

**Identifizierung einer neuen Rrm4-abhängigen
Komponente des endosomalen mRNA-Transports
in *Ustilago maydis***

Inaugural-Dissertation

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

vorgelegt von

Markus Tulinski
aus Tarnowitz

Düsseldorf, Januar 2021

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

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

Berichtersteller:

1. Prof. Dr. Michael Feldbrügge

2. Prof. Dr. Thomas Klein

Tag der mündlichen Prüfung: 19.04.2021

Eidesstattliche Erklärung

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

Ort, Datum

Markus Tulinski

Die Untersuchungen zur vorliegenden Arbeit wurden von Februar 2016 bis März 2020 in Düsseldorf an der Heinrich-Heine-Universität im Institut für Mikrobiologie unter der Betreuung von Herrn Prof. Dr. Michael Feldbrügge durchgeführt.

Zusammenfassung

Der Transport von mRNAs und deren lokale Translation spielen in eukaryotischen Zellen eine wichtige Rolle für eine Vielzahl von zellulären Prozessen, wie polarem Wachstum oder der Instandhaltung von Mitochondrien. Die mRNAs werden hierbei durch RNA-bindende Proteine gebunden und als messenger-Ribonukleoprotein (mRNP) -Komplex Membran-gekoppelt aktiv entlang des Cytoskeletts transportiert. Der endosomale mRNA-Transport wurde zum ersten Mal in dem phytopathogenen Pilz *Ustilago maydis* beschrieben. Hierbei wird die mRNA durch einen, an frühe Endosomen gekoppelten mRNP-Komplex entlang des Mikrotubuli-Cytoskeletts transportiert. Die entscheidende Rolle spielt hierbei das RNA-bindende Protein Rrm4, welches durch das Adapterprotein Upa1 an die Membran des frühen Endosoms verankert wird. Obwohl bereits einige weitere Komponenten identifiziert werden konnten, ist die genaue Komposition des mRNP-Komplexes unbekannt. Derzeit werden noch andere Komponenten vermutet, die zur Funktion und Regulation des endosomalen mRNA-Transports beitragen.

In dieser Arbeit wurden zwei proteinzentrische Methoden angewendet, um weitere Proteine des endosomalen mRNP-Komplexes zu identifizieren. Zum einen wurde versucht, die APEX2-vermittelte unspezifische Umgebungsmarkierung für eine *in vivo*-Anwendung in *U. maydis* zu etablieren. Bei dieser Methode sollten alle Proteine, die sich in näherer Umgebung von Rrm4 befinden, mit Biotin-Phenoxy markiert werden. Mit Hilfe dieser Markierung könnten so potentielle Interaktionspartner von Rrm4 identifiziert werden. Diese Methode erwies sich jedoch in *U. maydis* als unzuverlässig. Daher wurde alternativ eine Immunpräzipitation von Rrm4 durchgeführt, bei welcher alle co-immunpräzipitierten Proteine durch eine massenspektrometrische Analyse identifiziert wurden. Diese identifizierte eine Vielzahl potentieller mRNP-Komplex-Komponenten, welche anhand ihrer Funktion und Abundanz gefiltert wurden. Hierbei wurde das Ssd1-Homolog aus *Saccharomyces cerevisiae* als potentieller Bestandteil des mRNP-Komplexes identifiziert. Ssd1 erwies sich als interessanter Kandidat, da bereits in anderen Pilzen homologe Proteine als RNA-bindende Proteine beschrieben wurden, welche bei der Regulation der Translation eine wichtige Rolle spielen. Lokalisationsstudien zeigten, dass Ssd1-Gfp nahezu vollständig mit Rrm4 auf frühen Endosomen colokalisiert. Zudem erwies sich die endosomale Lokalisation von Ssd1 als Rrm4-abhängig. In Übereinstimmung mit einer möglichen Beteiligung von Ssd1 am hyphalen Wachstum von *U. maydis* zeigte die Überexpression von Ssd1 starke Auswirkungen auf das polare Wachstum von hyphalen Zellen. Somit wurde in dieser Arbeit Ssd1 als weitere Rrm4-abhängige mRNP-Komplex-Komponente identifiziert, welche wahrscheinlich als regulatorischer Bestandteil, der wiederum durch eine NDR-Proteinkinase reguliert wird, die lokale Translation und dadurch das polare Wachstum beeinflusst.

Summary

The transport of mRNAs and their local translation play an important role in a multitude of cellular processes in eukaryotic cells, like polar growth and the maintenance of mitochondria. mRNAs are bound by RNA-binding proteins and transported in a membrane-coupled messenger ribonucleoprotein (mRNP) complex along the cytoskeleton. The endosomal mRNA transport has first been described in the plant pathogenic fungus *Ustilago maydis*. Here the mRNAs are transported along the microtubule cytoskeleton by a mRNP complex which is bound to an early endosome. The RNA-binding protein Rrm4 plays a key role in the endosomal mRNP complex and is anchored by the adapter protein Upa1 to the membrane of the endosome. Although additional components have been successfully identified the exact composition of the mRNP complex is still unknown. Currently it is assumed that there might be more components involved in function and regulation of the endosomal mRNA transport.

In this thesis two protein-centric methods have been applied in order to identify novel endosomal mRNP complex proteins. One strategy was to establish APEX2-mediated unspecific proximity labeling for an *in vivo* application in *U. maydis*. This method should enable the biotin-phenoxyl labeling of all proteins in close proximity to Rrm4. This labeling could then be utilized to identify potential Rrm4 interaction partners. However, this method turned out to be unreliable in *U. maydis*. Hence as alternative an immunoprecipitation of Rrm4 has been performed in which all co-purified proteins have been identified by mass spectrometry. The results of this experiment yielded a variety of potential mRNP complex components, which have been filtered by their function and abundance. This way the Ssd1 homolog of *Saccharomyces cerevisiae* has been identified as a potential mRNP complex candidate. Ssd1 proved to be an interesting candidate since its homologs have been already described in other fungi as RNA-binding proteins which play an important role in regulation of translation. Localization studies showed that Ssd1-Gfp co-localizes nearly completely with Rrm4 on early endosomes. Furthermore, it could be shown that the endosomal localization of Ssd1 is Rrm4 dependent. In compliance with a possible involvement of Ssd1 in hyphal growth in *U. maydis*, an overexpression of Ssd1 had immense impact on the polar growth of hyphal cells. Consequently, this thesis identifies Ssd1 as a novel Rrm4-dependent mRNP complex component, which is likely a regulatory constituent, that is in turn regulated by a NDR kinase, influencing local translation and thereby polar growth.

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius	mRNA	<i>messenger RNA</i> (Boten-RNA)
µg	Mikrogramm	mRNP	<i>messenger</i> Ribonukleoprotein
µL	Mikroliter	mts	<i>Mitochondrial-targeting</i> <i>sequence</i>
µm	Mikrometer	nat	Nourseothricin
µM	Mikromol	ng	Nanogramm
Amp	Ampicillin	nls	<i>Nuclear localization signal</i>
As	Aminosäure(n)	nm	Nanometer
BSA	<i>Bovine serum albumin</i>	NM	Nitrat Medium
bzw.	beziehungsweise	N-terminal	Aminoterminal
ca.	circa	OD	optische Dichte
CM	<i>Complete</i> Medium	PAM2	<i>PABP-interacting motif 2</i>
C-terminal	Carboxyterminal	PAM2L	<i>PABP-interacting motif 2 like</i>
DF	Durchfluss	RNA	Ribonukleinsäure
DIC	<i>differential interference contrast</i>	rpm	<i>rounds per minute</i>
DIG	Digoxigenin	RRM	<i>RNA recognition motif</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure	s	Sekunden
E	Eluat	SDS-PAGE	<i>sodium dodecyl sulfate</i> <i>polyacrylamide gel</i> <i>electrophoresis</i>
E.I.	einzelne Insertion	SMVT	<i>Sodium-dependent multivitamin</i> <i>transporter</i>
et al.	und weitere	ssDNA	<i>single stranded DNA</i>
g	Gramm	ssRNA	<i>single stranded RNA</i>
Gfp	<i>green fluorescent protein</i>	TM	Transmembrandomäne
GZ	Gesamtzellextrakt	U	Unit (Einheit Enzymaktivität)
hyg	Hygromycin	UpM	Umdrehungen pro Minute
iCLIP	<i>individual-nucleotide resolution</i> <i>UV crosslinking and</i> <i>immunoprecipitation</i>	UTR	untranslatierte Region
kb	Kilobase	UV	Ultraviolett
kDa	Kilodalton	v/v	Volumenprozent
L	Liter	w/v	Gewichtsprozent
M	Mol	W1	Waschschritt 1
M.I.	multiple Insertion	W2	Waschschritt 2
mg	Milligramm	W3	Waschschritt 3
min	Minuten	wt	Wildtyp
mL	Milliliter		
MLLE	Mademoiselle-Domäne		
mM	Millimol		

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	I
Summary	II
Abkürzungsverzeichnis	III
Inhaltsverzeichnis	IV
1. Einleitung	1
1.1 Die Rolle des mRNA-Transports.....	1
1.2 Der Modellorganismus <i>Ustilago maydis</i>	2
1.3 Der endosomale mRNA-Transport in <i>U. maydis</i>	5
1.4 Identifikation neuer endosomaler mRNP-Komplex-Komponenten.....	8
1.4.1 Die unspezifische Umgebungsmarkierung durch APEX2	8
1.4.2 Nutzung einer Immunpräzipitation in Verbindung mit einer quantitativen markierungsfreien massenspektrometrischen Analyse	9
1.5 Zielsetzung dieser Arbeit.....	11
2. Ergebnisse	13
2.1 Etablierung der APEX2-Methode für die <i>in vivo</i> -Markierung.....	13
2.1.1 Etablierung eines alternativen Biotin-Transporters.....	16
2.1.2 Etablierung eines Membranpermeabilisierungsverfahrens	20
2.2 Massenspektrometrische Analyse einer Rrm4-Immunpräzipitation	26
2.2.1 Immunpräzipitation von Rrm4.....	26
2.2.2 Analyse der massenspektrometrischen-Daten der co-immunpräzipitierten Proteine	30
2.2.3 Identifikation der vielversprechendsten Kandidaten	34
2.3 Untersuchung des Kandidaten UMAG_01220 - <i>ssd1</i>	37
2.3.1 Bioinformatische Analyse von Ssd1	37
2.3.2 Analyse der Ssd1-Lokalisation	40
2.3.3 Analyse der zellulären Lokalisation und Bewegungsmusters von Ssd1 im Vergleich zu anderen mRNA-bindenden Proteinen.....	42
2.3.4 Untersuchung der Lokalisation von Ssd1 innerhalb des endosomalen mRNP- Komplexes.....	46
2.3.5 Untersuchung der Ssd1-Funktion durch Etablierung einer regulierbaren <i>ssd1</i> - Expression.....	50
3. Diskussion	54
3.1 Die Ermöglichung der <i>in vivo</i> -Markierung von Proteinen in <i>U. maydis</i>	54
3.1.1 Der alternative Biotin-Transporter SMVT	55
3.1.2 Nutzung eines Membranpermeabilisierungsverfahrens	58
3.2 Identifikation neuer Komponenten durch eine massenspektrometrische Analyse...62	
3.2.1 Die Immunpräzipitation von Rrm4	62

3.2.2 Posttranslationale Modifikationen von Rrm4	63
3.2.3 Auswertung der massenspektrometrischen Analyse.....	66
3.2.4 Die vielversprechendsten Kandidaten der massenspektrometrischen Analyse	68
3.2.5 Weitere Optimierungen der massenspektrometrischen Analysen.....	71
3.3 Charakterisierung der neuen endosomalen mRNP-Komplex-Komponente Ssd1 ...	73
3.3.1 Der mRNA-bindende Translationsrepressor Ssd1	73
3.3.2 Ssd1 ist ein Rrm4-abhängiger Teil des endosomalen mRNP-Komplexes	77
3.3.3 Funktionsanalyse durch Regulation der <i>ssd1</i> -Expression.....	81
3.4 Ausblick.....	86
4. Material und Methoden.....	88
4.1 Material und Bezugsquellen.....	88
4.1.1 Chemikalien, Puffer, Lösungen, Medien, Enzyme und Kits.....	88
4.1.2 Oligonukleotide.....	91
4.1.3 Plasmide.....	91
4.1.4 Stämme	94
4.2 Mikrobiologische, zellbiologische und genetische Methoden.....	95
4.2.1 Arbeiten mit <i>E. coli</i>	95
4.2.2 Arbeiten mit <i>U. maydis</i>	97
4.3 Molekularbiologische Methoden.....	99
4.3.1 Isolierung von Nucleinsäuren	99
4.3.2 Arbeiten mit Nucleinsäuren	100
4.3.3 Polymerase-Kettenreaktion	102
4.3.4 Auftrennung und Nachweis von Nucleinsäuren.....	102
4.3.5 Sequenzierung	105
4.4 Proteinbiochemische Methoden.....	106
4.4.1 Bestimmung der Proteinkonzentration	106
4.4.2 Präparation von Proteinen aus <i>U. maydis</i>	106
4.4.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	107
4.4.4 Western-Blot.....	108
4.4.5 Streptavidin Western-Blot.....	109
4.4.6 Coomassie-Blau-Färbung.....	109
4.4.7 Silberfärbung	110
4.4.8 Unspezifische Umgebungsmarkierung durch APEX2	110
4.4.9 Immunpräzipitation von Gfp-Fusionsproteinen.....	111
4.4.10 Massenspektrometrische Analyse der Gfp-Immumpräzipitationen	112
4.5 Mikroskopie und Bildverarbeitung	112
4.5.1 Mikroskop-Aufbau und Steuerung	112
4.5.2 Fluoreszenzmikroskopie.....	113

4.5.3 Analyse der subzellularen Lokalisation	113
4.5.4 Biotin-Fluorescein-Färbung	113
4.5.5 FM4-64-Färbung.....	114
4.5.6 Colokalisationsstudien und deren Auswertung.....	114
4.5.7 Untersuchung morphologischer Phänotypen	115
4.6 Verwendete Computer-Programme und bioinformatische Analysen	115
5. Literaturverzeichnis.....	116

1. Einleitung

1.1 Die Rolle des mRNA-Transports

Die asymmetrische subzelluläre Lokalisation der mRNA ist ein wichtiger Regulationsmechanismus für die lokale Genexpression in vielen Organismen (Buxbaum et al., 2015). Sie ermöglicht eine räumlich wie auch zeitlich kontrollierte Expression von Proteinen und hat somit einen großen Einfluss auf viele verschiedene Prozesse (Buxbaum et al., 2015). Unter anderem werden so die Polarität der Zelle, die Zelldifferenzierung, und das Zellschicksal reguliert (Lécuyer et al., 2007). Jüngste Erkenntnisse zeigen auch, dass die Erhaltung der mitochondrialen Integrität maßgeblich vom mRNA-Transport beeinflusst wird (Cioni et al., 2019). Die Störung des mRNA-Transport in Neuronen führt zu neuropathischen Erkrankungen wie amyotrophe Lateralsklerose (ALS) und der Charcot-Marie-Tooth-Krankheit (Cioni et al., 2019; Liao et al., 2019).

Obwohl bereits viel über den mRNA-Transport bekannt ist, sind die genauen Mechanismen und alle involvierten Komponenten bei weitem noch nicht vollständig erforscht worden. Dabei könnten neue Erkenntnisse über die Grundprinzipien des mRNA-Transports auch zum besseren Verständnis des mRNA-Transportmechanismus in Neuronen von Menschen führen. Dies würde dabei helfen, die Ursachen von neuropathischen Erkrankungen besser zu verstehen und so möglicherweise Ansätze für Behandlungen zu entwerfen.

Es wurden bereits verschiedene mRNA-Transportmechanismen in unterschiedlichen Organismen entdeckt, wie zum Beispiel der Transport durch Diffusion (Martin & Ephrussi, 2009). Ein prominentes Beispiel für diesen Transportmechanismus wurde in *Drosophila melanogaster* dokumentiert. Dort wird die *nanos*-mRNA mit Hilfe der Plasmaströmung zum entsprechenden Pol des Embryos transportiert (Eliscovich et al., 2013; Forrest & Gavis, 2003; Martin & Ephrussi, 2009). Der am häufigsten beschriebene Transportmechanismus ist jedoch der gerichtete mRNA-Transport (Martin & Ephrussi, 2009). Hierbei wird die mRNA durch spezialisierte Proteine aktiv zu ihrem Zielort transportiert. Obwohl sich der genaue Mechanismus von Organismus zu Organismus unterscheidet, sind jedoch die Grundprinzipien des gerichteten aktiven mRNA-Transports auf einer gewissen Basisebene universell.

Die mRNA wird durch RNA-bindende Proteine (RBP) gebunden, welche sie in einem sogenannten messenger-Ribonukleoprotein (mRNP) -Komplex zu ihrer finalen subzellulären Destination in der Zelle transportiert (Buxbaum et al., 2015). Während des Transports wird die mRNA durch die RBPs vor Degradation durch Ribonukleasen geschützt (Buxbaum et al., 2015). Es wird angenommen, dass die mRNA dabei bis zum Erreichen ihres Ziels translational reprimiert wird (Martin & Ephrussi, 2009). Dies ermöglicht der Zelle

eine Proteinbiosynthese der vor Ort benötigten Proteine. Das mRNA-bindende Protein wird bei einem gerichteten Transport mit Hilfe von Adapterproteinen an den jeweiligen zellulären Transportmechanismus gekoppelt. Ein hervorragend studiertes Beispiel ist der Transport der *ASH1*-mRNA in der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* (Heym & Niessing, 2012). Dort wird die *ASH1*-mRNA durch das She2p-Protein gebunden, welches wiederum durch das Adapterprotein She3p mit dem Motorprotein Myo4p verbunden ist (Heym & Niessing, 2012). So wird die *ASH1*-mRNA entlang des Aktin-Cytoskellets zur Tochterzelle transportiert wo sie lokal translatiert wird (Heym & Niessing, 2012). In *D. melanogaster* dagegen wird während der Oogenese die *oskar*-mRNA vom RNA-bindenden Protein Egl gebunden und mit Hilfe des BicD-Adapterproteins durch Dynein-1-Motorproteine entlang der Mikrotubuli transportiert (Vazquez-Pianzola et al., 2017). In einigen Organismen ist der gerichtete mRNA-Transport auch an membranöse Vesikel gekoppelt (Béthune et al., 2019). Dabei ist das RBP durch ein Adapterprotein an die Membran eines Endosoms oder Lysosoms verankert (Béthune et al., 2019; Cioni et al., 2019; Liao et al., 2019). Der mRNA-Transport auf frühen Endosomen wurde zum ersten Mal beim Pilz *Ustilago maydis* beschrieben und wurde seitdem eingehend erforscht (Zarnack & Feldbrügge, 2010). Dort wird das RNA-bindende Protein Rrm4 über das Adapterprotein Upa1 an das frühe Endosom verankert (Pohlmann et al., 2015). Der Vesikel-gekoppelte mRNA-Transport wurde zudem unter anderem auch in Neuronen nachgewiesen (Cioni et al., 2019; Liao et al., 2019). Der mRNA-Transport findet dort auf späten Endosomen oder Lysosomen statt (Cioni et al., 2019; Liao et al., 2019). Bei dem Transport auf Lysosomen wird der mRNP-Komplex in der RNA-Granule durch das Adapterprotein ANXA11 an die Membran verankert und durch Motorproteine entlang der Mikrotubuli transportiert (Liao et al., 2019). Neuste Ergebnisse zeigten, dass auch in der Reispflanzen endosomaler mRNA-Transport stattfindet (Tian et al., 2020).

Obwohl bereits viel zum gerichteten mRNA-Transport publiziert wurde, ist die Aufklärung der genauen Mechanismen immer noch Bestandteil aktueller Forschung. Die Parallelen zwischen dem vesikulären mRNA-Transport aus Neuronen und *U. maydis* Hyphen, wie auch die einfache Handhabung machen *U. maydis* daher zu einem guten Modellorganismus für die Erforschung universaler Mechanismen des gerichteten mRNA-Transports.

