín, José; Holloman, William K. (2013): Initiation of meiotic recombination in *Ustilago maydis*. In: *Genetics* 195 (4), S. 1231–1240. DOI: 10.1534/genetics.113.156752.
- Kolattukudy, P. E.; Rogers, L. M.; Li, D.; Hwang, C. S.; Flaishman, M. A. (1995): Surface signaling in pathogenesis. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92 (10), S. 4080–4087. DOI: 10.1073/pnas.92.10.4080.
- König, Julian; Baumann, Sebastian; Koepke, Janine; Pohlmann, Thomas; Zarnack, Kathi; Feldbrügge, Michael (2009): The fungal RNA-binding protein Rrm4 mediates long-distance transport of ubi1 and rho3 mRNAs. In: *The EMBO journal* 28 (13), S. 1855–1866. DOI: 10.1038/emboj.2009.145.
- Kononenko, Artem V.; Mitkevich, Vladimir A.; Atkinson, Gemma C.; Tenson, Tanel; Dubovaya, Vera I.; Frolova, Ludmila Yu et al. (2010): GTP-dependent structural rearrangement of the eRF1:eRF3 complex and eRF3 sequence motifs essential for PABP binding. In: *Nucleic acids research* 38 (2), S. 548–558. DOI: 10.1093/nar/gkp908.
- Konopacki, Filip A.; Wong, Hovy Ho-Wai; Dwivedy, Asha; Bellon, Anaïs; Blower, Michael D.; Holt, Christine E. (2016): ESCRT-II controls retinal axon growth by regulating DCC receptor levels and local protein synthesis. In: *Open biology* 6 (4), S. 150218. DOI: 10.1098/rsob.150218.
- Kozlov, G.; Trempe, J. F.; Khaleghpour, K.; Kahvejian, A.; Ekiel, I.; Gehring, K. (2001): Structure and function of the C-terminal PABC domain of human poly(A)-binding protein. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98 (8), S. 4409–4413. DOI: 10.1073/pnas.071024998.
- Kozlov, Guennadi; Crescenzo, Gregory de; Lim, Nadia S.; Siddiqui, Nadeem; Fantus, Daniel; Kahvejian, Avak et al. (2004): Structural basis of ligand recognition by PABC, a highly specific peptide-binding domain found in poly(A)-binding protein and a HECT ubiquitin ligase. In: *The EMBO journal* 23 (2), S. 272–281. DOI: 10.1038/sj.emboj.7600048.

- Kruzel, Emilia K.; Hull, Christina M. (2010): Establishing an unusual cell type: how to make a dikaryon. In: *Current opinion in microbiology* 13 (6), S. 706–711. DOI: 10.1016/j.mib.2010.09.016.
- Kugler, Jan-Michael; Lasko, Paul (2009): Localization, anchoring and translational control of oskar, gurken, bicoid and nanos mRNA during *Drosophila* oogenesis. In: *Fly* 3 (1), S. 15–28. DOI: 10.4161/fly.3.1.7751.
- Kutateladze, Tatiana G. (2007): Mechanistic similarities in docking of the FYVE and PX domains to phosphatidylinositol 3-phosphate containing membranes. In: *Progress in lipid research* 46 (6), S. 315–327. DOI: 10.1016/j.plipres.2007.06.001.
- Laemmli, U. K. (1970): Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. In: *Nature* 227 (5259), S. 680–685. DOI: 10.1038/227680a0.
- Langner, Thorsten; Göhre, Vera (2016): Fungal chitinases: function, regulation, and potential roles in plant/pathogen interactions. In: *Current genetics* 62 (2), S. 243–254. DOI: 10.1007/s00294-015-0530-x.
- Langner, Thorsten; Öztürk, Merve; Hartmann, Sarah; Cord-Landwehr, Stefan; Moerschbacher, Bruno; Walton, Jonathan D.; Göhre, Vera (2015): Chitinases Are Essential for Cell Separation in *Ustilago maydis*. In: *Eukaryotic cell* 14 (9), S. 846–857. DOI: 10.1128/EC.00022-15.
- Lanver, Daniel; Mendoza-Mendoza, Artemio; Brachmann, Andreas; Kahmann, Regine (2010): Sho1 and Msb2-related proteins regulate appressorium development in the smut fungus *Ustilago maydis*. In: *The Plant cell* 22 (6), S. 2085–2101. DOI: 10.1105/tpc.109.073734.
- Larkin, M. A.; Blackshields, G.; Brown, N. P.; Chenna, R.; McGettigan, P. A.; McWilliam, H. et al. (2007): Clustal W and Clustal X version 2.0. In: *Bioinformatics (Oxford, England)* 23 (21), S. 2947–2948. DOI: 10.1093/bioinformatics/btm404.
- Lazzaretti, Daniela; Tournier, Isabelle; Izaurrealde, Elisa (2009): The C-terminal domains of human TNRC6A, TNRC6B, and TNRC6C silence bound transcripts independently of Argonaute proteins. In: *RNA (New York, N.Y.)* 15 (6), S. 1059–1066. DOI: 10.1261/rna.1606309.
- Le, H.; Chang, S. C.; Tanguay, R. L.; Gallie, D. R. (1997): The wheat poly(A)-binding protein functionally complements pab1 in yeast. In: *European journal of biochemistry* 243 (1-2), S. 350–357.
- Lebeau, Geneviève; Maher-Laporte, Marjolaine; Topolnik, Lisa; Laurent, Charles E.; Sossin, Wayne; DesGroseillers, Luc; Lacaille, Jean-Claude (2008): Stauf1 regulation of protein synthesis-dependent long-term potentiation and synaptic function in hippocampal pyramidal cells. In: *Molecular and cellular biology* 28 (9), S. 2896–2907. DOI: 10.1128/MCB.01844-07.
- Lécuyer, Eric; Yoshida, Hideki; Parthasarathy, Neela; Alm, Christina; Babak, Tomas; Cerovina, Tanja et al. (2007): Global analysis of mRNA localization reveals a prominent role in organizing cellular architecture and function. In: *Cell* 131 (1), S. 174–187. DOI: 10.1016/j.cell.2007.08.003.

