

Transkriptomweite Identifizierung von
Ziel-Transkripten des endosomalen mRNPs
mittels iCLIP in *Ustilago maydis*

Inaugural-Dissertation

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

vorgelegt von

Lilli Olgeiser
aus Saran

Düsseldorf, Oktober 2019

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

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

Referent: Prof. Dr. Michael Feldbrügge

Korreferent: Prof. Dr. Heiner Schaal

Tag der mündlichen Prüfung: 24. Januar 2020

Eidesstattliche Erklärung

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

Ort, Datum

Unterschrift

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht in:

Lilli Olgeiser, Carl Haag, Susan Boerner, Jernej Ule, Anke Busch, Janine Koepke, Julian König, Michael Feldbrügge, and Kathi Zarnack (2019) The key protein of endosomal mRNA transport Rrm4 binds translational landmark sites of cargo mRNAs. *EMBO Rep* 20.

Die Untersuchungen zur vorliegenden Arbeit wurden von Dezember 2012 bis Dezember 2017 in Düsseldorf an der Heinrich-Heine-Universität in dem Institut für Mikrobiologie unter der Betreuung von Herrn Prof. Dr. Michael Feldbrügge durchgeführt.

Zusammenfassung

RNA-bindende Proteine (RBPs) sind an der zeitlichen und räumlichen Regulation der Genexpression beteiligt, in dem sie u. a. den mRNA Transport und die lokale Translation posttranskriptionell kontrollieren. Im phytopathogenen Pilz *Ustilago maydis* ist der morphologische Wechsel vom hefeartigen zum hyphalen und unipolaren Wachstum Voraussetzung für eine erfolgreiche Infektion der Wirtspflanze. Die Etablierung und Aufrechterhaltung des unipolaren Hyphenwachstums hängt vom Mikrotubuli-vermittelten endosomalen Langstreckentransport der mRNAs ab. Die Schlüsselrolle spielt bei diesem Prozess das RBP Rrm4. Der Verlust von *rrm4* führt zur Reduktion des hyphalen Wachstums und damit einhergehend zu einer verminderten Virulenz. Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es die mRNAs, die von Rrm4 und von dem putativen Rrm4 Interaktionspartner, Grp1B, gebunden werden, mit Hilfe der iCLIP (*individual nucleotide resolution in vivo UV-crosslinking and immunoprecipitation*) Methode zu identifizieren. Zusätzlich sollte Grp1B als Rrm4 Interaktionspartner bestätigt und charakterisiert werden.

Die Charakterisierung von Grp1B zeigte, dass Grp1B wichtig für beide Wachstumsformen ist und an einer Vielzahl biologischer Prozesse beteiligt ist. Grp1B wird für die Koordination des Längenwachstums benötigt und ist involviert in der Kälte- und Zellwandstressantwort. Kolokalisationsstudien zeigten, dass Rrm4 und Grp1B auf sich bewegenden Endosomen kolokalisieren. Dabei zeigte sich, dass die endosomale Lokalisation von Grp1B von den mRNAs abhängt die von Rrm4 gebunden wurden. Im Vergleich zu Rrm4, das eine Kernkomponente des endosomalen mRNPs ist, wurde Grp1B somit als akzessorische Komponente des Rrm4-vermittelten mRNA Transports klassifiziert.

Für die Ermittlung der mRNAs wurde die iCLIP Methode verwendet. Das optimierte iCLIP Protokoll ermöglichte die transkriptomweite Identifizierung der Transkripte die von den beiden endosomalen RBPs, Rrm4 und Grp1B, gebunden werden. Die vergleichende Analyse zeigte, dass beide RBPs gemeinsam eine Vielzahl funktionell diverser mRNAs binden. Die ermittelten mRNAs kodieren z. B. für mitochondriale Proteine, für Proteine des Membran-assoziierten Transports sowie Proteine des Zytoskeletts. Diese funktionelle Vielzahl zeigt, dass der Rrm4-vermittelte mRNA Transport eine globale Rolle in der *U. maydis* Hyphe einnimmt. Entsprechend der nukleärzytoplasmatischen Lokalisation von Grp1B wurden für Grp1B Ziel-mRNAs identifiziert, die für Zellkernproteine kodieren. Beide RBPs binden einen großen Teil der mRNAs gemeinsam und zwar bevorzugt in der 3' UTR. Die hohe Auflösung der iCLIP Daten zeigte, dass Rrm4, anders als Grp1B, spezifische Transkripte am Startkodon, im ORF und/oder am Stoppkodon bindet, was auf eine regulatorische Funktion der Translation während des endosomalen Transports hindeutet. Im Gegensatz zu Grp1B konnte für Rrm4 das Bindemotiv UAUG identifiziert werden, welches im ORF angereichert vorliegt und vermutlich von der dritten RRM Domäne erkannt wird.

Die Ergebnisse dieser Arbeit geben zum ersten Mal einen umfangreichen Einblick in die Organisation zweier RBPs eines endosomalen mRNPs und deuten auf eine enge Verbindung zwischen mRNA Transport und Translation hin.

Summary

RNA-binding proteins (RBPs) participate in spatial and temporal gene regulation by controlling mRNA transport and local translation. A prerequisite for infection of a host plant by the phytopathogenic fungus *Ustilago maydis* is the morphological switch from yeast-like to unipolar hyphal growth. Microtubule-dependent endosomal long distance mRNA transport was shown to be crucial for the establishment and maintenance of filamentation and polar growth. The key component of this transport process is the RBP Rrm4. Loss of *rrm4* leads to impaired hyphal growth and thus reduced virulence. The goal of this thesis was to identify those mRNAs which are bound by Rrm4 as well as by a putative Rrm4 interacting partner, Grp1B, using the iCLIP (*individual nucleotide resolution in vivo UV-crosslinking and immunoprecipitation*) method. An additional aim was the confirmation of Grp1B as a Rrm4 interacting partner and the characterization of Grp1B.

The characterization of Grp1B revealed that Grp1B is important for yeast and hyphal growth and is involved in a multitude of biological processes. Grp1B is crucial for the coordination of the correct cell size and is involved in cold as well as cell wall stress response. Co-localization studies showed that Rrm4 and Grp1B co-localize on moving endosomes, whereas the localization of Grp1B depends on the ability of Rrm4 to bind mRNAs. In comparison to Rrm4, which is a core component of endosomal mRNPs, Grp1B was classified as an accessory component of Rrm4-mediated mRNA transport.

The iCLIP technique was used to identify the target mRNAs. Using the improved iCLIP protocol, it was possible to identify the target transcripts of the endosomal RBPs, Rrm4 and Grp1B, at a transcriptome wide level. The iCLIP data shows that both endosomal RBPs bind numerous target mRNAs encode for a multitude of functionally diverse proteins, such as mitochondrial proteins and proteins associated with membrane transport and cytoskeleton. This functional diversity implicates that Rrm4-mediated mRNA transport plays a global role in *U. maydis* hyphae. In accordance with the nucleo-cytoplasmic localization of Grp1B, target mRNAs were identified within the iCLIP data, which are responsible for encoding the nuclear proteins. Both RBPs bind a large number of shared cargo transcripts, predominantly in the 3' UTR. Unlike Grp1B, Rrm4 binds at start codon, in the ORF and/or at stop codon, implicating involvement of translational regulation during endosomal transport. Furthermore, a binding motif UAUG was found to be enriched in the ORF and required for the interaction with the third RRM domain of Rrm4.

The results of this thesis provide for the first time a comprehensive insight into the organization of two RBPs of endosomal mRNPs and implicate a close link between mRNA transport and translation.

Abkürzungen und Fachbegriffe

AK	Antikörper	MS	Massenspektrometer
Amp	Ampicillin	MUMDB	MIPS Ustilago maydis DataBase
ARE	AU-reiches Element	ncRNA	non-coding RNA
ATP	Adenosintriphosphat	N-terminal	Aminoterminal
bp	Basenpaar(e)	Nt	Nukleotid
BS	Bindestelle	OD	Optische Dichte
°C	Grad Celsius	ORF	open reading frame (offener Leserahmen)
C-terminal	Carboxyterminal	PAR-CLIP	Photoaktivatable ribonucleoside-enhanced CLIP
CFW	Calcofour white	PCR	polymerase chain reaction
CLIP	in vivo UV-crosslinking immunoprecipitation	PNK	Polynukleotidkinase
CR	Congored	QE	Quervernetzungsereignis
DNA	deoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)	RBD	RNA-bindende Domäne
DIC	differential interference contrast (Differentialinterferenzkontrast)	RBP	RNA-bindendes Protein (RNA-bindendes Protein)
DIGE	differential gel electrophoresis	RFU	relative fluorescence unit(s)
ELAV	embryonic lethal, abnormal vision	RIP	RNA-Immunopräzipitation
eGfp	(enhanced) green fluorescent protein	RNA	ribonucleic acid (Ribonukleinsäure)
HITS-CLIP	high throughput sequencing CLIP	rRNA	ribosomale RNA
iCLIP	individual nucleotide resolution	Rpm	rounds per minute
kDa	Kilodalton	RRM	RNA recognition motif
KH	hnRNP K-homology	RT	Raumtemperatur
l	Liter	s	Sekunde
LE	Lokalisationselement	SELEX	systematic evolution of ligands by exponential enrichment
min	Minute	TAP	Tandem affinity purification
ml	Milliliter	TEV	Tobacco etch virus
MLLE	Mademoiselle-Domäne	U	Unit(s)
mM	Mikromolar	UTR	untranslated region
µl	Mikroliter	UV	Ultraviolett
µm	Mikrometer	v/v	Volumenprozent
mRNA	messenger RNA (Boten-RNA)	w/v	Gewichtsprozent
mRNP	Messenger Ribonukleoproteine	WT	Wildtyp

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	i
Summary	ii
Abkürzungen und Fachbegriffe.....	3
1. Einleitung	1
1.1. mRNA Transport und lokale Translation.....	1
1.1.1 Aktin-abhängiger mRNA Transport in <i>S. cerevisiae</i>	2
1.1.2. Mikrotubuli-abhängiger mRNA Transport	2
1.1.2.1 mRNA Transport in <i>D. melanogaster</i>	3
1.1.2.2 mRNA Transport in Neuronen	4
1.2. RNA-bindende Proteine	5
1.2.1 RNA-bindende Domänen	7
1.2.2 Interaktion zwischen RBPs und mRNAs	7
1.2.3 Glyzin-reiche RNA-bindende Proteine	8
1.3. Endosomaler mRNA Transport in <i>Ustilago maydis</i>	11
1.3.1 Modellorganismus <i>Ustilago maydis</i>	11
1.3.2. Endosomaler Transport entlang des Mikrotubuli-Zytoskeletts in <i>U. maydis</i>	13
1.3.2.1 Rrm4-abhängiger mRNA Transport in <i>U. maydis</i>	14
1.3.2.2 Aufbau des Rrm4-abhängigen mRNP.....	15
1.4. <i>Individual nucleotide resolution in vivo UV-crosslinking and immunoprecipitation</i>	17
1.5 Zielsetzung der Arbeit.....	20
2. Ergebnisse	21
2.1 Identifizierung des Glyzin/Glutamin-reichen RNA bindenden Proteins Grp1	21
2.2. Grp1B beeinflusst das Zellwachstum sowie die Stressantwort in <i>U. maydis</i>	22
2.2.1 Grp1B ist wichtig für das Wachstum von Sporidien	22
2.2.2 Phänotypische Analyse der <i>grp1</i> Deletion während des hyphalen Wachstums	25
2.2.3 Zellwandstress in <i>U. maydis</i> Hyphen	27
2.3 Grp1B ist eine neue Komponente des endosomalen Rrm4-abhängigen mRNP-Komplexes.....	28
2.3.1 Grp1B lokalisiert auf Endosomen, im Zytoplasma und im Zellkern.....	28
2.3.2 Grp1B und Rrm4 kolokalisieren auf identischen Endosomen	29
2.3.3 Die Lokalisation von Grp1B auf Endosomen ist abhängig von Rrm4.....	30
2.3.4 Die Interaktion zwischen Grp1B und Rrm4 wird über die gemeinsam gebundenen mRNAs vermittelt	30
2.4. Optimierung der iCLIP Methode in <i>Ustilago maydis</i>	32

2.4.1 Optimierung der Protein-Aufreinigung.....	34
2.4.2 Optimierung der Quervernetzungseffizienz	37
2.4 Isolierung der Ziel-mRNAs von Grp1B und Rrm4.....	39
2.5 Rrm4 und Grp1B binden mRNAs <i>in vivo</i>	41
2.5.1 Identifizierung der Rrm4 und Grp1B Bindestellen.....	43
2.5.2 Rrm4 und Grp1B binden funktional diverse mRNAs.....	45
2.5.3 Rrm4 und Grp1B binden bevorzugt die 3'UTR ihrer Ziel-mRNAs	48
2.5.4 Rrm4 bindet das Motiv UAUG.....	51
2.5.5 mRNAs der mitochondrialen F ₀ F ₁ ATPase Untereinheiten werden von Rrm4 gebunden.....	54
3. Diskussion	57
3.1. Optimierung der iCLIP Methode in <i>U. maydis</i>	57
3.1.1 Die Quervernetzungseffizienz ist proteinspezifisch.....	58
3.1.2 Die Aufreinigungsstrategie entscheidet über die Ausbeute der Protein-RNA Komplexe.....	59
3.2. Rrm4 und Grp1B binden ein breites Spektrum an funktional diversen mRNAs.....	59
3.2.1 Der Rrm4-vermittelter endosomaler mRNA Transport	60
3.2.2 Das Rrm4 Bindevverhalten und dessen Bedeutung für die posttranskriptionelle Regulation....	61
3.2.3 Rrm4 bindet transkriptional aktive mRNA Regionen.....	62
3.2.4 Rrm4 erkennt das Bindemotiv UAUG mit der dritten RRM3 Domäne	64
3.2.5 Grp1B bindet seine Ziel-Transkripte sequenzunspezifisch	66
3.2.6 Grp1B bindet mRNAs deren Translationsprodukte eine nukleäre Funktion haben	67
3.3. Grp1B ist ein multifunktionelles Protein in <i>U. maydis</i>	68
3.3.1 Grp1B und seine putative Beteiligung an der Regulation des Zellzykluses	69
3.3.2 Grp1B ist an der Kältestressantwort beteiligt.....	71
3.3.3 Grp1B beeinflusst die Zellwandintegrität	72
3.4 Modell zur Organisation des Rrm4-vermittelten endosomalen mRNA Transport	74
3.5 Ausblick	76
4. Material und Methoden.....	78
4.1. Material und Bezugsquellen	78
4.1.1 Chemikalien, Puffer, Lösungen, Medien, Enzyme und Kits.....	78
4.1.2 Oligonukleotide.....	82
4.1.3. Plasmide und Plasmidkonstruktionen	83
4.1.3.1 In dieser Arbeit verwendete Plasmide und Klonierungsvektoren	83
4.1.3.2 In dieser Arbeit hergestellte Plasmide.....	85

4.1.4 Stämme	87
4.1.5 Zentrifugen.....	88
4.2. Mikrobiologische, zellbiologische und genetische Methoden	88
4.2.1 Arbeiten mit <i>E. coli</i>	88
4.2.2 Arbeiten mit <i>Ustilago maydis</i>	90
4.3. Molekularbiologische Methoden.....	92
4.3.1 Isolierung von Nukleinsäuren	92
4.3.2 Arbeiten mit Nukleinsäuren.....	93
4.3.3 Polymerase Kettenreaktion (PCR).....	96
4.3.4 Auftrennung und Nachweis von Nukleinsäuren	96
4.3.5 Sequenzanalysen.....	99
4.4. Mikroskopie und Bildverarbeitung	99
4.4.1 Mikroskopaufbau und -Steuerung.....	99
4.4.2 Quantifizierung des Längenwachstums von <i>U. maydis</i>	100
4.4.3 Quantifizierung des Zellwanddefektes in Grp1-Deletionsmutanten	100
4.4.4 Quantifizierung von sich bewegenden Proteinen.....	101
4.4.5 Quantifizierung von kolokalisierenden Proteinen	101
4.4.6 Quantifizierung der Proteinverteilung in Abwesenheit von Rrm4	101
4.5. Biochemische Methoden	101
4.5.1 Proteinbiochemische Methoden	101
4.5.2 <i>Individual nucleotide resolution in vivo UV-crosslinking and immunoprecipitation</i> (iCLIP).....	106
4.6. Bioinformatische Analyse	114
4.6.1 Bioinformatische Analyse der iCLIP-Daten Prozessierung der iCLIP Banken.....	114
4.6.2 Verwendete Programme.....	116
5. Publikation	117
6. Literaturverzeichnis	118
7. Ergänzende Daten.....	131
8. Anhang	132
8.1 Bindung der Septin mRNAs durch Rrm4 und Grp1B.....	132
8.2 Rrm4 bindet spezifische Ziel-mRNAs am Stoppkodon und am Ende der 3'UTR	133
8.3 Grp1B bindet mRNAs die für Proteine des Zellzykluses und der Zellwand kodieren	133
8.4 Die Expression beider Grp1 Isoformen ist wichtig für das Wachstum von <i>U. maydis</i>	135
8.5 Die Expression beider Grp1 Isoformen ist wichtig für das Wachstum von <i>U. maydis</i>	136

Danksagung..... 137
Lebenslauf..... 138

1. Einleitung

1.1. mRNA Transport und lokale Translation

Die subzelluläre mRNA-Lokalisation zusammen mit einer kontrollierten Translation ermöglicht eine räumlich- und zeitlich-regulierte Proteinexpression. Diese ist wiederum eine Voraussetzung für die Zelldifferenzierung und –entwicklung, die asymmetrische Zellteilung und das polare Wachstum (Suter, 2018). Die mRNA-Lokalisation wurde bereits in zahlreichen Organismen, wie den Säugetieren, Insekten, Pilzen, Pflanzen und sogar Bakterien untersucht (Cody et al., 2013; Glock et al., 2017; Kanniah and Amster-Choder, 2014; Morris, 2018; Nevo-Dinur et al., 2012; Niessing et al., 2018). Die biologische Funktion der mRNA-Lokalisation hat einen weitreichenden Einfluss auf diverse zelluläre Prozesse. Dabei zeigte sich, dass der Prozess der mRNA-Lokalisation für viele verschiedene Transkripte und in unterschiedlichen Organismen genutzt wird. In Neuronen zum Beispiel findet die Proteinsortierung bevorzugt über die RNA-Lokalisation statt und dies trifft auf die Hälfte des Proteoms zu (Zappulo et al., 2017). In der Taufliege *Drosophila melanogaster* unterliegen während der frühen Embryonalentwicklung 71 % der über 3.000 untersuchten Transkripte der subzellulären Lokalisation (Lecuyer et al., 2007). Am besten untersucht ist hierbei die Etablierung der dorso-ventralen bzw. posterior-anterioren Polaritätsachse (Weil, 2014). In der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* lokalisieren viele mRNAs in der Nähe des Endoplasmatischen Retikulums (ERs), der Mitochondrien oder der Peroxisomen (Pizzinga and Ashe, 2014).

Darüber hinaus hat die Lokalisation der Transkripte viele Vorteile. Es ist für die Zelle energetisch günstiger einzelne RNA-Moleküle zu transportieren und nach Bedarf zahlreich am Zielort zu translätieren, anstatt jedes Protein einzeln zu befördern. Zusätzlich kann die Zelle so schneller und effizienter auf verschiedene Stimuli reagieren (Kejiou and Palazzo, 2017). Des Weiteren kann eine lokale Translation dazu dienen die Konzentration von bestimmten Proteinen ortsspezifisch zu erhöhen, wodurch auch die Assemblierung makromolekularer Komplexe begünstigt wird (Mingle et al., 2005; Zander et al., 2016).

Die mRNA kann auf unterschiedlichen Wegen subzellulär angereichert werden, wie zum Beispiel durch Diffusion und die anschließende Verankerung, durch die selektive Degradierung der mRNA oder durch den aktiven Transport entlang des Zytoskeletts (Martin and Ephrussi, 2009). Dabei kodiert die mRNA die Lokalisationsinformation in ihrer Sequenz. Diese *cis*-wirkenden Elemente werden als Lokalisationselemente (LE) oder „*zipcode*“ bezeichnet. LEs kommen überwiegend in der 3' untranslatierten Region (UTR) vor, sind aber auch in der 5'UTR und sogar im offenen Leserahmen (ORF; *open reading frame*) zu finden (Jambhekar and Derisi, 2007). Sie können unterschiedlich lang sein, von wenigen bis hin zu 1.000 Nukleotiden, und Sekundärstrukturen ausbilden (Jambhekar and Derisi, 2007). Die *cis*-wirkenden Elemente dienen als Plattform für RNA-bindende Proteine (RBPs), die die mRNA direkt oder über Adapterproteine an die Transportmaschinerie rekrutieren (Jambhekar and Derisi, 2007; Mofatteh and Bullock, 2017). Obwohl sich die einzelnen Komponenten der Transportmaschinerie unterscheiden können, sind die grundlegenden Transportprozesse hoch konserviert (Martin and Ephrussi, 2009; Vazquez-

Pianzola and Suter, 2012). Die treibende Kraft der Transportmaschinerie stellen Motorproteine aus den Familien der Myosine, Kinesine und Dyneine dar. Myosine sind für den Transport entlang des Aktin-Zytoskeletts verantwortlich. Kinesine und Dyneine transportieren die mRNPs entlang von Mikrotubulifilamenten (Bullock, 2007).

1.1.1 Aktin-abhängiger mRNA Transport in *S. cerevisiae*

Das am besten untersuchte Beispiel für mRNA Transport ist der *ASH1* mRNA Transport in der Bäckerhefe *S. cerevisiae*. In *S. cerevisiae* findet die asexuelle Vermehrung durch Knospung statt. Dabei entstehen eine große Mutterzelle und eine kleine Tochterzelle. Während der Zellteilung wird in der Tochterzelle der Paarungstypwechsel von dem Transkriptionsrepressor Ash1p inhibiert (Niessing et al., 2018). Dazu muss die *ASH1* mRNA von der Mutter- in die Tochterzelle transportiert werden. Die Maschinerie die für den Transport der *ASH1* mRNA entlang des Aktin-Zytoskeletts verantwortlich ist, wird als „Locasome“ bezeichnet (Abb. 1.1A; (Chartrand et al., 2001)). Das zugrundeliegende Prinzip des *ASH1* mRNA Transports ist die direkte Kopplung der mRNA über RBPs an Motorproteine, die das mRNP (*messenger Ribonukleoprotein*) entlang des Zytoskeletts transportieren. Die *ASH1* mRNA enthält insgesamt vier Lokalisationselemente, von denen drei im ORF und einer in der 3'UTR kodiert werden. Diese werden kotranskriptionell vom RBP She2p gebunden (Edelmann et al., 2017; Long et al., 2000). Im Zytoplasma interagiert She2p mit She3p, welches bereits in einem Komplex mit dem Motorprotein Myo4p (TypV Myosin) vorliegt, sodass das mRNP entlang des Aktin-Zytoskeletts in die Tochterzelle transportiert werden kann und dort verankert wird (Gonsalvez et al., 2004). Während des Transports wird die Translation der *ASH1* mRNA durch Puf6p und Khd1p inhibiert, um sicherzustellen, dass der Transkriptionsrepressor nur in der Tochterzelle aktiv ist (Gu et al., 2004). Sobald die mRNA in der Tochterzelle angekommen ist, werden Puf6p und Khd1p phosphoryliert und so deren Translation ermöglicht (Gu et al., 2004).

1.1.2. Mikrotubuli-abhängiger mRNA Transport

Neben dem Aktin-abhängigen mRNA Transport werden mRNAs auch entlang des Mikrotubuli-Zytoskeletts transportiert (Suter, 2018). Dieser Langstreckentransport spielt insbesondere während der Embryogenese, der Oogenese und in Neuronen von Metazoen sowie in filamentös auswachsenden Pilzen eine wichtige Rolle (Martin and Ephrussi, 2009; Vollmeister et al., 2012). Die beteiligten Motorproteine sind die zum Plusende hin gerichteten Kinesine und die zum Minusende hin gerichteten Dyneine (St Johnston, 2005). Ob das mRNP anterograd oder retrograd transportiert wird, ist abhängig vom Repertoire der Motorproteine (Bullock, 2011). Somit bestimmt die Anzahl der Motorproteine, die an die mRNPs gekoppelt sind, sowie die Ausrichtung des Zytoskeletts über die Transportrichtung.

1.1.2.1 mRNA Transport in *D. melanogaster*

Beispiele für den Mikrotubuli-abhängigen mRNA Transport lassen sich während der Oogenese von *D. melanogaster* finden. Die Körperachsen in *D. melanogaster* werden bereits während der Oogenese spezifiziert. Dabei spielt die Lokalisation der *oskar*, *bicoid* und *gurken* mRNAs eine entscheidende Rolle (Abb. 1.1B). Für die Etablierung der anterior-posterioren Polaritätsachse ist die posteriore Lokalisation der *oskar* mRNA und die anteriore Lokalisation der *bicoid* mRNA erforderlich. Die *gurken* mRNA wird zum dorso-anterioren Pol befördert. Die im Folgenden aufgeführten Beispiele beziehen sich überwiegend auf die mittlere Phase der Oogenese. Die Oozyte entwickelt sich dabei in einer Eikammer, die Follikelzellen und 15 Ammenzellen enthält. Über Ring-Kanäle werden die Ammenzellen mit der Oozyte verbunden und versorgen so die Oozyte mit RNAs und Proteinen (St Johnston and Nusslein-Volhard, 1992).

Für den Transport der *oskar* mRNA ist Kinesin-1 verantwortlich. Obwohl *oskar* bidirektional in der Oozyte transportiert wird, ist das Gleichgewicht zum posterioren Pol hin verlagert, wo die mRNA später auch lokalisiert (Abb. 1.1B; (Zimyanin et al., 2008)). Die Lokalisation der *oskar* mRNA ist eng an den Spleißvorgang gekoppelt. Dabei ist entscheidend, dass das erste von insgesamt drei Introns gespleißt wird und die Komponenten des EJC (*exon junction complex*), Y14 und Mago nashi, an die entsprechende Spleißstelle rekrutiert werden (Hachet and Ephrussi, 2004). Zwei weitere *trans*-wirkende Proteine, welche die *oskar* mRNA kotranskriptionell binden, sind Hrp48, welches zu der Familie der hnRNPA/B Proteinen gehört, und Bruno. Sowohl Bruno als auch Hrp48 binden die in der 3'UTR gelegenen „*Bruno response elements*“ (BREs), wobei Hrp48 zusätzlich in der 5'UTR bindet (Huynh et al., 2004; Snee et al., 2008). Die Interaktion der beiden RBPs ermöglicht die Oligomerisierung der *oskar* mRNAs und stellt sicher, dass diese translational inaktiv zur posterioren Achse transportiert werden (Chekulaeva et al., 2006). Dadurch entstehen dynamische, multimere Komplexe mit bis zu 250 *oskar* mRNAs (Little et al., 2015). Diese werden während des Transports neu organisiert, wodurch sich die Form und die Größe der Komplexe verändert (Mhlanga et al., 2009). In der Nähe des posterioren Pols angelangt, interagiert Staufen mit der *oskar* mRNA (Mhlanga et al., 2009). Staufen soll zum einen die *oskar* mRNA zum Endziel rekrutieren und zum anderen die mRNA mit dem Polysom zusammenbringen und so deren Translation ermöglichen (Mhlanga et al., 2009).

Die mRNAs *bicoid* und *gurken* dagegen werden mittels Dynein zum anterioren bzw. dorso-anterioren Pol der Oozyte transportiert (Rom et al., 2007; Trovisco et al., 2016). Im Gegensatz zur *oskar* mRNA, die eine stärkere Präferenz zum posterioren Pol aufweist, wird die *bicoid* mRNA zwar entlang der Mikrotubulifilamente zum Minusende hin transportiert, jedoch nicht gerichtet zum anterioren Pol (Trovisco et al., 2016). Die Lokalisation von *bicoid* erfolgt durch die Verankerung der *bicoid*-positiven Partikel am anterioren Pol. Ein weiterer Unterschied zur *oskar* mRNA ist, dass die *bicoid* mRNPs zwar in ihrer mRNA Zahl variieren können, sich die Größe der Partikel jedoch kaum verändert. Die Partikel weisen eine konstante Größe zwischen 110 und 120 nm auf (Trovisco et al., 2016). Der Zusammenschluss der *bicoid* mRNPs zu den sogenannten P-Bodies (*processing bodies*) inhibiert die Translation der *bicoid* mRNA (Decker and Parker, 2012).

Diese P-Bodies enthalten in ihrem Inneren keine Ribosomen, dafür aber verschiedenen Translationsrepressoren (Weil et al., 2012).

Dynein ist während der Lokalisation der *gurken* mRNA nicht nur wichtig für deren Transport, sondern ist, zusammen mit dem heterogenen nukleären RNP (hnRNP) Squid, auch für die Verankerung der mRNA am dorso-anterioren Pol zuständig (Delanoue et al., 2007). Zusätzlich dienen die Proteine Bicaudal-D und Egalitarian als Adaptoren zwischen den mRNAs und dem Motorprotein (Dienstbier et al., 2009; St Johnston, 2005). Während des Transports wird die Translation der *gurken* mRNA inhibiert (Davidson et al., 2016). Die Initiation der Translation findet, anders als bei der *bicoid* mRNA, die innerhalb der *P-Bodies* translationell inhibiert wird, an der Peripherie der *P-Bodies* statt, wo auch Ribosomen und andere Translationsaktivatoren vorhanden sind (Weil et al., 2012).

1.1.2.2 mRNA Transport in Neuronen

Des Weiteren spielt die Mikrotubuli-abhängige mRNA-Lokalisation und die lokale Translation eine sehr wichtige Rolle in Neuronen. Hier werden die mRNAs aus dem Soma zu den Dendriten und entlang des Axons zu den Synapsen transportiert (Abb. 1.1C). Dabei findet überwiegend die Translokation von mRNAs statt, die für Proteine kodieren, welche wichtige Funktionen in den Synapsen ausführen (Doyle and Kiebler, 2011). Somit können einzelne Synapsen innerhalb eines Neurons unabhängig voneinander modifiziert und so die Plastizität der Synapsen reguliert werden (Doyle and Kiebler, 2011; Martin and Ephrussi, 2009). Je nach Repertoire der Motorproteine werden die mRNAs sowohl in Dendriten als auch im Axon bidirektional entlang des Mikrotubuli-Zytoskeletts transportiert (Das et al., 2019). Beispielsweise wird die Lokalisation der *CAMKIIA* mRNA, die für die CaMKII α -Untereinheit der Ca²⁺/Calmodulin-Kinase II kodiert, in Dendriten über das RBP FMRP (*fragile-x mental retardation protein*) vermittelt (Dichtenberg et al., 2008; Doyle and Kiebler, 2011). FMRP dient zum einen als Adaptorprotein zwischen mRNA und Kinesin und ermöglicht so den Transport entlang der Mikrotubuli. Zum anderen wird vermutet, dass FMRP, aufgrund seiner Assoziation mit Bicaudal-D und Dynein in *D. melanogaster*, auch in der Lage ist den zum Minusende hin gerichteten Transport zu gewährleisten (Bianco et al., 2010).

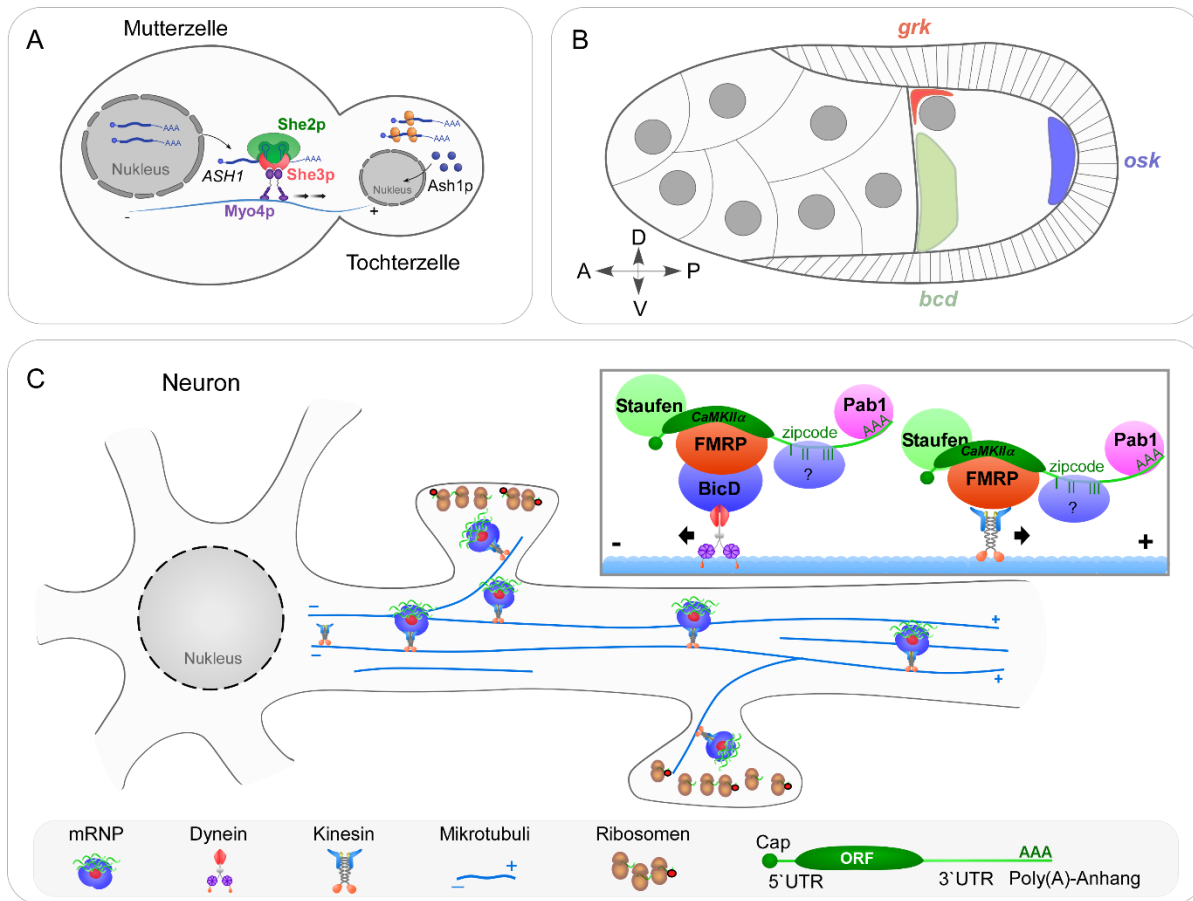


Abbildung 1.1 mRNA-Lokalisation **A)** Aktin-abhängiger mRNA-Transport in *S. cerevisiae*. Während der Knospung wird die *ASH1* mRNA von der Mutter- in die Tochterzelle entlang des Aktin-Zytoskeletts transportiert. Die mRNA wird durch die RBPs She2p und She3p gebunden. Für den Transport ist das Motorprotein Myo4p verantwortlich. Die Translation der *ASH1* mRNA wird während des Transports inhibiert. Somit wird sichergestellt, dass der Transkriptionsinhibitor Ash1p nur in der Tochterzelle den Paarungstypwechsel verhindert. Die Abbildung wurde modifiziert nach Niessing et al., 2018. **B)** Lokalisation von mRNAs in der mittleren Phase der Oogenese von *D. melanogaster*. Die *oskar* (*osk*) mRNA lokalisiert am posterioren Pol und die *bicoid* (*bcd*) mRNA am anterioren Pol der Oozyte. Die *gurken* (*grk*) mRNA lokalisiert im dorso-anterioren Bereich nahe des Zellkerns. Die Abbildung wurde modifiziert nach Lasko et al., 2012. **C)** Der mRNA Transport entlang des Mikrotubuli-Zytoskeletts in den Dendriten von Säugetierneuronen wird durch die Motorproteinen Dynein und Kinesin vermittelt. Die Abbildung wurde modifiziert nach Vollmeister et al., 2012.

1.2. RNA-bindende Proteine

Unabhängig davon, auf welche Weise die mRNA den Weg zu ihrem Bestimmungsort erreicht, wird ihr zelluläres Schicksal maßgeblich von RNA-bindenden Proteinen (RBPs) bestimmt. Die räumliche und zeitliche Regulation der Genexpression ist in Eukaryoten wichtig für die Kompartimentierung und die Spezialisierung von Zellen. Hierbei spielt die Regulation von mRNAs auf ko- und posttranskriptioneller Ebene eine zentrale Rolle. Die Schlüsselkomponenten stellen RBPs dar (Mansfield and Keene, 2009). Diese Gruppe von Proteinen verfügt klassischerweise über

eine oder mehrere RNA-bindende Domänen (RBD), die RNA Bindung vermitteln. In der Zelle liegen die RNAs niemals „nackt“ vor, sondern kommen stets in Assoziation mit RBPs in Form von *messenger* Ribonukleoproteinen (mRNPs) vor (Müller-McNicoll and Neugebauer, 2013; Singh et al., 2015). Um die Funktion bestimmter RBPs zu verstehen, ist es wichtig, deren zelluläre Lokalisation zu kennen. RBPs, die im Zellkern lokalisieren, kontrollieren die Transkription, das Spleißen von pre-mRNA und die Polyadenylierung. Im Zytoplasma regulieren sie die Modifikation, den Transport, die Lokalisation, die Translation und die Stabilität der mRNA (Glisovic et al., 2008). Einige RBPs sind zudem in der Lage zwischen dem Zellkern und dem Zytoplasma zu wechseln und bleiben sogar durchgehend mit ein und der selben mRNA assoziiert (Zucal et al., 2015). Somit sind RBPs an jedem Schritt im Lebenszyklus einer mRNA beteiligt (Abb. 1.2; (Coppin et al., 2018)).

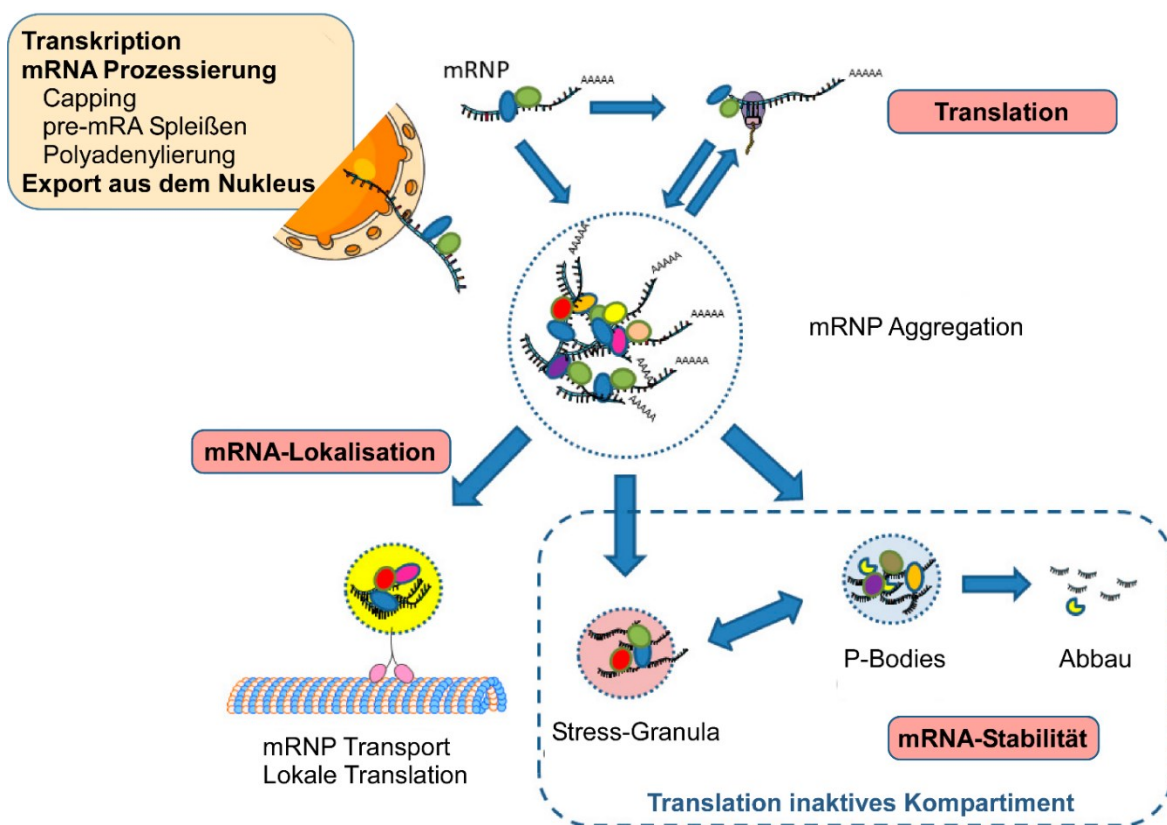


Abbildung 1.2 Lebenszyklus von mRNAs Die Illustration zeigt die verschiedenen Schritte im Lebenszyklus einer mRNA. Jeder dieser Schritte wird von RBPs reguliert: Im Nukleus sind RBPs an der Transkription und der mRNA-Prozessierung beteiligt. Auch beim Export der mRNA aus dem Nukleus spielen RBPs eine wichtige Rolle. Im Zytoplasma bestimmen die RBPs das Schicksal der mRNAs, indem sie die mRNA-Translation, den -Transport und den -Abbau kontrollieren. Der Zusammenschluss von mRNPs zu den sog. mRNP-Körperchen, die auch als RNA- oder mRNP-Granula bezeichnet werden, wird unter anderem durch die intrinsisch ungeordneten Proteinregionen (IDR: *intrinsically disordered region*) der RBPs begünstigt. Je nach Funktion der mRNP-Granula wird zwischen Stress-Granula und P-Bodies unterschieden. Stress-Granula bilden ein Depot für mRNAs und schützen diese vor Abbau bei Stress. P-Bodies sind am Abbau der mRNA beteiligt. Die Abbildung wurde modifiziert nach Coppin et al., 2018.

1.2.1 RNA-bindende Domänen

RNA-bindende Proteine sind modular aufgebaut. Sie können nur eine oder auch mehrere Kopien einer RNA-bindenden Domäne oder sogar eine Kombination aus verschiedenen RBDs enthalten. Die Affinität und Spezifität zur Ziel-mRNA wird durch die Kombination der jeweiligen Domänen bestimmt (Lunde et al., 2007). Zu den am besten untersuchten RBDs zählen zum Beispiel die RRM (RNA recognition motif), die KH (hnRNP K-homology), die DEAD-Box und die Zinkfinger Domäne (Ascano et al., 2012; Castello et al., 2012; Dominguez et al., 2018). Bei diesen Domänen handelt es sich um kurze RNA-bindende Motive mit einer durchschnittlichen Länge von 90 Aminosäuren, die vier bis sechs Nukleotide der mRNA binden (Gerstberger et al., 2014). Die wohl am häufigsten vorkommende RBD ist die RRM Domäne (Gerstberger et al., 2014; Maris et al., 2005). Sie ist 80-90 Aminosäuren lang und hat eine konservierte Topologie bestehend aus vier antiparallelen β -Strängen und zwei α -Helices ($\beta\alpha\beta\alpha$). Die RNA-Interaktion wird dabei von den zwei Ribonukleoprotein-Domänen (RNP1 und RNP2), die sich jeweils aus acht bzw. fünf konservierten Aminosäuren zusammensetzen, vermittelt (Maris et al., 2005). Ein klassisches Beispiel ist das Poly(A)-bindenden Protein (PABP), bei dem die RRM Domäne in mehreren Kopien vorliegt (Deo et al., 1999). Dadurch ist das RBP in der Lage längere mRNA-Abschnitte zu binden, wodurch sich die Affinität zur mRNA erhöht (Mackereth and Sattler, 2012; Müller-McNicoll and Neugebauer, 2013).

Neben diesen klassischen RBDs wurden in den letzten Jahren zunehmend RBPs mit intrinsisch ungeordneten Proteinregionen (IDR: *intrinsically disordered region*) identifiziert, die mit der RNA interagieren können (Baltz et al., 2012; Castello et al., 2012). Als intrinsisch ungeordnet werden diese Regionen deshalb bezeichnet, weil sie aufgrund ihrer Aminosäuresequenz keine stabile Tertiärstruktur ausbilden können (Castello et al., 2012; Järvelin et al., 2016). Neben den kleinen Aminosäuren Glyzin, Serin und Prolin enthalten diese Regionen häufig geladene Aminosäuren (Arginin, Lysin, Asparagin- und Glutaminsäure) sowie die aromatische Aminosäure Tyrosin (Castello et al., 2012; Castello et al., 2016). In den IDRs kommen diese Aminosäuren in sich wiederholender Reihenfolge vor. Das am häufigsten vorkommende Motiv ist das RGG/RG (Argenin-Glyzin-Glyzin) Motiv (Thandapani et al., 2013). Die Flexibilität der IDRs ermöglicht es dem Protein kooperative Bindungen nicht nur mit der RNA, sondern auch mit zahlreichen anderen Partnern einzugehen, wie zum Beispiel Proteinen oder DNA (Wright and Dyson, 2015). Bindung eines der Partner führt zu einer Konformationsänderung des Proteins, die einen Wechsel von ungeordneten hin zur geordneten dreidimensionalen Struktur zu Folge hat (Sugase et al., 2007). Ähnlich wie die klassischen RBPs weisen Proteine mit IDRs ebenfalls einen modularen Aufbau auf und kommen in Kombination mit den typischen RBDs vor (Castello et al., 2012).

1.2.2 Interaktion zwischen RBPs und mRNAs

Anfänglich wurden RBPs aufgrund ihrer Spezifität klassifiziert. Unter dem Begriff „spezifische“ RBPs waren Proteine definiert, die mit bestimmten RNA-Sequenzen oder RNA-Sekundärstrukturen interagieren. Als „unspezifische“ RBPs wurden diejenigen eingestuft, die mit

keiner erkennbaren Spezifität RNAs gebunden haben (Jankowsky and Harris, 2015). Die RNA-Sequenz und deren Sekundärstruktur kann für die Rekrutierung bestimmter Proteine eine Rolle spielen, jedoch ist der Mechanismus, mit dem die RBPs mit ihrer mRNA interagieren, weitaus komplexer (Dominguez et al., 2018; Loughlin et al., 2019). Grundsätzlich wird hierbei zwischen zwei Interaktionsarten unterschieden. RBPs binden entweder einzel- oder doppelsträngige mRNAs (Gerstberger et al., 2014; Lunde et al., 2007). Des Weiteren muss berücksichtigt werden, dass RBPs neben RBDs noch über zusätzliche akzessorische Regionen verfügen können (Glisovic et al., 2008). Häufig handelt es sich bei diesen Regionen um die bereits beschriebenen IDRs (Castello et al., 2016; Hentze et al., 2018). Der hohe Grad an Flexibilität innerhalb der IDRs ermöglicht die Ausbildung eines komplexen Netzwerks zwischen mRNAs und multiplen Proteinen (Calabretta and Richard, 2015; Protter and Parker, 2016). Dieser Zusammenschluss führt zur Bildung von dynamischen mRNPs mit einem variierenden Repertoire an RBPs (Gerstberger et al., 2014; Kim et al., 2007). Die Dynamik der mRNPs wird dabei zum einen durch konkurrierende RBPs und zum anderen über die posttranslationale Modifikation (PTM) der RBPs und mRNAs beeinflusst (Müller-McNicoll and Neugebauer, 2013; Ries et al., 2019; Thapar, 2015).

Zusätzlich wird zwischen globalen und regulatorischen RBPs unterschieden. Die globalen Komponenten binden bestimmte mRNA Elemente, wie die Cap-Struktur, die zum Beispiel mit dem eIF4E (*translation initiation factor 4E*) interagiert. Die Protein-kodierende Region wird unter anderen von den Ribosomen gebunden und der Poly(A)-Anhang vom Poly(A)-bindenden Protein (PABP). Somit beeinflussen diese Proteine direkt die Genexpression (Gehring et al., 2017; Rissland, 2017). RBPs, die an die 5' und 3'UTR binden, werden zu den regulatorischen Komponenten gezählt und regulieren die Interaktion der Kernkomponenten mit der mRNA (Rissland, 2017).

1.2.3 Glyzin-reiche RNA-bindende Proteine

Unter den RBPs sind die Glyzin-reichen RNA-bindende Proteine die mit dem breitesten funktionalen Spektrum (Ciuzan et al., 2015). Die Familie der Glyzin-reichen Proteine (GRPs) ist in allen Spezies vertreten, jedoch in Pflanzen am besten erforscht. Hier spielen GRPs eine wichtige Rolle bei der biotischen und abiotischen Stressantwort (Ciuzan et al., 2015; Sachetto-Martins et al., 2000). Wie der Name schon sagt, enthalten GRPs einen hohen Anteil der Aminosäure Glyzin, die häufig in repetitiven Motiven vorkommt (Sachetto-Martins et al., 2000). Aufgrund ihrer charakteristischen Struktur werden die GRPs in fünf Klassen gegliedert. Bei der Einteilung wird die Anordnung der Glyzin-Abfolge sowie die Anwesenheit weiterer konservierter Motive berücksichtigt (Abb. 1.3; (Mangeon et al., 2010)).

Proteine, die zur Klasse I bis III gezählt werden, enthalten ein Signalpeptid (SP) am N-Terminus. Bei den GRPs der Klasse I folgt nach dem Signalpeptid eine Region mit einem sehr hohen Glyzin-Anteil, der eine repetitive Sequenzabfolge von (GGX)_n aufweist. In der Klasse II folgen nach dem SP zwei konservierte Regionen, die (GGXXXGG)_n Sequenzwiederholungen sowie ein C-terminales

Cystein-reiches Motiv enthalten. GRPs der Klasse I sind in die Regulation des Organwachstums involviert oder sind Bestandteile der pflanzlichen Zellwand (Cassab, 1998; Park et al., 2001). GRPs die zur Klasse II gezählt werden, sind zum Beispiel an der Pathogenabwehr der Pflanze gegen verschiedene Schädlinge, wie Pilze oder Bakterien, beteiligt (Candido Ede et al., 2011). Im Gegensatz zu den anderen GRPs enthalten Proteine der Klasse III einen vergleichsweise geringen Glyzin-Anteil sowie eine charakteristische Oleosin Domäne. Diese Gruppe wird laut bioinformatischer Vorhersage sekretiert oder lokalisiert in der Nähe der Zellmembran (Czolpínska and Rurek, 2018). GRPs der Klasse III sind wichtig während der Pollinierung, insbesondere bei der Wasseraufnahme (Mayfield and Preuss, 2000). GRPs die in der Klasse V zusammengefasst werden unterscheiden sich von den GRPs aus der Klasse II durch die Abfolge der Glyzin-Motive. Neben einer $(GGx)_n/(GXGX)_n$ Abfolge können die Proteine der Klasse V, wie in der Klasse I-III, ein N-terminales SP enthalten (Abb. 1.3).

RNA-bindende GRPs werden zur Klasse IV gezählt (Abb. 1.3). Neben den Glyzin-reichen Regionen (GR) enthält diese Gruppe RRM Domänen oder eine Kälteschock Domäne (CSD: *cold-shock domain*). Zusätzlich können auch CCHC-Zinkfinger Domänen vertreten sein. Je nach Vorhandensein der Domänen, werden die RNA-bindenden GRPs in vier Subgruppen (IVa-IVd) unterteilt. Die Subgruppen IVa und IVb enthalten am N-Terminus eine und IVd zwei RRM Domänen. Die CSD ist hingegen bei den GRPs der IVc Subgruppe vertreten. Zusätzlich beinhaltet die Glyzin-reiche Region in den Subklassen IVb und IVc CCHC-Zinkfinger Domänen. Die Rolle der Glyzin-reichen Region ist bei den Proteinen dieser Klasse noch nicht vollständig bekannt, allerdings scheint diese Region wichtig für die Konformation und Funktion der Proteine zu sein. Darüber hinaus sind die GR Regionen unstrukturiert, haben einen hohen Grad an Flexibilität und erleichtern so die Interaktion mit unterschiedlichen Partnern (Ciuzan et al., 2015; Hanano et al., 1996; Steinert et al., 1991). Laut bioinformatischer Vorhersage sind GRPs der Klasse IVa im Zytosol, der Zellwand, dem Golgi Apparat oder in Organellen, wie den Mitochondrien, vorzufinden. Die Lokalisation der Subgruppen IVb und IVc ist dagegen überwiegend auf den Zellkern beschränkt (Czolpínska and Rurek, 2018). Proteine, die zur Klasse IV zählen, sind häufig an der Regulation der Transkription und der posttranskriptionellen Modifikation beteiligt (Shi et al. 2016). Aufgrund ihrer Domänenarchitektur können sie dabei als RNA-Chaperone fungieren (Kang et al., 2013; Kim et al., 2007). Aus physiologischer Sicht sind die Proteine bedeutend bei der Stresstoleranz und der -akklimatisierung (Kim et al., 2007; Kim et al., 2010).

Die wohl bekanntesten GRPs der Klasse IV sind *AtGRP7* (**glycin-rich RNA-binding protein 7**) aus Acker-Schmalwand *Arabidopsis thaliana* und *Rbm3* (**RNA-binding motif protein 3**) und *CIRP* (**cold-inducible RNA-binding protein**; auch als CIRBP oder A18 hnRNP bezeichnet) aus Menschen. Die Expression von *AtGRP7* wird von unterschiedlichen abiotischen Stressfaktoren moduliert. Bei niedrigen Temperaturen wird zum Beispiel die *AtGRP7* Expression hochreguliert. Durch seine Aktivität als RNA-Chaperon ermöglicht *AtGRP7* der Pflanze das Wachstum bei niedrigen Temperaturen. Darüber hinaus ist das GRP an alternativen Spleißprozessen, der Polyadenylierung sowie dem mRNA-Export beteiligt und kontrolliert die Expression spezifischer mRNAs (Kim et al., 2008; Kim et al., 2007; Meyer et al., 2017).

Bisher wurden in menschlichen Zellen nur zwei Kälteschock Proteine, RBM3 und CIRP, identifiziert, die zu der Klasse IV der GRPs gezählt werden (Zhu et al., 2016). Beide Proteine begünstigen die Translation bestimmter mRNAs bei hypothermischen und hypoxischen Stressbedingungen, indem sie die mRNAs binden und diese vor Abbau schützen (Al-Astal et al., 2016; Liao et al., 2017). Unter normalen Wachstumbedingungen sind beide Proteine überwiegend im Zellkern lokalisiert. Bei Stressbedingungen hingegen pendeln sie zwischen dem Zellkern und dem Zytoplasma (Zhu et al., 2016).

Eine Studie beschreibt ein GRP aus einem pflanzenpathogenen Pilz. *MoGRP1* ist ein Glyzin-reiches RNA-bindendes Protein aus dem Reispathogen *Magnaporthe oryzae* (Gao et al., 2019). *MoGRP1* enthält eine konservierte RRM Domäne, gefolgt von einer Glyzin-reichen Domäne mit vier Arginin-Glyzin-Glyzin (RGG) Wiederholungen am C-Terminus. Obwohl die RRM Domäne stark konserviert ist, sind die N- und C-terminalen Regionen nur in filamentös wachsenden Pilzen konserviert. Die Deletion von *MoGRP1* führt zu einer reduzierten Wachstumsrate, einer erhöhten Sensitivität gegenüber Zellwand- und Temperaturstress und einer reduzierten Oberflächenhydrophobizität. Darüber hinaus ist *MoGRP1* wichtig für die Ausbildung des Appressoriums, welches eine infektiöse Struktur des Pilzes darstellt, und somit auch für die Infektion der Reis-pflanze. Die Deletion des Proteins verursacht einen für GRPs typischen pleiotropen Phänotyp und scheint ein globaler Stressregulator in *M. oryzae* zu sein. Aufgrund von Koimmunopräzipitationsanalysen wird vermutet, dass *MoGRP1* als ein Spleißregulator fungiert und so an der Regulation der pathogenen Entwicklung und der Stressantwort beteiligt sein könnte.

Ein bislang uncharakterisiertes Homolog von *MoGRP1* existiert auch in dem phytopathogenen Pilz *Ustilago maydis*, dem Verursacher des Maisbeulenbrandes (UMAG_10162) (Gao et al., 2019). Neben diesem uncharakterisierten GRPs existiert ein weites GRP in *U. maydis*, das kleine Glyzin-reiche RNA-bindende Protein Grp1. Aufgrund seiner Domänenarchitektur wird dieses GRP zur Klasse IVa gezählt. Bisher ist nur wenig über Grp1 bekannt. Das Protein wurde in einer Koimmunopräzipitationsstudie zusammen mit dem RNA-bindenden Protein Rrm4 aufgereinigt und könnte daher eine neue Komponente des endosomalen Rrm4-abhängigen mRNPs sein. Ob Grp1, ähnlich wie die anderen GRPs, als ein globaler Stressregulator in *U. maydis* fungiert, muss jedoch noch analysiert werden.

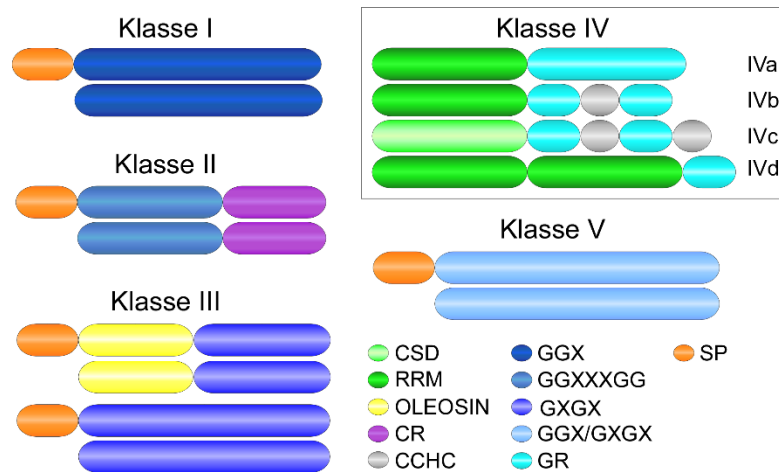


Abbildung 1.3 Klassifizierung pflanzlicher Glyzin-reicher Proteine CSD, Kälteschock Domäne (*cold-shock domain*); RRM, *RNA-recognition motif*; OLEOSIN, Oleosin Domäne; CR, Cystein-reiche Domäne, CCHC, Zinkfinger Domäne; GR, Glyzin-reiche Domäne; GGXXXGG, GGX, GXG, GGX/GXGX, repetitive Glyzin-reiche Sequenzen (X ist eine beliebige Aminosäure); SP, Signalpeptid. Die Abbildung wurde modifiziert nach Czolpinska et al., 2018.

1.3. Endosomaler mRNA Transport in *Ustilago maydis*

1.3.1 Modellorganismus *Ustilago maydis*

In dieser Arbeit wurde sowohl Grp1 als auch Rrm4 im Modellorganismus *U. maydis* untersucht. Daher soll der Pilz in diesem Kapitel näher vorgestellt werden.

U. maydis ist ein phytopathogener Basidiomyzet mit einem sehr engen Wirtsspektrum. Neben der Maispflanze (*Zea mays*), befällt er nur die verwandte Teosinte (*Zea mays subsp. parviglumis*) (Bölker, 2001). Aufgrund seiner leichten Kultivierbarkeit, kurzen Generationszeit, einfachen genomischen Zugänglichkeit und den zahlreichen etablierten genetischen, zell- und molekularbiologischen Techniken, eignet sich *U. maydis* sehr gut als Modellorganismus (Brachmann et al., 2004; Feldbrügge et al., 2004; Holliday, 1974). Darüber hinaus wurde das Genom 2006 vollständig sequenziert und annotiert, wodurch eine gezielte Manipulation von Genen möglich ist (Kämper et al., 2006). Lange Zeit diente der Phytopathogen als Modellsystem für die Erforschung der Interaktion zwischen Pilz und Wirtspflanze sowie für zellbiologische Fragestellungen (Djamei and Kahmann, 2012; Holliday, 2004). Zusätzlich zu der Grundlagenforschung, rückte *U. maydis* zunehmend in den Fokus biotechnologischer und biochemischer Fragestellungen (Feldbrügge et al., 2013; Geiser et al., 2016; Terfrüchte et al., 2017).

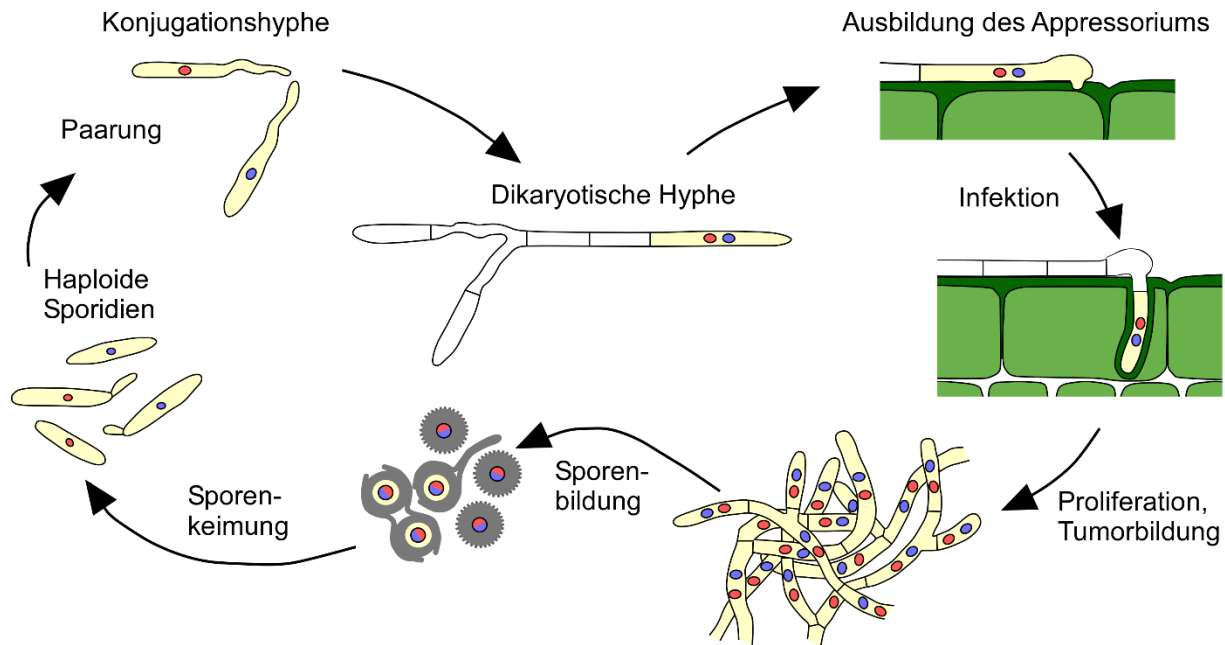


Abbildung 1.4 Lebenszyklus von *U. maydis* Die haploiden Sporidien vermehren sich in der saprotrophen Lebensphase durch Knospung. Die Paarung zweier kompatibler Sporidien wird durch ein Pheromon/Pheromonrezeptor-System vermittelt, welches von den α - und b -Loki kodiert wird. Die Wahrnehmung des Pheromons führt zum G2-Zellzyklus Arrest und induziert die Bildung einer Konjugationshyph. Nach der Plasmogamie wächst das Heterodikaryon auf der Pflanzenoberfläche filamentös aus. Um die Pflanze zu infizieren, bildet sich an der Spitze der Hyph ein Appressorium aus, das dem Pilz die Penetration der Pflanzenoberfläche ermöglicht. Innerhalb der Pflanze wird der Zellzyklus Arrest aufgehoben und der Pilz beginnt mit der Proliferation und der Tumorbildung. Zum Ende des Lebenszykluses findet die Karyogamie und die Bildung der Teliosporen statt. Bei günstigen Umweltbedingungen werden diese freigesetzt, keimen aus und bilden haploide Sporidien, die den Zyklus von Neuem beginnen können. Die Abbildung wurde modifiziert nach Kämper et al., 2006.

U. maydis hat einen dimorphen Lebenszyklus mit einer saprotrophen und einer parasitischen Phase (Abb. 1.4). Während der saprotrophen Lebensphase existiert *U. maydis* als haploide Zelle, welche auch als Sporidie bezeichnet wird und sich durch Knospung vermehrt (Bölker, 2001; Vollmeister et al., 2012a). Für den Übergang in die parasitäre Lebensform ist die Paarung zweier kompatibler Sporidien erforderlich. Die sexuelle Reproduktion und die pathogene Entwicklung sind stark voneinander abhängig und werden durch ein Pheromon/Pheromonrezeptor-System reguliert (Kellner et al., 2011). Das tetrapolare Paarungssystem besteht aus dem bi-alleischen α -Lokus und dem multi-alleischen b -Lokus (Bölker, 2001; Brefort et al., 2009). Die Paarungstypen nehmen sich über das vom α -Lokus kodierte Pheromon und den kompatiblen Pheromonrezeptor wahr (Bölker et al., 1992; Spellig et al., 1994). Bei bestehender Kompatibilität arretieren die Sporidien im G2-Zyklus und bilden Konjugationshyphen aus. Diese wachsen entlang des Pheromongradienten aufeinander zu und verschmelzen miteinander. Wie für alle Basidiomyceten charakteristisch, ist die Plasmogamie zeitlich von der Karyogamie getrennt. Somit führt die Fusion zweier Sporidien auf der Pflanzenoberfläche zur Ausbildung einer

dikaryotischen Hyphe (Bölker, 2001; Kruzel and Hull, 2010). Das weitere Wachstum des Dikaryons wird durch den *b*-Lokus gesteuert. Der *b*-Lokus kodiert die Untereinheiten bEast (bE) und bWest (bW), die zusammen einen heterodimeren Homöodomänen-Transkriptionsfaktor bilden, welcher die Expression von Virulenzgenen aktiviert (Bölker, 2001; Brefort et al., 2009; Gillissen et al., 1992; Kronstad and Leong, 1990). Dazu müssen jedoch beide Untereinheiten aus unterschiedlichen Paarungstypen stammen, um einen aktiven Transkriptionsfaktor zu generieren (Brefort et al., 2009; Kamper et al., 1995). Während das Dikaryon unipolar am apikalen Pol expandiert, werden im distalen Bereich Septen eingezogen, die die zytoplasmafreien Abschnitte von der Hyphe trennen (Lehmler et al., 1997; Steinberg et al., 1998). Um die Pflanze zu penetrieren, reagiert die Hyphe auf pflanzenspezifische Signale, wodurch die Ausbildung einer Appressorium-ähnlichen Verdickung an der Hyphenspitze erfolgt (Brefort et al., 2009; Mendoza-Mendoza et al., 2009). Nach erfolgreicher Penetration wird der Zellzyklusarrest aufgehoben und die Proliferation induziert. Dies führt zur Bildung eines ausgedehnten dikaryotischen Pilzmyzels innerhalb des Pflanzengewebes und somit zur Infektion der gesamten Maispflanze und der charakteristischen Tumorenbildung (Doehlemann et al., 2008). In den Tumoren findet die Karyogamie und die anschließende Differenzierung der stark melanisierten, diploiden Teliosporen statt (Banuett and Herskowitz, 1996). Durch das Aufbrechen der Tumore, werden die reifen Sporen über den Wind, den Regen oder die Insekten verteilt. Bei günstigen Umweltbedingungen keimen die Teliosporen aus, durchlaufen eine meiotische Teilung und bilden vier haploide Sporidien. Somit ist der Zellzyklus abgeschlossen und kann von Neuem beginnen (Bölker, 2001; Vollmeister et al., 2012a).