1.2 Der Modellorganismus *Ustilago maydis*

Ustilago maydis ist ein biotropher, phytopathogener Pilz aus der Familie der Basidiomycota. Dieser auch als Maisbeulenbrand bekannte Pilz befällt Maispflanzen (Bölker, 2001). *U. maydis* durchlebt dabei einen dimorphen Lebenszyklus (Abbildung 1 C) bei dem es

zunächst als haploide Hefeform wächst (Abbildung 1 A) (Bölker, 2001). Diese können sich durch Knospung teilen (Bölker, 2001). Auf der Pflanzenoberfläche bilden paarungskompatible Hefezellen Konjugationshyphen, welche anschließend zu einer dikaryotischen Hyphe vereinen. (Vollmeister et al., 2012). Dabei wird die Konjugationshyphenbildung durch Erkennung der Pheromone des kompatiblen Paarungspartners durch Pheromonrezeptoren induziert (Kellner et al., 2011). Der Pheromonrezeptor und das Pheromon werden durch den bi-allelischen *a*-Locus (*a1/a2*) kodiert. Die Konjugationshyphen wachsen entlang des Pheromongradienten aufeinander zu (Vollmeister et al., 2012). Anschließend verschmelzen sie miteinander. Für die erfolgreiche Bildung einer dikaryotischen Hyphe müssen zusätzlich auch die Untereinheiten der Transkriptionsfaktoren *bEast* und *bWest* kompatibel zueinander sein (Kämper et al., 2020). Diese Transkriptionsfaktoruntereinheiten werden vom multi-allelischen *b*-Locus kodiert, wobei 18 verschiedene Loci-Varianten bekannt sind (*b1*, *b2* usw.) (Kämper et al., 2020). Nur Transkriptionsfaktoruntereinheiten aus unterschiedlichen *b*-Loci können einen funktionsfähigen heterodimeren *bE/bW*-Transkriptionsfaktor bilden (Vollmeister et al., 2012). Die unipolaren Hyphen (Abbildung 1 B) stellen die pathogene Form des Pilzes dar (Vollmeister et al., 2012). Bei Wachstum der Hyphe expandiert die Zelle am apikalen Pol, wobei sie regelmäßig Septen im distalen Bereichen einzieht, welche sie von den zurückgebliebenen leeren Sektionen trennt (Lehmle et al., 1997; Steinberg et al., 1998). Die Hyphen bilden ein Appressorium mit welchem sie Zellen der Pflanzenoberfläche penetrieren, um anschließend im Inneren der Pflanze zu proliferieren (Lanver et al., 2018; Mendoza-Mendoza et al., 2009). In der Maispflanze vollendet *U. maydis* den sexuellen Zyklus, indem nach der Karyogamie Teliosporen gebildet werden (Saville et al., 2012; Vollmeister et al., 2012). Diese Teliosporen reifen in Tumoren, welche als Auswüchse am Maiskolben zu erkennen sind (Abbildung 1 D) (Vollmeister et al., 2012). Die Tumoren am Maiskolben sind essbar und gelten in Mexiko als Delikatesse (Olicón-Hernández et al., 2019). Wenn ein Tumor reif geworden ist, platzt er auf und setzt so die die Teliosporen frei (Vollmeister et al., 2012). Aus den keimenden Teliosporen wachsen dann erneut haploide Hefezellen aus womit der Lebenszyklus abgeschlossen ist (Vollmeister et al., 2012). *U. maydis* ist ein vielseitiger Modellorganismus für den Bereich der Genetik und der molekularen Zellbiologie. Das Genom von *U. maydis* ist vollständig sequenziert und annotiert (Kämper et al., 2006). Dies erlaubt eine gezielte Planung genetischer Eingriffe, sowie bioinformatische Analysen. Mittels homologer Rekombination kann *U. maydis* auf genetischer Ebene modifiziert werden (Holloman et al., 2008; Terfrüchte et al., 2017). Zudem sind die Zellen einfach in der Handhabung und leicht kultivierbar. In den letzten Jahren kam *U. maydis* neben der Grundlagenforschung auch für biotechnologisch orientierte Anwendungen zum Einsatz (Feldbrügge et al., 2013; Olicón-Hernández et al.,

2019). So wird, *U. maydis* unter anderem wegen seiner unkonventionellen Sekretion als kompetitive Expressionsplattform etabliert (Feldbrügge et al., 2013; Stock et al., 2012; Terfrüchte et al., 2017, 2018).

Insbesondere die langen unipolaren Hyphen von *U. maydis* eignen sich ideal für die Untersuchung von Langstreckentransportprozessen innerhalb der Zelle (Steinberg & Perez-Martin, 2008). Hierfür können Laborstämme verwendet werden, in welchen das hyphale Wachstum von *U. maydis* künstlich induziert werden kann. Dabei wird kein Paarungspartner benötigt. Bei dem in dieser Arbeit verwendeten Laborstamm AB33 stehen die für das hyphale Wachstum benötigten und miteinander kompatiblen Transkriptionsfaktoruntereinheiten unter der Kontrolle des induzierbaren *Pnar*-Promotors (A. Brachmann et al., 2004). Die von diesem Promotor regulierte Gentranskription kann durch einen Wechsel der Stickstoffquelle im Nährmedium kontrolliert werden (A. Brachmann et al., 2004). Dabei wird die Genexpression durch Ammonium reprimiert und durch Nitrat induziert (A. Brachmann et al., 2004). So erhält man acht Stunden nach der Induktion des Promotors voll ausgewachsene unipolare Hyphen. Für das unipolare Wachstum dieser Hyphen spielt unter anderem der mRNA-Transport eine wichtige Rolle (Becht et al., 2006).

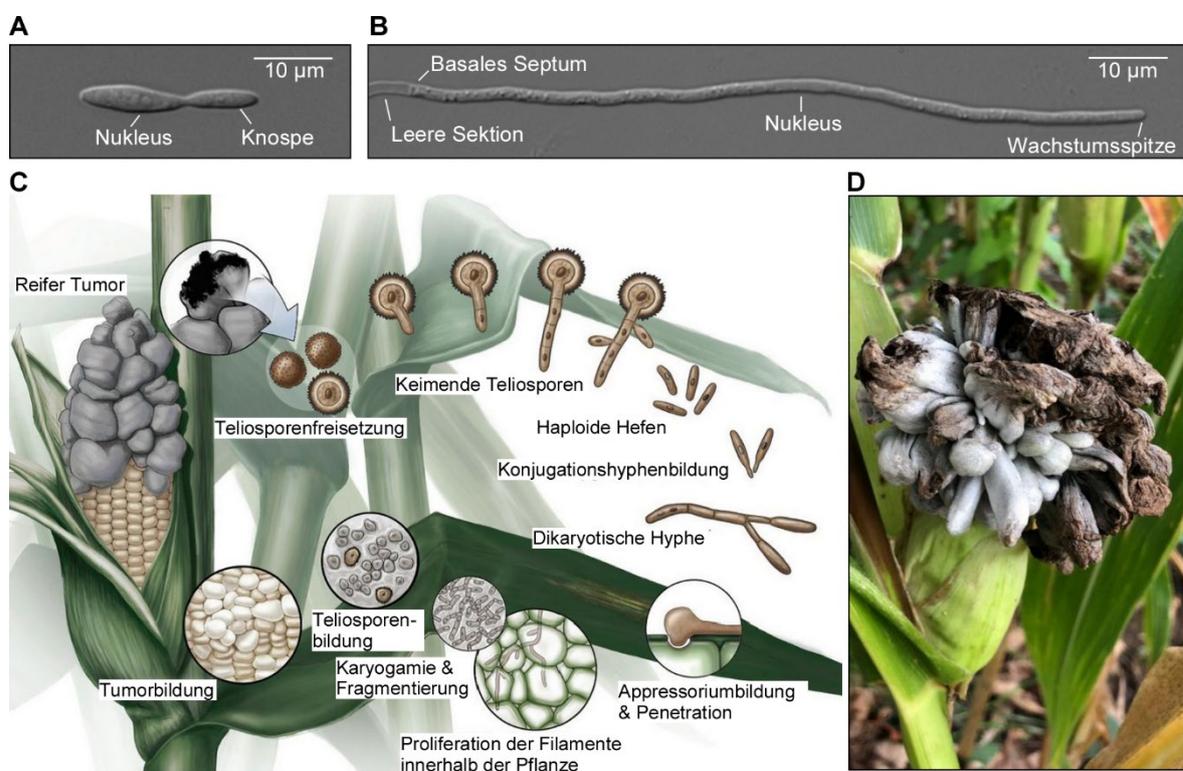


Abbildung 1: Morphologie und Lebenszyklus von *U. maydis*.

Mikroskopische Aufnahmen einer knospenden *U. maydis* Hefezelle (A) und einer Hyphe (B) des induzierbaren Laborstamms AB33. Die Aufnahme der Hyphe wurde gemäß Standardprotokoll acht Stunden nach der Induktion des hyphalen Wachstums aufgenommen. Sowohl die abgebildete

Hefezelle als auch die Hyphe des Laborstamms entsprechen von ihrer Morphologie dem Wildtyp. C) Lebenszyklus von *U. maydis*. Haploide Hefezellen fusionieren mittels Konjugationshyphen zu infektiösen dikaryotischen Hyphen. Mit Hilfe eines Appressoriums penetrieren diese die Maispflanze und proliferieren innerhalb der Pflanze. Dort findet dann die Karyogamie statt und es werden Teliosporen gebildet. Die Teliosporen reifen in den Tumoren und werden anschließend freigesetzt. Aus den keimenden Teliosporen entstehen so wieder haploide Hefezellen und der Lebenszyklus beginnt von neuem. Abbildung modifiziert nach Saville et al., 2012. D) Aufnahme einer durch *U. maydis* infizierten Maispflanze. Man erkennt deutlich die Tumoren, welche den Maiskolben überwuchern. Die Aufnahme wurde in der Nähe der Stadt Neuss in Nordrhein-Westfalen angefertigt.

1.3 Der endosomale mRNA-Transport in *U. maydis*

Der mRNP-Komplex wird in *U. maydis* auf den frühen Endosomen durch die Motorproteine Kinesin und Dynein entlang des Mikrotubuli-Cytoskelets transportiert (Baumann et al., 2012). Der Transport erfolgt dabei bidirektional durch die gesamte Zelle (Baumann et al., 2012; Becht et al., 2006). Der mRNP-Komplex besteht aus verschiedenen Proteinen, die durch ein komplexes Geflecht an Protein-RNA und Protein-Protein Interaktionen verbunden sind (Jankowski et al., 2019). Der endosomale mRNA-Transport in *U. maydis* wurde bereits intensiv erforscht (Göhre et al., 2012; Müller et al., 2019; Zander et al., 2016). Daher sind bereits einige Proteine und deren Funktion des endosomalen mRNP-Komplexes bekannt (Jankowski et al., 2019; Olgeiser et al., 2019; Pohlmann et al., 2015).

Die Kernkomponente des endosomalen mRNP-Komplexes ist das RNA-bindende Protein Rrm4. Rrm4 besitzt drei RNA-Bindedomänen, die sogenannten RRM-Domänen, und zwei Mademoiselle-Domänen (MLLE), die für die Protein-Protein-Interaktion von Rrm4 wichtig sind. Die Identität der gebundenen mRNA und das Bindeverhalten von Rrm4 wurden bereits erforscht. Dabei stellte man fest, dass Rrm4 über 3200 verschiedene mRNAs bindet (Olgeiser et al., 2019). Es wird angenommen, dass Rrm4 an der Regulation der Translation der gebundenen mRNA beteiligt ist, da Rrm4 unter anderem an Stopp- und Startcodons bestimmter mRNAs bindet (Olgeiser et al., 2019). Interessanterweise befinden sich unter den gebundenen mRNAs auch mitochondriale mRNAs (Olgeiser et al., 2019). Dies deutet auf eine Funktion in der Erhaltung der mitochondrialen Integrität durch eine Regulation der Translation hin, wie sie bereits bei Neuronen beschrieben wurde (Cioni et al., 2019; Olgeiser et al., 2019).

Bei einer Deletion des *rrm4*-Gens wird der endosomale mRNA-Transport in den Zellen vollständig inhibiert (Olgeiser et al., 2019). Dies führt in Hyphen zu einem bipolaren Wachstum (Abbildung 2 D) (Becht et al., 2006). Dieser Phänotyp tritt auf, wenn der endosomale Transport in *U. maydis* gestört ist (Becht et al., 2006; Jankowski et al., 2019; Pohlmann et al., 2015). Es wird angenommen, dass einige der von Rrm4 transportierten mRNAs bereits während des Transports translatiert werden könnten (Zander et al., 2016). Hierfür spricht, dass sowohl die transportierte *cdc3*-Septin-mRNA als auch das translatierte

Cdc3-Protein als Frachtprotein auf den gleichen frühen Endosomen vorzufinden sind (Zander et al., 2016).

Die MLLE-Domäne von Rrm4 interagiert mit der PAM2L-Domäne des Adapterproteins Upa1 (Pohlmann et al., 2015). Upa1 fungiert als Gerüstprotein, welches sowohl Rrm4 als auch das poly(A)-bindende Protein Pab1 durch seine Lipid-bindende FYVE-Zinkfinger-Domäne an die frühen Endosomen verankert (Pohlmann et al., 2015). Eine Deletion des *upa1*-Gens führt zu erheblich gestörtem, aber nicht vollständig inhibierten Rrm4-Transport (Pohlmann et al., 2015). Dies deutet auf die Existenz eines weiteren unbekanntem Adapterproteins hin, welches Rrm4 mit den Endosomen verbindet (Pohlmann et al., 2015). Das RNA-bindende Protein Pab1 bindet außerdem an den poly(A)-Schwanz der von Rrm4 gebundenen mRNA. Es besitzt ebenfalls eine MLLE-Domäne (Pohlmann et al., 2015). Diese Domäne kann nachweislich mit der PAM2-Domäne von Upa1 oder Upa2 interagieren (Jankowski et al., 2019; Pohlmann et al., 2015). Upa2 ist ein weiteres Gerüstprotein, welches wichtig für die Formierung des endosomalen mRNP-Komplexes ist (Jankowski et al., 2019). Eine Deletion von *upa2* führt ebenfalls zu bipolar auswachsenden Hyphen (Jankowski et al., 2019). Upa2 besitzt neben vier PAM2-Domänen, ein GWW-Motiv am C-Terminus, von welchem angenommen wird, dass es für eine Protein-Protein-Interaktion mit einem bis dato unbekanntem Protein des endosomalen mRNP-Komplexes benötigt wird (Jankowski et al., 2019).

Das RNA-bindende Glycin-reiche Protein Grp1 ist eine zusätzliche mRNA-assoziierte Komponente des endosomalen mRNP-Komplexes (Olgeiser et al., 2019). Etwa 67% aller identifizierten Zielgene, deren mRNA von Grp1 gebunden werden, werden dabei auch von Rrm4 gebunden (Olgeiser et al., 2019). Daher nimmt man an, dass Grp1 und Rrm4 möglicherweise beide an verschiedenen Stellen derselben mRNA binden (Olgeiser et al., 2019). Grp1 ist jedoch durch keine bekannte Protein-Protein-Interaktion an den frühen Endosomen verankert und gilt daher als eine akzessorische Komponente des mRNP-Komplexes (Olgeiser et al., 2019).

Die Forschungsergebnisse zu diesem endosomalen mRNP-Komplex lieferten immer wieder Indizien dafür, dass noch weitere unbekanntete Proteine in diesem Komplex involviert sind. So wird angenommen, dass ein weiteres Adapterprotein Rrm4 mit den Endosomen verbindet (Pohlmann et al., 2015). Das GWW-Motiv von Upa2 ist ein weiterer Indikator für ein bislang unbekanntes Interaktionsprotein (Jankowski et al., 2019). Somit ist der endosomale mRNA-Transport möglicherweise noch viel komplexer als bislang angenommen. Aus diesem Grund sollten die noch unbekannteten Komponenten identifiziert werden.

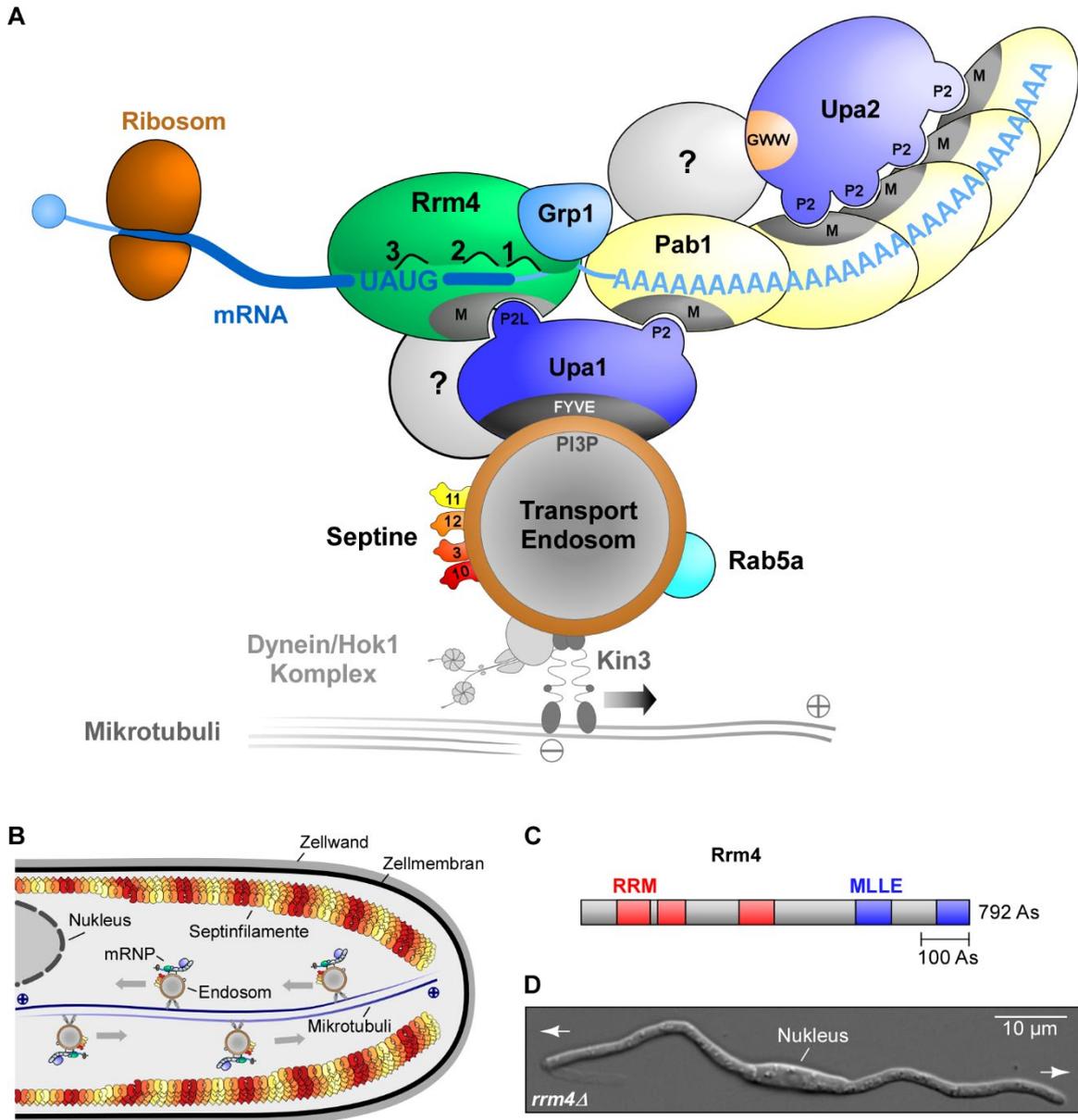


Abbildung 2: Zusammensetzung und Funktionsweise des endosomalen mRNP-Komplexes.