- Letunic, Ivica; Bork, Peer (2018): 20 years of the SMART protein domain annotation resource. In: *Nucleic acids research* 46 (D1), D493-D496. DOI: 10.1093/nar/gkx922.
- Li, Nan; Mruk, Dolores D.; Cheng, C. Yan (2015): Actin binding proteins in blood-testis barrier function. In: *Current opinion in endocrinology, diabetes, and obesity* 22 (3), S. 238–247. DOI: 10.1097/MED.000000000000155.
- Lim, Chunghun; Allada, Ravi (2013): ATAXIN-2 activates PERIOD translation to sustain circadian rhythms in Drosophila. In: *Science (New York, N.Y.)* 340 (6134), S. 875–879. DOI: 10.1126/science.1234785.
- Long, R. M.; Gu, W.; Lorimer, E.; Singer, R. H.; Chartrand, P. (2000): She2p is a novel RNA-binding protein that recruits the Myo4p-She3p complex to ASH1 mRNA. In: *The EMBO journal* 19 (23), S. 6592–6601. DOI: 10.1093/emboj/19.23.6592.
- Lunde, Bradley M.; Moore, Claire; Varani, Gabriele (2007): RNA-binding proteins: modular design for efficient function. In: *Nature reviews. Molecular cell biology* 8 (6), S. 479–490. DOI: 10.1038/nrm2178.
- Macdonald, Paul M. (2011): mRNA localization: assembly of transport complexes and their incorporation into particles. In: *Current opinion in genetics & development* 21 (4), S. 407–413. DOI: 10.1016/j.gde.2011.04.005.
- Maillet, L.; Tu, C.; Hong, Y. K.; Shuster, E. O.; Collart, M. A. (2000): The essential function of Not1 lies within the Ccr4-Not complex. In: *Journal of molecular biology* 303 (2), S. 131–143. DOI: 10.1006/jmbi.2000.4131.
- Mangus, D. A.; Amrani, N.; Jacobson, A. (1998): Pbp1p, a factor interacting with *Saccharomyces cerevisiae* poly(A)-binding protein, regulates polyadenylation. In: *Molecular and cellular biology* 18 (12), S. 7383–7396. DOI: 10.1128/mcb.18.12.7383.
- Mangus, David A.; Evans, Matthew C.; Jacobson, Allan (2003): Poly(A)-binding proteins: multifunctional scaffolds for the post-transcriptional control of gene expression. In: *Genome biology* 4 (7), S. 223. DOI: 10.1186/gb-2003-4-7-223.
- Marchler-Bauer, Aron; Anderson, John B.; Chitsaz, Farideh; Derbyshire, Myra K.; DeWeese-Scott, Carol; Fong, Jessica H. et al. (2009): CDD: specific functional annotation with the Conserved Domain Database. In: *Nucleic acids research* 37 (Database issue), D205-10. DOI: 10.1093/nar/gkn845.
- Marchler-Bauer, Aron; Derbyshire, Myra K.; Gonzales, Noreen R.; Lu, Shennan; Chitsaz, Farideh; Geer, Lewis Y. et al. (2015): CDD: NCBI's conserved domain database. In: *Nucleic acids research* 43 (Database issue), D222-6. DOI: 10.1093/nar/gku1221.
- Marchler-Bauer, Aron; Lu, Shennan; Anderson, John B.; Chitsaz, Farideh; Derbyshire, Myra K.; DeWeese-Scott, Carol et al. (2011): CDD: a Conserved Domain Database for the functional annotation of proteins. In: *Nucleic acids research* 39 (Database issue), D225-9. DOI: 10.1093/nar/gkq1189.
- Martin, Kelsey C.; Ephrussi, Anne (2009): mRNA localization: gene expression in the spatial dimension. In: *Cell* 136 (4), S. 719–730. DOI: 10.1016/j.cell.2009.01.044.