Für die Erforschung des hyphalen Wachstums unter Laborbedingungen werden die heterodimeren Homöodomänen-Transkriptionsfaktoren genutzt. Im Laborstamm AB33 kann, anhand der kontrollierten Expression beider Untereinheiten, das hyphale Wachstum ohne vorhergegangene Paarung induziert werden (Abb. 1.5B; (Brachmann et al., 2001)). Die beiden Transkriptionsuntereinheiten bE und bW stammen dabei aus unterschiedlichen Paarungstypen und stehen unter der Kontrolle des regulierbaren Promotors *P_{nar}*, wodurch das filamentöse Wachstum anhand des Wechsels der Stickstoffquelle induziert werden kann.

1.3.2. Endosomaler Transport entlang des Mikrotubuli-Zytoskeletts in *U. maydis*

Das filamentöse Wachstum spielt während der pathogenen Lebensphase von *U. maydis* eine entscheidende Rolle. Erst die Bildung eines polar auswachsenden Filaments ermöglicht eine erfolgreiche Infektion der Maispflanze. Dabei nimmt das Mikrotubuli-Zytoskelett beim polaren Hyphenwachstum eine zentrale Bedeutung ein (Fuchs et al., 2005). Die Mikrotubuli (MT) durchspannen die gesamte Hyphe in einer anti-parallelen Orientierung, lediglich 12 µm von den Zellperipherien entfernt liegen die MT in paralleler Anordnung vor und zeigen mit dem Plusende zu den Zellpolen (Egan et al., 2012; Lenz et al., 2006; Steinberg et al., 2001). Die Motorproteine, die entlang des MT-Zytoskeletts unterschiedliches Frachtgut transportieren, sind die zum Plusende hin gerichteten Kinesine (Kinesin-1 und Kinesin-3) und das zum Minusende hin

gerichtete Dynein (geteiltes Dyn1-Dyn2 Dynein) (Vale, 2003; Wedlich-Söldner et al., 2002). Mittels Langstreckentransports können Organellen, Endosomen, Peroxisomen, Ribosomen, Proteine und mRNAs befördert werden (Egan et al., 2012; Higuchi et al., 2014; König et al., 2009; Salogiannis et al., 2016; Zander et al., 2016).

Der bidirektionale Langstreckentransport von Endosomen ist von zentraler Bedeutung für das polare Wachstum von *U. maydis*. Diese dienen als Plattform für den Transport von mRNAs, die von dem RBP Rrm4 gebunden werden. Der endosomale Transport erfolgt durch ein Wechselspiel von Kinesin-3 und Dynein. Kinesin-3 ist durchgehend mit den Endosomen assoziiert und transportiert diese zum Plusende der MT. Dynein dagegen geht nur transient eine Assoziation mit den Endosomen ein und befördert diese zum Minusende der MT (Schuster et al., 2011c). Ein weiteres zum Plusende hin gerichtetes Motorprotein ist Kinesin-1. Kinesin-1 befördert Dynein, wodurch sich ein Dynein-Reservoir an den Plusenden der Zellpolen bildet (Lenz et al., 2006). Dadurch wird sichergestellt, dass Dynein den retrograden (zum Nukleus gerichteten) Transport auch im Bereich der parallel ausgerichteten MT gewährleisten kann. Sobald die Anordnung der MT antiparallel wird, übernimmt Kinesin-3 den retrograden Transport der Endosomen (Schuster et al., 2011b). Somit wird der bidirektionale Transport der Endosomen von der Orientierung, der Polarität der MT sowie dem Zusammenspiel der Motorproteine gewährleistet. Die Beladung der Endosomen mit Dyneinen am Plusende ermöglicht vermutlich das hyphale Spitzenwachstum, indem sichergestellt wird, dass die Endosomen beide Hyphenpole auch tatsächlich erreichen (Bielska et al., 2014; Lenz et al., 2006). Der Verlust dieser Motorproteine interferiert mit dem unipolaren Wachstum und resultiert in vermehrt bipolar auswachsenden Hyphen sowie Septierungsdefekten (Schuchardt et al., 2005).

1.3.2.1 Rrm4-abhängiger mRNA Transport in *U. maydis*

In einer bioinformatischen Analyse wurde Rrm4 aufgrund seiner Domänenarchitektur als ein RBP identifiziert. Rrm4 enthält drei N-terminale RRM Domänen und zwei C-terminale MLLE Domänen (**Mademoiselle**, auch als PABC-Domäne, **poly A-binding protein C-terminal domain** bezeichnet; (Becht et al., 2005; Kozlov et al., 2010; Pohlmann et al., 2015)). Die mRNA Bindung wird über die RRM Domänen vermittelt (Becht et al., 2006; König et al., 2009). Die Anordnung dieser Domänen ist charakteristisch für ELAV (**embryonic lethal abnormal vision**)-ähnliche Proteine, bei denen die zweite und dritte RRM Domäne durch eine Linkersequenz getrennt vorliegen (Abb. 1.5A; (Becht et al., 2005)). Die MLLE Domänen dagegen sind für Protein-Protein Interaktionen verantwortlich (Pohlmann et al., 2015). Der Verlust von Rrm4 führt zu einem ähnlichen Phänotyp wie der Verlust der Motorproteine oder depolymerisierten MT, nämlich zu vermehrt bipolar auswachsenden Hyphen, Defekten in der Septenbildung und verminderter Virulenz (Abb. 1.5B; (Becht et al., 2006; Fuchs et al., 2005)). Während des hefeartigen Wachstums hat die Deletion von *rrm4* hingegen keinen phänotypischen Effekt. Detaillierte Lokalisationsstudien von Rrm4, Endosomen und Motorproteinen bestätigten, dass Rrm4 zusammen mit frühen Endosomen bidirektional entlang des MT-Zytoskeletts transportiert wird (Abb. 1.5E; (Baumann et al., 2012)). Als ein endosomaler

Linker konnte das FIVE-Domänen Protein Upa1 identifiziert werden, welches mit den MLE Domänen von Rrm4 interagiert und die Lokalisation von Rrm4 auf Endosomen ermöglicht (Pohlmann et al., 2015).

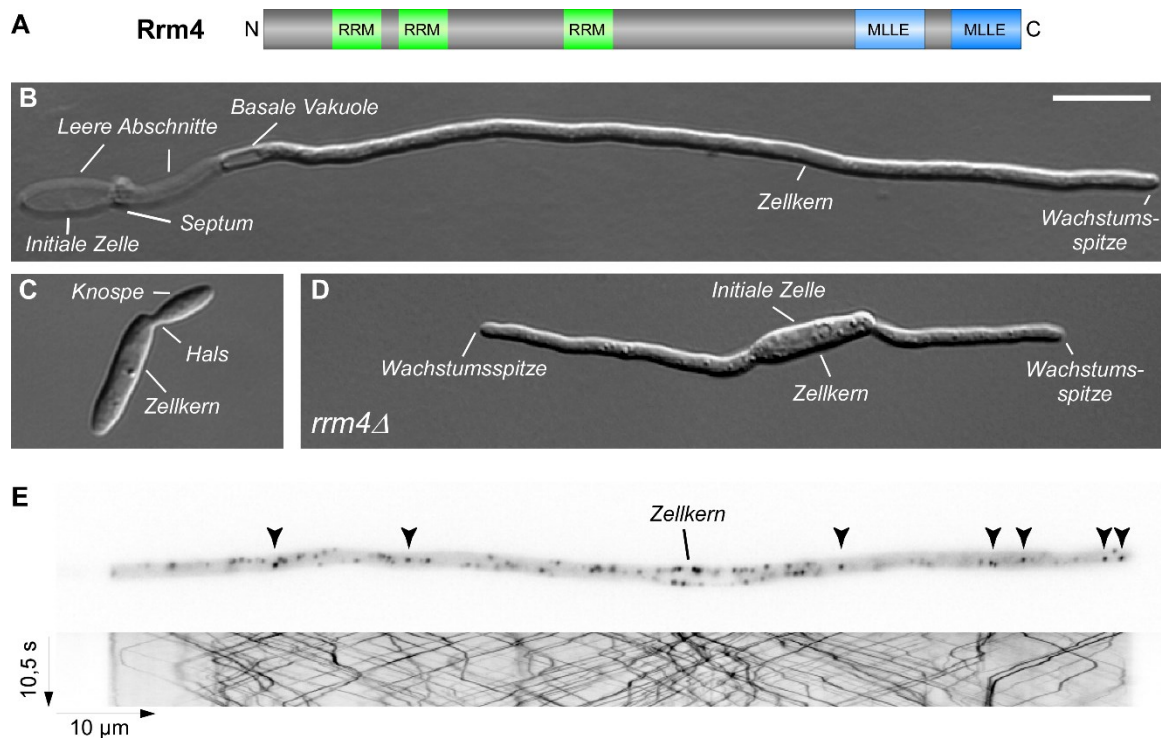


Abbildung 1.5 Das RBP Rrm4 ist wichtig für das hyphale Wachstum von *U. maydis* **A)** Domänenarchitektur von Rrm4. **B)** Hyphe des Laborstammes AB33, 6 Stunden nach der Induktion des hyphalen Wachstum durch Wechsel der Stickstoffquelle im Medium. Größenstandard: 10 µm, bezieht sich auch auf die Abbildungen B und C. **C)** Sporidien eines Rrm4-Deletionsstammes. Die Deletion von *rrm4* hat keinen phänotypischen Effekt auf das hefeartige Wachstum. **D)** Bidirektional auswachsende Hyphe, 6 Stunden nach der Induktion des hyphalen Wachstums. Ursache für den Verlust des uniploaren Wachstums ist die Deletion von *rrm4*. **E)** Lokalisation von Rrm4-Gfp, 6 Stunden nach der Induktion des hyphalen Wachstums. Rrm4-Gfp lokalisiert in zytoplasmatischen Einheiten, die sich bidirektional in der Hyphe bewegen. Die Bewegung von Rrm4-Gfp ist in dem Kymographen dargestellt, bei dem die Strecke pro Zeit abgebildet ist. Die Abbildungen wurden modifiziert nach Vollmeister et al., 2012a.

1.3.2.2 Aufbau des Rrm4-abhängigen mRNP

Obwohl schon viele Komponenten des Rrm4-abhängigen mRNA Transports identifiziert wurden, ist die Zusammensetzung der Rrm4-enthaltenden mRNP weitgehend unerforscht. Die Bindung zwischen Rrm4 und den mRNAs konnte mittels UV-induzierter Quervernetzungsexperimente nachgewiesen werden. Die Methoden, die dabei verwendet wurden, waren die CLIP (*in vivo UV-crosslinking and immune precipitation*) sowie die iCLIP (*individual nucleotide resolution CLIP*) Methode (s. Kapitel 1.4; (Becht et al., 2006; König et al., 2009)). Dabei wurden mRNAs

identifiziert, die unter anderem für Proteine kodieren, welche für die Proteinbiosynthese, Endozytose und für die mitochondriale Funktion wichtig sind (König et al., 2009). Für vier der identifizierten mRNAs, *ubi1*, *rho3*, *cts1* und *cdc3*, wurde die Interaktion mit Rrm4 in Echtzeit-RNA-Visualisierungs- oder FISH (*fluorescence in situ hybridization*)-Experimenten validiert (Baumann et al., 2014; Koepke et al., 2011; König et al., 2009). Um mikroskopisch die Verteilung der mRNAs beobachten zu können, wurde die Lokalisation des Poly(A)-bindenden Proteins Pab1 untersucht. Dieses Protein bindet den Poly(A)-Anhang der zytoplasmatischen mRNAs und kann so als indirekter Marker genutzt werden. Pab1 lokalisiert zusammen mit Rrm4 auf beweglichen frühen Endosomen (König et al., 2009). Sowohl die Quervernetzungsexperimente als auch die Lokalisationsstudien führen zu der Schlussfolgerung, dass Rrm4 eine zentrale Rolle beim mRNA-Langstreckentransport in *U. maydis* einnimmt.

Interessanterweise dient der Rrm4-vermittelte Langstreckentransport der mRNAs indirekt der Verteilung der mit der mRNA assoziierten Ribosomen und deren Translationsprodukten (Baumann et al., 2012; Higuchi et al., 2014). Dies wurde am Beispiel der Septine (*cdc3*, *cdc10*, *cdc11* und *cdc12*) gezeigt. Alle Septin mRNAs werden auf den Endosomen Rrm4-abhängig transportiert und wahrscheinlich lokal translatiert. Nur wenn die Translationsprodukte sich auf denselben Endosomen befinden, können heteromere Septinfilamente gebildet werden (Baumann et al., 2014; Zander et al., 2016). Diese sind für die effiziente Etablierung der Polaritätsachse während des hyphalen Wachstums wichtig (Zander et al., 2016).

Neben den Septinen wurde auch der Einfluss von Rrm4 auf die mitochondriale Proteine untersucht. Dazu wurden DIGE (*difference gel electrophoresis*)-Experimente durchgeführt (Koepke et al., 2011). Bei diesen Experimenten wurde die differentielle Expression der Membran-assoziierten Fraktion zwischen dem Rrm4-Deletions- und Wildtyp-Stamm verglichen. Dabei wurden unter anderem Expressionsunterschiede bei mitochondrialen Proteinen wie Afg3 (Untereinheit der m-AAA Protease), Atp4 (F_0 -Untereinheit der ATP-Synthase vom Komplex V) und Nuo1 (Untereinheit der NADH-Dehydrogenase vom Komplex I) festgestellt (Koepke et al., 2011). Die DIGE Ergebnisse deuten daraufhin, dass Rrm4 wichtig für den Import mitochondrialer Proteine und somit für die Assemblierung der Atmungskette sein könnte. Die bioinformatische Analyse der CLIP Daten hat jedoch keines der mitochondrialen mRNAs als ein potentiell Rrm4 Transkript identifiziert. Dies kann auf den geringen Umfang der dort generierten Banken zurückzuführen sein.

Interessanterweise wurde die mRNA der Endochitinase Cts1 in den UV-basierten Experimenten als ein putatives Ziel-Transkript von Rrm4 identifiziert und daraufhin näher untersucht. Eine genauere Analyse ergab, dass sowohl das MT-Zytoskelett als auch ein funktionelles Rrm4 Protein wichtig für die unkonventionelle Sekretion der Endochitinase sind (Koepke et al., 2011; Stock et al., 2012). Die Deletion von Rrm4 beeinträchtigt die Sekretion von Cts1 während des hyphalen Wachstums. Wie der genaue Translokationsmechanismus von Cts1 vom Rrm4-abhängigen Transport während der virulenten Phase reguliert wird, konnte bisher noch nicht geklärt werden. Während des hefeartigen Wachstums wird die unkonventionelle Cts1 Sekretion Zellzyklus-spezifisch reguliert und hängt zusätzlich von der Funktion des Septierungsfaktors Don3 ab (Aschenbroich et al., 2018; Reindl et al., 2019).

Neben den mRNAs wurde auch nach möglichen Rrm4 Proteininteraktionspartnern gesucht. Dazu wurde eine Koimmunopräzipitation durchgeführt und mit einer massenspektrometrischen Analyse kombiniert. Innerhalb dieses Datensatzes wurde zum Beispiel ein bereits bekanntes Protein, Pab1, identifiziert, dass ein bekanntes Protein des Rrm4-abhängigen mRNPs ist. Des Weiteren wurde eine Anreicherung für RNA-Helikasen, ribosomale Proteine, sowie für einen Translationsinitiations- und Translationselongationsfaktor ermittelt. Diese Interaktionspartner stimmen mit der Hypothese der lokalen Translation überein. Daneben wurden konservierte Proteine ermittelt, wie zum Beispiel das PAM2 Motiv (*poly(A)-binding associated motif 2*)-tragende Protein Upa2. Proteine mit PAM2 Motiven interagieren mit MLE Domänen (Kozlov et al., 2010). Rrm4 und Pab1 sind die einzigen Proteine in *U. maydis*, die klassische MLE Domänen tragen. Laut bioinformatischer Vorhersage tragen 14 Proteine PAM2 Motive, darunter das Linkerprotein Upa1, das sowohl mit der MLE Domäne von Rrm4 als auch mit der von Pab1 interagiert und so das mRNP mit den Endosomen verknüpft (Pohlmann et al., 2015). Das Upa2 Protein wurde sowohl bei der bioinformatischen Analyse, als auch als eine putative Komponente des Rrm4-abhängigen mRNPs identifiziert. Upa2 enthält neben vier PAM2 Motiven eine Coiled-coil Domäne, die vermutlich wichtig für den Dimerisierungsprozess ist, sowie eine C-terminale GWW Domäne, die wichtig für Protein-Protein-Interaktionen ist (Jankowski et al., 2019). Upa2 interagiert mit Pab1 und stabilisiert wahrscheinlich den endosomalen Rrm4-mRNA Komplex, indem es als Gerüstprotein innerhalb des mRNPs fungiert. Der Verlust von Upa2 interferiert mit dem endosomalen mRNA Transport und dem an die mRNAs gebundenen Pab1 (Jankowski et al., 2019). Neben Upa2 wurde ein weiterer interessanter Kandidat bei der Koimmunopräzipitationsanalyse identifiziert: Das kleine Glyzin-/Glutamin-reiche RNA-bindende Protein Grp1. Grp1 trägt eine N-terminale RRM Domäne gefolgt von einer Glyzin-/Glutamin-reichen Region und zählt zu den Glyzin-reichen RBPs der Klasse IVa (s. Kapitel 1.2.3). Durch alternatives Spleißen existieren zwei Isoformen in *U. maydis*, Grp1A und Grp1B. Beide Isoformen lokalisieren Rrm4-abhängig in zytoplasmatischen Einheiten, die sich bidirektional in der Hyphe bewegen (Dissertation Thomas Pohlmann, 2013). Dies deutet darauf hin, dass Grp1 tatsächlich eine Komponente des Rrm4-abhängigen mRNPs sein könnte.

1.4. Individual nucleotide resolution in vivo UV-crosslinking and immunoprecipitation

Um die Funktion von RBPs zu verstehen ist es erforderlich die Protein-RNA Interaktion in ihrem nativen Kontext zu untersuchen. Im Laufe der Zeit wurden immer mehr zuverlässige Methoden entwickelt, um die Protein-RNA Interaktion zu detektieren. Die Basis der CLIP (*in vivo UV-crosslinking and immunoprecipitation*) Methode ist die UV-induzierte Quervernetzung der RBPs mit den gebundenen RNAs. Im Vergleich zu der Formaldehyd-abhängigen Quervernetzung, bei der sowohl die RNAs mit Proteinen als auch Proteine untereinander verbunden werden, erzeugt die UV-abhängige Quervernetzung eine kovalente Bindung zwischen dem RBP und der direkt gebundenen RNA (Greenberg, 1979; Meyer et al., 2017; Niranjankumari et al., 2002; Ule et al., 2005). Dazu wird die natürliche Photoreaktivierbarkeit der Aminosäuren Phenylalanin, Tryptophan, Tyrosin, Cystein, Lysin, Arginin sowie Methionin und den Nukleotiden,

insbesondere der Pyrimidine, bei einer Wellenlänge von 254 nm ausgenutzt (Greenberg, 1979; Hockensmith et al., 1986; Shetlar et al., 1984). Da die kovalente Bindung nur zwischen direkt interagierenden Proteinen und RNAs erzeugt wird, können diese unter stringenten Bedingungen isoliert werden (Ule et al., 2005; Ule et al., 2003). Die spezifische Aufreinigung des RBPs und die damit einhergehende Koimmunopräzipitation der gebundenen mRNAs ermöglicht die genaue Identifizierung der Proteinbindestellen (Ule et al., 2003).

Ursprünglich wurden die isolierten RNAs, nach deren reversen Transkription in cDNAs, mittels der Sanger-Sequenzierungsmethode sequenziert (Ule et al., 2005; Ule et al., 2003). Mit dieser Vorgehensweise wurden zum Beispiel 340 mRNAs identifiziert die, in Gehirnzellen der Maus, von den Nova Spleißfaktoren gebunden werden (Ule et al., 2003). Darüber hinaus binden die Nova Proteine Ziel-mRNAs mit dem Bindemotiv UCAU und regulieren so den alternativen Spleißvorgang (Ule et al., 2003). Mit dem zunehmenden Fortschritt der Sequenzierungsmethoden wurde bei der CLIP Methode die Sanger-Sequenzierungsmethode durch die Hochdurchsatz-Sequenzierungsmethode (*high throughput sequencing*; HITS-CLIP) ersetzt. Dadurch wurde eine transkriptomweite Sicht auf die Protein-RNA Interaktionen ermöglicht. Mittels HITS-CLIP konnten für das bereits untersuchte RBP Nova die Anzahl der identifizierten Transkripte um das 1000-fache erhöht werden (Licatalosi et al., 2008). Aufgrund weiterer Optimierungen existiert heutzutage eine Vielzahl CLIP-basierter Methoden, wie zum Beispiel HITS-CLIP (*high-throughput sequencing* CLIP) bzw. CLIP-Seq, PAR-CLIP (*photoactivatable-ribonucleosideenhanced* CLIP) oder iCLIP (*individual nucleotide resolution* CLIP), sowie zahlreiche andere (Garzia et al., 2017; König et al., 2010; Lee and Ule, 2018; Licatalosi et al., 2008; Yeo et al., 2009).

Bei der iCLIP Methode werden, wie auch bei der ursprünglichen CLIP Methode, die lebenden Zellen mit ultravioletem Licht, bei einer Wellenlänge von 254 nm, bestrahlt, und so die Protein-RNA Interaktionspartner irreversibel miteinander quervernetzt (Abb. 1.6; (König et al., 2012)). Dies ermöglicht eine stringente Aufreinigung des Protein-RNA Komplexes und die Isolierung der gebundenen RNAs (König et al., 2010; Ule et al., 2003). Um iCLIP-Banken generieren zu können, müssen die RNAs in cDNAs umgeschrieben und anschließend amplifiziert werden. Dazu muss zuvor das Protein proteolytisch von der RNA entfernt werden. Während dieses Prozesses bleibt ein Peptidrest an der Quervernetzungsstelle zurück. Dieser Peptidrest führt dazu, dass die anschließende reverse Transkription vorzeitig an dieser Stelle abbricht (König et al., 2010; Sugimoto et al., 2012). Dieses Wissen wird genutzt, um die Bindestelle präzise zu ermitteln. Bei der CLIP Methode wurde der Adapter für die PCR-Amplifikation bereits vor der reversen Transkription an die RNA ligiert (Ule et al., 2005). Da in etwa 80 % eine vorzeitige Termination der reversen Transkription stattfindet, konnten nur etwa 20 % der cDNAs für die Generierung der CLIP-Banken verwendet werden (Sugimoto et al., 2012). Bei der iCLIP Methode wurde dieser Schritt optimiert. Die cDNA wird erst nach der reversen Transkription zirkularisiert und dann wieder linearisiert. Dieser Schritt erzeugt eine cDNA, die an beiden Enden eine Adaptersequenz für die PCR-Amplifikation trägt. Dadurch konnte die Ausbeute der cDNAs gesteigert werden, da sowohl die trunkierten als auch die bis zum Ende revers transkribierten cDNAs erfasst werden (Sugimoto et al., 2012). Eine weitere Besonderheit stellt der für die reverse Transkription

verwendete Primer dar. Dieser ist zum einen komplementär zum Adapter, der an die mRNA ligiert wurde und zum anderen enthält er einen Barcode. Dieser Barcode teilt sich in den experimentellen Barcode und den *random* Barcode, der auch als UMI (*unique molecular identifier*) Barcode bezeichnet wird, auf (König et al., 2010; Lee and Ule, 2018). Der experimentelle Barcode erlaubt die Vereinigung der Proben für den Sequenzierungsprozess aus verschiedenen Experimenten. Der *random* Barcode ermöglicht die Differenzierung zwischen tatsächlichen Interaktionsereignissen und technischen Duplikaten, die während der PCR generiert werden (König et al., 2010). Die Identifizierung und Eliminierung der technischen Duplikate ist wichtig, um die Bindekapazität des RBPs nicht zu verfälschen. Die darauffolgende bioinformatische Analyse ermöglicht eine umfangreiche Ermittlung der gebundenen RNAs sowie eine hochauflösende Darstellung der Bindestellen (König et al., 2010; Sugimoto et al., 2012). Durch die Quervernetzung der beiden Interaktionspartner zu einem spezifischen Zeitpunkt ist es somit möglich, die Momentaufnahmen genauer zu analysieren und so ein besseres Verständnis für die Funktion von spezifischen RBPs zu erhalten.

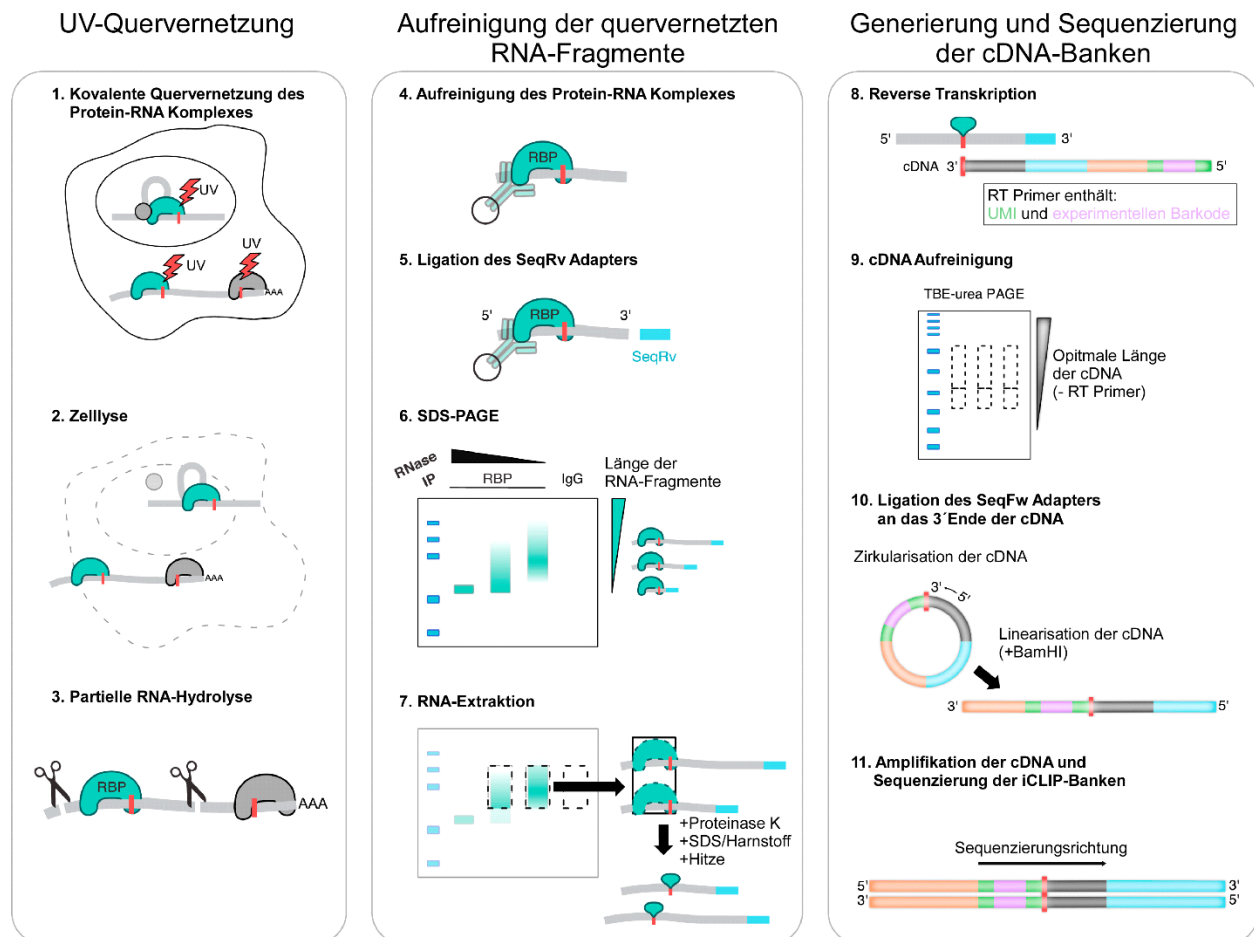


Abbildung 1.6 Die iCLIP Methode Die Abbildung zeigt die Kernschritte der iCLIP Methode. Die Illustration wurde in drei Teile gegliedert: die UV-Quervernetzung, die Aufreinigung der quervernetzten RNA-Fragmente und die Generierung und Sequenzierung der cDNA-Banken. Die UV-Bestrahlung der lebenden

Zellen induziert eine kovalente Quervernetzung zwischen den RBPs und den gebundenen RNAs. Dadurch ist deren Aufreinigung unter stringenten Bedingungen möglich. Die isolierten mRNAs werden in cDNAs umgeschrieben und sequenziert. Für weitere Details siehe Text. Die Abbildung wurde modifiziert nach Lee et al., 2018.

1.5 Zielsetzung der Arbeit

In der vorliegenden Arbeit wurde der endosomale mRNA Transport im Modellorganismus *U. maydis* untersucht. Zwei RBPs standen im Fokus dieser Arbeit, das Schlüsselprotein des endosomalen mRNA Transports, Rrm4, sowie dessen putativer Interaktionspartner Grp1B. Verfolgt wurden folgende Ziele:

Da über die zelluläre Funktion von Grp1B in *U. maydis* nur wenig bekannt war, sollte als erstes das Protein charakterisiert werden. Ob Grp1B, ähnlich wie andere GRPs der Klasse IVa, die Rolle eines globalen Stressregulators in *U. maydis* einnehmen könnte, sollte mittels einer phänotypischen *grp1*-Deletionsanalyse sowie eines Stresstests untersucht werden.

Da Grp1B im Zuge einer Rrm4-abhängigen Koimmunopräzipitation identifiziert wurde und Rrm4-abhängig auf Endosomen lokalisiert, sollte eine Interaktion zwischen den RBPs Grp1B und Rrm4 nachgewiesen werden. Aufgrund seiner Domänenarchitektur wäre Grp1B theoretisch in der Lage mRNAs zu binden. Deshalb stellte sich die Frage, inwiefern Grp1B in den Rrm4-abhängigen Transportprozess involviert ist.

Um die mRNAs zu identifizieren, die von Rrm4 gebunden werden, wurde in Vorarbeit bereits die iCLIP Methode etabliert. Aufgrund des geringen Umfangs der iCLIP Banken, konnte das Potenzial der Methode jedoch nicht vollständig ausgeschöpft werden. Deshalb lag der zweite Fokus der Arbeit auf der Optimierung der iCLIP Methode in *U. maydis*. Mittels des optimierten iCLIP Protokolls sollten die mRNAs, die von Rrm4 und von Grp1B gebunden werden, transkriptomweit identifiziert werden. Neben der Identifizierung der mRNAs sollte das Bindeverhalten der zwei RBPs analysiert und miteinander verglichen werden.

Die transkriptomweite Identifizierung der mRNAs, die von zwei unterschiedlichen RBPs gebunden werden, die jedoch Komponenten desselben endosomalen mRNPs sind, sollte zur Aufklärung des Bindeverhaltens von einzelnen mRNAs sowie der Organisation des Rrm4-vermittelten mRNPs beitragen.

2. Ergebnisse

2.1 Identifizierung des Glyzin-/Glutamin-reichen RNA bindenden Proteins Grp1

Die Identifizierung und Charakterisierung RNA-bindender Proteine (RBPs) ermöglicht ein besseres Verständnis für zellbiologische Prozesse, insbesondere während der posttranskriptionellen Regulation, zu entwickeln. Um mögliche Interaktionspartner des RBPs Rrm4 zu identifizieren, wurde in Vorarbeit eine Tandemaffinitätsaufreinigung (*tandem affinity purification*; TAP (Rigaut et al., 1999)) durchgeführt. Für die Analyse wurde das Rrm4-Gfp-Fusionsprotein mit einem C-terminalen TAP-Epitop (Rrm4GT) verwendet. Das TAP-Epitop ermöglichte die gezielte Aufreinigung von Rrm4GT zusammen mit den assoziierten Interaktionspartnern. Anschließend wurde diese mittels MS analysiert.

Gesucht wurde nach Proteinen, die sowohl mit Rrm4 als auch mit RNAs interagieren können. Zur Identifizierung interessanter Kandidaten, wurde eine Aminosäuresequenzanalyse (SMART; *Simple Modular Architecture Research Tool*; <http://smart.embl-heidelberg.de/>; (Letunic and Bork, 2018; Letunic et al., 2015)) durchgeführt. Gesucht wurde nach bekannten RNA-bindenden Domänen, insbesondere nach der RRM Domäne. Neben dem Poly(A)-bindenden Protein Pab1, wurden RRM Domänen in zwei weiteren möglichen Interaktionspartnern identifiziert. Ein Kandidat (UMAG_05258) ist als ein hypothetisches Protein annotiert und enthält eine RRM Domäne, die auch in dem Nukleoporin Nup53 in *S. cerevisiae* und anderen Organismen vorzufinden ist. Allerdings fehlen dieser RRM Domäne die charakteristischen RNP1 und RNP2 Motive, die für die RNA Interaktion benötigt werden (Handa et al., 2006). Aus diesem Grund wurde das Protein von der weiteren Analyse ausgeschlossen.

Der zweite Kandidat war das kleine, Glyzin-/Glutamin-reiche RNA-bindende Protein Grp1 (UMAG_02412). Grp1 besteht aus einer N-terminalen konservierten RRM Domäne, gefolgt von einer Glyzin-/Glutamin-reichen (G/Q) Region. Aufgrund von alternativem Spleißen werden für dieses Protein zwei Isoformen generiert (Grp1A und Grp1B, Abb. 2.1A). Die beiden Isoformen unterscheiden sich am C-Terminus in ihrer Aminosäuresequenz (Abb. 2.1B, grau unterlegten Aminosäuren in Grp1A und Grp1B), wobei die Grp1A Isoform um 17 Aminosäuren länger ist als die Isoform Grp1B. Grp1 hat Homologe in anderen Organismen (Abb. 2.1B). Es wurde ein Homolog aus *A. thaliana* GRP7 und zwei aus *H. sapiens* RBM3 und CIRP identifiziert. Diese Proteine besitzen eine charakteristische Domänenarchitektur: eine hochkonservierte RRM Domäne gefolgt von einer Glyzin-reichen Region. Bei Grp1 kommt in dieser Region neben Glyzin vermehrt die Aminosäure Glutamin vor. Bei GRP7, RBM3 und CIRPB ist zusätzlich Arginin vorzufinden. Glyzin-reiche Regionen werden auch als IDRs (IDR: *intrinsically disordered region*; intrinsisch, ungeordnete Proteinregionen) bezeichnet. Diese sind in der Lage, sowohl mit RNAs als auch Proteinen zu interagieren (Castello et al., 2012; Järvelin et al., 2016). Die Ähnlichkeit zu bekannten Glyzin-reichen RBPs macht Grp1 somit zu einem interessanten und vielversprechenden Kandidaten zur Untersuchung des endosomalen mRNP Transports.

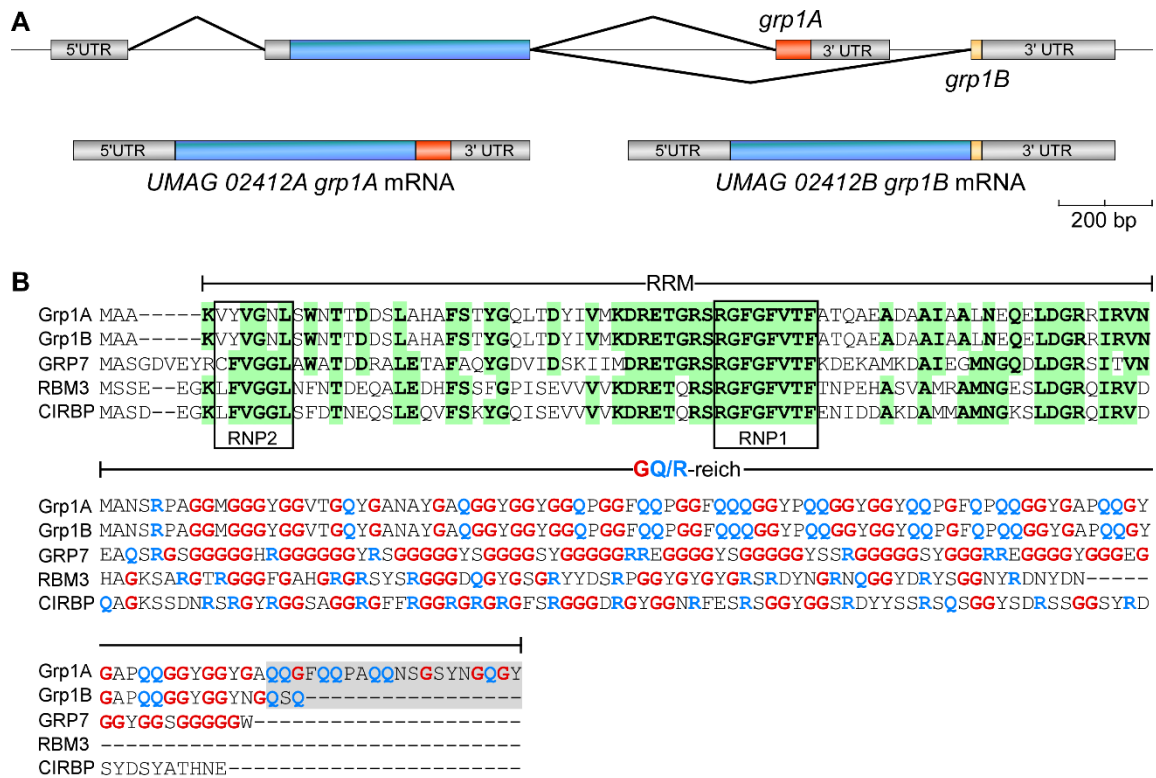


Abbildung 2.1 *grp1* kodiert für zwei Isoformen und hat Homologe in anderen Organismen A) Schematische Darstellung des *grp1* genomischen Locus. Die Introns sind als Linien und die Exons als blaue Zylinder dargestellt. Die beiden Exons, die für *grp1A* bzw. *grp1B* kodieren, sind in dunkel- bzw. hellorange dargestellt. Größenstandard: 200 bp (Abgewandelt nach Dissertation T. Pohlmann, 2013). **B)** Vergleich der Aminosäuresequenzen zwischen Grp1A und Grp1B aus *U. maydis* (UMAG_02412) mit GRP7 aus *A. thaliana* (NC_003071.7), RBM3 und CIRBP aus *H. sapiens* (NC_000023.11 und NC_000019.10). Die Länge der RRM Domäne ist mit einer Linie gekennzeichnet und die Position von RNP1 und 2 mit einer Box umrandet. Aminosäuren, die in mindestens drei der fünf Proteinen identisch waren, wurden grün unterlegt. Der Anfang und das Ende der Glyzin-/Glutamin-reichen bzw. Glyzin/Argenin-reichen Region sind mit einem Strich gekennzeichnet und die entsprechenden Aminosäuren farblich hervorgehoben (Glyzin (G) in rot, Glutamin (Q) und Arginin (R) in blau). Grau unterlegten Aminosäuren am C-Terminus verweisen auf den Sequenzunterschied zwischen der Grp1A und Grp1B Isoform. Die Abbildung wurde modifiziert nach Olgeiser et al., 2019 (Abb. 1A).

2.2. Grp1B beeinflusst das Zellwachstum sowie die Stressantwort in *U. maydis*

2.2.1 Grp1B ist wichtig für das Wachstum von Sporidien

Um die Funktion von Grp1B zu charakterisieren und zu überprüfen, ob Grp1B tatsächlich mit Rrm4 interagiert, wurde sowohl *grp1* deletiert (*grp1Δ*) als auch eine C-terminale Gfp-Fusion hergestellt (Grp1B-Gfp, Abb. 2.2A). Der Deletionsstamm wurde hergestellt, indem durch die homologe Rekombination der *grp1* ORF (*open reading frame*; offene Leserahmen) durch eine Hygromycin-Resistenzkassette ausgetauscht wurde. Für die Herstellung der C-terminalen Gfp-Fusion wurde die Grp1B Isoform gewählt, da die Fusion von Gfp an die Grp1A Isoform mit dem Spleißen der Grp1B Isoform interferieren könnte. Somit wurde ein Stamm generiert, der neben

der Gfp-markierten *grp1B* Variante, die native *grp1A* Isoform koexprimiert. Dieser Stamm wurde als *grp1B-gfp* bezeichnet.

Als erstes wurde die phänotypische Auswirkung der Deletion von *grp1* im Hinblick auf das hefeartige Zellwachstum hin untersucht. In dieser Arbeit diente der Laborstamm AB33 als Ausgangsstamm und Kontrolle und wird deshalb durchgehend als Wildtyp bezeichnet. Da Grp1B eine mögliche Komponente des endosomalen mRNA Transports sein könnte, wurde die Deletion von *grp1* mit der *rrm4*-Deletionsmutante verglichen. Zusätzlich wurde der Stamm *grp1B-gfp* verwendet um zu überprüfen, ob die C-terminale Gfp-Fusion phänotypische Auswirkungen auf den Stamm hat. Untersuchungen zum Wachstumverhalten zeigten, dass die Deletion von *grp1* zur Reduktion der Wachstumsgeschwindigkeit führte. Im Vergleich zu den Kontrollstämmen zeigte die *grp1*-Deletionsmutante in Flüssigkultur eine langsamere Zunahme der optischen Dichte (Abb. 2.2B). Dies deutet auf eine längere Generationszeit hin. Die Deletion von *rrm4* hatte dagegen keinen Einfluss auf das hefeartige Wachstum.

Mikroskopische Analysen zeigten zudem, dass die Deletion von *grp1* zu einer veränderten Zellmorphologie führte. Während kein Unterschied zwischen den Sporidien des Wildtypstammes und der *rrm4Δ*-Mutante festgestellt werden konnte, führte der Verlust von *grp1* zu elongierten Zellen (Abb. 2.2C und D). Der Median der gemessenen Zelllängen lag beim Wildtyp bei 15 µm und bei der Deletionsmutante bei 20 µm (Abb. 2.2D). Sowohl das verlangsamte Wachstum als auch die erhöhte Zelllänge konnte durch die endogene Expression der Grp1B-Gfp Variante komplementiert werden. Dies deutet darauf hin, dass das Gfp-Fusionsprotein nicht mit der Funktion von Grp1B interferiert (Abb. 2.2B-D). Im Gegensatz zu *rrm4* Deletion hat die *grp1* Deletion phänotypische Auswirkungen auf das hefeartige Wachstum.

Glyzin-reiche RNA-bindende Proteine (GRP) spielen in anderen Organismen vor allem bei Stressbedingungen wie z. B. Kältestress eine wichtige Rolle (Ciuzan et al., 2015). So wird *AtGRP7* aus *A. thaliana* für die Anpassung der Jungpflanzen bei Kältestress benötigt (Kim et al., 2008). Daher wurde als nächstes untersucht, ob Grp1B ebenfalls eine Rolle bei der Kältestressadaptation spielen könnte. Hierzu wurde das hefeartige Wachstum bei Niedrigtemperaturen (21 °C und 16 °C) auf Agarplatten untersucht. Die *rrm4Δ*-Mutante zeigte keinen phänotypischen Wachstumsunterschied unterhalb der Optimaltemperatur von 28 °C. Im Gegensatz zur *rrm4Δ*-Mutante war das hefeartige Wachstum von der *grp1Δ*-Mutante stark eingeschränkt. Dies äußerte sich in einer veränderten Kolonimorphologie. Bei niedrigen Temperaturen waren die Kolonien kleiner und von einem schleimigen Erscheinungsbild (Abb. 2.2E). Dies zeigt, dass die Deletion von *grp1* zu einer reduzierten Kältestresstoleranz führt.

Einige GRPs sind nicht nur wichtig bei Kältestress, sondern sind wichtige Komponenten der Zellwand (Czolpinska and Rurek, 2018). So bindet *AtGRP3* an die Zellwand-assoziierte Kinase Wak1 und reguliert deren Aktivität (Park et al., 2001). Daher wurde überprüft, ob die *grp1Δ*-Mutante sensitiv auf Zellwandstress reagiert. Zu diesem Zweck wurde das Wachstum von *U. maydis* Sporidien in Anwesenheit der Zellwandsyntheseinhibitoren *Calcoflour white* (CFW) und *Congo red* (CR) untersucht. Sowohl CFW als auch CR inhibieren das Wachstum von Pilzen,

indem sie die Enzyme hemmen, die für die Verknüpfung von Chitin mit β -1,3- bzw. β -1,6-Glucan verantwortlich sind (Ram and Klis, 2006). Die Anwesenheit beider Inhibitoren führte bei den Kontrollstämmen (Wildtyp, *rrm4* Δ -Mutante und *grp1B*-*gfp*-Stamm) zu einer minimalen Veränderung in der Kolonimorphologie und zu reduziertem Wachstum, jedoch nicht in dem Ausmaß wie bei der *grp1* Δ -Mutante. Auf CR-haltigen Agarplatten wurde das Wachstum von der *grp1* Δ -Mutante gehemmt, was an kleineren Kolonien zu erkennen war (Abb. 2.2F). Im Vergleich dazu inhibierte CFW nahezu vollständig das hefeartige Wachstum auf dem Festmedium (Abb. 2.2F). Wie bereits beim Wachstumstest in Flüssigkultur konnte die Expression von Grp1B-Gfp den Deletionsphänotypen komplementieren (Abb. 2.2F und F).

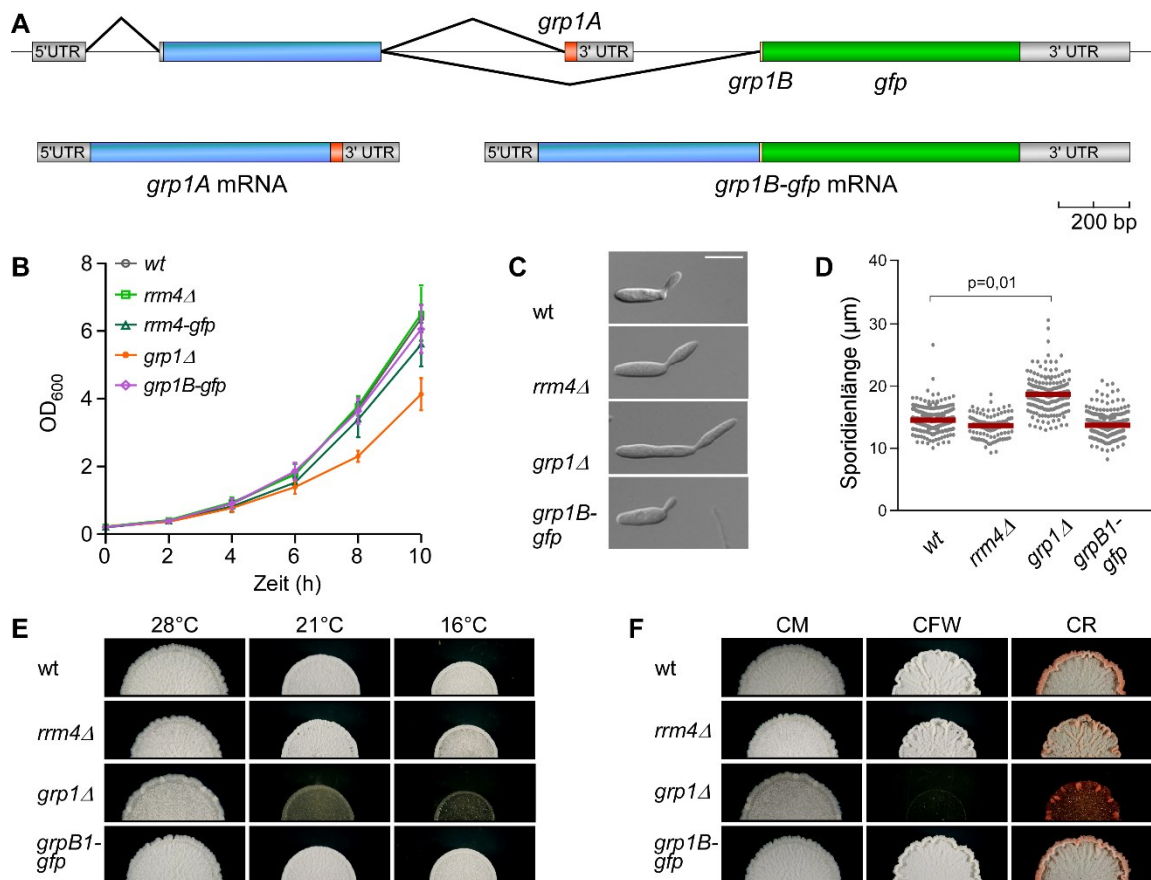


Abbildung 2.2 Die Deletionsmutante *grp1* weist einen Wachstumsdefekt und reduzierte Kältetoleranz auf **A**) Schematische Darstellung des genomischen *grp1* Lokus mit einer C-terminalen *gfp*-Fusion der *grp1B*-Isoform. Die Introns sind als Linien und die Exons als blaue Zylinder dargestellt. Die beiden Exons, die für *grp1A* bzw. *grp1B* kodieren, sind in dunkel- bzw. hellorange dargestellt. Die *gfp*-Sequenz ist in grün dargestellt. Die Insertion der *gfp*-Sequenz erfolgte am 3'-Ende der *grp1B* Isoform. Somit exprimierte dieser Stamm (Grp1B-Gfp) sowohl die native Grp1A-Isoform als auch das Grp1B-Gfp-Fusionsprotein. **B**) Wachstumskurve vom Wildtyp-Stamm (Wt), den Deletionsstämmen *grp1* Δ und *rrm4* Δ sowie deren C-terminalen Gfp-Fusionen (Grp1B-Gfp und Rrm4-Gfp). Die untersuchten Stämme wurden in CM angezogen und deren optische Dichte bei 600 nm alle 2 h gemessen. Die OD₆₀₀ wurde gegen die Zeit (h) aufgetragen. Die gezeigten Wachstumskurven setzen sich aus den Mittelwerten zusammen, die aus

drei unabhängigen Messungen ermittelt wurden. Fehlerbalken zeigen den Standardfehler. **C)** DIC (*differential interference contrast*) Aufnahmen der hefeartigen Wachstumsform vom Wt, *grp1Δ*- und *rrm4Δ*-Stämmen sowie des *grp1B-gfp* Stammes. Größenstandard: 10 μm. **D)** Diagramm zeigt die Länge der Sporidien in μm vom Wt-, *grp1Δ*- und *rrm4Δ*- sowie *grp1B-gfp*-Stammes an. Der Median ist als roter Balken dargestellt. Ausgemessen wurde immer nur die Länge einzelner Zellen, die sich nicht in der Teilungsphase befanden (n= 3 Experimente; > 40 Zelle pro Experiment). Durchgeführt wurde ein gepaarter *t*-Test auf den Mittelwerten der gemessenen Zelllängen aus den drei Replikaten. **E)** Kältestresstest mit den Stämmen Wt, *grp1Δ*, *rrm4Δ* und *grp1B-gfp*. 3 μl Hauptkultur (OD₆₀₀=0,5) wurden pro CM-Agarplatte getropft und bei 28 °C für einen Tag, bzw. bei 21 °C und 16 °C jeweils für fünf Tage inkubiert. **F)** Zellwandstresstest mit den Stämmen Wt, *grp1Δ*, *rrm4Δ* und *grp1B-gfp*. 3 μl Hauptkultur (OD₆₀₀=0,5) wurden pro CM-Agarplatte ohne Inhibitoren und mit CFW (50 μM) bzw. CR (57,4 μM) getropft und bei 28 °C für einen bzw. vier Tage inkubiert. Die Abbildung wurde modifiziert nach Olgeiser et al., 2019 (Abb. EV1E-I).

2.2.2 Phänotypische Analyse der *grp1* Deletion während des hyphalen Wachstums

Der Rrm4-abhängige endosomale Transport in *U. maydis* ist wichtig für das filamentöse Wachstum. Da Grp1B ein potentieller Interaktionspartner von Rrm4 ist, wurde die Auswirkung der *grp1*-Deletion auf das hyphale Wachstum untersucht. Hierzu wurde in dem Laborstamm AB33 das hyphale Wachstum durch den Wechsel der Stickstoffquelle im Medium induziert. Mikroskopische Analysen ergaben, dass sich die Deletion von *grp1* phänotypisch von der *rrm4* Deletion unterscheidet. Während der Verlust von *rrm4* zu kürzeren Hyphen und einer erhöhten Rate an bipolar auswachsenden Zellen führt, äußerte sich die *grp1* Deletion in einer Zunahme des Längenwachstums (Abb. 2.3A und B (Becht et al., 2006)). Die Hyphenlänge des Deletionsstammes wurde mit der des Wildtyps zwei, vier und sechs Stunden nach der Induktion des hyphalen Wachstums verglichen. Bereits nach zwei Stunden waren die Hyphen des *grp1*-Deletionsstammes signifikant länger als die des Wildtypstammes (Abb. 2.3B). Sechs Stunden nach der Induktion des hyphalen Wachstums lag der Median beim Wildtyp bei ca. 95 μm und der der Deletionsmutanten bei etwa 130 μm. Somit waren die Hyphen der Mutante 1,4 mal so lang.

Das unipolare Wachstum der Hyphe findet in *U. maydis* an der Hyphenspitze statt, wobei am basalen Pol in regelmäßigen Abständen Septen eingezogen werden (Steinberg et al., 1998). Um zu überprüfen, ob erhöhtes Längenwachstum auf die fehlende Septenbildung zurückzuführen ist, wurde das Vorhandensein von Septen in der Analyse mit berücksichtigt. Neben der erhöhten bipolaren Wachstumsrate beeinträchtigt die *rrm4* Deletion die Septenbildung (Becht et al., 2006). Damit übereinstimmend wurden nur vereinzelt Hyphen mit Septen in dem *rrm4Δ*-Stamm identifiziert (Abb. 2.3B). Anders als bei der *rrm4Δ*-Mutante bildeten sowohl der Wildtyp als auch die *grp1Δ*-Mutante ab einer bestimmten Hyphenlänge Septen aus. Der Wildtyp und der *grp1B-gfp* Stamm bildeten ab einer Hyphenlänge von ca. 60 μm Septen aus. Im Vergleich dazu waren beim Deletionsstamm Septen ab einer Hyphenlänge von ca. 90 μm zu sehen.

Darüber hinaus wurde auch untersucht, ob sich die Länge der leeren Abschnitte zwischen dem Wildtyp und der Mutante unterscheiden (Abb. 2.3C und D). Hierzu wurde die Länge des zuletzt gebildeten leeren Abschnittes gemessen. Die Quantifizierung zeigte, dass der Median der Länge

der leeren Abschnitte in der *grp1Δ*-Mutante bei 17,5 μm lag und beim Wildtyp bei 12,5 μm . Somit liegt der Median der Deletionsmutante um den Faktor 1,4 höher, als der des Wildtyps. Sowohl die Gesamtlänge der Hyphen als auch die der leeren Abschnitte erhöhen sich folglich beim *grp1Δ*-Stamm um denselben Faktor (Abb. 2.3D). Dieses Ergebnis zeigt, dass das erhöhte Längenwachstum beim Verlust von *grp1* nicht auf die fehlende Septenbildung zurückzuführen ist.

Wie auch schon beim hefeartigen Stadium konnte der Deletionsphänotyp in Hyphen durch die Expression des Grp1B-Gfp Proteins komplementiert werden. Die Länge der Hyphen und der Septen unterschieden sich nicht vom Wildtyp (Abb. 2.3A-D). Aus diesem Grund wurde für den folgenden Zellwandstresstest in Hyphen ein Kontrollstamm verwendet, der das funktionelle Grp1B-Gfp-Fusionsprotein exprimiert.

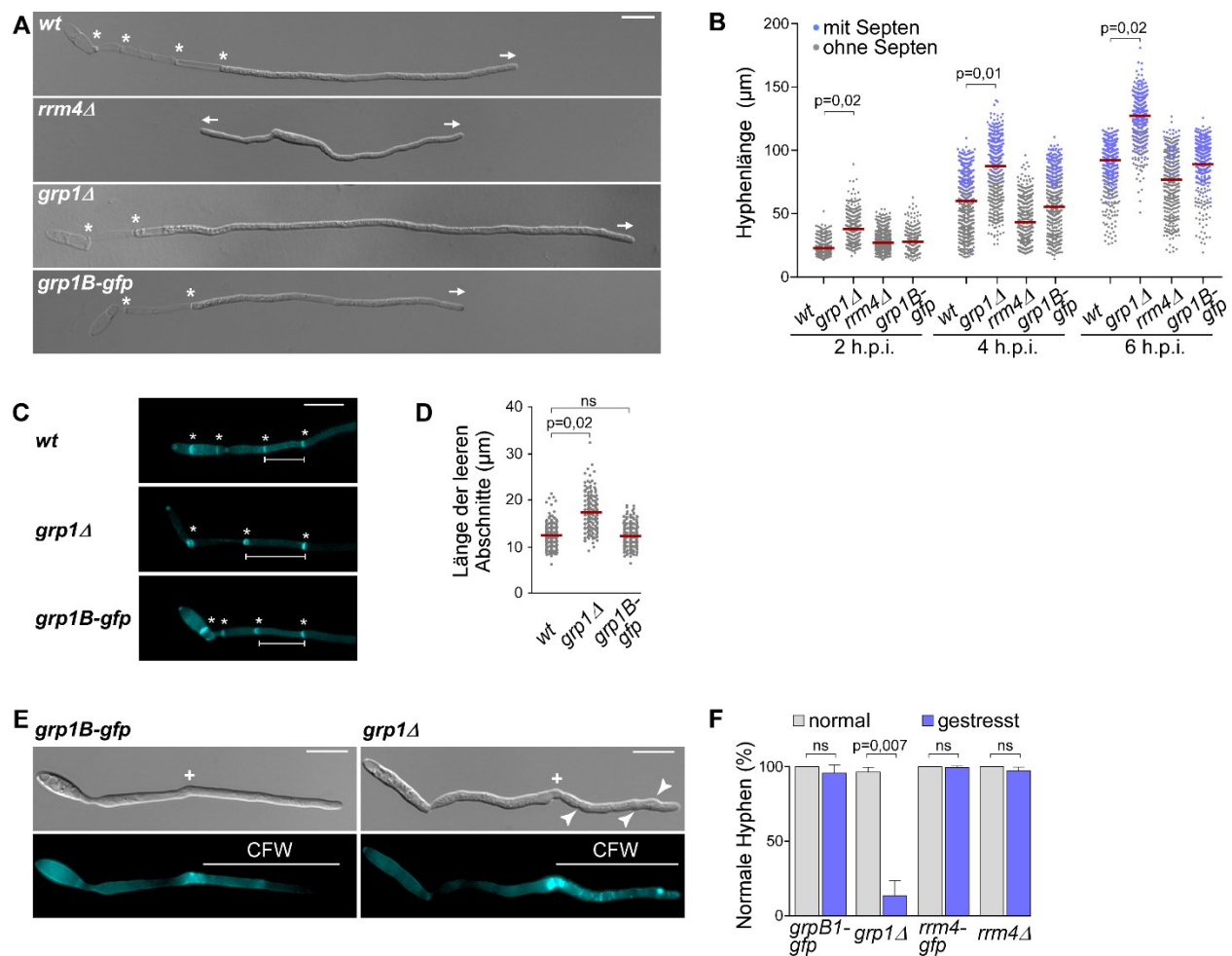


Abbildung 2.3 *grp1* Deletion führt zu gesteigerter Hyphenlänge und einer erhöhten Sensitivität gegenüber Zellwandstress **A**) DIC Aufnahmen von *U. maydis* Hyphen 6 Stunden nach der Induktion (h.p.i.; hours post induction) des hyphalen Wachstums vom Wildtyp-Stamm und den Stämmen *grp1Δ*, *rrm4Δ* und *grp1B-gfp*. Die Wachstumsrichtung ist durch Pfeile und die Septen mit Sternchen markiert. Größenstandard: 10 μm . **B**) Diagramm zeigt die Hyphenlänge, der Stämme Wt, *grp1Δ*, *rrm4Δ* und *grp1B-gfp* in μm . Die leeren Abschnitte wurden bei der Messung nicht mitgemessen. Unterschieden wurde

jedoch zwischen Hyphen ohne Septen (graue Punkte) und mit Septen (blaue Punkte). Der Median ist als roter Balken dargestellt ($n = 3$ Experimente, pro Experiment wurden mindestens 100 Hyphen analysiert; gepaarter t -Test, Signifikanz: $P < 0,05$). **C)** Visualisierung von Septen mittels einer *Calcofluor white* (CFW)-Färbung. Die Stämme Wt, *grp1Δ*, *rrm4Δ* und *grp1B-gfp* wurden mit CFW gefärbt und mikroskopiert. Die Visualisierung der Septen erfolgt im DAPI-Kanal. Die Sternchen kennzeichnen die Septen und die Balken die Länge der leeren Abschnitte. Größenstandard: 10 μm . **D)** Diagramm zeigt die Länge der leeren Abschnitt, der Stämme Wt, *grp1Δ*, *rrm4Δ* und *grp1B-gfp* in μm . Dabei wurde der zuletzt gebildete leere Abschnitt gemessen. Der Median ist als roter Balken dargestellt ($n = 3$ Experimente; > 190 Zelle pro Experiment wurden analysiert; gepaarter t -Test; ns = nicht signifikant, Signifikanz: $P > 0,05$). **E)** Aufnahmen einer Hyphe der Stämme *grp1B-gfp* und *grp1Δ* nach einer CFW (2,5 μM) Behandlung. DIC- und CFW-Aufnahmen sind untereinander gezeigt. Mit Plus ist die Krümmung und die Akkumulation des Farbstoffes, hervorgerufen zum Zeitpunkt der CFW-Zugabe, in der Hyphen gekennzeichnet. Morphologische Veränderungen oder Auffälligkeiten hingegen sind durch Pfeile markiert. Größenstandard: 10 μm . **F)** Balkendiagramm zeigt den relativen Anteil an normalen Hyphen (%) mit und ohne CFW Behandlung. Dabei wurde immer der Deletionsstamm mit dem entsprechenden Gfp-Fusionsstamm verglichen ($n = 3$ Experimente; > 100 Zelle pro Experiment wurden analysiert; gepaarter t -Test; ns = nicht signifikant, Signifikanz: $P > 0,05$; Fehlerbalken zeigt den Mittelwert und den Standardfehler). Die Abbildung wurde modifiziert nach Olgeiser et al., 2019 (Abb. 1B-F, EV1J).

2.2.3 Zellwandstress in *U. maydis* Hyphen

Wie bereits in Sporidien gezeigt werden konnte, war die *grp1Δ*-Mutante sensitiv gegenüber Zellwandstress. Aus diesem Grund wurde der Einfluss von Zellwandinhibitoren auch auf das hyphale Wachstum hin untersucht. Dazu wurde den *U. maydis* Kulturen drei Stunden nach der Induktion des hyphalen Wachstums CFW hinzugegeben und die Kulturen für weitere zwei Stunden inkubiert. Für die Untersuchung wurde die minimale Hemmkonzentration (2,5 μM) gewählt, bei der das Wachstum der Kontrollstämmen (*grp1B-gfp* bzw. *rrm4-gfp*) nicht signifikant beeinflusst wurde. Abbildung 2.3E zeigt exemplarisch mikroskopische Aufnahmen von Hyphen des *grp1Δ*-Stammes sowie des entsprechenden Kontrollstammes *grp1B-gfp* nach Wachstum im CFW-haltigen Medium. Die Zugabe von CFW führte in beiden Stämmen zunächst zu einer morphologischen Veränderung der Zellwand. Dies ist sowohl an der Krümmung der Hyphe als auch an der Einlagerung von CFW, an der entsprechenden Stelle zu sehen (Abb. 2.3E, mit einem Plus gekennzeichnet). Die Hyphen der *grp1*-Deletionsmutante zeigten nach CFW Zugabe deutliche Veränderungen in der Morphologie auf. Die Hyphen zeigten zahlreiche Verdickungen, Einschnürungen und ungleichmäßige Einlagerungen des Farbstoffes in der Zellwand (Abb. 2.3E, mit Pfeilen markiert). Um eine quantitative Aussage über die Wirkung von CFW auf eine wachsende Hyphe machen zu können, wurden die Hyphen, ihrer Morphologie entsprechend, in zwei Klassen unterteilt. Als morphologisch auffällig und somit „gestresst“ wurden alle Hyphen eingestuft, die Verdickungen und/oder Einschnürungen aufwiesen (Abb. 2.3E rechts, Position der Pfeile, Abb. 2.3F). Als morphologisch unauffällig und somit als „normal“ wurden Hyphen ohne Verdickungen oder Einschnürungen in dem neugebildeten Teil der Hyphe nach CFW Zugabe gezählt (Abb. 2.3E und F). Im Gegensatz zum Kontrollstamm wurde die Zellwandmorphologie des *grp1*-Deletionsstammes durch CFW signifikant verändert. So konnten morphologische

Auffälligkeiten bei ca. 90 % der Hyphen nach der Behandlung mit CFW detektiert werden. CFW hatte jedoch keinen Einfluss auf die Zellwand in der *rrm4Δ*-Mutante (Abb. 2.3F).