A) Modell des Rrm4-abhängigen endosomalen mRNP-Komplexes. Die zu transportierende mRNA wird vom RNA-bindenden Protein Rrm4 gebunden. Die drei RRM-Domänen von Rrm4 sind in dieser Darstellung durch Zahlen angedeutet. Rrm4 bindet in diesem Modell an eine der identifizierten Nukleotidsequenzen in dem kodierenden Bereich der mRNA. Rrm4 wird durch das Adapterprotein Upa1 an das frühe Endosom verankert. Dabei interagiert die MLE-Domäne (M) von Rrm4 mit der PAM2L-Domäne (P2L) von Upa1. Upa1 bindet wiederum durch die Lipid-bindende FYVE-Domäne an die Membran des Endosoms. Upa1 bindet mittels seiner PAM2-Domäne (P2) auch die MLE-Domäne von Pab1. Pab1 bindet den poly(A)-Schwanz der mRNA. Dabei interagieren die weiteren Pab1-Proteine auch mit dem Gerüstprotein Upa2. Upa2 besitzt vier PAM2-Domänen und ein GWW-Motiv, welches für eine Interaktion mit einem unbekanntem Protein (?) benötigt wird. Auch Rrm4 wird durch ein weiteres unbekanntes Adapterprotein mit dem Endosom verbunden. Das akzessorische RNA-bindende Protein Grp1 bindet an die 3' UTR der mRNA. Auf der Oberfläche des Endosoms befinden sich zusätzlich das frühe Endosom-Markerprotein Rab5a. Auch die Septine Cdc3, Cdc10, Cdc11 und Cdc12 sind auch auf der Oberfläche des Endosoms als Frachtproteine vorzufinden. Auf der mRNA befindet sich ebenfalls ein Ribosom, welches für die lokale Translation co-transportiert wird. Dabei ist es auch möglich, dass die mRNA bereits während des Transports translatiert wird. Das frühe Endosom wird mit Hilfe von Motorproteinen wie Dynein und Kinesin-3 entlang des Mikrotubuli-Cytoskeletts transportiert. Schema modifiziert nach Kwon et al., 2020. B) Der endosomale

mRNP-Komplex wird in der Hyphe bidirektional transportiert. Darstellung modifiziert nach Kwon et al., 2020 C) Schematische Darstellung des Rrm4-Proteins und der Position der bislang bekannten Domänen. Rrm4 besitzt drei RRM-Domänen und zwei MLE-Domänen. D) Mikroskopische Aufnahme des bipolaren Phänotyps einer Hyphe des *rrm4*-Deletionstamms. Durch die Deletion von *rrm4* wird der endosomale mRNA-Transport inhibiert, was zur bipolaren Hyphenbildung führt. Die Aufnahme der Hyphe wurden acht Stunden nach Induktion des hyphalen Wachstums aufgenommen.

1.4 Identifikation neuer endosomaler mRNP-Komplex-Komponenten

Die Kartierung des endosomalen mRNP-Komplexes ist der erste Schritt, um dessen Funktionsmechanismus vollkommen zu verstehen. Vorangegangene Arbeiten konnten bereits einige Komponenten des Rrm4-abhängigen mRNP-Komplexes identifizieren (Jankowski et al., 2019; Olgeiser et al., 2019; Pohlmann et al., 2015). Dabei wurden Hinweise dafür gefunden, dass möglicherweise noch weitere unbekannte Komponenten vorhanden sein könnten (Jankowski et al., 2019; Pohlmann et al., 2015). Daher sollten Protein-zentrische Methoden genutzt werden, die die unvoreingenommene Identifikation der Proteine des endosomalen mRNP-Komplexes ermöglichen. Hierfür stehen eine Vielzahl von Methoden zur Verfügung mit welchen Protein-Protein- wie auch Protein-RNA-Komplexe untersucht werden können (Licatalosi et al., 2020; Titeca et al., 2019). In dieser Arbeit wurden zwei verschiedene Methoden zur Identifikation neuer mRNP-Komplex-Komponenten genutzt.

1.4.1 Die unspezifische Umgebungsmarkierung durch APEX2

Durch eine enzymatische Umgebungsmarkierung können Proteine die sich in unmittelbarer Nähe befinden *in vivo* markiert werden, wodurch man in der Lage ist das gesamte Protein-Protein-Interaktionsnetzwerk eines Protein-Komplexes zu identifizieren (Kim & Roux, 2016; Titeca et al., 2019). Die unspezifische Umgebungsmarkierung durch APEX2 ist eine dieser Methoden welche bereits erfolgreich für die Identifikation von Proteinkomplexen genutzt wurde (Han et al., 2020; Zhen et al., 2018). Mit Hilfe der APEX2-Methode könnten somit alle Proteine, die sich in unmittelbarer Nähe zu Rrm4 im mRNP-Komplex befinden, identifiziert werden.

Die genetisch modifizierte Ascorbat-Peroxidase APEX2 aus der Soja-Pflanze markiert unspezifisch alle Proteine in einem 20 nm Umkreis von APEX2 mit Biotin-Phenoxy (Hung et al., 2016) (Abbildung 3). Diese Reaktion wird durch die Zugabe von Wasserstoffperoxid induziert (Hung et al., 2016). Bei der Reduktion von Wasserstoffperoxid durch APEX2 wird das Substrat Biotin-Phenol oxidiert (Hung et al., 2016). Dadurch entstehen kurzlebige Biotin-Phenoxy-Radikale, welche eine kovalente Bindung mit Proteinen eingehen können

(Hung et al., 2016). Die so markierten Proteine können durch eine Biotin-Präzipitation mit Streptavidin aufgereinigt und anschließend durch eine massenspektrometrische Analyse identifiziert werden (Hung et al., 2016). Aufgrund der sehr kurzen Dauer der Markierungsreaktion und des Umstands, dass die Proteine dabei unter *in vivo*-Bedingungen markiert werden, erlaubt es dieser Methode sogar transiente Proteininteraktionen nachzuweisen (Hung et al., 2016).

Die APEX2-Methode wurde bereits in einer vorrausgegangenen Arbeit für den *in vitro*-Gebrauch in *U. maydis* etabliert (Masterarbeit Tulinski 2016). Hierbei wurde ein Codon-optimiertes Gfp-APEX2Fusionsprotein in *U. maydis* exprimiert und die unspezifische Markierungsreaktion in *in vitro*-Experimenten überprüft (Masterarbeit Tulinski 2016).

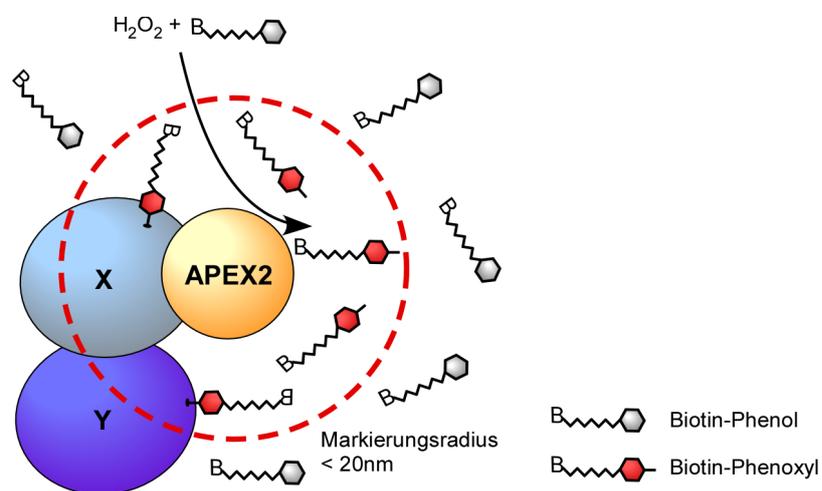


Abbildung 3: Mechanismus der APEX2-vermittelten unspezifischen *in vivo*-Markierung.

Schematische Darstellung der unspezifischen Umgebungsmarkierung durch die APEX2-Peroxidase. Bei Zugabe von Biotin-Phenol und Wasserstoffperoxid werden durch die Reduktion von Wasserstoffperoxid Biotin-Phenoxy-Radikale generiert, welche in ihrer kurzen Lebensdauer unspezifisch an Proteine in einem Umkreis von 20 nm binden. So kann mit Hilfe einer Fusion von APEX2 an ein bekanntes Protein (X) ein unbekannter Interaktionspartner (Y) markiert werden.

1.4.2 Nutzung einer Immunpräzipitation in Verbindung mit einer quantitativen markierungsfreien massenspektrometrischen Analyse

Für die Identifikation neuer Rrm4-abhängiger endosomaler mRNP-Komplex-Proteine kann alternativ eine massenspektrometrische Untersuchung einer Immunpräzipitation durchgeführt werden. Bei einer Immunpräzipitation wird ein Protein mittels Antikörper aus dem Gesamtzellextrakt aufgereinigt. Bei diesem Vorgang werden die direkten sowie

indirekten Interaktionspartner dieser Proteine co-immunpräzipitiert. Für die Immunpräzipitation wurde in dieser Arbeit das Gfp-Trap-Verfahren genutzt (Fedorova & Dorogova, 2020). In dieser Methode kommen magnetische Agarosekugeln mit anti-Gfp-Nanokörpern zum Einsatz, welche mit hoher Affinität Gfp binden (Fedorova & Dorogova, 2020). Somit können Proteine, die mit einem Gfp fusioniert wurden, aufgereinigt werden (Fedorova & Dorogova, 2020). Die Effektivität dieser Methode in *U. maydis* konnte bereits in vorangegangenen Arbeiten gezeigt werden (Olgeiser et al., 2019). Mit diesen magnetischen Gfp-Trap-Agarosekugeln war man in der Lage Rrm4-Gfp aus dem Zellysate von Hyphen zu isolieren (Olgeiser et al., 2019).

Mittels massenspektrometrischer Analyse werden die co-immunpräzipitierten Proteine identifiziert und so das Interaktionsnetzwerk des Protein-Komplexes kartiert (Titeca et al., 2019). Hierfür können verschiedene Strategien gewählt werden. Weit verbreitet ist zum Beispiel die SILAC (*stable isotope-labelling for amino acid quantification*)-Methode, in welcher Proteine mit Hilfe von mit stabilen Isotopen markierten Aminosäuren identifiziert und quantifiziert werden (Calderón-Celis et al., 2018). Dieser Ansatz ist jedoch zeitaufwändig und kostspielig (Calderón-Celis et al., 2018).

In dieser Arbeit wird alternativ der markierungsfreie quantitative massenspektrometrische Ansatz genutzt, welcher vergleichbare Ergebnisse zur SILAC-Methode erzielt (Calderón-Celis et al., 2018; Keilhauer et al., 2015). Hierbei wird bei der quantitativen Auswertung eine Computer-gestützte Normalisierung der Signalintensitäten der Rohdaten und der entsprechenden Kontrollen durchgeführt (Calderón-Celis et al., 2018). Dadurch kann anhand der ermittelten Anreicherung eines Proteins in einer Probe die Zusammensetzung eines Protein-Protein-Komplexes identifiziert werden (Calderón-Celis et al., 2018).

Analysen dieser Art wurden bereits häufig für die Identifikation von Proteinkomplexen genutzt (Calderón-Celis et al., 2018; Keilhauer et al., 2015; Li et al., 2016). Auf diese Weise wurden zum Beispiel verschiedene menschliche nukleare Proteinkomplexe untersucht (Connelly et al., 2018). Es ist aber auch möglich RNA-Protein-Interaktionen zu kartieren (Licatalosi et al., 2020). So wurde das Protein-Protein-Interaktionsnetzwerk des menschlichen RNA-bindenden Proteins RBM45, welches wichtig für die neuronale Entwicklung ist, aufgedeckt (Li et al., 2016).

1.5 Zielsetzung dieser Arbeit

Ziel dieser Arbeit war es in *U. maydis* neue Rrm4-abhängige endosomale mRNP-Komplex-Komponenten mit Hilfe von proteinzentrischen Methoden zu identifizieren. Um die Funktion des endosomalen mRNA-Transports vollständig zu verstehen ist es notwendig, alle involvierten Faktoren zu kennen. Daher ist es von größter Wichtigkeit die Zusammensetzung des endosomalen mRNP-Komplexes zu erforschen. Um dies zu erreichen, sollte eine APEX2-basierte Markierung wie auch eine massenspektrometrisch basierte Analyse einer Rrm4-Immunpräzipitation durchgeführt werden.

Mit Hilfe eines Rrm4-APEX2-Fusionsproteins sollten Proteine im sehr nahem Umfeld mit Biotin-Phenoxyll markiert werden (Abbildung 4). Dadurch wäre man in der Lage durch Aufreinigung der biotinylierten Proteine das Interaktom von Rrm4 zu bestimmen. In dieser Arbeit sollte auf Basis vorangegangener *in vitro*-Ergebnisse die APEX2-Methode für eine *in vivo*-Anwendung in *U. maydis* etabliert werden. Um dies zu erreichen muss zunächst die Aufnahme von Biotin-Phenol ermöglicht werden, was kritisch für die erfolgreiche *in vivo*-Biotinylierung ist. Dabei sollten verschiedene Lösungsansätze mit einem APEX2-Gfp-Expressionsstamm überprüft werden, wie die Anwendung eines alternativen Biotin-Transporters oder die Permeabilisierung der Plasmamembran durch unterschiedliche Chemikalien.

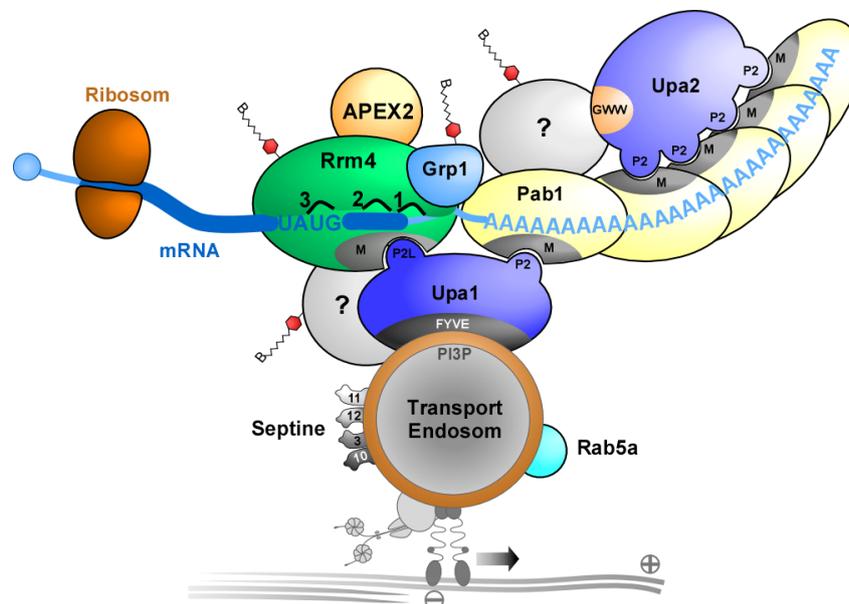


Abbildung 4: APEX2-vermittelte *in vivo*-Markierung des endosomalen mRNP-Komplexes.

Darstellung der geplanten Markierung des endosomalen mRNP-Komplexes. Mit Hilfe eines Rrm4-APEX2-Fusionsproteins sollen sowohl die bereits bekannten wie auch die unbekannt Komponenten des endosomalen mRNP-Komplexes mit Biotin-Phenoxyll markiert werden. Dabei können nur die Proteine markiert werden, die sich in unmittelbarer Nähe befinden. Darstellung modifiziert nach Kwon et al., 2020.

Als alternativen Ansatz sollte eine markierungsfreie quantitative massenspektrometrische Analyse einer Rrm4-Gfp-Immunpräzipitation aus *U. maydis* Hyphen Aufschluss über die Komposition des endosomalen mRNP-Komplexes liefern. Hierbei sollten alle co-immunpräzipitierten Proteine identifiziert und diese anschließend auf potentielle Kandidaten untersucht werden. Dafür muss mit Hilfe einer bioinformatischen Herangehensweise herausgefunden werden, wie stark die Proteine in der Immunpräzipitation angereichert sind und welche potentielle Funktion die identifizierten Proteine haben könnten. Neben cytoplasmatisch exprimiertem Gfp soll auch eine in der ersten RNA-Bindedomäne mutierte Rrm4-Variante, welche weniger mRNAs bindet (Becht et al., 2006), als Kontrolle weitere Informationen über mögliche Kernkomponenten des endosomalen mRNP-Komplexes liefern.

Sobald mit einem der Ansätze potentielle Kandidaten identifiziert wurden, sollten dann mit weiteren Untersuchungen die Assoziation mit dem endosomalen mRNP-Komplex verifiziert werden. Durch ein jeweiliges Gfp-Fusionsprotein sollte so eine potentielle endosomale Lokalisation und eine Rrm4-Colokalisation überprüft werden. Sobald diese bestätigt wurde sollte durch genetische Studien in *U. maydis* Hyphen die genaue Position und Funktion des Kandidaten im endosomalen mRNP-Komplex geklärt werden.

2. Ergebnisse

2.1 Etablierung der APEX2-Methode für die *in vivo*-Markierung

Aus Vorarbeiten war bereits bekannt, dass Gfp-APEX2 in *U. maydis* exprimiert werden konnte und in der Lage war, Proteine *in vitro* zu biotinylieren (Masterarbeit Tulinski 2016). Dieser Sachstand wurde als Ausgangspunkt für diese Arbeit genutzt und erneut experimentell validiert. Mit dem cytoplasmatisch exprimierten Gfp-APEX2 konnten erneut erfolgreich in *in vitro*-Experimenten Proteine jeglicher Größe im Zellextrakt mit Biotin-Phenol markiert werden (Abbildung 5 A). Dafür wurden Gesamtzellextrakte von *U. maydis* Hefezellen des als Kontrolle fungierenden *gfp*-Stamms und des *gfp-apex2*-Expressionsstamms hergestellt. Der Zellextrakt wurde dann jeweils mit Biotin-Phenol und Wasserstoffperoxid versetzt, um die Biotinylierungsreaktion zu induzieren. Als Negativkontrollen dienten in den jeweiligen Stämmen Proben ohne Wasserstoffperoxid und Biotin-Phenol. Die Proteine wurden per SDS-PAGE-Verfahren aufgetrennt und mit Hilfe der Westernblot-Technik und Streptavidin-HRP sichtbar gemacht. In den Ergebnissen der Westernblots konnten in allen Proben Proteinbanden nativ biotinylierter Proteine nachgewiesen werden. Im Falle der APEX2-Proben wurde eine unspezifische Biotinylierung von Proteinen jeglicher Größe nur in Anwesenheit von Wasserstoffperoxid und Biotin-Phenol beobachtet. Ohne Wasserstoffperoxid wurde erwartungsgemäß keine zusätzliche Markierung festgestellt, da die Markierungsreaktion nicht induziert werden konnte. Die Machbarkeit einer unspezifischen *in vitro*-Biotinylierung konnte somit nachgewiesen werden.

Eine *in vivo*-Markierung durch Biotinylierung mittels APEX2 war in *U. maydis* bisher nicht erfolgreich. Daher wurde zunächst die Zellwand von *U. maydis* als erste physikalische Barriere untersucht. Hierfür wurde für *in vivo*-Biotinylierungs-Experimente mit APEX2 zunächst die Zellwand von *U. maydis* Hefezellen enzymatisch entfernt. Den resultierenden Protoplasten des *gfp*-Kontrollstamms und des *gfp-apex2*-Expressionsstamms wurde dann sowohl Biotin-Phenol wie auch Wasserstoffperoxid hinzugefügt. Nach Ablauf der Reaktionszeit wurde der Gesamtzellextrakt dieser Zellen isoliert und per SDS-PAGE mit anschließendem Westernblot-Verfahren untersucht. In den Ergebnissen der Westernblot-Analyse der zellwandlosen Protoplasten wurde jedoch im Vergleich zu dem Gfp-exprimierenden Kontrollstamm keine signifikante Anreicherung von unspezifisch biotinylierten Proteinen detektiert (Abbildung 5 B). Zwar wiesen einige wenige Banden ein stärkeres Biotinylierungssignal auf, jedoch fehlte eine Anreicherung von unspezifisch biotinylierten Proteinen jeglicher Größe. Zu erwarten wäre, dass das Biotinylierungssignal einen ähnlich starken Signalschmier wie bei dem *in vitro*-Experiment aufweisen würde.

Somit konnte die Zellwand als Grund für die nicht erfolgreiche *in vivo*-Markierung ausgeschlossen werden.