- Matei, Alexandra; Doehlemann, Gunther (2016): Cell biology of corn smut disease-*Ustilago maydis* as a model for biotrophic interactions. In: *Current opinion in microbiology* 34, S. 60–66. DOI: 10.1016/j.mib.2016.07.020.
- Matsuzaki, Takashi; Fujiki, Yukio (2008): The peroxisomal membrane protein import receptor Pex3p is directly transported to peroxisomes by a novel Pex19p- and Pex16p-dependent pathway. In: *The Journal of cell biology* 183 (7), S. 1275–1286. DOI: 10.1083/jcb.200806062.
- Maxon, M. E.; Herskowitz, I. (2001): Ash1p is a site-specific DNA-binding protein that actively represses transcription. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98 (4), S. 1495–1500. DOI: 10.1073/pnas.98.4.1495.
- McClintock, Mark A.; Dix, Carly I.; Johnson, Christopher M.; McLaughlin, Stephen H.; Maizels, Rory J.; Hoang, Ha Thi; Bullock, Simon L. (2018): RNA-directed activation of cytoplasmic dynein-1 in reconstituted transport RNPs. In: *eLife* 7. DOI: 10.7554/eLife.36312.
- Medioni, Caroline; Mowry, Kimberly; Besse, Florence (2012): Principles and roles of mRNA localization in animal development. In: *Development (Cambridge, England)* 139 (18), S. 3263–3276. DOI: 10.1242/dev.078626.
- Melton, D. A. (1987): Translocation of a localized maternal mRNA to the vegetal pole of *Xenopus* oocytes. In: *Nature* 328 (6125), S. 80–82. DOI: 10.1038/328080a0.
- Mendez, Raul; Murthy, Kannenganti G.K.; Ryan, Kevin; Manley, James L.; Richter, Joel D. (2000): Phosphorylation of CPEB by Eg2 Mediates the Recruitment of CPSF into an Active Cytoplasmic Polyadenylation Complex. In: *Molecular cell* 6 (5), S. 1253–1259. DOI: 10.1016/S1097-2765(00)00121-0.
- Mendoza-Mendoza, Artemio; Eskova, Anastasia; Weise, Carolin; Czajkowski, Robert; Kahmann, Regine (2009): Hap2 regulates the pheromone response transcription factor prf1 in *Ustilago maydis*. In: *Molecular microbiology* 72 (3), S. 683–698. DOI: 10.1111/j.1365-2958.2009.06676.x.
- Miroci, Hatmone; Schob, Claudia; Kindler, Stefan; Ölschläger-Schütt, Janin; Fehr, Susanne; Jungenitz, Tassilo et al. (2012): Makorin ring zinc finger protein 1 (MKRN1), a novel poly(A)-binding protein-interacting protein, stimulates translation in nerve cells. In: *The Journal of biological chemistry* 287 (2), S. 1322–1334. DOI: 10.1074/jbc.M111.315291.
- Moore, Samantha; Järvelin, Aino I.; Davis, Ilan; Bond, Gareth L.; Castello, Alfredo (2018): Expanding horizons: new roles for non-canonical RNA-binding proteins in cancer. In: *Current opinion in genetics & development* 48, S. 112–120. DOI: 10.1016/j.gde.2017.11.006.
- Mowry (1996): Complex formation between stage-specific oocyte factors and a *Xenopus* mRNA localization element. In: *Developmental Biology* (Vol. 93), S. 14608–14613.
- Mowry, K. L.; Melton, D. A. (1992): Vegetal messenger RNA localization directed by a 340-nt RNA sequence element in *Xenopus* oocytes. In: *Science* 255 (5047), S. 991–994.
- Müller, Jessica; Pohlmann, Thomas; Feldbrügge, Michael (2019): Core components of endosomal mRNA transport are evolutionarily conserved in fungi. In: *Fungal genetics and biology : FG & B* 126, S. 12–16. DOI: 10.1016/j.fgb.2019.01.013.