Die divergenten phänotypischen Auswirkungen zwischen der *grp1Δ*- und der *rrm4Δ*-Mutante, deuten daraufhin, dass Grp1B wichtige Funktionen außerhalb des endosomalen Transports in der Zelle übernehmen könnte. Im Gegensatz zu Rrm4, das wichtig für das unipolare Hyphenwachstum ist, ist Grp1B wichtig für die Kontrolle des Längenwachstums, sowohl in den Sporidien als auch in den Hyphen. Der Verlust von *grp1* führt nicht, wie bei der *rrm4* Deletion, zu vermehrt bipolar auswachsenden Filamenten, sondern zu einer Elongation der Hyphen und Sporidien. Die Sensitivität der *grp1Δ*-Mutante gegenüber Kälte- und Zellwandstress könnten darauf hindeuten, dass Grp1B als ein Stressregulator fungieren könnte.

2.3 Grp1B ist eine neue Komponente des endosomalen Rrm4-abhängigen mRNP-Komplexes

Die Charakterisierung der *grp1Δ*-Mutante sowie der phänotypische Vergleich zwischen Grp1B und Rrm4 haben ergeben, dass Grp1B in andere zellbiologische Prozesse als Rrm4 involviert ist. Da Grp1B jedoch im Zuge der Koimmunopräzipitationsanalyse als ein putativer Interaktionspartner von Rrm4 identifiziert wurde, wurde die subzelluläre Lokalisation von Grp1B untersucht. Thomas Pohlmann zeigte bereits in seiner Dissertation, dass beide Isoformen in mobilen zytoplasmatischen Einheiten lokalisieren und sich bidirektional in den Hyphen bewegen (Dissertation Thomas Pohlmann, 2013). Um herauszufinden ob Grp1B und Rrm4 Teil der selben zytoplasmatischen Einheiten sind, wurden Kollokalisationsstudien durchgeführt.

2.3.1 Grp1B lokalisiert auf Endosomen, im Zytoplasma und im Zellkern

Für die Lokalisationsanalysen wurde der Stamm *grp1B-gfp* sowie die Kontrollstämme *rrm4-gfp* und *pab1-gfp* verwendet. Sowohl die Synthese von Grp1B-Gfp als auch Rrm4-Gfp waren in der Lage, den jeweiligen Deletionsphänotyp zu kompensieren. Folglich sind diese Proteine funktionell (Abb. 2.1, 2.3, (Becht et al., 2006)). Die Funktion von Pab1-Gfp wurde in vorhergehenden Studien in *S. cerevisiae* überprüft (König et al., 2009). Wie schon bereits in der Dissertation von Thomas Pohlmann gezeigt, konnte auch in dieser Arbeit bestätigt werden, dass Grp1B-Gfp, wie auch Rrm4-Gfp und Pab1-Gfp, auf sich bewegenden Einheiten lokalisieren (Abb. 2.4A).

Im Gegensatz zu Rrm4-Gfp, das ausschließlich auf frühen Endosomen lokalisiert, zeigten Grp1B-Gfp und Pab1-Gfp ein stärkeres zytoplasmatisches Signal. Dies deutet auf eine zytoplasmatische Lokalisation der beiden Proteine hin (Abb. 2.4A). Im Vergleich zu Pab1-Gfp, das nicht im Zellkern lokalisiert, wurde die Lokalisation von Grp1B-Gfp auch im Zellkern beobachtet (Abb. 2.4A, Nukleus ist mit einem N markiert), obwohl Grp1B kein annotiertes NLS (*nuclear localisation signal*) aufweist. Grp1B könnte durch die Bindung an mRNAs mit diesen zusammen den Nukleus verlassen und durch den Kotransport mit anderen Proteinen in den Zellkern zurück transportiert werden, so wie es für *AtGRP7* beschrieben wurde (Kim et al., 2008; Ziemienowicz et al., 2003).

Um herauszufinden, ob sich die Grp1B-Gfp, Rrm4-Gfp und Pab1-Gfp positiven Partikel gleich schnell in der Hyphe bewegen, wurde deren Geschwindigkeit gemessen. Die Geschwindigkeit lag

durchschnittlich bei 2,6 $\mu\text{m/s}$, war unter den drei untersuchten Proteinen vergleichbar und entsprach der Geschwindigkeit von Rrm4-positiven Endosomen (Abb. 2.4B). Das Grp1B-Gfp nicht ausschließlich auf Endosomen lokalisiert, sondern auch im Zytoplasma und dem Zellkern, unterstreicht die phänotypischen Analysen, bei denen deutlich wurde das Grp1B nicht dieselben Aufgaben in der Zelle hat wie Rrm4.

2.3.2 Grp1B und Rrm4 kolokalisieren auf identischen Endosomen

Das Pab1 mit Rrm4-positiven Endosomen kolokalisiert war bereits bekannt (Abb. 2.4C; (Baumann et al., 2014; König et al., 2009)). Ob Grp1B-Gfp auf denselben Endosomen vorzufinden ist wie Rrm4-Gfp und Pab1-Gfp, wurde mittels Kolokalisationsstudien analysiert. Dazu wurde ein Stamm verwendet, der sowohl Grp1B-Gfp als auch Rrm4-tag-Rfp (tRfp) bzw. Pab1-mCherry unter den jeweiligen nativen Promotoren exprimiert (*rrm4-trfp/grp1B-gfp*, *pab1-mcherry/grp1B-gfp* und *pab1-mcherry/rrm4-gfp*). Diese Stämme ermöglichten die zeitgleiche Detektion von Grp1B-Gfp mit Rrm4-tRfp oder Pab1-mCherry. Die mobile Fraktion der Grp1B-Gfp Proteine kolokalisierten nahezu zu 100 % mit Rrm4-tRfp auf sich bewegenden Endosomen (Abb. 2.4C und D). Auch die Kolokalisation mit Pab1-Gfp belief sich auf nahezu 100 % (Abb. 2.4C und D). Die Kolokalisationsanalysen demonstrieren somit, dass Grp1B auf denselben Endosomen transportiert wird wie Rrm4 und Pab1.

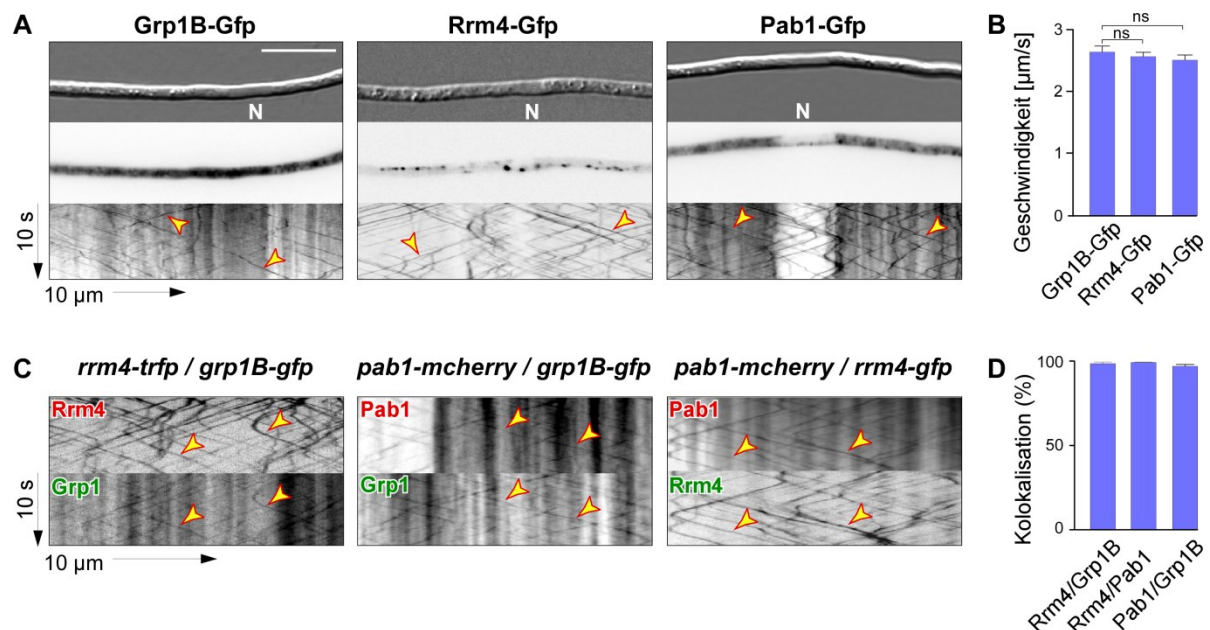


Abbildung 2.4 Grp1B kolokalisiert mit Pab1 auf Rrm4-positiven Endosomen **A)** Ausschnitte aus der Mitte von Hyphen der Stämme *grp1B-gfp*, *rrm4-gfp* und *pab1-gfp* 6h nach Induktion der Hyphenbildung. DIC-, Gfp-Einzelbilder und Kymographen sind untereinander gezeigt. N markiert den Nukleus. Größenstandard: 10 μm . **B)** Das Balkendiagramm zeigt die Geschwindigkeit der Partikel von Rrm4-Gfp, Grp1B-Gfp und Pab1-Gfp in $\mu\text{m/s}$ ($n = 3$ Experimente, pro Experiment wurden mindestens 11 Hyphen analysiert, Fehlerbalken

zeigt den Mittelwert und den Standardfehler an; gepaarter *t*-Test, ns = nicht signifikant, Signifikanz: $P > 0,05$). **C)** Kolokalisation von Rrm4-tRfp mit Grp1B-Gfp, Pab1-mCherry mit Grp1B-Gfp und Pab1-mCherry mit Rrm4-Gfp. Die gelben Pfeile im Kymographen heben die Kolokalisation zwischen zwei Partikeln hervor. **D)** Das Balkendiagramm zeigt die Anzahl der rot-fluoreszierenden Signale, die mit grün-fluoreszierenden Signalen kolokalisieren ($n = 3$ Experimente, pro Experimente wurden 11 Hyphen analysiert, Fehlerbalken zeigt den Mittelwert und den Standardfehler). Die Abbildung wurde modifiziert nach Olgeiser et al., 2019 (Abb. 2A-D).

2.3.3 Die Lokalisation von Grp1B auf Endosomen ist abhängig von Rrm4

Um zu untersuchen, ob Grp1B die endosomale Lokalisation und die Mobilität von Rrm4 beeinflusst, wurde die Auswirkung der *grp1*-Deletion auf Rrm4 untersucht. Dazu wurde ein Stamm verwendet der Rrm4-Gfp exprimiert und in dem der *grp1* Locus deletiert vorlag (*rrm4-gfp/grp1Δ*). Rrm4-Gfp lokalisierte weiterhin auf sich bewegendes Endosomen die sich mit einer durchschnittlichen Geschwindigkeit von $2,6 \mu\text{m/s}$ in der Hyphe bewegten (Abb. 2.5A und B). Die Deletion von *grp1* hat somit weder einen Einfluss auf die Lokalisation noch auf die Mobilität von Rrm4-Gfp.

In vorangegangenen Studien konnte gezeigt werden, dass der Transport von mRNAs und dem assoziierten Protein Pab1-Gfp Rrm4 abhängig ist (Abb. 2.5C; (Baumann et al., 2014)). Deshalb wurde als nächstes überprüft, ob eine *rrm4* Deletion die Lokalisation von Grp1B beeinflusst. Dazu wurde in dem Stamm *grp1B-gfp* der *rrm4*-Locus deletiert (*grp1B-gfp/rrm4Δ*). Die Deletion von *rrm4* führte, ähnlich wie bei Pab1, zum Verlust von Grp1B-Gfp auf den Endosomen (Abb. 2.5C). Somit ist Rrm4 wichtig für die endosomale Lokalisation von Pab1 und Grp1B.

Darüber hinaus wird Rrm4 benötigt, um die mRNAs und somit die mit den mRNAs assoziierten Pab1-Proteine gleichmäßig in der Zelle zu verteilen. In Abwesenheit von Rrm4 findet eine Akkumulation des Pab1-Proteins in der Nähe des Zellkerns statt (Abb. 2.5D und E; (König et al., 2009)). Ob Rrm4 auch die Verteilung von Grp1B-Gfp beeinflusst wurde ebenfalls untersucht. Dazu wurde die Verteilung von Grp1B-Gfp in dem *rrm4*-Deletionsstamm analysiert. Die Deletion von *rrm4* führte nicht nur zum Verlust der endosomalen Lokalisation, sondern auch zur Ausbildung eines Grp1B-Gfp Proteingradienten (Abb. 2.5D und E). Dabei war die Akkumulation von Grp1B-Gfp und Pab1-Gfp um den Zellkern herum erhöht und nahm zur Zellperipherie hin ab. Somit ist Rrm4 wichtig für den Transport und die Verteilung von Grp1B in der Hyphe.

2.3.4 Die Interaktion zwischen Grp1B und Rrm4 wird über die gemeinsam gebundenen mRNAs vermittelt

Wie bereits erwähnt ist Rrm4, neben der gleichmäßigen Verteilung von Grp1B-Gfp und Pab1-Gfp, maßgeblich für die Verteilung von mRNAs verantwortlich. Verliert Rrm4 seine Fähigkeit mRNAs zu binden, wie zum Beispiel durch Mutationen in den RRM Domänen oder deren Deletion, so kann Pab1-Gfp nicht länger auf Endosomen detektiert werden. Der Phänotyp entspricht dann dem der *rrm4*-Deletionsmutante (Abb. 2.5C bis F; (Baumann et al., 2014)). Um zu überprüfen, ob der Interaktionsverlust zwischen Rrm4 und mRNAs einen Einfluss auf die Grp1B Lokalisation und

dessen Gradientenbildung hat, wurde der Stamm *grp1-gfp/rrm4^{mR123}-trfp* untersucht. Dieser Stamm kodiert eine Rrm4 Variante, die in jeder der drei RRM Domänen Aminosäure-Substitutionen enthält. Dadurch ist die Affinität von Rrm4 zu mRNAs stark reduziert (Becht et al., 2006). Die Lokalisation auf Endosomen wird jedoch nicht beeinflusst, weil diese über die MLLE-Domäne vermittelt wird (Abb. 2.5F, (Pohlmann et al., 2015)). Der Interaktionsverlust zwischen Rrm4 und der mRNA führt dazu, dass Grp1B-Gfp nicht länger auf Endosomen lokalisiert. Dies wiederum induziert, wie auch bei der *rrm4*-Deletion, die Ausbildung eines Grp1B-Gfp-Gradienten (Abb. 2.5F). Diese Analyse verdeutlicht, dass der Grp1B Transport in der Hyphe durch die von Rrm4 gebunden mRNAs erfolgt.

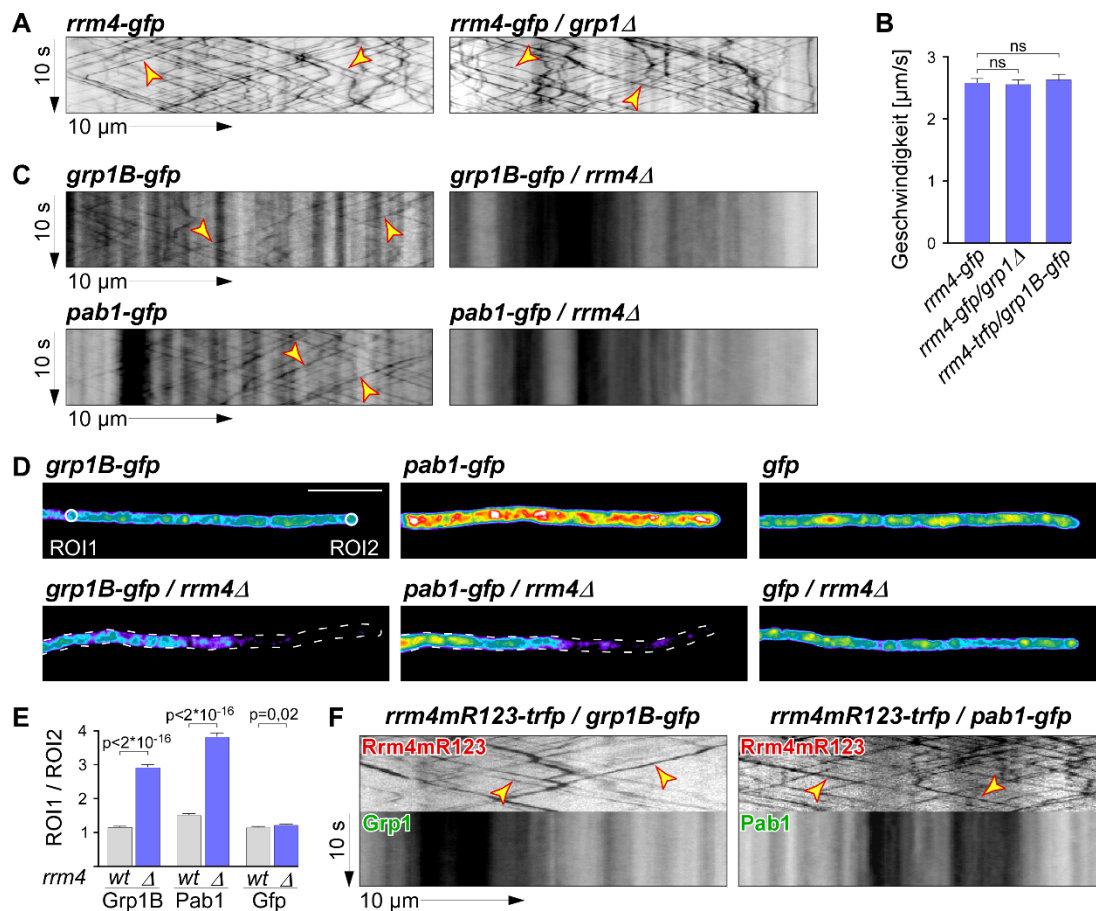


Abbildung 2.5 Grp1B ist ein Teil des Rrm4-positiven endosomalen mRNA-Protein Komplexes **A)** Die Kymographen zeigen die Auswirkung der *grp1*-Deletion auf die Rrm4 Lokalisation. Mikroskopiert wurden die Stämme *rrm4-gfp* und *rrm4-gfp/grp1Δ*. **B)** Das Balkendiagramm zeigt die Geschwindigkeit der Partikel von Rrm4-Gfp (*rrm4-gfp*), Rrm4-Gfp in Abwesenheit von *grp1* (*rrm4-gfp/grp1Δ*) und Anwesenheit von Grp1B-Gfp (*rrm4-trfp/grp1B-gfp*) in μm/s (n = 3 Experimente, pro Experiment wurden mindestens 10 Hypphen analysiert, Fehlerbalken zeigt den Mittelwert und den Standardfehler an; gepaarter *t*-Test, ns = nicht signifikant, $P > 0,05$). **C)** Die Kymographen zeigen die Lokalisation von Grp1B-Gfp und Pab1-Gfp in Anwesenheit von Rrm4 (links) und in der *rrm4*-Deletionsmutante (rechts). **D)** Einfluss der Rrm4-Deletion auf die Proteinverteilung von Grp1B-Gfp, Pab1-Gfp und Gfp. Gezeigt ist jeweils ein Fluoreszenzbild mit

Falschfarben zu besseren Visualisierung des Gradienten. Größenstandard: 10 μm . **E)** Das Balkendiagramm zeigt das Verhältnis zwischen dem Gfp-Signal ca. 10 μm vom Nukleus entfernt (*region of interest*: ROI I) und dem Gfp-Signal an der Hyphenspitze (ROI II) (ROI = 2 μm^2 ; n > 150 Hyphen; ungepaarter *t*-Test; P < 0,05; Fehlerbalken zeigt den Mittelwert und den Standardfehler an). **F)** Die Kymographen zeigen die Lokalisation von Grp1B-Gfp und Pab1-Gfp in Anwesenheit einer Rrm4-Variante, deren RRM Domänen in ihrer RNA-Bindfähigkeit reduziert sind. Mikroskopiert wurden die Stämme *rrm4mR123-trfp/grp1-gfp* und *rrm4mR123-trfp/pab1-gfp*. Die Abbildung wurde modifiziert nach Olgeiser et al., 2019 (Abb. 2E-J).

Das kleine Glyzin-/Glutamin-reiche RNA-bindende Protein Grp1B lokalisiert auf Rrm4-positiven Endosomen. Somit ist Grp1B eine neue Komponente des Rrm4-mRNPs. Die Kolo-kalisation zwischen Rrm4 und Grp1B wird dabei über die mRNA vermittelt. Die Deletion von Grp1B beeinflusst die Lokalisation von Rrm4 nicht. Obwohl Grp1B ein Teil des Rrm4-mRNPs ist, ist das Protein für den endosomalen Transport nicht essentiell. Neben der endosomalen Lokalisation ist Grp1B auch im Zellkern und Zytoplasma zu finden, was für ein weitere Rrm4-unabhängige Funktion des Proteins spricht.

2.4. Optimierung der iCLIP Methode in *Ustilago maydis*

iCLIP ist die Methode der Wahl, um Protein-RNA Interaktionen in lebenden Zellen zu untersuchen. Neben der Analyse der assoziierten mRNAs ermöglicht die Methode die Identifizierung von Proteinbindestellen mit einer nukleotidgenauen Auflösung. Mit der Etablierung der iCLIP Methode in *U. maydis* konnte demonstriert werden, dass Rrm4 die Funktion des globalen mRNA Transports in den Hyphen von *U. maydis* übernimmt (Dissertation Carl Haag, 2013). Trotz des so bereits erlangten Einblicks in die Funktion von Rrm4 waren die generierten iCLIP-Banken nicht ausreichend gesättigt und unterlagen Schwankungen in ihrer Reproduzierbarkeit. Aus diesem Grund wurde das iCLIP Protokoll in dieser Arbeit optimiert. Dabei sollten mit Grp1B, als ein neues RBP des endosomalen Transports, und Rrm4 vergleichende iCLIP-Analysen durchgeführt werden. Dies wurde mit Hilfe einer umfangreichen Studie zur Optimierung der Methode erzielt.

Von besonderer Bedeutung für erfolgreiche iCLIP Experimente sind die schnelle und effektive Aufreinigung des Protein-RNA Komplexes und die Bestimmung einer Protein-spezifischen UV-Dosis für die Quervernetzung. Deshalb sollen diese zwei Optimierungsschritte im Folgenden näher beschrieben werden. Eine Übersicht über die einzelnen Optimierungsschritte wird in Tabelle 2.1 gegeben.

Tabelle 2.1: Optimierung der iCLIP Methode in *U. maydis*

Original Protokoll	Optimierungen	Grund/Vorteile der Optimierung
Tap-Aufreinigung	Gfp-Trap	Schnelle und effiziente Aufreinigung steigert die Ausbeute
OD₆₀₀ der Hauptkultur: 0,8-1,0	OD ₆₀₀ der Hauptkultur: 0,5	Geringere Zelldichte reduziert den Zellstress und den Abbau von Proteinen und RNAs und erhöht somit die Ausbeute des Protein-RNA Komplexes
Lösen des Zellpellets einer 150 ml Kultur in 5 mL Lysispuffer	Lösen des Zellpellets einer 150 ml Kultur in 15 ml 1x PBS-Puffer	i) Lysispuffer greift die Zellen bereits vor dem Zellaufschluss an; das Lösen im PBS-Puffer reduziert die Stressantwort und erhöht die Ausbeute ii) Übereinanderliegende Hyphen werden nicht gleichmäßig mit UV-Licht bestrahlt; Verdünnung der Zellsuspension ermöglicht eine gleichmäßige und reproduzierbare Bestrahlung aller Zellen
UV-Bestrahlung: 3 × 160 mJ/cm²	UV-Bestrahlung: 1 × 200 mJ/cm ²	Erhöhung der Quervernetzungsereignisse, führt zur Konzentrationserhöhung des Protein-RNA Komplexes
DNaseI Behandlung	keine DNaseI Behandlung	DNA interferiert nicht mit der Aufreinigung des Protein-RNA Komplexes in <i>U. maydis</i> ; durch den Verzicht der DNaseI Behandlung bei 37 °C wird die alkalische Hydrolyse reduziert
RNaseI Behandlung	keine partielle RNaseI Behandlung	Hohe intrinsische RNase Aktivität erlaubt es auf die Zugabe externer RNasen zu verzichten, wodurch eine effiziente Aufreinigung längerer RNA Fragmente in höher Konzentration ermöglicht wird
pH-Wert Einstellung der verwendeten Puffer bei Raumtemperatur	pH-Wert Einstellung der verwendeten Puffer bei der entsprechenden Arbeitstemperatur	pH-Wert Tris-basierter Puffer ist Temperatur abhängig (sinkende Temperatur führt zu Erhöhung des pH-Wertes); Stabiler niedriger pH-Wert verhindert die alkalische Hydrolyse der RNA
Phenol/Chloroform pH 4.3	Phenol/Chloroform pH 6.7	Ligation des L3-Adapters an die RNA erzeugt ein DNA-RNA Hybrid. Ein neutraler pH reduziert den Verlust des DNA-RNA Hybrides an die Phenol-Phase
Transfer der radioaktiven RNA in die PCR	Alkalische Hydrolyse der radioaktiven RNA nach der reversen Transkription	Alkalische Hydrolyse der markierten RNA reduziert das radioaktive Signal und verhindert somit die Inhibierung des Zirkularisationsprozesses der cDNA
Keine Phenol/Chloroform Aufreinigung nach der cDNA Gelelution	Zusätzliche Phenol/Chloroform Extraktion nach der cDNA Gelelution	Durch das Entfernen der Urea Reste, wird eine höhere Reinheit der cDNA erreicht, wodurch die Zirkularisationseffizienz erhöht wird
Präparative PCR im selben Volumen wie die Test-PCR	Volumenerhöhung des präparativen PCR-Reaktionsansatzes	Erhöhung der cDNA Konzentration im präparativen PCR-Ansatz erhöht zeitgleich die Salzkonzentration und führt somit zur Inhibierung der PCR-Reaktion. Die Verdünnung des PCR-Ansatzes optimiert die Amplifikation der cDNA

2.4.1 Optimierung der Protein-Aufreinigung

In Pilzen ist die Konzentration an Proteinasen und Ribonukleasen sehr hoch (de Souza et al., 2015). Dies kann zu unerwünschten Degradation der zu isolierenden Proteinen und RNAs führen. Um den Abbau des Proteins und der gebundenen mRNAs zu reduzieren, ist eine schnelle und effiziente Aufreinigungsstrategie erforderlich. Für die Aufreinigung von Rrm4 wurde anfänglich ein Stamm verwendet, der Rrm4 mit einem C-terminalen Gfp sowie einem Tap-Epitop (*tandem affinity purification*) endogen exprimiert (Rrm4-Gfp-Tap; (Becht et al., 2006; Rigaut et al., 1999)). Das Tap-Epitop besteht aus einem Calmodulin-bindenden Peptid, einer TEV-Protease Schnittstelle (*tobacco etch virus*) sowie zwei IgG-bindenden Domänen des Proteins A (Rigaut et al., 1999). Die Tandemaffinitätsaufreinigung basiert auf einer zweistufigen Affinitätschromatografie. Zunächst erfolgt die Bindung des Protein A an die IgG immobilisierte Agarosematrix. Durch die Zugabe der TEV-Protease wurde Rrm4-Gfp an der entsprechenden Stelle hydrolysiert. Die Abspaltung der Protein A-Domäne verringerte das Molekulargewicht des Proteins (Abb. 2.6A; links; Spalte vor TEV: 134 kDa; nach TEV: 118 kDa). Im zweiten Aufreinigungsschritt bindet das Calmodulin-bindende Peptid an die Calmodulin-Matrix, wodurch die Aufreinigung von Rrm4-Gfp erfolgte. Anhand der in Abbildung 2.6A gezeigten Silbergefärbung (links), dem Western Blot (mittig) und dem Autoradiogramm (rechts) wird deutlich, welche Nachteile diese Art der Aufreinigung mit sich bringt. Zum einen hydrolysierte die TEV-Protease bei 4 °C das Fusionsprotein nicht effizient, so dass Rrm4 nach der Restriktion weiterhin auf der IgG-Matrix detektiert werden konnte (Raran-Kurussi et al., 2013). Zum anderen ist die Tap-Aufreinigung sehr zeitaufwändig, wodurch der Protein-RNA Komplex schneller degradiert wurde. Dies wird vor allem im Autoradiogramm deutlich (Abb. 2.6A, rechts). Die Intensität des radioaktiven RNA Signals war an der Stelle des Molekulargewichtes des entsprechenden Proteins sehr stark, was auf die Anreicherung kurzer RNA Fragmente hindeutete (Abb. 2.6A, rechts). Je länger die quervernetzten RNAs sind, desto diffuser ist das Signal des Protein-RNA Komplexes.

Um die Protein-RNA Komplexe schneller und effizienter zu isolieren, wurde die Tap-Aufreinigung durch die Gfp-Trap der Firma Chromotek ersetzt (Rothbauer et al., 2008). Die Gfp-Trap basiert auf der Kopplung eines α -Gfp-Nanobodies (Antikörper aus Alpaka, bestehend nur aus einer schweren Kette) an eine magnetischen Matrix und erlaubt eine schnellere und effizientere Aufreinigung von Gfp-Fusionsproteinen. In Abbildung 2.6B ist exemplarisch ein Western Blot von einer Gfp-Trap Aufreinigung zu sehen. Aufgereinigt wurden die Proteine Rrm4-Gfp, Grp1B-Gfp und Gfp. Zum einen ist zu erkennen, dass die Protein Konzentration von Grp1B-Gfp und Gfp höher zu sein scheint als die von Rrm4-Gfp, so dass die Matrix bereits gesättigt war und deshalb die Proteine auch in der Durchfluss-Fraktion (FT) detektiert werden konnte. Dieser Umstand wurde in den darauffolgenden Experimenten durch die Erhöhung des Matrix-Volumens behoben.

Die Proteindegradierung konnte auch mit Verwendung der schnelleren Gfp-Trap Technik nicht verhindert werden. Trotz der Degradation war die Proteinausbeute mit der Gfp-Trap höher als mit der Tap-Aufreinigung. Das entscheidende war jedoch, dass die RNAs, die an das Protein quervernetzt wurden, weniger abgebaut wurden, wodurch die Isolierung längerer RNAs möglich war. Dies ist besonders gut im Autoradiogramm an der Verteilung des radioaktiven Signals,

welches repräsentativ für RNAs ist, zu sehen. In Abbildung 2.6C werden jeweils zwei Replikate der Protein-RNA Komplexe für alle drei Proteine gezeigt. Aus diesen Ergebnissen können folgende Schlussfolgerungen gezogen werden:

- 1) Das radioaktive Signal unterscheidet sich zwischen den jeweiligen Replikaten kaum. Dies deutet darauf hin, dass die Aufreinigung der Protein-RNA Komplexe reproduzierbar ist.
- 2) Die Isolierung längerer RNA-Fragmente war erfolgreich. Besonders der Vergleich zwischen dem Rrm4-Gfp-Tap-RNA Komplex (Abb. 2.6A, rechts) und Rrm4-Gfp-RNA Komplex (Abb. 2.6C) macht deutlich, wie sich die optimierte Aufreinigungsstrategie auf die RNA-Länge auswirkt. Exemplarisch wird in Abbildung 2.6D gezeigt, wie sich die Länge der quervernetzten RNAs auf die Größenauftrennung des Grp1B-Gfp-RNA Komplexes auswirkt. Je länger die RNAs sind, die mit Grp1B-Gfp quervernetzt wurden, desto stärker wurde das Molekulargewicht des Fusionproteins erhöht (vgl. Abb. 2.6D, Region A im Bild rechts und links). Je kürzer die RNAs waren, desto näher befanden sich die Protein-RNA Komplexe am freien Protein (vgl. Abb. 2.6D, Region D im Bild rechts und links).
- 3) Für die Negativkontrolle Gfp, welches kein RBP ist, wurde ein schwaches radioaktives Signal detektiert. Das Gfp unspezifisch an RNAs quervernetzt werden kann, wurde ebenfalls in anderen Studien beobachtet (Castello et al., 2012; Meyer et al., 2017).
- 4) Der im Western Blot beobachtete Unterschied in der Proteinmenge zwischen den zwei RBPs hat auch Bestand in der Intensität des radioaktiven Signals. Das Signal für den Rrm4-Gfp-RNA Komplex ist wesentlich schwächer als das für den Grp1B-Gfp-RNA Komplex.
- 5) Neben dem Rrm4-Gfp-RNA- bzw. Grp1B-Gfp-RNA-spezifischen Signal, sind keine weiteren Signale zu sehen. Dies spricht für eine effiziente Aufreinigung der Komplexe mit einem hohen Reihnheitsgrad.

Durch die Verwendung der Gfp-Trap konnten sowohl die Ausbeute der Protein-RNA Komplexe als auch die Reproduzierbarkeit der Aufreinigung gesteigert werden und längere RNAs für Rrm4 und Grp1B isoliert werden.

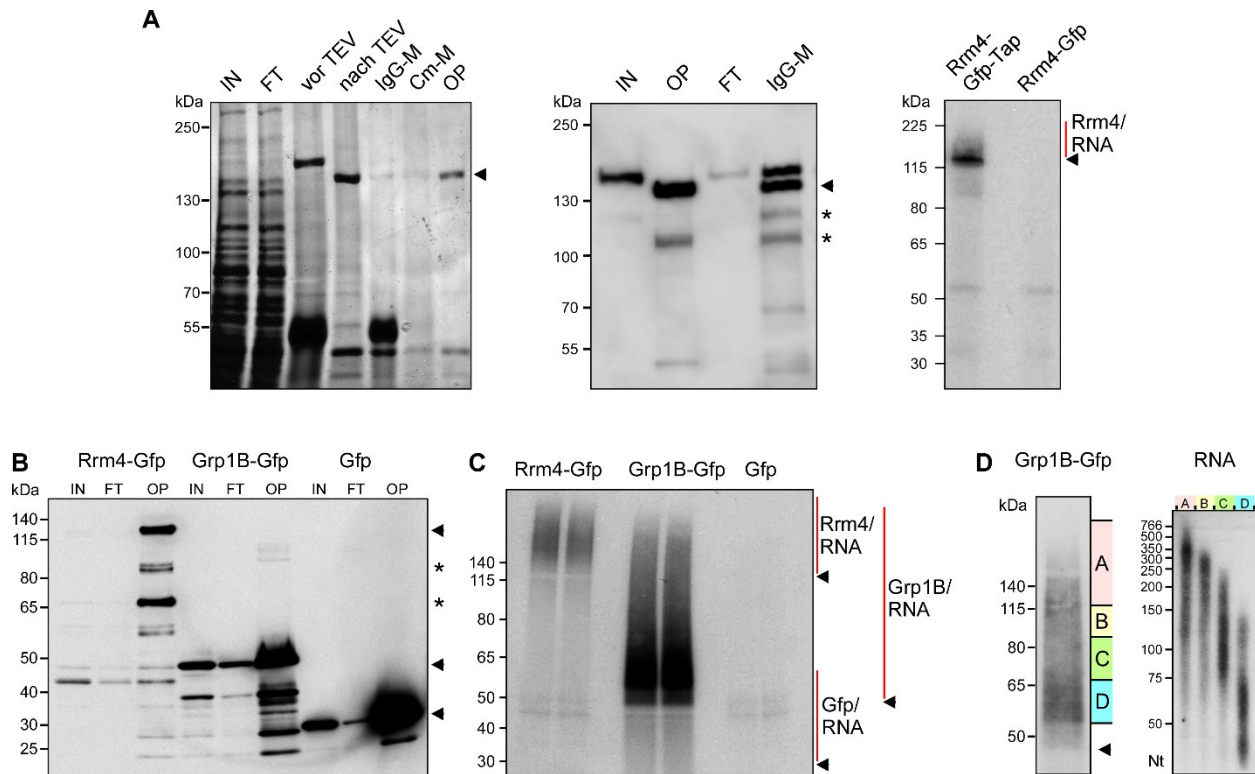


Abbildung 2.6 Optimierung der Aufreinigungsstrategie **A)** Links: Silbergel der Tap-Aufreinigung von Rrm4-Gfp-Tap. Aufgetragen wurde von links nach rechts; IN: *input* (Proteinrohextrakt), FT: *flow-through* (Durchfluss), vor der Zugabe der TEV-Protease war das erwartete Molekulargewicht von Rrm4-Gfp-Tap 134 kDa, nach der TEV-Protease Inkubation verringerte sich das Molekulargewicht von Rrm4-Gfp-Tap auf 118 kDa, IgG-M: Matrix mit immobilisierten IgG-Antikörpern, Cm-M: Calmodulin-Matrix, OP: *output* (Ausbeute). Mitte: Western Blot der Tap-Aufreinigung von Rrm4-Gfp-Tap. Das Protein wurde mit dem α -Gfp Antikörper detektiert. Bezeichnung der Spuren wie im linken Bild. Rechts: Das Autoradiogramm zeigt Rrm4-Gfp-Tap und Rrm4-Gfp nach UV-Bestrahlung. Bestrahlt wurden die Hyphen mit $3 \times 160 \text{ mJ/cm}^2$. Nach jeder Bestrahlungsrunde wurden die Zellen durch Schwenken gemischt. Der Protein-RNA Komplex wurde mittels Tap-Aufreinigung isoliert, die RNA am 5' Ende radioaktiv markiert, mittels SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend auf die Nitrozellulosemembran transferiert. Die Aufreinigung des Protein-RNA Komplexes ist nur in Anwesenheit eines Tap-Epitops möglich (Die Pfeile markieren das Rrm4-Gfp Vollängenproteine nach der Spaltung durch die TEV-Protease; die Sternchen markieren die Abbaubanden von Rrm4; die Protein-RNA Komplexe sind rot markiert). **B)** Western Blot einer Gfp-Trap von Rrm4-Gfp, Grp1B-Gfp und Gfp. Das Protein wurde mit dem α -Gfp Antikörper detektiert. Bezeichnung der Spuren wie in A (Die Pfeile markieren die Vollängenproteine). **C)** Das Autoradiogramm zeigt jeweils zwei Replikate für Rrm4-Gfp, Grp1B-Gfp und Gfp. Die Protein-RNA Komplexe wurden nach der UV-Bestrahlung ($1 \times 200 \text{ mJ/cm}^2$) mit Gfp-Trap aufgereinigt, die RNA radioaktiv markiert und nach der SDS-PAGE und dem Transfer auf die Nitrozellulosemembran visualisiert (Die Protein-RNA Komplexe sind rot markiert). **D)** Das Autoradiogramm (links) zeigt den Grp1B-Gfp-RNA Komplex nach einer SDS-PAGE und dem Transfer auf die Nitrozellulosemembran. Die radioaktiv markierte RNA erlaubt die Visualisierung des Komplexes. Aufgrund der unterschiedlichen RNA Längen im Komplex wird das Molekulargewicht des Proteins erhöht. Das Signal breitet sich somit, ausgehend vom erwarteten Proteingewicht, in der Spur nach oben aus. Um die RNA Länge zu bestimmen, wurden verschiedene Membranareale, gekennzeichnet mit A-D, ausgeschnitten, die RNA isoliert und auf einem denaturierenden Urea-Polyacrylamidgel separiert (rechts). Die Abbildung wurde modifiziert nach Olgeiser et al., 2019 (Abb. EV2A).

2.4.2 Optimierung der Quervernetzungseffizienz

Der zweite essentielle Optimierungsschritt wurde durch die Erhöhung der Quervernetzungseffizienz erzielt. Dazu musste die Protein-spezifische UV-Dosis bestimmt werden. Durch die UV-Bestrahlung der lebenden Zellen bei einer Wellenlänge von 254 nm wird eine kovalente Bindung zwischen Proteinen und der gebundenen Nukleinsäure erzeugt, die die Aufreinigung der Komplexe ermöglicht (s. Einleitung Kapitel 1.4; (Greenberg, 1979; Hockensmith et al., 1986; König et al., 2010; Ule et al., 2005)). Da die kovalente Bindung von der Gegenwart photoaktiver Aminosäuren innerhalb des Bindemotives und der gebundenen Basen der Nukleinsäure abhängig ist ist es notwendig, die optimale UV-Dosis für jedes zu untersuchende RBP zu bestimmen. Im ursprünglichen Protokoll wurden die lebenden *U. maydis* Hyphen drei Mal mit 160 mJ/cm^2 bestrahlt, wobei nach jedem Bestrahlungsschritt pausiert wurde (Dissertation Carl Haag, 2013). In den Pausen wurden die Hyphen durch Schwenken der Petrischale durchmischt. Die Durchmischung sollte zum einen dafür sorgen, dass alle Hyphen einer gleichmäßigen Bestrahlung ausgesetzt wurden und zum anderen sollte die Hitzeentwicklung, die bei der Bestrahlung entsteht, reduziert werden. Um herauszufinden, ob eine Korrelation zwischen der Bestrahlungsintensität und der Anzahl der Quervernetzungsereignisse für Rrm4-Gfp und Grp1B-Gfp besteht, wurden die Hyphen ein bis vier Mal mit 160 mJ/cm^2 bestrahlt. Die Protein-RNA Komplexe wurden mittels Gfp-Trap isoliert, die quervernetzten RNAs am 5'Ende radioaktiv markiert und mittels SDS-PAGE ihrer Größe nach aufgetrennt. Anschließend wurden die Protein-RNA Komplexe auf eine Nitrozellulosemembran transferiert und die markierten RNAs auf einem Röntgenfilm visualisiert (Abb. 2.7A und B).

Das Ergebnis in Abbildung 2.7A zeigt, dass die Auswirkung der UV-Intensität einen Einfluss auf den Protein-RNA Komplex hat und proteinspezifisch ist. Mit zunehmender UV-Dosis wurden im Fall von Rrm4 sowohl die RNAs als auch das Rrm4 Protein degradiert (Abb. 2.7A links; oben Autoradiogramm und unten Western Blot). Eine UV-Dosis von $2 \times 160 \text{ mJ/cm}^2$ war bereits ausreichend, um das radioaktive Signal um etwa 50 % zu reduzieren (Abb. 2.7A, links). Im Vergleich zum Rrm4-RNA Komplex schien der Grp1B-RNA Komplex stabiler zu sein. Ein sichtbarer Abbau des Komplexes wurde bei einer UV-Intensität von $4 \times 160 \text{ mJ/cm}^2$ gemessen (Abb. 2.7A, mittig). Im Gegensatz zu den beiden untersuchten RNA-bindenden Proteinen wirkte sich die UV-Bestrahlung auf das Kontrollprotein Gfp invers aus. Während mit zunehmender UV-Intensität Gfp schrittweise degradiert wurde, nahm das radioaktive Signal, welches repräsentativ die unspezifische RNA-Quervernetzung darstellte, zu (Abb. 2.7A, rechts).

Das Ergebnis bestätigt, dass die Quervernetzungseffizienz proteinspezifisch ist und individueller UV-Bestrahlung bedarf. Durch die Modifikation der Probenbehandlung während der UV-Bestrahlung wurde zusätzlich festgestellt, dass die ursprüngliche Durchführung ungeeignet war.

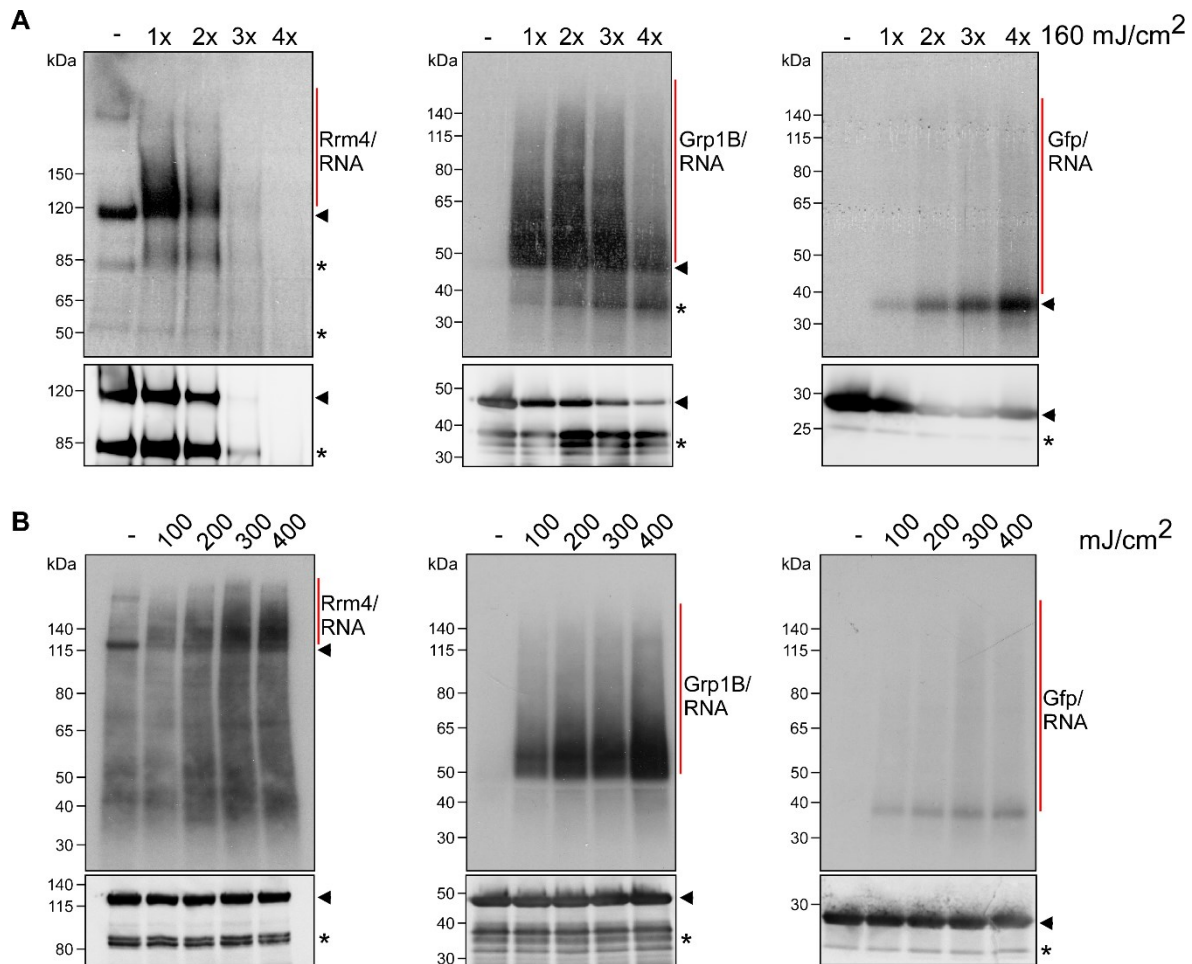


Abbildung 2.7 Optimierung der proteinspezifischen UV-Dosis **A)** Das Autoradiogramm zeigt Rrm4-Gfp-, Grp1B-Gfp- und Gfp-RNA Komplexe nach UV-Bestrahlung unterschiedlicher Dosen (1×160, 2×160, 3×160 und 4×160 mJ/cm²). Nach jeder Bestrahlungsrunde wurden die Zellen durch Schwenken gemischt. Der entsprechende Western Blot ist jeweils unter dem Autoradiogramm zu sehen. Für die Detektion der Proteine wurde ein α -Gfp Antikörper verwendet (Protein-RNA Komplexe sind rot markiert; die Pfeile markieren das Volllängenprotein, Rrm4-Gfp: 112 kDa, Grp1B-Gfp: 45 kDa und Gfp: 27 kDa; die Sternchen markieren Abbaubanden der Proteine). **B)** Das Autoradiogramm zeigt Rrm4-Gfp-, Grp1B-Gfp- und Gfp-RNA Komplexe nach UV Bestrahlung. Bestrahlt wurden die Hyphen mit 100, 200, 300 und 400 mJ/cm², die Zellen wurden nicht zusätzlich durchgemischt, sondern sofort nach der Bestrahlung geerntet. Der entsprechenden Western Blot ist jeweils unter dem Autoradiogramm zu sehen. Für die Detektion der Proteine wurde ein α -Gfp Antikörper verwendet (Markierungen wie in Abb. 2.6A). Die Abbildung wurde modifiziert nach Olgeiser et al., 2019 (Abb. EV2B und C).

Aufgrund des starken Abbaus des Protein-RNA Komplexes, der vor allem bei Rrm4-Gfp schwerwiegend war, wurde untersucht, ob dieser durch die UV-Intensität oder durch die Probenverarbeitung hervorgerufen wurde. Deshalb wurden die lebenden Zellen mit ansteigender UV-Dosis bestrahlt. Die Bestrahlung fand kontinuierlich statt, ohne jegliche Unterbrechung. Nach der UV-Behandlung wurden die Zellen unverzüglich geerntet und eingefroren. Es hat sich gezeigt, dass durch diese Vorgehensweise die Quervernetzungseffizienz

gesteigert und der Abbau aller untersuchten Proteine reduziert werden konnte (Abb. 2.7B). Bei allen drei Proteinen nahm die Signalintensität mit zunehmender UV-Dosis zu. Unter der optimalen UV-Dosis verteilte sich die Signalintensität gleichmäßig über die gesamte Spur. Bei Rrm4 ist eine UV-Dosis zwischen 100 und 200 mJ/cm² (Abb. 2.7B, links) und bei Grp1B zwischen 200 und 300 mJ/cm² optimal (Abb. 2.7B, mittig). Beim Gfp nahm die Signalintensität mit zunehmender UV-Dosis zu, was für die Zunahme von unspezifischen Gfp-RNA Interaktionen spricht (Abb. 2.7B, rechts). Da bei der Anwendung der iCLIP Methode Rrm4- und Grp1B-Gfp Fusionsproteine verwendet wurden, sollte die Konzentration der von Gfp unspezifisch gebundenen RNAs gering gehalten werden. Aus diesem Grund und um die beiden RBPs besser miteinander vergleichen zu können, wurde eine UV-Dosis von 200 mJ/cm² für alle weiteren Experimente gewählt. Die Ergebnisse der beiden Versuchsreihen zur Optimierung der UV-Bestrahlung haben gezeigt, dass sowohl die proteinspezifische UV-Dosis als auch die Handhabung der Proben während der Bestrahlung ausschlaggebend für eine höhere Protein-RNA Komplex Ausbeute sind.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass, neben den in Tabelle 2.1 aufgeführten Optimierungen, die effiziente Aufreinigungsstrategie, die proteinspezifische UV-Dosis sowie die Handhabung der Proben entscheidend für eine erfolgreiche Etablierung der iCLIP Methode in *U. maydis* waren.

2.4 Isolierung der Ziel-mRNAs von Grp1B und Rrm4

Um die gebundenen mRNAs der beiden endosomalen RBPs Rrm4 und Grp1B zu identifizieren, wurde das optimierte iCLIP Protokoll verwendet. Für jedes Protein wurden zwei biologische Replikate generiert. Das hyphale Wachstum wurde für 6 Stunden induziert, die Hyphen mit 200 mJ/cm² bei einer Wellenlänge von 254 nm bestrahlt und die Protein-RNA Komplexe mittels Gfp-Trap aufgereinigt. Nach der radioaktiven 5' Endmarkierung der RNAs wurden die Komplexe auf einer SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend auf die Nitrozellulosemembran transferiert. Die kovalente Quervernetzung zwischen Rrm4 bzw. Grp1B und deren gebundenen RNAs war UV-abhängig und RNase sensitiv. Nur mit der UV-Bestrahlung und in Abwesenheit der RNase war im Autoradiogramm ein deutliches RNA-spezifisches Signal zu sehen (Abb. 2.8A). Die RNAs wurden anschließend isoliert und revers transkribiert. Die Verwendung spezifischer Primer während der reversen Transkription erlaubt die Vereinigung verschiedener iCLIP-Banken für das Sequenzierungsverfahren. Im Laufe der bioinformatischen Analyse ermöglicht das Proben-indexieren die einzelnen Sequenzen den entsprechenden Experimenten zuzuordnen. Um die generierten cDNAs sequenzieren zu können, mussten diese zunächst adäquat vervielfältigt werden. Da die Konzentration der cDNAs sehr gering ist und nicht vorher gemessen werden konnte, wurden diese zunächst mittels PCR amplifiziert. Um eine Über- oder Unteramplifikation der cDNA-Banken zu vermeiden, wurden die cDNAs zunächst mit unterschiedlicher Anzahl an PCR-Zyklen vervielfältigt. Eine zu hohe PCR-Zykluszahl erzeugte PCR-Artefakte, die im Agarosegel als zusätzliches Signal oberhalb den zu erwartenden Banden zu sehen waren (Abb. 2.8B, rechts;

(Huppertz et al., 2014)). Bei optimaler Anzahl an PCR-Zyklen waren keine scharfen Banden zu sehen, sondern Banden mit einem leicht diffusen Auslauf nach oben. Dies ist auf die unterschiedlichen Längen der isolierten RNA-Moleküle zurückzuführen (Abb. 2.8B, links). Für Rrm4 wurden die cDNA-Banken des ersten Replikates mit 18 und die Bank des zweiten Replikates mit 22 PCR-Zyklen amplifiziert. Die Grp1B- und Gfp- abstammenden cDNA-Banken wurden mit jeweils 18 PCR-Zyklen amplifiziert (Abb. 2.8A). Der Unterschied in der Anzahl der PCR-Zyklen kann als Maß für die Menge der isolierten RNAs herangezogen werden. Werden zu viele Zyklen benötigt, um die cDNAs zu visualisieren, so spricht dies für eine zu geringe RNA Ausbeute. Im Falle von Grp1B wurden demzufolge mehr RNAs als bei Rrm4 isoliert.

Die iCLIP-Banken wurden von Kollaborationspartnern weiterverarbeitet (Raymond Sutandy, Anke Busch und Julian König, IMB, Mainz). Dabei wurden die iCLIP-Banken vereint und hochdurchsatzsequenziert (Illumina HiSeq 2500).

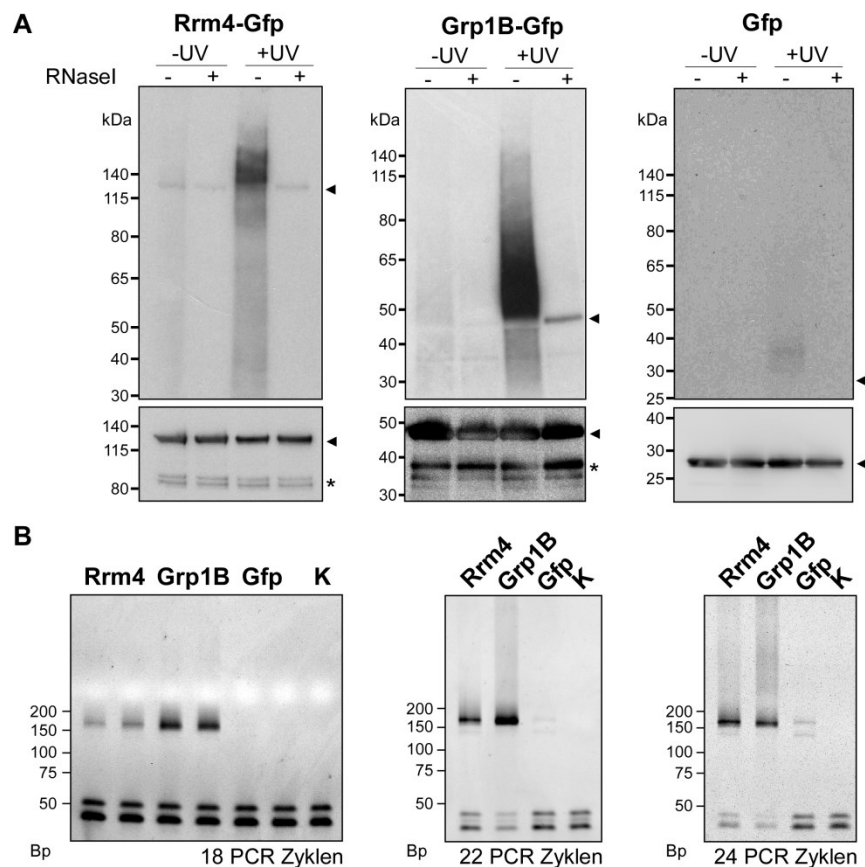


Abbildung 2.8 Repräsentatives iCLIP Experiment A) Autoradiogramm (oben) und Western Blot (unten) zeigen repräsentativ ein iCLIP Experiment von Rrm4, Grp1B und Gfp. Die RNAs, die an die zu untersuchenden Proteine kovalent quervernetzt wurden, wurden radioaktiv markiert, der Protein-RNA Komplex auf einer SDS PAGE aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Das Molekulargewicht des Proteins im Komplex erhöht sich der RNA-Länge entsprechend. Detektiert wurde das radioaktive Signal, das sich, ausgehend vom Molekulargewicht des Proteins (Rrm4-Gfp, 112 kDa; Grp1B-Gfp, 45 kDa; Gfp, 27 kDa; gekennzeichnet durch einen Pfeil), aufwärts in der Spur ausbreitet. Untersucht wurde die UV-Abhängigkeit (ohne (-) bzw. mit (+) UV; 200 mJ/cm²) sowie RNaseI-Abhängigkeit

(1:10 Verdünnung). Die aufgereinigten Proteine wurden mittels Western Blot mit einem α -Gfp Antikörper nachgewiesen (Abbauprodukte der Proteine sind durch einen Stern gekennzeichnet). **B)** Native Polyacrylamidgele der amplifizierten cDNA-Banken von Rrm4, Grp1B und Gfp. Amplifiziert wurden die cDNA-Banken mit unterschiedlichen PCR-Zyklen (18, 22 und 24 Zyklen; Kontrolle (K): ohne Template cDNA). Die Visualisierung der Banden erfolgte mit SYBR-Green I. Die erwartete Länge der amplifizierten cDNAs lag bei ca. 150-160 Nt (cDNA: 20-30 Nt; L3-Adapter + RT-Primer + P3/P5 Solexa Primer: 128 Nt). Die Abbildung wurde modifiziert nach Olgeiser et al., 2019 (Abb. 3A und EV2D).

2.5 Rrm4 und Grp1B binden mRNAs *in vivo*

Die Identifizierung gebundener mRNAs erfolgte anhand der erhaltenen Sequenzen. Die bioinformatische Auswertung erfolgte in Kooperation mit Susan Boerner und Kathi Zarnack (BMLS, Frankfurt). Die Zusammenfassung aller identifizierten Sequenzen, Quervernetzungsereignissen (QE), Cluster (Clu) und Bindestellen (BS), sowie die Anzahl der gebundenen Genen sind in Tabelle 2.2 zusammengefasst. Abbildung 2.9A zeigt die Vorgehensweise der Eliminierung der PCR-Duplikate und der Ermittlung der QE.

Tabelle 2.2: Zusammenfassung der iCLIP Daten

Die Tabelle wurde modifiziert nach Olgeiser et al., 2019 (Abb. EV3A).

Rep: Replikat; QE: Quervernetzungsereignis; BS: Bindestellen

		Sequenzen	einmal kartierte Sequenzen	QE	Σ der QE	Cluster	BS	Gene
Rrm4	Rep 1	14.791.625	9.027.052	2.777.064	4.683.060	14.210	6.412	3.262
	Rep 2	24.757.620	16.269.064	1.905.996				
Grp1B	Rep 1	41.915.499	26.716.134	9.106.077	14.789.890	18.155	6.478	3.165
	Rep 2	18.157.540	12.288.327	5.683.815				
Gfp	Rep 1	671.922	208.847	73.398	153.851	88	54	42
	Rep 2	2.262.880	885.903	80.453				

Mittels der Hochdurchsatzsequenzierung wurden über 14 Millionen Sequenzen für Rrm4 und über 18 Millionen Sequenzen für Grp1B generiert. Diese Sequenzen wurden im Genom von *U. maydis* kartiert. Mit Hilfe der Probenindizes konnte zwischen den PCR-Duplikaten (technische Duplikate) und tatsächlichen Interaktionsereignissen unterschieden werden. Die PCR-Duplikate werden als Sequenzen definiert, die an dieselbe genomische Region binden und einen identischen *random* Barcode aufweisen. Diese wurden von der weiteren Analyse ausgeschlossen (Abb. 2.9A). Nach der Kartierung der Sequenzen im Genom und der Eliminierung der Duplikate dienten mehr als 60 % aller Sequenzen von Grp1B und Rrm4 als Ausgangsmaterial für die weitere bioinformatische Analyse (Abb. 2.9 A und B). Im Vergleich dazu wurden für Gfp nur etwa 30 % der Sequenzen für die weitere Analyse verwendet (Abb. 2.9B).

Um die Proteinbindestellen nukleotidgenau zu identifizieren, wurden nach der Eliminierung der PCR-Duplikate die Summe aller kartierten Sequenz an der identischen genomischen Position als Quervernetzungsereignis (QE) bezeichnet. Die Summe der QE für Rrm4 betrug $4,7 \times 10^6$, für Grp1B $14,8 \times 10^6$ und für Gfp $0,2 \times 10^6$ (Tab. 2.2).

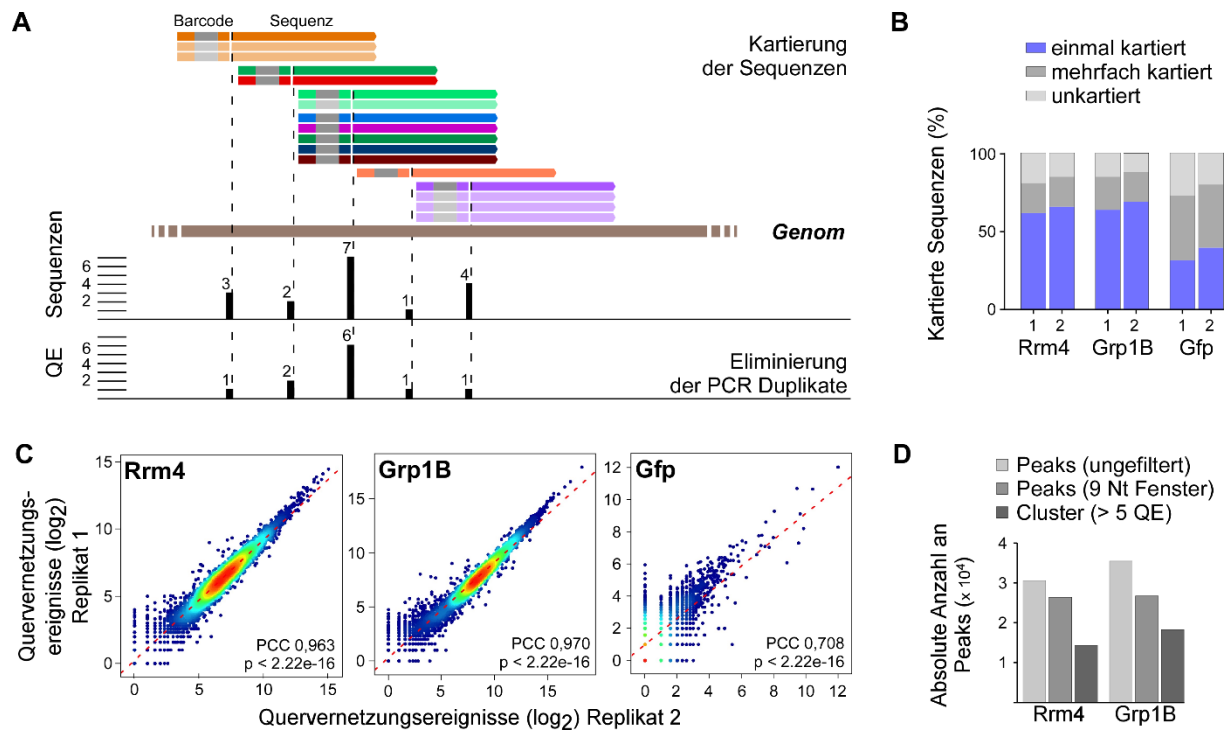


Abbildung 2.9 Qualitätskontrolle der iCLIP-Banken **A**) Schematische Darstellung der Identifizierung der Quervernetzungsereignisse (QE). Die unterschiedlich gefärbten Balken repräsentieren die ermittelten Sequenzen. Der sequenzspezifische Barcode, der sich in den experimentellen (grau) und *random* Barcode unterteilt, wird jeweils links von der Sequenz dargestellt. Nach der Kartierung der Sequenzen im Genom wurden die Quervernetzungsstellen (gestrichelte Linie) ermittelt, welche sich ein Nukleotid stromabwärts des ersten Nukleotids in der Sequenz befindet. Mit Hilfe des *random* Barcodes ist die Eliminierung der PCR-Duplikate möglich. Somit reduziert sich die Anzahl der kartierten Sequenzen auf die QE. **B**) Gestapeltes Balkendiagramm zeigt die Anzahl der einfach, mehrfach und unkartierten Sequenzen im *U. maydis* Genom in Prozent für Rrm4, Grp1B und Gfp. **C**) Diagramm vergleicht die Anzahl der QE pro Gen aus den beiden unabhängigen biologischen Replikaten für Rrm4, Grp1B und Gfp, um die Reproduzierbarkeit zwischen den Experimenten zu ermitteln (PCC=Pearson Correlation Coefficient). **D**) Balkendiagramm zeigt die Anzahl der Peaks vor dem Filtern (ungefiltert), nach dem Filtern (Begrenzung der Peaks auf ein 9 Nt Fenster) und nach der Festlegung stringenterer Filterkriterien, dass mindestens 5 QE aus jedem Replikat vorhanden sein müssen, um einen statistisch signifikanten Peak darzustellen (>5QE). Diese Peaks wurden zunächst in Cluster zusammengefasst. Die Abbildung wurde modifiziert nach Olgeiser et al., 2019 (Abb. EV3B und C).