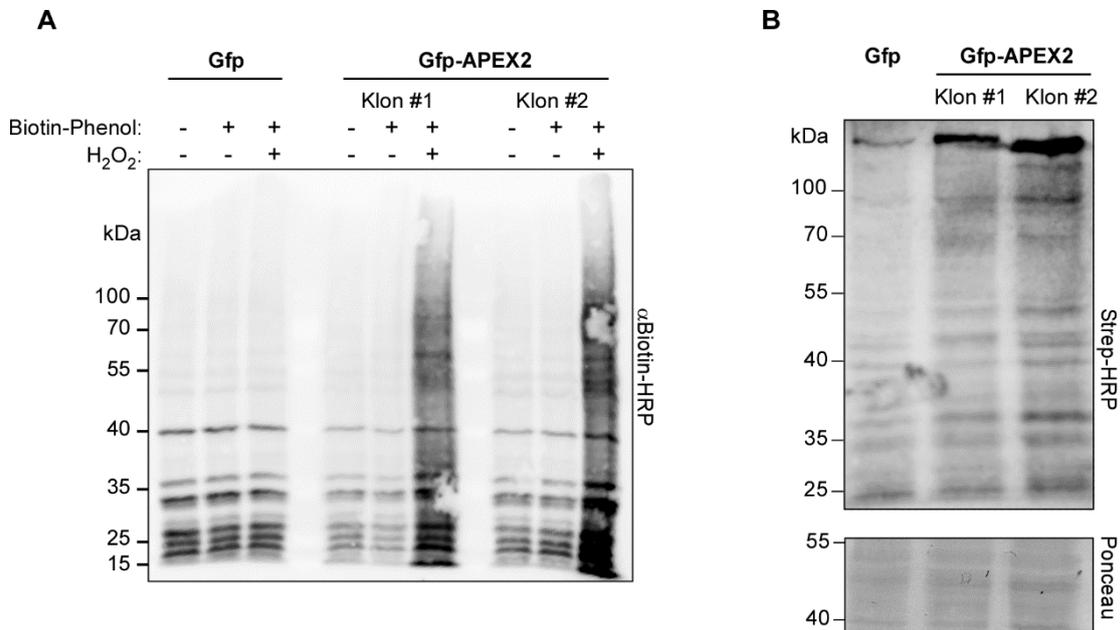


Abbildung 5: Eine Biotinylierung ist *in vitro*, aber nicht *in vivo* möglich.

A) *In vitro*-Detektion Gfp-APEX2-biotinylierter Proteine. Die biotinylierten Proteine des Gesamtzellextraktes wurden mit anti-Biotin-HRP Antikörpern sichtbar gemacht. Es wurden zwei verschiedene Klone des *gfp-apex2*-Stamms und ein Gfp exprimierender Stamm als Negativkontrolle verwendet. Zusätzlich wurden jeweils ein unbehandelter Ansatz, ein Ansatz in Anwesenheit von Biotin-Phenol und ein Ansatz mit sowohl Biotin-Phenol als auch dem Reaktionsinitiator Wasserstoffperoxid getestet. Von allen Proben wurde jeweils die gleiche Menge Zellextrakt aufgetragen. B) *In vivo*-Biotinylierung durch Gfp-APEX2 in Protoplasten. Die biotinylierten Proteine des Gesamtzellextraktes wurden mit Streptavidin-HRP detektiert. Der Gesamtzellextrakt der Protoplasten des *gfp*-Kontrollstamms und des *gfp-apex2*-Stamms wurden auf unspezifische Biotinylierung untersucht. Für diese Untersuchung wurden von allen Proben das gleiche Volumen Zellextrakt verwendet. Die Ponceau-Färbung der Membran diente als Ladekontrolle.

Da Biotin-Phenol nicht membrangängig ist, muss dieser Stoff höchstwahrscheinlich durch den Biotin-Transporter der Zelle ins Cytoplasma transportiert werden (Hung et al., 2016). Es ist jedoch nicht bekannt, ob der Biotin-Transporter von *U. maydis* überhaupt in der Lage ist Biotin-Phenol zu transportieren. In einer Publikation konnte bereits nachgewiesen werden, dass das zu Biotin-Phenol strukturähnliche Biotinyl-p-nitrophenylester den Biotin-Transporter Vht1 von *S. cerevisiae* irreversibel blockiert (Becker et al., 1971). Möglicherweise blockiert Biotin-Phenol aufgrund seiner ähnlichen Struktur ebenfalls den Biotin-Transporter. Dies würde erklären, weshalb die APEX2-Reaktion bei *S. cerevisiae* nicht unter den im Originalprotokoll publizierten Bedingungen durchgeführt werden konnte.

(Singer-Krüger et al., 2020). Zwar ist der Biotin-Transporter von *U. maydis* bislang nicht beschrieben worden, aber nach einer Homologiestudie mit Hilfe des NCBI - Protein Blast Programms (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE=Proteins>; Altschul et al., 1990) konnte das Protein UMAG_11172 als Homolog des *S. cerevisiae* Vht1 identifiziert werden. Somit könnte bei *U. maydis* der native Biotin-Transporter ebenfalls durch Biotin-Phenol blockiert werden. Aus diesem Grund wurden alternative Strategien für die Aufnahme von Biotin-Phenol getestet (Abbildung 6). Zunächst wurde ein alternativer Biotin-Transporter, welcher nicht durch Biotin-Phenol blockiert wird, in *U. maydis* etabliert. Zusätzlich wurde überprüft, ob durch die Permeabilisierung der Plasmamembran Biotin-Phenol in das Cytoplasma gelangen kann.

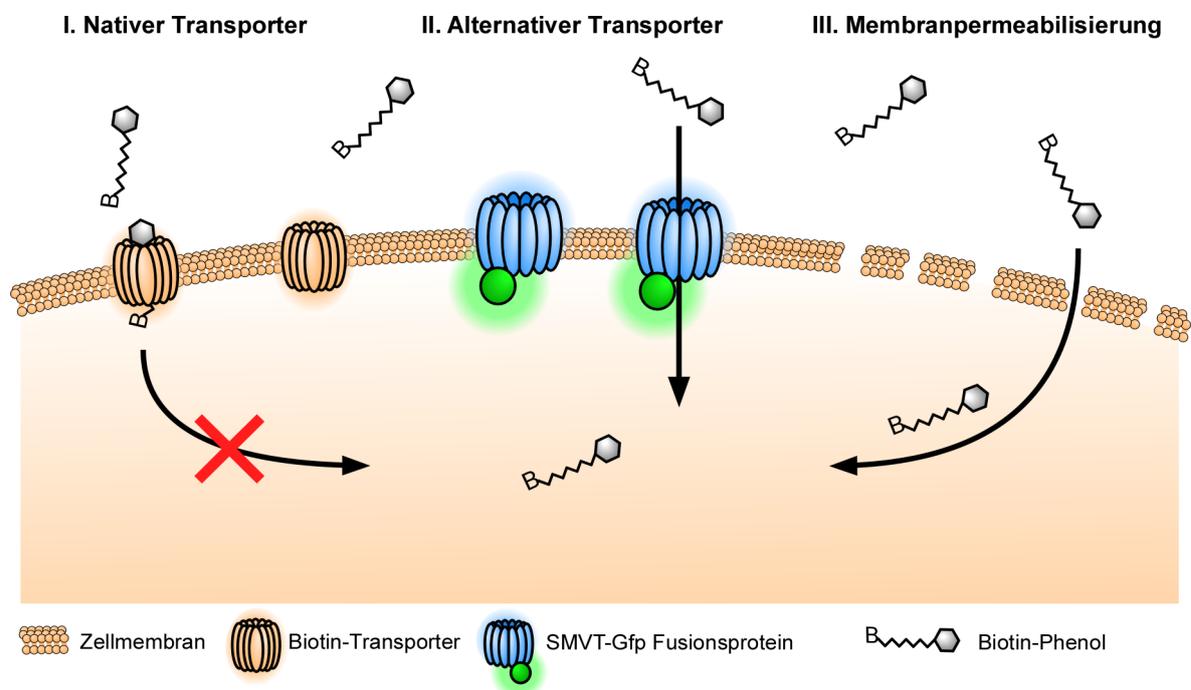


Abbildung 6: Strategien zur Ermöglichung der Biotin-Phenol Aufnahme.

Darstellung der Möglichkeiten, Biotin-Phenol in die Zelle zu transportieren. I.) Unter nativen Bedingungen kann Biotin-Phenol nicht durch den nativen Biotin-Transporter in das Cytoplasma der Zelle gelangen, da es den Transporter nicht vollständig passieren kann. II.) Alternativ könnte der humane SMVT-Biotin-Transporter etabliert werden. So würde Biotin-Phenol durch ein SMVT-Gfp-Fusionsprotein aufgenommen werden. III.) Ein anderer Ansatz sieht vor, durch eine Membranpermeabilisierung Poren in der Plasmamembran zu generieren, durch welche Biotin-Phenol in die Zelle gelangen könnte.

2.1.1 Etablierung eines alternativen Biotin-Transporters

Da der Transport von Biotin-Phenol über die Plasmamembran nicht möglich war, wurde getestet ob dieses Problem durch die Etablierung eines alternativen Biotin-Transporters gelöst werden konnte. In Säugetierzellen werden Biotin, Pantothenat und Lipoat durch den Natrium-abhängigen Multivitamin Transporter SMVT (*sodium-dependent multivitamin transporter*) in das Cytoplasma transportiert (Quick & Shi, 2015). SMVT besitzt mindestens zwölf Transmembrandomänen, die den Transporter in der Plasmamembran verankern (Wang et al., 1999). Laut Proteindomänen-Vorhersage, die in der Proteindatenbank UniProt (www.uniprot.org) zusammengefasst wurden, werden derzeit 13 mögliche Transmembrandomänen vorhergesagt (Abbildung 7 A). Aktuellere Studien weisen jedoch darauf hin, dass SMVT bis zu 14 Transmembrandomänen besitzen könnte (Quick & Shi, 2015). Dieser Transporter ist in der Lage, ähnliche große biotinylierte Moleküle aufzunehmen, wie das als Prodrug wirkende Biotin-Acyclovir (Vadlapudi, Vadlapatla, Pal, et al., 2012). Falls dieses Protein funktional in *U. maydis* exprimiert werden könnte, wäre es möglich Biotin-Phenol in die Zelle zu transportieren.

Es wurden bereits Studien zur Lokalisation von SMVT-Gfp-Fusionsproteinen und der Aufnahmefähigkeit von biotinylierten Molekülen veröffentlicht (Quick & Shi, 2015; Subramanian et al., 2009; Vadlapudi, Vadlapatla, & Mitra, 2012). Diese dienten als Ausgangspunkt für diese Arbeit. Für die Expression von SMVT in *U. maydis* wurde das humane für SMVT kodierende Gen *SLC5A6* mit Hilfe eines Programms (<http://dicodon-optimization.appspot.com>) Codon-optimiert und von der Firma IDT synthetisiert. Das *smvt*-Gen wurde über eine 36 Nukleotide lange Linkersequenz C-Terminal mit dem Gen für das rote Fluoreszenzprotein mCherry und einem dreifachen Myc-Epitop-Tag (3xMyc) fusioniert (Abbildung 7 A). Dies ermöglichte einen immunologischen und fluoreszenzmikroskopischen Nachweis des Fusionsproteins. Das Konstrukt des SMVT-mCherry-3xMyc-Fusionsproteins wurde im *ip*-Genlocus des *U. maydis* Genoms stabil integriert und unter der Kontrolle des konstitutiven *Potef*-Promotors exprimiert (Andreas Brachmann et al., 2001). Hierbei ist es möglich, dass das Konstrukt einfach oder mehrfach inseriert wird (Dissertation Brachmann 2001). Somit kann neben einem Stamm mit einer einzelnen Insertion und einem geringen Expressionsniveau auch ein Überexpressionsstamms mit multiplen Insertionen generiert werden.

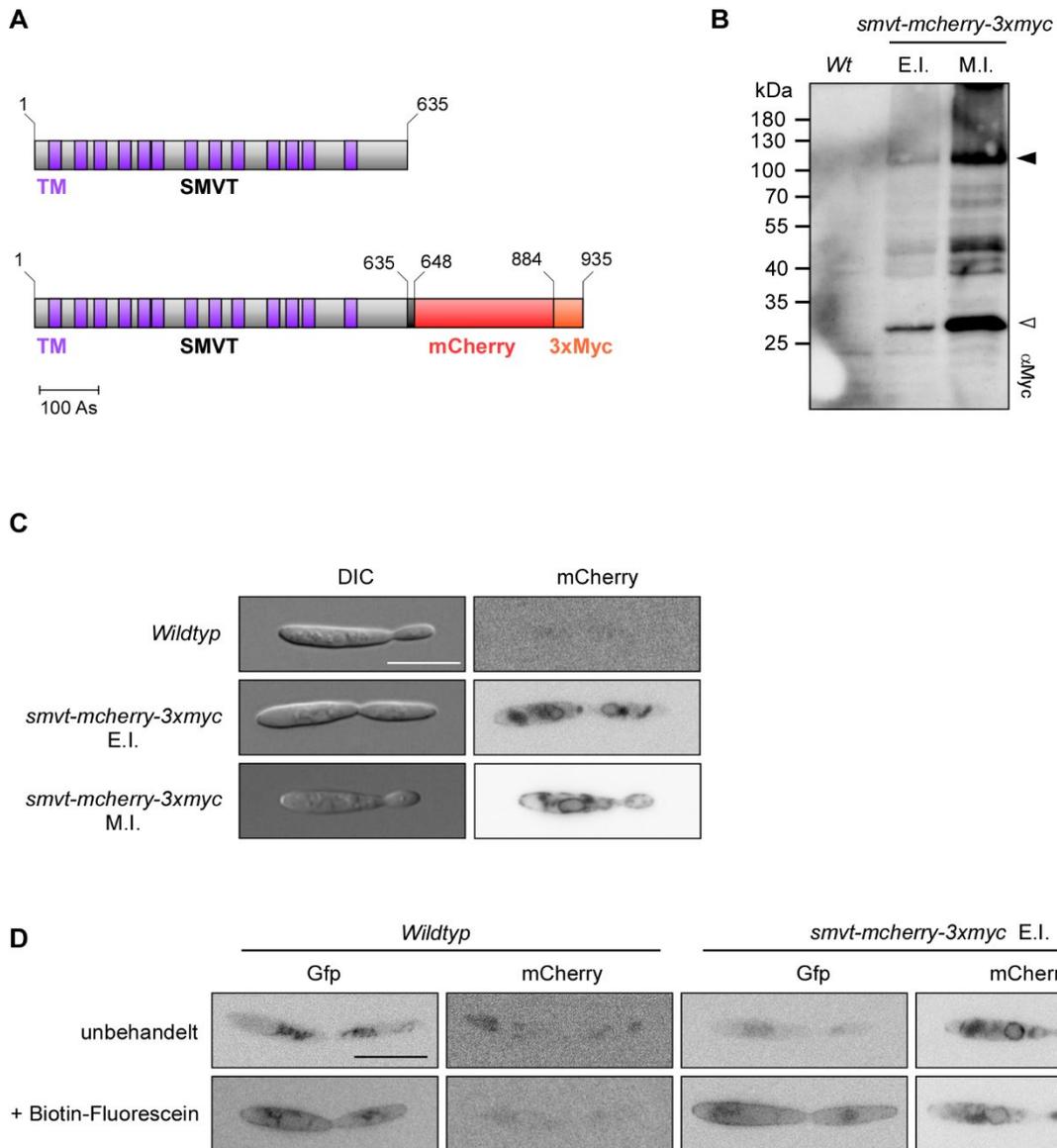


Abbildung 7: Expression des humanen Biotin-Transporters SMVT in *U. maydis*.

A) Schematische Darstellung des SMVT-Proteins und des SMVT-mCherry-3xMyc-Fusionsproteins. Dargestellt sind die Transmembrandomänen (TM) wie auch die Proteinlänge in Aminosäuren (As). Die jeweiligen Informationen stammen aus dem Eintrag in der UniProtKB Datenbank (Q9Y289). B) Überprüfung der Expression des SMVT-mCherry-3xMyc-Fusionsproteins. Das gleiche Volumen Gesamtzellextrakt des wildtypartigen Laborstamms (Wt) der jeweiligen SMVT-mCherry-3xMyc einzelnen (E.I.) und multiplen (M.I.) Insertionen wurde durch Immundetektion mit einem Anti-Myc-Antikörper auf einer Westernblotmembran auf SMVT-mCherry-3xMyc-Expression untersucht. Der schwarze Pfeil markiert das SMVT-mCherry-3xMyc-Volllängenprotein mit einer Größe von 101,6 kDa. Der weiße Pfeil markiert die mCherry-3xMyc-Degradationsbande. C) Licht- und fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von *U. maydis* Hefezellen des wildtypartigen Laborstamms AB33 und der beiden *smvt-mcherry-3xmyc*-Stämme. Der eingezeichnete weiße Balken entspricht einer Distanz von 10 μ m. E.I. bezeichnet eine einzelne und M.I. eine multiple Insertion des Fusionskonstruktes. D) Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen des Gfp- bzw. mCherry-Kanals des wildtypartigen Laborstamms und des *smvt-mcherry-3xmyc*-E.I.-Stamms jeweils mit und ohne Zugabe von Biotin-Fluorescein. Der schwarze Balken entspricht 10 μ m.

Zunächst wurde die Expression von jeweils einem Klon mit einer einzelnen Insertion (E.I.) und einem mit einer multiplen Insertion (M.I.) des *smvt-mcherry-3xmyc*-Konstruktes überprüft. Dafür wurde in Gesamtzellextrakten immunologisch die Expression des dreifachen Myc-Tags des SMVT-mCherry-3xMyc -Fusionsproteins nachgewiesen (Abbildung 7 B). Es konnte in beiden Klonen das Volllängenprotein mit einer Größe von 101,6 kDa detektiert werden. Des Weiteren wurden auch Degradationsbanden nachgewiesen, die aufgrund der C-terminalen Fusion des dreifachen Myc-Tags auf N-terminal verkürzte Formen von SMVT-mCherry-3xMyc schließen ließen. Außerdem wies die Proteinbande mit einer Größe von etwa 27 kDa im Vergleich zur Volllängenbande eine stärkere Signalintensität auf. Diese Größe entspricht dem mCherry-3xMyc-Fragment des Fusionsproteins. Beim Klon mit den mehrfachen Insertionen des *smvt-mcherry-3xmyc*-Konstruktes konnte genau dasselbe Bandenmuster nachgewiesen werden. Wie erwartet waren trotz des gleichen Probenvolumens die Bandenintensitäten deutlich stärker, da durch mehrere Kopien des *smvt-mcherry-3xmyc*-Konstruktes höchstwahrscheinlich mehr von diesem Protein exprimiert wurde. Ob die Degradationsbanden wegen einer möglichen Instabilität des Fusionsproteins oder auf Degradation während der Isolierung des Zellextraktes zurückzuführen ist, konnte nicht eindeutig geklärt werden. Der Nachweis des Volllängenproteins zeigte, dass die Expression des *smvt-mcherry-3xmyc*-Konstruktes erfolgreich war. Die Einzelinsertion hatte im Vergleich zum Ausgangsstamm keinen merklichen Einfluss auf die Zellmorphologie. Im Gegensatz zur Einzelinsertion hatte die multiple Insertion jedoch einen negativen Einfluss auf die Wachstumsgeschwindigkeit der Zellen. Da die Überexpression des heterologen Proteins das Zellwachstum störte, wurden jegliche Untersuchungen fortan mit dem Stamm mit der Einzelinsertion durchgeführt.