- Müller, Marisa; Heym, Roland Gerhard; Mayer, Andreas; Kramer, Katharina; Schmid, Maria; Cramer, Patrick et al. (2011): A cytoplasmic complex mediates specific mRNA recognition and localization in yeast. In: *PLoS biology* 9 (4), e1000611. DOI: 10.1371/journal.pbio.1000611.
- Nicastro, Giuseppe; Candel, Adela M.; Uhl, Michael; Oregioni, Alain; Hollingworth, David; Backofen, Rolf et al. (2017): Mechanism of β -actin mRNA Recognition by ZBP1. In: *Cell Reports* 18 (5), S. 1187–1199. DOI: 10.1016/j.celrep.2016.12.091.
- Niedner, Annika; Müller, Marisa; Moorthy, Balaji T.; Jansen, Ralf-Peter; Niessing, Dierk (2013): Role of Loc1p in assembly and reorganization of nuclear ASH1 messenger ribonucleoprotein particles in yeast. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110 (52), E5049-58. DOI: 10.1073/pnas.1315289111.
- Niessing, Dierk; Jansen, Ralf-Peter; Pohlmann, Thomas; Feldbrügge, Michael (2017): mRNA transport in fungal top models. In: *Wiley interdisciplinary reviews. RNA* 9 (1). DOI: 10.1002/wrna.1453.
- Nonhoff, Ute; Ralser, Markus; Welzel, Franziska; Piccini, Ilaria; Balzereit, Daniela; Yaspo, Marie-Laure et al. (2007): Ataxin-2 interacts with the DEAD/H-box RNA helicase DDX6 and interferes with P-bodies and stress granules. In: *Molecular Biology of the Cell* 18 (4), S. 1385–1396. DOI: 10.1091/mbc.e06-12-1120.
- Olgeiser, Lilli; Haag, Carl; Boerner, Susan; Ule, Jernej; Busch, Anke; Koepke, Janine et al. (2019): The key protein of endosomal mRNP transport Rrm4 binds translational landmark sites of cargo mRNAs. In: *EMBO reports* 20 (1). DOI: 10.15252/embr.201846588.
- Osawa, Masanori; Hosoda, Nao; Nakanishi, Tamiji; Uchida, Naoyuki; Kimura, Tomomi; Imai, Shunsuke et al. (2012): Biological role of the two overlapping poly(A)-binding protein interacting motifs 2 (PAM2) of eukaryotic releasing factor eRF3 in mRNA decay. In: *RNA (New York, N.Y.)* 18 (11), S. 1957–1967. DOI: 10.1261/rna.035311.112.
- Palmer, Ella; Freeman, Tom (2004): Investigation into the use of C- and N-terminal GFP fusion proteins for subcellular localization studies using reverse transfection microarrays. In: *Comparative and functional genomics* 5 (4), S. 342–353. DOI: 10.1002/cfg.405.
- Paquin, Nicolas; Ménade, Marie; Poirier, Guillaume; Donato, Damiane; Drouet, Emmanuel; Chartrand, Pascal (2007): Local activation of yeast ASH1 mRNA translation through phosphorylation of Khd1p by the casein kinase Yck1p. In: *Molecular cell* 26 (6), S. 795–809. DOI: 10.1016/j.molcel.2007.05.016.
- Plemel, Rachael L.; Lobingier, Braden T.; Brett, Christopher L.; Angers, Cortney G.; Nickerson, Daniel P.; Paulsel, Andrew et al. (2011): Subunit organization and Rab interactions of Vps-C protein complexes that control endolysosomal membrane traffic. In: *MBoC* 22 (8), S. 1353–1363. DOI: 10.1091/mbc.E10-03-0260.
- Pohlmann, Thomas; Baumann, Sebastian; Haag, Carl; Albrecht, Mario; Feldbrügge, Michael (2015): A FYVE zinc finger domain protein specifically links mRNA transport to endosome trafficking. In: *eLife* 4. DOI: 10.7554/eLife.06041.

- Poirier, Yves; Antonenkov, Vasily D.; Glumoff, Tuomo; Hiltunen, J. Kalervo (2006): Peroxisomal beta-oxidation--a metabolic pathway with multiple functions. In: *Biochimica et biophysica acta* 1763 (12), S. 1413–1426. DOI: 10.1016/j.bbamcr.2006.08.034.
- Pollard, Thomas D. (2016): Actin and Actin-Binding Proteins. In: *Cold Spring Harb Perspect Biol* 8 (8), a018226. DOI: 10.1101/cshperspect.a018226.
- Porro, Danilo; Vai, Marina; Vanoni, Marco; Alberghina, Lilia; Hatzis, Christos (2009): Analysis and modeling of growing budding yeast populations at the single cell level. In: *Cytometry. Part A : the journal of the International Society for Analytical Cytology* 75 (2), S. 114–120. DOI: 10.1002/cyto.a.20689.
- Poulton, John S.; Deng, Wu-Min (2007): Cell-cell communication and axis specification in the *Drosophila* oocyte. In: *Developmental Biology* 311 (1), S. 1–10. DOI: 10.1016/j.ydbio.2007.08.030.
- Ramanathan, Muthukumar; Porter, Douglas F.; Khavari, Paul A. (2019): Methods to study RNA-protein interactions. In: *Nature methods* 16 (3), S. 225–234. DOI: 10.1038/s41592-019-0330-1.
- Rathinasamy, K.; Panda, D. (2006): Suppression of microtubule dynamics by benomyl decreases tension across kinetochore pairs and induces apoptosis in cancer cells. In: *The FEBS journal* 273 (17), S. 4114–4128. DOI: 10.1111/j.1742-4658.2006.05413.x.
- Rehwinkel, Jan; Herold, Andrea; Gari, Kerstin; Köcher, Thomas; Rode, Michaela; Ciccarelli, Francesca L. et al. (2004): Genome-wide analysis of mRNAs regulated by the THO complex in *Drosophila melanogaster*. In: *Nature structural & molecular biology* 11 (6), S. 558–566. DOI: 10.1038/nsmb759.
- Renicke, Christian; Schuster, Daniel; Usherenko, Svetlana; Essen, Lars-Oliver; Taxis, Christof (2013): A LOV2 Domain-Based Optogenetic Tool to Control Protein Degradation and Cellular Function. In: *Chemistry & Biology* 20 (4), S. 619–626. DOI: 10.1016/j.chembiol.2013.03.005.
- Rink, Jochen; Ghigo, Eric; Kalaidzidis, Yannis; Zerial, Marino (2005): Rab conversion as a mechanism of progression from early to late endosomes. In: *Cell* 122 (5), S. 735–749. DOI: 10.1016/j.cell.2005.06.043.
- Roque, Sylvain; Cerciat, Marie; Gaugué, Isabelle; Mora, Liliana; Floch, Aurélie G.; Zamaroczy, Miklos de et al. (2015): Interaction between the poly(A)-binding protein Pab1 and the eukaryotic release factor eRF3 regulates translation termination but not mRNA decay in *Saccharomyces cerevisiae*. In: *RNA (New York, N.Y.)* 21 (1), S. 124–134. DOI: 10.1261/rna.047282.114.
- Roux, Kyle J.; Kim, Dae in; Burke, Brian (2013): BioID: a screen for protein-protein interactions. In: *Current protocols in protein science* 74, Unit 19.23. DOI: 10.1002/0471140864.ps1923s74.
- Ruan, Lin; Osawa, Masanori; Hosoda, Nao; Imai, Shunsuke; Machiyama, Asako; Katada, Toshiaki et al. (2010): Quantitative characterization of Tob interactions provides the thermodynamic basis for translation termination-coupled deadenylase regulation. In: *The Journal of biological chemistry* 285 (36), S. 27624–27631. DOI: 10.1074/jbc.M110.138867.