Um eine Aussage über die Reproduzierbarkeit und somit die Qualität der iCLIP Experimente treffen zu können, wurden die QE aus beiden Replikaten miteinander verglichen. Dazu wurde die Anzahl der QE pro Gen für jedes Replikat berechnet und anschließend miteinander verglichen (Abb. 2.9C). Sowohl die Replikate von Rrm4 als auch von Grp1B zeigten eine hohe Übereinstimmung mit einem Pearson Korrelationskoeffizienten (PCC) von > 0,96 (Abb. 2.9C). Gfp ist kein RBP und bei den isolierten Sequenzen handelt es sich vermutlich um unspezifische Interaktionen zwischen Gfp und RNA. Dafür spricht die relativ hohe Anzahl an technischen Duplikaten (über 60 %; Abb. 2.9B), vor allem jedoch die geringe Übereinstimmung zwischen den Replikaten (PCC = 0,71; Abb. 2.9C).

Um die Proteinbindestellen von Rrm4 und Grp1B zu identifizieren, wurden die QE aus beiden Replikaten als Cluster zusammengefasst. Das Aufkommen mehrerer QE in unmittelbarer Nähe zueinander, auch als Peak bezeichnet, könnten auf eine potentielle Proteinbindestelle hindeuten. Um diese statistisch zu verifizieren, wurde das ASPeak Programm verwendet (Kucukural et al., 2013). Dabei wurden für Rrm4 30.665 Peaks identifiziert, die sich auf 5.821 Gene verteilten. Für Grp1B wurden 35.549 Peaks ermittelt, die sich auf 5.910 Gene verteilten (Abb. 2.9D, Peaks (ungefiltert)). Um das Aufkommen von falschpositiven Peaks zu minimieren, wurden die Kriterien stringenter definiert. Somit war es möglich, die Anzahl der zuvor identifizierten Peaks um etwa die Hälfte zu reduzieren. Trotzdem verteilten sich die Peaks weitläufig in Clustern über die Transkripte und bildeten selten definierte Bindestellen (Tab. 2.2, Abb. 2.9D). Es wurden 14.210 Cluster für Rrm4 und 18.155 Cluster für Grp1B identifiziert, die sich entsprechend auf 4.426 bzw. 4.941 Gene verteilten (Tab. 2.2, Abb. 2.9D). Unter diesen Bedingungen würde Rrm4 über 65 % und Grp1B über 73 % aller in *U. maydis* kodierten Gene (6734) binden ((Kämper et al., 2006); Abb. 2.9D).

2.5.1 Identifizierung der Rrm4 und Grp1B Bindestellen

Um die Bindestellen präziser eingrenzen zu können und diese zwischen den beiden RBPs besser miteinander vergleichen zu können, wurden die QE innerhalb und außerhalb eines Peaks für jedes Gen ermittelt und als „*signal-over-background*“ (SOB) angegeben (Abb. 2.10A). Der SOB-Wert ist der Quotient aus der Anzahl der QE innerhalb und außerhalb einer Bindestelle, normalisiert auf die Länge des Transkriptes (Abb. 2.10A). Je höher der SOB-Wert einer Bindestelle ist, desto stärker wird die RNA an dieser Stelle gebunden. Somit erlaubt der SOB-Wert mehrere Bindestellen innerhalb eines Transkripts, entweder von einem RBP oder zwischen den zwei untersuchten RBPs, miteinander zu vergleichen. Mit Hilfe der SOB-Werte war es möglich, die Bindestellen nach ihrer Stärke zu sortieren.

Die Verteilung der SOB-Werte zeigte, dass unter der Berücksichtigung der 75 % (SOB 0,25) bzw. 50 % (SOB 0,5) der besten BS immer noch über 11.000 Peaks identifiziert werden (Abb. 2.10B). Obwohl die Anzahl der Peaks mit steigendem SOB-Wert abnimmt, bleibt die Anzahl der gebundenen Gene weitgehend konstant (Abb. 2.10B). Dies spricht dafür, dass trotz der stringenteren Filterkriterien kein Verlust an putativen Ziel-Transkripten erfolgt. Darüber hinaus verdeutlicht die Abbildung 2.10C, dass die besten 25 % der Bindestellen immer noch mindestens 15 QE pro Peak für Rrm4 und 18 QE pro Peak für Grp1B aufweisen. Somit weisen diese Bindestellen eine hohe Reproduzierbarkeit auf (Abb. 2.10C, rot gestrichelten Linien). Um sich mehr auf die statistisch signifikanten Bindestellen zu konzentrieren, wurden deshalb die besten 25 % (SOB-Wert=0,75) aller Bindestellen für die weitere Analyse verwendet (Abb. 2.10C, blaue Balken). In Abbildung 2.10D wird anhand einer RNA-Helikase exemplarisch gezeigt, wie sich die QE von Grp1B (hellgrau/grau) und Rrm4 (hellblau/blau) sowie die Cluster (Clu; schwarz) und Bindestellen (BS; rot) über das Transkript verteilen. Dabei wird deutlich, dass die stringenteren Filterkriterien die Zahl der zunächst identifizierten Cluster auf spezifische Bindestellen reduziert.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass mittels der iCLIP Methode zahlreiche mRNAs identifiziert werden konnten, die von Rrm4 und Grp1B gebunden werden.

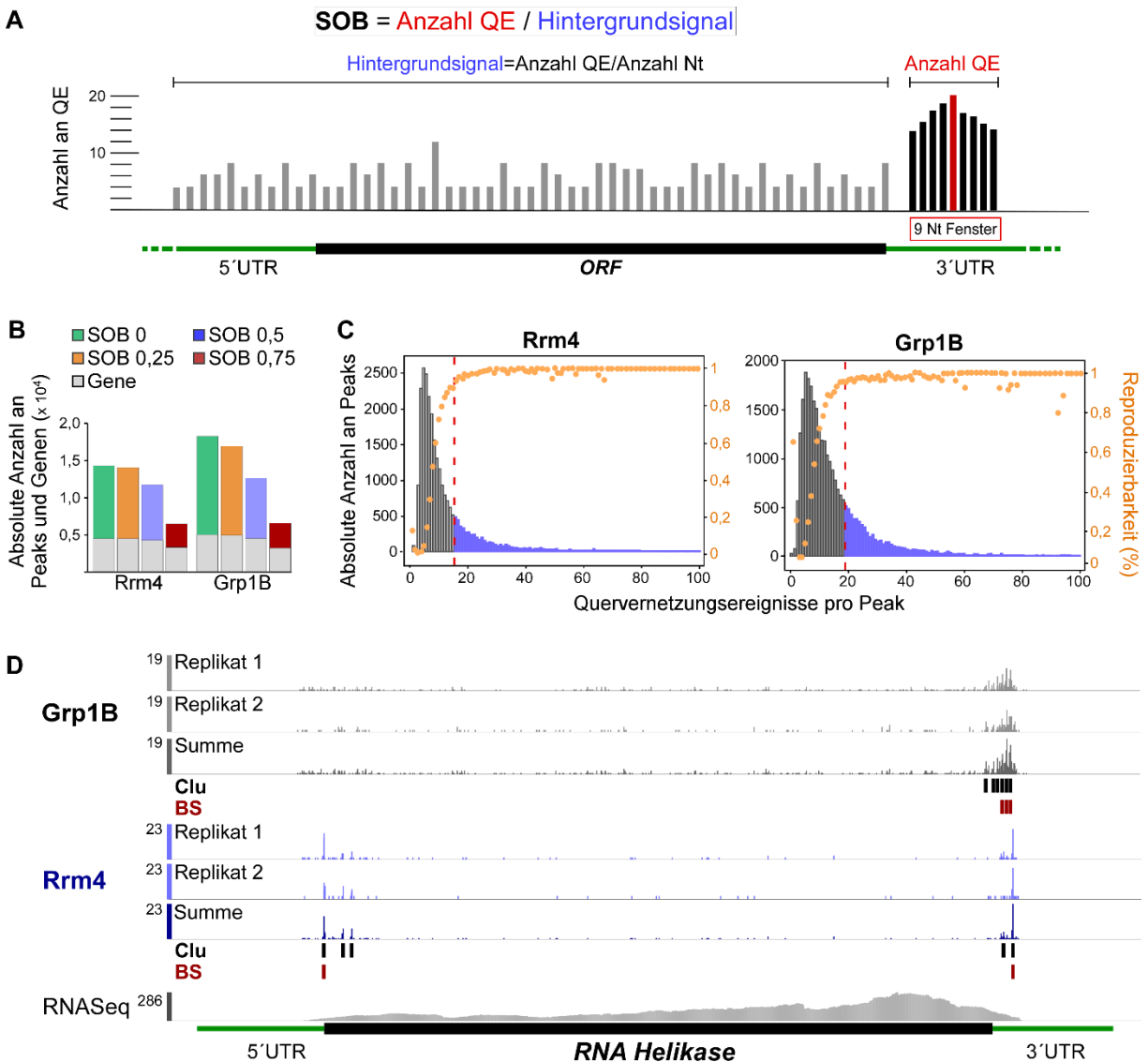


Abbildung 2.10 Identifizierung der Proteinbindestellen von Rrm4 und Grp1B **A)** Schematische Darstellung zur Berechnung des „signal over background“ SOB-Wertes. Gezeigt wird ein Beispieltranskript und die Verteilung der QE über die 5'UTR, den ORF und die 3'UTR. Das Hintergrundsignal wurde ermittelt, indem zunächst alle QE außerhalb der BS aufsummiert und anschließend auf die Genlänge normalisiert wurden. Daraufhin wurden QE innerhalb der BS ermittelt. Der SOB-Wert setzt sich aus dem Quotienten der Anzahl der QE aus der BS und des Hintergrundsignals zusammen. **B)** Verteilung der Peaks und Gene entsprechend des SOB Werts. SOB 0 = Peaks wurden auf 9 Nt-Fenster begrenzt, >5 QE pro Peak müssen aus beiden Replikaten vorhanden sein, BS, die mit Gfp-BS überlappten, wurden eliminiert (grün); SOB 0,25= 75 % der besten BS wurden berücksichtigt (orange); SOB 0,5 = 50 % der besten BS wurden berücksichtigt (blau); SOB 0,75 = 25 % der stärksten BS würden für die weitere Analyse verwendet (rot). In grau ist die Anzahl der Gene dargestellt, auf die sich die identifizierten Peaks verteilten. **C)** Verteilung der Peaks aufsteigend nach der Anzahl ihrer QE für Rrm4 (links) und Grp1B (rechts). Mit zunehmenden QE

nimmt die Anzahl an Peaks ab und deren Reproduzierbarkeit zu (orangene Punkte). Die rot gestrichelte Linie kennzeichnet den SOB 0,75. Die stärksten 25 % der BS, die für die weitere Analyse verwendet wurden, sind als blaue Balken dargestellt. **D)** Verteilung der QE und BS von Grp1B und Rrm4 am Beispiel einer RNA-Helikase (UMAG_05214). Die QE aus beiden Replikaten sind in hellgrau für Grp1B und in hellblau für Rrm4 dargestellt, deren Summe in grau bzw. blau. Die Cluster (Clu) sind schwarz und darunter die putativen Bindestellen (BS), die zu den 25 % der stärksten BS gehören, in rot gezeigt. Neben den iCLIP-Daten sind auch die RNASeq-Daten visualisiert. Da die 5'UTR und 3'UTR in der *U. maydis* Genom Datenbank nicht annotiert sind, wurde 300 Nt stromaufwärts und –abwärts der Bereich vom Transkript (schwarz) erweitert. Die UTRs sind in grün dargestellt.

2.5.2 Rrm4 und Grp1B binden funktional diverse mRNAs

Das Ziel, Rrm4-gebundene mRNAs transkriptomweit zu identifizieren, wurde bereits seit der Einführung der CLIP Methode verfolgt. Mittels der CLIP Methode konnte das Ziel nicht erreicht werden, da die generierten CLIP-Banken erst konventionell in Vektoren kloniert und danach sequenziert wurden, wodurch 55 Ziel-Transkripte für Rrm4 identifiziert wurden (Abb. 11A; (König et al., 2009; Ule et al., 2005)). Aus diesem Grund war der Umfang der Banken gering und eine umfassende Analyse nicht möglich. Mit der Einführung der Hochdurchsatzsequenzierung wurden die generierten CLIP-Banken einer Resequenzierung unterzogen und die Zahl der von Rrm4 gebundenen mRNAs auf 948 erhöht (Abb. 11A; (Koepke et al., 2011)). Mit der Weiterentwicklung der CLIP Methode, der iCLIP Methode, konnten nicht nur die Zahl der von Rrm4 gebundenen Transkripte erhöht werden, sondern ein putatives Bindemotiv UAUG identifiziert werden (Dissertation Carl Haag, 2013). Da der Umfang der iCLIP-Banken innerhalb der generierten Replikaten großen Schwankungen unterlag, wurde diese Methode in der vorliegenden Arbeit optimiert und erfolgreich angewendet. Im Vergleich zu dem ersten iCLIP Protokoll konnte die Anzahl identifizierter Ziel-Transkripten von Rrm4 mit dem optimierten iCLIP Protokoll von 1.106 auf 3.262 mRNAs gesteigert werden (Abb. 2.11A).

Auf die 3.262 Transkripte verteilten sich 6.412 statistisch signifikante Bindestellen (BS; SOB 0,75; Tab. 2.2). Darüber hinaus wurde das iCLIP Verfahren für das weitere endosomale RBP Grp1B angewendet. Grp1B bindet mit 6.478 Bindestellen, 3.165 mRNAs und ist Teil desselben Rrm4-abhängigen mRNPs (s. Kapitel 2.2; Abb. 2.11B; Tab. 2.2). Da Rrm4 und Grp1B Komponenten desselben mRNPs sind und deren Interaktion über die gemeinsam gebundenen mRNAs vermittelt wird, sollte zunächst überprüft werden, wie groß der Anteil der identifizierten mRNAs ist, der von beiden RBPs gebunden wird. Die Analyse der gebundenen mRNAs zeigte, dass Rrm4 und Grp1B zwei Drittel (2.114 mRNAs) ihrer Transkripte gemeinsam binden. (Abb. 2.11B). Um herauszufinden, welche mRNAs nur von Rrm4 oder nur von Grp1B gebunden werden, wurden 25 % der besten Bindestellen von Rrm4 (6.412) bzw. Grp1B (6.478) mit allen reproduzierbaren Clustern (SOB 0) des jeweils anderen Proteins verglichen (4.426 Clu für Rrm4 und 4.941 Clu für Grp1B). Dadurch sollte gewährleistet werden, dass mögliche Bindestellen, die aufgrund der Filterkriterien nicht weiter analysiert wurden, bei dem Vergleich berücksichtigt wurden. Unter diesen Bedingungen wurden 280 Rrm4-spezifische und 520 Grp1B-spezifische Transkripte

identifiziert (Abb. 2.11C). Werden zu dieser Analyse die Lokalisationsstudien herangezogen (Abb. 2.4 und 2.5), so sprechen diese dafür, dass die 2.114 mRNAs, die sowohl von Rrm4 als auch von Grp1B gebunden werden, Transkripte des endosomalen Transports sind. Unter diesen mRNAs befanden sich auch die bereits charakterisierten Septin-mRNAs (Baumann et al., 2014).

Da die Komposition der Rrm4-abhängigen endosomalen mRNPs noch nicht gut erforscht ist, wurden die mRNAs, die sowohl von Rrm4 als auch von Grp1B gemeinsam gebunden werden, einer FunCat (*functional catalogue*) Analyse unterzogen. FunCat erlaubt die Klassifizierung der zu untersuchenden Transkripte hinsichtlich ihrer biologischen Funktion. Die Klassifizierung erfolgt dabei Organismus-unspezifisch in bestimmten Kategorien wie Metabolismus, Transport, Lokalisation und einige weitere ((Ruepp et al., 2004); <http://mips.gsf.de/funcatDB/>; 24.09.2017). Die FunCat Analysen wurden mit Hilfe von Carl Haag und Kathi Zarnack durchgeführt. In die Analyse eingeflossen sind die 2.114 identifizierten mRNAs, die von beiden RBPs gebunden wurden, sowie die 520 Grp1B-spezifische und 280 Rrm4-spezifische Transkripte. Die Gene die im Vergleich zu allen annotierten Genen im Genom eine statistisch signifikante Anreicherung aufwiesen ($p > 0,1$), wurden tabellarisch in Abbildung 2.11D zusammengefasst. In der Gruppe der „Subzellulären Lokalisation“ waren für die gemeinsam gebundenen Transkripte unter anderem die funktionellen Kategorien „Mitochondrium“, „Intrazellulärer vesikulärer Transport“ und „Zytoskelett“ angereichert. Auffällig war, dass eine signifikante Anreicherung für die Kategorie „Nukleus“ für Grp1B-spezifische Transkripte beobachtet wurde. Dies passt zu der subzellulären Lokalisation von Grp1B, welches sowohl im Zellkern als auch Zytoplasma vorzufinden ist.

Für Rrm4-spezifische Transkripte wurden keine signifikanten Anreicherungen beobachtet. Eine visuelle Untersuchung der 280 Transkripte ergab, dass es sich hierbei vermutlich um falschpositive Transkripte handeln könnte, die sehr stark oder sehr schwach exprimiert sind. Bei sehr schwach exprimierten Transkripten ist das Hintergrundsignal sehr niedrig, entsprechend wird ein sehr hoher SOB-Wert für die Bindestellen berechnet. Im Falle von sehr stark exprimierten Genen können die QE der Bindestellen nicht den Hintergrund überragen und werden deshalb nicht als solche identifiziert.

Mit Hilfe der FunCat Analyse konnte die Hypothese, dass Rrm4 für einen globalen Transport der mRNA in der *U. maydis* Hyphe verantwortlich ist, unterstützt werden. Darüber hinaus konnte mittels der vergleichenden iCLIP-Analyse gezeigt werden, dass Rrm4 und Grp1B als Komponenten desselben mRNPs die Mehrzahl der mRNAs gemeinsam binden. Interessanterweise sind die mRNAs, die von Grp1B spezifisch gebunden werden, in der Kategorie „Nukleus“ angereichert und unterstützen die Theorie, dass Grp1B eine Funktion außerhalb des endosomalen mRNA Transports hat.

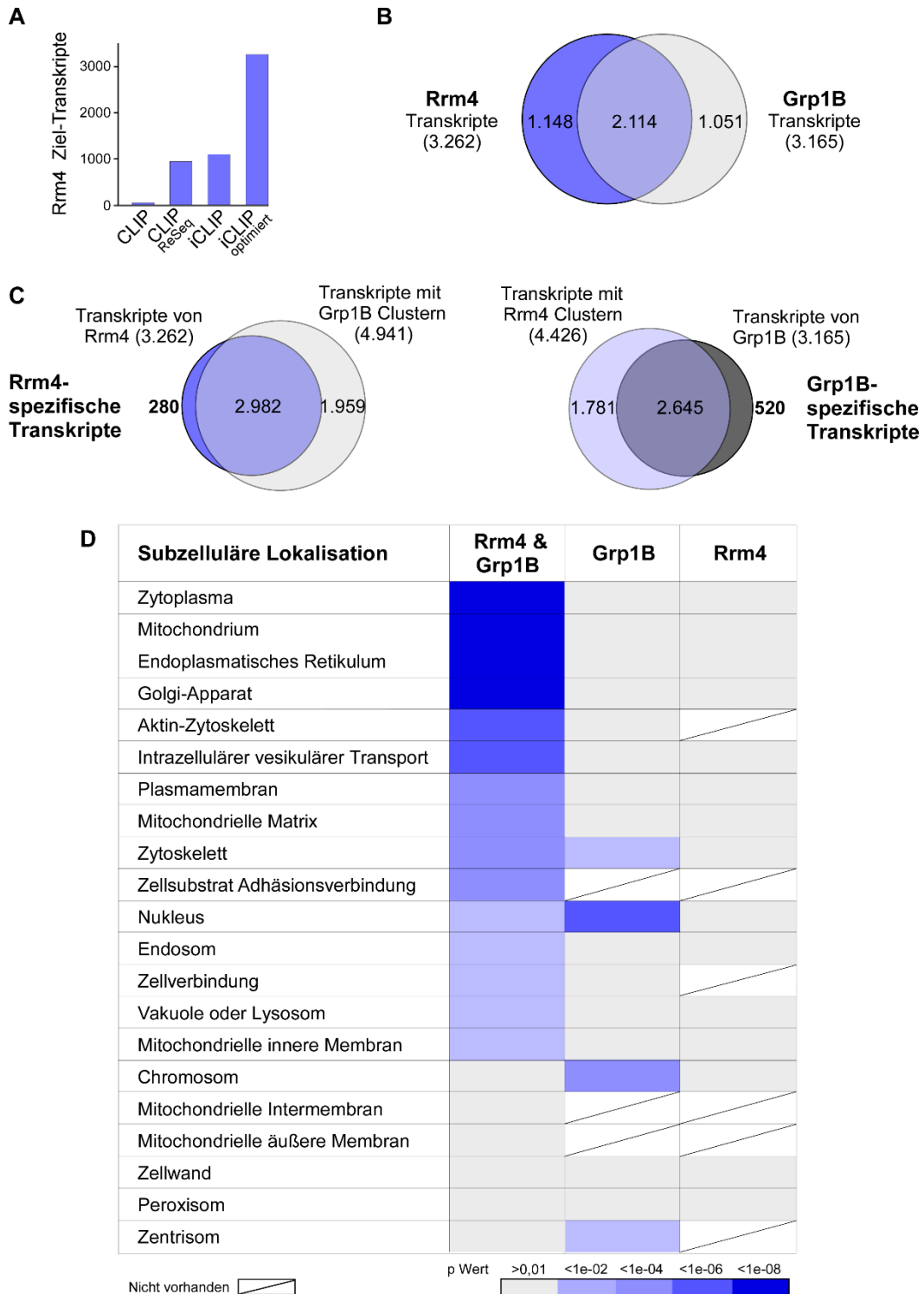


Abbildung 2.11 Rrm4 und Grp1B interagieren mit funktional diversen mRNAs **A)** Das Balkendiagramm repräsentiert die Anzahl der von Rrm4 gebundenen Transkripte, die mit der jeweiligen Methode identifiziert werden konnten. Mit der CLIP Methode konnten 55 Transkripte ermittelt werden und mit der Resequenzierung der CLIP-Banken (CLIP ReSeq) konnte die Zahl der Transkripte auf 948 erhöht werden. Mit der Etablierung der iCLIP Methode wurden 1.106 mRNAs identifiziert und mit dem optimierten iCLIP Protokoll (iCLIP optimiert) konnten 3.262 Rrm4 Ziel-Transkripte ermittelt werden. **B)** Venn-Diagramm

zeigt sowohl die Anzahl an Transkripten, die von Rrm4 und Grp1B gebunden werden, als auch die Anzahl der Transkripte, die von beiden RBPs gemeinsam gebunden werden. **C)** Venn-Diagramm zeigt 280 Rrm4-spezifische Transkripte (links) und 520 Grp1B-spezifische Transkripte (rechts). Die Rrm4 (3.262) bzw. Grp1B (3.165) Transkripte wurden gegen alle Cluster (4.941 Clu für Grp1B und 4.426 Clu für Rrm4) des jeweils anderen RBP abgeglichen, um die spezifischen Transkripte zu ermitteln. **D)** Tabellarische Zusammenfassung der FunCat Analyse, wobei nur die angereicherten Transkripte gezeigt werden ($p > 0,01$; (Ruepp et al., 2004)). In die Analyse eingeflossen sind Transkripte, die entweder von beiden RBPs gemeinsam gebunden wurden oder spezifisch von einem RBP. Die Abbildung wurde modifiziert nach Olgeiser et al., 2019 (Abb. 3B und D, EV3E).

2.5.3 Rrm4 und Grp1B binden bevorzugt die 3'UTR ihrer Ziel-mRNAs

Die iCLIP-Methode ermöglichte eine detaillierte Analyse des Bindevhaltens entlang der gebundenen Transkripte von Rrm4 und Grp1B. Die Analyse ergab, dass beide Proteine bevorzugt die 3'UTR binden (Abb. 2.12A). Von den identifizierten Bindestellen lagen 67 % der Rrm4 und 88 % der Grp1B Bindestellen in der 3'UTR. Im Vergleich dazu wurden nur 5 % aller Bindestellen von Rrm4 und 4 % von Grp1B in der 5'UTR detektiert. Im ORF befanden sich 28 % der Rrm4 Bindestellen. Diese Anreicherung konnte nur für Rrm4 und nicht für Grp1B (7 %) detektiert werden.

Dieses Ergebnis unterstützt die Hypothese, dass mRNAs translational aktiv in der Hyphe transportiert werden könnten. Passend dazu werden die gut untersuchten Septin mRNAs ebenfalls bevorzugt in der 3'UTR gebunden (Zander et al., 2016).

Interessanterweise ergab eine positionelle Analyse der Bindestellen beider RBPs zueinander, dass diese oft in unmittelbarer Nähe liegen und sogar über ein Drittel der Bindestellen direkt überlappen (Abb. 2.12B). In der 3'UTR überlappen sogar mehr als 50 % der Bindestellen von Rrm4 und Grp1B. Ob die beiden RBPs um dieselben Bindestellen konkurrieren, müsste erst untersucht werden. Da jedoch der Rrm4-vermittelte mRNA Transport wichtig für das unipolare Hyphenwachstum ist, wäre es denkbar, dass die Rrm4 Bindung für die gemeinsam gebundenen Transkripte eine höhere Priorität hat.

Neben den beschriebenen Transkriptregionen wurden insbesondere die translational aktive Regionen, wie der Translationsstart und –stopp untersucht. Bei dieser Analyse wurden nicht nur die 25 % der besten Bindestellen untersucht, sondern alle Transkripte die QE aufwiesen. Damit sollte sichergestellt werden, dass auch schwach bzw. sehr stark exprimierte Gene in die Analyse mit einfließen. Dazu wurden alle QE relativ zum Start- und zum Stoppkodon in einem Metaprofil zusammengefasst. Für die Interpretation der Metaprofile müssen die unterschiedlichen Skalierungen der Y-Achsen beachtet werden (Abb. 2.12C, Startkodon in blau, Stoppkodon in rot). Rrm4 weist sowohl am Start- als auch am Stoppkodon eine Anreicherung der QE auf (Abb. 2.12C links). Im Vergleich zum Startkodon konnten in etwa drei Mal mehr QE am Stoppkodon ermittelt werden. Für Grp1B konnte keine Anreicherung von QE am Startkodon detektiert werden (Abb. 2.12C, rechts). Für das Stoppkodon wurden drei Mal weniger QE für Grp1B im Vergleich zu Rrm4 ermittelt. Das Metaprofil von Grp1B zeigt zusätzlich, dass stromabwärts vom Stoppkodon die

Anzahl der QE zunimmt. Das Ergebnis entspricht der zuvor durchgeführten Analyse, dass Grp1B bevorzugt in der 3'UTR bindet.

Im nächsten Schritt wurde untersucht, wieviele Transkripte tatsächlich von Rrm4 bzw. Grp1B gebunden werden. Für Rrm4 konnten 47 Transkripte identifiziert werden, die am Startkodon und 291 Transkripte, die am Stoppkodon gebunden wurden. Zwei mRNAs wurden von Grp1B am Startkodon gebunden. Diese Anzahl spiegelt das Ergebnis der QE im Metaprofil wieder (Abb. 2.12C, rechts). Obwohl die Anzahl der QE für das Stoppkodon relativ gering war, wurden 292 Ziel-mRNAs von Grp1B am Stoppkodon gebunden. Somit binden Rrm4 und Grp1B fast gleich viele mRNAs am Translationsende. Die Anzahl der QE kann als Maß für eine stärkere Bindung genutzt werden. Da die Anzahl an QE für Rrm4 höher war als für Grp1B, ist die Bindung am Stoppkodon durch Rrm4 vermutlich stärker. Diese Anreicherung war spezifisch für Rrm4 und konnte folglich nicht für Grp1B ermittelt werden (Abb. 2.12C).

Interessanterweise scheint Rrm4 die eigene mRNA in unmittelbarer Nähe zum Startkodon zu binden (Abb. 2.12D). Das *rrm4* Transkript wird unter den gewählten Bedingungen nicht von Grp1B gebunden. Eine nähere Betrachtung der *grp1* mRNA ergab, dass Grp1B die 3'UTR der *grp1A* Isoform bindet, wobei Rrm4 die 3'UTR der *grp1B* Isoform bindet (Abb. 2.12E). Aufgrund der verwendeten C-terminalen Gfp-Fusionskonstrukte von Rrm4-Gfp und Grp1B-Gfp ist es nicht möglich eine Aussage über die Bindung der eigenen mRNA des jeweiligen RBP am 3'Ende zu machen. Die Bindung der eigenen mRNA könnte für eine Autoregulation sprechen. Die Autoregulation ist ein weitverbreiteter Regulationsmechanismus und ist wichtig für die präzise Funktion von RBPs (Müller-McNicoll et al., 2019). Dabei binden die RBPs direkt an ihre eigene mRNA und beeinflussen so ihr eigenes Schicksal. Bei dem Autoregulationsmechanismus wird zwischen der positiven und der negativen Feedback-Regulation unterschieden. Bei der positiven RBP-vermittelten Feedback-Regulation wird das Proteinlevel des RBP erhöht. Bei der negativen Feedback-Regulation wird die Proteinmenge reduziert. Der Mechanismus mit dem die eigene Proteinkonzentration reguliert wird, ist häufig der selbe mit dem das RBP seine Ziel-Transkripte reguliert (Müller-McNicoll et al., 2019). Welchem Mechanismus die potentielle Autoregulation der *rrm4* und *grp1B* mRNA unterliegt, müsste erst untersucht werden.

Die iCLIP Analyse ermöglichte eine detaillierte Auflösung der Bindestellen von Rrm4 und Grp1B. Beide RBPs binden bevorzugt die 3'UTR ihrer Ziel-Transkripte. Dies unterstützt die Theorie vom translational aktiven endosomalen Rrm4-abhängigen mRNA Transport in *U. maydis* Hyphen. Darüber hinaus war es zum ersten Mal möglich, das Bindeverhalten von Rrm4 detailliert darzustellen. Neben der 3'UTR bindet Rrm4 einige Transkripte am Startkodon und vor allem auch am Stoppkodon. Diese neue Erkenntnis wirft die Frage auf, ob Rrm4 neben dem globalen, endosomalen mRNA-Transport eine Rolle bei der translationalen Regulation spielen könnte. Dieses Ergebnis eröffnet eine neue mögliche Funktion von Rrm4, bei der Rrm4 an der Translationsregulation von spezifischen Transkripten beteiligt sein könnte.

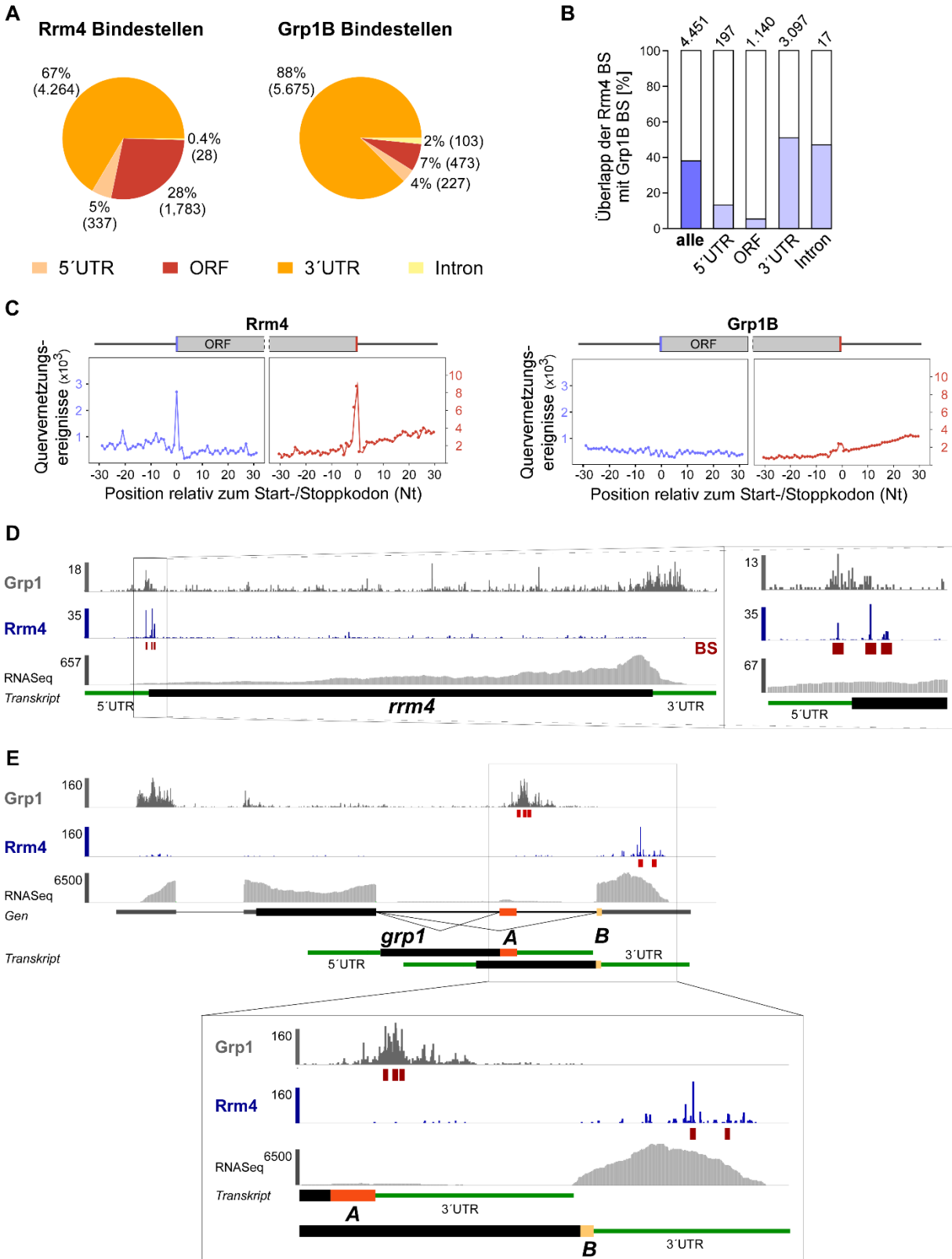


Abbildung 2.12 Verteilung der Bindestellen entlang der Ziel-mRNAs **A)** Verteilung der BS entlang der 5'UTR (hellorange), des ORF (rot), der 3'UTR (orange) und des Introns (gelb). Sowohl die relativen als auch die absoluten Zahlen sind im Diagramm dargestellt. **B)** Relativer Anteil von überlappenden BS der beiden RBPs (Grp1B, Rrm4). Die absolute Anzahl der BS pro Region sind zusätzlich über jedem Balken aufgeführt. In diese Untersuchung sind BS aus der Rubrik der gemeinsam gebundenen Gene eingeflossen. **C)** Metaprofile für Rrm4 (links) und Grp1B (rechts) zeigen die Position der QE relativ zum Start (blau)- und Stoppkodon (rot; jeweils Position 0). **D)** Rrm4 bindet die eigene mRNA in der 5'UTR und in der Nähe des Startkodons. Dargestellt ist das *rrm4* Transkript (UMAG_10836) in schwarz und die 5'UTR und 3'UTR in grün. Die QE sind in grau für Grp1B, in blau für Rrm4 dargestellt und darunter sind die BS in rot gezeigt. Neben den iCLIP-Daten sind auch die RNASeq-Daten gezeigt. **E)** Die *grp1* mRNA (UMAG_02412) wird sowohl von Grp1B selbst als auch von Rrm4 in der 3'UTR gebunden. Dabei bindet Rrm4 vermutlich die 3'UTR der *grp1B* Isoform (hellorange). Grp1B bindet die 3'UTR der *grp1A* Isoform (dunkelorange). Aufgrund der C-terminalen Gfp-Fusion an die *grp1B* Isoform, kann nicht ermittelt werden, ob Grp1B die eigenen 3'UTR binden kann. Die Abbildung wurde modifiziert nach Olgeiser et al., 2019 (Abb. 4A, B, D und E).

2.5.4 Rrm4 bindet das Motiv UAUG

Die iCLIP Methode ermöglicht nicht nur eine detaillierte Darstellung der Bindestellen, sondern deren nukleotidgenaue Auflösung. Als eine mögliche Bindesequenz für Rrm4 wurde eine CA-reiche Sequenz postuliert. In der vorangegangenen iCLIP Arbeit wurde jedoch das Bindemotiv UAUG ermittelt (Dissertation Carl Haag, 2013). Um die Bindemotive für Rrm4 und Grp1B anhand der neu gewonnenen Daten zu untersuchen, wurde eine DREME (*discriminative regular expression motif elicitation*) Analyse durchgeführt (Bailey, 2011). DREME erlaubt die Identifizierung von kurzen, konservierten Motiven, die innerhalb der zu untersuchenden Sequenzen angereichert vorliegen. Die Analyse wurde in einem 30 Nukleotid-Fenster um die Bindestellen herum, unabhängig von deren Lage, durchgeführt. Dabei wurde für Grp1B zunächst das Bindemotiv UGUA identifiziert (Abb. 2.13A). Die darauffolgende Untersuchung der quantitativen Verteilung des Motives innerhalb der Grp1B Bindestellen konnte jedoch das Tetranukleotid UGUA nicht als Bindemotiv bestätigen. Die Anhäufung dieses Tetranukleotids war sehr schwach und wurde gleichermaßen auch von Rrm4 gebunden (Abb. 2.13B). Aus diesem Grund wurde UGUA nicht als ein Bindemotiv von Grp1B angesehen und deshalb nicht weiter untersucht.

Nach denselben Kriterien wurde auch für Rrm4 nach einem putativen Bindemotiv gesucht. Dabei wurde das Bindemotiv UAUG bestätigt (Abb. 2.13A). Bei näherer Betrachtung konnte festgestellt werden, dass 34 % der Bindestellen (2.201 von 6.412) dieses Tetranukleotid enthielten (Abb. 2.13C). Die Quervernetzung fand in 90 % am ersten Uracil des Bindemotivs statt (Abb. 2.13C; 1.992 Bindestellen mit einer Quervernetzung am Uracil von insgesamt 2201 untersuchten Bindestellen mit einem Motiv). Dies deutet darauf hin, dass das Tetranukleotid UAUG spezifisch von Rrm4 erkannt wird. Nur ein sehr geringer Anteil der Bindestellen von Grp1B enthielt UAUG (Abb. 2.13C). Eine genauere Analyse ergab, dass alle Bindestellen von Grp1B, die dieses Bindemotiv enthielten, entweder zum Teil oder vollständig mit den Rrm4 Bindestellen überlappten (Abb. 2.13D).

Darüber hinaus wurde die Stärke der Rrm4 Bindestellen mit und ohne das Bindemotiv miteinander verglichen (Abb. 2.13E). Bindestellen, welche das Motiv (UAUG) beinhalten, hatten eine signifikant höhere Anzahl an QE (p -Wert=2.22e-16) als Bindestellen ohne Bindemotiv. Anschließend wurde die Verteilung der Bindestellen mit dem Bindemotiv auf die Regionen des Transkriptes untersucht. Dabei hat sich gezeigt, dass Bindestellen, die das Motiv enthielten, im ORF angereichert waren (61 %; Abb. 2.13F).

In der vorhergegangenen Analyse wurde festgestellt, dass Rrm4 bei 47 Transkripten eine Bindestelle am Startkodon aufweist. Diese Bindestellen wurden auf das Vorhandensein des Bindemotivs UAUG überprüft. 88 % dieser Transkripte zeigten ein Uracil vor dem Startkodon auf und bildeten somit das identifizierte Bindemotiv UAUG von Rrm4 (Abb. 2.13G, rechts). Da drei der Nukleotide des Bindemotives UAUG mit dem Startkodon AUG übereinstimmen, sollte überprüft werden, ob Rrm4 spezifisch am Startkodon bindet. Es wäre denkbar, dass Rrm4 zufällig aufgrund der Sequenzübereinstimmung und der höheren Affinität zum Sequenzmotiv an den Translationsstart bindet. Deshalb wurde zunächst die Häufigkeit des UAUG Motives am Translationsstart genomweit untersucht (Abb. 2.13G, links). Die Analyse ergab, dass in 49 % aller Transkripte Cytosin und nicht Uracil (8 %) vor dem Startkodon zu finden ist. Somit spricht die Verteilung des stromaufwärts gelegenen Nukleotides vor dem Startkodon dafür, dass Rrm4 spezifisch am Translationsstart bindet und nicht zufällig aufgrund der höheren Affinität zum Sequenzmotiv.

Eine ähnliche Analyse wurde für die 291 Transkripte durchgeführt, die von Rrm4 am Stoppkodon gebunden werden. Genomweit werden 44 % aller Transkripte mit dem Stoppkodon UGA terminiert (Abb. 2.13H, rechts). Würden sich stromaufwärts vom UGA-Kodon die Nukleotide UA befinden, dann würden zwei Nukleotide mit dem Bindemotiv UAUG überlappen (UAUGA). Sollte die Mehrheit der Rrm4 Bindestellen am UGA-Stoppkodon lokalisieren, dann wäre die Wahrscheinlichkeit für eine unspezifische Bindung höher. Die Untersuchung der Stoppkodons innerhalb der 291 Transkripte hat jedoch ergeben, dass nur 23 % der Bindestellen mit dem UGA-Kodon überlappten (Abb. 2.13H, links). Die Mehrheit der Bindestellen (55 %) überlappte mit dem Stoppkodon UAG. Das Motiv UAUG überschneidet sich nicht mit dem Stoppkodon UAG, folglich werden diese Transkripte spezifisch von Rrm4 am Translationende gebunden. Dies führt zu der Schlussfolgerung, dass Rrm4 spezifisch am Stoppkodon von bestimmten Transkripten bindet und somit an deren Translationsregulation beteiligt sein könnte.

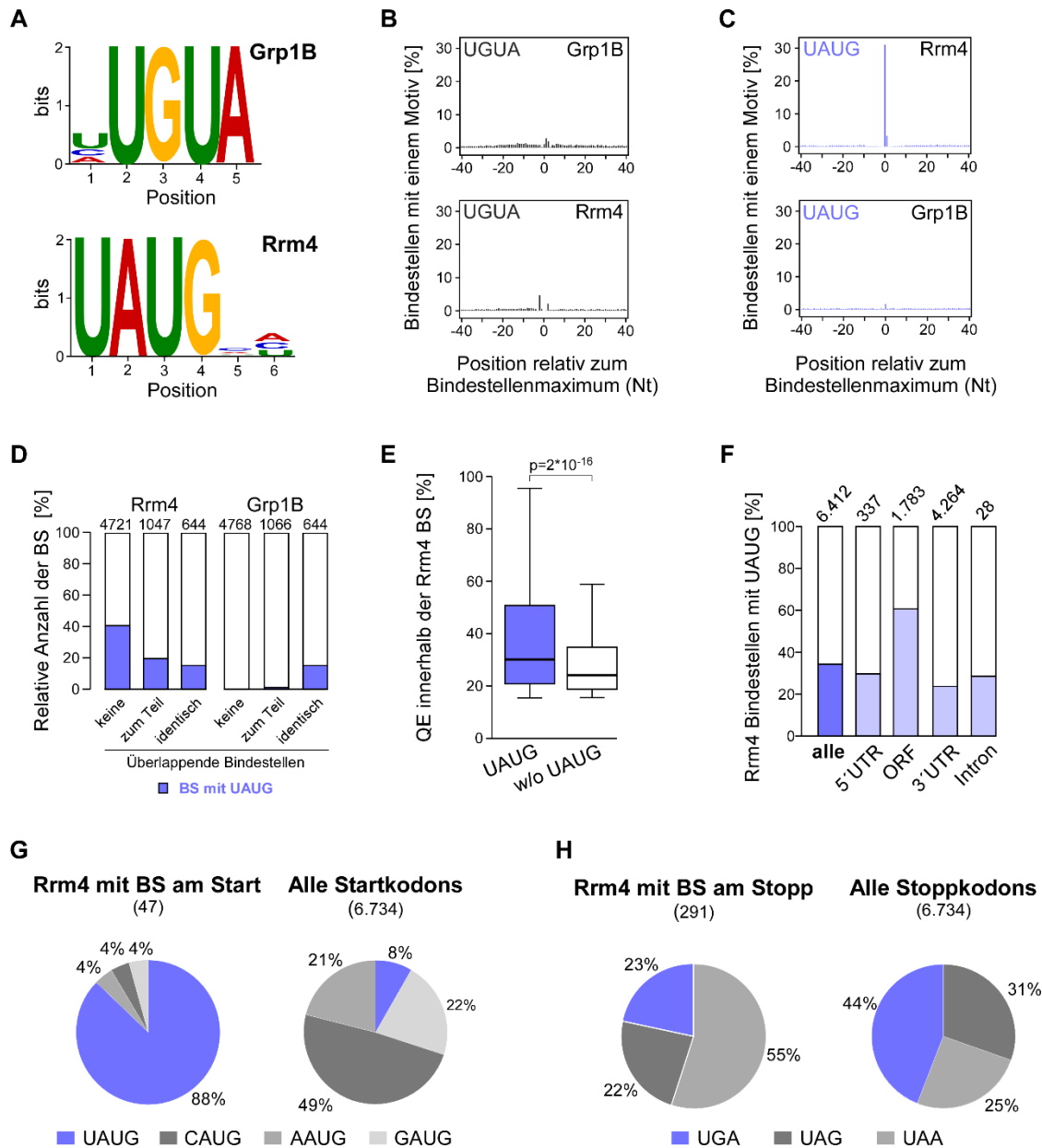


Abbildung 2.13 Identifizierung potentieller Bindemotive von Rrm4 und Grp1B **A)** DREME Sequenzlogo repräsentiert die Anreicherung der Tetranukleotide UGUA an den Bindestellen von Grp1B (oben) und UAUG an den Bindestellen von Rrm4 (unten) (<http://meme-suite.org/tools/dreme>; (Bailey, 2011)). Die Höhe der Nukleotide repräsentiert die Häufigkeit, mit der dieses Nukleotid an der entsprechenden Position vorkommt. **B)** Histogramm zeigt die Häufigkeit in Prozent an, mit der das Bindemotiv UGUA um die Bindestellen herum von Grp1B und Rrm4 vorzufinden ist. Analysiert wurde ein 40 Nukleotid-Fenster um das Bindestellenmaximum herum. **C)** Dargestellt wird die Häufigkeit vom Tetranukleotid UAUG um die Grp1B und Rrm4 Bindestellen herum. Die Analyse wurde durchgeführt wie in B. **D)** Das Balkendiagramm zeigt die relative Anzahl an Bindestellen von Grp1B und Rrm4 die entweder gar nicht (keine), zum Teil oder vollständig (identisch) mit der Bindestelle des jeweils anderen Proteins überlappen. Die absolute Häufigkeit ist über dem jeweiligen Balken zusätzlich aufgeführt. Der Anteil an Bindestellen, die das Bindemotiv UAUG enthalten sind blau hervorgehoben. **E)** Der Box-Plot zeigt die relative Häufigkeit der QE von Rrm4 BS mit und ohne das Bindemotiv UAUG (ungepaarter t-Test; $P < 2.22 \times 10^{-16}$). **F)** Das

Balkendiagramm zeigt die relative Anzahl an Rrm4 BS pro Region (5'UTR, ORF, 3'UTR und Intron) mit dem Bindemotiv UAUG. Die absoluten Zahlen sind über den entsprechenden Balken dargestellt. **G)** Das Diagramm zeigt das relative Vorkommen der von Rrm4-gebundenen (links) Startkodons und der NAUG Sequenz im Kontext aller (rechts) Startkodons. Uracil vor dem Startkodon ist in beiden Diagrammen blau hervorgehoben. **H)** Das Kuchendiagramm zeigt die relative Verteilung der drei Stoppkodons für Rrm4-gebundenen Gene (links) und aller Gene (rechts). Das Stoppkodon UGA ist blau hervorgehoben, weil sich zwei der Nukleotide (UG) mit dem Rrm4 Bindemotiv (UAUG) überschneiden. Die Abbildung wurde modifiziert nach Olgeiser et al., 2019 (Abb. 5A-C, G, H und EV5A, B und D).

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass UAUG als ein potentielles Bindemotiv für Rrm4 bestätigt werden konnte. Ein Drittel der Bindestellen von Rrm4 weist dieses Tetranukleotid auf. Darüber hinaus sind die QE innerhalb dieser Bindestellen angereichert, was für eine stärkere Interaktion zwischen Rrm4 und dem Bindemotiv spricht. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass Rrm4 unabhängig von der Sequenzähnlichkeit zum Start- und Stoppkodon spezifisch den Translationsstart und das -ende bindet. Diese Ergebnisse könnten auf eine neue Funktion von Rm4 während der posttranskriptionellen Regulation hindeuten.

2.5.5 mRNAs der mitochondrialen F₀F₁ ATPase Untereinheiten werden von Rrm4 gebunden

Die Analyse der gebundenen Transkripte zeigte, dass viele der Ziel-mRNAs für mitochondriale Proteine kodieren (Abb. 2.11D). Insbesondere waren unter den 291 am Stoppkodon gebundenen Rrm4 Transkripten mRNAs, die für die Proteinuntereinheiten der mitochondrialen F₀F₁ ATP-Synthase kodieren, angereichert. Dabei wurden 9 von den insgesamt 17 mRNAs, die für die ATP-Synthase Untereinheiten kodieren, von Rrm4 direkt am Stoppkodon gebunden und 8 in der 3'UTR (Abb. 2.14A und B). Eine detaillierte Verteilung der Bindestellen ist in Abbildung 2.14B zu sehen. Diese zeigt eindeutig, dass die Transkripte, die für die ATP-Synthase kodieren sehr viele Rrm4 Bindestellen enthielten. Im direkt Vergleich befanden sich nur vereinzelt Grp1B Bindestellen in der 3'UTR. Neben den in dieser Arbeit identifizierten mitochondrialen Proteinen, konnte Janine Koepke bereits 2011 zeigen, dass eine Verbindung zwischen Rrm4 und Mitochondrien besteht (Koepke et al., 2011). Mittels DIGE-Analysen wurde gezeigt, dass Rrm4 einen Einfluss auf die Proteinmenge von 10 verschiedenen Proteine in der Membran-assoziierten Fraktion hat. Darunter wurden drei mitochondriale Proteine, die NADH-Ubiquinon Oxidoreduktase Nuo2 (UMAG_11495), die mitochondriale AAA Protease Afg3 (UMAG_00898) und Atp4 der F₀-b-Untereinheit der ATP-Synthase, identifiziert (Koepke et al., 2011). Abbildung 2.14C zeigt die Verteilung der Rrm4 sowie Grp1B Bindestellen entlang von *nuo2*, *afg3* und *atp4*. Sowohl *nuo2* als auch *afg3* weisen UAUG-Bindestellen im ORF auf. Zusätzlich dazu wurde *afg3* von Grp1B und Rrm4 in der 3'UTR gebunden. Die *atp4* mRNA, die für die b-Untereinheit der F₀F₁ ATP-Synthase kodiert, wird von Grp1B und Rrm4 am Ende der 3'UTR gebunden.

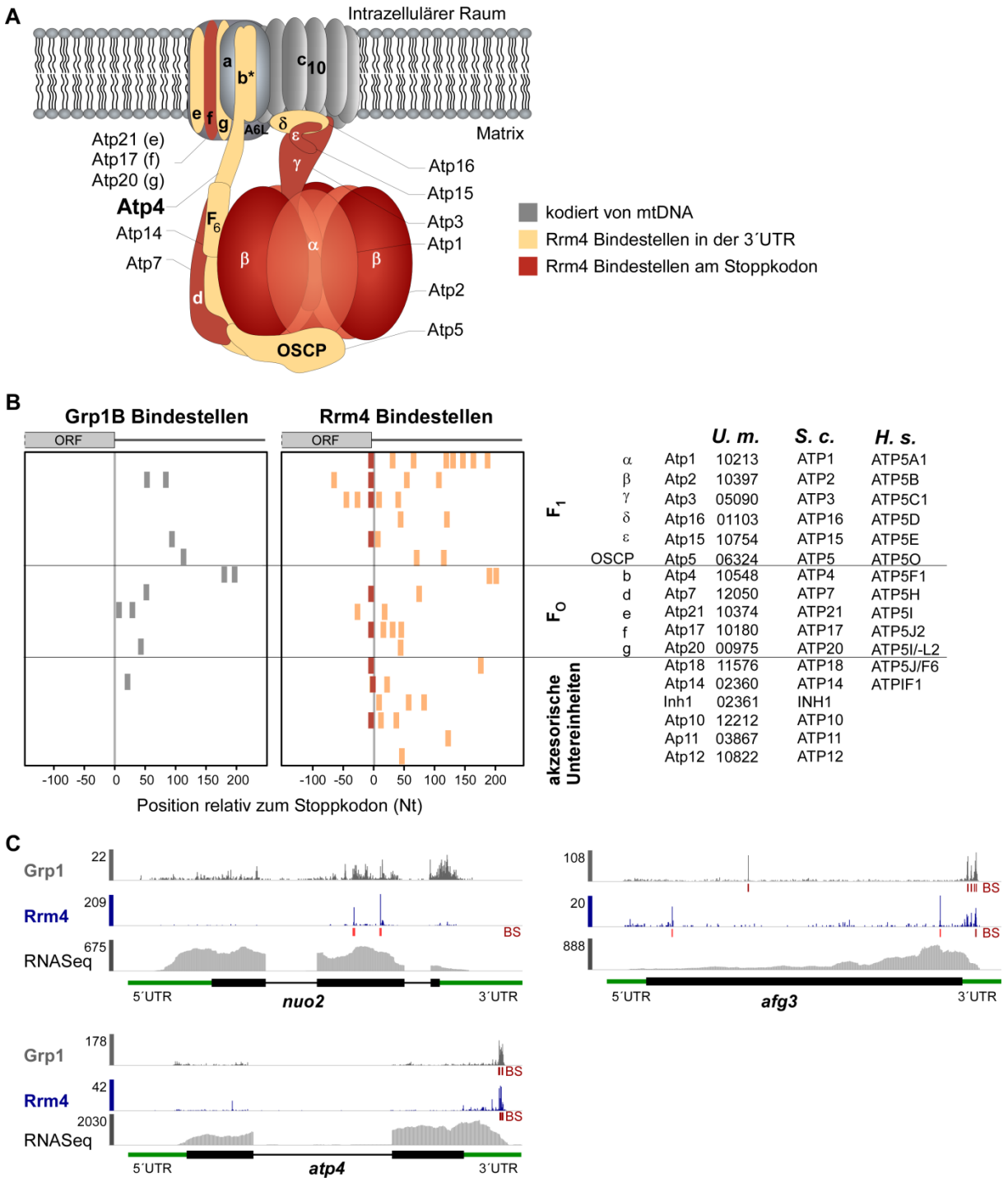


Abbildung 2.14 Rrm4 interagiert mit Transkripten, die für die mitochondriale ATPase kodieren A) Illustration der mitochondrialen F₀F₁ ATPase (modifiziert nach (Kucharczyk et al., 2009)). Proteinuntereinheiten, deren mRNA Rrm4 Bindestellen am Stoppkodon oder in der 3'UTR aufweisen, sind in rot bzw. orange dargestellt. Graue Proteinuntereinheiten werden von dem mitochondrialen Genom kodiert. B) Kartierung der Bindestellen von Grp1B (links) und Rrm4 (rechts) am Transkriptende, die für die Untereinheiten der F₀F₁ ATP-Synthase kodieren. Auf der rechten Seite sind die Nomenklatur und die entsprechenden UMAG Nummern in *U. maydis* (*U.m.*), *S. cerevisiae* (*S.c.*) und humanen Zellen (*H.s.*)

dargestellt. **C)** Verteilung der Bindestellen von Rrm4 und Grp1B entlang von *nuo2* (UMAG_11495), *afg3* (UMAG_00898) und *atp4*. Die Transkripte sind in schwarz dargestellt und die 5'UTR und 3'UTR in grün. Die QE sind in grau für Grp1B, in blau für Rrm4 dargestellt und darunter sind die UAUG-enhaltenden Rrm4 Bindestellen in hellrot hervorgehoben. Zusätzlich sind die RNASeq-Daten gezeigt. Die Abbildung wurde modifiziert nach Olgeiser et al., 2019 (Abb. EV4A).

Die iCLIP Ergebnisse unterstützen die mittels DIGE aufgestellte Hypothese, dass Rrm4 wichtig für den Import mitochondrialer Proteine und somit für die Funktion der Mitochondrien sein könnte. Darüber hinaus war es in dieser Arbeit zum einen möglich, Transkripte zu identifizieren, die für die mitochondriale F_0F_1 ATP-Synthase kodieren und zum anderen genau zu bestimmen, wo diese von Rrm4 und Grp1B gebunden werden. Die Lokalisation der Rrm4 Bindestellen im ORF, am Stoppkodon bzw. in der 3'UTR deutet daraufhin, dass Rrm4 einen Einfluss auf die translationale Regulation der F_0F_1 ATP-Synthase Transkripte haben könnte. Rrm4 könnte mit der Translokation der Ribosomen interferieren und so die Fertigstellung des Proteins verzögern, bis die mRNA ihren Bestimmungsort erreicht hat.

3. Diskussion

RNA-bindende Proteine (RBPs) sind wichtig für die ko- und posttranskriptionelle Regulation (Mansfield and Keene, 2009). In *U. maydis* ist das RBP Rrm4 essentiell für das unipolare Hyphenwachstum und die pathogene Entwicklung (Becht et al., 2006). Beide Eigenschaften sind abhängig vom endosomalen mRNA Transport (Kapitel 1.3). Obwohl schon einige am Transport beteiligten Proteinkomponenten und mRNAs bekannt sind, ist die Komposition der Rrm4-abhängigen mRNPs weitgehend unerforscht.

Das Ziel dieser Arbeit war die mRNAs des Rrm4-abhängigen mRNPs zu untersuchen. Dazu sollten sowohl die mRNAs die von Rrm4, als auch die von dem putativen Rrm4 Interaktionspartner Grp1B (Glyzin-/Glutamin-reiche RNA-bindende Protein) gebunden werden, transkriptomweit identifiziert werden. Da sich die iCLIP Methode für die Analyse der Protein-RNA Interaktionen am besten eignet, wurde diese Technik in *U. maydis* verwendet. Für die Generierung reproduzierbarer iCLIP Ergebnisse wurde die Methode optimiert. Die optimierte iCLIP Methode ermöglichte die Identifizierung zahlreicher mRNAs und lieferte einen Einblick in das Bindeverhalten zweier RBPs, welche beide Komponenten des endosomalen mRNPs sind.

Darüber hinaus wurde in der vorliegenden Arbeit die Funktion von Grp1B, während des hefeartigen und des hyphalen Wachstums von *U. maydis*, untersucht. Die Ergebnisse zeigen eindeutig, dass sich Grp1B und Rrm4 in ihren zellulären Funktionen unterscheiden. Rrm4 wird primär für das hyphale Wachstum benötigt, in dem es, über den endosomalen mRNA Transport, die Etablierung und Aufrechterhaltung des polaren Wachstums reguliert. Grp1B ist hingegen für beide Wachstumsstadien wichtig und spielt eine Rolle beim Zellwachstum sowie bei Kälte- und Zellwandstress. Trotz der divergenten zellbiologischen Funktionen sind beide Proteine Komponenten der endosomalen mRNA Transportmaschinerie. Die Interaktion zwischen Rrm4 und Grp1B ist dabei auf die gemeinsam gebundenen mRNAs zurückzuführen (Abb. 2.5).

3.1. Optimierung der iCLIP Methode in *U. maydis*

Der Hauptfokus dieser Arbeit lag auf der Optimierung der iCLIP (*individual nucleotide resolution in vivo UV-crosslinking and immunoprecipitation*) Methode, da die bisherigen iCLIP Ergebnisse sehr stark in ihrem Umfang und ihrer Qualität schwankten (Dissertation Carl Haag, 2013). Die iCLIP Methode eignet sich besonders gut für die Analyse von Protein-RNA Interaktionen und ermöglicht ein besseres Verständnis für die Funktionsweise von RBPs zu entwickeln. Diese Methode identifiziert transkriptomweit Ziel-mRNAs eines RBPs mit einer nukleotidgenauen Auflösung der Proteinbindestellen (König et al., 2012; König et al., 2010). Mit Hilfe des optimierten iCLIP Protokolls konnten umfangreiche und reproduzierbare iCLIP-Banken mit einer hohen Qualität generiert werden (Abb. 2.9C). Somit war es möglich die mRNAs die von Rrm4 und Grp1B gebunden werden transkriptomweit zu identifizieren und das Bindeverhalten der beiden RBPs im direkten Vergleich zueinander zu analysieren. Als besonders kritische Parameter erwiesen sich die UV-Quervernetzungsreaktion sowie die Aufreinigung des Protein-RNA-Komplexes.

3.1.1 Die Quervernetzungseffizienz ist proteinspezifisch

Die UV-abhängige Quervernetzung zwischen den RBPs und den RNAs ist der erste essentielle Schritt für eine erfolgreiche und spezifische Identifizierung der gebundenen RNAs. Obwohl gezeigt werden konnte, dass fast alle Aminosäuren, mit Ausnahme von Asparagin, Asparaginsäure, Glutamin und Glutaminsäure, das Potential besitzen durch UV-Bestrahlung Quervernetzungen mit Nukleotiden einzugehen, muss in CLIP-basierten Experimenten die anzuwendende UV-Dosis für jedes zu untersuchende RBP optimiert werden (König et al., 2012; Kramer et al., 2014). Bei der Optimierung des iCLIP Protokolls in *U. maydis* wurde für Grp1B und Rrm4 die spezifische UV-Dosis von 200 mJ/cm² ermittelt (Abb. 2.7). In den zuvor durchgeführten Experimenten wurden die Hyphen mit insgesamt 480 mJ/cm² bestrahlt.

Die Quervernetzungseffizienz ist nicht nur proteinspezifisch sondern auch abhängig vom Organismus. In adhärent wachsenden Zellkulturen wird beispielsweise eine Bestrahlungsenergie von 150 mJ/cm² empfohlen (König et al., 2010). In Acker-Schmalwand *Arabidopsis thaliana* hingegen wurde für die Quervernetzung des Grp1B Homologs, AtGRP7, die Energie auf 500 mJ/cm² erhöht (Meyer et al., 2017). Eine Erhöhung der Bestrahlungsenergie bei Pflanzen ist notwendig, da diese über UV-absorbierende Pigmente verfügt. Ähnlich könnte es sich mit der Zellwand von Pilzen verhalten, was die Durchführung von CLIP-basierten Experimenten erschweren würde.

Die CLIP Methode wurde bereits in der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* angewendet, jedoch noch nicht in filamentös wachsenden Pilzen (Mitchell et al., 2013). In *S. cerevisiae* wurde zum Beispiel die HITS-CLIP Methode verwendet, um das gesamte Repertoire an RBPs zu ermitteln (Mitchell et al., 2013). Die Quervernetzungseffizienz bei der Bestrahlung der Hefezellen, bei einer Wellenlänge von 254 nm, war jedoch nicht ausreichend und eine Erhöhung der UV-Dosis (von 0,04 bis 1,2 J/cm²) interferierte sogar erheblich mit der RNA Integrität (Beckmann et al., 2015). Eine mögliche Ursache für die geringe Quervernetzungseffizienz in Pilzen, im Vergleich zu humanen Zellkulturen, könnten die Zellwand und deren Bestandteile, wie zum Beispiel Melanin, sein (Wang and Casadevall, 1994). Um die Effizienz der Bestrahlung zu erhöhen, wurde die PAR-CLIP Methode entwickelt (Hafner et al., 2010). Bei dieser Methode werden photoaktivierbare Ribonukleoside, wie 4-Thiouridin, 4-Thiouracil oder 6-Thioguanosin, verwendet, die bei einer Wellenlänge von 365 nm aktiviert werden (Hafner et al., 2010). Mit der PAR-CLIP Methode konnten sechs Mal mehr RBPs in *S. cerevisiae* identifiziert werden, als mit der HITS-CLIP Methode (Beckmann et al., 2015; Mitchell et al., 2013). Die UV-Dosis muss jedoch auch bei PAR-CLIP Experimenten für jeden Organismus angepasst werden. Während in PAR-CLIP Experimenten in *S. cerevisiae* eine Energie von 0,15 J/cm² eingesetzt wurde, war in dem Fadenwurm *Caenorhabditis elegans* eine weitaus höhere Dosis von 2 J/cm² erforderlich (Creamer et al., 2011; Jungkamp et al., 2011). Trotz der verbesserten Quervernetzungseffizienz ist die PAR-CLIP Methode nicht für alle Organismen geeignet, da nicht alle Lebewesen in der Lage sind die Basanaloge effizient aufzunehmen und in die mRNA zu inkorporieren. Zusätzlich kann die Inkubation dieser Nukleoside toxisch für die Zellen sein (Huppertz et al., 2014). Die Anpassung der UV-Dosis in *U. maydis* resultierte in reproduzierbaren iCLIP Ergebnissen.

3.1.2 Die Aufreinigungsstrategie entscheidet über die Ausbeute der Protein-RNA Komplexe

Die Aufreinigung des Protein-RNA Komplexes ist ein weiterer kritischer Schritt der über die Ausbeute der quervernetzten RNAs entscheidet. Da es sich bei der iCLIP Methode um eine protein-zentrische Methode handelt, ist die Integrität und Konzentration des zu untersuchenden RBP-RNA Komplexes von großer Bedeutung. Die ursprünglich verwendete Tap-Tag Aufreinigung, war sehr zeitintensiv und verbunden mit einer geringen Ausbeute, weshalb dieser Schritt ebenfalls optimiert wurde. Durch die Verwendung der Grp1B-Gfp und Rrm4-Gfp Fusionsproteine konnte für die Aufreinigung der Protein-RNA Komplexe die Gfp-Trap Methode angewandt werden. Die Nutzung einer schnellen und effizienten Aufreinigung sowie das Arbeiten bei niedrigen Temperaturen, führte zur Reduktion des enzymatischen Abbaus des Protein-RNA Komplexes und somit zur Steigerung der Ausbeute. Dadurch konnten iCLIP-Banken mit einem großen Umfang generiert werden (Tab. 2.2). Trotz der Optimierung konnten weiterhin, wenn auch reduziert, Proteinabbaubanden detektiert werden (de Souza et al., 2015). Eine weitere mögliche Verbesserung wäre die Isolierung des Komplexes unter denaturierenden Bedingungen. Dadurch könnte der enzymatische Abbau des Komplexes weiter reduziert werden. Dazu müssten Aufreinigungstags verwendet werden, die die denaturierenden Bedingungen erlauben. So werden zum Beispiel bei einigen CLIP-Varianten, wie CRAC (*UV crosslinking and analysis of cDNAs*), CLAP (*crosslinking and affinity purification*), urea-iCLIP, uvCLAP (*UV crosslinking and affinity purification*) oder dCLIP (*denaturing CLIP*), die Protein-RNA Komplexe unter denaturierenden Bedingungen isoliert, um die Ausbeute zu erhöhen und mögliche indirekte Interaktionspartner und ungebundene RNAs zu entfernen (Aktas et al., 2017; Granneman et al., 2009; Huppertz et al., 2014; Rosenberg et al., 2017; Wang et al., 2010). Die Gfp-Trap Methode führte bereits zu einer deutlichen Verbesserung der Ausbeute, aber eine weitere Erhöhung der Konzentration, unter denaturierender Bedingungen, wäre daher auch für *U. maydis* denkbar.