Da SMVT ein in der Plasmamembran verankertes Protein ist, war zu erwarten, dass das Fusionsprotein ebenfalls in der Membran vorzufinden ist. Dass dies mit einem am C-Terminus fusionierten Gfp möglich ist, konnte bereits in verschiedenen Zellkulturlinien nachgewiesen werden (Nabokina et al., 2011; Subramanian et al., 2009). Um zu überprüfen, ob SMVT-mCherry-3xMyc an der Plasmamembran lokalisiert, wurde eine fluorenmikroskopische Analyse durchgeführt (Abbildung 7 C). Dafür wurde in *U. maydis* Hefezellen die intrazelluläre Lokalisation des mCherry-Signals des SMVT-mCherry-3xMyc fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Als Kontrolle diente der Ausgangsstamm AB33, um Artefakte durch zelleigene Autofluoreszenz auszuschließen. Das meiste SMVT-mCherry-3xMyc-Signal konnte im Expressionsstamm ringartig um den Nukleus der Zellen und in den Vakuolen detektiert werden. Die Lokalisation um den Nukleus herum deutete auf eine Akkumulation von SMVT im endoplasmatischen Retikulum hin, was folglich auf ein Problem in der Lokalisierung zur Plasmamembran hindeutete. Die vakuoläre Lokalisation hingegen könnte ein Indiz für eine Proteindegradation sein. Dabei kann nicht differenziert werden, ob

das Protein wegen einer strukturellen Instabilität oder wegen dem Verbleib im endoplasmatischen Retikulum zu den Vakuolen transportiert und dort degradiert wurde. Trotz dieser Fehllokalisierung war eine sehr schwache Lokalisation an der Plasmamembran sichtbar, weshalb als nächstes überprüft wurde, ob diese für den Import von Biotin-Phenol ausreichen könnte.

Hierfür wurde eine Methode etabliert, welche es ermöglichen sollte, die Funktionalität von SMVT-mCherry-3xMyc durch eine fluoreszenzmikroskopische Analyse zu überprüfen. Es wurde bereits nachgewiesen, dass SMVT die Aufnahme von weitaus größeren Molekülen wie biotinylierten PAMAM-Dendrimern ermöglicht (Vadlapudi, Vadlapatla, & Mitra, 2012). Diese PAMAM-Dendrimere sind neben Biotin auch mit Fluoresceinisothiocyanat (FITC) konjugiert, wodurch eine Aufnahme in das Cytoplasma fluoreszenzmikroskopisch nachgewiesen werden kann (Vadlapudi, Vadlapatla, & Mitra, 2012). Basierend auf diesem Prinzip wurde für den Nachweis, ob das an der Plasmamembran sitzende SMVT-mCherry-3xMyc-Fusionsprotein funktionell ist, ein Test mit Biotin-Fluorescein durchgeführt (Abbildung 7 D). Durch die strukturelle Ähnlichkeit von Biotin-Fluorescein zu Biotin-Phenol könnten die Ergebnisse auch Hinweise auf eine potentielle Aufnahme von Biotin-Phenol liefern.

Dafür wurden die *U. maydis* Hefezellen mit einer finalen Konzentration von 5 mM Biotin-Fluorescein für 30 Minuten inkubiert, gewaschen und mikroskopiert. Neben der intrazellulären Autofluoreszenz zeigte der Ausgangsstamm AB33 bei der Zugabe von Biotin-Fluorescein Fluoreszenzsignal, welches deutlich an der Plasmamembran lokalisierte. Dies spricht dafür, dass Biotin-Fluorescein an der Plasmamembran bzw. in dem Biotin-Transporter der Zelle stecken bleibt und nicht in das Cytoplasma hineingelangt. Die Ergebnisse des *smvt-mcherry-3xmyc*-Stamms wiesen unter Zugabe von Biotin-Fluorescein keinen nennenswerten Unterschied zu den Zellen des Kontrollstamms auf. Auch dort lokalisierte das Biotin-Fluorescein-Signal an der Plasmamembran. Daraus ließ sich schlussfolgern, dass das an der Membran sitzende SMVT-mCherry-3xMyc entweder nicht funktionell war oder nicht korrekt in die Plasmamembran lokalisiert wurde. Dieses Ergebnis bedeutete, dass der *smvt-mcherry-3xmyc*-Expressionsstamm nicht für die Aufnahme von Biotin-Phenol geeignet war. Daher wurde aus Zeitgründen die SMVT-Strategie nicht weiterverfolgt und eine andere Strategie getestet.

2.1.2 Etablierung eines Membranpermeabilisierungsverfahrens

Als weitere Möglichkeit, Biotin-Phenol in die Zelle zu transportieren, wurde die Permeabilisierung der Plasmamembran in Betracht gezogen. Eine permeabilisierte Plasmamembran sollte es ermöglichen, Biotin-Phenol bzw. Biotin-Fluorescein in *U. maydis* Zellen zu transportieren. In einer Publikation wurde berichtet, dass hoher osmotischer Druck die Aufnahme von Biotin-Phenol und so die unspezifische Markierung durch APEX2 beim Pilz *Schizosaccharomyces pombe* ermöglicht (Hwang & Espenshade, 2016). Daher sollte dieses Verfahren ebenfalls für *U. maydis* etabliert werden. Das Glykosid Digitonin wurde in vorherigen Arbeiten erfolgreich für die Permeabilisierung der Plasmamembran von *U. maydis* genutzt (Koepke et al., 2011). Digitonin interagiert mit den Sterolen der Plasmamembran und bildet dabei Komplexe, welche die Membran permeabel macht (Frenkel et al., 2014). Auf diese Art und Weise könnte Biotin-Phenol möglicherweise in das Cytoplasma der Zelle gelangen.

Ob eine der Membranpermeabilisierungsmethoden erfolgreich ist, kann ebenfalls mit Biotin-Fluorescein nachgewiesen werden. Bei einer erfolgreichen Aufnahme von Biotin-Fluorescein sollte es möglich sein, eine unspezifische *in vivo*-Markierungsreaktion mit APEX2 in *U. maydis* durchzuführen. Daher wurde die Aufnahme von Biotin-Fluorescein mit Hilfe von drei verschiedenen Verfahren in wildtypartigen *U. maydis* Hefezellen getestet (Abbildung 8 A). Die Zellen wurden in einem Biotin-Fluorescein enthaltenden Medium mit entweder geringem osmotischen Druck, hohem osmotischen Druck oder mit Digitonin inkubiert. Als Autofluoreszenzkontrolle diente ein Ansatz ohne Biotin-Fluorescein und als Negativkontrolle wurde Zellen in PBS ohne weitere Behandlung hinzugeben. In beiden Kontrollen konnte man in den Zellen statt Biotin-Fluorescein nur die zelleigene Autofluoreszenz beobachten. Bei geringem osmotischem Druck durch destilliertes Wasser wurde Biotin-Fluorescein nur an der Membran detektiert. Dagegen sorgte der hohe osmotische Druck in den Proben mit 1,2 M Sorbitol in PBS dafür, dass das Biotin-Fluorescein sich punktförmig an der Zellmembran akkumulierte, sich jedoch nicht homogen im Cytoplasma verteilte. Bei den Proben mit 40 μ M Digitonin in PBS konnte sowohl das stärkste Biotin-Fluorescein-Signal als auch eine Verteilung im Cytoplasma detektiert werden, was dies zur erfolgversprechendsten Methode machte.

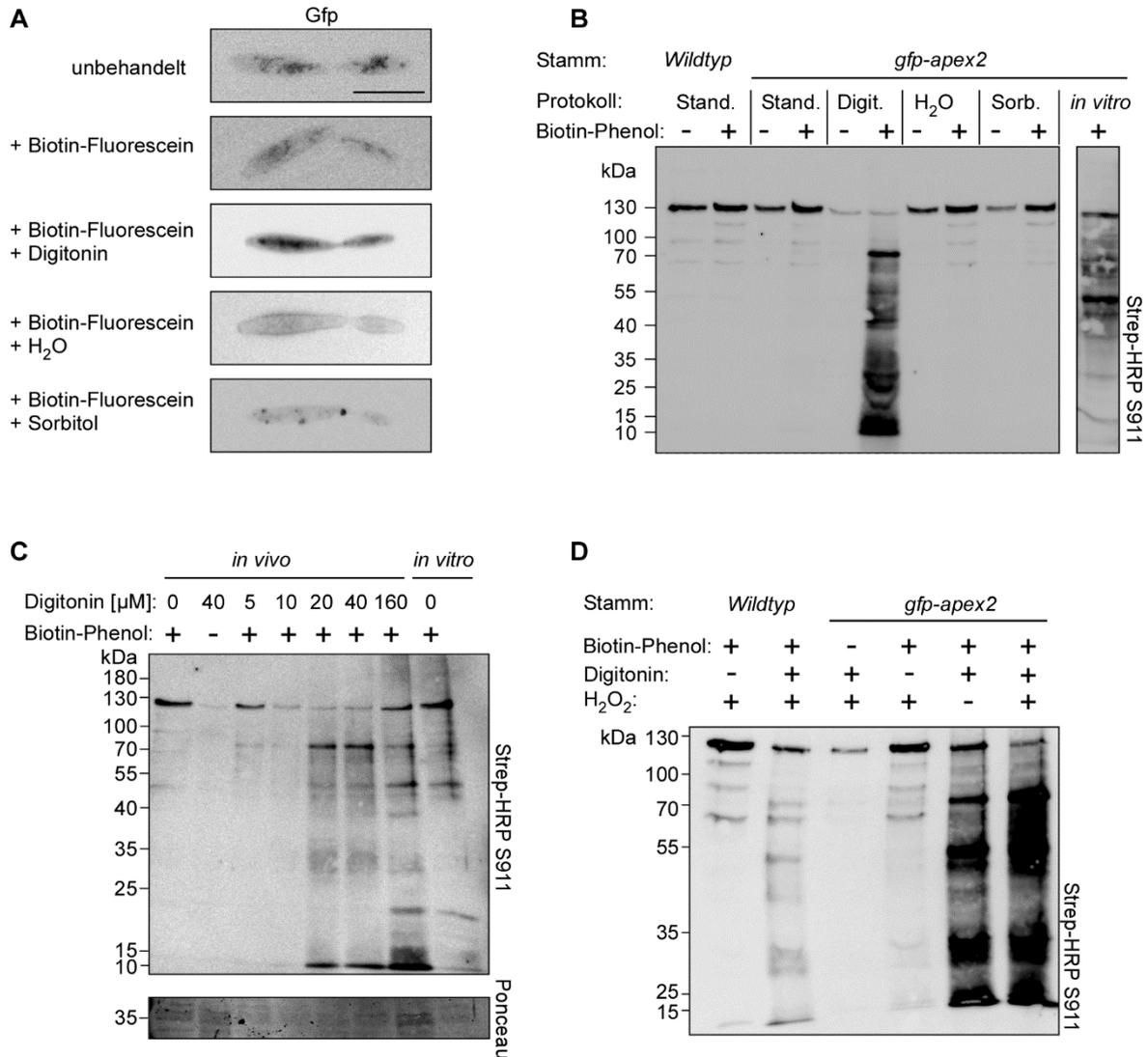


Abbildung 8: Etablierung einer Membranpermeabilisierungsmethode.

A) Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von *U. maydis* Hefezellen des wildtypartigen Laborstamms. Überprüft wurde die Biotin-Fluorescein-Aufnahme der Zellen durch die Inkubation mit verschiedenen membranpermeabilisierenden Medien. Der dargestellte schwarze Balken entspricht einer Länge von 10 μm. B) Streptavidin-Detektion von *in vivo* biotinylierten Proteinen des Gesamtzellextraktes in einem Westernblot. Das APEX2-*in vivo*-Protokoll wurde mit dem bislang genutzten Protokoll (Stand.: Standardprotokoll) und verschiedenen membranpermeabilisierenden Methoden (Digit.: Digitonin-Protokoll; H₂O: destilliertes Wasser-Protokoll; Sorb.: Sorbitol-Protokoll) getestet, wobei jeweils ein Ansatz mit und ohne Biotin-Phenol durchgeführt wurde. C) Detektion von *in vivo* biotinylierten Proteinen aus dem Zellextrakt des *gfp-apex2*-Stamms unter Verwendung verschiedener Digitonin-Konzentrationen. Als Ladekontrolle wurden die Proteine auf der Westernblotmembran mit Ponceau angefärbt. D) Nachweis der *in vivo*-Biotinylierung durch das Digitonin-Protokoll. Es wurde in jeweils eine Substanz weggelassen, um deren Einfluss auf die Initiierung der unspezifischen Markierungsreaktion zu überprüfen. Bei allen Westernblot Experimenten wurde stets dieselbe Menge Probenvolumen der jeweiligen Gesamtzellextrakte verwendet.

Als nächstes wurde der Frage nachgegangen, ob die Ergebnisse des Biotin-Fluorescein-Tests auch auf die Biotin-Phenol-Aufnahme zutreffen. Bei einer erfolgreichen Aufnahme von Biotin-Phenol sollte eine *in vivo*-Biotinylierung im cytoplasmatisch Gfp-APEX2 exprimierenden Stamm möglich sein (Abbildung 8 B). Dafür wurde das bislang verwendete Protokoll mit den jeweiligen Reagenzien angepasst. Der Zellextrakt der verschiedenen Ansätze wurde extrahiert und durch ein Westernblot-Verfahren mittels Streptavidin-HRP auf Biotinylierung untersucht. Dabei wurde jeder Ansatz jeweils mit und ohne Zugabe von Biotin-Phenol durchgeführt, um einen Unterschied zu den nativ Biotinylierten Proteinen sehen zu können. Als Positivkontrolle wurde zeitgleich auch ein *in vitro*-Ansatz durchgeführt. Das bislang verwendete Protokoll wurde als Negativkontrolle sowohl in dem APEX2-exprimierenden Stamm als auch im wildtypartigen Laborstamm durchgeführt. Die Detektion biotinylierter Proteine im Westernblot zeigte, dass nur bei der Membranpermeabilisation durch Digitonin eine unspezifische Biotinylierung von cytoplasmatischen Proteinen jeglicher Größe detektiert wurde. Alle andere Verfahren wiesen keine signifikante Zunahme von markierten Proteinen auf und lieferten vergleichbare Ergebnisse zu dem zuvor nicht erfolgreichen *in vivo*-Protokoll. Folglich wurde das Verfahren mit Digitonin für zukünftige Experimente übernommen.

Die Nutzung von Digitonin ermöglichte erstmalig eine *in vivo*-Anwendung von APEX2 in *U. maydis*. Da jedoch die angewandte Digitonin-Konzentration auf einem Verfahren basiert, welches nicht für Markierung von Proteinen entwickelt wurde, war es notwendig weitere Konzentrationen zu testen. Daher wurde die Minimalkonzentration von Digitonin für die APEX2-vermittelte *in vivo*-Biotinylierung ermittelt (Abbildung 8 C). Dafür wurde das APEX2-Digitonin-Protokoll mit verschiedenen Digitonin-Konzentrationen (5, 10, 20, 40, 160 μM) durchgeführt und der Gesamtzellextrakt anschließend auf unspezifische Biotinylierung untersucht. Die Westernblot-Ergebnisse zeigten, dass bei einer Digitonin-Konzentration von 5 μM und 10 μM nicht mehr unspezifisches Biotinylierungssignal generiert wurde als bei der Probe ohne Digitonin. Bei der Probe, die mit einer 20 μM Digitonin-Konzentration behandelt wurde, konnte man hingegen dieselbe Signalintensität beobachtet werden, wie bei der Probe mit der bislang verwendeten 40 μM Konzentration. Die Proben mit 160 μM Digitonin wiesen dagegen kaum stärkere Signalintensitäten auf und töteten viele Zellen bereits während der Inkubationszeit. Somit sind sowohl 20 μM als auch 40 μM Digitonin am geeignetsten. Da man innerhalb der relativ kurzen Inkubationszeit den größtmöglichen Effekt erreichen wollte, wurde die 40 μM Digitonin-Konzentration für das Protokoll ausgewählt. Diese Konzentration wurde von da an für alle Untersuchungen angewendet. Bei weiteren *in vivo*-Pilotversuchen mit Digitonin wurde in den Westernblot-Ergebnissen festgestellt, dass auch der Ausgangsstamm AB33 eine Zunahme von unspezifisch biotinylierten Proteinen jeglicher Größe aufwies (Abbildung 8 D). Dabei wurde ein zwar

deutlich schwächerer aber dennoch klar zu erkennender Signalschmier beobachtet, der dem einer erfolgreichen Biotinylierung durch APEX2 gleicht. Dies wurde bei vorherigen *in vivo*-Versuchen ohne Digitonin bislang nicht beobachtet. Daraufhin wurde das Digitonin-Protokoll systematisch überprüft, indem bei den *in vivo*-Proben entweder Biotin-Phenol, Digitonin oder Wasserstoffperoxid weggelassen und anschließend die unspezifische Biotinylierung in einem Westernblot detektiert wurde (Abbildung 8 D). Zu erwarten wäre, dass unspezifische Biotinylierung nur detektiert werden kann, wenn Biotin-Phenol, Digitonin und Wasserstoffperoxid hinzugegeben wurden. Wenn eine der drei Komponenten fehlt, sollte eine *in vivo*-Biotinylierung nicht stattfinden. Man konnte feststellen, dass bei dem Ausgangsstamm, welcher als Negativkontrolle diente, unspezifische Biotinylierung auftrat, wenn Digitonin hinzugegeben wurde. Beim Auslassen von Digitonin fand trotz Zugabe von Biotin-Phenol und Wasserstoffperoxid keine unspezifische Biotinylierung statt. Beim *gfp-apex2*-Stamm konnte wie erwartet ohne Biotin-Phenol keine Biotinylierung festgestellt werden. Daher konnte eine stressinduzierte native Biotinylierung ausgeschlossen werden. Wurde Biotin-Phenol hinzugefügt aber Digitonin weggelassen, konnte nur eine geringe Menge unspezifisch markierter Proteine detektiert werden. Jedoch wies der *gfp-apex2*-Stamm bereits bei der Zugabe von Biotin-Phenol und Digitonin sehr viel unspezifische Biotinylierung auf, obwohl Wasserstoffperoxid fehlte, um die Reaktion zu initiieren. In diesem Ansatz war die detektierte Signalintensität vergleichbar zum Ansatz mit Biotin-Phenol, Digitonin und Wasserstoffperoxid. Somit war für einen Anstieg von unspezifischer Biotinylierung scheinbar nur Digitonin und Biotin-Phenol aber kein Wasserstoffperoxid notwendig. Die Ergebnisse deuteten somit auf eine unspezifische Markierungsreaktion hin, welche durch die alleinige Zugabe von Digitonin initiiert wurde. Diese sollte eigentlich nur durch den Stress von reaktiven Sauerstoffspezies des Wasserstoffperoxids gestartet werden. Daraus ließ sich schließen, dass eine Inkubation der Zellen mit Digitonin bereits vor dem eigentlichen Reaktionsstart oxidativen Stress generierte. Dieser führte zur Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies, was wiederum zur Bildung von Biotin-Phenoxy-Radikalen führte. Auch Zellen ohne APEX2 waren durch diesen Digitonin-induzierten Stress in der Lage aus dem hinzugegebenen Biotin-Phenol Biotin-Phenoxy-Radikale für die Markierung von Proteinen zu bilden.

In einer weiteren Versuchsreihe, in der mit Hilfe des Digitonin-Protokolls verschiedene APEX2-Fusionsproteine getestet wurden, konnte dies erneut bestätigt werden. Es wurden für zukünftige Anwendungen verschiedene APEX2-Varianten mit unterschiedlicher subzellulärer Lokalisation hergestellt. Unter diesen APEX2-Varianten befanden sich ein mit einem Kernlokalisierungssignal (NLS) fusionierten NLS-Gfp-APEX2, einem mitochondrialen Lokalisierungssignal (MTS) fusionierten MTS-Gfp-APEX2 (Abbildung 9 A) und einem Rrm4-Gfp-APEX2-Fusionsprotein (Abbildung 9 B). Mit diesen drei Stämmen wurde ein

Markierungsexperiment unter Anwendung des Digitonin-Protokolls unternommen. Als Negativkontrolle wurde der wildtypartige Laborstamm genutzt. Da in diesem Stamm APEX2 nicht vorhanden war, sollte keine unspezifische Markierung entstehen. Der cytoplasmatisch exprimierende *gfp-apex2*-Stamm diente als Positivkontrolle. Erwartet wurde, dass sich die Markierungsmuster der verschiedenen Fusionsproteine aufgrund ihrer unterschiedlichen Lokalisation (Abbildung 9 C) und somit deren Kontakt zu nur einem Bruchteil aller in der Zelle vorkommenden Proteine unterschieden. Die Ergebnisse zeigten, dass sich die Bandenmuster zwischen den verschiedenen APEX2-Fusionsproteinen nicht wie erwartet signifikant unterschieden. Der Hintergrund bei den NLS-, MTS- und Rrm4-Varianten war etwas stärker. Zwar wiesen die Bandenmuster des Laborstamms und der *apex2*-Stämme geringfügige Unterschiede auf, jedoch waren keine einzigartigen Signalbandenmuster, welche auf eine Biotinylierung einer spezifischen Teilmenge aller Proteine hinweisen könnte, zu sehen. Aus den Ergebnissen ging zudem hervor, dass auch der wildtypartige Stamm unspezifische Biotinylierung in einem Maß aufwies wie man es eigentlich nur von den *apex2*-Stämmen erwartete. Dieses Ergebnis unterstützte die These, dass die Digitonin-Behandlung zu unerwünschten Nebenwirkungen führte.