- Salogiannis, John; Egan, Martin J.; Reck-Peterson, Samara L. (2016): Peroxisomes move by hitchhiking on early endosomes using the novel linker protein PxdA. In: *The Journal of cell biology* 212 (3), S. 289–296. DOI: 10.1083/jcb.201512020.
- Salogiannis, John; Reck-Peterson, Samara L. (2017): Hitchhiking: A Non-Canonical Mode of Microtubule-Based Transport. In: *Trends in cell biology* 27 (2), S. 141–150. DOI: 10.1016/j.tcb.2016.09.005.
- Sanghavi, Paulomi; Liu, Guojun; Veeranan-Karmegam, Rajalakshmi; Navarro, Caryn; Gonsalvez, Graydon B. (2016): Multiple Roles for Egalitarian in Polarization of the Drosophila Egg Chamber. In: *Genetics* 203 (1), S. 415–432. DOI: 10.1534/genetics.115.184622.
- Sarkari, Parveen; Reindl, Michèle; Stock, Janpeter; Müller, Olaf; Kahmann, Regine; Feldbrügge, Michael; Schipper, Kerstin (2014): Improved expression of single-chain antibodies in *Ustilago maydis*. In: *Journal of biotechnology* 191, S. 165–175. DOI: 10.1016/j.jbiotec.2014.06.028.
- Sato, Yasuhiko; Shibata, Hiroyuki; Nakano, Hiroaki; Matsuzono, Yuji; Kashiwayama, Yoshinori; Kobayashi, Yuji et al. (2008): Characterization of the interaction between recombinant human peroxin Pex3p and Pex19p: identification of TRP-104 IN Pex3p as a critical residue for the interaction. In: *The Journal of biological chemistry* 283 (10), S. 6136–6144. DOI: 10.1074/jbc.M706139200.
- Satterfield, Terrence F.; Pallanck, Leo J. (2006): Ataxin-2 and its Drosophila homolog, ATX2, physically assemble with polyribosomes. In: *Human molecular genetics* 15 (16), S. 2523–2532. DOI: 10.1093/hmg/ddl173.
- Saville; Donaldson; Doyle (2012): Investigating Host Induced Meiosis in a Fungal Plant Pathogen. In: Andrew Swan (Hg.): Meiosis. Molecular mechanisms and cytogenetic diversity. Rijeka, Croatia: InTech. Online verfügbar unter DOI: 10.5772/30032.
- Scherer, Mario; Heimel, Kai; Starke, Verena; Kämper, Jörg (2006): The Clp1 protein is required for clamp formation and pathogenic development of *Ustilago maydis*. In: *The Plant cell* 18 (9), S. 2388–2401. DOI: 10.1105/tpc.106.043521.
- Schultz, J.; Milpetz, F.; Bork, P.; Ponting, C. P. (1998): SMART, a simple modular architecture research tool: identification of signaling domains. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95 (11), S. 5857–5864. DOI: 10.1073/pnas.95.11.5857.
- Schulz, B.; Banuett, F.; Dahl, M.; Schlesinger, R.; Schäfer, W.; Martin, T. et al. (1990): The b alleles of *U. maydis*, whose combinations program pathogenic development, code for polypeptides containing a homeodomain-related motif. In: *Cell* 60 (2), S. 295–306.
- Schuster, Martin; Lipowsky, Reinhard; Assmann, Marcus-Alexander; Lenz, Peter; Steinberg, Gero (2011): Transient binding of dynein controls bidirectional long-range motility of early endosomes. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108 (9), S. 3618–3623. DOI: 10.1073/pnas.1015839108.
- Shav-Tal, Yaron; Singer, Robert H. (2005): RNA localization. In: *Journal of cell science* 118 (Pt 18), S. 4077–4081. DOI: 10.1242/jcs.02543.