3.2. Rrm4 und Grp1B binden ein breites Spektrum an funktional diversen mRNAs

Mit Hilfe der vergleichenden iCLIP Studie wurde erstmals ein umfassender, transkriptomweiter Einblick auf die Grp1B- und Rrm4-gebundenen Transkripte gewährt. Die iCLIP Analysen ergaben, dass beide RBPs über 3.000 Transkripte binden, wobei zwei Drittel dieser Transkripte sowohl von Grp1B als auch von Rrm4 gebunden werden.

In Übereinstimmung mit der großen Anzahl an gemeinsam gebundenen Transkripten, kolokalisieren beide RBPs auf Endosomen. Die Lokalisationsstudien zeigten, dass Rrm4 hauptsächlich auf frühen Endosomen lokalisiert und Grp1B lediglich Rrm4-abhängig auf Endosomen vorzufinden ist, wobei die Kolokalisation von der Rrm4 Fähigkeit abhängt mRNAs zu binden (Abb. 2.4 und 2.5). Darüber hinaus interferiert der Verlust von *grp1* nicht mit dem endosomalen mRNA Transport, weshalb Grp1B eine akzessorische Komponente des Rrm4-vermittelten mRNPs ist (Abb. 2.5). Unter der Berücksichtigung dieses Wissens, deuten die iCLIP Ergebnisse daraufhin, dass eine große Anzahl an mRNAs auf Endosomen transportiert wird und Rrm4 hauptsächlich, wenn nicht sogar ausschließlich für den Transport verantwortlich ist.

3.2.1 Der Rrm4-vermittelter endosomaler mRNA Transport

Die Untersuchung der mRNAs die über den endosomalen Transportweg verteilt werden ergab, dass diese für funktional diverse Proteine kodieren. Eine statistisch signifikante Anreicherung in Bezug auf subzelluläre Lokalisation wurde für Translationsprodukte gebundener mRNAs in den Kategorien „Mitochondrium“, „Intrazellulärer vesikulärer Transport“ und „Zytoskelett“ festgestellt (Abb. 2.11D). Diese funktionale Diversität der Rrm4-gebundenen Transkripte unterstützt die Hypothese, dass Rrm4 eine zentrale Rolle beim globalen mRNA Transport einnimmt. Der Verlust von Rrm4 führt sowohl zum Verlust der Verteilung der mRNAs als auch der mit der mRNA assoziierten Proteinen, wie zum Beispiel der endosomalen Pab1- und Grp1B-Fraktion (Abb. 2.5; (König et al., 2009)). Der aktive mRNA Transport ist besonders wichtig während des hyphalen Wachstums. In polar wachsenden Hyphen müssen die mRNAs von dem zentral gelegenen Zellkern bis zu den Zellperipherien gelangen. Da die freie Diffusion ein langsamer Prozess ist, könnte *U. maydis* den aktiven Rrm4-vermittelten Langstreckentransport entlang des MT-Zytoskeletts ausnutzen, um die mRNAs zu transportieren (Baumann et al., 2014; Higuchi et al., 2014). Fehlt der aktive Rrm4-abhängige mRNA Transport, so hat es eine signifikante Auswirkung auf das polare Wachstum und die Virulenz des Pilzes (Becht et al., 2006; Becht et al., 2005).

Der Rrm4-vermittelte mRNA Transport, ohne detektierbare mRNA Akkumulation, ähnelt dem in Neuronen aufgestelltem Sushi-Fließband-Modell, für mRNA Transport. In diesem Modell werden in Neuronen mRNAs ohne sichtbare zelluläre Akkumulation verteilt (Doyle and Kiebler, 2011). Dabei werden die mRNAs in der Zelle transportiert, um entfernte Bereiche vom Zellkern zu erreichen, nach Bedarf abgeladen und translatiert. Das hat mehrere Vorteile: Das Protein kann zum einen lokal und in der benötigten Konzentration hergestellt werden und zum anderen kann die Zelle schneller auf bestimmte Stimuli reagieren (Doyle and Kiebler, 2011; Kejiou and Palazzo, 2017; Martin and Ephrussi, 2009). Obwohl die Rrm4-abhängige Verteilung der mRNAs an das Sushi-Fließband-Modell erinnert, so scheint ein wesentlicher Unterschied zu bestehen. Immer mehr Studien deuten darauf hin, dass die Rrm4-spezifischen mRNPs translational aktiv transportiert werden könnten (Baumann et al., 2014; Higuchi et al., 2014; Zander et al., 2016). Die bisher am besten untersuchten Beispiele für die endosomale Translation in *U. maydis* sind die Septin mRNAs (Baumann et al., 2014; Zander et al., 2016). Die Lokalisation der Septin mRNAs auf Rrm4-positiven Endosomen ist erforderlich für die Assemblierung der Septin Proteine zu multimären Komplexen und somit für ein effizientes unipolares Hyphenwachstum (Zander et al., 2016). Passend dazu wurden alle vier Septin mRNAs in dem iCLIP-Datensatz als Ziel-Transkripte von Rrm4 und Grp1B identifiziert (Anhang Abb. 8.1). Dabei werden sie von beiden RBPs hauptsächlich in der 3'UTR gebunden. Demnach kann vermutet werden, dass die Bindung der RBPs nicht mit den Ribosomen während der Translation interferiert.

Tatsächlich konnte kürzlich in Neuronen gezeigt werden, dass Rab7-positiven Endosomen, die auch als späten Endosomen bezeichnet werden, als Plattform für die axonale Lokalisation und Translation von mRNAs, die für die mitochondriale Proteine kodieren, dienen (Cioni et al., 2019). Die lokale Translation ist dabei wichtig für die Funktion der Mitochondrien im Axon (Cioni et al.,

2019; Rangaraju et al., 2019). Interessanterweise wurde bereits 2011 gezeigt, dass eine Verbindung zwischen Rrm4 und Mitochondrien in *U. maydis* besteht (Kapitel 3.2.3; (Koepke et al., 2011)). iCLIP-Daten dieser Arbeit deuten ebenfalls auf eine Verbindung zu Mitochondrien hin.

Die Funktion des Rrm4-vermittelten endosomale mRNA Transports innerhalb der Zelle könnte somit die gleichmäßige Verteilung von mRNAs, deren Translationsprodukte, assoziierte Proteine (zum Beispiel das Poly(A)-bindende Protein Pab1), sowie auch die Translationsmaschinerie und deren Translationsprodukte sein (Baumann et al., 2014; Higuchi et al., 2014; König et al., 2009; Zander et al., 2016). Interessant wäre zu klären, wie die Translation während des Transports reguliert wird. Werden alle mRNAs, wie die der Septine, auf den Endosomen translatiert, oder werden einige translational inaktiv befördert. In diesem Zusammenhang stellt sich die Frage, welche Auswirkungen das Bindeverhalten von Rrm4 und Grp1B auf die Translation haben könnte.

3.2.2 Das Rrm4 Bindeverhalten und dessen Bedeutung für die posttranskriptionelle Regulation

Um mehr über die Funktion von RBPs zu erfahren reicht es nicht aus lediglich die Ziel-mRNAs zu identifizieren, sondern es ist notwendig deren vollständiges Interaktionsspektrum zu ermitteln. Mittels der iCLIP Methode ist es gelungen die Proteinbindestellen der beiden RBPs transkriptomweit zu identifizieren. Sowohl Grp1B als auch Rrm4 binden gemeinsam ein Drittel der Protein-kodierten mRNAs und zwar bevorzugt in ihrer 3'UTR. Es gibt zahlreiche Beispiele für mRNAs deren subzelluläre Lokalisation über die Bindung der RBPs an die 3'UTR reguliert wird (Lecuyer et al., 2007). Ein Beispiel dafür ist das RBP Staufin (Stau2). Staufin vermittelt die mRNA Lokalisation in Dendriten durch die Bindung der 3'UTR. So wird die 3'UTR der Calmodulin 3 (*Calm3*) mRNA für die Rekrutierung von Stau2 benötigt, damit *Calm3* in dem distalen Bereich der Dendriten lokalisieren kann (Sharangdhar et al., 2017). Weitere Beispiele sind die RBPs Vg1 und Vera im Krallenfrosch *Xenopus laevis*. Beide RBPs binden während der Oogenese die *cis*-wirkenden Elemente in der 3'UTR von *Vg1* mRNA und ermöglichen die Lokalisation am vegetativen Pol (Lewis et al., 2008).

Die detaillierte Analyse der Rrm4 Bindestellen zeigte, dass sich die Bindestellen bei einigen Transkripten vermehrt am Ende der 3'UTR befinden (Anhang Abb. 8.2, links). Interessanterweise galt diese Beobachtung jedoch nicht für die Grp1B Bindestellen (Anhang Abb. 8.2). Eine mögliche Erklärung dafür könnte die Interaktion mit dem endosomalen Adapterprotein Upa1 liefern. Upa1 interagiert sowohl mit dem Poly(A)-bindenden Protein Pab1 als auch mit Rrm4 und verbindet das Rrm4-abhängige mRNP mit dem Endosomen (Pohlmann et al., 2015). Diese Komplexbildung, die über Upa1 zustande kommt, könnte einen Einfluss auf das Bindeverhalten von Rrm4 haben und so die Anreicherung der Bindestellen am Ende der 3'UTRs erklären. Darüber hinaus interagiert ein weiteres PAM2 Motiv-tragendes Protein, Upa2, mit dem Pab1 Protein und stabilisiert dadurch den Rrm4-abhängigen mRNP Komplex (Jankowski et al., 2019).

Die nicht-kodierenden Regionen der mRNA übernehmen wichtige regulatorische Funktionen und sind maßgeblich an der posttranskriptionalen Genregulation beteiligt (Mayr, 2017). Zwar sind die

3'UTRs nicht so stark konserviert wie die kodierenden Bereiche der mRNAs, trotzdem enthalten sie eine beträchtliche Anzahl an konservierten Sequenzmotiven, den *cis*-wirkenden Elementen. Diese können sogar Spezies-übergreifend sein, was auf eine wichtige regulatorische Funktion hindeutet (Mayr, 2016; Siepel et al., 2005). Die 3'UTRs sind an der Regulation der mRNA Stabilität, Translation und Lokalisation beteiligt (Barreau et al., 2005; Martin and Ephrussi, 2009). Sie fungieren als Plattform für RBPs und ermöglichen die Assemblierung von Proteinkomplexen, wodurch das subzelluläre Schicksal der gebundenen mRNA bestimmt wird (Baltz et al., 2012; Castello et al., 2012). Für die Bindung der RBPs an eine 3'UTR sind zusätzlich zu den *cis*-wirkenden Elementen auch die Länge und die Sekundärstruktur der 3'UTR entscheidend (Dominguez et al., 2018). Durch die Ausbildung von Sekundärstrukturen sind die *cis*-wirkenden Elemente schwerer zugänglich (Mayr, 2017). Dabei unterliegen längere 3'UTRs nicht zwangsläufig einer stärkeren Regulation, sondern das Gegenteil ist oftmals der Fall (Mayr, 2017).

Ob die Anreicherung der Bindestellen in der Nähe des Poly(A)-Anhangs durch die Rrm4-Upa1 Interaktion bestimmt wird, oder auf die bessere Zugänglichkeit am Ende der 3'UTR zurückzuführen ist, müsste näher untersucht werden. Dazu müsste überprüft werden, ob eine Korrelation zwischen der Lage der Bindestellen und der Länge der 3'UTRs besteht.

Interessanterweise wurde die Beobachtung, dass RBPs häufig in der Nähe des Poly(A)-Anhangs binden, auch in anderen CLIP-basierten Experimenten gemacht (Mukherjee et al., 2014; Wang et al., 2012). So bindet zum Beispiel das *Muscleblind*-ähnliche RBP (Mbnl1), welches für die Entwicklung der Muskeln und der Augen benötigt wird, die mRNAs bevorzugt in der 3'UTR, in der Nähe der Polyadenylierungsstelle (PAS; *polyadenylation site*) (Wang et al., 2012). Ein anderes Beispiel ist das ARE-bindende RBP, ZFP36, welches bevorzugt in den letzten 100 Nukleotiden der 3'UTR bindet und vermutlich so die Stabilität der mRNA beeinflusst (Mukherjee et al., 2014).

Im Hinblick auf die endosomale Translation könnte die Lage der Bindestellen von Rrm4 und Grp1B entscheidend sein. Die Bindung der beiden RBPs am 3'UTR passt zu der Theorie der lokalen Translation während des Rrm4-vermittelten Transportprozesses, da die RBPs nicht mit der Translokation der Ribosomen interferieren würden. Die präzise Analyse der Rrm4 Bindestellen deutet jedoch darauf hin, dass nicht alle mRNAs lokal translatiert werden.

3.2.3 Rrm4 bindet transkriptional aktive mRNA Regionen

Obwohl die Mehrheit der Transkripte von Rrm4 in der 3'UTR gebunden werden, konnte im Vergleich zu Grp1B eine signifikante Anzahl an Bindestellen in der Protein-kodierenden Region ermittelt werden. Über ein Viertel der Rrm4 Bindestellen befanden sich im offenem Leseramen. Dies könnte daraufhin deuten, dass mRNAs die von Rrm4 im ORF gebunden werden einer anderen posttranskriptionellen Regulation unterliegen, als diejenigen die in der 3'UTR gebunden werden. Die Bindung von Rrm4 im ORF könnte die Translokation der Ribosomen verhindern und so mit der Translation interferieren. Ein ähnlicher Mechanismus wird in Neuronen genutzt um die Translation zahlreicher mRNAs während des Transports zu blockieren (Graber et al., 2013). Für das neuronale RBP, FMRP, wurde gezeigt, dass es die Translation reversibel reprimiert, in

dem es mRNAs im ORF bindet und so die Translokation der Ribosomen blockiert (Darnell et al., 2011).

Die genaue Analyse zur Verteilung der Rrm4 Bindestellen entlang der kodierenden Region ergab, dass ca. 50 mRNAs genau am Startkodon und ca. 300 mRNAs am Stoppkodon gebunden werden (Abb. 2.13G und H). Je nach Position könnte Rrm4 somit an der Regulation der Translationinitiation oder –termination beteiligt sein. Interessanterweise bindet Rrm4 seine eigene mRNA in der Nähe des Startkodons. Dies könnte auf eine mögliche Autoregulation der *rrm4* mRNA hindeuten. Autoregulation ist bei RBPs ein gängiger Mechanismus, um das eigene Proteinlevel zu regulieren. Häufig wird die eigene mRNA nach demselben Prinzip reguliert wie die mRNAs die von dem RBP gebunden werden (Müller-McNicoll et al., 2019). So regulieren die meisten Serin/Arginin-reichen Proteine (SR-Proteine), die selbst Spleißregulatoren sind, ihr Proteinlevel indem sie das alternative Spleißen mit dem *non-sense mediated mRNA decay* (NMD) koppeln (Müller-McNicoll et al., 2016; Müller-McNicoll et al., 2019). Das RBP SRSF3 zum Beispiel führt zur Insertion eines Exons, welches ein vorzeitiges Stoppkodon kodiert, und somit zum Abbau der eigenen mRNA, über den NMD-Weg, führt (Jumaa and Nielsen, 2000; Müller-McNicoll et al., 2019). Ob Rrm4 das eigene RNA- oder Proteinlevel reguliert müsste näher untersucht werden. Um zu überprüfen, ob Rrm4 die eigene RNA Expression beeinflusst, könnte *rrm4* überexprimiert werden und das mRNA-Level mittels einer RNASeq Analyse überprüft werden. Durch die Verwendung eines regulierbaren Expressionssystems, wie zum Beispiel dem Tetracyclin-regulierbaren System, könnte Rrm4 überexprimiert werden und die Konzentration des endogen exprimierten Rrm4 Proteins mittels Western Blot analysiert werden. Mit einem ähnlichen Experiment konnte gezeigt werden, dass der Spleißingregulator RBM10 sowohl das Level seiner eigenen mRNA als auch das des Proteins über einen negativen Feedback-Mechanismus reguliert (Sun et al., 2017).

Im Hinblick auf die mRNAs die am Stoppkodon gebunden werden, ist aufgefallen, dass in diesem Datensatz Zellkern-kodierte mitochondriale mRNAs vertreten waren. Interessanterweise sind alle Untereinheiten von der mitochondrialen F_0F_1 ATP-Synthase Teil des endosomalen mRNPs. Dabei bindet Rrm4 neun der 17 Untereinheiten direkt am Stoppkodon (Abb. 2.14). Das eine Verbindung zwischen den Mitochondrien und dem Rrm4-abhängigen mRNA Transport besteht konnte bereits in vorangegangenen Studien demonstriert werden (Kapitel 3.2.1; (Koepke et al., 2011)). Dabei wurde gezeigt, dass in Abwesenheit von *rrm4* die Konzentration des Atp4 Proteins, welches die b-Untereinheit der F_0F_1 ATP-Synthase ist, in *U. maydis* Hyphen reduziert ist. Wie Rrm4 in die posttranskriptionelle Regulation der mitochondrialen ATP-Synthase involviert ist, muss noch genauer analysiert werden. Immer mehr Studien belegen aber, dass die mRNA-Lokalisation und die Biogenese der Mitochondrien miteinander verknüpft sind (Cioni et al., 2019; Marc et al., 2002; Margeot et al., 2002; Rossoll and Bassell, 2019). In Neuronen wurde gezeigt, dass die lokale Translation der mRNAs mitochondrialer Proteine auf späten Endosomen wichtig für die Funktion und Aufrechterhaltung der axonalen Mitochondrien ist (Kapitel 3.2.1; (Cioni et al., 2019)). Die Assoziation der späten Endosomen mit den Mitochondrien, kombiniert mit der lokalen Translation, soll die Lokalisation der Proteine zu den Mitochondrien erleichtern. Die

Rrm4-vermittelten endosomalen Lokalisationen der mRNAs, die für die Untereinheiten der ATP-Synthase kodieren, könnten, ähnlich wie in den Neuronen, wichtig für die Funktion der Mitochondrien in *U. maydis* sein. Auch in anderen Organismen scheint die RNA Biologie eng mit der Biologie der Mitochondrien verküpft zu sein. In *S. cerevisiae* wurden über 100 mRNAs identifiziert, die in der Nähe der Mitochondrien, unabhängig von ihrer Translation, lokalisieren (Marc et al., 2002). Die Lokalisation dieser mRNAs wird vor allem über die 3'UTR vermittelt, wie es für die *ATM1* mRNA, die für den ABC-Transporter der inneren mitochondrialen Membran kodiert, und die *ATP2* mRNA, die für die β -Untereinheit der F_0F_1 -ATP-Synthase kodiert, gezeigt werden konnte (Corral-Debrinski et al., 2000; Margeot et al., 2002). Interessanterweise wird die *atp2* mRNA aus *U. maydis* von Rrm4 am Stoppkodon und in der 3'UTR gebunden. Ob durch die Rrm4 Bindung am Stoppkodon die Translationstermination der *atp2* mRNA verhindert werden soll, bis die mRNA die Mitochondrien erreicht ist momentan noch unklar. All diese Studien deuten an, dass es eine speziesübergreifende enge Verbindung zwischen dem endosomalen mRNA Transport, der lokalen Translation sowie der Funktion von Mitochondrien zu geben scheint (Rossoll and Bassell, 2019).

3.2.4 Rrm4 erkennt das Bindemotiv UAUG mit der dritten RRM3 Domäne

Die Stärke der iCLIP Methode ist die Identifizierung der Proteinbindestellen mit einer nukleotidgenauen Auflösung des Bindemotivs (König et al., 2009). Die nukleotidgenaue Analyse der Rrm4 Bindestellen bestätigte das zuvor ermittelte Motiv UAUG (Abb. 2.13A; (Dissertation Carl Haag, 2013)). Mit Hilfe der iCLIP-Technik konnten bereits für zahlreiche RBPs spezifische Bindemotive identifiziert werden, wie zum Beispiel für die Proteine hnRNP C, TIA1 und alle sieben humanen SRSF Proteine (König et al., 2010; Müller-McNicoll et al., 2016; Wang et al., 2010). Interessanterweise wurde das Rrm4 spezifische Bindemotiv UAUG vor einigen Jahren in einem SELEX (*systematic evolution of ligands by exponential selection*) Experiment identifiziert, in welchem es von der dritten RRM Domäne von Rrm4 gebunden wurde. In darauffolgenden Hefe-Drei-Hybrid Experimenten wurde die SELEX UAUG-Struktur als Bindemotiv von RRM3 bestätigt (König et al., 2007).

Die genaue Untersuchung zur Lage des Bindemotivs ergab, dass Rrm4 überwiegend UAUG in der Protein-kodierenden Region bindet (Abb. 2.13F). Darüber hinaus scheinen Motiv-enthaltende Bindestellen stärker von Rrm4 gebunden zu werden als Bindestellen ohne Motiv (Abb. 2.13E). Damit übereinstimmend, führte eine Mutation der dritten RRM Domäne zur Reduktion der UV-abhängigen Quervernetzung zwischen Rrm4 und den mRNAs (Becht et al., 2006). Die UV-induzierte Fixierung zwischen den RBPs und den Ziel-mRNAs wird maßgeblich über die interagierenden Aminosäuren und die Nukleoside bestimmt. Obwohl gezeigt werden konnte, dass alle Aminosäuren photoaktivierbar sind und irreversibel mit den gebundenen Nukleosiden kreuzvernetzt werden können, lassen sich einige Nukleoside leichter photoaktivieren als Andere. Uridin (U) kann am besten aktiviert werden, gefolgt von Cytosin (C), Adenin (A) und Guanin (G) (Hockensmith et al., 1986). Deshalb wird Uridin in iCLIP Experimente am häufigsten quervernetzt (Sugimoto et al., 2012). Um eine Aussage über die biologische Relevanz eines RBPs

treffen zu können, müssen die RBPs und ihr Bindeverhalten *in vivo* untersucht werden. So haben Rrm4 Mutationsanalysen gezeigt, dass die Mutation der dritten RRM Domäne keine phänotypische Auswirkung zeigt. Die Mutation der ersten RRM Domäne hingegen führt zum Verlust des unipolaren Hyphenwachstums, ähnlich dem Rrm4 Deletionsphänotypen (Becht et al., 2006). Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass RRM1 im Vergleich zu RRM3 eine höhere biologische Relevanz hat, oder über eine geringere UV-Quervernetzungseffizienz verfügt. In der Regel erkennen RBPs kurze Sequenzmotive von wenigen Nukleotiden und sind deshalb in der Lage viele verschiedenen mRNAs an unterschiedlichen Positionen zu binden (Cook et al., 2015). RBPs die mit multiplen RNA-bindenden Domänen (RBDs) ausgestattet sind, können unterschiedliche Sequenzmotive innerhalb eines mRNA Moleküls binden (Dominguez et al., 2018). Interessanterweise binden in Tandem liegenden RRM Domänen die mRNA häufig in der 5' → 3' Orientierung. Dabei richtet sich RRM2 an der 5' Richtung aus und RRM1 an der 3' Richtung (Afroz et al., 2015). Diese Orientierung würde auch zum Bindeverhalten von Rrm4 passen (Abb. 3.1). Im Hinblick auf die ELAV-ähnliche Domänenarchitektur von Rrm4 (Abb. 1.5A), könnten RRM1 und RRM2 die mRNAs in der 3'UTR binden und so für die globale endosomale mRNA Rekrutierung zuständig sein. Diese Theorie würde auch zu der Beobachtung passen, dass die Mutation von RRM1 die endosomale mRNA Lokalisation beeinträchtigt (Baumann et al., 2014). RRM3 hingegen könnte ein selektives Bindeverhalten aufweisen, indem es zwar entbehrlich für die endosomale mRNA Rekrutierung ist, jedoch wichtig für die translationale Regulation spezifischer mRNAs sein könnte. Somit würde RRM3 translationale wichtige Regionen wie den Translationsstart und den ORF, indem es das Bindemotiv UAUG erkennt, binden und die Tandem RRM2/1 Domänen würden das Ende der mRNA sowie die 3'UTR binden (Abb. 3.1). Ein detailliertes Bindeverhalten von Rrm4, könnte ein besseres Verständnis für die Organisation des Rrm4-abhängigen mRNPs liefern. Deshalb sollte die Beteiligung der einzelnen RRM Domänen in weiteren Studien genauer analysiert werden. Dazu könnten zum Beispiel iCLIP Analysen mit mutierten RRM Domänen durchgeführt werden.

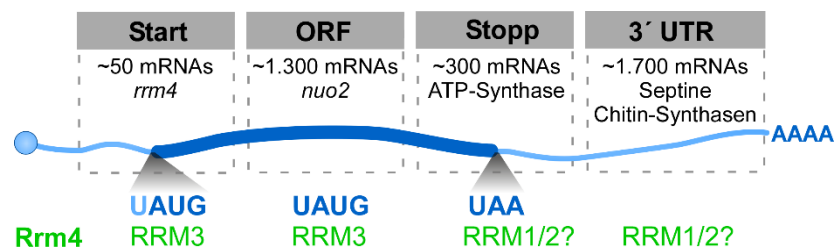


Abbildung 3.1 Die einzelnen RRM Domänen von Rrm4 könnten unterschiedliche mRNA Regionen binden Die Illustration zeigt wie Rrm4 seine Ziel-mRNAs binden könnte. Dabei binden die Tandem RRM Domänen, in der RRM2–RRM1 Orientierung, am Ende der mRNA und in der 3'UTR. RRM3 bindet den Translationsstart und den ORF, in dem es das spezifische Sequenzmotiv UAUG erkennt. Die Rrm4 Ziel-Transkripte wurden, abhängig von der Verteilung der Bindestellen, in unterschiedliche Kategorien unterteilt. Die Bindestellen die am Startkodon (~50) und im ORF (~1.300) identifiziert wurden, werden von RRM3 gebunden. Die Bindestellen die am Stoppkodon (~300) und in der 3'UTR ermittelt wurden, werden

wahrscheinlich von RRM1 und RRM2 gebunden. Die Abbildung wurde modifiziert nach Olgeiser et al., 2019 (Abb. 6A).

3.2.5 Grp1B bindet seine Ziel-Transkripte sequenzunspezifisch

Die vergleichenden iCLIP Analysen zeigten, dass Rrm4 und Grp1B bevorzugt in der 3'UTR binden und sich die Bindestellen häufig überlappen, es aber Unterschiede im Bindeverhalten gibt. Besonders deutlich wird es bei der Verteilung der Quervernetzungsereignissen (QE). Während die QE bei Rrm4 häufig auf wenige Nukleotide begrenzt sind, verteilen sich die QE von Grp1B großflächig über mehrere Nukleotide (Abb. 2.10D). Interessanterweise wurde ein ähnliches Bindeverhalten für das ARE-bindende RBP ZFP36, das durch seine Bindung an die 3'UTR zum Abbau der mRNA führt, gezeigt. Die Bindestellen von ZFP36 liegen sehr nah beieinander, was auf die Multimerisierung des Proteins zurückgeführt wird (Mukherjee et al., 2014). Ob Grp1B ebenfalls in der Lage ist zu multimerisieren, müsste genauer untersucht werden. Ein Hinweis darauf könnte die häufig beobachtete Bande im Immunoblot sein, die auf der Höhe eines Grp1B-Gfp Dimers detektiert wird (Abb. 2.6B). Die Protein-Protein Interaktion könnte dabei vermutlich über die Glyzin-reiche Region vermittelt werden (Steinert et al., 1991; Wright and Dyson, 2015). Die Anzahl der gebundenen mRNAs sowie das eher unspezifische Bindeverhalten deuten bereits an, dass Grp1B mRNAs vermutlich sequenzunspezifisch bindet. Tatsächlich konnte bislang kein spezifisches Bindemotiv identifiziert werden. Dieses Bindeverhalten könnte möglicherweise auf die Anzahl der RRM Domänen zurückzuführen sein. Grp1B enthält nur eine einzelne RRM Domäne, während Rrm4 drei Domänen enthält. Andererseits sind RBPs die nur eine RRM Domäne enthalten ebenfalls im Stande spezifische Nukleoside zu binden. Sie sind häufig in der Lage sowohl eine variable Anzahl an Nukleosiden als auch spezifische RNA Sequenzen zu binden (Afroz et al., 2015). So wird zum Beispiel für das Serin-Arginin-reiche RBP SRp20 (auch als SRSF3 bekannt) ein „semi-spezifisches“ Bindeverhalten ermittelt. Dabei wurde gezeigt, dass das Motiv CAUC zwar von SRp20 gebunden wird, jedoch nur das erste Cytosin spezifisch erkannt wird (Hargous et al., 2006). Für das Grp1B Homolog *AtGRP7* aus *A. thaliana* wurde mit der iCLIP Methode eine U/C-reiche Sequenz identifiziert.

Um die mRNAs erfolgreich zu binden, ist es für ein Protein nicht zwingend erforderlich eine spezifische Sequenz zu erkennen. Je nach Funktion der RBPs, wie zum Beispiel bei den RNA-Chaperonen, wäre es sogar kontraproduktiv nur bestimmte Motive zu binden. Im Gegensatz zu Sequenz-spezifischen RBPs ist die Bindung zwischen RNA-Chaperonen und gebundenen mRNAs häufig schwach und sequenzunspezifisch (Mayer et al., 2007). Das ist notwendig, da sie im RNA Metabolismus involviert sind und mit einer Vielzahl unterschiedlicher mRNAs stabile Interaktion eingehen müssen (Kang et al., 2013).

Das einige Glyzin-reiche RBPs (GRPs) auch als RNA-Chaperone agieren können, wurde bereits demonstriert (Al-Astal et al., 2016; Han et al., 2013; Kwak et al., 2011). *AtGRP7* zum Beispiel verfügt über Chaperonaktivität bei Kältestress (Kwak et al., 2011). Studien zeigten, dass nicht nur die RRM Domäne wichtig für die Chaperonaktivität ist, sondern auch die benachbarten Regionen (Kwak et al., 2011). Vor allem die unstrukturierten Proteinregionen, wie zum Beispiel die Glyzin-reiche Region, sollen wichtig für die Funktionalität der Chaperone sein (Tomba and Csermely,

2004). Ob Grp1B RNA-Chaperonaktivität besitzt, müsste in weiterführenden Studien untersucht werden (Abb. 3.2). Dazu könnte zum Beispiel eine „Transkription Anti-Terminationsanalyse“ durchgeführt werden (Rajkowitsch et al., 2005). Mit dieser Analyse konnte die RNA-Chaperonaktivität für die CSP (*cold shock proteins*) Proteine *in vivo* gezeigt werden (Bae et al., 2000; Phadtare et al., 2003). Während der Transkription der Chloramphenicol Acetyltransferase (CAT) bildet sich eine Terminationsschleife aus, eine Sekundärstruktur die die weitere Transkription des CAT Gens verhindert. Die *Escherichia coli* Zellen sind in diesem Fall Chloramphenicol sensitiv. In Anwesenheit eines RNA-Chaperons wird die Sekundärstruktur aufgelöst und die Transkription des CAT Gens kann fortgeführt werden. Die *E. coli* Zellen werden resistent gegenüber Chloramphenicol.

Eine Analyse zum Interaktionsverhalten von Grp1B könnte mehr Aufschluss über seine zelluläre Funktion geben.

3.2.6 Grp1B bindet mRNAs deren Translationsprodukte eine nukleäre Funktion haben

Die in dieser Arbeit durchgeführte Charakterisierung ergab, dass Grp1B, neben dem endosomalen mRNA Transport, eine zelluläre Funktion hat. Deshalb wurden die Ziel-Transkripte, die nur von Grp1B und nicht von Rrm4 gebunden werden, genauer untersucht. Unter diesen 520 identifizierten mRNAs wurde eine Anreicherung in der funktionellen Kategorie „Nukleus“ festgestellt (Abb. 2.11D). Dieses Ergebnis passt zu der subzellulären Grp1B Verteilung, denn neben der endosomalen Lokalisation ist Grp1B ebenfalls im Zellkern und im Zytoplasma vorzufinden. Darüberhinaus unterstützt es die Vermutung, dass es sich beim Grp1B um eine akzessorische Komponenten des Rrm4-vermittelten endosomalen mRNA Transports handelt.

Die Nukleus-zytoplasmatische Lokalisation wirft die Frage auf, wie Grp1B, das kein kanonisches NLS (*nuclear localization signal*) Signal aufweist, zwischen dem Zellkern und dem Zytoplasma wechselt. Aufgrund seiner geringen Größe (18 kDa), könnte Grp1B den Kernporenkomplex durch freie Diffusion passieren (Mohr et al., 2009). In *A. thaliana* lokalisiert AtGRP7 ähnlich wie Grp1B in beiden Kompartimenten (Kim et al., 2008). Dabei interagiert das Protein mit dem nukleären Transportin1 Rezeptor, wodurch der Zellkernimport ermöglicht wird (Ziemienowicz et al., 2003). Darüber hinaus wird vermutet, dass AtGRP7 den mRNA Export nutzt um den Zellkern wieder zu verlassen. Dabei wirkt es wahrscheinlich als ein RNA-Chaperon und unterstützt die korrekte mRNA Faltung, wodurch bei Kältestress der effiziente Export der gebundenen mRNAs gefördert wird (Kim et al., 2008; Kwak et al., 2011). Mit einem ähnlichen Mechanismus könnte auch Grp1B die mRNAs bereits im Zellkern binden und diesen zusammen mit den gebundenen Transkripten verlassen. Es ist denkbar, dass die Grp1B-spezifischen Transkripte vermutlich nicht in der Hyphe aktiv transportiert werden, sondern in der Nähe des Zellkerns lokalisieren (Abb. 3.2). Eine detailliertere Untersuchung der 520 Grp1B-spezifischen mRNAs könnte weitere Aufschlüsse über die funktionelle Rolle von Grp1B in der *U. maydis* Hyphe geben.

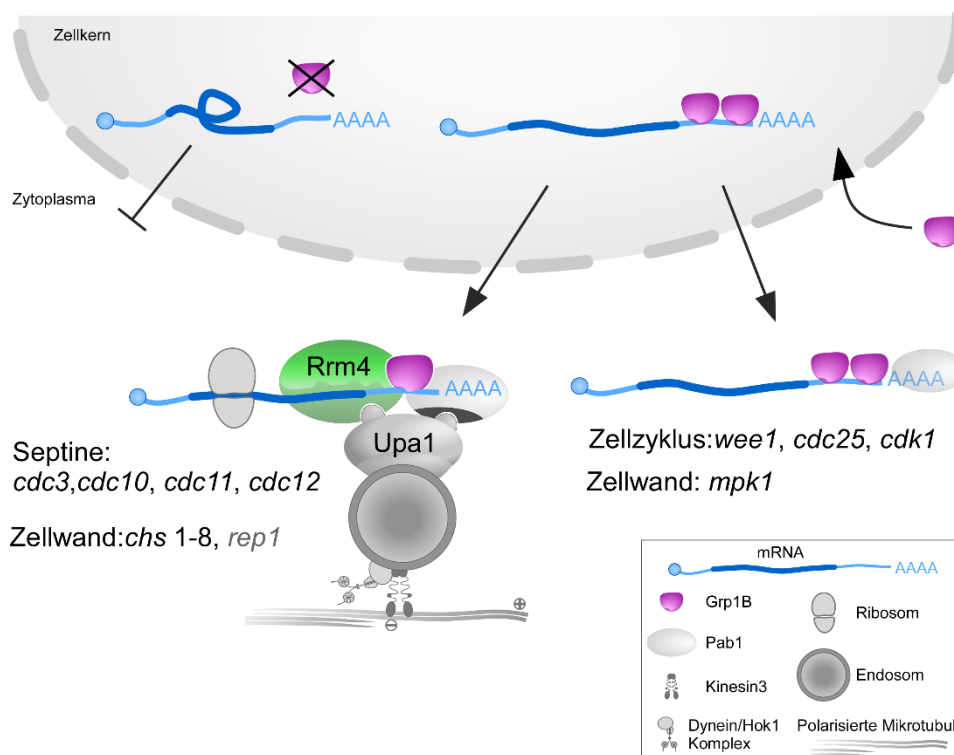


Abbildung 3.2 Modell der zellulären Funktion von Grp1B Das Modell zeigt eine Möglichkeit wie Grp1B in der Zelle agieren könnte. Als ein putativer RNA-Chaperon könnte Grp1B die mRNA bei der korrekten Faltung unterstützen und so den Export aus dem Zellkern ins Zytoplasma erleichtern. mRNAs die für nukleäre Proteine kodieren, wie zum Beispiel die Komponenten des Zellzykluses, werden vermutlich nicht über den endosomalen Transportweg befördert. mRNAs die eine andere subzelluläre Lokalisation aufweisen, werden zusammen mit Grp1B über den Rrm4-vermittelten Transportweg in der Zelle verteilt. Neben dem mRNA Export, könnte Grp1B auch an der mRNA Stabilität beteiligt sein. Die *rep1* mRNA ist in grau dargestellt, um zu verdeutlichen, dass diese nur im ungefilterten Datensatz (und nicht wie die anderen untersuchten Transkripte bei SOB 0,75) Grp1B Bindestellen aufweist (s. Anhang Abb. 8.3B). In der Legende sind alle Komponenten die nicht in der Abbildung bezeichnet wurden, aufgelistet.

3.3. Grp1B ist ein multifunktionelles Protein in *U. maydis*

Neben seiner Beteiligung am endosomalen Rrm4-abhängigen mRNA Transport, wurde die biologische Funktion von Grp1B näher untersucht. Grp1B wird zu den Glyzin-reichen RBPs der Klasse IVa gezählt. Wie für die GRPs dieser Klasse beschrieben, zählen diese Proteine zu den globalen Stressregulatoren, die an einer Vielzahl zellulärer Prozesse beteiligt sind (Czolpinski and Rurek, 2018; Zhu et al., 2016). In *U. maydis* führt der Verlust von *grp1* zu einem pleiotropen Phänotyp, was auf eine Beteiligung des Proteins an mehreren zellulären Prozessen hindeutet. In Abwesenheit von Grp1B sind die Zellen elongiert und sensitiv gegenüber Kälte- und Zellwandstress. Dies deutet darauf hin, dass Grp1B an der Regulation der Zelllänge, an der Kältestress- sowie der Zellwandstressantwort beteiligt ist.

Grp1B hat Homologe in anderen Organismen. Die Homologie beruht dabei vor allem auf der Ebene des Domänenaufbaus (Abb. 2.1B). So weisen die Proteine CIRP, RBM3 und AtGRP7

ebenfalls wie Grp1B, eine N-terminale RRM Domäne, gefolgt von einer Glyzin-reichen Region auf (Ciuzan et al., 2015; Zhu et al., 2016). Besonders die Beteiligung bei Kältestress und Kälteakklimatisierung ist bei den GRPs evolutionär konserviert (Ciuzan et al., 2015; Czolpinska and Rurek, 2018).

Neben dem Kältestress ist AtGRP7 zusätzlich in die Regulation der osmotischen Stressantwort, der pflanzlichen Immunabwehr und der circadianen Rhythmik involviert (Czolpinska and Rurek, 2018; Meyer et al., 2017). In Säugetierzellen wird die Expression von CIRP und RBM3 nicht nur bei Hypothermie sondern auch bei Hypoxie und UV-Bestrahlung hochreguliert (Wellmann et al., 2004; Zhong and Huang, 2017). Zusätzlich sind die beiden Proteine an einer Vielzahl zellulärer Prozesse beteiligt (Masuda et al., 2012; Roilo et al., 2018; Zhong and Huang, 2017). Zum Beispiel an der Aufrechterhaltung der Telomere, an der Modulation des Zellzykluses und somit auch der Zellproliferation (Masuda et al., 2012; Roilo et al., 2018; Zhong and Huang, 2017). Die hier vorgestellten Beispiele multifunktionaler GRPs sind vor allem wichtig bei Kältetoleranz und regulieren als RNA-Chaperone die Stabilität gebundener mRNAs (Al-Astal et al., 2016; Han et al., 2013; Zhong and Huang, 2017). Die bisherigen Analysen deuten daraufhin, dass Grp1B als RNA-Chaperon am Export der mRNA beteiligt sein könnte, oder die Stabilität der mRNA beeinflussen könnte (Abb. 3.2). Ob Grp1B als RNA-Chaperon die Stabilität der mRNAs beeinflusst, könnte zum Beispiel mit der Genkontroll Methode untersucht werden (Baudrimont et al., 2017). Mit dieser Methode lässt sich die Halbwertszeit für ein spezifisches mRNA-Molekül ermittelt. Dabei wird die Expression einer mRNA gezielt unterbrochen, damit deren Lebenszeit bestimmt werden kann.

3.3.1 Grp1B und seine putative Beteiligung an der Regulation des Zellzykluses

Ein Phänotyp der *grp1*-Deletion ist die Zunahme der Zelllänge in Sporidien und Hyphen. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass Grp1B einen Einfluss auf den Zellzyklus hat, da zwischen dem Zellzyklus und der Zellgröße eine enge Verbindung besteht. Die Zellzyklusrate und das Wachstum bestimmen die Zellgröße, diese wiederum moduliert den Zellzyklus (Rupes, 2002). Die Zunahme der Sporidienlänge geht daher möglicherweise mit einer verlängerten Generationszeit einher. Für andere GRPs ist beschrieben, dass diese in die Regulation des Zellzykluses involviert sind. So wurde für das Grp1B Homolog CIRP aus Säugetierzellen gezeigt, dass es an der Regulation des Zellzykluses, in den Testikel der Maus, beteiligt ist. Dabei ist CIRP in die Progression von der G0/G1- sowie der G1/S-Phase involviert (Masuda et al., 2012; Roilo et al., 2018).

Der Zellzyklus gliedert sich in die M (Mitose)-, G1 (*Gap*; Lücke)-, S (Synthese)- und G2 (*Gap*)-Phase (Abb. 3.3). Es gibt zwei wichtige Kontrollpunkte an denen der Zellzyklus reguliert wird. Der erste Kontrollpunkt befindet sich beim Übergang von der G1- in die S-Phase, der zweite zwischen der G2- und der M-Phase. Die Schlüsselkomponenten während des Zellzykluses sind die sogenannten CDKs (*cycline dependent kinases*) und Cycline. Zusammen bilden sie Komplexe deren Aktivität von ihrem Phosphorylierungsstatus abhängt. In *U. maydis* sind die Hauptregulatoren beim Übergang von der G2- in die M-Phase die B-Cycline Clb2 und Clb1 die jeweils mit Cdk1 einen Komplex bilden (Garcia-Muse et al., 2004; Sgarlata and Perez-Martin, 2005a). Die Regulation ist

hierbei abhängig von dem Phosphorylierungsstatus von Cdk1 (Abb. 3.3). Dieser wird durch die zwei Antagonisten Wee1 und Cdc25 bestimmt. Die Phosphorylierung von Cdk1 durch die Proteinkinase Wee1 verhindert den Übergang in die M-Phase (Sgarlata and Perez-Martin, 2005a). Die Zellen verbleiben so lange in der G2-Phase bis sie eine bestimmte Größe erreicht haben und Cdk1 durch die Phosphatase Cdc25 dephosphoryliert wird (Sgarlata and Perez-Martin, 2005b). Verzögerungen beim Übergang in die M-Phase gehen mit einer Zunahme der Zellgröße einher. In *U. maydis*, ähnlich wie auch in höheren Eukaryoten, wird die Größe der Zellen sowohl beim Übergang von G1- zur S-Phase als auch beim Übergang von G2-zur M-Phase überwacht (Castillo-Lliva et al., 2004; Sgarlata and Perez-Martin, 2005a, 2005b). Als globaler Stressregulator könnte Grp1B einen Einfluss auf den zweiten Kontrollpunkt haben und so die Länge der G2-Phase modulieren.

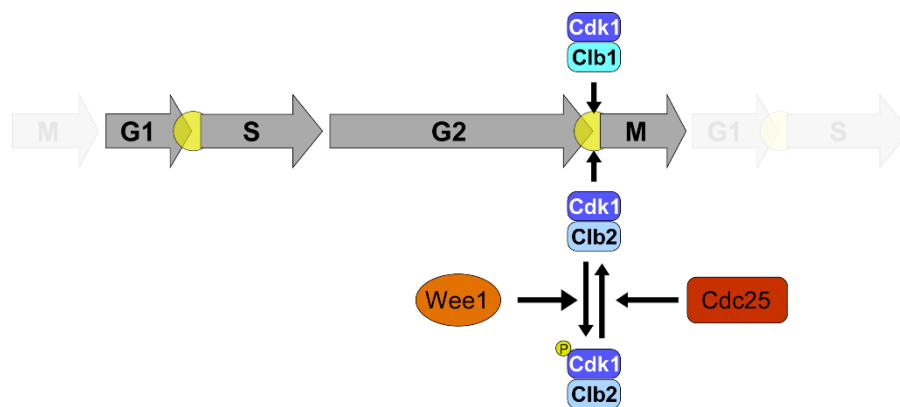


Abbildung 3.3 Zellzyklus Die Illustration zeigt die vereinfachte Form des Zellzykluses mit dem Augenmerk auf den zweiten Kontrollpunkt (G2/M-Phase; die beiden Kontrollpunkte sind mit einem gelben Kreis gekennzeichnet). Die Proteinkinase Wee1 phosphoryliert den Cdk1-Clb2 Komplex und verhindert so den Übergang von der G2- in die M-Phase. Sobald die Zellen eine gewisse Länge erreicht haben dephosphoryliert die Proteinphosphatase Cdc25 den Cdk1-Clb2 Komplex und die Zellen beginnen mit der Mitose. Die Abbildung wurde modifiziert nach Sgarlata und Perez-Martin 2005b.

Für eine Grp1B-vermittelte Regulation der G2-Phase sprechen folgende Parallelen: Es gibt phänotypische Ähnlichkeiten zu Zellzyklusmutanten, wie zum Beispiel der *wee1* Mutante. Studien zeigten, dass die Überexpression von *wee1* die G2-Phase verlängert und zu elongierten Zellen führt (30 μm im Vergleich zu 15 μm ; (Sgarlata and Perez-Martin, 2005a)). Wie im Falle des Verlustes von *grp1* sind die Sporidien bei einer *wee1* Überexpression doppelt so lang wie die der wildtypischen Sporidien (Abb. 2.2C; 20 μm im Vergleich zu 15 μm ; (Sgarlata and Perez-Martin, 2005a)). Die Konzentration von *wee1* bestimmt über die Verweildauer in der G2-Phase, was sich in der Länge der Sporidien widerspiegelt. Dies deutet daraufhin, dass der Verlust von *grp1* zur Erhöhung der *wee1* Konzentration führen könnte. Da die Sporidien in der *grp1*-Deletionsmutante kürzer sind als bei der induzierten *wee1* Überexpression wäre es möglich, dass die *wee1* Konzentration zwar erhöht wird, jedoch nicht in dem Ausmaße wie bei deren Überexpression. Untersuchungen dazu haben gezeigt, dass Wee1 ein Dosis-abhängiger Inhibitor der Mitose ist

(Sgarlata and Perez-Martin, 2005a). Tatsächlich wurde die *wee1* mRNA in dem iCLIP Datensatz als ein putatives Grp1B Ziel-Transkript identifiziert (Anhang Abb. 8.3A). Die *wee1* mRNA enthält in ihrer 3'UTR drei Grp1B Bindestellen. Obwohl auch eine Bindestelle von Rrm4 ermittelt wurde, hat diese nur einen halb so hohen SOB-Wert und ist folglich schwächer als die Bindestellen von Grp1B.

Neben der *wee1* wurde auch die *cdc25* mRNA als ein mögliches Ziel-Transkript von Grp1B identifiziert (Anhang Abb. 8.3A). Insgesamt wurden vier Grp1B Bindestellen und eine Rrm4 Bindestelle in der 3'UTR lokalisiert. Für Cdc25 konnte gezeigt werden, dass die Zellen mit zunehmender Cdc25 Konzentration immer kürzer werden und die Zellen zu früh in die M-Phase eintreten (Sgarlata and Perez-Martin, 2005b). Interessanterweise hat ein erhöhtes Cdc25 Level auch einen Einfluss auf das filamentöse Wachstum des Laborstammes AB33 (Sgarlata and Perez-Martin, 2005b). Die Reduktion der *cdc25* Konzentration könnte die elongierten Sporidien und Hyphen in der *grp1*-Deletionsmutante erklären. Theoretisch könnte Grp1B die mRNA Stabilität von *cdc25* beeinflussen, jedoch auf eine antagonistische Weise im Vergleich zur *wee1* mRNA. Dies würde bedeuten, dass in Abwesenheit von *grp1* die Stabilität und somit die mRNA Konzentration von *cdc25* reduziert wäre.

Die verlängerte Verdopplungszeit und die elongierten Zellen in der *grp1*-Deletionsmutante sowie die in dem iCLIP-Datensatz identifizierten *wee1* und *cdc25* Transkripte unterstützen die Hypothese, dass Grp1B als RNA-Chaperon an der Regulation des Zellzykluses beteiligt sein könnte. Dies könnte zum Beispiel in differentiellen Genexpressionsanalysen oder Pulse-Chase (Pulsmarkierung) Experimenten näher untersucht werden.

3.3.2 Grp1B ist an der Kältestressantwort beteiligt

Die evolutionär konservierte Beteiligung der GRPs an der Kältestressantwort, scheint auch auf Grp1B aus *U. maydis* zuzutreffen (Ciuzan et al., 2015; Czolpinska and Rurek, 2018). In Abwesenheit von *grp1* ist der Stamm sensitiver gegenüber niedrigen Temperaturen (Abb. 2.2E und Anhang Abb. 8.4B). *AtGRP7* aus *A. thaliana* wird zum Beispiel für den effizienten Export der mRNAs aus dem Nukleus während des Kältestresses benötigt und erhöht so die Frosttoleranz bei der Pflanze (Kim et al., 2008). Häufig ist die Funktion dieser Proteine, die in die Kältestressantwort involviert sind, Organismen-übergreifend konserviert. Studien dazu zeigten, dass ein kältesensitiver *E. coli* Stamm durch die Expression von *AtGRP7* aus *A. thaliana*, wieder in der Lage war bei niedrigen Temperaturen zu wachsen (Kim et al., 2007; Kim et al., 2010). Ob *AtGRP7* in der Lage wäre den Kältephänotyp auch in *U. maydis* zu komplementieren, könnte in einer nachfolgenden Studie untersucht werden.

Um das Wachstum bei Hypothermie zu ermöglichen, muss besonders die Translation der mRNA gewährleistet werden. Als Antwort auf den Kältestress in Bakterien formieren sich Sekundärstrukturen in der 5'UTR von mRNAs, die die Shine-Dalgarno Sequenz verdecken und so die Translation verhindern. Erst durch die Bindung von CSPs wird die Sekundärstruktur aufgelöst und die Translation ermöglicht (Phadtare and Severinov, 2010). Sollte Grp1B RNA-Chaperon

Aktivität aufweisen, wäre dies ein möglicher Wirkungsmechanismus bei Kältestress. Die Verwendung eines Reportergens, welches nur bei niedrigen Temperaturen translatiert wird, könnte Aufschluss darüber geben, ob Grp1B die Translation bei kälteinduzierten mRNAs erleichtert. Der Verlust von Grp1B würde demnach zur Reduktion der Translation des Reportergens, bei niedrigen Temperaturen führen.

3.3.3 Grp1B beeinflusst die Zellwandintegrität

Eine weitere phänotypische Ausprägung der *grp1* Deletion ist die veränderte Zellwandintegrität. Dabei scheint die Oberflächenhydrophobizität der Kolonien reduziert zu sein (Anhang Abb. 8.5). Dies trifft sowohl auf das hefeartige Wachstum als auch auf die Lufthyphen zu. Mit zunehmend niedrigerer Temperatur wird dieser Effekt sogar verstärkt. In *U. maydis* reguliert das Protein Rep1 (*repellent*) die Oberflächenhydrophobizität der Hyphe (Teertstra et al., 2009). Interessanterweise besteht eine gewisse phänotypische Ähnlichkeit zwischen dem *grp1Δ*- und dem *rep1Δ*-Stamm. Sowohl die Ausbildung der Lufthyphen als auch die Zellwandoberflächenhydrophobizität sind in beiden Deletionsmutanten reduziert (Abb.4.2; (Teertstra et al., 2006)). Die Parallelen zur *rep1*-Deletionsmutante deutet daraufhin, dass Grp1B an der Regulation von Rep1 beteiligt sein könnte. Bei der Analyse der iCLIP-Daten wurde festgestellt, dass, unter den definierten SOB-Kriterien, keine Grp1B Bindestellen entlang der *rep1* mRNA ermittelt werden konnten. Die Verteilung der QE zeigt jedoch eine massive Grp1B Bindung entlang des gesamten Transkriptes, mit einer starken Anreicherung der QE sowohl in der 5' als auch in der 3' UTR (Anhang Abb. 8.3B). Das trotz der zahlreichen QE keine Bindestellen ermittelt wurden, hängt zum einen mit dem Bindeverhalten von Grp1B und zum anderen mit der Definition des SOB-Wertes zusammen. Die QE von Grp1B weisen eine großflächigere Verteilung auf als die QE von Rrm4. Wird ein Transkript sehr stark exprimiert, was auf *rep1* in den Hyphen zutrifft, so erhöht sich auch das Hintergrundsignal. Die Bindestellen können dann als solche nicht mehr erkannt werden. Aus diesem Grund wurden für *rep1* keine Grp1B Bindestellen identifiziert. Um sicher zu sein, ob *rep1* ein Ziel-Transkript von Grp1B ist, müssten spezifische Analysen durchgeführt werden, wie zum Beispiel RNA-Lebendzellmikroskopie (*RNA live imaging*), EMSA (*electrophoretic mobility shift assay*), RT-PCR (*real-time PCR*) oder Hefe-Drei-Hybrid Experimente (Baumann et al., 2014; Hellman and Fried, 2007; Konig et al., 2007).

Um zu überprüfen welchen Einfluss Grp1B auf die Zellwandintegrität hat, wurde bei den Zellen Zellwandstress ausgelöst. Tatsächlich sind die Sporidien und Hyphen in Abwesenheit von *grp1* sensitiver gegenüber den Zellwandinhibitoren *Calcoflour white* (CFW) und *Congo red* (CR) (Abb. 2.2F und 2.2E). Die Behandlung der Zellen mit diesen Chemikalien führt zu Destabilisierung der Zellwand, indem sich die Stoffe zwischen die Chitinketten einlagern. Dadurch wird deren Kristallisation verhindert und so die Sensitivität gegenüber Chitinasen erhöht. Dabei ist das neusynthetisierte Chitin anfälliger für den Abbau durch Chitinasen, als bereits in kristalliner Form vorliegendes Chitin (Vermeulen and Wessels, 1986). Obwohl CFW sich in der gesamten Zellwand einlagert, greift es verstärkt die Wachstumszone an, an der auch die Chitin Synthese stattfindet

und führt in dieser Zone zur Zelllyse (Roncero and Duran, 1985). Um einen Unterschied zwischen dem Wildtyp und der *grp1*-Mutante beim hyphalen Wachstum beobachten zu können, wurde deshalb die minimale Hemmkonzentration von CFW gewählt. Dabei zeigte sich, dass sich die Zellwandintegrität in Abwesenheit von *grp1* deutlich vom Wildtyp unterscheidet (Abb. 2.3E). Da die Neusynthese an der Hyphenspitze stattfindet ist es nicht verwunderlich, dass CFW in beiden Stämmen an der Wachstumszone akkumuliert. Diese führt zur veränderten Zellwandplastizität und ist in beiden Stämmen gut an einer Hyphenbiegung zu erkennen. Im Gegensatz zur *grp1*-Mutante adaptiert sich der Wildtyp an die neue Stresssituation und nimmt das Wachstum ohne weitere morphologischen Veränderungen auf. Im Deletionsstamm hingegen findet die CFW Akkumulation ungleichmäßig in der Hyphe statt und die Zellwand verliert ihre Stützfunktion. Dies deutet daraufhin, dass das neusynthetisierte Chitin vermutlich längere Zeit in der nicht-kristallinen Form vorliegt und so weiterhin anfällig gegenüber der Chitinasen bleibt. Die Tatsache, dass der Wildtypstamm die Zellwandsynthese an die Stresssituation anpassen kann und die *grp1*-Mutante nicht, lässt die Schlussfolgerung zu, dass Grp1B wichtig während des Adaptationsprozesses ist. In *S. cerevisiae* konnte gezeigt werden, dass die CFW Behandlung zu erhöhten Chitin-Synthase Expression führt (Roncero et al., 1988). Dadurch kann der Zellwanddefekt kompensiert werden. Grp1B könnte an der posttranskriptionellen Regulation der mRNAs der Chitin-Synthasen beteiligt sein, indem es deren Zellkern Export, Stabilität oder Translation beeinflusst. Für diese Theorie spricht, dass all acht mRNAs die für die Chitin-Synthasen kodieren, sowohl von Grp1B als auch von Rrm4, gebunden werden.

Eine andere Möglichkeit wäre, dass Grp1B einen indirekten Einfluss auf die Funktion der Chitin-Synthasen ausübt, indem es deren Transportweg reguliert. Für die Chitin-Synthase Chs3 aus *S. cerevisiae* konnte zum Beispiel gezeigt werden, dass diese in Chitosomen innerhalb des *trans*-Golgi Netzwerkes gelagert und erst bei Zellwandstress an die Zelloberfläche befördert wird (Valdivia and Schekman, 2003). In *U. maydis* werden die für die Zellwandsynthese benötigten Enzyme zusammen in denselben sekretorischen Vesikeln transportiert (Schuster et al., 2016). Am apikalen Hyphenpol verschmelzen diese Vesikel mit der Membran. Auf diese Weise gelangen die Enzyme aus der Zelle und können dort mit der Zellwandsynthese beginnen. Der Transport dieser sekretorischen Vesikel hängt vom Mcs1 (Protein mit einer N-terminalen Myosin Motor Domäne und einer C-terminalen Chitin-Synthase Domäne) ab (Schuster et al., 2016). Da die *mcs1* mRNA als ein putatives Ziel-Transkript von Grp1B identifiziert wurde, könnte Grp1B beispielsweise die *mcs1* mRNA Stabilität bei Zellwandstress regulieren und so den Transport der Vesikel und die Exozytose am apikalen Pol beeinflussen.

Die Zellwandsynthese wird stark vom Zellwachstum beeinflusst, welches wiederum eng mit dem Zellzyklus verknüpft ist. Im vorangegangenen Kapitel (3.4.1) wurde spekuliert, ob Grp1B an der Regulation des Zellzykluses beteiligt sein könnte. Insbesondere seine potentielle Rolle in der G2-Phase wurde diskutiert. Basierend auf dieser Vermutung stellt sich die Frage, ob eine Korrelation zwischen der Wachstumsgeschwindigkeit und der Zellwandsynthese besteht. Eine Studie von Carbó und Pérez-Martín im Jahre 2010 zeigte, dass die MAP-Kinasen des Zellwand-Integritätsweges unter Stressbedingungen die Cdc25 Proteinphosphatase aktivieren. Diese

wiederum führt zur erhöhten Konzentration des dephosphorylierten Cdk1/Clb2-Komplexes und somit zu einer kürzeren G2-Phase (Abb. 3.3 (Carbo and Perez-Martin, 2010)). Mutation der Cdc25 Phosphatase führt dazu, dass die Zellen sensitiver gegenüber Zellwandstress werden. Cdc25 wird somit für die Anpassung während des Zellwandstresses benötigt (Carbo and Perez-Martin, 2010). Sollte Grp1B tatsächlich den *cdc25* mRNA Level regulieren, könnte dies sowohl die Veränderungen beim Zellwachstum als auch der Zellwandmorphologie erklären. Um den Einfluss von Grp1B auf *cdc25* zu überprüfen könnten vergleichende Genexpressionsanalysen und iCLIP Analysen bei Zellwandstress durchgeführt werden.

Sowohl die iCLIP Analysen als auch die phänotypische Charakterisierung deuten darauf hin, dass Grp1B an unterschiedlichen stressbedingten Regulationsmechanismen beteiligt sein könnte. Als RNA-Chaperon könnte Grp1B bei Kälte- und Zellwandstress die korrekte Faltung der mRNA erleichtern und die mRNA beim Export aus dem Zellkern unterstützen, oder an der Regulation der mRNA Stabilität beteiligt sein. Seine mögliche Funktion als globaler Stressregulator stimmt mit den multifunktionellen Eigenschaften der GRPs aus anderen Organismen überein. Um die zelluläre Funktion von Grp1B besser zu verstehen, müsste Grp1B unter Stressbedingungen genauer analysiert werden.

3.4 Modell zur Organisation des Rrm4-vermittelten endosomalen mRNA Transport

Der endosomale mRNA Transport ist wichtig für ein effizientes unipolares Hyphenwachstum und ist somit entscheidend für die Fitness von *U. maydis* (Becht et al., 2006). In der aktuellen Modellvorstellung bindet Rrm4 funktionell diverse mRNAs und transportiert diese bidirektional auf Rab5-positiven Endosomen. Die Lokalisation auf den Endosomen wird dabei über das endosomale Linkerprotein Upa1 vermittelt und der Transport der Endosomen durch das Zusammenspiel von Motorproteinen gewährleistet (Baumann et al., 2012; Pohlmann et al., 2015). In dieser Arbeit konnte, mittels der iCLIP Methode, bestätigt werden, dass Rrm4 ein breites Spektrum an mRNAs bindet und somit als globaler mRNA Verteiler in der *U. maydis* Hyphe fungiert (Abb. 3.4). Darüber hinaus deutet die transkriptomweite Analyse des Rrm4 Bindevhaltens darauf hin, dass Rrm4 eine weitere posttranskriptionelle Funktion während des mRNA Transports haben könnte, indem es an translational wichtige mRNA Regionen bindet.

Die Positionierung von Rrm4 auf den Ziel-Transkripten wird vermutlich über Upa1 gesteuert, das sowohl mit Rrm4 als auch mit Pab1 interagiert (Abb. 3.4 (Pohlmann et al., 2015)). Aufgrund der hier ermittelten Verteilung der Rrm4 Bindestellen und der vorangegangenen Analysen der RRM Domänen (SELEX-, der Hefe-Drei-Hybrid- und der Deletionsanalysen; (Baumann et al., 2014; Becht et al., 2006; König et al., 2007)), wird die Hypothese aufgestellt, dass die RRM Domänen von Rrm4 unterschiedliche Regionen der mRNA binden. Dabei binden RRM1 und RRM2 das Stoppkodon und die 3' UTR in der Nähe des Poly(A)-Anhangs und ermöglichen somit den globalen mRNA Transport. RRM3 hingegen erkennt spezifisch das Bindemotiv UAUG, welches im ORF angereichert vorliegt, und bindet translational wichtige Regionen, wie das Startkodon und den

ORF (Abb. 3.1). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass Rrm4 über sein Bindeverhalten einen Einfluss auf die lokale Translation ausüben könnte.

mRNAs die nur in der 3'UTR gebunden werden, werden vermutlich auf den Endosomen translatiert, wie es zum Beispiel bei den Septinen der Fall ist (Baumann et al., 2014). Bindet Rrm4 seine Ziel-Transkripte am Startkodon, im ORF oder am Stoppkodon, so könnte dies, je nach Position, mit der Initiation, Elongation oder Termination der Translation interferieren (Abb. 3.1). Diese Art der posttranskriptionellen Regulation könnte wahrscheinlich auf die nukleär-kodierten mitochondrialen Transkripte zutreffen.

Um ein besseres Verständnis für die Rrm4-vermittelte Proteinlokalisierung zu erhalten, ist es notwendig die Rrm4-abhängigen mRNPs zu dechiffrieren. Dabei muss zwischen den Kernkomponenten, wie das auf Rrm4 und das Gerüstprotein Upa2 zutrifft, und akzessorischen Komponenten unterschieden werden. Während Rrm4 eine zentrale Rolle beim mRNA Transport einnimmt, ist Grp1B eine akzessorische Komponente des endosomalen Rrm4-abhängigen mRNPs. Aufgrund seiner subzellulären Lokalisation und einer putativen RNA-Chaperonaktivität, könnte Grp1B die mRNAs bereits im Zellkern binden, die Faltung unterstützen und die mRNAs beim Export aus dem Zellkern begleiten (Abb. 3.2). Die Grp1B gebundenen Transkripte, die den Zellkern verlassen haben, könnten in zwei Kategorien unterteilt werden: Die mRNAs die über den endosomalen Transportweg verteilt werden, würden mit Rrm4 koloalisieren. Die Transkripte die nicht transportiert werden, würden eine zytoplasmatische Lokalisation aufweisen. Mit Hilfe der vergleichenden iCLIP Analyse sowie den Lokalisationsstudien von zwei Komponenten des endosomalen mRNA Transports, Rrm4 und Grp1B, konnte ein weiteres Puzzleteil zur Entschlüsselung der Organisation der Rrm4-abhängigen mRNPs beigetragen werden.