Digitonin verursachte somit so viel Zellstress, dass keine kontrollierte APEX2-abhängige Reaktion durchgeführt werden konnte. Des Weiteren konnte man nicht sicher sein, ob durch den Digitonin-induzierten Stress eine native *in vivo*-Situation in den Zellen vorherrscht. Dies steht entgegen der initialen Idee eines *in vivo*-Markierungsverfahrens unter natürlichen Bedingungen. Die APEX2-Strategie wurde wegen dieser Ergebnisse aus zeittechnischen Gründen und zu Gunsten einer anderen Methode aufgegeben.

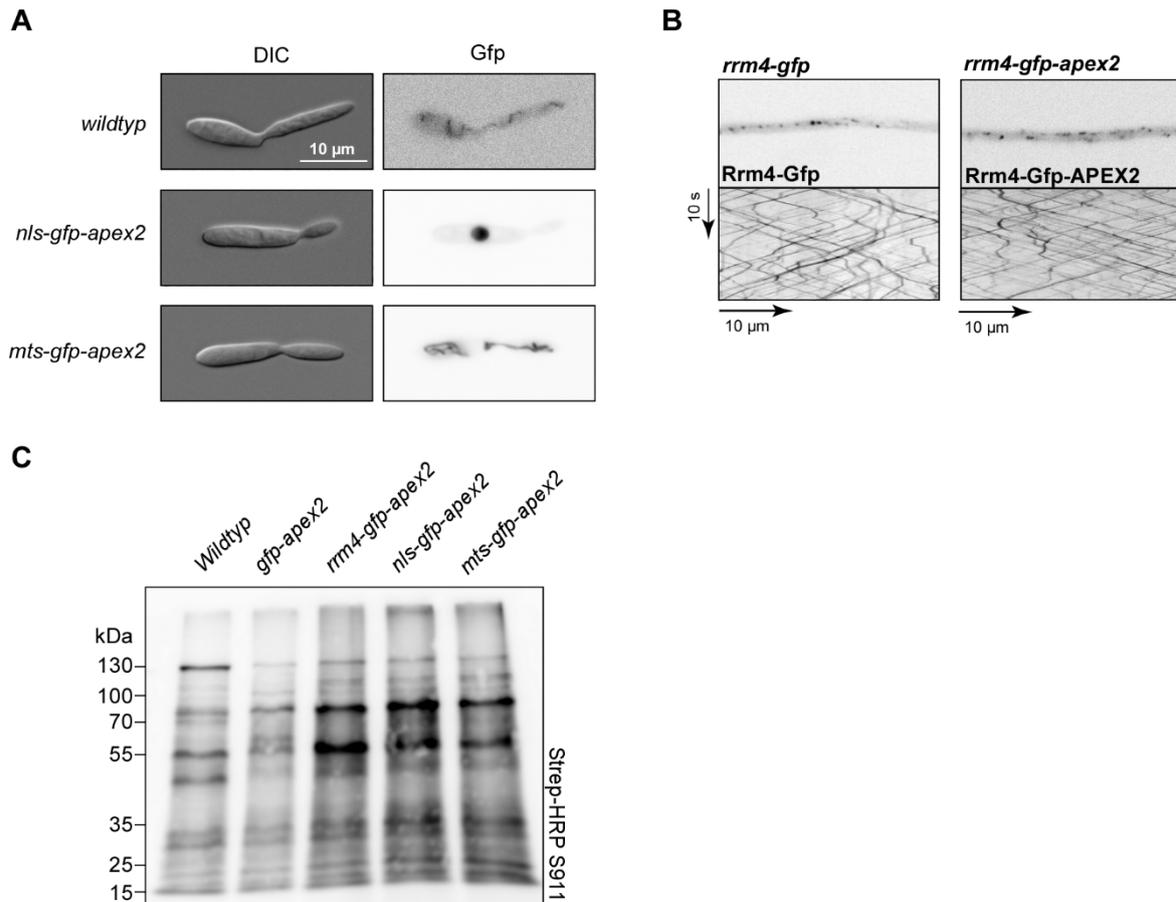


Abbildung 9: Untersuchung verschiedener APEX2-Varianten.

A) Licht- und fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von *U. maydis* Hefezellen des wildtypartigen Laborstamms sowie Stämmen in denen Gfp-APEX2 mit einem Kernlokalisierungssignal (NLS) bzw. einem mitochondrialen Lokalisierungssignal (MTS) fusioniert wurde. Der eingezeichnete Balken entspricht 10 μ m. B) Ausschnitte von fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen einer Hyphe des *Rrm4-Gfp* und *Rrm4-Gfp-APEX2* Expressionsstamms. Gezeigt ist jeweils ein 30 μ m großer Ausschnitt einer Hyphe. Von jedem Bildausschnitt wurde der entsprechende Kymograph abgebildet, welcher die Bewegung der detektierten Partikel über einen Zeitraum von 22,5 s visualisiert. C) Vergleich der auf der Westernblotmembran detektierten *in vivo* biotinylierten Proteinbandenmuster aus Gesamtzellextrakten verschiedener APEX2-Stämme. Die *in vivo* Markierung wurde mit dem etablierten Digitonin-Protokoll durchgeführt. Für die Detektion wurde von jedem Stamm dasselbe Volumen Gesamtzellextrakt aufgetragen.

2.2 Massenspektrometrische Analyse einer Rrm4-Immunpräzipitation

2.2.1 Immunpräzipitation von Rrm4

Als alternative Methode zur Identifizierung neuer Komponenten des endosomalen mRNP-Komplexes wurde eine massenspektrometrische Analyse aller Proteine einer Rrm4-Immunpräzipitation durchgeführt. Hierbei sollten Proteine des endosomalen mRNP-Komplex co-immunpräzipitiert werden, wobei vor allem Proteine, die durch Protein-Protein-Interaktionen verbunden sind, hierbei wesentlich häufiger identifiziert werden sollten (Abbildung 10). Daher kann man annehmen, dass bei einer Rrm4-Gfp-Immunpräzipitation insbesondere der direkte Interaktionspartner Upa1 aber auch bislang unbekannte direkte Interaktionspartner stark angereichert sein werden.

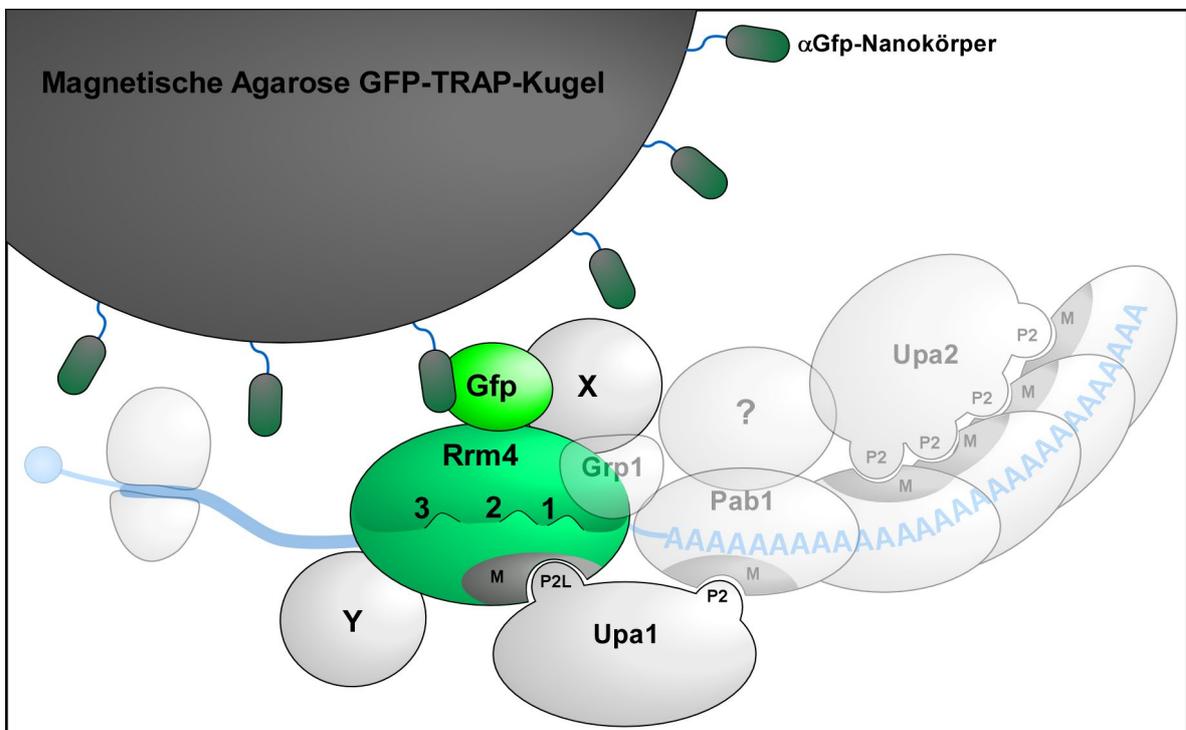


Abbildung 10: Erwartete Ergebnisse einer Rrm4-Immunpräzipitation.

Darstellung der erwarteten co-immunpräzipitierten Proteine des endosomalen mRNP-Komplexes. Das Rrm4-Gfp-Fusionsprotein wird mit Hilfe von Gfp-spezifischen Nanokörpern, die an magnetischen Agarose GFP-Trap-Kugeln konjugiert sind, immunpräzipitiert. Dabei sollten mit hoher Wahrscheinlichkeit die Proteine, die durch eine Protein-Protein-Interaktion mit Rrm4 interagieren, co-immunpräzipitiert werden. Daher sollte sowohl Upa1 wie auch andere unbekannte Interaktionspartner (X, Y) in der massenspektrometrischen Analyse der Rrm4-Immunpräzipitation als stark angereichert identifiziert werden. Da die mRNA unter den Zellaufschluss-Bedingungen eventuell degradiert wird, könnten alle mRNA-abhängigen Proteine und deren Interaktionspartner möglicherweise nicht co-immunpräzipitiert werden. Diese Proteine sind in dieser Abbildung transparent dargestellt. Von diesen Proteinen wird erwartet, dass sie im gegebenen Fall als nicht oder nur geringfügig angereichert gefunden werden.

Neben den direkten Interaktionspartnern von Rrm4 würden dann auch Proteine, die durch unterschiedliche Faktoren indirekt miteinander vernetzt sind, co-immunpräzipitiert werden. So wäre zu erwarten, dass sich Teile des endosomalen mRNP-Komplexes auch aufreinigen lassen. Dies würde zum Beispiel auf Proteine, die durch ihre mRNA-Assoziation co-immunpräzipitiert werden, zutreffen. Daher könnten so möglicherweise Grp1, Pab1 und Upa2 in Immunpräzipitationen angereichert werden. Um herauszufinden, ob bestimmte co-immunpräzipitierte Proteine ausschließlich wegen ihrer mRNA-Assoziation gefunden werden, wird eine zusätzliche Kontrolle benötigt, in der keine oder zumindest signifikant weniger mRNA im endosomalen mRNP-Komplex vorhanden ist. Dafür könnte man einen RNase-Verdau der Proben in Betracht ziehen, um so die mRNA und alle mit ihr assoziierten Proteine vom endosomalen mRNP-Komplex zu entfernen (Brannan et al., 2016). Rrm4 ist jedoch ein instabiles Protein (persönliche Kommunikation Lilli Olgeiser), somit wurde, um die Proteinintegrität nicht zu gefährden, auf eine zusätzliche Behandlung der Proben verzichtet. Daher wurde eine genetische Kontrolle in Form einer Rrm4-Mutante ausgewählt, welche durch eine Mutation in der ersten RRM-Domäne signifikant in ihrer mRNA-Bindeaffinität gestört ist (Becht et al., 2006). Die verringerte mRNA-Bindung der Rrm4^{mRRM1}-Variante führt zu dem gleichen morphologischen Phänotyp wie bei einer *rrm4*-Deletionsmutante (Becht et al., 2006). Trotz dieser Umstände lokalisiert Rrm4^{mRRM1} weiterhin im endosomalen mRNP-Komplex (Becht et al., 2006). Daher sollten durch die Rrm4^{mRRM1}-Gfp-Immunpräzipitation bei weitem weniger mRNA-abhängige Komponenten des endosomalen mRNP-Komplexes identifiziert werden. So wäre man in der Lage in einem Vergleich der identifizierten Proteine von Rrm4 und Rrm4^{mRRM1} zu differenzieren welche Proteine mRNA-assoziiert sind. Als Negativkontrolle dient eine Immunpräzipitation von cytoplasmatisch exprimiertem Gfp, welche Aufschluss über die durch diese Methode unspezifisch aufgereinigten Proteine geben sollte.

Als erstes musste jedoch ein Rrm4-Gfp-Immunpräzipitationsprotokoll angepasst werden, welches in der Lage war, möglichst viel volllängen Rrm4-Gfp aufzureinigen. In vorangegangenen Arbeiten wurde die GFP-Trap-Methode erfolgreich für eine Rrm4-Gfp-Immunpräzipitation angewendet. Daher wurde für die massenspektrometrische Analyse ein GFP-Trap-Protokoll getestet. Hierbei wurde überprüft, ob Rrm4-Gfp und cytoplasmatisches Gfp aus sechs Stunden alten *U. maydis* Hyphen angereichert werden konnte. Der Gesamtzellextrakt (GZ) von Hyphen der jeweiligen Expressionsstämme wurde isoliert und für eine Stunde mit den magnetischen GFP-Trap-Agarosekugeln inkubiert. Daraufhin wurden die GFP-Trap-Kugeln magnetisch vom Zellextrakt separiert und drei Mal gewaschen (W1, W2, W3). Anschließend wurden die Kugeln in reinem Wasser aufgenommen und mit einem LDS-Probenpuffer versetzt. Die Lösung wurde dann bei 95 °C gekocht, um die Bindung der aufgereinigten Proteine zu den GFP-Trap-Kugeln zu lösen.

Die GFP-Trap-Kugeln wurden daraufhin magnetisch von dem Eluat (E) entfernt. Von jedem Arbeitsschritt wurde eine Probe entnommen, für eine proteinbiochemische Analyse durch das SDS-PAGE-Verfahren der Größe nach aufgetrennt und anschließend mit Hilfe einer Coomassie-Färbung detektiert (Abbildung 11 A). Die Ergebnisse zeigten beim Eluat eine distinkte Bande bei etwa 112 kDa, welches dem Vollängen-Rrm4-Gfp entsprach und somit bewies, dass Rrm4-Gfp erfolgreich immunpräzipitiert werden konnte. Zusätzlich konnten distinkte Abbaubanden von Rrm4-Gfp beobachtet werden. Da Gfp sich am C-Terminus von Rrm4-Gfp befindet und die Proben von den Anti-Gfp-Nanokörpern der GFP-Trap-Kugeln gebunden wurden, handelte es sich hierbei höchstwahrscheinlich um N-terminale Verkürzungen. Die gleiche Anzahl und Größe der Abbaubanden konnte bereits in vorhergehenden Arbeiten beobachtet werden (Olgeiser et al., 2019). In den Proben des Durchflusses (DF) wie auch der einzelnen Waschschriffe (W1 W2, W3) waren keine großen Mengen Vollängen-Rrm4-Gfp bzw. Gfp erkennbar, was von einer guten Bindeaffinität der Anti-GFP-Nanokörper zu Rrm4-Gfp in dem verwendeten Protokoll zeugte. Die Anwendbarkeit des GFP-Trap-Protokolls wurde somit nachgewiesen, womit die Immunpräzipitation für die massenspektrometrische Analyse beginnen konnte.

Es wurden jeweils sechs biologische Replikate der Immunpräzipitation pro Fusionsprotein durchgeführt. Die Rrm4-Gfp-, Rrm4^{mRRM1}-Gfp- und Gfp-Proben wurden zur Lagerung eingefroren, nachdem 5 µL jeder Probe für eine Qualitätskontrolle entnommen wurden. In dieser Qualitätskontrolle wurden die präzipitierten Proteine dieser Proben per SDS-PAGE-Verfahren der Größe nach aufgetrennt und mit Hilfe einer Silberfärbung sichtbar gemacht (Abbildung 11 B). In allen Proben konnte das entsprechende Vollängen-Protein detektiert werden. In den Rrm4-Gfp- und Rrm4^{mRRM1}-Gfp-Proben konnten zusätzlich auch die distinkten Rrm4-spezifischen Abbaubanden beobachtet werden. Auffällig war, dass bei den Rrm4^{mRRM1}-Gfp-Proben weniger Vollängenprotein vorhanden war. Ob der Grund hierfür eine Instabilität oder einer geringere Immunpräzipitationsaffinität der mutierten Rrm4-Variante war, konnte nicht geklärt werden.

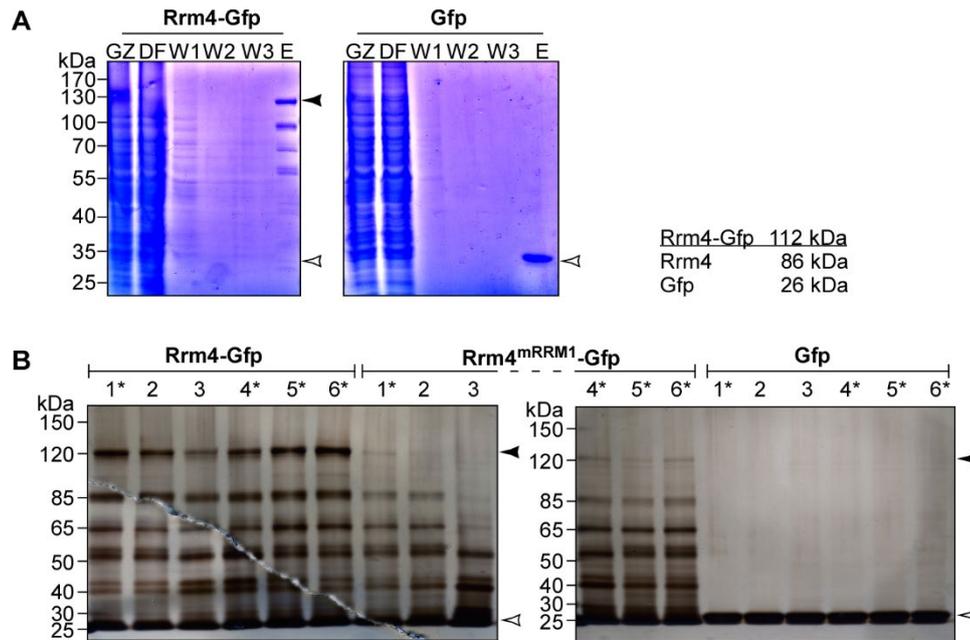


Abbildung 11: Nachweis der Immunpräzipitation von Rrm4-Gfp.

A) Detektion der Proteine durch eine Coomassie-Färbung des SDS-PAGE-Gels. Untersucht wurde, ob Vollängen-Rrm4-Gfp mit einer Größe von 112 kDa (schwarzer Pfeil) bzw. Gfp mit einer Größe von 26 kDa (weißer Pfeil) in den Proben der einzelnen Arbeitsschritte gefunden werden konnte. B) Nachweis der Immunpräzipitation der einzelnen Replikate der drei verschiedenen Stämme durch eine Silbergefärbung des SDS-PAGE-Gels. Aus jedem Replikate wurden 5 μ L aufgetragen und auf die Abundanz der Vollängen-Rrm4-Gfp, -Rrm4^{mRRM1}-Gfp (schwarzer Pfeil) und -Gfp (weißer Pfeil) untersucht. Die mit einem Stern gekennzeichneten Proben wurden für die massenspektrometrische Analyse eingeschickt.