- Shoji, Jun-ya; Arioka, Manabu; Kitamoto, Katsuhiko (2006): Vacuolar membrane dynamics in the filamentous fungus *Aspergillus oryzae*. In: *Eukaryotic cell* 5 (2), S. 411–421. DOI: 10.1128/EC.5.2.411-421.2006.
- Siddiqui, Nadeem; Mangus, David A.; Chang, Tsung-Cheng; Palermino, Jeanne-Marie; Shyu, Ann-Bin; Gehring, Kalle (2007): Poly(A) nuclease interacts with the C-terminal domain of polyadenylate-binding protein domain from poly(A)-binding protein. In: *The Journal of biological chemistry* 282 (34), S. 25067–25075. DOI: 10.1074/jbc.M701256200.
- Singh, Guramrit; Pratt, Gabriel; Yeo, Gene W.; Moore, Melissa J. (2015): The Clothes Make the mRNA: Past and Present Trends in mRNP Fashion. In: *Annual review of biochemistry* 84, S. 325–354. DOI: 10.1146/annurev-biochem-080111-092106.
- Song, Yuyu; Brady, Scott T. (2015): Post-translational modifications of tubulin: pathways to functional diversity of microtubules. In: *Trends in cell biology* 25 (3), S. 125–136. DOI: 10.1016/j.tcb.2014.10.004.
- Spellig, T.; Bölker, M.; Lottspeich, F.; Frank, R. W.; Kahmann, R. (1994): Pheromones trigger filamentous growth in *Ustilago maydis*. In: *The EMBO journal* 13 (7), S. 1620–1627.
- St Johnston, Daniel (2005): Moving messages: the intracellular localization of mRNAs. In: *Nature reviews. Molecular cell biology* 6 (5), S. 363–375. DOI: 10.1038/nrm1643.
- States, D. J.; Gish, W. (1994): Combined use of sequence similarity and codon bias for coding region identification. In: *Journal of computational biology : a journal of computational molecular cell biology* 1 (1), S. 39–50. DOI: 10.1089/cmb.1994.1.39.
- Steinberg, G.; Schliwa, M.; Lehmler, C.; Bölker, M.; Kahmann, R.; McIntosh, J. R. (1998): Kinesin from the plant pathogenic fungus *Ustilago maydis* is involved in vacuole formation and cytoplasmic migration. In: *Journal of cell science* 111 (Pt 15), S. 2235–2246.
- Steinberg, Gero (2007): Tracks for traffic: microtubules in the plant pathogen *Ustilago maydis*. In: *The New phytologist* 174 (4), S. 721–733. DOI: 10.1111/j.1469-8137.2007.02072.x.
- Stock, Janpeter; Sarkari, Parveen; Kreibich, Saskia; Brefort, Thomas; Feldbrügge, Michael; Schipper, Kerstin (2012): Applying unconventional secretion of the endochitinase Cts1 to export heterologous proteins in *Ustilago maydis*. In: *Journal of biotechnology* 161 (2), S. 80–91. DOI: 10.1016/j.jbiotec.2012.03.004.
- Strathern, J. N.; Herskowitz, I. (1979): Asymmetry and directionality in production of new cell types during clonal growth: the switching pattern of homothallic yeast. In: *Cell* 17 (2), S. 371–381.
- Takizawa, P. A.; Vale, R. D. (2000): The myosin motor, Myo4p, binds Ash1 mRNA via the adapter protein, She3p. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97 (10), S. 5273–5278. DOI: 10.1073/pnas.080585897.
- Terfrüchte, Marius; Joehnk, Bastian; Fajardo-Somera, Rosa; Braus, Gerhard H.; Riquelme, Meritxell; Schipper, Kerstin; Feldbrügge, Michael (2014): Establishing a versatile Golden Gate cloning system for genetic engineering in fungi. In: *Fungal genetics and biology : FG & B* 62, S. 1–10. DOI: 10.1016/j.fgb.2013.10.012.