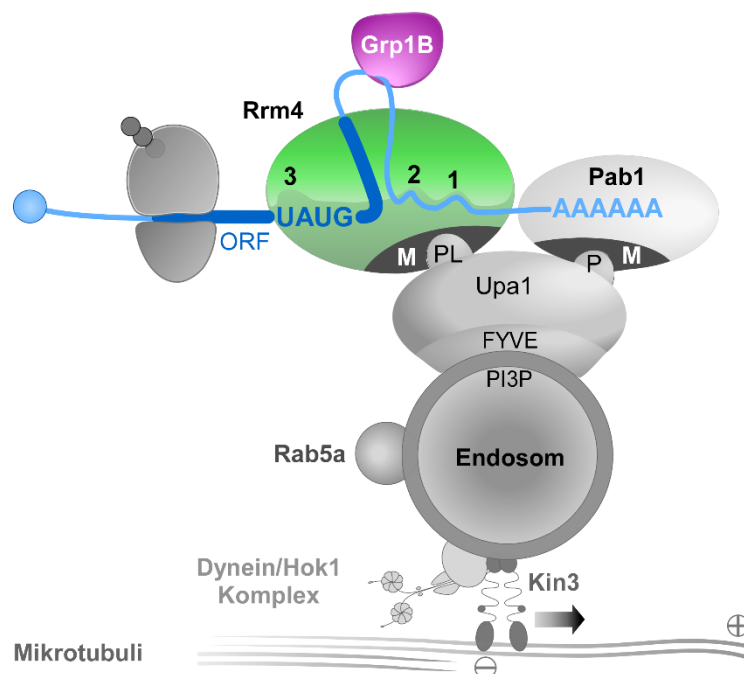


Abbildung 3.4 Modell des Rrm4-vermittelten endosomalen mRNA Transports in *U. maydis* Vereinfachte Darstellung der Organisation der endosomalen RBPs mit der gebundenen Ziel-mRNA. Die RRM Domänen von Rrm4 sind durchnummeriert. Dabei binden RRM1 und RRM2 in der 3'UTR und RRM3 im ORF, in dem es das Bindemotiv UAUG erkennt. Die Interaktion von Upa1 mit den MLE Domänen (M) von Rrm4 und Pab1 ermöglicht deren Lokalisation auf Rab5-positiven Endosomen und bestimmt die Positionierung von Rrm4 in der 3'UTR (P: PAM2 Sequenz; PL: Pam2-ähnliche Sequenz). Die Endosomen werden von den Motorproteinen, Dynein und Kinesin-3, bidirektional in der Hyphe, entlang der polarisierten Mikrotubuli, transportiert. Die Abbildung wurde modifiziert nach Olgeiser et al., 2019 (Abb. 6B).

3.5 Ausblick

In der vorliegenden Arbeit konnten die Ziel-Transkripte des Rrm4-vermittelten endosomalen mRNA Transports transkriptomweit identifiziert werden und das Bindeverhalten zweier kolokalisierender RBPs, Rrm4 und Grp1B, detailliert ermittelt werden. Die Ergebnisse geben einen umfangreichen Einblick in die Organisation des Rrm4-abhängigen mRNA Transports und erlauben die Erweiterung des bisherigen Modells um eine neue akzessorische Komponente. Die generierten iCLIP-Banken liefern einen fundierten Ausgangspunkt, um die Ziel-Transkripte sowie das Bindeverhalten von Rrm4 und Grp1B detaillierter analysieren zu können und somit ein besseres Verständnis für die biologische Funktion des endosomalen mRNA Transports zu entwickeln.

Die Funktion von Rrm4 wird vermutlich vom Bindeverhalten der drei RRM Domänen bestimmt. Während RRM1 und RRM2 wichtig für den endosomalen mRNA Transport zu sein scheinen, moduliert RRM3, wahrscheinlich die Translation spezifischer Transkripte. Um Aufschluss über die Beteiligung der jeweiligen Domänen am mRNA Transport und der Translation und somit über die Wirkungsweise sowie die biologische Funktion von Rrm4 zu erhalten, könnten detaillierten Analysen der einzelnen RRM Domänen durchgeführt werden. Dazu könnten zum Beispiel iCLIP Analysen mit den mutierten RRM Domänen durchgeführt werden, um das spezifische Bindeverhalten der einzelnen Domänen zu bestimmen. Darüber hinaus könnten dieselben Konstrukte für Ribosom-Profiling Analysen verwendet werden, um mehr über die mögliche Rolle von Rrm4 in der Translation von transportierten Transkripten zu erhalten.

Immer mehr Hinweise deuten darauf hin, dass Rrm4 wichtig für die Mitochondrien Funktion sein könnte (Cioni et al., 2019; Koepke et al., 2011). Die in den iCLIP-Daten identifizierten Ziel-mRNAs, die für die Proteinuntereinheiten der mitochondrialen F_0F_1 ATP-Synthase kodieren, könnten dazu verwendet werden diesen Hinweisen auf den Grund zu gehen. So könnten zum Beispiel die Auswirkung von RRM3 Mutation auf die mRNAs und die Proteine der ATP-Synthase, mittels Pulse-Chase sowie Northern Blot und Western Blot Analysen untersucht werden. Darüber hinaus könnten unterschiedliche Stressbedingungen simuliert werden, wie zum Beispiel die Inhibierung der Atmungskette in An- und Abwesenheit von Rrm4, um so den Einfluss von Rrm4 auf die Mitochondrien genauer zu analysieren.

Die Beobachtung, dass die Affinität von Rrm4 zu mRNAs, vom hefeartigen zum hyphalen Wachstum um das Siebenfache zu nimmt, deutet daraufhin, dass Rrm4 einer posttranslationalen

Modifikation (PTM) unterliegen könnte (Becht et al., 2006). Tatsächlich deuten die ersten MS-Analysen daraufhin, dass Rrm4 in der ersten RRM Domäne sowie in der Linker-Sequenz posttranslational modifiziert wird (persönliche Mitteilung, Markus Tulinski). Eine präzise Mutation der PTM Stelle könnte zur weiteren Aufklärung des Rrm4 Bindungsverhaltens beitragen.

Grp1B ist eine neue akzessorische Komponente des endosomalen mRNA Transports, dessen Lokalisation auf Endosomen über die Rrm4-gebundene mRNA vermittelt wird. Vermutlich bindet Grp1B die Ziel-Transkripte bereits im Zellkern und bleibt mit der mRNA auch nach dem Export assoziiert (Abb. 3.2). Es konnte bisher nicht geklärt werden nach welchen Kriterien entschieden wird, welche mRNAs über den Rrm4-abhängigen Transportweg verteilt werden. Sehr wahrscheinlich beteiligen sich an diesem Prozess weitere Komponenten. Die detaillierte Charakterisierung Grp1B-spezifischer mRNPs mit Hilfe von zum Beispiel Grp1B-gerichteter Affinitätsaufreinigung kombiniert mit einer MS-Analyse, könnte zu Identifizierung weiterer interessanter Kandidaten führen.

Zudem konnten Ziel-mRNAs identifiziert werden, die ausschließlich von Grp1B gebunden werden. Diese Transkripte kodieren für Proteine mit einer nukleären Funktion und entsprechen der nukleär-zytoplasmatischen Lokalisation von Grp1B. RNA-Lebendzellmikroskopie sowie Lokalisationsanalysen der Grp1B-spezifischen mRNAs könnten helfen ein besseres Verständnis für die Funktionsweise von Grp1B zu entwickeln. Besonders die mRNA der Cdc25 Proteinphosphatase stellt einen interessanten Kandidaten für diese Untersuchungen dar, da das Translationsprodukt sowohl an der Regulation des Zellzykluses als auch in die Zellwandstressantwort involviert ist. Dabei könnte die Pulse-Chase Methode Aufschluss darüber liefern, ob Grp1B die Stabilität der *cdc25* mRNA oder des Proteins beeinflusst.

Um die biologische Funktion von Grp1B näher zu erforschen, müsste das Protein weiter charakterisiert werden. Vergleichende Genexpressionsanalysen und iCLIP Analysen, bei Kälte- und Zellwandstress, in An- und Abwesenheit von Grp1B sowie eine fraktionierte iCLIP Analyse könnten Aufschluss über die Ziel-Transkripte geben, die von Grp1B im Zellkern bzw. Zytoplasma gebunden und reguliert werden.

Interessanterweise existieren im *U. maydis* Genom zwei Grp1 Isoformen, die laut RNASeq Daten unterschiedlich exprimiert werden. Es wäre interessant zu erforschen unter welchen Bedingungen die Expression der beiden Isoformen reguliert wird und ob beide Isoformen Komponenten desselben mRNPs sind. Untersuchungen zur Lokalisation der beiden GRPs unter Stressbedingung, sowie vergleichende Koaufräufungsanalysen und iCLIP Untersuchungen könnten Antworten auf diese Fragen liefern.

Die im Ausblick beschriebenen differenziellen Studien der beiden RBPs in *U. maydis* würden nicht nur zur Aufklärung des Rrm4/Grp1-RNA bzw. Grp1-RNA Interaktionsprofils beitragen, sondern auch Aufschluss über die spezifische mRNP-Dynamik und deren biologischen Funktionsweisen liefern.

4. Material und Methoden

Die in der vorliegenden Arbeit beschriebenen, standardisierten Methoden, Medienzusammensetzungen und Informationen zu den verwendeten Materialien sowie den verwendeten Plasmidsammlungen sind zum Teil wörtlich oder leicht modifiziert aus den Methodensammlungen der Arbeitsgruppe Feldbrügge übernommen.

4.1. Material und Bezugsquellen

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

Alle Lösungen, Puffer und Medien wurden, sofern nicht anders angegeben, mit hochreinem Milli-Q-Wasser (hauseigene Anlage mit nachgeschaltetem *water purification system* EPA Est. 41237-MA-1 Millipore GmbH, Neu Isenburg) angesetzt. Dieses wird im folgendem als H₂O_{bid.} bezeichnet.

Chemikalien

Alle in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien besaßen, sofern nicht anders vermerkt, den Reinheitsgrad *pro analysis (p.a.)*. Die verwendeten Chemikalien wurden von Firmen bezogen, die in Tabelle 4.1. aufgeführten sind.

Tabelle 4.1 Bezugsquelle von verwendeten Chemikalien

Hersteller	Niederlassung der Firma
Applichem GmbH	Darmstadt, Deutschland
BioRad	München, Deutschland
Biozym Scientific GmbH	Hessisch Oldendorf, Deutschland
Beckton Dickinson	Franklin Lakes, NJ, USA
Carl Roth	Karlsruhe, Deutschland
Duchefa	Haarlem, Niederlande
GE Healthcare	Little Chalfont, England
Gerbu	Heidelberg, Deutschland
Grüssing GmbH Analytika	Filsum, Deutschland
Hartmann Analytic	Braunschweig, Deutschland
Life Technologies	Carlsbad, CA, USA
Merck	Darmstadt, Deutschland
Roche	Penzberg, Deutschland
Serva	Heidelberg, Deutschland
Sigma-Aldrich	St. Louis, MI, USA
Thermo Fisher Scientific	Waltham, MA, USA
VWR	Darmstadt, Deutschland

Puffer und Lösungen

Die Herstellung der verwendete Standard-Puffer und -Lösungen erfolgte wie bereits beschrieben (Ausubel et al., 1987; Sambrook et al., 1989). Spezielle Puffer und Lösungen sind unter den jeweiligen Methoden aufgeführt.

Medien

Die Herstellung der verwendeten Medien erfolgte nach Ausubel et al., Sambrook et al., Holliday und Banuett und Herskowitz (Ausubel et al., 1987; Banuett and Herskowitz, 1989; Holliday, 1974; Sambrook et al., 1989).

Verwendete Medien für die Anzucht von *E. coli*

Für die Kultivierung von *E. coli* wurden YT-Festmedium und dYT-Flüssigmedium verwendet. Die Medien wurden vor Verwendung für 5 min bei 121 °C autoklaviert. Bakterienstämme mit plasmidkodierten Resistenzmarkern wurden unter Selektionsdruck durch Zugabe des jeweiligen Antibiotikums kultiviert. Ampicillin wurde dabei in einer Konzentration von 100 µg/ml und Kanamycin in einer Konzentration von 25 µg/ml eingesetzt.

dYT-Flüssigmedium		YT-Festmedium	
Bacto-Trypton	1,6 % (w/v)	Bacto-Trypton	0,8 % (w/v)
Hefeextrakt	1,0 % (w/v)	Hefeextrakt	0,5 % (w/v)
NaCl	0,5 % (w/v)	NaCl	0,5 % (w/v)
		Bacto-Agar	2,0 % (w/v)
In H ₂ O _{bid.}		In H ₂ O _{bid.}	

Verwendete Medien für die Anzucht von *U. maydis*

Für die Kultivierung von *U. maydis* wurden die unten aufgeführten Fest- und Flüssigmedien verwendet. Sofern nicht anders vermerkt, wurden die Medien vor der Verwendung für 5 min bei 121 °C autoklaviert. Vor dem Gebrauch wurden die Medien, wenn nicht anders angegeben, mit 1 % (w/v) Glukose-Lösung (sterilfiltriert) versetzt.

CM (Complete Medium)-Medium

(Banuett and Herskowitz, 1989; Holliday, 1974)

Casaminosäuren	0,25 % (w/v)
Hefeextrakt	0,1 % (w/v)
Vitaminlösung	1,0 % (v/v)
Salzlösung	6,25 % (v/v)
DNA, degradiert (Sigma, D-3159)	0,05 % (w/v)
NH ₄ NO ₃	0,15 % (w/v)
Bacto Agar (für Festmedien)	2 % (w/v)

In H₂O_{bid.}, mit NaOH auf pH 7,0 einstellen**Vitaminlösung**

(Holliday, 1974)

Thiamin (Hydrochlorid)	0,1 ‰ (w/v)
Riboflavin	0,05 ‰ (w/v)
Pyridoxin	0,05 ‰ (w/v)
Calciumpantothenat	0,2 ‰ (w/v)
p-Aminobenzoessäure	0,05 ‰ (w/v)
Nicotinsäure	0,2 ‰ (w/v)
Cholinchlorid	0,2 ‰ (w/v)
(myo)-Inositol	1 ‰ (w/v)

In H₂O_{bid.}, sterilfiltrieren**Salzlösung**

(Holliday, 1974)

KH ₂ PO ₄	16,0 ‰ (w/v)
Na ₂ SO ₄	4,0 ‰ (w/v)
KCl	8,0 ‰ (w/v)
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	1,32 ‰ (w/v)
Spurenelementlösung	8,0 ‰ (v/v)
MgSO ₄ (wasserfrei)	1,0 ‰ (w/v)

In H₂O_{bid.}, sterilfiltrieren**Spurenelementlösung**

(Holliday, 1974)

H ₃ BO ₃	0,06 ‰ (w/v)
MnCl ₂ x 4 H ₂ O	0,14 ‰ (w/v)
ZnCl ₂	0,4 ‰ (w/v)
Na ₂ MoO ₄ x 2 H ₂ O	0,4 ‰ (w/v)
FeCl ₃ x 6 H ₂ O	0,1 ‰ (w/v)
CuSO ₄ x 5 H ₂ O	0,04 ‰ (w/v)

In H₂O_{bid.}, sterilfiltrieren**NM (Nitrat Minimal)-Medium**

(Scherer et al., 2006)

KNO ₃	0,3 % (w/v)
Salzlösung	6,25 % (v/v)

In H₂O_{bid.}, mit KOH auf pH 7,0 einstellen**AM (Amonium-Minimal)-Medium**

Casaminosäuren	0,25 % (w/v)
Hefeextrakt	0,1 % (w/v)
Vitaminlösung	1,0 % (v/v)
Salzlösung	6,25 % (v/v)
DNA, degradiert (Sigma, D-3159)	0,05 % (w/v)
NH ₄ NO ₃	0,15 % (w/v)
Bacto-Agar (für Festmedium)	2,0 % (w/v)

In H₂O_{bid.}, mit NaOH auf pH 7,0 einstellen**Regenerationsagar**

(Schulz et al., 1990)

(i) Top-Agar:	
Bacto Agar	1,5 % (w/v)
Sorbitol	1 M

In YEPS-light-Medium

(ii) Bottom-Agar:	wie (i), mit Antibiotikum
-------------------	------------------------------

YEPS-light-Medium

(modifiziert nach Tsukuda et al. 1988)

Hefeextrakt	1,0 % (w/v)
Pepton	0,4 % (w/v)
Saccharose	0,4 % (w/v)

In H₂O_{bid.}

NSY-Glyzerin (Für Glyzerinkulturen)

(Schulz et al., 1990)

Nutrient Broth	0,8 % (w/v)
Hefeextrakt	0,1 % (w/v)
Saccharose	0,5 % (w/v)
87 % Glyzerin	80 % (v/v)

In H₂O_{bid.}

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

Enzyme

Enzyme, die für die Standardmethoden verwendet wurden, sind in Tabelle 4.2 aufgeführt. Speziell verwendete Enzyme sind unter den entsprechenden Methoden zusammengefasst.

Tabelle 4.2 Bezugsquelle von verwendeten Enzymen

Enzyme	Bezugsquelle
Alkalische Phosphatase	Roche
Lysozym	Merck
Novozym 234	Novo Nordisc
Phusion DNA-Polamerase	Finnzymes (NEB)
Restriktionsendonukleasen	New England Biolabs (NEB)
Ribonuklease A	Boehringer
Taq-DNA-Polymerase	Laborpräparation
T4-DNA-Ligase	Roche
Quick Ligase	Roche

Größenstandards für DNA-Gelelektrophorese:

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

Größenstandards für SDS-PAGE:

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

Kits

Alle Standard-Kits wurden, sofern nicht anders angegeben, in dieser Arbeit nach Herstellerangaben verwendet. Spezielle Kits wurden unter den jeweiligen Methoden separat aufgeführt.

Tabelle 4.3 Bezugsquelle von verwendeten Kits

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

4.1.2 Oligonukleotide

Die für die Klonierung von Plasmiden und PCR-Sonden verwendeten Oligonukleotide sind in Tabelle 4.4 aufgeführt. Die Sequenzen sind jeweils in 5'-3'-Richtung angegeben. Wenn nicht anders vermerkt, wurde in den PCR-Reaktionen jeweils eine Konzentration von 50 pmol/μl eingesetzt. Die Standard-Oligonukleotide wurden bei der Firma Metabion GmbH (Martinsried, Deutschland) synthetisiert. Oligonukleotide mit einer Länge über 30 Nukleotide wurden bei der Firma Sigma (München, Deutschland) synthetisiert und mittels HPLC aufgereinigt. Spezielle Oligonukleotide die bei der iCLIP-Methode zum Einsatz gekommen sind, werden separat nach der Methode aufgeführt.

Tabelle 4.4 Für die Plasmidklonierung verwendete Oligonukleotide

Bezeichnung	Nukleotidsequenz	Verwendungszweck
oSL217	ATGGTCTCGACTTGCGCG	<i>grp1Δ</i> u1
oSL218	ttcggccatctaggccACGTAACTTTGGCGGCC	<i>grp1Δ</i> u2
oSL219	tgaggcctgagtggccTCGCTGGTTGTCCCTCGAG	<i>grp1Δ</i> d1
oSL220	GTAGCGTTGCCACTCAGC	<i>grp1Δ</i> d2
oMB415	ggtCTCgCCTGCAATATTTGCGAGAGCGGCAGGATG	<i>grp1</i> u1
oMB416	ggtctccAGCCTCCGTAGCCACCCTGCTGAGGAG	<i>grp1</i> u3
oMB417	ggtctccGGCTACGGTGCTCAGCAGGG	<i>grp1</i> ExonA fwd
oMB418	ggtctccTGGCGTAGCCCTGGCCGTTGTAC	<i>grp1</i> ExonA rev
oMB419	GGATAACAACGGACAGAGCCAG	<i>grp1</i> ExonB fwd
oMB420	TGGCCTGGCTCTGTCCGTTGT	<i>grp1</i> ExonB rev
oMB421	ggtctccGGCCGAGTGGCCACGACTCTTGTCG	<i>grp1</i> d1
oMB422	ggtctcgCTGCAATATTCGCTTTTCGGCGCGCTTCG	<i>grp1</i> d3

4.1.3. Plasmide und Plasmidkonstruktionen

4.1.3.1 In dieser Arbeit verwendete Plasmide und Klonierungsvektoren

Die unten aufgeführten Plasmide und Klonierungsvektoren wurden für die Arbeit in *U. maydis* verwendet.

pCR[®]II-TOPO (Life Technologies)

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

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

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

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

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

pMF5-1n (pUMa389)

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

pMF5-4h (pUMa647)

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

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

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

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

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

pRrm4Δ-HygR (pUMa473; Becht et al., 2006)

Plasmid für die Herstellung einer Deletionsmutante des *rrm4*-Gens (UMAG 10836). Es enthält eine 818 bp lange stromaufwärts des offenen Leserahmens von *rrm4* liegende Flanke, sowie eine 1943 bp lange stromabwärts liegende Flanke. Zwischen den Flanken befindet sich ein 1884 bp langes *Sfil/Sfil*-Fragment aus pMF1hs (pUMa194) mit einer Hygromycin-Resistenzkassette. Das Plasmid wurde für die homologe Integration in den *rrm4*-Lokus verwendet.

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

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

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

Plasmid für die Expression einer C-terminalen Fusion von Pab1 mit Gfp unter der Kontrolle des nativen Promotors. Es enthält eine 3004 bp lange stromaufwärts gelegene Flanke, inklusive 1935 bp des offenen Leserahmens von *pab1* (UMAG 03494), sowie eine 986 bp lange stromabwärts gelegene Flanke für die homologe Rekombination im *pab1*-Lokus. Zwischen den Flanken wurde ein 2448 bp langes *Sfil/Sfil*-Fragment mit *egfp*, gefolgt von dem Terminator *Tnos* in Kombination mit einer Nourseothricin-Resistenz eingefügt. Das Plasmid wurde für die homologe Integration in den *pab1*-Lokus verwendet.

pGrp1AG (pGrr1AG-NatR (pUMa1594))

Plasmid für die Expression einer C-terminalen Fusion von Grp1A (UMAG 02412) mit Gfp unter der Kontrolle des nativen Promotors. Es enthält eine 1979 bp lange stromaufwärts gelegene Flanke, inklusive 1098 bp des offenen Leserahmens von *grp1A*, sowie eine 1158 bp lange stromabwärts gelegene Flanke für die homologe Rekombination im *grp1*-Lokus. Die Flanken wurden durch PCR mit den Oligonukleotid-Kombinationen oSL217/oSL861 und oRL862/oRL866 auf genomischer UM521-DNA hergestellt. Zwischen den Flanken wurde ein 2448 bp langes *Sfil/Sfil*-Fragment aus pMF5-1n (pUMa389) eingefügt. Dieses enthält *egfp*, gefolgt von dem Terminator *Tnos*, sowie einer Nourseothricin-Resistenzkassette. Dieses Konstrukt korreliert vermutlich mit der Expression der Isoform Grp1B. Das Plasmid wurde für die homologe Integration in den *grp1*-Lokus verwendet.

pGrp1BG (pGrr1BG-NatR (pUMa1595))

Plasmid für die Expression einer C-terminalen Fusion von Grp1B (UMAG 02412 (um10149)) mit Gfp unter der Kontrolle des nativen Promotors. Es enthält eine 2338 bp lange stromaufwärts gelegene Flanke, inklusive 1457 bp des offenen Leserahmens von *grp1B*, sowie eine 1158 bp lange stromabwärts gelegene Flanke für die homologe Rekombination im *grp1*-Lokus. Die Flanken wurden durch PCR mit den Oligonukleotid-Kombinationen oSL863/oSL865 und oSL864/oSL866 auf genomischer UMa521-DNA hergestellt. Zwischen den Flanken wurde ein 2448 bp langes *Sfil/Sfil*-Fragment aus pMF5-1n (pUMa389) eingefügt. Dieses enthält *egfp*, gefolgt von dem Terminator *Tnos*, sowie einer Nourseothricin-Resistenzkassette. Dieses Konstrukt sollte die Expression der Isoform Grp1A nicht beeinträchtigen. Das Plasmid wurde für die homologe Integration in den *grp1*-Lokus verwendet.

4.1.3.2 In dieser Arbeit hergestellte Plasmide

Die Plasmide wurden mittels molekularbiologischer Standardmethoden hergestellt. Alle Plasmide tragen entweder eine Ampicillin- oder eine Kanamycin-Resistenzkassette zur Selektion in *E. coli*. Alle Klonierungsschritte wurden durch Restriktionsanalyse überprüft, alle eingebrachten PCR-Amplifikate sequenziert.

pGrp1Δ-HygR (pGrr1Δ-HygR (pUMa848))

Plasmid für die Herstellung einer Deletionsmutante des *grp1*-Gens (UMAG 02412). Es enthält eine 900 bp lange stromaufwärts des offenen Leserahmens von *grp1* liegende Flanke, sowie eine 800 bp lange stromabwärts liegende Flanke. Die Flanken wurden durch PCR mit den Oligonukleotid-Kombinationen oSL217/oSL2018 und oSL219/oSL220 auf genomischer UM521-DNA hergestellt. Zwischen den Flanken befindet sich ein 1884 bp langes *Sfil/Sfil*-Fragment aus

pMF1hs (pUMa194) mit einer Hygromycin-Resistenzkassette. Das Plasmid wurde für die homologe Integration in den *grp1*-Lokus verwendet.

pRrm4mR123tR_G418R (pUMa 2849)

Plasmid für die Expression einer C-terminalen Fusion von Rrm4^{mR123} mit tag-Rfp-3xMyc Epitop unter der Kontrolle des nativen Promotors. Es enthält eine 3205 bp lange stromaufwärts gelegene Flanke, inklusive 2376 bp des offenen Leserahmens von *rrm4*, sowie eine 1987 bp lange stromabwärts gelegene Flanke für die homologe Rekombination im *rrm4*-Lokus. Zwischen den Flanken wurde ein 2448 bp langes *Sfil/Sfil*-Fragment mit *tag-rfp*, gefolgt von dem Terminator *Tnos* in Kombination mit einer Geneticin-Resistenzkassette eingefügt. Das Plasmid wurde für die homologe Integration in den *rrm4*-Lokus verwendet. Bei dieser Rrm4 Variante wurde in jeder RRM Domäne das RNP1 Motiv mutiert.

pGrp1AG-NatR ohne *grp1B* (pUMa2850)

Plasmid für die Expression einer C-terminalen Fusion von Grp1A (UMAG 02412) mit Gfp unter der Kontrolle des nativen Promotors. Es enthält eine 1292 bp lange stromaufwärts gelegene Flanke, inklusive 69 bp des offenen Leserahmens von *grp1B* Exon, sowie eine 696 bp lange stromabwärts gelegene Flanke für die homologe Rekombination im *grp1*-Lokus. Die Flanken wurden durch PCR mit den Oligonukleotid-Kombinationen MB415/MB416 (UF + Exon1), MB417/MB418 (ExonA) und MB421/MB422 (DF) auf genomischer UMa521-DNA hergestellt. Zwischen den Flanken wurde ein 2448 bp langes *Sfil/Sfil*-Fragment aus pMF5-1n (pUMa389) eingefügt. Dieses enthält *egfp*, gefolgt von dem Terminator *Tnos*, sowie einer Nourseothricin-Resistenzkassette. Zwischen den Flanken wurde ein 2448 bp langes *Sfil/Sfil*-Fragment aus pMF5-1n (pUMa389) eingefügt. Dieses enthält *egfp*, gefolgt von dem Terminator *Tnos*, sowie einer Nourseothricin-Resistenzkassette.

pGrp1BG-NatR ohne *grp1A* (pUMa2851)

Plasmid für die Expression einer C-terminalen Fusion von Grp1B (UMAG 02412) mit Gfp unter der Kontrolle des nativen Promotors. Es enthält eine 1318 bp lange stromaufwärts gelegene Flanke, inklusive 21 bp des offenen Leserahmens von *grp1B* Exon, sowie eine 721 bp lange stromabwärts gelegene Flanke für die homologe Rekombination im *grp1*-Lokus. Die Flanken wurden durch PCR mit den Oligonukleotid-Kombinationen MB415/MB423 (UF + Exon1), MB419/MB420 (ExonB) und MB421/MB422 (DF) auf genomischer UMa521-DNA hergestellt. Zwischen den Flanken wurde ein 2448 bp langes *Sfil/Sfil*-Fragment aus pMF5-1n (pUMa389) eingefügt. Dieses enthält *egfp*, gefolgt von dem Terminator *Tnos*, sowie einer Nourseothricin-Resistenzkassette. Zwischen den Flanken wurde ein 2448 bp langes *Sfil/Sfil*-Fragment aus pMF5-1n (pUMa389) eingefügt. Dieses enthält *egfp*, gefolgt von dem Terminator *Tnos*, sowie einer Nourseothricin-Resistenzkassette.

pRrm4tR-G418 (pUMa3004)

Plasmid für die Expression einer C-terminalen Fusion von Rrm4 mit tag-Rfp-3xMyc Epitop unter der Kontrolle des nativen Promotors. Es enthält eine 830 bp lange stromaufwärts gelegene Flanke, inklusive 2376 bp des offenen Leserahmens von *rrm4*, sowie eine 1987 bp lange stromabwärts gelegene Flanke für die homologe Rekombination im *rrm4*-Lokus. Zwischen den Flanken wurde ein 2448 bp langes *SfiI/SfiI*-Fragment mit *tag-rfp*, gefolgt von dem Terminator *Tnos* in Kombination mit einer Geneticin-Resistenzkassette eingefügt. Das Plasmid wurde für die homologe Integration in den *rrm4*-Lokus verwendet.

4.1.4 Stämme***E. coli***

Für die Standardklonierungen wurde der *E. coli*-Stamm TOP10 (Invitrogen) verwendet (Genotyp: *F- mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80lacZΔM15 ΔlacX74 nupG recA1 araD139 Δ(ara-leu)7697 galE15 galK16 rpsL(StrR) endA1 λ-*).

U. maydis

Die Stämme in Tabelle 4.5 dienten als Ausgangs- und/oder Teststämme und lagen bereits zur Beginn dieser Arbeit vor. Die in Tabelle 4.6 aufgeführten Stämme wurden im Rahmen dieser Arbeit hergestellt. In allen hergestellten Stämmen wurden die homologen Rekombinationsereignisse durch eine Southern Blot-Analyse verifiziert.

Tabelle 4.5 Verwendete *U.maydis*-Stämme

Stamm	relevanter Genotyp	UMa-Nr.	Referenz
AB33	<i>α2 Pnar:bW2 bE1*</i>	133	(Brachmann et al., 2001)
AB33gfp	<i>gfp</i>	487	
AB33rrm4Δ	<i>rrm4Δ</i>	273	(Becht et al., 2006)
AB33rrm4G	<i>rrm4-gfp</i>	274	(Becht et al., 2006)
AB33rrm4GT	<i>rrm4-gfp-taptag</i>	303	(Becht et al., 2006)
AB33grp1Δ	<i>grp1Δ</i>	380	M. Feldbrügge, unveröffentlicht
AB33pab1G	<i>pab1-gfp</i>	389	(König et al., 2009)
AB33pab1G/rrm4Δ	<i>pab1-gfp, rrm4Δ</i>	472	(König et al., 2009)
AB33rrm4GT ^{RRMΔ}	<i>rrm4^{RRMΔ}-gfp-taptag</i>	396	P. Happel, unveröffentlicht
AB33rrm4G/pab1mC	<i>rrm4-gfp, pab1-mcherry</i>	428	(König et al., 2009)
AB33grp1AG	<i>grp1A-gfp</i>	854	T. Pohlmann, unveröffentlicht
AB33grp1BG	<i>grp1B-gfp</i>	911	T. Pohlmann, unveröffentlicht
AB33rrm4R/grp1AG	<i>rrm4-rfp, grp1A-gfp</i>	853	T. Pohlmann, unveröffentlicht
AB33grp1AG/rrm4Δ	<i>grp1A-gfp, rrm4Δ</i>	1049	T. Pohlmann, unveröffentlicht
AB33grp1BG/rrm4Δ	<i>grp1B-gfp, rrm4Δ</i>	1050	T. Pohlmann, unveröffentlicht

Tabelle 4.6 Hergestellte *U.maydis*-Stämme

Stamm	relevanter Genotyp	UMa-Nr.	Ausgangsstamm	Integriertes Plasmid	Lokus
AB33rrm4tR/grp1BG	<i>rrm4-trfp, grp1B-gfp</i>	2169	AB33grp1BG/rrm4Δ	<i>rrm4tR-genR</i>	<i>rrm4</i>
AB33pab1mC/grp1BG	<i>pab1-mcherry, grp1B-gfp</i>	2200	AB33grp1BG	<i>pab1mC-hygR</i>	<i>pab1</i>
AB33rrm4G/grp1Δ	<i>rrm4-gfp, grp1Δ</i>	880	AB33rrm4G	<i>grp1Δ-hyg</i>	<i>grp1</i>
AB33rrm4 ^{mR123} tR/grp1BG	<i>rrm4^{mR123}-trfp, grp1B-gfp</i>	2012	AB33grp1BG/rrm4Δ	<i>rrm4^{mR123}tR-genR</i>	<i>rrm4</i>
AB33rrm4 ^{mR123} tR/pab1G	<i>rrm4^{mR123}-trfp, pab1-gfp</i>	1200	AB33pab1G	<i>rrm4^{mR123}tR-genR</i>	<i>rrm4</i>
AB33grp1AG ohne Introns	<i>grp1A-gfp</i>	2036	AB33grp1Δ	<i>grp1AG-natR</i>	<i>grp1</i>
AB33grp1BG ohne Introns	<i>grp1B-gfp</i>	2037	AB33grp1Δ	<i>grp1BG-natR</i>	<i>grp1</i>

4.1.5 Zentrifugen

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

4.2. Mikrobiologische, zellbiologische und genetische Methoden

Alle Arbeiten mit gentechnisch veränderten Organismen wurden stets unter sterilen Bedingungen und dem Einhalten des Gentechnikgesetzes (der Sicherheitsstufe 1) durchgeführt. Der während der Arbeit anfallende mikrobiologische Abfall wurde vor der Entsorgung rückautoklaviert.

4.2.1 Arbeiten mit *E. coli*

Kultivierung von *E. coli*

Die Anzucht von *E. coli* auf Agarplatten erfolgte durch das Austreichen einer Glycerinkultur und deren Bebrütung bei 37 °C bis einzelne Kolonien zu sehen waren. Je nach Bakterienstamm waren die YT-Agarplatten mit dem entsprechenden Antibiotikum supplementiert (4.1.1). Anschließend

konnten die Einzelkolonien zur Überimpfung von YT-Flüssigmedium verwendet werden. Die Flüssigkulturen wurden über Nacht bei 200 rpm und 37 °C inkubiert.

Bestimmung der optischen Zelldichte von Flüssigkulturen

Um die Zelldichte von Flüssigkulturen bestimmen zu können, wurden Messungen der optischen Dichte (OD) bei einer Wellenlänge von 600 nm in einem Spektralphotometer (Novospec II Photometer, Pharmacia Biotech) durchgeführt. Für die Kalibrierung des Spektralphotometers wurde steriles YT-Medium verwendet. Um korrekte Messergebnisse zu gewährleisten wurde der lineare Messbereich eingehalten (OD₆₀₀ zwischen 0,2 und 0,5). Gegebenenfalls wurden die entnommenen Proben entsprechend mit sterilem YT-Medium verdünnt.

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

Zur Herstellung chemisch kompetenter *E. coli* Zellen (modifiziert nach (Cohen et al., 1972)) wurden 100 ml dYT-Medium mit 1 ml einer TOP10 Übernachtskultur inokuliert und mit 10 mM MgCl₂ sowie 10 mM MgSO₄ versetzt. Die Kultur wurde, bis zum Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,5, bei 37 °C bei 200 rpm schüttelnd inkubiert. Das Pelletieren der Zellen erfolgte durch Zentrifugation (3.000 rpm, 15 min, 4 °C). Das Zellpellet wurde anschließend in 33 ml eiskalter RF1-Lösung resuspendiert und 30-60 min auf Eis inkubiert. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt bei 3.000 rpm, 15 min und 4 °C, wurde das Zellpellet in 5 ml eiskalter RF2-Lösung resuspendiert und für weitere 15 min auf Eis inkubiert. Die Zellsuspension wurde zu je 50 µl in 1,5 ml-Reaktionsgefäßen aliquotiert, in flüssigem Stickstoff gefroren und bei -80 °C gelagert.

<u>RF1-Lösung</u>		<u>RF2-Lösung</u>	
RbCl	100 mM	MOPS	10 mM
MnCl ₂ x 4 H ₂ O	50 mM	RbCl	10 mM
KAc	30 mM	CaCl ₂ x 2 H ₂ O	10 mM
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	75 mM	Glyzerin in H ₂ O _{bid}	15 % (v/v)
Glyzerin in H ₂ O _{bid}	15 % (v/v)		
Mit Essigsäure auf pH 5,8 einstellen und steril filtrieren.		Mit NaOH auf pH 5,8 einstellen und steril filtrieren.	

Transformation chemisch kompetenter *E. coli* Zellen mit Plasmid-DNA

Für eine Transformation wurden 50 µL chemisch kompetente Zellen auf Eis aufgetaut, mit 1-10 µl (~1-5 ng) Plasmid-DNA oder 10 µl Ligationsansatz vorsichtig gemischt und 30 min auf Eis inkubiert. Nach einem 45 sec Hitzeschock bei 42 °C wurden 250 µL dYT-Medium (4.1.1) zugegeben. Nach einer 30 minütigen Inkubationszeit bei 37 °C unter Schütteln, wurde der Transformationsansatz auf selektiven YT-Agarplatten (4.1.1) ausgestrichen. Diese wurden dann über Nacht bis zum Anwachsen von Einzelkolonien bei 37 °C inkubiert.

4.2.2 Arbeiten mit *Ustilago maydis*

Kultivierung von *U. maydis*

Die Anzucht von *U. maydis* auf CM-Agarplatten (4.1.1) erfolgte durch das Austreichen einer Glyzerinkulturen und deren Inkubation bei 28 °C. Bis zu ihrer Verwendung wurden die Kulturen auf Festmedien bis zu drei Wochen, mit Ausnahme von *grp1Δ*-Stämmen, diese wurden nicht länger als 2 Wochen bei 4 °C, gelagert. Vorkulturen wurden von den Agarplatten in Reagenzgläsern in 3 ml CM-Medium (4.1.1) angeimpft und über Nacht auf einem Drehrad bei 28 °C inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurden eine Hauptkultur in 20-150 ml CM-Medium mit der Vorkulturen i.d.R. 1:1600, mit Ausnahme von *grp1Δ*-Stämmen diese wurden 1:800 im Schikanekolben angeimpft, und über Nacht bei 200 rpm bei 28 °C kultiviert. Für die Aufnahmen einer Wachstumskurve wurden die Hauptkulturen aller Stämme auf eine OD₆₀₀ eingestellt und das Wachstum alle 2h photometrisch detektiert. Anschließend wurde die OD₆₀₀ gegen die Zeit in einem Diagramm dargestellt.

Induktion des filamentösen Wachstums von AB33 und Derivaten

Der Stamm AB33 trägt die kompatiblen Allele bW2 und bE1 unter der Kontrolle des Stickstoff-regulierten Promotors *Pnar*. Um die Expression zu induzieren, wurden die Zellen von einem NH₄NO₃-haltigen Medium (CM) in ein KNO₃-haltiges Medium (NM) überführt. Eine Hauptkultur wurde nach Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,5 durch Zentrifugation (5.000 rpm, 3 min) pelletiert, in 20 ml NM resuspendiert und erneut zentrifugiert (5.000 Upm, 5 min). Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in NM (Ziel-OD₆₀₀ von 0,5) resuspendiert. Die Kultur wurde, wenn nicht anders angegeben, für 6 h bei 28 °C und 200 rpm inkubiert. Für die Bestimmung des hyphalen Längenwachstums wurden die Zellen nach 2 h, 4 h und 6 h Inkubationszeit mikroskopisch analysiert (4.4.2).

Analyse des filamentösen Wachstums auf Festmedium

Für die Analyse des filamentösen Wachstums wurden 3 µl einer Vorkultur auf aktivkohlehaltiges NM-Festmedium getropft und, wenn nicht anders angegeben, für 2 Tage bei 28 °C inkubiert. Für die Analyse des filamentösen Wachstums von *U. maydis*-Kolonien wurde das Stereomikroskop Zeiss Stemi 2000C verwendet. Als Lichtquelle diente eine Zeiss KL1500 LCD (Zeiss). Für die Aufnahmen der Kolonien wurde eine stationär angebrachte Canon PowerShot A650 IS-Kamera (Canon Deutschland GmbH, Krefeld, Deutschland) verwendet.

U. maydis Wachstum bei Stressbedingungen

Die Auswirkung von Kältestress auf das Wachstum von *U. maydis* wurde auf CM-Agarplatten untersucht. Für den Tropftest wurden 3 µl der Hauptkultur (OD₆₀₀ = 0,5) auf je eine Agarplatte getropft und bei 28 °C für einen Tag, 21 °C und 16 °C jeweils für fünf Tage inkubiert. Die

anschließende Analyse der Kolonien erfolgte mittels eines Stereomikroskopes (Zeiss Stemi 2000C). Als Lichtquelle diente eine Zeiss KL1500 LCD (Zeiss). Für die Aufnahmen der Kolonien wurde eine stationär angebrachte Canon PowerShot A650 IS-Kamera (Canon Deutschland GmbH, Krefeld, Deutschland) verwendet.

Die Auswirkung von CFW und CR auf das Zellwachstum und Zellwandmorphologie wurde sowohl auf Festmedium als auch in Flüssigkulturen untersucht. Dazu wurden 3 μl Hauptkultur ($\text{OD}_{600} = 0,5$) pro CM-Agarplatte ohne Inhibitoren und mit CFW (50 μM) bzw. CR (57,4 μM) getropft und bei 28 °C, für einen bzw. vier Tage inkubiert. Die Analyse erfolgte mittels des Stereomikroskopes (Zeiss Stemi 2000C).

Der Zellwandstress in Flüssigmedium wurde durchgeführt, indem 3 h nach der Induktion des hyphalen Wachstums 2,5 μM CFW zugegeben wurde. Die Kultur wurde für weitere 2 h bei 28 °C und 200 rpm inkubiert. Anschließend wurde die Morphologie mikroskopisch analysiert (4.4.3).

Bestimmung der Zelldichte bei *U. maydis*

Die Zelldichte bei *U. maydis* wurde auf dieselbe Art bestimmt wie für *E. coli* (4.2.1). Eine OD_{600} von 1,0 entspricht ungefähr $1-5 \times 10^7$ Zellen/ml.

Herstellung transformationskompetenter Protoplasten von *U. maydis*

Die Transformation von *U. maydis* wurde nach einem modifizierten Protokoll nach Schulz et al. 1990 und Gillissen et al. durchgeführt (Gillissen et al., 1992; Schulz et al., 1990). Dazu wurde von einem entsprechenden Stamm eine Hauptkultur in 50 ml CM-Medium mit einer entsprechenden Vorkultur inokuliert und über Nacht bei 28 °C inkubiert. Bei einer OD_{600} von 0,6-1,0 wurde die Kultur pelletiert (2500xg für 6 min) und das Zellpellet in 20 ml SCS-Lösung resuspendiert. Die Zellen wurden erneut pelletiert und das Zellpellet wurde in 5 ml SCS gelöst. Anschließend wurden 4 ml SCS mit 12,5 mg/ml Novozym 234, welches zuvor steril filtriert wurde, hinzugegeben. Die Protoplastierung erfolgte bei Raumtemperatur und wurde mikroskopisch verfolgt. Die Lyse der Zellwand führt zum Abkugeln der sonst eigentlich zigarrenförmigen Zellform. Nachdem etwa 1/3 der Zellen nach 3-8 min protoplastiert waren, wurden 30 ml eiskaltes SCS hinzugegeben und die Zellen durch Zentrifugation bei 1100xg für 8 min bei 4 °C pelletiert. Das Zellpellet wurde anschließend zweimal mit 10 ml eiskaltem SCS gewaschen (1100xg, 8 min, 4 °C). Daraufhin wurde das Zellpellet in 10 ml eiskaltem STC resuspendiert und durch Zentrifugation (1100xg, 8 min, 4 °C) pelletiert. Das Zellpellet wurde in 2,5 ml eiskaltem STC resuspendiert und zu je 110 μl in vorgekühlte 2 ml Reaktionsgefäße aliquotiert. Die so behandelten Protoplasten konnten einige Stunden auf Eis gelagert werden oder bei -80 °C für mehrere Jahre aufbewahrt werden.

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

Zur integrativen Transformation wurden 110 µl Protoplasten mit 2-4 µg Plasmid-DNA und 1 µl Heparinlösung für 10 min auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 500 µl STC/PEG erfolgte eine weitere Inkubation von 15 min auf Eis. Anschließend wurde der Transformationsansatz auf zwei (kurz zuvor mit Top-Agar überschichteten) Regenerationsagarplatten (4.1.1) ausgestrichen. Nach 4 bis 7 Tagen Inkubation bei 28 °C wurden die Kolonien auf antibiotikahaltigen CM-Agarplatten (4.1.1) vereinzelt.

<u>SCS</u>		<u>STC</u>		<u>Heparin-Lösung</u>		<u>STC/PEG</u>	
Na-Citrat pH 5,8	20 mM	Tris-HCl, pH 7,5	10 mM	Tris-HCl, pH 7,5	10 mM	STC	15 mM
Sorbitol	1 M	CaCl ₂	100 mM	CaCl ₂	100 mM	PEG 4000	10 g
		Sorbitol	1 M	Sorbitol	1 M		

In H₂O_{bid.}, sterilfiltrieren

4.3. Molekularbiologische Methoden

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

4.3.1 Isolierung von Nukleinsäuren

Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli*

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

<u>STET</u>		<u>Lysozym-Lösung</u>		<u>TE/RNase A</u>	
Tris-HCl, pH 8,0	50 mM	Lysozym	10 mg/ml	Tris-HCl, pH 7,9	10 mM
Na ₂ -EDTA	50 mM	Tris-HCl, pH 8,0	10 mM	Na ₂ -EDTA	1 mM
Saccharose	8 % (w/v)			RNase A	20 µg/ml
Triton X-100	5 % (w/v)				

In H₂O_{bid.}

Präparation genomischer DNA aus *U. maydis* (modifiziert nach Hoffman und Winston 1987).

Eine Vorkultur von 3 ml CM-Medium wurde über Nacht bei 28 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurden 2 ml der dichtbewachsenen Flüssigkultur durch Zentrifugation (13.000 rpm, 2 min, RT) pelletiert. Zu dem Zellpellet wurden ca. 0,3 g Glasperlen gegeben und durch kurzes zentrifugieren pelletiert. Anschließend wurden 500 µl TE-Phenol/Chloroform und 500 µl „Ustilago-Lysispuffer“ hinzugegeben. Die Suspension wurde für 6-10 min auf einem Vibrax-Schüttler geschüttelt und anschließend abzentrifugiert (13.000 rpm, 15 min, RT). Dadurch wurde eine Phasentrennung in eine untere (organische) und obere (wässrige) Phase erreicht. Proteine und Zelltrümmer sammeln sich dabei im Bereich des Phasenübergangs, während die DNA in der wässrigen Phase gelöst vorliegt. Es wurden 400 µl dieser wässrigen Phase abgenommen und zusammen mit 1 ml Ethanol (100 %) in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Durch mehrmaliges Invertieren sowie Zentrifugation (13.000 rpm, 5 min, RT) wurde die DNA gefällt. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet erneut zentrifugiert. Der restliche Überstand wurde abgenommen und das Pellet in 50 µl TE/RNase A bei 50 °C durch Schütteln gelöst. Die so präparierte genomische DNA wurde bei -20 °C gelagert.

<u>Ustilago-Lysispuffer</u>		<u>TE-Phenol/Chloroform</u>	
Na-Citrat pH 8	10 mM	Mischung aus gleichen Teilen Phenol	
NaCl	100 mM	(mit TE-Puffer äquilibriert) und	
SDS	1 % (w/v)	Chloroform. Das Phenol sollte vor	
Triton X-100	2 % (w/v)	Gebrauch mit einer Spatelspitze 8-	
EDTA	1 mM	Hydroxychinolin versetzt werden	
In H ₂ O _{bid.}			

4.3.2 Arbeiten mit Nukleinsäuren

Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Bestimmung der Konzentration und des Reinheitsgrades von Nukleinsäuren erfolgte mit Hilfe des NanoDrop2000c Spektrophotometers (Thermo Fisher Scientific). Die Konzentration von Nukleinsäuren wurde bei einer Wellenlänge von 260 nm gemessen. Vor der Messung wurde der NanoDrop2000 mit der Lösung kalibriert, in dem die zu messende Probe gelöst vorlag (i. d. R. in H₂O_{bid.} oder TE-Puffer). Es wurde immer ein 1 µL der Probe für die Messungen eingesetzt. Der

Reinheitsgrad der Nukleinsäure wurde mittels eines UV-Spektrums über einen Wellenlängenbereich von 220 nm bis 320 nm ermittelt. Die Reinheit lässt sich aus dem Quotienten von 260 nm und 280 nm berechnen.

Restriktionsendonukleolytische Reaktionen

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

	<u>Analytische Reaktion</u>	<u>Präparative Reaktion</u>	<u>Reaktion für Transformations- fragmente</u>	<u>Reaktion für Southern- Analyse</u>
Plasmid-DNA	0,5-2 µl	5-20 µl	40 µl	20 µl
NEB-Puffer (10×)	2 µl	5 µl	10 µl	3 µl
Restriktionsenzym	0,5-1 U	1-2 U	3-6 U	1-3 U
H ₂ O _{bid}	ad 20 µl	ad 50 µl	ad 100 µl	ad 30 µl

Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten

Die Religation zwischen restringierten DNA-Fragmenten konnte verhindert werden, indem deren 5'-Enden dephosphoryliert wurden. Dies wurde erreicht, indem dem Restriktionsansatz Alkalische Phosphatase zugegeben wurde. Nach einer 30-minütigen Inkubationzeit bei 37 °C wurde der gesamte Ansatz auf einem Agarosegel aufgetrennt und die entsprechenden Banden extrahiert.

<u>Reaktionsansatz</u>	
Präparativer Restriktionsansatz	50 µl
Alkalische Phosphatase	3 µl
Alkalische Phosphatase Puffer	7 µl
H ₂ O _{bid} .	ad 20 µl

Ethanol-Salz-Präzipitation von DNA

Die Fällung von Nukleinsäuren aus einer wässrigen Lösung erfolgte nach der Methode der Ethanol-Salz-Fällung. Zu einer Nukleinsäurelösung wurde 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat (pH 5,3) sowie das 2,5-fache Volumen an kaltem 100 % Ethanol hinzugegeben. Durch Invertieren wurde die Lösung gemischt und auf ein sichtbares Ausfällen der DNA hin überprüft. Die gefällte

DNA wurde durch Zentrifugation (13.000 rpm, 15 min, RT) pelletiert. Das Pellet wurde mit dem 2,5-fachen Volumen 70 % Ethanol gewaschen und erneut zentrifugiert (13.000 rpm, 15 min, RT). Der Überstand wird verworfen, das Pellet getrocknet und in H₂O_{bid} oder TE-Puffer gelöst.

Ligation von Nukleinsäurefragmenten

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

<u>Ligationsansatz</u>		<u>(Quick) Ligationsansatz</u>	
DNA-Fragment	X µl	DNA-Fragment	X µl
Puffer (10×)	2 µl	Puffer (2×)	10 µl
T4 DNA-Ligase	1 µl	QuickLigase	1 µl
H ₂ O _{bid}	ad 20 µl	H ₂ O _{bid}	ad 20 µl

Golden Gate-Klonierung

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

<u>Rektionsansatz</u>		<u>PCR-Programm</u>	<u>Zyklen</u>
Aufbewahrungs-Plasmid	75 ng	37 °C/2 min	50
Ziel-Plasmid	75 ng	16 °C/5 min	50
Flanken*	40 ng	37 °C/5 min	1
T4 DNA-Ligase	0,75 µl	50 °C/5 min	1
BsaI-HF oder SapI-HF (NEB)	0,5 µl	80 °C/5 min	1
NEB-Puffer (10×)	1,5 µl	16 °C	∞
H ₂ O _{bid}	ad 1,5 µl		

*PCR-generiert und aufgereinigt

4.3.3 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase Kettenreaktion (PCR) wurde modifiziert nach Innis et al. durchgeführt (Innis et al., 1990). Zur Generierung von DNA-Fragmenten für Klonierungen wurde die Phusion Polymerase von NEB eingesetzt. Für verschiedene Kontroll-PCRs, wurde eine selbst hergestellte Phusion Polymerase benutzt. Diese ist nicht so effizient wie die kommerziell erworbene Polymerase und weist eine längere Elongationszeit auf. Die Reaktion erfolgte in den Thermocyclern PTC100 / 200 (MJ Research; St. Bruno, Quebec, Kanada) oder Labcycler (SensoQuest GmbH; Göttingen, Deutschland).

<u>Reaktionsansatz</u>		<u>PCR-Programm</u>	
Matritzen-DNA	10-100 ng	Initiale Denaturierung	98 °C/30 sec
dNTPs (25 mM)	0,5 µl	Amplifikation	30-34 Zyklen
Oligonucleotide (je 100 µM)	0,5 µl	Denaturierung	98 °C/10 sec
DMSO	1,5 µl	Hybridisierung	55-65 °C / 20 sec
Phusion-Polymerase	0,5 µl	Elongation	72 °C
Phusion-HF Puffer (10×)	5 µl	Phusion Polymerase (NEB)	30 sec pro 1 kb
H ₂ O _{bid}	ad 50 µl	selbsthergestellte Phusion Polymerase	45-60 sec pro 1 kb
		Endelongation	72 °C/8 min

4.3.4 Auftrennung und Nachweis von Nukleinsäuren

Auftrennung von Nukleinsäuren mittels Gelelektrophorese

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

<u>TAE-Laufpuffer (50x)</u>		<u>DNA-Auftragspuffer</u>	
Tris-Acetat 30 %	2 M	Glyzerin	30 % (v/v)
Na ₂ -EDTA	100 mM	Bromphenolblau	0,4 % (w/v)
In H ₂ O _{bid} .		In H ₂ O _{bid} .	ad 20 µl

Präparation von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

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

Transfer von DNA (Southern-Blot)

Zum Transfer von DNA wurde eine modifizierte Variante der 1975 entwickelten Methode des Southern-Blots angewendet (Southern, 1975). Die in einer Restriktionsendonukleolyse geschnittene genomische DNA wurde dazu in einem TAE-Agarosegel aufgetrennt. Anschließend wurde das Agarosegel je 20 min in 0,25 M HCl, DENAT- und RENAT-Lösung inkubiert, um einen Teil der Purine abzuspalten und die Stränge, für einen besseren Transfer, aufzutrennen. Der Transfer der DNA-Fragmente auf eine Nylonmembran erfolgte durch einen Kapillar-Blot. Der Blot wurde dabei wie folgt aufgebaut: Ein Behältnis wurde mit Transferlösung (20xSSC) befüllt und eine Glasplatte auf den Behälter gelegt. Ein Streifen Whatman-Papier diente dabei als Salzbrücke, welches so über die Glasscheibe gelegt wurde, dass beide Enden in die Pufferlösung ragen. Das Gel wurde mit den Taschen nach unten zeigend auf der Salzbrücke platziert, auf die eine Nylonmembran (Hybond-N+, GE Healthcare Life Sciences) und zwei gleich große Whatman-Papiere gelegt wurden. Ein großer Stapel Papierhandtücher mit einem gleichmäßig verteilten Gewicht gewährleistete einen enge Verbindung zwischen den verschiedenen Lagen des Transfersystems. Die Transferlösung wurde aus dem Pufferreservoir durch Kapillarkräfte über die Salzbrücke, das Gel und die Membran in die Papierhandtücher gesaugt. Aufgrund des so erzeugten Pufferstroms, wurden die DNA-Fragmente aus dem Gel auf die Nylonmembran übertragen. Der Kapillar-Blot erfolgte für mindestens 4 h bzw. über Nacht. Nach dem Transfer der Nukleinsäuren, wurde die DNA auf der Membran durch UV-Bestrahlung (120 mJ/cm²) in einer UV-Kammer (BLX-254; Vilber Lourmat) fixiert.

<u>20x SSC</u>		<u>DENAT-Lösung</u>		<u>RENAT-Lösung</u>	
NaCl	3 M	NaCl	1,5 M	NaCl	1,5 M
Na-Citrat x 2 H ₂ O	300 mM	NaOH	400 mM	Tris-HCl	282 mM
In H ₂ O _{bid.}				Tris	218 mM
Mit HCl auf pH 7,0 einstellen		In H ₂ O _{bid.}		In H ₂ O _{bid.}	

Spezifische Nachweis immobilisierter Nukleinsäure (Southern-Analyse)

Für den Nachweis der benötigten DNA-Fragmente wurden genspezifische Sonden verwendet. Diese wurden durch den Einbau von Digoxigenin-11-dUTP (DIG-dUTP) während einer PCR markiert. Die Reaktion erfolgte in einem Thermocycler PTC200 (MJ Research) analog zu einer

normalen PCR (4.3.3). Die Hybond-N+-Membran wurde mit Southern-Hybridisierungspuffer für mindestens 30 min bei 65 °C in einer Hybridisierungsröhre präinkubiert. Die DIG-markierte Sonde wurde in 15- 20 ml Southern-Hybridisierungspuffer resuspendiert und für 10 min bei 99 °C in einem Heizblock denaturiert. Nach dem Entfernen des Präinkubationspuffers wurde die Sonde zu der Membran gegeben. Die Hybridisierung der Sonde erfolgte bei 65 °C mindestens für 6 h, üblicherweise allerdings über Nacht. Anschließend wurde die Membran für jeweils 15 min bei 65 °C mit Southern-Waschpuffer I, Southern-Waschpuffer II und Southern-Waschpuffer III gewaschen. Die nachfolgenden Waschschrte wurden bei Raumtemperatur ausgeführt. Nach 5 min Inkubation mit DIG-Waschpuffer wurde die Membran 30 min mit DIG2-Puffer blockiert. Anschließend wurde eine DIG2-Antikörperlösung (Anti-Digoxigenin-AB Fab-Fragmente, Roche 1:10.000 in DIG2-Puffer) hinzugegeben und für 30 bis 60 min inkubiert. Die Membran wurde zweimal 15 min mit DIG-Waschpuffer gewaschen und 5 min mit DIG3 äquilibriert. In einer Plastikhülle wurde die Membran für 5 min mit einer Chemilumineszenzlösung (CDP-Star (Roche) 1:100 in DIG3) inkubiert. Anschließend wurde das Chemilumineszenzsignal mit dem Aufnahmesystem ImageQuant LAS 4000 (GE Healthcare Life Sciences) detektiert.

PCR-Reaktionsansatz

linearisierte Plasmid-DNA	5-25 ng
PCR-Puffer (10x)	5 µl
PCR-DIG-Labeling-Mix (DIG-Labeling Kit, Roche)	5 µl
DMSO	1,5 µl
je Oligonukleotid	20 pmol
Phusion DNA-Polymerase	0,5 µl
In H ₂ O _{bid.}	ad 50 µl

20x SSPE		Denhardt-Lösung		Southern-Hybridisierungspuffer	
NaCl	3 M	BSA Fraktion V (Sigma A-9647)	2 % (v/v)	SSPE (20x)	26 % (v/v)
Na ₂ HPO ₄	200 mM	Ficoll	2 % (v/v)	Denhardt-Lösung	5 % (v/v)
Na ₂ -EDTA	20 mM	PVP (Sigma PVP-360)	2 % (v/v)	SDS (10 %)	5 % (v/v)
In H ₂ O _{bid.}	pH 7,4	In H ₂ O _{bid.}		In H ₂ O _{bid.}	
Southern-Waschpuffer I		Southern-Waschpuffer II		Southern-Waschpuffer III	
SSPE (20x)	2x	SSPE (20x)	1x	SSPE (20x)	0,1x
SDS (10 %)	0,1%	SDS (10 %)	0,1%	SDS (10 %)	0,1 %
In H ₂ O _{bid.}					

DIG1		DIG-Waschpuffer		DIG2		DIG3	
Maleinsäure	100 mM	Tween 20	0,3 %	Mager-	1 %	Tris-HCl	100 mM
NaCl	150 mM	In DIG1-Lösung		milchpulver	(w/v)	CaCl	100 mM
In H ₂ O _{bid.} mit NaOH auf pH 7,5 einstellen				In DIG1-Lösung		In H ₂ O _{bid.} mit NaOH pH 9,5 einstellen	

4.3.5 Sequenzanalysen

DNA-Sequenzierung

Die DNA-Sequenzierung wurde von dem Sequencing Service des Biozentrums der LMU München durchgeführt. Die Sequenzierung erfolgte nach der BigDye v3.1-Methode. Die erhaltenen Daten wurden mit dem Programm Clonemanager (Version 9; Scientific and Educational Software) ausgewertet.

Sequenzierungsansatz

Plasmid-DNA	250 ng
je Oligonukleotid	3,2 pmol
10 mM Tris/HCl pH 8,5	ad 7µl

Sequenz- und Strukturanalyse

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

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

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

4.4. Mikroskopie und Bildverarbeitung

4.4.1 Mikroskopaufbau und -Steuerung

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

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

ii) Zeiss Axio Observer.Z1 ausgestattet mit einer CCD-Kamera (Photometrics CoolSNAP HQ2) und den Objektivlinsen Plan Neofluar (40x, NA 1,3), Plan Apochromat (63x und 100x, NA 1,4) und a-Plan Apochromat (100x, NA 1.46).

Die Anregung von Fluoreszenz-markierten Proteinen erfolgte mittels einer HXP Halogen-Metalldampfampe (LEJ, Jena), Laser für die Anregung von eGfp (488 nm/100mW) oder Rfp/mCherry (561nm/150mW), in Kombination mit den Filter-Sets für eGfp (ET 470/40x, ET525/50m, T495_PXR) oder mCherry (ET560/40x, ET630/75m, T581p, AHF Analysetechnik, Tübingen) oder einer LED Lampe (CoolLED, precisExcite, Andover, UK).

Kolokalisationsstudien wurden unter Verwendung eines Zweikanal-Bildwandlers (DV2, Photometrics) durchgeführt, welcher die simultane Detektion von Gfp und Rfp/mCherry ermöglichte. Zur Anregung von Gfp und Rfp/mCherry wurde ein dichroitischer Strahlteiler in Verbindung mit einem spezifischen Anregungsfilter für Gfp und mCherry (Gfp/mCherry, Chroma) verwendet. Die Fluoreszenzsignale wurden von einem zweiten dichroitischen Strahlteiler (dcxr565) in die jeweiligen Wellenlängen aufgeteilt. Die Fluoreszenzsignale wurden anschließend getrennt und mit Emissionsfiltern (Gfp ET520/40; Rfp/mCherry ET632/60) gefiltert, bevor sie auf unterschiedlichen Bereichen eines CCD-Chips detektiert wurden. Die Steuerung der Mikroskope sowie Auswertung und Bearbeitung der Aufnahmen erfolgte mit dem Programm Metamorph (Versions 7.7.0.0 and 7.7.4.0; Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA.).

4.4.2 Quantifizierung des Längenwachstums von *U. maydis*

Die Länge der sich auswachsenden *U. maydis*-Zellen wurde mikroskopisch ermittelt. Zum einen wurde die Länge der hefeartig wachsenden Zellen analysiert, wobei darauf geachtet wurde einzelne Zellen zu messen, die sich nicht in der Teilung befanden. Zum anderen wurden die filamentös auswachsenden Zellen gemessen, wobei zwischen Hyphen mit und ohne Septen differenziert wurde. Gemessen wurde immer von Pol zu Pol einer Zelle, wobei die leeren Abschnitte nicht berücksichtigt wurden. Zusätzlich wurde auch die Länge der leeren Abschnitte analysiert, dabei wurde immer das zuletzt gebildete Septum am distalen Pol gemessen. Die Länge der Hyphen wurde 2, 4 und 6 h nach der Induktion des hyphalen Wachstums mikroskopisch analysiert. Die Länge der leeren Abschnitte wurden 6 h nach der Induktion des hyphalen Wachstums analysiert. Es wurden mindestens drei unabhängige Experimente durchgeführt, wobei bei jedem Experiment mindestens 190 Zellen ausgemessen wurden. Angegeben wurde der Median der jeweiligen Zelllängen.

4.4.3 Quantifizierung des Zellwanddefektes in Grp1-Deletionsmutanten

Die Quantifizierung der Hyphen mit Zellwanddefekt erfolgte durch manuelles Auszählen von Zellen mit abweichender Zellwandmorphologie. Dabei wurden Zellen mit und ohne CFW-Behandlung miteinander verglichen. Hyphen, die ungewöhnliche Verdickungen, Einschnürungen oder Unebenheiten an der Zellwandperipherie aufwiesen wurden als morphologisch auffällig

eingestuft. Es wurden drei unabhängige Experimente durchgeführt und mindestens 100 Hyphen pro Experiment analysiert.

4.4.4 Quantifizierung von sich bewegenden Proteinen

Für die Quantifizierung der sich bewegenden Partikel wurden die Videos zunächst in Kymographen umgewandelt. Nur die Proteine die sich mindestens 5 μm bewegen wurden in der Quantifizierung berücksichtigt. Es wurden drei unabhängige Experimente durchgeführt und mindestens 11 Hyphen pro Experiment analysiert.

4.4.5 Quantifizierung von kolokalisierenden Proteinen

Für die Quantifizierung von kolokalisierenden Proteinen in sich bewegenden Partikeln, wurden die sich beweglichen Rrm4-Partikel gezählt und auf eine Kolokalisation mit Grp1 bzw. Pab1 hin überprüft. Dabei wurde das schwächere Singal (meist tagRfp) mit dem stärkeren Signal verglichen. Wenn in beiden Kanälen der gleiche Partikel zu sehen war, wurde dies als Kolokalisation gewertet. Es wurden drei unabhängige Experimente mit mindestens 10 Filamenten pro Experiment durchgeführt. Angegeben wurde der Mittelwert der kolokalisierenden Proteine, wobei die Fehlerbalken den Standardfehler angeben.