Für die massenspektrometrische Analyse wurden nun jeweils vier Replikate pro Protein ausgewählt. Dabei wurde darauf geachtet, dass die jeweiligen vier Replikate eine hohe Menge Vollängen-Protein aufwiesen und die Proben der verschiedenen Stämme von denselben Versuchstagen stammen. Die Entscheidung fiel daraufhin auf die Replikate 1, 4, 5 und 6 der drei Stämme. Die Proben wurden umgehend durch einen Kollaborationspartner (Falk Butter, Institute of Molecular Biology in Mainz) mittels Flüssigchromatographie und gekoppelter Massenspektrometrie analysiert. Mit Hilfe des Maxquant-Programms wurde so von unserem Kollaborationspartner eine Liste der identifizierten Proteine und deren Anreicherungs- und Signifikanzwerte erstellt (Tyanova et al., 2016). Für die weitere Analyse und Auswertung der MS-Ergebnisse wurden nur die drei Replikate berücksichtigt, die in einer Hauptkomponentenanalyse am besten clustern. Somit wurden die Replikate 4, 5 und 6 ausgewertet.

2.2.2 Analyse der massenspektrometrischen-Daten der co-immunpräzipitierten Proteine

Die Ergebnisse der massenspektrometrischen Analyse unseres Kollaborationspartners enthielten Listen von Proteinen, die in den jeweiligen Proben identifiziert wurden. Diese Listen beinhalteten bereits eine quantitative Auswertung, in welcher bestimmt wurde wie stark ein Protein angereichert war. Dafür wurden die Anreicherungs- und Signifikanzwerte (p-Werte) aller identifizierter Proteine der Rrm4-Gfp- und der Rrm4^{mRRM1}-Gfp-Proben jeweils im Verhältnis zu den als Kontrolle dienenden Gfp-Proben gesetzt. Die Ergebnisse wurden in einem Vulkan-Plots graphisch dargestellt, in welchen die Proteine nach ihrer Anreicherung in Relation zum Signifikanzwert aufgetragen wurden (Abbildung 12 A, B). Damit ein Protein als signifikant angereichert galt, musste es einen $-\log_{10}$ Signifikanzwert von mindestens 1,3 haben, welches einem Signifikanzwert von 0,05 entspricht. Auch musste der \log_2 -Anreicherungsvalue mindestens 1 betragen, was eine doppelte so hohe Häufigkeit wäre.

Zunächst wurden die in Rrm4-Gfp identifizierten Daten analysiert (Abbildung 12 A). Es wurden im Vergleich von Rrm4-Gfp zu Gfp 937 angereicherte Proteine identifiziert (Tabelle 1). Davon waren 280 Proteine signifikant in Rrm4-Gfp angereichert, während man in den Gfp-Proben nur 15 signifikant angereicherte Proteine zählte. Die 280 signifikant angereicherten Proteine von Rrm4-Gfp wurden daraufhin untersucht, ob Komponenten des endosomalen mRNP-Komplexes co-immunpräzipitiert werden konnten (Abbildung 12 C). Der direkte Rrm4-Interaktionspartner Upa1 wie auch das mRNP Upa2 wurden signifikant angereichert. Dies bewies, dass es möglich war mit einer Rrm4-Gfp-Immunpräzipitation Komponenten des mRNP-Komplexes aufzureinigen. Upa2 war sogar das am meisten angereicherte Protein im gesamten Rrm4-Gfp-Datensatz. Pab1 konnte auch im Rrm4-Gfp-Datensatz identifiziert werden, jedoch war es nicht signifikant angereichert. Das RNA bindende Protein Grp1 dagegen wurde gar nicht detektiert. Des Weiteren wurde das Septin-Protein Cdc11 signifikant angereichert vorgefunden. Es wurde bereits in vorangehenden Arbeiten gezeigt, dass Cdc11, dessen mRNA von Rrm4 transportiert wird, auch als Fracht-Protein auf Endosomen vorkommt (Zander et al., 2016). Auch die anderen drei Septine Cdc3, Cdc10 und Cdc12 sind als nicht signifikant angereichert in den Rrm4-Gfp-Ergebnissen gefunden worden. Die Anwesenheit der Septine ließ darauf schließen, dass sich unter den angereicherten Proteinen auch weitere Fracht-Proteine befinden könnten. Auch das endosomal assoziierte Protein Rab5a, welches unabhängig von der Funktion des mRNP-Komplexes an den frühen Endosomen lokalisiert, wurde identifiziert. Folglich könnten auch andere bislang unbekannte endosomale Proteine im Datensatz vorhanden sein.

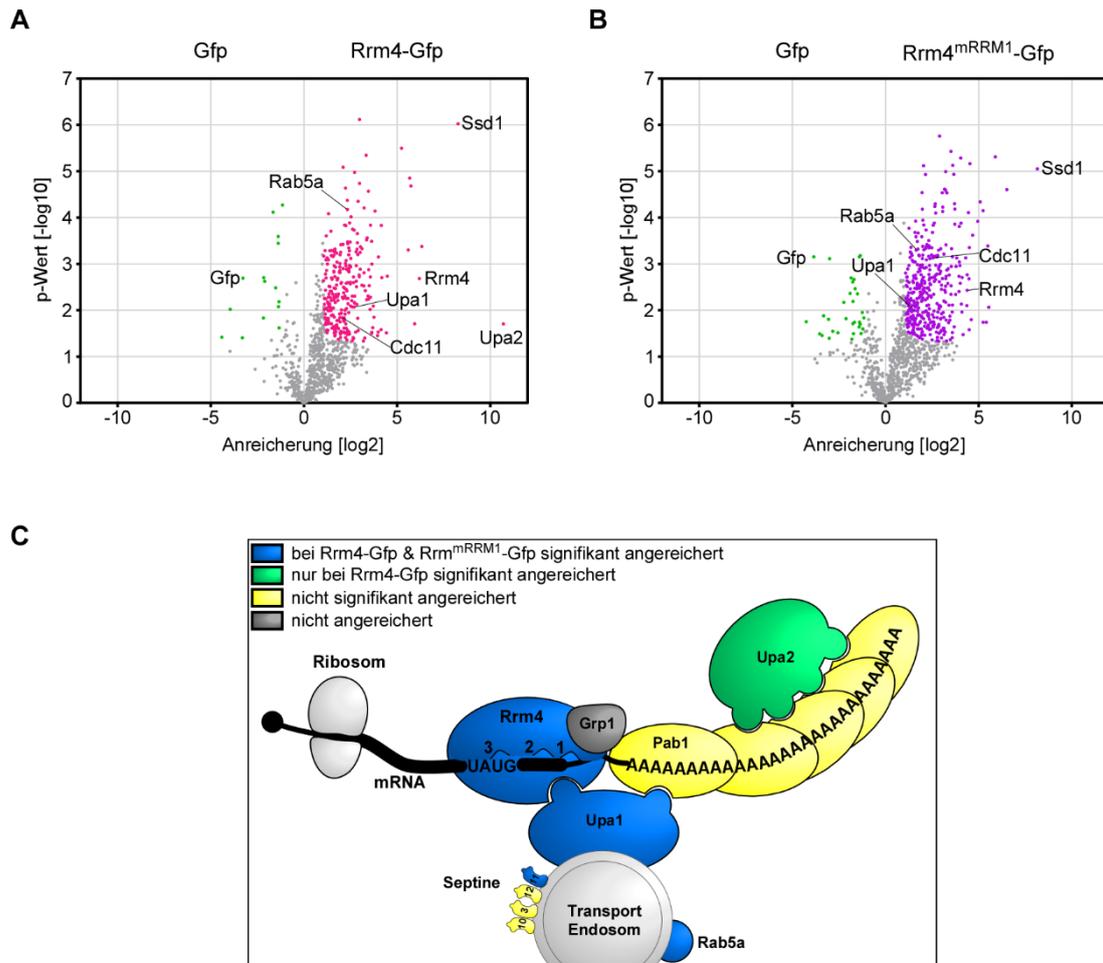


Abbildung 12: Identifizierte Proteine der massenspektrometrischen Analyse.

A) Vulkan-Plot aller identifizierten Proteine aus den Rrm4-Gfp- und Gfp-Proben. In diesem Graphen werden alle Proteine anhand ihrer Anreicherung und ihres Signifikanzwerts (p-Wert) kartiert. Proteine deren Anreicherung und Signifikanzwert signifikant sind, sind farblich dargestellt. Bekannte endosomal assoziierte Proteine, unter anderem die des mRNP-Komplexes sind markiert. Alle nicht signifikant angereicherten Proteine sind grau dargestellt. B) Vulkan-Plot der in den Rrm4^{mRRM1}-Gfp- und Gfp-Proben identifizierten Proteine. C) Schematische Darstellung der identifizierten Proteine des endosomal mRNP-Komplexes.

In diesem Datenset wurden auch 35 Proteine gefunden, die mit Ribosomen assoziieren. Sollten diese Proteine tatsächlich zusammen mit dem endosomal mRNP-Komplex lokalisieren, so könnte dies für die Theorie der lokalen Translation sprechen. Bei dieser Theorie wird angenommen, dass die von Rrm4 transportierte mRNA auch auf den Endosomen translatiert wird (Zander et al., 2016). Interessanterweise wurden auch 29 mit Mitochondrien assoziierende Proteine gefunden. Darunter befinden sich unter anderem mitochondrielle ribosomale Proteine wie auch einige mitochondriale Transporter. Diese Beobachtung unterstützt die derzeitige angenommene Hypothese, bei welcher man davon ausgeht, dass Kern-kodierte mitochondriale Proteine mit Hilfe des endosomal mRNP-Komplexes transportiert werden (Olgeiser et al., 2019).

Im Vergleich der Rrm4^{mRRM1}-Gfp-Proben zu der Gfp-Kontrolle (Abbildung 12 B) wurden insgesamt 1102 Proteine identifiziert (Tabelle 1). Davon waren 390 Proteine bei Rrm4^{mRRM1}-Gfp signifikant angereichert. Bei der Gfp-Kontrolle dagegen waren nur 32 Proteine signifikant angereichert. Damit sind mehr Proteine im Rrm4^{mRRM1}-Gfp-Datensatz signifikant angereichert worden als im Rrm4-Gfp-Datensatz. Erneut wurde zunächst nach bekannten endosomalen mRNP-Komplex-Proteinen gesucht (Abbildung 12 C). Upa1 wurde signifikant angereichert identifiziert. Upa2 dagegen wurde als nicht signifikant angereichert erfasst, genau wie Pab1. Grp1 wurde erneut nicht vorgefunden. Dies ließ vermuten, dass auch im Rrm4^{mRRM1}-Gfp-Datensatz unbekannte mRNP-Komplex-Komponenten vorhanden sein könnten, wobei durch die mutationsbedingt verringerte RNA-Bindeaffinität von Rrm4^{mRRM1}-Gfp möglicherweise weniger signifikant angereicherte RNA-abhängige mRNP-Komplex-Komponenten vorhanden sein könnten. Cdc11 wurde auch signifikant und die anderen drei Septine nicht signifikant angereichert angetroffen. Somit wurde bestätigt, dass auch Fracht-Proteine im Datensatz vorhanden sein müssten. Auch Rab5a wurde signifikant angereichert womit, ähnlich wie beim Rrm4-Gfp-Datensatz, auch generelle endosomale Proteine aufgereinigt wurden.

Tabelle 1: Gesamtzahl aller identifizierten Proteine.

Dargestellt sind die absoluten Zahlen aller identifizierten Proteine und der signifikant angereicherten Proteine der jeweiligen quantitativen Analysen der Rrm4-Gfp- und Rrm4^{mRRM1}-Gfp-Proben im Vergleich zur Gfp Probe.

	Rrm4-Gfp	Rrm4 ^{mRRM1} -Gfp
Anzahl aller identifizierte Proteine	937	1102
Signifikant angereicherte Proteine	Gfp: 15 Rrm4: 280	Gfp: 32 Rrm4 ^{mRRM1} : 390

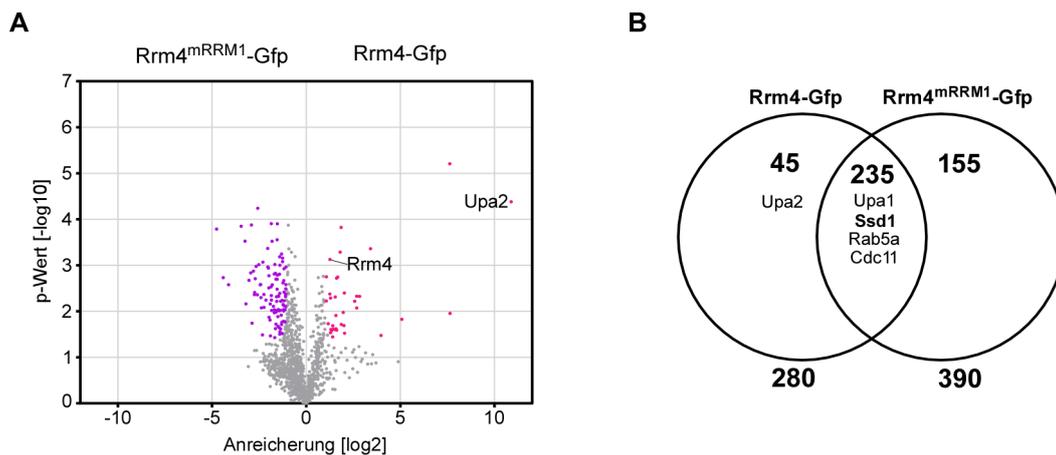


Abbildung 13: Quantitativer und qualitativer Vergleich der Rrm4-Gfp- und Rrm4^{mRRM1}-Gfp-Proben.

A) Vulkan-Plot des Rrm4-Gfp- und Rrm4^{mRRM1}-Gfp-Vergleichs. Signifikant angereicherte Proteine sind farblich dargestellt und bekannte endosomal assoziierte Proteine sind eingezeichnet. B) Venn-Diagramm der signifikant angereicherten Proteine aus dem Vergleich der jeweiligen Probe mit cytoplasmatischem Gfp. Es wurde die Anzahl der Proteine dargestellt, die ausschließlich in Rrm4-Gfp, Rrm4^{mRRM1}-Gfp und in beiden Proben vorkommen. Bereits bekannte endosomal assoziierende Proteine sind je nach Vorkommen in den entsprechenden Feldern aufgelistet.

Als nächstes wurde eine differenzielle Analyse der Datensätze von Rrm4-Gfp und Rrm4^{mRRM1}-Gfp durchgeführt. Zunächst wurde quantitativ festgestellt in welcher der beiden Proben die jeweiligen Proteine am meisten signifikant angereichert wurden. Von insgesamt 1128 identifizierten angereicherten Proteinen wurden insgesamt 36 in Rrm4-Gfp und 106 in Rrm4^{mRRM1}-Gfp als signifikant angereichert identifiziert. Da man erwartet hatte, dass durch die verringerte RNA-Bindeaffinität von Rrm4^{mRRM1}-Gfp (Becht et al., 2006) weniger RNA-abhängige Proteine aufgereinigt würden, stellte sich die Frage, ob mehr falsch-positive Proteine signifikant in Rrm4^{mRRM1}-Gfp angereichert wurden. Da man sich die höchsten Chancen erhoffte, eine neue Rrm4-abhängige mRNP-Komplex-Komponente bei den Proben mit einem voll funktionellen mRNP-Komplex zu finden, wurde dieser Frage vorerst nicht nachgegangen.

Nach der Untersuchung der 36 signifikant angereicherten Proteine im Rrm4-Gfp-Datensatz konnte nur Upa2 als einziges bekanntes mRNP-Komplex-Protein identifiziert werden. Des Weiteren wurde auch Rrm4 selber als signifikant angereichert im Rrm4-Gfp-Datensatz gefunden. Dies bedeutete, dass mehr Rrm4-Protein in den Rrm4-Gfp-Proben gefunden wurde als in den Rrm4^{mRRM1}-Gfp-Proben. Dies stimmt mit der Beobachtung in der Silbergelkontrolle (Abbildung 11 B) überein, in der weniger Vollängen-Rrm4^{mRRM1}-Gfp detektiert wurde. Ließ man Upa2 und Rrm4 außer Acht, so erhielt man eine Liste von 34 Kandidaten, die laut der Grundannahme möglicherweise RNA-abhängige mRNP-Komplex-Komponenten enthalten könnte. Bei der Durchführung einer qualitativen Analyse der Rrm4-

Gfp- und Rrm4^{mRRM1}-Gfp-Datensätze (Abbildung 13) wurden 235 Proteine in beiden Datensätzen als signifikant angereichert identifiziert (Tabelle 2). Darunter befanden sich unter anderem Upa1, Cdc11 und Rab5a. Unter diesen 235 Proteinen sollten sich nach der Grundhypothese potentielle RNA-unabhängige Kernkomponenten des endosomalen mRNP-Komplexes befinden. Die beiden generierten Listen wurden einer weiteren genaueren Untersuchung unterzogen, um potentielle mRNP-Komplex-Kandidaten herauszufiltern.

Tabelle 2: Gesamtzahl der identifizierten Proteine im Vergleich zwischen Rrm4-Gfp und Rrm4^{mRRM1}-Gfp.

Aufgelistet sind die absoluten Zahlen aller identifizierten Proteine und der signifikant angereicherten Proteine aus den quantitativen Analysen der Rrm4-Gfp- und Rrm4^{mRRM1}-Gfp-Proben im Vergleich zueinander.

	Rrm4-Gfp vs Rrm4 ^{mRRM1} -Gfp
Anzahl aller identifizierten Proteine	1128
Signifikant angereicherte Proteine	Rrm4: 36 Rrm4 ^{mRRM1} : 106

2.2.3 Identifikation der vielversprechendsten Kandidaten

Die Ergebnisse der quantitativen und qualitativen Analyse der identifizierten Proteine wurden auf vielversprechende Kandidaten untersucht. Das Ziel war es neue Rrm4-abhängige mRNP-Komplex-Komponenten zu finden. Daher wurde nach Kandidaten anhand verschiedener Kriterien gesucht. Damit ein Protein als vielversprechender Top-Kandidat eingestuft werden konnte, musste es zumindest eines der Kriterien erfüllen.

Zunächst wurde nach RNA-assoziierten Proteinen gesucht. Dafür musste das Protein oder ein Homolog dieses Proteins entweder als RNA-assoziiertes Protein beschrieben worden sein oder eine RNA-bindende Domäne besitzen. Neben RNA-assoziierten Proteinen wurde auch nach uncharakterisierten Proteinen gesucht, deren Funktion und dessen Homologe zwar unbekannt waren, die jedoch eine hohe Anreicherung oder eine potentiell endosomal assoziierte Domäne aufwiesen. Die Anreicherung der Proteine wurde zwar berücksichtigt, jedoch nicht als striktes Ausschlusskriterium angewandt, da eine mRNP-Komplex-Assoziation nicht zwingend mit hoher Anreicherung einherging, wie man anhand des Rrm4-Interaktionspartners Upa1 sehen konnte. Zusätzlich wurde eine Suche nach potentiellen PAM2-Motiven durchgeführt, welche als Protein-Protein-Interaktionsdomäne, die unter anderem die Interaktion von Rrm4 und Upa1 ermöglicht, bekannt ist. Dabei wurde nach der

spezifischen Aminosäurefolge (AXXFXP) von Alanin (A) gefolgt von zwei beliebigen Aminosäuren (X), Phenylalanin (F), erneut gefolgt von einer beliebigen Aminosäure und schließlich Prolin (P) gesucht.