- Terfrüchte, Marius; Reindl, Michèle; Jankowski, Silke; Sarkari, Parveen; Feldbrügge, Michael; Schipper, Kerstin (2017): Applying Unconventional Secretion in *Ustilago maydis* for the Export of Functional Nanobodies. In: *International journal of molecular sciences* 18 (5). DOI: 10.3390/ijms18050937.
- Terfrüchte, Marius; Wewetzer, Sandra; Sarkari, Parveen; Stollewerk, Daniel; Franz-Wachtel, Mirita; Macek, Boris et al. (2018): Tackling destructive proteolysis of unconventionally secreted heterologous proteins in *Ustilago maydis*. In: *Journal of biotechnology* 284, S. 37–51. DOI: 10.1016/j.jbiotec.2018.07.035.
- Thomas Pohlmann (2013): Die Rolle von PAM2-Proteinen während des endosomalen mRNA-Transports in *Ustilago maydis*. Dissertation.
- Titus, Margaret A. (2018): Myosin-Driven Intracellular Transport. In: *Cold Spring Harb Perspect Biol* 10 (3), a021972. DOI: 10.1101/cshperspect.a021972.
- Tomek, Wolfgang; Wollenhaupt, Karin (2012): The "closed loop model" in controlling mRNA translation during development. In: *Animal reproduction science* 134 (1-2), S. 2–8. DOI: 10.1016/j.anireprosci.2012.08.005.
- Tsang, Brian; Arsenault, Jason; Vernon, Robert M.; Lin, Hong; Sonenberg, Nahum; Wang, Lu-Yang et al. (2019): Phosphoregulated FMRP phase separation models activity-dependent translation through bidirectional control of mRNA granule formation. In: *PNAS* 116 (10), S. 4218–4227. DOI: 10.1073/pnas.1814385116.
- Uchida, Naoyuki; Hoshino, Shin-ichi; Katada, Toshiaki (2004): Identification of a Human Cytoplasmic Poly(A) Nuclease Complex Stimulated by Poly(A)-binding Protein. In: *J. Biol. Chem.* 279 (2), S. 1383–1391. DOI: 10.1074/jbc.M309125200.
- Vazquez-Pianzola, Paula; Schaller, Bogdan; Colombo, Martino; Beuchle, Dirk; Neuenschwander, Samuel; Marcil, Anne et al. (2017): The mRNA transportome of the BicD/Egl transport machinery. In: *RNA biology* 14 (1), S. 73–89. DOI: 10.1080/15476286.2016.1251542.
- Verhey, Kristen J.; Gaertig, Jacek (2007): The tubulin code. In: *Cell cycle (Georgetown, Tex.)* 6 (17), S. 2152–2160. DOI: 10.4161/cc.6.17.4633.
- Verhey, Kristen J.; Hammond, Jennetta W. (2009): Traffic control: regulation of kinesin motors. In: *Nature reviews. Molecular cell biology* 10 (11), S. 765–777. DOI: 10.1038/nrm2782.
- Vida, T. A.; Emr, S. D. (1995): A new vital stain for visualizing vacuolar membrane dynamics and endocytosis in yeast. In: *The Journal of cell biology* 128 (5), S. 779–792. DOI: 10.1083/jcb.128.5.779.
- Vollmeister, Evelyn; Schipper, Kerstin; Baumann, Sebastian; Haag, Carl; Pohlmann, Thomas; Stock, Janpeter; Feldbrügge, Michael (2012a): Fungal development of the plant pathogen *Ustilago maydis*. In: *FEMS microbiology reviews* 36 (1), S. 59–77. DOI: 10.1111/j.1574-6976.2011.00296.x.

- Vollmeister, Evelyn; Schipper, Kerstin; Feldbrügge, Michael (2012b): Microtubule-dependent mRNA transport in the model microorganism *Ustilago maydis*. In: *RNA biology* 9 (3), S. 261–268. DOI: 10.4161/rna.19432.
- Wahle, Elmar; Winkler, G. Sebastiaan (2013): RNA decay machines: deadenylation by the Ccr4-not and Pan2-Pan3 complexes. In: *Biochimica et biophysica acta* 1829 (6-7), S. 561–570. DOI: 10.1016/j.bbagr.2013.01.003.
- Wandinger-Ness, Angela; Zerial, Marino (2014): Rab proteins and the compartmentalization of the endosomal system. In: *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 6 (11), a022616. DOI: 10.1101/cshperspect.a022616.
- Wang, J.; Holden, D. W.; Leong, S. A. (1988): Gene transfer system for the phytopathogenic fungus *Ustilago maydis*. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 85 (3), S. 865–869. DOI: 10.1073/pnas.85.3.865.
- Wang, Ming-Dong; Gomes, James; Cashman, Neil R.; Little, Julian; Krewski, Daniel (2014): Intermediate CAG repeat expansion in the ATXN2 gene is a unique genetic risk factor for ALS—a systematic review and meta-analysis of observational studies. In: *PLoS one* 9 (8), e105534. DOI: 10.1371/journal.pone.0105534.
- Waterham, Hans R.; Ebberink, Merel S. (2012): Genetics and molecular basis of human peroxisome biogenesis disorders. In: *Biochimica et biophysica acta* 1822 (9), S. 1430–1441. DOI: 10.1016/j.bbadis.2012.04.006.
- Watts, Felicity Z.; Baldock, Robert; Jongjitwimol, Jirapas; Morley, Simon J. (2014): Weighing up the possibilities: Controlling translation by ubiquitylation and sumoylation. In: *Translation (Austin, Tex.)* 2 (2), e959366. DOI: 10.4161/2169074X.2014.959366.
- Wedlich-Söldner, Roland; Schulz, Irene; Straube, Anne; Steinberg, Gero (2002): Dynein supports motility of endoplasmic reticulum in the fungus *Ustilago maydis*. In: *MBoC* 13 (3), S. 965–977. DOI: 10.1091/mbc.01-10-0475.
- Weil, Timothy T. (2014): mRNA localization in the *Drosophila* germline. In: *RNA biology* 11 (8), S. 1010–1018. DOI: 10.4161/rna.36097.
- Wittmann, Torsten; Hyman, Anthony; Desai, Arshad (2001): The spindle: a dynamic assembly of microtubules and motors. In: *Nature cell biology* 3 (1), E28. DOI: 10.1038/35050669.
- Wu et al. (1998): CPEB-Mediated Cytoplasmic Polyadenylation and the Regulation of Experience-Dependent Translation of α -CaMKII mRNA at Synapses. In: *Neuron* (Vol. 21), S. 1129–1139.
- Xie, Jingwei; Kozlov, Guennadi; Gehring, Kalle (2014): The "tale" of poly(A) binding protein: the MLL domain and PAM2-containing proteins. In: *Biochimica et biophysica acta* 1839 (11), S. 1062–1068. DOI: 10.1016/j.bbagr.2014.08.001.
- Yang, Na; Yu, Zhenyu; Hu, Menglong; Wang, Mingzhu; Lehmann, Ruth; Xu, Rui-Ming (2015): Structure of *Drosophila* Oskar reveals a novel RNA binding protein. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 112 (37), S. 11541–11546. DOI: 10.1073/pnas.1515568112.