4.4.6 Quantifizierung der Proteinverteilung in Abwesenheit von Rrm4

Der Einfluss der Rrm4-Deletion auf die Proteinverteilung von Grp1B-Gfp, Pab1-Gfp und Gfp wurde quantifiziert, indem die Fluoreszenzintensität des Gfp-Signals von zwei zuvor ausgewählten Regionen (*region of interest*; ROI I und ROI II) miteinander verglichen wurde. ROI I wurde immer ca. 10 μm vom Nukleus entfernt plaziert und ROI II an der Hyphenspitze. Dabei wurde die Größe beider Regionen auf 2 μm^2 beschränkt. Anschließend wurde das Verhältnis zwischen den Signalintensitäten von ROI I und ROI II berechnet und in einem Balkendiagramm zusammengefasst. Angegeben wurde der Mittelwert und der Standardfehler.

4.5. Biochemische Methoden

4.5.1 Proteinbiochemische Methoden

Proteinpräparation aus *U. maydis*

Für eine Standardproteinpräparation wurde eine 50 ml Kultur angeimpft und über Nacht bei 28 °C und 200 rpm schüttelnd inkubiert. Nach dem Erreichen einer OD_{600} von 0,5 wurden die Zellen entweder direkt für die Proteinpräparation vorbereitet oder zunächst das hyphale Wachstum induziert (4.2.2) und anschließend die Hyphen für den Zellaufschluss vorbereitet. Dazu wurden die Zellen zunächst pelletiert (7500 rpm, 10 min, 4 °C), einmal in 5 ml eiskaltem 1x PBS-Puffer

gewaschen und in 2 ml Lysispuffer unter der Zugabe von Proteaseinhibitoren resuspendiert. Die Zellsuspension wurde in, mit flüssigem Stickstoff, vorgekühlte Mahlbecher überführt und schockgefroren. Anschließend wurden 2 vorgekühlte Mahlkugeln (d=12 mm) in die Mahlbecher gegeben und die Zellen 3-mal bei 30 Hz für 10 min in einer Schwingmühle (MM400, Retsch, Haan, Deutschland) aufgeschlossen. Zwischen jedem Zellaufschluss wurden die Mahlbecher in flüssigem Stickstoff abgekühlt. Das Lysat wurde anschließend in vorgekühlte Reaktionsgefäße transferiert. Durch die Zentrifugation (13.000 rpm, 10 min, 4 °C) wurden die Zelltrümmer pelletiert und mit dem Überstand weitergearbeitet. Das Proteinrohextrakt wurde entweder sofort verarbeitet oder für weitere Experimente bei -20 °C gelagert.

<u>Lysispuffer</u>		<u>10× PBS-Lösung pH 7,4</u>	
Tris-HCl, pH 7,4	50 mM	NaCl	1,37 M
NaCl	100 mM	Na ₂ HPO ₄	27 mM
Nonidet P-40	1 %	KCl	100 mM
SDS	0,1 %	KH ₂ PO ₄	20 mM
Natrium-deoxycholat	0,5 %	10× PBS-Lösung bei Raumtemperatur lagern, 1× PBS-Lösung bei 4 °C	

Proteaseinhibitoren für 10 ml Lysispuffer

Complete Proteinaseinhibitoren EDTA frei (Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland)	2×
DTT (GERBU, Heidelberg, Deutschland)	1 mM
PMSF (Sigma)	1 mM
Pepstatin A (Sigma)	5,25 ng/μl

Bestimmung der Proteinkonzentration (modifiziert nach Bradford, 1976)

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte anhand der Bradford-Methode. Hierbei wurde eine kommerziell verfügbare Protein-Färbelösung verwendet (Bio-Rad Protein Färbelösung (5x), #500-0006). Vor jeder Messung wurde die Färbelösung zunächst mit Wasser 1:5 verdünnt. Die Färbung und Messung erfolgte in Mikrotiterplatten. Pro Reaktionsvolumen wurden 200 μl Färbelösung (1x) und 10 μl Proteinlösung bzw. Proteinstandardlösung pipettiert. Die Proben wurden lichtgeschützt für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Absorption bei 595 nm in einem Fluoreszenzspektrometer (Infinite M200, Tecan; Crailsheim, Deutschland) gemessen.

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

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

Die SDS-PAGE von Tris-HCl Gelen erfolgte mittels des Mini-Protein Systems (Bio-Rad). Die gegossenen Gele bestanden aus Sammel- und Trenngel und besaßen jeweils eine Schichtdicke von 1 mm. Der Polyacrylamidanteil orientierte sich an der Größe der aufzutrennenden Proteine. Für Rrm4-Gfp (112 kDa) beispielsweise wurden 6 % PAA-Gele verwendet. Nach dem Gießen des Trenngels, wurde es mit Isopropanol überschichtet und so lange gewartet bis das Gel polymerisierte. Anschließend wurde das Isopropanol entfernt und die Gele kurz mit Wasser gewaschen. Daraufhin wurde das Sammelgel gegossen und ein Kamm eingesetzt. Nach der vollständigen Polymerisation wurden die SDS-Gele entweder sofort verwendet oder bei 4 °C bis zu weiteren Verarbeitung gelagert.

Die Proteinproben wurden vor dem Auftragen auf das SDS-Gel zusammen mit einem 3-fachen Probenpuffer 10 min bei 95 °C denaturiert. Die Elektrophorese erfolgte für 60 min bei 30 mA/Gel.

<u>Trenngel</u>		<u>Sammelgel</u>	
Tris-HCl, pH 8,8	375 mM	Tris-HCl, pH 6,8	125 mM
Polyacrylamid	7,5-15 %	Acrylamid	5 %
SDS	0,1 %	SDS	0,1 %
Glyzerin	1,25 %	APS	0,05 %
Ammoniumpersulfat (APS)	0,05 %	TEMED	0,1 %
N, N, N', N'-tetramethylethylenediamine (TEMED)	0,1 %		

<u>3× Probenpuffer (Laemmli)</u>		<u>10× Laufpuffer</u>	
Tris-HCl; pH 6,8	0,15 M	Tris, pH 8,4	25 mM
Glyzerin	30 %	Glyzin	192 mM
SDS	6 %	SDS	0,1 %
Bromphenolblau	0,003%		
In H ₂ O _{bid.}		In H ₂ O _{bid.}	

Western-Blot (modifiziert nach Kyhse-Andersen, 1984)

Die in der SDS-PAGE aufgetrennten Proteine wurden nach dem „semi dry“ Prinzip auf die PVDF-Membran (Hybond™-P; GE Healthcare Life Sciences) transferiert. Vor dem Transfer wurde die Membran zunächst für mindestens 1 min in Methanol inkubiert und anschließend mit H₂O_{bid.} gewaschen. Bis zum Aufbau des Blots wurde die Membran in Anodenpuffer 2 äquilibriert. Der Aufbau ist unten schematisch dargestellt.

Kathode

3 Filterpapiere in Kathodenpuffer

SDS-Gel

äquilibrierte Membran

1 Filterpapier in Anodenpuffer 2

2 Filterpapiere in Anodenpuffer 1

Anode

Die Proteine wurden für 60 min und 75 mA/Gel auf die Membran transferiert. Anschließend wurden die Membranen für 30 min schüttelnd mit TBST-Puffer mit 6 % Magermilchpulver blockiert. Die Hybridisierung des ersten Antikörpers erfolgte über Nacht bei 4 °C oder mindestens 2 h bei Raumtemperatur auf einem Drehrad. Nach der Hybridisierung wurde die Membran dreimal für 10 min mit TBST-Puffer gewaschen. Die Hybridisierung mit dem zweiten Antikörpers erfolgte für 1 h bei Raumtemperatur auf einem Drehrad. Anschließend wurde die Membran dreimal für 10 min mit TBST-Puffer und einmal 5 min mit TBS-Puffer gewaschen. Die an den sekundären Antikörper gekoppelte Meerrettich-Peroxidase (HRP; horseradish peroxidase) ermöglichte die Visualisierung der Proteine. Dazu wurde das ECL-Kit (GE Healthcare Life Sciences) verwendet indem 1 ml Lösung A mit 25 µl Lösung B vermischt und für 2 min mit der Membran inkubiert wurden. Alternativ wurde das AceGlow Blot-System (PeproLab, Erlangen, Germany) verwendet, indem Lösung A und B 1:1 miteinander gemischt und mit der Membran inkubiert wurden. Das Chemilumineszenzsignal wurde anhand des ImageQuant LAS-4000 Imagers (GE Healthcare Life Sciences) detektiert und ausgewertet.

Die Färbung geblotteter Proteine erfolgte, indem die Membran für kurze Zeit in der Coomassiefärbelösung inkubiert wurde. Anschließend wurde diese mit der Entfärbelösung entfärbt und bei Raumtemperatur getrocknet.

Primäre Antikörper

- αGfp (Mischung der monoklonalen Antikörper 7.1 und 13.1, Maus IgG1_{1K}; Roche)
- αc-Myc (Anti-c-Myc, monoklonaler Antikörper, Klon 9E10, Maus IgG1_{1K}; Roche)
- αHA (Anti-HA, monoklonaler Antikörper, Klon 12CA5, Maus IgG2b_{2bK}; Roche)
- αTub1 (Anti-α-Tubulin, monoklonaler Antikörper, Klon DM 1A, Maus IgG1_{1K}; Sigma)

Sekundärer Antikörper

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

Die primären Antikörper wurden in einer Konzentration von 0,1 µg/ml (in TBST mit 3 % Magermilchpulver) eingesetzt, mit Ausnahme von αGfp, der in einer Konzentration von 0,4 µg/ml

(in TBST mit 3 % Magermilchpulver) eingesetzt wurde. Der sekundäre Antikörper wurde in einer Konzentration von 40 ng/ml (in TBST mit 3 % Magermilchpulver) eingesetzt.

<u>TBS</u>		<u>TBST</u>	
Tris-HCl, pH 7,6	20 mM	Tris-HCl, pH 7,6	20 mM
NaCl	136 mM	NaCl	136 mM
In H ₂ O _{bid.}		Tween 20	0,05 %
		In H ₂ O _{bid.}	

<u>Anodenpuffer 1</u>		<u>Anodenpuffer 2</u>		<u>Kathodenpuffer</u>	
Tris-HCl,	300 mM	Tris-HCl,	30 mM	Tris-HCl,	25 mM
pH 10,4		pH 10,4		pH 9,4	
MeOH	15 %	MeOH	15 %	ε-Aminocapronsäure	40 mM
In H ₂ O _{bid.}		In H ₂ O _{bid.}		MeOH	15 %
				In H ₂ O _{bid.}	

Coomassie Blau Färbung

Zur Visualisierung von Proteinen in einem SDS-Gel wurde Coomassie Blau verwendet. Dazu wurde das SDS-Gel 1 h bei Raumtemperatur zunächst schwenkend in Fixierungslösung gewaschen. Die Fixierung wurde anschließend durch Waschen des Gels in Waschlösung über Nacht bei Raumtemperatur fortgesetzt. Am nächsten Tag wurden die Gele mittels der Färbelösung für mindestens 2-3 h bei Raumtemperatur gefärbt. Nach der Färbung wurden die Gele in Entfärber bei Raumtemperatur solange entfärbt, bis außer den Proteinbanden keine Farbe mehr im Gel zu beobachten war. Dabei wurde der Entfärber regelmäßig ausgetauscht. Nach erfolgreicher Entfärbung wurden die Gele eingescannt.

<u>Fixierungslösung</u>		<u>Waschlösung</u>		<u>Färbelösung</u>		<u>Entfärber</u>	
Ethanol	50 %	Methanol	50 %	Methanol	10 %	Methanol	10 %
Acetat	10 %	Acetat	10 %	Acetat	50 %	Acetat	10 %
				Coomassie R-250	0,05 %		
In H ₂ O _{bid.}							

Silberfärbung

Zur Visualisierung von Proteinen in einem SDS-Gel kam die Silberfärbung zum Einsatz. Dabei wurde das SDS-Gel zunächst für eine Stunde in der Fixierlösung fixiert und anschließend 3-mal für 20 min mit 50 %igen Ethanol gewaschen. Danach wurde das Gel für 30 min in der Vorfärbelösung (40 mg/ml Na₂S₂O₃) inkubiert und erneut 3-mal für etwa 20 s in H₂O_{bid.} gewaschen. Die Silberfärbung erfolgte für etwa 30 min in der Silbernitratlösung. Anschließend wurde das Gel 3-mal für etwa 20 s in H₂O_{bid.} gewaschen und in die Entwicklerlösung gegeben.

Dort wurde es für etwa 5 min inkubiert bis die Proteinbanden zu sehen waren, das Gel jedoch selbst keine Hintergrundfärbung zeigte. Die Reaktion wurde dann mit der Stopplösung gestoppt. Bis zur Dokumentation konnte das gefärbte Gel im Lagerpuffer gelagert werden.

Fixierungslösung		Silbernitratlösung		Entwicklerlösung	
Methanol	50 %	Silbernitrat	2 mg/ml	Na ₂ CO ₃	3 g
Essigsäure (100 %)	12 %	Formaldehyd (37 %)	0,2 %	Formaldehyd (37 %)	0,2 %
Formaldehyd (37 %)	0,054 %			Na ₂ S ₂ O ₃ (40mg/ml)	0,3 %
ad 50 ml H ₂ O _{bid} .					

Stopplösung		Lagerpuffer	
Methanol	50 %	Glyzerin	10 %
Essigsäure (100 %)	12 %	Ethanol	5 %
ad 50 ml H ₂ O _{bid} .			

4.5.2 Individual nucleotide resolution in vivo UV-crosslinking and immunoprecipitation (iCLIP)

Eine Übersicht über die im iCLIP Experiment verwendeten Reagenzien und Materialien wurden in der Tabelle 4.7 und 4.8 zusammengefasst.

Tabelle 4.7: Im iCLIP verwendeten Materialien

Materialien	Hersteller
GFP-Trap (Proteinaufreinigung)	ChromoTek
Complete Proteaseinhibitor (EDTA-frei)	Roche
Turbo DNase	Invitrogen
SUPERase-IN (RNase-Inhibitor)	Thermo Fisher Scientific
T4 RNA Ligase	NEB
L3-App Linker	IDT
PEG 400	Sigma-Aldrich
T4 PNK	NEB
[γ- ³² P]ATP	Hartmann Analytic
4-12 % NuPAGE Bis-Tris Gele	Invitrogen
NuPAGE Ladepuffer	Invitrogen
MOPS Laufpuffer	Invitrogen
NuPAGE Antioxidant	Invitrogen
NuPAGE Transfer-Puffer	Invitrogen
Proteinmarker: Colour Plus Prestained Protein Broad Range Marker	NEB
Whatman Protran BA-85 Nitrozellulosemembran (Porengröße 0,45 µm)	GE Healthcare

Proteinase K	Roche
Phenol/Chloroform (pH 6,7)	Sigma Aldrich
GlycoBlue	Invitrogen
3 M Natriumacetat, pH 5,5	Invitrogen
dNTP Mix	NEB
SuperScript III	Invitrogen
TE Puffer	VWR
DNA-Marker: Low molecular weight DNA ladder	NEB
6 % TBE-Harnstoffgele	Invitrogen
TBE Harnstoffladepuffer	Invitrogen
SYBR Green II	Thermo Fisher Scientific
CircLigase II	Epicentre
HF BamHI	ThermoScientific
AccuPrime Supermix 1 Enzyme	Invitrogen
RNase-freie Reaktionsgefäße	Eppendorf
Reaktionsgefäße: Phase Lock Gel Heavy tube (2 ml)	VWR
Whatman Glassfaserfilter (d=1 cm)	GE Healthcare
CoStar SpinX Säulen	Corning

Tabelle 4.8: Verwendete Oligonukleotide

Bezeichnung	Sequenz (in 5'-3'Richtung)	Bemerkung	Replikat
L3-Oligo	App-AGATCGGAAGAGCGTTTCAG-ddC	5'Adenylierung 3'ddC	
RL1	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTCTTTCCCTACACGA CGCTCTCCGATCT	P5-Oligo	
RL2	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATCGGTCTCGGCATTCTGCT GAACCGCTCTCCGATCT	P3-Oligo	
RL3	G TTCAGGATCCACGACGCTCTTcaaaa	Cut-Oligo	
RL4	NNAACCN NNAGATCGGAAGAGCGTCGTGgatcCTGAACCGC	iCLIP RT-Oligo (oRT1)	Rrm4 Rep1
RL7	NNAGGTNNNAGATCGGAAGAGCGTCGTGgatcCTGAACCGC	iCLIP RT-Oligo (oRT4)	Rrm4 Rep2
RL5	NNACAANNNAGATCGGAAGAGCGTCGTGgatcCTGAACCGC	iCLIP RT-Oligo (oRT2)	Grp1B Rep1
RL8	NNCGCCNNNAGATCGGAAGAGCGTCGTGgatcCTGAACCGC	iCLIP RT-Oligo (oRT5)	Grp1B Rep2
RL6	NNATTGNNNAGATCGGAAGAGCGTCGTGgatcCTGAACCGC	iCLIP RT-Oligo (oRT3)	Gfp Rep1
RL9	NNCCGGNNNAGATCGGAAGAGCGTCGTGgatcCTGAACCGC	iCLIP RT-Oligo (oRT6)	Gfp Rep2

Anzucht und UV-Quervernetzung der *U. maydis* Hyphen

Die Zellen von *U. maydis* wurden, wie unter 4.2.2 beschrieben, angezogen und das hyphale Wachstum ausgelöst. Um eine höhere Ausbeute an Protein-RNA-Komplexen zu erhalten, wurde eine Hauptkultur von 150 ml CM-Glukose-Medium angeimpft. Die OD₆₀₀ von 0,5 wurde dabei nicht überschritten. Die Ernte der Hyphen erfolgte 6 h nach der Induktion des hyphalen Wachstums. Alle Schritte ab der Zellernte erfolgten auf Eis oder bei 4 °C. Die Kultur wurde auf drei 50 ml Reaktionsgefäße à 50 ml Kultur aufgeteilt. Die Hyphen wurden bei 7.500 rpm für 10 min und 4 °C zentrifugiert, der Überstand wurde verworfen und das Pellet vorsichtig in 5 ml 1x PBS-Puffer (4.5.1) resuspendiert. Diese Zellsuspension wurde im Anschluss daran in 10x10 cm große Petrischalen (insgesamt 3 pro Kultur) überführt. Dabei wurde darauf geachtet, dass die Kultur sich gleichmäßig über die gesamte Schale verteilte. Die drei Petrischalen wurden, zusammen mit dem Eisbad, in einen Bio-Link UV-Quervernetzer (Vilber-Lourmat) gestellt und die Hyphen bei einer Wellenlänge von 245 nm mit 200 mJ/cm² bestrahlt. Nach der UV-Behandlung wurden die Hyphen einer Kultur in einem Reaktionsgefäß vereint und bei 7.500 rpm für 10 min bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 6 ml Lysispuffer (4.5.1), versetzt mit Proteaseinhibitoren und 15 µl SUPERase-IN, resuspendiert. Dabei wurde darauf geachtet, das Aufschäumen des Lysepuffers zu minimieren, um die Oxidation von DTT zu verhindern. Anschließend wurde das Zelllysate auf drei vorgekühlte Mahlbecher verteilt und schockgefroren. Die Zellen wurden entweder direkt aufgeschlossen oder über Nacht bei -80 °C gelagert.

Proteaseinhibitoren für 10 ml Lysispuffer

Complete Proteinaseinhibitoren EDTA frei	2×
DTT	1 mM
PMSF	1 mM
Pepstatin A	5,25 ng/µl
Heparin	0,75 µg/µl

Zellyse

Die gefrorenen Zellen wurden in einer Schwingmühle (MM400; Retsch) aufgeschlossen. Die Proben wurden, mit jeweils zwei Mahlkugeln (d=12 mm) 3-mal für 10 min bei 30 Hz aufgeschlossen. Nach jedem Durchgang wurden die Proben mit flüssigem Stickstoff gekühlt. Die Zelllysate wurden zunächst in einem 15 mL Reaktionsgefäß vereint und anschließend auf 1,5 ml Reaktionsgefäße verteilt und bei 7.500 rpm für 10 min und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde mittels GFP-Trap aufgereinigt, während das Pellet verworfen wurde.

Aufreinigung der Gfp-Fusionsprotein mittels GFP-Trap

Für die Aufreinigung der Gfp-Fusionsproteine wurden die 60 µl GFP-Trap magnetische Agarosekügelchen verwendet (Chromotek; GFPTrap_MA; (Rothbauer et al., 2008)). Zur Vorbereitung auf die Proteinaufreinigung wurden die Agarosekügelchen mit 500 µl eiskaltem Lysispuffer (ohne Inhibitoren) 3-mal in 2 ml Reaktionsgefäßen gewaschen. Die Agarosekügelchen wurden auf drei 2 ml Reaktionsgefäße aufgeteilt. Anschließend wurden zu jedem Reaktionsgefäß 2 ml des Zelllysats hinzugegeben und für 1 h bei 4 °C auf einem Drehrad drehend inkubiert. Darauffolgend wurde der Überstand verworfen und die Agarosekügelchen für die Waschschrte vereint. Gewaschen wurde 3-mal mit 900 µl Salz-Waschpuffer und 4-mal mit 900 µl PNK-Waschpuffer. Für die enzymatische Reaktion wurden die Proben gedrittelt und für die Waschschrte erneut vereint.

<u>Salz-Waschpuffer</u>		<u>PNK Waschpuffer</u>	
Tris-HCl, pH 7,4	50 mM	Tris-HCl, pH 7,4	20 mM
NaCl	1 M	MgCl ₂	10 mM
EDTA	1 mM	Tween-20	0,2 %
Nonidet P-40	1 %		
SDS	0,1 %		
Natrium-deoxycholat	0,5 %		

Dephosphorylierung und Ligation des Linkers

Für die Dephosphorylierung des 3' Endes der mRNA wurden die Agarosekügelchen in 20 µl des Dephosphorylierungsansatzes gelöst und für 20 min bei 37 °C in einem Thermomixer (Eppendorf) bei 1200 rpm schüttelnd inkubiert. Nach der Dephosphorylierung wurden die Agarosekügelchen 1-mal mit 900 µl PNK Waschpuffer, 2-mal mit 900 µl Salz-Waschpuffer und 2-mal erneuts mit 900 µl PNK Waschpuffer gewaschen und in 20 µl Ligationsmix aufgenommen. Die Ligation des Linkers an das 3' Ende der mRNA erfolgte über Nacht bei 16 °C in einem Thermomixer schüttelnd bei 1200 rpm. Nach der Ligation wurde zuerst der Überstand des Ligationsmixes entfernt und anschließend die Agarosekügelchen gewaschen. Dazu wurde 1-mal 500 µl PNK-Waschpuffer, 2-mal 900 µl Salz-Waschpuffer und 3-mal in 900µl PNK-Waschpuffer verwendet. Die Proben wurden dabei bis zur radioaktiven Markierung in der letzten Waschlösung auf Eis gelagert.

Dephosphorylierung des 3' Endes der mRNA

H ₂ O	15 µl
5× PNK-Puffer, pH 6,5	4 µl
T4 PNK	0,5 µl
SUPERase-IN	0,5 µl

Linker Ligation

H ₂ O	8 µl
4× Ligationspuffer	5 µl
SUPERase-IN	0,5 µl
L3-App linker [20 µM]	1,5 µl
PEG 400	4 µl

Radioaktive Markierung des 5' Endes der mRNA, SDS-Gelelektrophorese und Membrantransfer

Für die radioaktive 5' Endmarkierung wurden 50 % der Proben verwendet. Dazu wurde der Überstand abgenommen und die Agarosekügelchen in 10 µl des Phosphorylierungsansatzes gelöst. Die Markierung erfolgte für 10 min bei 37 °C in einem Thermomixer schüttelnd bei 1200 rpm. Bevor die markierten Proben mit den unmarkierten vereint wurden, wurde der radioaktive Überstand abgenommen und die Agarosekügelchen in 900 µl PNK-Waschpuffer gewaschen. Anschließend wurden die Agarosekügelchen in 80 µl 1× NuPAGE LDS-Puffer, mit 0,1 M DTT gelöst, bei 70 °C für 5 min denaturiert und der Überstand von den Agarosekügelchen getrennt. Im nächsten Schritt wurde der Überstand auf zwei Geltaschen eines 4-12 % NuPAGE Bis-Tris Gels aufgetragen und die Elektrophorese bei 180 V für 70 min, im MOPS Laufpuffer mit 500 µl NuPAGE durchgeführt.

Der Protein-RNA Komplex wurde in dem darauffolgenden Schritt auf eine Nitrocellulosemembran (Protran BA-85; Whatman) transferiert. Verwendet wurde ein 1-facher Transferpuffer (Life Technologies), welchem 0,01 % SDS sowie 10 % Methanol hinzugegeben wurden. Der Membrantransfer (30 V) fand für eine Stunde statt. Im Anschluss wurde die Membran 5 min in 1× PBS-Waschpuffer gewaschen, in Frischhaltefolie verpackt und in eine Röntgenfilmkassette geklebt. Röntgenfilme wurden für 2 h oder über Nacht bei -80 °C belichtet.

<u>Radioaktive 5' Endmarkierung</u>		<u>Linker Ligation</u>	
H ₂ O	7,6 µl	H ₂ O	8 µl
5× PNK-Puffer	1 µl	4× Ligationspuffer	5 µl
T4 PNK	0,4 µl	SUPERase-IN	0,5 µl
SUPERase-IN	0,5 µl	L3-App linker [20 µM]	1,5 µl
³² P-γ-ATP	0,5 µl	PEG 400	4 µl

Isolierung der RNA

Der belichtete Röntgenfilm wurde entwickelt, eingescannt, und anschließend als Schablone präpariert. Dazu wurden mit einem Skalpell die entsprechenden Areale auf dem Röntgenfilm ausgeschnitten. Anhand des Röntgenfilms wurden daraufhin die entsprechenden Membranareale ausgeschnitten und in ein sauberes 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Aufgereinigte RNA wurde mittels Proteinase K-Behandlung isoliert. Dazu wurden die Membranausschnitte in 200 µl PK Puffer und 10 µl Proteinase K getränkt und die Probe für 20 min bei 37 °C in einem Thermomixer bei 1200 rpm schüttelnd inkubiert. Anschließend wurden dem Reaktionsansatz 20 µl PK Puffer (versetzt mit 7 M Urea) zugegeben und für weitere 20 min inkubiert. Das radioaktive Signal der Membran wurde sowohl vor als auch nach der Inkubation mit Proteinase K kontrolliert.

Als nächstes wurde der Überstand in ein sauberes 1,5 ml Reaktionsgefäß transferiert. Die Probe wurde mit 400 µl RNA Phenol/Chloroform (pH 6,7) gemischt und in ein PhaseLock Gel Heavy (2 ml) Reaktionsgefäß (5Prime) transferiert. Die Lösung wurde anschließend für 5 min bei 30 °C und

1100 rpm schüttelnd inkubiert. Die Phasentrennung erfolgte durch Zentrifugation bei 13 000 rpm (~ 16 000 g; Heraeus Pico Fuge) für 5 min. Die wässrige Lösung wurde in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß transferiert, erneut zentrifugiert und in eine neues Gefäß überführt. Die Präzipitation der RNA erfolgte durch die Zugabe von 0,75 µl Glycoblau und 40 µl 3M NaAcetat, pH 5,5 sowie 1 ml vorgekühltem 100 % Ethanol bei -20 °C über Nacht.

<u>PK-Puffer</u>		<u>PK-Puffer/Urea</u>	
Tris-HCl, pH 7,4	100 mM	Tris-HCl, pH 7,4	100 mM
NaCl	50 mM	NaCl	50 mM
EDTA	10 mM	EDTA	10 mM
		Urea	7 M

Reverse Transkription

Die RNA wurde durch Zentrifugation bei 15 000 rpm und 4 °C für 15 min präzipitiert. Anschließend wurde das RNA-Pellet mit 900 µl 80 % EtOH gewaschen, in 5 µl H₂O resuspendiert und in ein PCR-Gefäß transferiert. Der Probe wurden 1 µl Oligonukleotid (0,5 pmol/µl) und 1 µl dNTP Mix (10 mM) hinzugegeben. Die Probe wurde anschließend im PCR-Cycler für 5 min bei 70 °C inkubiert und dann auf 25 °C abgekühlt. Durch die Zugabe von 13 µl des reversen Transkriptionsmixes (RT-Mix) wurde die Reaktion mit dem unten aufgeführten Programm gestartet.

<u>RT-Mix</u>		<u>RT-Programm</u>	
H ₂ O _{bid.}	7 µl	25 °C	5 min
5× RT Puffer	4 µl	42 °C	20 min
0,1 M DTT	1 µl	50 °C	40 min
SUPERase-IN	0,5 µl	80 °C	5 min
Superscript III	0,5 µl	4 °C	bis zu weiteren Prozessierung der Probe

Die anschließende Zugabe von 1,65 µl einer 1 M NaOH Lösung und die Inkubation bei 98 °C für 20 min sollte zur alkalischen Lyse der RNA führen und das radioaktive Signal für die nachfolgenden Schritte reduzieren. Mit 20 µl einer 1 M Hepes-NaOH Lösung wurde der Reaktionsansatz neutralisiert. Dem cDNA-Ansatz wurden 350 µl TE-Puffer hinzugegeben und die cDNA mit 0,75 µl Glycoblau, 40 µl 3M NaAcetat, pH 5,5 sowie 1 ml vorgekühltem 100 % Ethanol bei -20 °C über Nacht präzipitiert.

Aufreinigung der cDNA

Die cDNA wurde wie oben beschrieben pelletiert, mit 80 % Ethanol gewaschen und anschließend in 6 µl H₂O_{bid.} resuspendiert. 6 µl 2x TBE-Harnstoff Ladepuffer wurden den Proben hinzu gegeben

und für 5 min bei 80 °C denaturiert. Anschließend wurden die Proben auf ein 6 % TBE-Harnstoffgel aufgetragen. Als Marker wurden 6 µl des *Low Molecular Weight Markers* (1/30 verdünnt; NEB) verwendet. Die Elektrophorese erfolgte bei 180 V für 40 min. Die Spur mit dem Marker wurde ausgeschnitten und in 20 ml TBE mit 2 µl SYBR Green II Stammlösung 10 min lang schüttelnd gefärbt. Nach der Visualisierung der gefärbten Markerbanden diente diese als Referenz, um aus dem Gel die entsprechenden Areale herauszuschneiden, welche ~30-150 nt große cDNA-Moleküle (Abzüglich der Oligonukleotide) enthielten (Abb. 4.1).

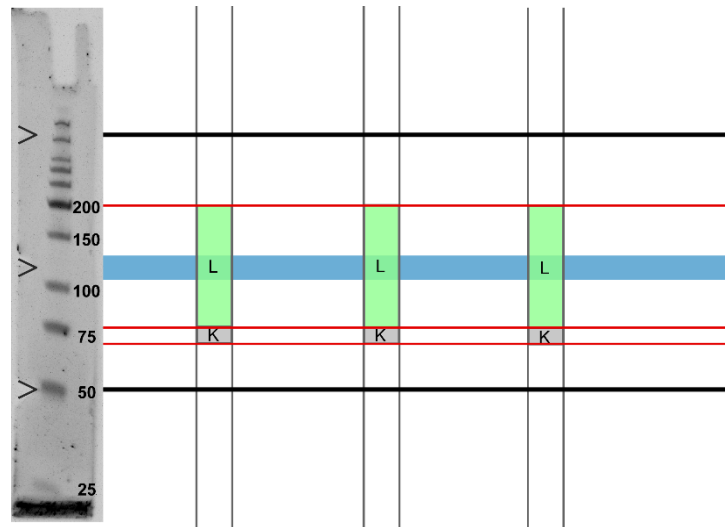


Abbildung 4.1 Beispiel für eine Schablone zur Elution der cDNA Die Aufteilung der Schablone orientiert sich an der gefärbten Markerbande, der Plastikassette des Gels (schwarze Linien markieren den Plastikstreifen in der Kassette) sowie an der Lauffront von Xylencyanol (hellbauer Streifen; läuft bei 100-130 nt). Einschnitte im Gel der Markerbande (>), auf der Höhe der Plastikstreifen und der hellblauen Lauffront, erleichtern die Erstellung der Schablone. Der L3-Linker und das RT-Oligonukleotid ergeben zusammen eine Länge von 52 nt. Für die Generierung der cDNA-Banken wurde die grünen Gelareale herausgeschnitten. Diese sollten 30-150 nt lange cDNAs enthalten. Areale die mit einem K markiert wurden (graues Feld) enthalten zu kurze cDNAs (~20 nt) die für die iCLIP Analyse ungeeignet sind.

Für die Elution der cDNA, wurde zuvor in den Boden eines 500 µl Reaktionsgefäßes mit einer heißen Kanüle Löcher gestochen. Die herausgeschnittenen Gelstücke wurden dann in das 500 µl Gefäß transferiert und diese in einem weiteren 1,5 ml Reaktionsgefäß platziert. Durch die Zentrifugationskraft wurden die Gelstücke durch die Löcher gedrückt und dabei zerkleinert. Zu den zerkleinerten Gelstücken wurden 400 µl Diffusionspuffer hinzugegeben und für 30 min bei 50 °C im Thermomixer schüttelnd inkubiert. Der flüssige Überstand wurde in ein Costar SpinX Gefäß (Corning Incorporated, 8161), in die zuvor zwei 1 cm Glaswollefilter (Whatman 1823010) hineingestopft wurde, überführt und bei 13.000 rpm für 1 min zentrifugiert. Um die Gelreste zu entfernen, wurde der Ansatz mit 400 µl Phenol/Chloroform (pH 8) vermischt und in ein 2 ml Phase Lock Gel Heavy Gefäß transferiert. Anschließend wurden die Proben 5 min bei 30 °C und 1.100 rpm im Thermomixer inkubiert. Die Phasentrennung erfolgte für 5 min bei 13.000 rpm bei

Zimmertemperatur. Daraufhin wurde die flüssige Phase in ein neues Gefäß übertragen und, wie zuvor beschrieben, über Nacht gefällt.

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

Die cDNA wurde wie bereits beschrieben pelletiert, gewaschen und in 8 µl Ligationsansatz resuspendiert. Die Reaktion wurde bei 60 °C für eine Stunde durchgeführt.

Selbstzirkularisierungsansatz

H ₂ O _{bid.}	6,5 µl
10× CircLigase Puffer II	0,8 µl
50 mM MnCl ₂	0,4 µl
CircLigase II	0,3 µl

Anschließend wurden 30 µl des Hybridisierungsansatzes hinzugegeben und die Reaktion gestartet.

Hybridisierungsansatz

H ₂ O _{bid.}	25 µl
FastDigest Buffer	4 µl
10 µM Cut-Oligo	1 µl

Hybridisierungsprogramm

95 °C	2 min
95-25 °C	Reduktion der Temperatur nit jedem Zyklus um 1 °C
25 °C	bis zur weiteren Prozessierung der Proben

Durch Zugabe von 2 µl *Bam*HI-HF wurde die zirkularisierte cDNA wieder linearisiert, indem der Reaktionsansatz für 30 min bei 37 °C inkubiert wurde. Das Restriktionsenzym wurde für 5 min bei 80 °C deaktiviert. Die cDNAs wurden wie zuvor beschrieben präzipitiert.

Herstellung von cDNA-Banken (PCR-Amplifikation)

Die cDNA wurde wie bereits beschrieben pelletiert, gewaschen und in 21 µl H₂O_{bid.} resuspendiert. Um die korrekte Anzahl an PCR-Zyklen zu bestimmen, wurde zunächst eine Test-PCR-Amplifikation mit 1 µl der cDNA und unterschiedlichen Amplifikationsrunden (18 -24 Zyklen) durchgeführt. Für die cDNA von Rrm4 wurde im ersten Replikat mit 18 und im zweiten mit 22 Zyklen amplifiziert. Grp1B und Gfrp wurden mit 18 Zyklen in beiden Replikaten vervielfältigt.

	<u>Test-PCR</u>	<u>Präparative-PCR</u>
H ₂ O _{bid.}	25 µl	9 µl
AccuPrime Supermix 1	5 µl	20 µl
P5/P3 Solexa Oligo-Mix (von jedem 10 µM)	0,25 µl	1 µl
cDNA	1 µl	10 µl

<u>PCR-Programm</u>		
<u>Temperatur</u>	<u>Zeit</u>	<u>Zyklen</u>
94 °C	2 min	1
94 °C	15 s	
65 °C	30 s	20 / 25
68 °C	30 s	
68 °C	3 min	1
25 °C	für immer	für immer

Um die amplifizierte cDNA zu visualisieren, wurden 8 µl des PCR-Ansatzes mit 2 µl 5× TBE Ladepuffer versetzt und auf ein 6 %iges TBE-Gel (Life Technologies) aufgetragen. Als Marker wurden 2 µl des 50 bp Standards (Fermentas) verwendet. Die Elektrophorese wurde bei 180 V für 25 min durchgeführt. Das Gel wurde anschließend mit SYBR Green I gefärbt (siehe SYBR Green II-Färbung: cDNA-Aufreinigung).

4.6. Bioinformatische Analyse

4.6.1 Bioinformatische Analyse der iCLIP-Daten Prozessierung der iCLIP Banken

Nach der Hochdurchsatzsequenzierung wurden die iCLIP-Banken einer allgemeinen Qualitätskontrolle (FastQC; <https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>) unterzogen. Anschließend wurden die zuvor vereinten Sequenzen mit Hilfe des experimentellen Barkodes wieder getrennt (Flexbar; version 2.4, GitHub, San Francisco, CA, USA; (Dodt et al., 2012)). Nachdem die Sequenzen den entsprechenden Experimenten zugeordnet worden sind, wurde die Adaptersequenz entfernt, die Information jedoch in der *fastq* Datei gespeichert. Die verbleibende Ziel-Sequenz musste eine Mindestlänge von 15 Nukleotiden aufweisen, um diese eindeutig im Genom kartieren zu können. Damit sollte verhindert werden, dass kürzere Fragmente mehr als nur einmal einer genomischen Region zugeordnet werden. Für die initiale Kartierung gegen das *Ustilago maydis* Genom (PEDANT, Genomname: p3_t237631_Ust_-maydi_v2GB; ftp://ftpmips.gsf.de/fungi/Ustilaginaceae/Ustilago_maydis_521/) wurden zwei Fehlpaarungen erlaubt (STAR; version 2.5.1b, GitHub; (Dobin et al., 2013)). Nach der Kartierung der Sequenzen wurden PCR-Duplikate (technische Duplikate), Sequenzen die an dieselbe genomische Region binden und einen identischen *random* Barcode aufweisen, von der weiteren Analyse ausgeschlossen (*dedup* Funktion von *bamUtil*; version 1.0.7;

<https://github.com/statgen/bamUtil>). Nach der Kartierung der Sequenzen und der Eliminierung der PCR-Duplikate wurden die verbleibenden Sequenzen für die Ermittlung der Quervernetzungsereignisse (QE) verwendet. Diese ermöglichen im weiteren Verlauf der Analyse die Identifizierung der Bindestellen (BS). Dazu wurde, ausgehend von der kartierten Sequenz, das erste stromaufwärts gelegene Nukleotid ermittelt. Dieses Nukleotid und die Anzahl der dazugehörigen Sequenzen, abzüglich der technischen Duplikaten, wurden als QE bezeichnet.

Reproduzierbarkeit der iCLIP Replikate

Um die Reproduzierbarkeit zu überprüfen, wurde die Anzahl aller QE innerhalb eines Gens bestimmt und diese zwischen den jeweiligen Replikaten verglichen.

Identifizierung der Proteinbindestellen (*peak calling*)

Die Anreicherung mehrerer QE (auch Peaks genannt) innerhalb einer definierten Region, könnte auf eine Bindestelle hindeuten. Um die Peaks zu identifizieren wurde das ASpeak Programm verwendet (Kucukural et al., 2013). Um das Aufkommen von falschpositiven Peaks (Ansammlung von QE) zu minimieren, wurden die Kriterien stringenter definiert. Innerhalb der vorhergesagten Peaks wurde die Position mit den meisten QE ermittelt und der Peak auf 4 Nukleotide stromaufwärts und 4 Nukleotide stromabwärts begrenzt, so dass ein Fenster von 9 Nukleotiden festgelegt wurde. Überlappten zwei Peaks, so wurden diese vereint, indem ein neues Maximum der QE ermittelt wurde und das Nukleotidfenster erneut um das Maximum herum auf 9 Nukleotide begrenzt wurde. Weiterhin wurden nur die Peaks weiter prozessiert, die mindestens 5 QE aus beiden biologischen Replikaten aufwiesen. Bindestellen, die mit den Gfp-Bindestellen überlappten, wurden von der weiteren Analyse ausgeschlossen, da es sich hierbei wahrscheinlich um unspezifische Bindungen handelt.

Um die Bindestellen präziser eingrenzen zu können und diese zwischen den beiden RBPs besser miteinander vergleichen zu können, wurden die QE innerhalb und außerhalb eines Peaks für jedes Gen ermittelt und als „*signal-over-background*“ (SOB) angegeben. Der SOB-Wert ist der Quotient aus der Anzahl der QE innerhalb und außerhalb einer Bindestelle, normalisiert auf die Länge des Transkriptes. Je höher der SOB-Wert einer Bindestelle ist, desto stärker wird die RNA an dieser Stelle gebunden. Nur die 25 % (SOB 0,75) der stärksten Bindestellen wurden für die weitere Analyse verwendet.

Identifizierung der Lage der Bindestellen entlang der Ziel-Transkripte

Bei der Ermittlung der Bindestellen der entsprechenden mRNA Regionen, wurde folgende Hierarchie eingehalten: 3'UTR > 5'UTR > Exon > Intron

Da im *U. maydis* Genom die 3' und 5'UTRs nicht annotiert sind, wurden die Transkriptenden, 300 nt stromaufwärts bzw. stromabwärts vom Gen, manuell annotiert.

Identifizierung des Bindemotivs

Um mögliche Bindemotive zu identifizieren wurde eine DREME (*discriminative regular expression motif elicitation*) Analyse durchgeführt (Bailey, 2011). DREME erlaubt die Identifizierung von kurzen, konservierten Motiven, die innerhalb der zu untersuchenden Sequenzen angereichert vorliegen. Die Analyse wurde in einem 30 Nukleotid-Fenster um die Bindestelle herum, unabhängig von dessen Lage, durchgeführt.

FunCat Analysen

Die Ziel-Transkripte von Rrm4 und Grp1B wurden mittels FunCat (*functional catalogue*) in funktionelle Kategorien eingeteilt (<http://mips.gsf.de/funcatDB/>; version 2.1, reference genome: p3_t237631_Ust_maydi_v2GB) (Ruepp et al., 2004).

4.6.2 Verwendete Programme

Computerprogramme

Clonemanager 9 (Scientific and Educational Software; Cary, NC, USA)

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

bowtie (Version 0.12.7; <http://bowtie-bio.sourceforge.net/index.shtml>; Langmead et al., 2009)

Die Kartierung von Sequenzen innerhalb des Genoms erfolgte anhand dieses Programms.

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

Für die Erstellung und Bearbeitung der Abbildungen wurden die Programme Canvas 12 verwendet.

Prism5 (Version 5.04; GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA)

Die statistischen Auswertungen wurden mit dem Programm GraphPad Prism 5 durchgeführt.

Alle anderen verwendeten Programme sind unter den jeweiligen Methoden aufgeführt.

5. Publikation

Nachfolgend wird auf den wissenschaftlichen Eigenanteil an der Publikation verwiesen, die im Rahmen dieser Arbeit entstand.

The key protein of endosomal mRNA transport Rrm4 binds translational landmark sites of cargo mRNAs

Lilli Olgeiser, Carl Haag, Susan Boerner, Jernej Ule, Anke Busch, Janine Koepke, Julian König, Michael Feldbrügge, and Kathi Zarnack (2019) *EMBO Rep* 20.

Beitrag: Erstautorin

Planung und Durchführung von folgenden Experimenten erfolgte durch mich:

- Die Herstellung der Stämme *AB33rrm4tagRfp/grp1Gfp*, *AB33pab1mCherry/grp1Gfp*, *AB33rrm4Gfp/grp1Δ*, *AB33rrm4mR123tagRfp/grp1Gfp*, *AB33rrm4mR123tagRrf/pab1Gfp*
- Wachstumskurven und Stresstests (Abbildungen: EV1E, H und I)
- Sequenzvergleich der Gluzin-reichen RNA-bindenden Proteinen (Abbildungen: 1A und EV1B)
- Fluoreszenzmikroskopischen Analysen sowie die dazugehörigen Quantifizierungen der Zell- und Septenlängen (Abbildungen: 1B-F; EV1A, F, G und J; Abbildung: 2)
- Planung, Optimierung und Durchführung von iCLIP Experimenten (Abbildungen: 3A und EV2). Die Präparation der iCLIP-Banken für die Sequenzierung erfolgte von R.F.X. Sutandy. Die bioinformatische Analyse erfolgte von A. Busch, S Boerner und Kathi Zarnack. Die Functat Analysen erfolgten in Kooperation mit C. Haag.
- Manuelle Annotation der Transkripten für über 234 mRNAs (Abbildung: 4C)
- Erstellen der Graphiken (außer Abbildungen: 5 D-F; EV1 C und D; EV4 D; EV5 C und E) und Einbringen von Ideen für das Manuskript.

6. Literaturverzeichnis

- Afroz, T., Cienikova, Z., Clery, A., and Allain, F. H. T. (2015). One, Two, Three, Four! How Multiple RRM's Read the Genome Sequence. *Methods Enzymol* **558**, 235-278.
- Aktas, T., Avsar Ilik, I., Maticzka, D., Bhardwaj, V., Pessoa Rodrigues, C., Mittler, G., Manke, T., Backofen, R., and Akhtar, A. (2017). DHX9 suppresses RNA processing defects originating from the Alu invasion of the human genome. *Nature* **544**, 115-119.
- Al-Astal, H. I., Massad, M., AlMatar, M., and Ekal, H. (2016). Cellular Functions of RNA-Binding Motif Protein 3 (RBM3): Clues in Hypothermia, Cancer Biology and Apoptosis. *Protein Pept Lett* **23**, 828-35.
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., and Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* **215**, 403-10.
- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schaffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., and Lipman, D. J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* **25**, 3389-402.
- Ascano, M., Hafner, M., Cekan, P., Gerstberger, S., and Tuschl, T. (2012). Identification of RNA-protein interaction networks using PAR-CLIP. *Wiley Interdiscip Rev RNA* **3**, 159-77.
- Aschenbroich, J., Hussnaetter, K. P., Stoffels, P., Langner, T., Zander, S., Sandrock, B., Bolker, M., Feldbrugge, M., and Schipper, K. (2018). The germinal centre kinase Don3 is crucial for unconventional secretion of chitinase Cts1 in *Ustilago maydis*. *Biochim Biophys Acta Proteins Proteom.*
- Ausubel, F. M., Brenz, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A., and Struhl, K. (1987). Current Protocols in Molecular Biology. *John Wiley & Sons, Inc., USA*.
- Bae, W., Xia, B., Inouye, M., and Severinov, K. (2000). Escherichia coli CspA-family RNA chaperones are transcription antiterminators. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 7784-9.
- Bailey, T. L. (2011). DREME: motif discovery in transcription factor ChIP-seq data. *Bioinformatics* **27**, 1653-9.
- Baltz, A. G., Munschauer, M., Schwanhäusser, B., Vasile, A., Murakawa, Y., Schueler, M., Youngs, N., Penfold-Brown, D., Drew, K., Milek, M., Wyler, E., Bonneau, R., Selbach, M., Dieterich, C., and Landthaler, M. (2012). The mRNA-bound proteome and its global occupancy profile on protein-coding transcripts. *Mol Cell* **46**, 674-90.
- Banuett, F., and Herskowitz, I. (1989). Different alleles of *Ustilago maydis* are necessary for maintenance of filamentous growth but not for meiosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**, 5878-82.
- Banuett, F., and Herskowitz, I. (1996). Discrete developmental stages during teliospore formation in the corn smut fungus, *Ustilago maydis*. *Development* **122**, 2965-2976.
- Barreau, C., Paillard, L., and Osborne, H. B. (2005). AU-rich elements and associated factors: are there unifying principles? *Nucleic Acids Res* **33**, 7138-50.
- Baudrimont, A., Voegeli, S., Vilorio, E. C., Stritt, F., Lenon, M., Wada, T., Jaquet, V., and Becskei, A. (2017). Multiplexed gene control reveals rapid mRNA turnover. *Sci Adv* **3**, e1700006.
- Baumann, S., König, J., Koepke, J., and Feldbrugge, M. (2014). Endosomal transport of septin mRNA and protein indicates local translation on endosomes and is required for correct septin filamentation. *EMBO Rep* **15**, 94-102.
- Baumann, S., Pohlmann, T., Jungbluth, M., Brachmann, A., and Feldbrugge, M. (2012). Kinesin-3 and dynein mediate microtubule-dependent co-transport of mRNPs and endosomes. *J Cell Sci* **125**, 2740-52.
- Becht, P., König, J., and Feldbrugge, M. (2006). The RNA-binding protein Rrm4 is essential for polarity in *Ustilago maydis* and shuttles along microtubules. *J Cell Sci* **119**, 4964-73.

- Becht, P., Vollmeister, E., and Feldbrugge, M. (2005). Role for RNA-binding proteins implicated in pathogenic development of *Ustilago maydis*. *Eukaryot Cell* **4**, 121-33.
- Beckmann, B. M., Horos, R., Fischer, B., Castello, A., Eichelbaum, K., Alleaume, A. M., Schwarzl, T., Curk, T., Foehr, S., Huber, W., Krijgsveld, J., and Hentze, M. W. (2015). The RNA-binding proteomes from yeast to man harbour conserved enigmRBPs. *Nat Commun* **6**, 10127.
- Bianco, A., Dienstbier, M., Salter, H. K., Gatto, G., and Bullock, S. L. (2010). Bicaudal-D regulates fragile X mental retardation protein levels, motility, and function during neuronal morphogenesis. *Curr Biol* **20**, 1487-92.
- Bielska, E., Schuster, M., Roger, Y., Berepiki, A., Soanes, D. M., Talbot, N. J., and Steinberg, G. (2014). Hook is an adapter that coordinates kinesin-3 and dynein cargo attachment on early endosomes. *J Cell Biol* **204**, 989-1007.
- Bölker, M. (2001). *Ustilago maydis*--a valuable model system for the study of fungal dimorphism and virulence. *Microbiology* **147**, 1395-401.
- Bölker, M., Urban, M., and Kahmann, R. (1992). The a mating type locus of *U. maydis* specifies cell signaling components. *Cell* **68**, 441-50.
- Brachmann, A., König, J., Julius, C., and Feldbrügge, M. (2004). A reverse genetic approach for generating gene replacement mutants in *Ustilago maydis*. *Mol Genet Genomics* **272**, 216-26.
- Brachmann, A., Weinzierl, G., Kamper, J., and Kahmann, R. (2001). Identification of genes in the bW/bE regulatory cascade in *Ustilago maydis*. *Mol Microbiol* **42**, 1047-63.
- Brefort, T., Doehlemann, G., Mendoza-Mendoza, A., Reissmann, S., Djamei, A., and Kahmann, R. (2009). *Ustilago maydis* as a Pathogen. *Annu Rev Phytopathol* **47**, 423-45.
- Bullock, S. L. (2007). Translocation of mRNAs by molecular motors: think complex? *Semin Cell Dev Biol* **18**, 194-201.
- Bullock, S. L. (2011). Messengers, motors and mysteries: sorting of eukaryotic mRNAs by cytoskeletal transport. *Biochem Soc Trans* **39**, 1161-5.
- Calabretta, S., and Richard, S. (2015). Emerging Roles of Disordered Sequences in RNA-Binding Proteins. *Trends Biochem Sci* **40**, 662-672.
- Candido Ede, S., Pinto, M. F., Pelegrini, P. B., Lima, T. B., Silva, O. N., Pogue, R., Grossi-de-Sa, M. F., and Franco, O. L. (2011). Plant storage proteins with antimicrobial activity: novel insights into plant defense mechanisms. *FASEB J* **25**, 3290-305.
- Carbo, N., and Perez-Martin, J. (2010). Activation of the cell wall integrity pathway promotes escape from G2 in the fungus *Ustilago maydis*. *PLoS Genet* **6**, e1001009.
- Cassab, G. I. (1998). Plant Cell Wall Proteins. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **49**, 281-309.
- Castello, A., Fischer, B., Eichelbaum, K., Horos, R., Beckmann, B. M., Strein, C., Davey, N. E., Humphreys, D. T., Preiss, T., Steinmetz, L. M., Krijgsveld, J., and Hentze, M. W. (2012). Insights into RNA biology from an atlas of mammalian mRNA-binding proteins. *Cell* **149**, 1393-406.
- Castello, A., Fischer, B., Frese, C. K., Horos, R., Alleaume, A. M., Foehr, S., Curk, T., Krijgsveld, J., and Hentze, M. W. (2016). Comprehensive Identification of RNA-Binding Domains in Human Cells. *Mol Cell* **63**, 696-710.
- Castillo-Lluva, S., Garcia-Muse, T., and Perez-Martin, J. (2004). A member of the Fizzy-related family of APC activators is regulated by cAMP and is required at different stages of plant infection by *Ustilago maydis*. *J Cell Sci* **117**, 4143-56.
- Chartrand, P., Singer, R. H., and Long, R. M. (2001). RNP localization and transport in yeast. *Annu Rev Cell Dev Biol* **17**, 297-310.
- Chekulaeva, M., Hentze, M. W., and Ephrussi, A. (2006). Bruno acts as a dual repressor of oskar translation, promoting mRNA oligomerization and formation of silencing particles. *Cell* **124**, 521-33.

- Cioni, J. M., Lin, J. Q., Holtermann, A. V., Koppers, M., Jakobs, M. A. H., Azizi, A., Turner-Bridger, B., Shigeoka, T., Franze, K., Harris, W. A., and Holt, C. E. (2019). Late Endosomes Act as mRNA Translation Platforms and Sustain Mitochondria in Axons. *Cell* **176**, 56-72 e15.
- Ciuzan, O., Hancock, J., Pamfil, D., Wilson, I., and Lodomery, M. (2015). The evolutionarily conserved multifunctional glycine-rich RNA-binding proteins play key roles in development and stress adaptation. *Physiol Plant* **153**, 1-11.
- Cody, N. A., Iampietro, C., and Lecuyer, E. (2013). The many functions of mRNA localization during normal development and disease: from pillar to post. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol* **2**, 781-96.
- Cohen, S. N., Chang, A. C., and Hsu, L. (1972). Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **69**, 2110-4.
- Cook, K. B., Hughes, T. R., and Morris, Q. D. (2015). High-throughput characterization of protein-RNA interactions. *Brief Funct Genomics* **14**, 74-89.
- Coppin, L., Leclerc, J., Vincent, A., Porchet, N., and Pigny, P. (2018). Messenger RNA Life-Cycle in Cancer Cells: Emerging Role of Conventional and Non-Conventional RNA-Binding Proteins? *Int J Mol Sci* **19**.
- Corral-Debrinski, M., Blugeon, C., and Jacq, C. (2000). In yeast, the 3' untranslated region or the presequence of ATM1 is required for the exclusive localization of its mRNA to the vicinity of mitochondria. *Mol Cell Biol* **20**, 7881-92.
- Creamer, T. J., Darby, M. M., Jamonnak, N., Schaugency, P., Hao, H., Wheelan, S. J., and Corden, J. L. (2011). Transcriptome-wide binding sites for components of the *Saccharomyces cerevisiae* non-poly(A) termination pathway: Nrd1, Nab3, and Sen1. *PLoS Genet* **7**, e1002329.
- Czulpinska, M., and Rurek, M. (2018). Plant Glycine-Rich Proteins in Stress Response: An Emerging, Still Prospective Story. *Front Plant Sci* **9**, 302.
- Darnell, J. C., Van Driesche, S. J., Zhang, C., Hung, K. Y., Mele, A., Fraser, C. E., Stone, E. F., Chen, C., Fak, J. J., Chi, S. W., Licatalosi, D. D., Richter, J. D., and Darnell, R. B. (2011). FMRP stalls ribosomal translocation on mRNAs linked to synaptic function and autism. *Cell* **146**, 247-61.
- Das, S., Singer, R. H., and Yoon, Y. J. (2019). The travels of mRNAs in neurons: do they know where they are going? *Curr Opin Neurobiol* **57**, 110-116.
- Davidson, A., Parton, R. M., Rabouille, C., Weil, T. T., and Davis, I. (2016). Localized Translation of gurken/TGF- α mRNA during Axis Specification Is Controlled by Access to Orb/CPEB on Processing Bodies. *Cell Rep* **14**, 2451-62.
- de Souza, P. M., Bittencourt, M. L., Caprara, C. C., de Freitas, M., de Almeida, R. P., Silveira, D., Fonseca, Y. M., Ferreira Filho, E. X., Pessoa Junior, A., and Magalhaes, P. O. (2015). A biotechnology perspective of fungal proteases. *Braz J Microbiol* **46**, 337-46.
- Decker, C. J., and Parker, R. (2012). P-bodies and stress granules: possible roles in the control of translation and mRNA degradation. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **4**, a012286.
- Delanoue, R., Herpers, B., Soetaert, J., Davis, I., and Rabouille, C. (2007). *Drosophila* Squid/hnRNP helps Dynein switch from a gurken mRNA transport motor to an ultrastructural static anchor in sponge bodies. *Dev Cell* **13**, 523-38.
- Deo, R. C., Bonanno, J. B., Sonenberg, N., and Burley, S. K. (1999). Recognition of polyadenylate RNA by the poly(A)-binding protein. *Cell* **98**, 835-45.
- Dictenberg, J. B., Swanger, S. A., Antar, L. N., Singer, R. H., and Bassell, G. J. (2008). A direct role for FMRP in activity-dependent dendritic mRNA transport links filopodial-spine morphogenesis to fragile X syndrome. *Dev Cell* **14**, 926-39.
- Dienstbier, M., Boehl, F., Li, X., and Bullock, S. L. (2009). Egalitarian is a selective RNA-binding protein linking mRNA localization signals to the dynein motor. *Genes Dev* **23**, 1546-58.
- Djamei, A., and Kahmann, R. (2012). *Ustilago maydis*: dissecting the molecular interface between pathogen and plant. *PLoS Pathog* **8**, e1002955.

- Dobin, A., Davis, C. A., Schlesinger, F., Drenkow, J., Zaleski, C., Jha, S., Batut, P., Chaisson, M., and Gingeras, T. R. (2013). STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics* **29**, 15-21.
- Dodt, M., Roehr, J. T., Ahmed, R., and Dieterich, C. (2012). FLEXBAR-Flexible Barcode and Adapter Processing for Next-Generation Sequencing Platforms. *Biology (Basel)* **1**, 895-905.
- Doehlemann, G., Wahl, R., Vranes, M., de Vries, R. P., Kämper, J., and Kahmann, R. (2008). Establishment of compatibility in the *Ustilago maydis*/maize pathosystem. *J Plant Physiol* **165**, 29-40.
- Dominguez, D., Freese, P., Alexis, M. S., Su, A., Hochman, M., Palden, T., Bazile, C., Lambert, N. J., Van Nostrand, E. L., Pratt, G. A., Yeo, G. W., Graveley, B. R., and Burge, C. B. (2018). Sequence, Structure, and Context Preferences of Human RNA Binding Proteins. *Mol Cell* **70**, 854-867 e9.
- Doyle, M., and Kiebler, M. A. (2011). Mechanisms of dendritic mRNA transport and its role in synaptic tagging. *EMBO J* **30**, 3540-52.
- Edelmann, F. T., Schlundt, A., Heym, R. G., Jenner, A., Niedner-Boblenz, A., Syed, M. I., Paillart, J. C., Stehle, R., Janowski, R., Sattler, M., Jansen, R. P., and Niessing, D. (2017). Molecular architecture and dynamics of ASH1 mRNA recognition by its mRNA-transport complex. *Nature Structural & Molecular Biology* **24**, 152-161.
- Egan, M. J., McClintock, M. A., and Reck-Peterson, S. L. (2012). Microtubule-based transport in filamentous fungi. *Curr Opin Microbiol* **15**, 637-45.
- Feldbrügge, M., Kämper, J., Steinberg, G., and Kahmann, R. (2004). Regulation of mating and pathogenic development in *Ustilago maydis*. *Curr Opin Microbiol* **7**, 666-72.
- Feldbrügge, M., Kellner, R., and Schipper, K. (2013). The biotechnological use and potential of plant pathogenic smut fungi. *Applied Microbiology and Biotechnology* **97**, 3253-3265.
- Fuchs, U., Manns, I., and Steinberg, G. (2005). Microtubules are dispensable for the initial pathogenic development but required for long-distance hyphal growth in the corn smut fungus *Ustilago maydis*. *Mol Biol Cell* **16**, 2746-58.
- Gao, X., Yin, C., Liu, X., Peng, J., Chen, D., He, D., Shi, W., Zhao, W., and Yang, J. (2019). A glycine-rich protein MoGrp1 functions as a novel splicing factor to regulate fungal virulence and growth in *Magnaporthe oryzae*.
- Garcia-Muse, T., Steinberg, G., and Perez-Martin, J. (2004). Characterization of B-type cyclins in the smut fungus *Ustilago maydis*: roles in morphogenesis and pathogenicity. *J Cell Sci* **117**, 487-506.
- Garzia, A., Meyer, C., Morozov, P., Sajek, M., and Tuschl, T. (2017). Optimization of PAR-CLIP for transcriptome-wide identification of binding sites of RNA-binding proteins. *Methods* **118-119**, 24-40.
- Gehring, N. H., Wahle, E., and Fischer, U. (2017). Deciphering the mRNP Code: RNA-Bound Determinants of Post-Transcriptional Gene Regulation. *Trends Biochem Sci* **42**, 369-382.
- Geiser, E., Przybilla, S. K., Engel, M., Kleineberg, W., Buttner, L., Sarikaya, E., Den Hartog, T., Klankermayer, J., Leitner, W., Bolker, M., Blank, L. M., and Wierckx, N. (2016). Genetic and biochemical insights into the itaconate pathway of *Ustilago maydis* enable enhanced production. *Metabolic Engineering* **38**, 427-435.
- Gerstberger, S., Hafner, M., and Tuschl, T. (2014). A census of human RNA-binding proteins. *Nat Rev Genet* **15**, 829-45.
- Gillissen, B., Bergemann, J., Sandmann, C., Schroeer, B., Bolker, M., and Kahmann, R. (1992). A two-component regulatory system for self/non-self recognition in *Ustilago maydis*. *Cell* **68**, 647-57.
- Gish, W., and States, D. J. (1993). Identification of protein coding regions by database similarity search. *Nat Genet* **3**, 266-72.
- Glisovic, T., Bachorik, J. L., Yong, J., and Dreyfuss, G. (2008). RNA-binding proteins and post-transcriptional gene regulation. *FEBS Lett* **582**, 1977-86.
- Glock, C., Heumüller, M., and Schuman, E. M. (2017). mRNA transport & local translation in neurons. *Curr Opin Neurobiol* **45**, 169-177.

- Gonsalvez, G. B., Little, J. L., and Long, R. M. (2004). ASH1 mRNA anchoring requires reorganization of the Myo4p-She3p-She2p transport complex. *J Biol Chem* **279**, 46286-94.
- Graber, T. E., Hebert-Seropian, S., Khoutorsky, A., David, A., Yewdell, J. W., Lacaille, J. C., and Sossin, W. S. (2013). Reactivation of stalled polyribosomes in synaptic plasticity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**, 16205-10.
- Granneman, S., Kudla, G., Petfalski, E., and Tollervey, D. (2009). Identification of protein binding sites on U3 snoRNA and pre-rRNA by UV cross-linking and high-throughput analysis of cDNAs. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 9613-8.
- Greenberg, J. R. (1979). Ultraviolet light-induced crosslinking of mRNA to proteins. *Nucleic Acids Res* **6**, 715-32.
- Gu, W., Deng, Y., Zenklusen, D., and Singer, R. H. (2004). A new yeast PUF family protein, Puf6p, represses ASH1 mRNA translation and is required for its localization. *Genes Dev* **18**, 1452-65.
- Hachet, O., and Ephrussi, A. (2004). Splicing of oskar RNA in the nucleus is coupled to its cytoplasmic localization. *Nature* **428**, 959-63.
- Hafner, M., Landthaler, M., Burger, L., Khorshid, M., Hausser, J., Berninger, P., Rothballer, A., Ascano, M., Jr., Jungkamp, A. C., Munschauer, M., Ulrich, A., Wardle, G. S., Dewell, S., Zavolan, M., and Tuschl, T. (2010). Transcriptome-wide identification of RNA-binding protein and microRNA target sites by PAR-CLIP. *Cell* **141**, 129-41.
- Han, J. H., Jung, Y. J., Lee, H. J., Jung, H. S., Lee, K. O., and Kang, H. (2013). The RNA chaperone and protein chaperone activity of Arabidopsis glycine-rich RNA-binding protein 4 and 7 is determined by the propensity for the formation of high molecular weight complexes. *Protein J* **32**, 449-55.
- Hanano, S., Sugita, M., and Sugiura, M. (1996). Isolation of a novel RNA-binding protein and its association with a large ribonucleoprotein particle present in the nucleoplasm of tobacco cells. *Plant Mol Biol* **31**, 57-68.
- Handa, N., Kukimoto-Niino, M., Akasaka, R., Kishishita, S., Murayama, K., Terada, T., Inoue, M., Kigawa, T., Kose, S., Imamoto, N., Tanaka, A., Hayashizaki, Y., Shirouzu, M., and Yokoyama, S. (2006). The crystal structure of mouse Nup35 reveals atypical RNP motifs and novel homodimerization of the RRM domain. *J Mol Biol* **363**, 114-24.
- Hargous, Y., Hautbergue, G. M., Tintaru, A. M., Skrisovska, L., Golovanov, A. P., Stevenin, J., Lian, L. Y., Wilson, S. A., and Allain, F. H. (2006). Molecular basis of RNA recognition and TAP binding by the SR proteins SRp20 and 9G8. *EMBO J* **25**, 5126-37.
- Hellman, L. M., and Fried, M. G. (2007). Electrophoretic mobility shift assay (EMSA) for detecting protein-nucleic acid interactions. *Nat Protoc* **2**, 1849-61.
- Hentze, M. W., Castello, A., Schwarzl, T., and Preiss, T. (2018). A brave new world of RNA-binding proteins. *Nat Rev Mol Cell Biol* **19**, 327-341.
- Higuchi, Y., Ashwin, P., Roger, Y., and Steinberg, G. (2014). Early endosome motility spatially organizes polysome distribution. *J Cell Biol* **204**, 343-57.
- Hockensmith, J. W., Kubasek, W. L., Vorachek, W. R., and von Hippel, P. H. (1986). Laser cross-linking of nucleic acids to proteins. Methodology and first applications to the phage T4 DNA replication system. *J Biol Chem* **261**, 3512-8.
- Holliday, R. (1974). Molecular aspects of genetic exchange and gene conversion. *Genetics* **78**, 273-87.
- Holliday, R. (2004). Early studies on recombination and DNA repair in *Ustilago maydis*. *DNA Repair (Amst)* **3**, 671-82.
- Huppertz, I., Attig, J., D'Ambrogio, A., Easton, L. E., Sibley, C. R., Sugimoto, Y., Tajnik, M., König, J., and Ule, J. (2014). iCLIP: protein-RNA interactions at nucleotide resolution. *Methods* **65**, 274-87.
- Huynh, J. R., Munro, T. P., Smith-Litiere, K., Lepesant, J. A., and St Johnston, D. (2004). The *Drosophila* hnRNPA/B homolog, Hrp48, is specifically required for a distinct step in *osk* mRNA localization. *Dev Cell* **6**, 625-35.