- York, J. D.; Odom, A. R.; Murphy, R.; Ives, E. B.; Wente, S. R. (1999): A phospholipase C-dependent inositol polyphosphate kinase pathway required for efficient messenger RNA export. In: *Science (New York, N.Y.)* 285 (5424), S. 96–100. DOI: 10.1126/science.285.5424.96.
- Zander, Sabrina; Baumann, Sebastian; Weidtkamp-Peters, Stefanie; Feldbrügge, Michael (2016): Endosomal assembly and transport of heteromeric septin complexes promote septin cytoskeleton formation. In: *Journal of cell science* 129 (14), S. 2778–2792. DOI: 10.1242/jcs.182824.
- Zappulo, Alessandra; van den Bruck, David; Ciolli Mattioli, Camilla; Franke, Vedran; Imami, Koshi; McShane, Erik et al. (2017): RNA localization is a key determinant of neurite-enriched proteome. In: *Nature communications* 8 (1), S. 583. DOI: 10.1038/s41467-017-00690-6.
- Zarnack, Kathi; Feldbrügge, Michael (2010): Microtubule-dependent mRNA transport in fungi. In: *Eukaryotic cell* 9 (7), S. 982–990. DOI: 10.1128/EC.00030-10.
- Zekri, Latifa; Huntzinger, Eric; Heimstädt, Susanne; Izaurralde, Elisa (2009): The silencing domain of GW182 interacts with PABPC1 to promote translational repression and degradation of microRNA targets and is required for target release. In: *Molecular and cellular biology* 29 (23), S. 6220–6231. DOI: 10.1128/MCB.01081-09.
- Zhou, Lu; Obhof, Theresa; Schneider, Karina; Feldbrügge, Michael; Nienhaus, G. Ulrich; Kämper, Jörg (2018): Cytoplasmic Transport Machinery of the SPF27 Homologue Num1 in *Ustilago maydis*. In: *Scientific reports* 8 (1), S. 3611. DOI: 10.1038/s41598-018-21628-y.
- Zimyanin, Vitaly L.; Belaya, Katsiaryna; Pecreaux, Jacques; Gilchrist, Michael J.; Clark, Alejandra; Davis, Ilan; St Johnston, Daniel (2008): In vivo imaging of oskar mRNA transport reveals the mechanism of posterior localization. In: *Cell* 134 (5), S. 843–853. DOI: 10.1016/j.cell.2008.06.053.

Danksagung

Zunächst möchte ich mich bei Michael für die Bereitstellung des interessanten Themas und seine Unterstützung während meiner Zeit bei RabLab bedanken, sowie für spannende Mexiko-Reisen, sehr viel Kritik, aber auch Ideen und Diskussionen.

Frau Prof. Dr. Ursula Nicole Fleig danke ich ausdrücklich für die Annahme des Zweitgutachtens.

Ein großes Danke geht an Kira, die seit Jahren meinen Laborzwilling darstellt und es in Zukunft hoffentlich (auch unabhängig vom Labor) bleiben wird! Unsere Sessions auf der Terrasse und unsere gemeinsamen Unternehmungen haben mir stets den Alltag versüßt. Ich werde für dich immer eine Flasche Weißwein im Kühlschrank stehen haben!

Ebenso geht ein großer Dank an Thomas, der für mich als Upa2-Papa stets erleuchtende Worte übrig hatte und eine enorme Hilfe für alle Silke-typischen „Versteh ich nicht“-Momente darstellte. Danke für deine Unterstützung und für die witzige Zeit in unserem Büro!

Natürlich möchte ich auch allen anderen aktuellen und verflissenen Feldis danken, und ich glaube, ich könnte hier zu fast jeder Person eine längere Passage einfügen. Also sage ich einfach: Danke euch allen für eine schöne Zeit im Institut, für Hilfsbereitschaft an allen Ecken und Enden, für all die witzigen Aktionen und diverse Feierabend-Bierchen, sowie für das häufige Lachen!

Ein Danke geht auch an meine Freunde, insbesondere an Nino, die mich schon seit meiner Bachelorarbeit durchs Leben begleitet (Uffтата!), sowie an Klobert und Nicoccus für ihre Hilfe und Zuspruch, sowie Pizza-Abende und Schabernack-Touren!

Zuletzt möchte ich meiner Familie für ihre ständige Unterstützung und Hilfe in allen Lebenslagen danken! Ihr seid toll und ich hätte das Alles ohne euch nicht geschafft! Danke für das Ertragen von Fragen wie „Schorsch macht komische Geräusche, was soll ich tun?“ oder „Was will diese Versicherung jetzt von mir?“, und für die immerwährenden Aufmunterungen, wenn mal wieder was schief gelaufen ist!