- Innis, M. A., Gelfand, D. H., Sninsky, J. J., and White, T. J. (1990). PCR Protocols: a guide to methods and amplifications. *San Diego, USA: Academic press.*
- Jambhekar, A., and Derisi, J. L. (2007). Cis-acting determinants of asymmetric, cytoplasmic RNA transport. *RNA* **13**, 625-42.
- Jankowski, S., Pohlmann, T., Baumann, S., Muntjes, K., Devan, S. K., Zander, S., and Feldbrugge, M. (2019). The multi PAM2 protein Upa2 functions as novel core component of endosomal mRNA transport. *EMBO Rep*, e47381.
- Jankowsky, E., and Harris, M. E. (2015). Specificity and nonspecificity in RNA-protein interactions. *Nat Rev Mol Cell Biol* **16**, 533-44.
- Järvelin, A. I., Noerenberg, M., Davis, I., and Castello, A. (2016). The new (dis)order in RNA regulation. *Cell Commun Signal* **14**, 9.
- Jumaa, H., and Nielsen, P. J. (2000). Regulation of SRp20 exon 4 splicing. *Biochim Biophys Acta* **1494**, 137-43.
- Jungkamp, A. C., Stoeckius, M., Mecnas, D., Grun, D., Mastrobuoni, G., Kempa, S., and Rajewsky, N. (2011). In vivo and transcriptome-wide identification of RNA binding protein target sites. *Mol Cell* **44**, 828-40.
- Kämper, J., Kahmann, R., Bölker, M., Ma, L. J., Brefort, T., Saville, B. J., Banuett, F., Kronstad, J. W., Gold, S. E., Müller, O., Perlin, M. H., Wosten, H. A., de Vries, R., Ruiz-Herrera, J., Reynaga-Pena, C. G., Snetselaar, K., McCann, M., Perez-Martin, J., Feldbrügge, M., Basse, C. W., Steinberg, G., Ibeas, J. I., Holloman, W., Guzman, P., Farman, M., Stajich, J. E., Sentandreu, R., Gonzalez-Prieto, J. M., Kennell, J. C., Molina, L., Schirawski, J., Mendoza-Mendoza, A., Greilinger, D., Munch, K., Rossel, N., Scherer, M., Vranes, M., Ladendorf, O., Vincon, V., Fuchs, U., Sandrock, B., Meng, S., Ho, E. C., Cahill, M. J., Boyce, K. J., Klose, J., Klosterman, S. J., Deelstra, H. J., Ortiz-Castellanos, L., Li, W., Sanchez-Alonso, P., Schreier, P. H., Hauser-Hahn, I., Vaupel, M., Koopmann, E., Friedrich, G., Voss, H., Schluter, T., Margolis, J., Platt, D., Swimmer, C., Gnirke, A., Chen, F., Vysotskaia, V., Mannhaupt, G., Guldener, U., Munsterkotter, M., Haase, D., Oesterheld, M., Mewes, H. W., Mauceli, E. W., DeCaprio, D., Wade, C. M., Butler, J., Young, S., Jaffe, D. B., Calvo, S., Nusbaum, C., Galagan, J., and Birren, B. W. (2006). Insights from the genome of the biotrophic fungal plant pathogen *Ustilago maydis*. *Nature* **444**, 97-101.
- Kamper, J., Reichmann, M., Romeis, T., Bolker, M., and Kahmann, R. (1995). Multiallelic recognition: nonself-dependent dimerization of the bE and bW homeodomain proteins in *Ustilago maydis*. *Cell* **81**, 73-83.
- Kang, H., Park, S. J., and Kwak, K. J. (2013). Plant RNA chaperones in stress response. *Trends Plant Sci* **18**, 100-6.
- Kannaiah, S., and Amster-Choder, O. (2014). Protein targeting via mRNA in bacteria. *Biochim Biophys Acta* **1843**, 1457-65.
- Kejiou, N. S., and Palazzo, A. F. (2017). mRNA localization as a rheostat to regulate subcellular gene expression. *Wiley Interdiscip Rev RNA* **8**.
- Kellner, R., Vollmeister, E., Feldbrugge, M., and Begerow, D. (2011). Interspecific sex in grass smuts and the genetic diversity of their pheromone-receptor system. *PLoS Genet* **7**, e1002436.
- Kim, J. S., Jung, H. J., Lee, H. J., Kim, K. A., Goh, C. H., Woo, Y., Oh, S. H., Han, Y. S., and Kang, H. (2008). Glycine-rich RNA-binding protein 7 affects abiotic stress responses by regulating stomata opening and closing in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* **55**, 455-66.
- Kim, J. S., Park, S. J., Kwak, K. J., Kim, Y. O., Kim, J. Y., Song, J., Jang, B., Jung, C. H., and Kang, H. (2007). Cold shock domain proteins and glycine-rich RNA-binding proteins from *Arabidopsis thaliana* can promote the cold adaptation process in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res* **35**, 506-16.

- Kim, J. Y., Kim, W. Y., Kwak, K. J., Oh, S. H., Han, Y. S., and Kang, H. (2010). Glycine-rich RNA-binding proteins are functionally conserved in *Arabidopsis thaliana* and *Oryza sativa* during cold adaptation process. *J Exp Bot* **61**, 2317-25.
- Koepke, J., Kaffarnik, F., Haag, C., Zarnack, K., Luscombe, N. M., König, J., Ule, J., Kellner, R., Begerow, D., and Feldbrügge, M. (2011). The RNA-binding protein Rrm4 is essential for efficient secretion of endochitinase Cts1. *Mol Cell Proteomics* **10**, M111 011213.
- König, J., Baumann, S., Koepke, J., Pohlmann, T., Zarnack, K., and Feldbrügge, M. (2009). The fungal RNA-binding protein Rrm4 mediates long-distance transport of *ubi1* and *rho3* mRNAs. *EMBO J* **28**, 1855-66.
- König, J., Julius, C., Baumann, S., Homann, M., Goring, H. U., and Feldbrügge, M. (2007). Combining SELEX and the yeast three-hybrid system for in vivo selection and classification of RNA aptamers. *RNA* **13**, 614-22.
- König, J., Zarnack, K., Luscombe, N. M., and Ule, J. (2012). Protein-RNA interactions: new genomic technologies and perspectives. *Nat Rev Genet* **13**, 77-83.
- König, J., Zarnack, K., Rot, G., Curk, T., Kaykici, M., Zupan, B., Turner, D. J., Luscombe, N. M., and Ule, J. (2010). iCLIP reveals the function of hnRNP particles in splicing at individual nucleotide resolution. *Nature Structural & Molecular Biology* **17**, 909-U166.
- Kozlov, G., Menade, M., Rosenauer, A., Nguyen, L., and Gehring, K. (2010). Molecular determinants of PAM2 recognition by the MLE domain of poly(A)-binding protein. *J Mol Biol* **397**, 397-407.
- Kronstad, J. W., and Leong, S. A. (1990). The b mating-type locus of *Ustilago maydis* contains variable and constant regions. *Genes Dev* **4**, 1384-95.
- Kruzel, E. K., and Hull, C. M. (2010). Establishing an unusual cell type: how to make a dikaryon. *Curr Opin Microbiol* **13**, 706-11.
- Kucharczyk, R., Zick, M., Bietenhader, M., Rak, M., Couplan, E., Blondel, M., Caubet, S. D., and di Rago, J. P. (2009). Mitochondrial ATP synthase disorders: molecular mechanisms and the quest for curative therapeutic approaches. *Biochim Biophys Acta* **1793**, 186-99.
- Kucukural, A., Özadam, H., Singh, G., Moore, M. J., and Cenik, C. (2013). ASPeak: an abundance sensitive peak detection algorithm for RIP-Seq. *Bioinformatics* **29**, 2485-6.
- Kwak, K. J., Park, S. J., Han, J. H., Kim, M. K., Oh, S. H., Han, Y. S., and Kang, H. (2011). Structural determinants crucial to the RNA chaperone activity of glycine-rich RNA-binding proteins 4 and 7 in *Arabidopsis thaliana* during the cold adaptation process. *J Exp Bot* **62**, 4003-11.
- Larkin, M. A., Blackshields, G., Brown, N. P., Chenna, R., McGettigan, P. A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I. M., Wilm, A., Lopez, R., Thompson, J. D., Gibson, T. J., and Higgins, D. G. (2007). Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* **23**, 2947-8.
- Lecuyer, E., Yoshida, H., Parthasarathy, N., Alm, C., Babak, T., Cerovina, T., Hughes, T. R., Tomancak, P., and Krause, H. M. (2007). Global analysis of mRNA localization reveals a prominent role in organizing cellular architecture and function. *Cell* **131**, 174-87.
- Lee, F. C. Y., and Ule, J. (2018). Advances in CLIP Technologies for Studies of Protein-RNA Interactions. *Mol Cell* **69**, 354-369.
- Lehmler, C., Steinberg, G., Snetselaar, K. M., Schliwa, M., Kahmann, R., and Bolker, M. (1997). Identification of a motor protein required for filamentous growth in *Ustilago maydis*. *EMBO J* **16**, 3464-73.
- Lenz, J. H., Schuchardt, I., Straube, A., and Steinberg, G. (2006). A dynein loading zone for retrograde endosome motility at microtubule plus-ends. *EMBO J* **25**, 2275-86.
- Letunic, I., and Bork, P. (2018). 20 years of the SMART protein domain annotation resource. *Nucleic Acids Res* **46**, D493-D496.
- Letunic, I., Doerks, T., and Bork, P. (2015). SMART: recent updates, new developments and status in 2015. *Nucleic Acids Res* **43**, D257-60.

- Lewis, R. A., Gagnon, J. A., and Mowry, K. L. (2008). PTB/hnRNP I is required for RNP remodeling during RNA localization in *Xenopus* oocytes. *Mol Cell Biol* **28**, 678-86.
- Liao, Y., Tong, L., Tang, L., and Wu, S. (2017). The role of cold-inducible RNA binding protein in cell stress response. *Int J Cancer* **141**, 2164-2173.
- Licatalosi, D. D., Mele, A., Fak, J. J., Ule, J., Kayikci, M., Chi, S. W., Clark, T. A., Schweitzer, A. C., Blume, J. E., Wang, X., Darnell, J. C., and Darnell, R. B. (2008). HITS-CLIP yields genome-wide insights into brain alternative RNA processing. *Nature* **456**, 464-9.
- Little, S. C., Sinsimer, K. S., Lee, J. J., Wieschaus, E. F., and Gavis, E. R. (2015). Independent and coordinate trafficking of single *Drosophila* germ plasm mRNAs. *Nat Cell Biol* **17**, 558-68.
- Long, R. M., Gu, W., Lorimer, E., Singer, R. H., and Chartrand, P. (2000). She2p is a novel RNA-binding protein that recruits the Myo4p-She3p complex to ASH1 mRNA. *EMBO J* **19**, 6592-601.
- Loughlin, F. E., Lukavsky, P. J., Kazeeva, T., Reber, S., Hock, E. M., Colombo, M., Von Schroetter, C., Pauli, P., Clery, A., Muhlemann, O., Polymenidou, M., Ruepp, M. D., and Allain, F. H. (2019). The Solution Structure of FUS Bound to RNA Reveals a Bipartite Mode of RNA Recognition with Both Sequence and Shape Specificity. *Mol Cell* **73**, 490-504 e6.
- Lunde, B. M., Moore, C., and Varani, G. (2007). RNA-binding proteins: modular design for efficient function. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**, 479-90.
- Mackereth, C. D., and Sattler, M. (2012). Dynamics in multi-domain protein recognition of RNA. *Curr Opin Struct Biol* **22**, 287-96.
- Mangeon, A., Junqueira, R. M., and Sachetto-Martins, G. (2010). Functional diversity of the plant glycine-rich proteins superfamily. *Plant Signal Behav* **5**, 99-104.
- Mansfield, K. D., and Keene, J. D. (2009). The ribonome: a dominant force in co-ordinating gene expression. *Biol Cell* **101**, 169-81.
- Marc, P., Margeot, A., Devaux, F., Blugeon, C., Corral-Debrinski, M., and Jacq, C. (2002). Genome-wide analysis of mRNAs targeted to yeast mitochondria. *EMBO Rep* **3**, 159-64.
- Margeot, A., Blugeon, C., Sylvestre, J., Vialette, S., Jacq, C., and Corral-Debrinski, M. (2002). In *Saccharomyces cerevisiae*, ATP2 mRNA sorting to the vicinity of mitochondria is essential for respiratory function. *EMBO J* **21**, 6893-904.
- Maris, C., Dominguez, C., and Allain, F. H. (2005). The RNA recognition motif, a plastic RNA-binding platform to regulate post-transcriptional gene expression. *FEBS J* **272**, 2118-31.
- Martin, K. C., and Ephrussi, A. (2009). mRNA localization: gene expression in the spatial dimension. *Cell* **136**, 719-30.
- Masuda, T., Itoh, K., Higashitsuji, H., Nakazawa, N., Sakurai, T., Liu, Y., Tokuchi, H., Fujita, T., Zhao, Y., Nishiyama, H., Tanaka, T., Fukumoto, M., Ikawa, M., Okabe, M., and Fujita, J. (2012). Cold-inducible RNA-binding protein (Cirp) interacts with Dyrk1b/Mirk and promotes proliferation of immature male germ cells in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**, 10885-90.
- Mayer, O., Rajkowitsch, L., Lorenz, C., Konrat, R., and Schroeder, R. (2007). RNA chaperone activity and RNA-binding properties of the *E. coli* protein StpA. *Nucleic Acids Res* **35**, 1257-69.
- Mayfield, J. A., and Preuss, D. (2000). Rapid initiation of Arabidopsis pollination requires the oleosin-domain protein GRP17. *Nat Cell Biol* **2**, 128-30.
- Mayr, C. (2016). Evolution and Biological Roles of Alternative 3'UTRs. *Trends Cell Biol* **26**, 227-237.
- Mayr, C. (2017). Regulation by 3'-Untranslated Regions. *Annu Rev Genet* **51**, 171-194.
- Mendoza-Mendoza, A., Berndt, P., Djamei, A., Weise, C., Linne, U., Marahiel, M., Vranes, M., Kamper, J., and Kahmann, R. (2009). Physical-chemical plant-derived signals induce differentiation in *Ustilago maydis*. *Mol Microbiol* **71**, 895-911.
- Meyer, K., Koster, T., Nolte, C., Weinholdt, C., Lewinski, M., Grosse, I., and Staiger, D. (2017). Adaptation of iCLIP to plants determines the binding landscape of the clock-regulated RNA-binding protein AtGRP7. *Genome Biol* **18**, 204.

- Mhlanga, M. M., Bratu, D. P., Genovesio, A., Rybarska, A., Chenouard, N., Nehrbass, U., and Olivo-Marin, J. C. (2009). In vivo colocalisation of oskar mRNA and trans-acting proteins revealed by quantitative imaging of the *Drosophila* oocyte. *PLoS One* **4**, e6241.
- Mingle, L. A., Okuhama, N. N., Shi, J., Singer, R. H., Condeelis, J., and Liu, G. (2005). Localization of all seven messenger RNAs for the actin-polymerization nucleator Arp2/3 complex in the protrusions of fibroblasts. *J Cell Sci* **118**, 2425-33.
- Mitchell, S. F., Jain, S., She, M., and Parker, R. (2013). Global analysis of yeast mRNPs. *Nature Structural & Molecular Biology* **20**, 127-33.
- Mofatteh, M., and Bullock, S. L. (2017). SnapShot: Subcellular mRNA Localization. *Cell* **169**, 178-178 e1.
- Mohr, D., Frey, S., Fischer, T., Guttler, T., and Gorlich, D. (2009). Characterisation of the passive permeability barrier of nuclear pore complexes. *EMBO J* **28**, 2541-53.
- Morris, R. J. (2018). On the selectivity, specificity and signalling potential of the long-distance movement of messenger RNA. *Curr Opin Plant Biol* **43**, 1-7.
- Mukherjee, N., Jacobs, N. C., Hafner, M., Kennington, E. A., Nusbaum, J. D., Tuschl, T., Blackshear, P. J., and Ohler, U. (2014). Global target mRNA specification and regulation by the RNA-binding protein ZFP36. *Genome Biol* **15**, R12.
- Müller-McNicoll, M., Botti, V., de Jesus Domingues, A. M., Brandl, H., Schwich, O. D., Steiner, M. C., Curk, T., Poser, I., Zarnack, K., and Neugebauer, K. M. (2016). SR proteins are NXF1 adaptors that link alternative RNA processing to mRNA export. *Genes Dev* **30**, 553-66.
- Müller-McNicoll, M., and Neugebauer, K. M. (2013). How cells get the message: dynamic assembly and function of mRNA-protein complexes. *Nat Rev Genet* **14**, 275-87.
- Müller-McNicoll, M., Rossbach, O., Hui, J., and Medenbach, J. (2019). Auto-regulatory feedback by RNA-binding proteins. *J Mol Cell Biol*.
- Nevo-Dinur, K., Govindarajan, S., and Amster-Choder, O. (2012). Subcellular localization of RNA and proteins in prokaryotes. *Trends Genet* **28**, 314-22.
- Nicholas, K. B., Nicholas Jr., H., and D.W., D. I. (1997). GeneDoc: Analysis and visualization of genetic variation. *EMBNEW.NEWS* **4**.
- Niessing, D., Jansen, R. P., Pohlmann, T., and Feldbrügge, M. (2018). mRNA transport in fungal top models. *Wiley Interdiscip Rev RNA* **9**.
- Niranjankumari, S., Lasda, E., Brazas, R., and Garcia-Blanco, M. A. (2002). Reversible cross-linking combined with immunoprecipitation to study RNA-protein interactions in vivo. *Methods* **26**, 182-90.
- Park, A. R., Cho, S. K., Yun, U. J., Jin, M. Y., Lee, S. H., Sachetto-Martins, G., and Park, O. K. (2001). Interaction of the Arabidopsis receptor protein kinase Wak1 with a glycine-rich protein, AtGRP-3. *J Biol Chem* **276**, 26688-93.
- Phadtare, S., and Severinov, K. (2010). RNA remodeling and gene regulation by cold shock proteins. *RNA Biol* **7**, 788-95.
- Phadtare, S., Severinov, K., and Inouye, M. (2003). Assay of transcription antitermination by proteins of the CspA family. *Methods Enzymol* **371**, 460-71.
- Pizzinga, M., and Ashe, M. P. (2014). Yeast mRNA localization: protein asymmetry, organelle localization and response to stress. *Biochem Soc Trans* **42**, 1256-60.
- Pohlmann, T., Baumann, S., Haag, C., Albrecht, M., and Feldbrügge, M. (2015). A FYVE zinc finger domain protein specifically links mRNA transport to endosome trafficking. *Elife* **4**.
- Protter, D. S. W., and Parker, R. (2016). Principles and Properties of Stress Granules. *Trends Cell Biol* **26**, 668-679.
- Rajkowitz, L., Semrad, K., Mayer, O., and Schroeder, R. (2005). Assays for the RNA chaperone activity of proteins. *Biochem Soc Trans* **33**, 450-6.

- Ram, A. F., and Klis, F. M. (2006). Identification of fungal cell wall mutants using susceptibility assays based on Calcofluor white and Congo red. *Nat Protoc* **1**, 2253-6.
- Rangaraju, V., Lauterbach, M., and Schuman, E. M. (2019). Spatially Stable Mitochondrial Compartments Fuel Local Translation during Plasticity. *Cell* **176**, 73-84 e15.
- Raran-Kurussi, S., Tozser, J., Cherry, S., Tropea, J. E., and Waugh, D. S. (2013). Differential temperature dependence of tobacco etch virus and rhinovirus 3C proteases. *Anal Biochem* **436**, 142-4.
- Reindl, M., Hansch, S., Weidtkamp-Peters, S., and Schipper, K. (2019). A Potential Lock-Type Mechanism for Unconventional Secretion in Fungi. *Int J Mol Sci* **20**.
- Ries, R. J., Zaccara, S., Klein, P., Olarerin-George, A., Namkoong, S., Pickering, B. F., Patil, D. P., Kwak, H., Lee, J. H., and Jaffrey, S. R. (2019). m(6)A enhances the phase separation potential of mRNA. *Nature* **571**, 424-428.
- Rigaut, G., Shevchenko, A., Rutz, B., Wilm, M., Mann, M., and Seraphin, B. (1999). A generic protein purification method for protein complex characterization and proteome exploration. *Nat Biotechnol* **17**, 1030-2.
- Rissland, O. S. (2017). The organization and regulation of mRNA-protein complexes. *Wiley Interdiscip Rev RNA* **8**.
- Roilo, M., Kullmann, M. K., and Hengst, L. (2018). Cold-inducible RNA-binding protein (CIRP) induces translation of the cell-cycle inhibitor p27Kip1. *Nucleic Acids Res* **46**, 3198-3210.
- Rom, I., Faicevici, A., Almog, O., and Neuman-Silberberg, F. S. (2007). Drosophila Dynein light chain (DDL1) binds to gurken mRNA and is required for its localization. *Biochim Biophys Acta* **1773**, 1526-33.
- Roncero, C., and Duran, A. (1985). Effect of Calcofluor white and Congo red on fungal cell wall morphogenesis: in vivo activation of chitin polymerization. *J Bacteriol* **163**, 1180-5.
- Roncero, C., Valdivieso, M. H., Ribas, J. C., and Duran, A. (1988). Effect of calcofluor white on chitin synthases from *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* **170**, 1945-9.
- Rosenberg, M., Blum, R., Kesner, B., Maier, V. K., Szanto, A., and Lee, J. T. (2017). Denaturing CLIP, dCLIP, Pipeline Identifies Discrete RNA Footprints on Chromatin-Associated Proteins and Reveals that CBX7 Targets 3' UTRs to Regulate mRNA Expression. *Cell Syst* **5**, 368-385 e15.
- Rossoll, W., and Bassell, G. J. (2019). Crosstalk of Local Translation and Mitochondria: Powering Plasticity in Axons and Dendrites. *Neuron* **101**, 204-206.
- Rothbauer, U., Zolghadr, K., Muyldermans, S., Schepers, A., Cardoso, M. C., and Leonhardt, H. (2008). A versatile nanotrapp for biochemical and functional studies with fluorescent fusion proteins. *Mol Cell Proteomics* **7**, 282-9.
- Ruepp, A., Zollner, A., Maier, D., Albermann, K., Hani, J., Mokrejs, M., Tetko, I., Guldener, U., Mannhaupt, G., Münsterkötter, M., and Mewes, H. W. (2004). The FunCat, a functional annotation scheme for systematic classification of proteins from whole genomes. *Nucleic Acids Res* **32**, 5539-45.
- Rupes, I. (2002). Checking cell size in yeast. *Trends Genet* **18**, 479-85.
- Sachetto-Martins, G., Franco, L. O., and de Oliveira, D. E. (2000). Plant glycine-rich proteins: a family or just proteins with a common motif? *Biochim Biophys Acta* **1492**, 1-14.
- Salogiannis, J., Egan, M. J., and Reck-Peterson, S. L. (2016). Peroxisomes move by hitchhiking on early endosomes using the novel linker protein PxdA. *J Cell Biol* **212**, 289-96.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. (1989). "Molecular Cloning: A Laboratory Manual.," Cold Spring Harbour Laboratory Press Cold Spring Harbour, New York, USA.
- Scherer, M., Heimel, K., Starke, V., and Kamper, J. (2006). The Clp1 protein is required for clamp formation and pathogenic development of *Ustilago maydis*. *Plant Cell* **18**, 2388-401.
- Schuchardt, I., Assmann, D., Thines, E., Schuberth, C., and Steinberg, G. (2005). Myosin-V, Kinesin-1, and Kinesin-3 cooperate in hyphal growth of the fungus *Ustilago maydis*. *Mol Biol Cell* **16**, 5191-201.

- Schulz, B., Banuett, F., Dahl, M., Schlesinger, R., Schafer, W., Martin, T., Herskowitz, I., and Kahmann, R. (1990). The b alleles of *U. maydis*, whose combinations program pathogenic development, code for polypeptides containing a homeodomain-related motif. *Cell* **60**, 295-306.
- Schuster, M., Kilaru, S., Fink, G., Collemare, J., Roger, Y., and Steinberg, G. (2011b). Kinesin-3 and dynein cooperate in long-range retrograde endosome motility along a nonuniform microtubule array. *Mol Biol Cell* **22**, 3645-57.
- Schuster, M., Lipowsky, R., Assmann, M. A., Lenz, P., and Steinberg, G. (2011c). Transient binding of dynein controls bidirectional long-range motility of early endosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**, 3618-23.
- Schuster, M., Martin-Urdiroz, M., Higuchi, Y., Hacker, C., Kilaru, S., Gurr, S. J., and Steinberg, G. (2016). Co-delivery of cell-wall-forming enzymes in the same vesicle for coordinated fungal cell wall formation. *Nat Microbiol* **1**, 16149.
- Sgarlata, C., and Perez-Martin, J. (2005a). Inhibitory phosphorylation of a mitotic cyclin-dependent kinase regulates the morphogenesis, cell size and virulence of the smut fungus *Ustilago maydis*. *J Cell Sci* **118**, 3607-22.
- Sgarlata, C., and Perez-Martin, J. (2005b). The *cdc25* phosphatase is essential for the G2/M phase transition in the basidiomycete yeast *Ustilago maydis*. *Mol Microbiol* **58**, 1482-96.
- Sharangdhar, T., Sugimoto, Y., Heraud-Farlow, J., Fernandez-Moya, S. M., Ehses, J., Ruiz de Los Mozos, I., Ule, J., and Kiebler, M. A. (2017). A retained intron in the 3'-UTR of *Calm3* mRNA mediates its Staufen2- and activity-dependent localization to neuronal dendrites. *EMBO Rep* **18**, 1762-1774.
- Shetlar, M. D., Carbone, J., Steady, E., and Hom, K. (1984). Photochemical addition of amino acids and peptides to polyuridylic acid. *Photochem Photobiol* **39**, 141-4.
- Siepel, A., Bejerano, G., Pedersen, J. S., Hinrichs, A. S., Hou, M., Rosenbloom, K., Clawson, H., Spieth, J., Hillier, L. W., Richards, S., Weinstock, G. M., Wilson, R. K., Gibbs, R. A., Kent, W. J., Miller, W., and Haussler, D. (2005). Evolutionarily conserved elements in vertebrate, insect, worm, and yeast genomes. *Genome Res* **15**, 1034-50.
- Singh, G., Pratt, G., Yeo, G. W., and Moore, M. J. (2015). The Clothes Make the mRNA: Past and Present Trends in mRNP Fashion. *Annu Rev Biochem* **84**, 325-54.
- Snee, M., Benz, D., Jen, J., and Macdonald, P. M. (2008). Two distinct domains of Bruno bind specifically to the oskar mRNA. *RNA Biol* **5**, 1-9.
- Spellig, T., Bölker, M., Lottspeich, F., Frank, R. W., and Kahmann, R. (1994). Pheromones trigger filamentous growth in *Ustilago maydis*. *EMBO J* **13**, 1620-7.
- St Johnston, D. (2005). Moving messages: the intracellular localization of mRNAs. *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**, 363-75.
- St Johnston, D., and Nusslein-Volhard, C. (1992). The origin of pattern and polarity in the *Drosophila* embryo. *Cell* **68**, 201-19.
- Steinberg, G., Schliwa, M., Lehmler, C., Bolker, M., Kahmann, R., and McIntosh, J. R. (1998). Kinesin from the plant pathogenic fungus *Ustilago maydis* is involved in vacuole formation and cytoplasmic migration. *J Cell Sci* **111 (Pt 15)**, 2235-46.
- Steinberg, G., Wedlich-Soldner, R., Brill, M., and Schulz, I. (2001). Microtubules in the fungal pathogen *Ustilago maydis* are highly dynamic and determine cell polarity. *J Cell Sci* **114**, 609-22.
- Steinert, P. M., Mack, J. W., Korge, B. P., Gan, S. Q., Haynes, S. R., and Steven, A. C. (1991). Glycine loops in proteins: their occurrence in certain intermediate filament chains, lorincins and single-stranded RNA binding proteins. *Int J Biol Macromol* **13**, 130-9.
- Stock, J., Sarkari, P., Kreibich, S., Brefort, T., Feldbrugge, M., and Schipper, K. (2012). Applying unconventional secretion of the endochitinase *Cts1* to export heterologous proteins in *Ustilago maydis*. *J Biotechnol* **161**, 80-91.

- Sugase, K., Dyson, H. J., and Wright, P. E. (2007). Mechanism of coupled folding and binding of an intrinsically disordered protein. *Nature* **447**, 1021-5.
- Sugimoto, Y., Konig, J., Hussain, S., Zupan, B., Curk, T., Frye, M., and Ule, J. (2012). Analysis of CLIP and iCLIP methods for nucleotide-resolution studies of protein-RNA interactions. *Genome Biol* **13**, R67.
- Sun, Y., Bao, Y., Han, W., Song, F., Shen, X., Zhao, J., Zuo, J., Saffen, D., Chen, W., Wang, Z., You, X., and Wang, Y. (2017). Autoregulation of RBM10 and cross-regulation of RBM10/RBM5 via alternative splicing-coupled nonsense-mediated decay. *Nucleic Acids Res* **45**, 8524-8540.
- Suter, B. (2018). RNA localization and transport. *Biochim Biophys Acta Gene Regul Mech* **1861**, 938-951.
- Teertstra, W. R., Deelstra, H. J., Vranes, M., Bohlmann, R., Kahmann, R., Kamper, J., and Wosten, H. A. (2006). Repellents have functionally replaced hydrophobins in mediating attachment to a hydrophobic surface and in formation of hydrophobic aerial hyphae in *Ustilago maydis*. *Microbiology* **152**, 3607-12.
- Teertstra, W. R., van der Velden, G. J., de Jong, J. F., Kruijtzter, J. A., Liskamp, R. M., Kroon-Batenburg, L. M., Muller, W. H., Gebbink, M. F., and Wosten, H. A. (2009). The filament-specific Rep1-1 repellent of the phytopathogen *Ustilago maydis* forms functional surface-active amyloid-like fibrils. *J Biol Chem* **284**, 9153-9.
- Terfrüchte, M., Reindl, M., Jankowski, S., Sarkari, P., Feldbrügge, M., and Schipper, K. (2017). Applying Unconventional Secretion in *Ustilago maydis* for the Export of Functional Nanobodies. *Int J Mol Sci* **18**.
- Thandapani, P., O'Connor, T. R., Bailey, T. L., and Richard, S. (2013). Defining the RGG/RG motif. *Mol Cell* **50**, 613-23.
- Thapar, R. (2015). Structural basis for regulation of RNA-binding proteins by phosphorylation. *ACS Chem Biol* **10**, 652-66.
- Tompa, P., and Csermely, P. (2004). The role of structural disorder in the function of RNA and protein chaperones. *FASEB J* **18**, 1169-75.
- Trovisco, V., Belaya, K., Nashchekin, D., Irion, U., Sirinakakis, G., Butler, R., Lee, J. J., Gavis, E. R., and St Johnston, D. (2016). bicoid mRNA localises to the *Drosophila* oocyte anterior by random Dynein-mediated transport and anchoring. *Elife* **5**.
- Ule, J., Jensen, K., Mele, A., and Darnell, R. B. (2005). CLIP: a method for identifying protein-RNA interaction sites in living cells. *Methods* **37**, 376-86.
- Ule, J., Jensen, K. B., Ruggiu, M., Mele, A., Ule, A., and Darnell, R. B. (2003). CLIP identifies Nova-regulated RNA networks in the brain. *Science* **302**, 1212-5.
- Valdivia, R. H., and Schekman, R. (2003). The yeasts Rho1p and Pkc1p regulate the transport of chitin synthase III (Chs3p) from internal stores to the plasma membrane. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 10287-92.
- Vale, R. D. (2003). The molecular motor toolbox for intracellular transport. *Cell* **112**, 467-80.
- Vazquez-Pianzola, P., and Suter, B. (2012). Conservation of the RNA Transport Machineries and Their Coupling to Translation Control across Eukaryotes. *Comp Funct Genomics* **2012**, 287852.
- Vermeulen, C. A., and Wessels, J. G. (1986). Chitin biosynthesis by a fungal membrane preparation. Evidence for a transient non-crystalline state of chitin. *Eur J Biochem* **158**, 411-5.
- Vollmeister, E., Schipper, K., Baumann, S., Haag, C., Pohlmann, T., Stock, J., and Feldbrügge, M. (2012a). Fungal development of the plant pathogen *Ustilago maydis*. *FEMS Microbiol Rev* **36**, 59-77.
- Vollmeister, E., Schipper, K., and Feldbrugge, M. (2012). Microtubule-dependent mRNA transport in the model microorganism *Ustilago maydis*. *RNA Biol* **9**, 261-8.
- Wang, E. T., Cody, N. A., Jog, S., Biancolella, M., Wang, T. T., Treacy, D. J., Luo, S., Schroth, G. P., Housman, D. E., Reddy, S., Lecuyer, E., and Burge, C. B. (2012). Transcriptome-wide regulation of pre-mRNA splicing and mRNA localization by muscleblind proteins. *Cell* **150**, 710-24.

- Wang, Y., and Casadevall, A. (1994). Decreased susceptibility of melanized *Cryptococcus neoformans* to UV light. *Appl Environ Microbiol* **60**, 3864-6.
- Wang, Z., Kayikci, M., Briese, M., Zarnack, K., Luscombe, N. M., Rot, G., Zupan, B., Curk, T., and Ule, J. (2010). iCLIP predicts the dual splicing effects of TIA-RNA interactions. *PLoS Biol* **8**, e1000530.
- Wedlich-Söldner, R., Straube, A., Friedrich, M. W., and Steinberg, G. (2002). A balance of KIF1A-like kinesin and dynein organizes early endosomes in the fungus *Ustilago maydis*. *EMBO J* **21**, 2946-57.
- Weil, T. T. (2014). mRNA localization in the *Drosophila* germline. *RNA Biol* **11**, 1010-8.
- Weil, T. T., Parton, R. M., Herpers, B., Soetaert, J., Veenendaal, T., Xanthakis, D., Dobbie, I. M., Halstead, J. M., Hayashi, R., Rabouille, C., and Davis, I. (2012). *Drosophila* patterning is established by differential association of mRNAs with P bodies. *Nat Cell Biol* **14**, 1305-13.
- Wellmann, S., Buhrer, C., Moderegger, E., Zelmer, A., Kirschner, R., Koehne, P., Fujita, J., and Seeger, K. (2004). Oxygen-regulated expression of the RNA-binding proteins RBM3 and CIRP by a HIF-1-independent mechanism. *J Cell Sci* **117**, 1785-94.
- Wright, P. E., and Dyson, H. J. (2015). Intrinsically disordered proteins in cellular signalling and regulation. *Nat Rev Mol Cell Biol* **16**, 18-29.
- Yeo, G. W., Coufal, N. G., Liang, T. Y., Peng, G. E., Fu, X. D., and Gage, F. H. (2009). An RNA code for the FOX2 splicing regulator revealed by mapping RNA-protein interactions in stem cells. *Nature Structural & Molecular Biology* **16**, 130-7.
- Zander, S., Baumann, S., Weidtkamp-Peters, S., and Feldbrügge, M. (2016). Endosomal assembly and transport of heteromeric septin complexes promote septin cytoskeleton formation. *J Cell Sci* **129**, 2778-92.
- Zappulo, A., van den Bruck, D., Ciolli Mattioli, C., Franke, V., Imami, K., McShane, E., Moreno-Estelles, M., Calviello, L., Filipchuk, A., Peguero-Sanchez, E., Müller, T., Woehler, A., Birchmeier, C., Merino, E., Rajewsky, N., Ohler, U., Mazzoni, E. O., Selbach, M., Akalin, A., and Chekulaeva, M. (2017). RNA localization is a key determinant of neurite-enriched proteome. *Nat Commun* **8**, 583.
- Zhong, P., and Huang, H. (2017). Recent progress in the research of cold-inducible RNA-binding protein. *Future Sci OA* **3**, FSO246.
- Zhu, X., Bührer, C., and Wellmann, S. (2016). Cold-inducible proteins CIRP and RBM3, a unique couple with activities far beyond the cold. *Cell Mol Life Sci* **73**, 3839-59.
- Ziemienowicz, A., Haasen, D., Staiger, D., and Merkle, T. (2003). Arabidopsis transportin1 is the nuclear import receptor for the circadian clock-regulated RNA-binding protein AtGRP7. *Plant Mol Biol* **53**, 201-212.
- Zimyanin, V. L., Belaya, K., Pecreaux, J., Gilchrist, M. J., Clark, A., Davis, I., and St Johnston, D. (2008). In vivo imaging of oskar mRNA transport reveals the mechanism of posterior localization. *Cell* **134**, 843-53.
- Zucal, C., D'Agostino, V., Loffredo, R., Mantelli, B., NatthakanThongon, Lal, P., Latorre, E., and Provenzani, A. (2015). Targeting the multifaceted HuR protein, benefits and caveats. *Curr Drug Targets* **16**, 499-515.

7. Ergänzende Daten

Auf dem Datenträger der dieser Arbeit beiligt befinden sich folgende Daten:

1. Eine elektronische Version dieser Arbeit
2. Auswertung der iCLIP Analysen
3. Datensätze der iCLIP Experimente (.bed Dateien)
4. Skript der bioinformatischen Auswertung
5. Auswertung der RNASeq Daten
6. Datensätze der RNASeq Experimente
7. Filme, die zur Erstellung von Kymographen verwendet worden sind

8. Anhang

8.1 Bindung der Septin mRNAs durch Rrm4 und Grp1B

Die vier Septin mRNAs (*cdc3*, *cdc10*, *cdc 11* und *cdc12*) konnten in der vorliegenden Arbeit als Ziel-Transkripte des endosomalen mRNA Transports bestätigt werden. Die Verteilung der Rrm4 und Grp1B Bindestellen sind in Abbildung 8.1 gezeigt.

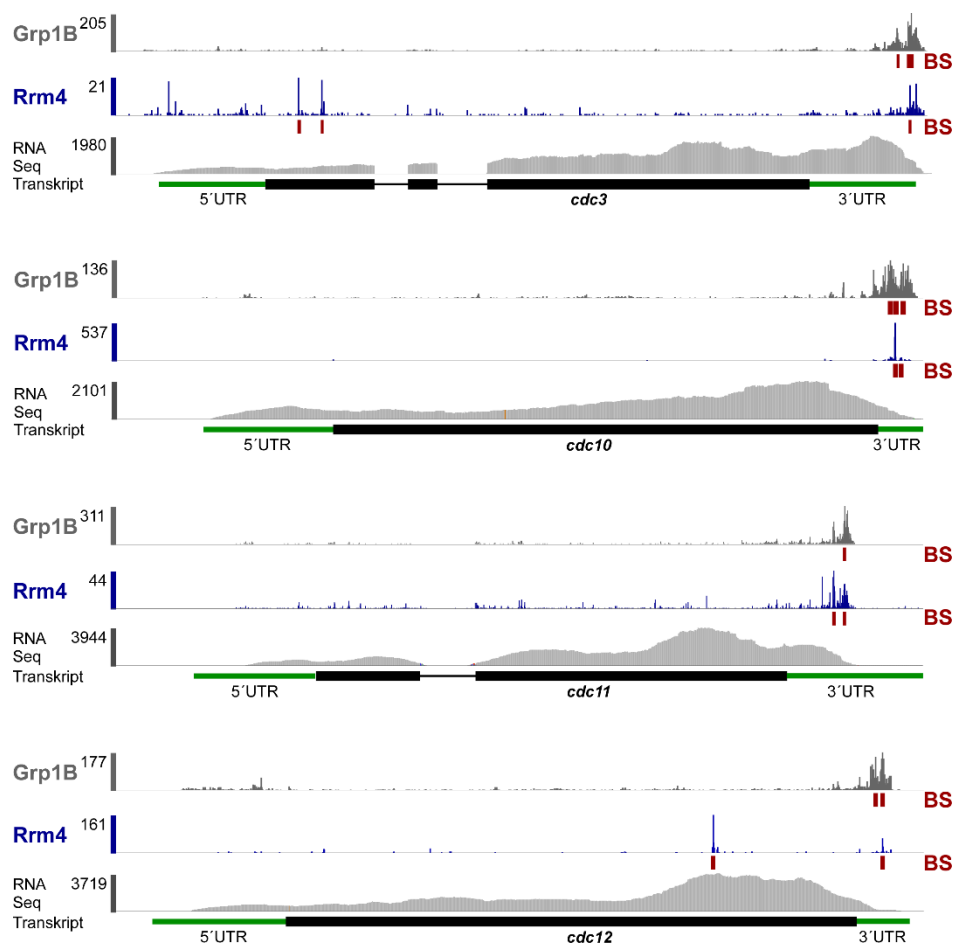


Abbildung 8.1 Septin mRNAs tragen Rrm4 und Grp1B Bindestellen überwiegend in ihrer 3'UTR. Verteilung der Quervernetzungsereignisse (QE) und Bindestellen (BS) von Grp1B und Rrm4 entlang der Septin mRNAs (*cdc3*: UMAG_10503, *cdc10*: UMAG_10644, *cdc11*: UMAG_03449, *cdc12*: UMAG_03599). Die QE sind in grau für Grp1B und in blau für Rrm4 dargestellt. Die putativen Bindestellen (BS), die zu den 25 % der stärksten BS gehören, sind in rot gezeigt. Neben den iCLIP-Daten sind auch die RNASeq-Daten visualisiert. 5'UTR und 3'UTR sind in grün hervorgehoben. Die Länge der UTRs wurden anhand der RNASeq Reichweiten ermittelt.

8.2 Rrm4 bindet spezifische Ziel-mRNAs am Stoppkodon und am Ende der 3'UTR

Im Gegensatz zu Grp1B akkumulieren die Rrm4 Bindestellen nicht ausschließlich in den 3'UTRs, sondern für bestimmte Transkripte auch am Stoppkodon, wie es zum Beispiel für Untereinheiten der F_0F_1 ATP-Synthase der Fall ist (Abb. 2.14). Zusätzlich konnte eine Anreicherung der Rrm4 Bindestellen am Ende der 3'UTR beobachtet werden (Abb. 8.2). Ob diese Anreicherung auf die Upa1- und Upa2-abhängige mRNP Organisation zurückzuführen ist, oder auf eine bessere Zugänglichkeit am Ende der 3'UTRs, müsste genauer untersucht werden.

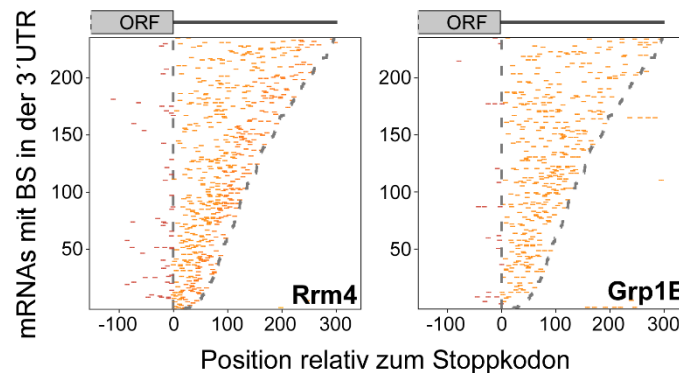


Abbildung 8.2 Rrm4 Bindestellen häufen sich am Ende der 3'UTR Die positionelle Karte zeigt die Verteilung der Bindestellen (BS) von Rrm4 (links) und Grp1B (rechts) am Stoppkodon und entlang der 3'UTRs. Untersucht wurden 234 zufällig ausgewählten Ziel-Transkripte, bei denen das Ende der 3'UTR anhand der RNASeq-Daten manuell bestimmt wurde. Die Transkripte wurden der Länge der 3'UTR entsprechend (von lang zu kurz) geordnet. Die Abbildung wurde modifiziert nach Olgeiser et al., 2019 (Abb. 4C).

8.3 Grp1B bindet mRNAs die für Proteine des Zellzykluses und der Zellwand kodieren

Die phänotypische Charakterisierung von Grp1B deutet darauf hin, dass Grp1B ein multifunktionales Protein ist, das an vielen zellbiologischen Prozessen beteiligt sein kann. Insbesondere das Längenwachstum deutet daraufhin, dass Grp1B in der Regulation des Zellzykluses involviert sein könnte. Dieser Theorie entsprechend bindet Grp1B mRNAs die für die Proteine des Zellzykluses kodieren (Abb. 8.3A). Neben der Regulation der Zelllängen ist Grp1B wichtig bei der Kälte- und Zellwandstressantwort. So konnten Ziel-mRNAs identifiziert werden, die von Grp1B gebunden werden und wichtig für die Zellwandintegrität sind (Abb. 8.3B).

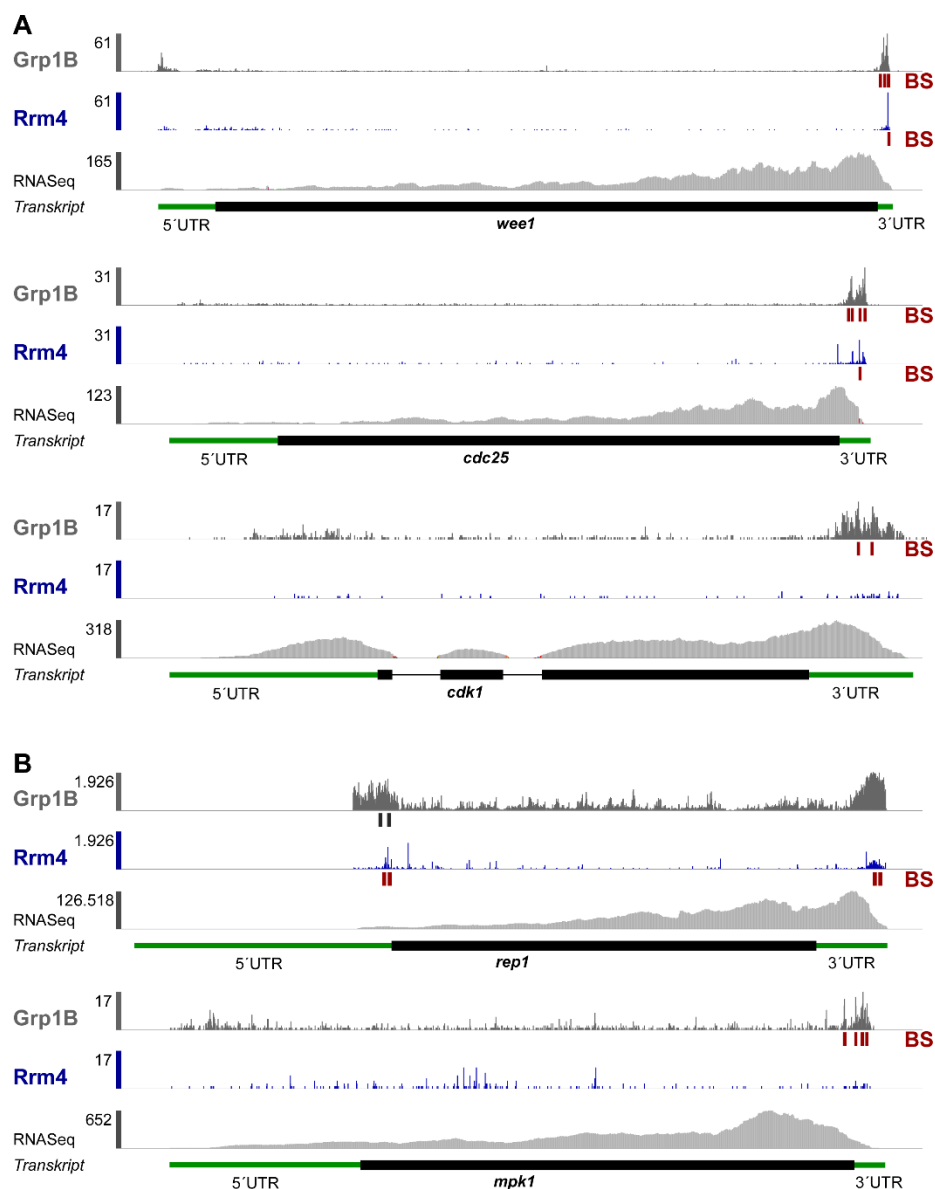


Abbildung 8.3 Grp1B bindet mRNAs die für Proteine des Zellzykluses kodieren **A)** Die positionelle Karte zeigt die Verteilung der QE und BS von Grp1B und Rrm4 entlang von mRNAs die für Proteine des Zellzykluses kodieren (*wee1*: UMAG_06337, *cdc25*: UMAG_00277 *cdk1*: UMAG_10705). Die QE sind in grau für Grp1B und in blau für Rrm4 dargestellt. Die putativen BS, die zu den 25 % der stärksten BS gehören, sind in rot gezeigt. Neben den iCLIP-Daten sind auch die RNASeq-Daten visualisiert. Die 5'UTR und 3'UTR sind in grün hervorgehoben. Die Länge der UTRs wurden anhand der RNASeq Reichweiten ermittelt. **B)** Die Verteilung der QE und BS für Grp1B und Rrm4 entlang von *rep1* (UMAG_03924) und *mpk1* (UMAG_10107) mRNA. Obwohl eine massive Anreicherung an QE für Grp1B entlang der *rep1* mRNA dekletiert werden konnten, wurde unter den stringenten Filterkriterien keine Bindestellen ermittelt. Nur in dem ungefilterten Datensatz werden die QE als Bindestellen identifiziert (graue Balken).

8.4 Die Expression beider Grp1 Isoformen ist wichtig für das Wachstum von *U. maydis*

Um die Funktion von Grp1 zu charakterisieren wurden sowohl *grp1* deletiert als auch C-terminale Gfp-Fusionen beider Isoformen hergestellt (Grp1A-Gfp und Grp1B-Gfp). Zusätzlich wurde der Stamm *grp1_{AB}-gfp* hergestellt, der neben der Gfp-markierten *grp1B* Variante, die native *grp1A* Isoform koexprimiert (Abb. 2.2A).

Die Deletion von *grp1* führt zur Reduktion des Wachstums (Abb. 2.1C und 8.4A). Wird nur eine der Isoformen exprimiert, so ist die Wachstumsgeschwindigkeit vergleichbar mit der des Wildtyps (Abb. 8.4A). Interessanterweise ist ein deutlicher Unterschied in der Koloniemorphologie zu beobachten. Werden beide Isoformen exprimiert, so erscheint die Kolonienoberfläche matt und der Kolonienrand flach. Die Kolonien der *grp1* Deletionsmutante erscheinen dagegen glänzend (Abb. 8.4B). Die Stämme die *grp1A-gfp* und *grp1B-gfp* exprimieren unterscheiden sich phänotypisch von den Kontrollstämmen. Diese Mutanten weisen einen stark gewellten, erhabenen Rand auf (Abb. 8.4B). Dies spricht dafür, dass die Expression beider Isoformen für ein effizientes Wachstum benötigt wird.

Des Weiteren wurde die Beteiligung der beiden Isoformen beim Kältestress untersucht. Hierzu wurde das hefeartige Wachstum auf aktivkohlehaltigem Festmedium bei einer Temperatur von 28 °C und 20 °C untersucht. Bei Kältestress zeigen die Gfp-Fusionen die gleiche Morphologie wie der Deletionsstamm auf (Abb. 8.4B). Um den Phänotyp des Deletionsstammes vollständig zu komplementieren sind somit beide Isoformen notwendig.

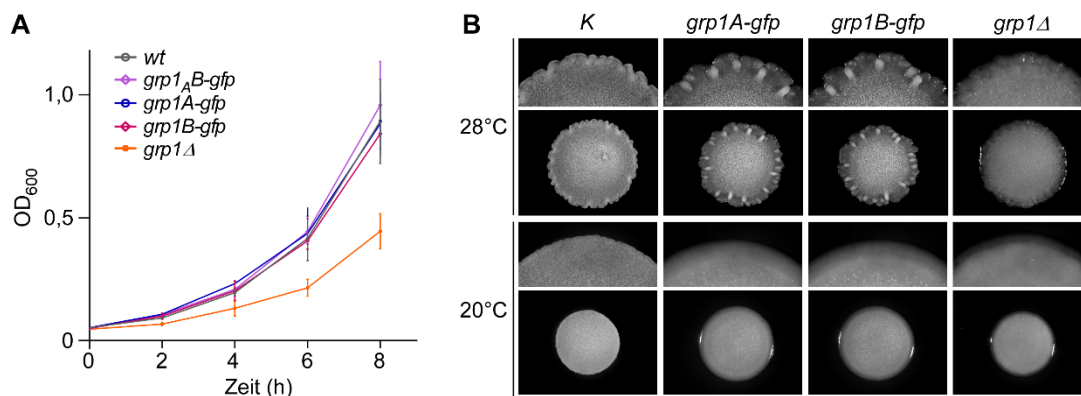


Abbildung 8.4 Grp1 Isoformen A) Exemplarische Wachstumskurve vom Wildtyp-Stamm (AB33), dem Deletionsstamm *grp1Δ* sowie der C-terminalen *grp1_{AB}-gfp* Fusion. Der Stamm *grp1-gfp* exprimiert sowohl das Fusionsprotein Grp1B-Gfp als auch die native Isoform Grp1A. Die Stämme *grp1A-gfp* und *grp1B-gfp* exprimieren nur das entsprechende Fusionsprotein und nicht zusätzlich die andere native Isoform. Die untersuchten Stämme wurden in CM angezogen und deren optische Dichte bei 600 nm alle 2 Stunden gemessen. Die OD₆₀₀ wurde gegen die Zeit (h) aufgetragen. **B)** Kältestresstest mit den Stämmen *grp1_{AB}-gfp* als Kontrollstamm (K), *grp1A-gfp*, *grp1B-gfp* und *grp1Δ*. 3 µl Hauptkultur (OD₆₀₀=0,5) wurden pro aktivkohlehaltigen CM-Agarplatte

getropft und bei 28 °C für einen Tag und bei 20 °C für fünf Tage inkubiert. Dargestellt sind einzelne Kolonien und die Vergrößerung des Kolonienrandes für einen besseren Vergleich.

8.5 Die Expression beider Grp1 Isoformen ist wichtig für das Wachstum von *U. maydis*

Die Koloniemorphologie der Deletionsmutante bei Kältestress zeigte Ähnlichkeit zu der *rep1*-Mutante, die eine veränderte Zellwandoberflächenhydrophobizität aufweist (Teertstra et al., 2006). Aus diesem Grund wurde die Zellwandoberflächenhydrophobizität bei beiden Grp1 Isoformen getestet (Abb. 8.5). Dazu wurde ein Wassertropfen auf die Kolonie des jeweiligen Stammes getropft. Auf Zellen mit einer intakten Oberflächenhydrophobizität verbleibt der Wassertropfen in seiner runden Form bestehen. Ist die Oberflächenhydrophobizität verändert, so ist die Integrität des Wassertropfens nicht mehr gewährleistet und dieser zerfließt auf der Kolonie. Untersucht wurde sowohl das hefeartige als auch das hyphale Wachstum bei optimaler Temperatur (28 °C) und bei Niedrigtemperaturen (20 °C und 16 °C). Beim hefeartigen Wachstum zeigte die *grp1*-Deletionsmutante bereits beim Wachstum unter der optimalen Temperatur eine veränderte Oberflächenhydrophobizität, entsprechend blieb der Wassertropfen nicht in seiner Form bestehen (Abb. 8.5 A). Mit abnehmender Temperatur verstärkte sich das Phänomen, indem der Wassertropfen seine Form verlor und auf der Kolonie zerfloss. Wird nur eine der Isoformen exprimiert, so scheint die Zellwandoberflächenhydrophobizität unter der optimalen Wachstumstemperatur nicht gestört zu sein. Bei niedrigen Temperaturen hingegen, scheint die Oberflächenhydrophobizität, ähnlich wie bei der Deletionsmutante gestört zu sein (Abb. 8.5A). Diese Beobachtung trifft nicht auf das hyphale Wachstum zu. Während des hyphalen Wachstums ist die Oberflächenhydrophobizität nur bei dem Deletionsstamm bei 16 °C verändert, der Wassertropfen blieb nicht in seiner runden Form erhalten (Abb. 8.5B).

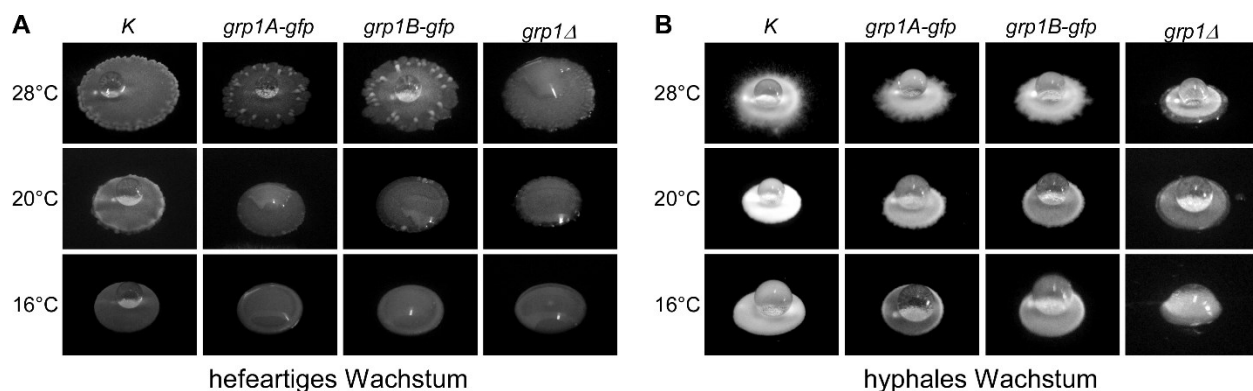


Abbildung 8.5 Grp1 hat eine veränderte Zelloberflächenhydrophobizität **A)** Untersuchung der Zelloberflächenhydrophobizität während des hefeartigen Wachstums. Die Stämme wurden wie in Abbildung 7.4D beschrieben angezogen. Auf jede Kolonie wurde ein Wassertropfen (5µl) getropft und seine Form dokumentiert. **B)** Untersuchung der Zelloberflächenhydrophobizität während des hyphalen Wachstums.

Danksagung

Ein herzlicher Dank gilt an erster Stelle Herrn Prof. Dr. Michael Feldbrügge für das spannende und herausfordernde Projekt, für die exzellente Betreuung während der gesamten Doktorarbeit sowie für die gemeinsame lehrreiche Reise nach Kanada, bei der uns zum Glück nicht die Nasen abgefrohren sind.

Herrn Prof. Dr. Heiner Schaal danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens sowie der Betreuung meiner Arbeit im Rahmen der MOI-Graduiertenschule.

Der Graduiertenschule „Molecules of Infection“ möchte ich danken, dass ich als ein assoziiertes Mitglied an zahlreichen Veranstaltungen teilnehmen durfte. Dabei gilt mein Dank insbesondere Frau Dr. Inge Krümpelbeck für die Koordination und Organisation der Graduiertenschule.

Ein riesen Dankeschön geht an Kathi Zarnack; ohne ihre Hilfe wäre der bioinformatische Teil der iCLIP Analyse wohl niemals zustande gekommen. In diesem Zusammenhang möchte ich auch Susane Boerner, Julian König, Reymond Sutandy und Anke Busch danken, die die iCLIP Proben für die Sequenzierung vorbereitet haben und auch die ersten Qualitätskontrollen der iCLIP-Banken durchgeführt haben. Sowohl Kathi als auch Julian, danke ich für ihre Gastfreundschaft und die offenen Türen bei den zahlreichen „Hekatrons“ in Mainz.

Ein großer Dank gilt allen Feldis die mich während der gesamten Doktorarbeit begleitet haben. Insbesondere Sabrina, Carl und Thomas möchte ich für die tolle gemeinsame Zeit im Labor und für jedes Feierabendbierchen danken. Aber auch allen anderen RAB-Lab Mitgliedern, Sebastian, Kira, Silke, Markus, Ute, Simone, Diana, Nina, Woogie, Senthil und Sri danke ich für die tolle Arbeitsatmosphäre.

Insbesondere Carl, Sabrina, Nina, Vera, Kerstin, meiner Freundin Sarah und meiner Cousine Julia möchte ich danken, dass sie sich die Mühe gemacht haben meine Arbeit zu korrigieren und mir mit konstruktiver Kritik zur Seite gestanden haben.

Ein ganz besondere Dank gilt meiner Familie (Mama, Papa, Schwiegermama, Schwiegerpapa und Schwägerin), ohne deren Hilfe ich wahrscheinlich immer noch an der Arbeit schreiben würde. Danke, dass ihr so toll auf Jannik aufgepasst habt und mir somit wertvolle Zeit geschenkt habt um die Arbeit zu beenden.

Meiner kleinen Familie, Björn und Jannik, möchte ich dafür danken, dass ihr so geduldig mit mir wart und mich während der gesamten Zeit großartig unterstützt habt, unabhängig davon wie stressig es für uns alle war.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Lilli Olgeiser
Geburtsdatum 07. September 1984
Geburtsort Saran

Schulische und universitäre Ausbildung

- 12/2012- heute **Promotionsstudium Biologie**
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, Institut für Mikrobiologie,
Prof. Dr. Michael Feldbrügge
Thema: „Transkriptomweite Identifizierung von
Ziel-Transkripten des endosomalen mRNPs
mittels iCLIP in *Ustilago maydis*“
- 10/2010 – 12/2012 **Master of Science Biology**
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf,
Institut für Physikalische Biologie
Prof. Dr. Rolf Wagner
Thema: „Wechselbeziehungen zwischen den beiden bakteriellen
Transkriptionsregulatoren DksA und 6S RNA“ (Note: 1,0)
- 10/2007 – 09/2010 **Bachelor of Science Biology**
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf,
Institut für Molekulare Enzymtechnologie (IMET)
Prof. Dr. Werner Hummel
Thema: „Charakterisierung zweier bakterieller N-ethylmaleinimid-
reduktasen“ (Note: 1,3)
- 08/2005 – 2007 **Staatlich geprüfte biologisch-technische Assistentin**
Berufskolleg Hilden
Erfolgreich absolvierte BTA-Ausbildung mit dem Schwerpunkt
Biochemie/Molekularbiologie
Thema des Praktikums am pathologischen Institut:
„Lymphknoteninfektion und deren Diagnose mittels unterschiedlicher
Färbemethoden“ (Note: 1)
- 08/1996 – 07/2005 **Allgemeine Hochschulreife**
Gesamtschule Brüggen

Publikationen

Lilli Olgeiser, Carl Haag, Susan Boerner, Jernej Ule, Anke Busch, Janine Koepke, Julian König, Michael Feldbrügge, and Kathi Zarnack (2019) The key protein of endosomal mRNA transport Rrm4 binds translational landmark sites of cargo mRNAs. *EMBO Rep* 20.

Programme und Graduiertenschulen

- Seit 2014 Mitglied des **SelmaMeyerMentoring** Programms
Programm für Förderung junger Wissenschaftlerinnen mit den Schlüsselqualifikationen: „Leadership and Conflict Management“
- Seit 06/2013 Kollegiatin des **MOI II** (Molecules of Infection) Graduiertenkollegs
Interdisziplinäre Graduiertenschule mit dem Fokus auf die Infektionsbiologie der vier großen Erregergruppen Viren, Bakterien, Protozoen und Pilze sowie der Immunantwort der Wirtszelle. Das Curriculum beinhaltet die Teilnahme an Vorlesungen, Labor-Rotationen, Verfassen von Statusberichten, Training von Schlüsselqualifikationen sowie die aktive Teilnahme und Planung von Symposien.
Mit der finanziellen Hilfe der MOI II Graduiertenschule habe ich mit vier weiteren Kolleginnen eigenständig einen Carrier Day organisiert.
- Seit 12/2012 Mitglied der **iGRAD** (Interdisciplinary Graduate and Research Academy Düsseldorf) sowie der **HeRA** (Heine Research Academies) Düsseldorf
Teilnahme an Workshops: Good Scientific Practice, Presenting Science, Get into teaching for doctoral Researchers

Konferenzen und Poster

- 06/2017 RMU-RNA Salon on Genomics approaches in RNA biology
Mündliche Präsentation:
“Transcriptome-wide identification of endosomal mRNP targets”
- 02/2017 Keystone Symposia Conference on Protein-RNA Interactions: Scale, Mechanisms, Structure and Function of Coding and Noncoding RNPs
Banff, Alberta, Canada
Mündliche- und Posterepräsentation:
“Transcriptome-wide analysis of endosomal mRNP transport”
- 04/2013 EMBO Conference on Eukaryotic RNA Turnover: From Structural Insights to Diseases
Posterepräsentation:
„Transcriptome-wide insights into Rrm4-mediated mRNA transport in *Ustilago maydis*“