Durch das Anwenden der oben beschriebenen Kriterien konnte die hohe Anzahl der identifizierten Proteine erheblich reduziert werden. Hierbei wurde mit Hilfe von Proteindomänenvorhersagen und Homologieanalysen die Liste der potentiellen 34 mRNA-abhängigen Kandidaten und die der 235 potentiellen Kernkomponenten des endosomalen mRNP-Komplexes untersucht. Dadurch konnten aus den 269 Proteinen fünfzehn Top-Kandidaten identifiziert werden, welche sich für eine weitere genauere Untersuchung qualifizierten. Unter diesen fünfzehn Top-Kandidaten befanden sich neun, die als RNA-assoziiert kategorisiert wurden (Tabelle 3). Betrachtete man diese RNA-assoziierten Proteine so befanden sich darunter die vier RNA-Helikasen UMAG_10655, UMAG_00652, UMAG_10410 und UMAG_11769. Des Weiteren wurden bei den drei Proteinen UMAG_04390, UMAG_03724 und UMAG_05392 die RNA-bindende RRM-Domäne identifiziert. Beim Protein UMAG_01220 wurde die RNA-bindende RNB-Domäne und eine potenzielle PAM2-Domäne gefunden. Der Kandidat UMAG_03013 wurde aufgrund des bekannten mRNA-Bindeverhaltens des *clu1*-Homologes in *S. cerevisiae* ausgesucht (Gao et al., 2014). Die sechs nicht mRNA-assoziierten Kandidaten wurden als Kandidaten mit unbekanntem Funktionen kategorisiert (Tabelle 4). UMAG_12107, UMAG_03972 und UMAG_11225 wurden aufgrund ihrer relativ hohen Anreicherung ausgesucht. UMAG_05058 dagegen wurde wegen der Einzelstrang-DNA-bindenden Proteindomäne (ssDNA) ausgesucht. Die markante Ähnlichkeit der Einzelstrang-RNA (ssRNA) zur ssDNA und der Umstand, dass einige ssDNA-bindende Proteine auch ssRNA binden (Dickey et al., 2013) machten UMAG_05058 zu einem interessanten Kandidaten. UMAG_10266 wurde aufgrund seiner zwei unbekanntem DUF1682-Domänen und der zwei möglichen Transmembrandomänen (TM) ausgesucht. Transmembrandomänen könnten eine Lokalisation an frühen Endosomen ermöglichen (Cosson et al., 2013), was als interessant eingestuft wurde, da Rrm4 auch weitere Linkerproteine neben Upa1 besitzen könnte. Bei UMAG_15053 wurde ebenfalls wegen einer potentiellen Transmembrandomäne, den sechs unbekanntem DUF3712-Domänen und der potentiellen PAM2-Sequenz ausgewählt. Von allen Kandidaten wurde eine Untersuchung der Lokalisation in der Zelle mit Gfp-Fusionsproteinen geplant. Vorerst wurden jegliche Untersuchungen auf die RNA-assoziierten Kandidaten beschränkt. Zuerst wurden die Kandidaten UMAG_03013 und UMAG_01220 näher untersucht, da bei beiden Proteinen bereits in anderen Organismen eine RNA-Bindung nachgewiesen werden konnte (Gao et al., 2014; Uesono et al., 1997). Daher musste bei diesen zwei Kandidaten lediglich verifiziert werden, ob sie auch Teil des Rrm4-abhängigen mRNA-Transports sind.

In dieser Arbeit wird nun ausschließlich von den Ergebnissen von UMGAG_01220 berichtet, da weitere Untersuchungen dieses Protein als vielversprechendsten Kandidaten des endosomalen mRNP-Komplexes einstufen.

Tabelle 3: mRNA-assoziierte Kandidaten des endosomalen mRNP-Komplexes.

Auflistung der neun vielversprechendsten Kandidaten mit RNA-assoziierten Proteindomänen. Die Kandidaten sind nach ihrer Anreicherung in den Rrm4-Gfp-Proben sortiert.

Protein ID	Genbeschreibung	Anreicherung	p Wert [-log10]	Proteindomänen	Vorhanden in Rrm4 ^{mRRM1}
UMAG_01220	Verwandt mit SSD1-Protein	8,27	6,02	PAM2, Coiled-Coil, RNB	Ja
UMAG_10655	Wahrscheinliche ATP-anhängige RNA-Helikase DHH1	3,64	1,52	Helikase	Ja
UMAG_00652	Verwandt mit RNA-Helikase	3,19	1,34	Helikase	Ja
UMAG_04390	Uncharakterisiertes Protein	2,32	1,54	RRM	Nein
UMAG_10410	Wahrscheinlich HAS1 - Helikase assoziiert mit Set1p	2,09	2,25	Helikase	Ja
UMAG_03013	Geclustertes Mitochondrien-Protein-Homolog	2,01	2,60	CLU, TPR	Ja
UMAG_03724	Verwandt mit LHP1 - RNA-bindendes Protein	1,84	1,37	LA, RRM	Nein
UMAG_11769	Wahrscheinlich SUB2 - mRNA-Export-Protein, Mitglied der DEAD-box RNA-Helikase Superfamilie	1,58	1,65	Helikase	Ja
UMAG_05392	Uncharakterisiertes Protein	1,19	2,70	RRM	Nein

Tabelle 4: Nicht mRNA-assoziierte Kandidaten des endosomalen mRNP-Komplexes.

Auflistung sechs weiterer Kandidaten, die sich durch ihre jeweilige Proteindomäne oder hohe Anreicherung für zukünftige Untersuchungen qualifiziert haben. Die Liste anhand der Anreicherung sortiert.

Protein ID	Genbeschreibung	Anreicherung	p Wert [-log10]	Proteindomänen	Vorhanden in Rrm4 ^{mRRM1}
UMAG_12107	Uncharakterisiertes Protein	5,94	1,71	ATPase	Nein
UMAG_03972	Uncharakterisiertes Protein	5,74	4,68	Ribosomal, Coiled Coil	Ja
UMAG_11225	Uncharakterisiertes Protein	4,47	2,74	Coiled Coil, KOW	Ja
UMAG_05058	Uncharakterisiertes Protein	3,63	3,49	ssDNA bindend	Ja
UMAG_10266	Uncharakterisiertes Protein	2,96	2,76	Signal Peptid, 2x TM, 2x DUF1682	Ja
UMAG_15053	Wahrscheinliches konserviertes hypothetisches <i>Ustilago</i> -spezifisches Protein	1,58	2,05	TM, PAM2, 6x DUF3712	Nein

2.3 Untersuchung des Kandidaten UMAG_01220 - *ssd1*

2.3.1 Bioinformatische Analyse von *Ssd1*

Das als mRNA-assoziiert klassifizierte Protein UMAG_01220 galt als eines der besten Kandidaten. Die Genbeschreibung von UMAG_01220 betitelte es als verwandt mit dem SSD1-Protein. Um zu überprüfen, ob es sich dabei tatsächlich um das Homolog des *S. cerevisiae* Proteins SSD1 handelt, wurde zunächst mit einer vergleichenden Analyse der verschiedenen Ssd1-Proteine aus unterschiedlichen Pilzen durchgeführt. Dafür wurden auch Ssd1-Homologe aus verschiedenen Pilzspezies der Basidiomyceten und Ascomyceten ausgewählt und verglichen. Der Hauptfokus lag dabei auf der Proteindomänenarchitektur des Proteins und dem Grad der Konservierung (Abbildung 14). Zunächst wurde die UMAG_01220 Proteinsequenz mit Hilfe des NCBI - Protein Blast Programms (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE=Proteins>; Altschul et al., 1990) mit der von SSD1 aus *S. cerevisiae* verglichen (Abbildung 14 A). Dabei wurde festgestellt, dass die N-terminale Region von UMAG_01220 keine Homologie zu SSD1 aufwies. Daraufhin wurde UMAG_01220 mit weiteren Pilzspezies untersucht. Hierfür wurden sowohl Spezies ausgewählt, bei welchen SSD1-Homologe bereits untersucht wurden, wie auch Spezies welche Rrm4-Homologe und somit potentiell einen Rrm4-abhängigen endosomalen mRNA-Transport besitzen. Als einen Vertreter der Basidiomyceten mit Homologen des endosomalen mRNA-Transports mit Rrm4, Upa1 und Upa2 wurde *Coprinopsis cinerea* verwendet (Müller et al., 2019). *Cryptococcus neoformans var. grubii* wurde als Basidiomycet mit Homologen von Rrm4 und Upa1, aber degeneriertem Upa2 ausgesucht (Müller et al., 2019). *Malassezia globosa* ist eine Spezies aus der Familie der Basidiomyceten welcher keine Rrm4- und Upa2-Homologe besitzt (Müller et al., 2019). Daher diente *M. globosa* als basidiomycetische Kontrolle ohne Rrm4-abhängigen endosomalen mRNA-Transport. *Sordaria macrospora* und *Neurospora crassa* dienten als Vertreter der Ascomyceten in welchen Ssd1 bereits untersucht wurde (Herold & Yarden, 2017; Stein et al., 2020). Diese beiden Spezies besitzen auch keine Rrm4-Homologe und somit auch keinen Rrm4-abhängigen endosomalen mRNA-Transport (Müller et al., 2019). Die Proteinsequenzen der Ssd1-Homologe all dieser Spezies wurden dann mit Hilfe des NCBI - Protein Blast Programms miteinander verglichen.

Betrachtete man die Konservierung von UMAG_01220 im Vergleich zu den verschiedenen Ssd1-Homologen so konnte man feststellen, dass nur der Bereich ab Position 540 des UMAG_01220-Proteins bei allen Organismen stark konserviert war (Abbildung 14 A). Damit war in allen Spezies die Region um die Ribonuklease II (RNB) -Domäne herum konserviert. In *C. cinerea* und *M. globosa* war der konservierte Bereich zum N-Terminus hin länger. Des Weiteren konnte eine 105 Aminosäuren große Region in der N-terminalen Hälfte ab Position 220 in *C. cinerea* und *C. neoformans var. grubii* schwach konserviert vorgefunden

werden. Bei den restlichen Spezies waren die ersten 540 Aminosäuren von UMAG_01220 nicht konserviert. Dies könnte auf eine mögliche Spezialisierung dieser Region auf den Rrm4-abhängigen endosomalen mRNA-Transport der jeweiligen Spezies hinweisen, da nur die beiden anderen Rrm4-Homologe besitzenden Spezies *C. cinerea* und *C. neoformans* var. *grubii* geringe Konservierung im N-terminalen Bereich vorweisen konnten.

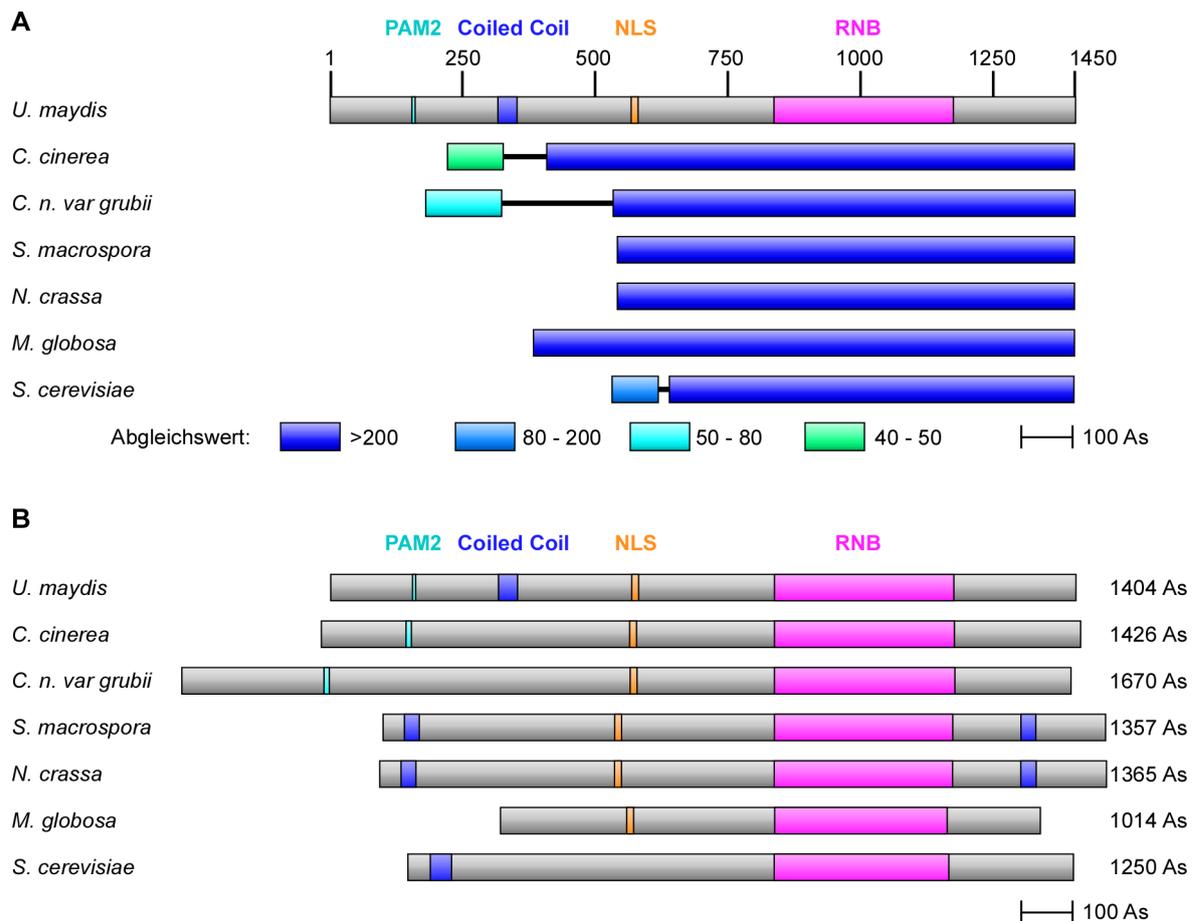


Abbildung 14: Vergleich der UMAG_01220 Proteinsequenz mit bekannten SSD1-Homologen.

A) Darstellung der UMAG_01220 Proteinsequenzkonservierung zu SSD1-Homologen aus anderen Pilzspezies. Die Größe des Protein-Blast-Abgleichswerts der konservierten Bereiche ist farblich dargestellt. Die Skala bildet die Aminosäureposition innerhalb des Proteins ab. Die Position der in UMAG_01220 gefundenen Proteindomänen sind farblich eingezeichnet. B) Ergebnisse der Proteindomänenvorhersage durch das SMART-Programm. Die in UMAG_01220 gefundenen Domänen wurden in den SSD1-Homologen der anderen Pilzspezies gesucht. Das Kernlokalisationssignal wurde mit Hilfe des NLS Mapper-Programms vorhergesagt. Die Anzahl der Aminosäuren (As) der jeweiligen Proteine ist dargestellt.

Als nächstes wurden die Proteindomänen von UMAG_01220 genauer untersucht (Abbildung 14 B). SSD1 aus *S. cerevisiae* ist ein 1250 Aminosäuren großes Protein, bei welchem unter anderem eine RNB-Domäne, eine Kernlokalisierungssequenz (NLS) und zwei N-terminale Prion-artige Domänen (PLD) beschrieben wurden. Um zu überprüfen welche Proteindomänen UMAG_01220 besitzt und um deren Position innerhalb des Proteins zu bestimmen wurde die Proteinsequenz mit dem SMART-Proteindomänenvorhersageprogramm (http://smart.embl-heidelberg.de/smart/set_mode.cgi?NORMAL=1; Letunic et al., 2002) untersucht. Die Analyse identifizierte innerhalb der Aminosäuresequenz eine RNB- und eine Coiled-Coil-Domäne. Das Vorhandensein einer potentiellen NLS wurde mit dem Programm NLS Mapper (http://nls-mapper.iab.keio.ac.jp/cgi-bin/NLS_Mapper_form.cgi; Kosugi et al., 2009) festgestellt. Zusätzlich wurden innerhalb von Ssd1 anhand des Peptidmotivs AXXFXP manuell potentielle PAM2-Motive kartiert. Die gewonnenen Daten wurden dann mit denen der anderen Spezies verglichen. Man konnte erkennen, dass die Größe der Proteine zwar variierte, jedoch war bei allen Ssd1-Homologen eine RNB-Domäne in der C-terminalen Hälfte des Proteins vorhanden. Auch war in allen Spezies bis auf *S. cerevisiae* eine NLS vorhanden, welche bei allen relativ gleich weit weg von der RNB-Domäne entfernt war. Bei *S. cerevisiae* konnte zwar keine NLS-Domäne mit NLS Mapper vorhergesagt werden, jedoch ging aus experimentellen Daten einer Publikation hervor, dass auch dort eine NLS vorhanden sei (Kurischko, Kuravi, et al., 2011). Ssd1 aus *C. cinerea*, *C. neoformans var. grubii* und *M. globosa* wiesen laut Vorhersage auch keine Coiled-Coil-Domänen auf. Bei *S. macrospora* und *N. crassa* dagegen konnten jeweils zwei Coiled-Coil-Domänen gefunden werden. Eine die, wie bei den anderen Spezies, N-Terminal positioniert ist und eine in der Nähe des C-Terminus. Interessanterweise konnte nur in *C. cinerea* und *C. neoformans var. grubii*, den zwei Spezies mit potentiellen Rrm4-Homologen, eine PAM2-Sequenz gefunden werden. Diese befand sich auch ähnlich wie bei *U. maydis* in relativer Nähe zum N-Terminus.

Die Ergebnisse dieser bioinformatischen Analyse ließen zweifelsohne erkennen, dass es sich bei UMAG_01220 um ein SSD1-Homolog handeln musste. Von daher wird von nun an in dieser Dissertation das Protein von UMAG_01220 als Ssd1 bezeichnet.

2.3.2 Analyse der Ssd1-Lokalisation

Die bisher gewonnenen Daten deuten an, dass Ssd1 eine Komponente des Rrm4-abhängigen mRNP-Komplexes sein könnte. Um herauszufinden, ob Ssd1 tatsächlich im endosomalen mRNP-Komplex lokalisiert, wurde ein Gfp-Reporterstamm hergestellt, um die subzelluläre Lokalisation fluoreszenzmikroskopisch analysieren zu können. Da bereits in anderen Organismen funktionelle C-terminale Ssd1-Gfp-Fusionsproteine beschrieben wurden, wurde deshalb mit Hilfe von homologer Rekombination eine C-terminale *gfp*-Fusion stabil in den endogenen *ssd1*-Locus von *U. maydis* integriert (Abbildung 15 A). Hierfür wurde ein *gfp*-Konstrukt mit einem *Tnos*-Terminator und einer Hygromycin B-Resistenzkassette (*hygR*) ans 3' Ende des *ssd1*-Gens inseriert. Im Zuge dessen wurde das native Stopcodon des *ssd1*-Gens deletiert. Somit erhielt man ein *ssd1-gfp*-Gen, welches durch den nativen *ssd1*-Promotor reguliert wurde. Dies ermöglichte eine Expression von *ssd1-gfp* unter nativen Bedingungen und sollte so Überexpressions-Artefakte verhindern. Zuerst wurde kontrolliert, ob die C-terminale Fusion von *gfp* an *ssd1* phänotypische Veränderungen induziert (Abbildung 15 B). Der wildtypartige Laborstamm AB33 diente hierbei als Kontrolle. Bei den DIC-Aufnahmen des *ssd1-gfp*-Expressionsstamms konnten jedoch keine phänotypischen Unterschiede zu den wildtypartigen Hefen- und Hyphenformen festgestellt werden.

Zeitgleich wurde auch die Expression und Lokalisation von Ssd1-Gfp in *U. maydis* Hefezellen wie auch in Hyphen fluoreszenzmikroskopisch untersucht (Abbildung 15 B). Der Laborstamm AB33 wurde dafür als Autofluoreszenzkontrolle verwendet. Als weitere Kontrolle wurde ein Stamm hinzugezogen, der cytoplasmatisches Gfp exprimiert und als Referenz für eine cytoplasmatische Signalverteilung diente. Bei fluoreszenzmikroskopischen Analysen konnte wie erwartet ein Gfp-Signal nur im *gfp*-Kontrollstamm und im *ssd1-gfp*-Expressionsstamm beobachtet werden. Beim *gfp*-Kontrollstamm war das Gfp-Signal in der gesamten Zelle und Hyphe verteilt. Zusätzlich konnte in Hefezellen und Hyphen eine stärkere Signalakkumulation im Nukleus der Zelle beobachtet werden. Beim *ssd1-gfp*-Expressionsstamm hingegen wurden sowohl in den Hefezellen als auch in den Hyphen ein sehr schwaches cytoplasmatisches Signal und distinkte Partikel mit hoher Signalintensität detektiert. Diese distinkten Partikel bewegten sich prozessiv innerhalb der ganzen Zelle in einer Art und Weise, die an andere RNA-bindende Proteine des endosomalen mRNA-Transports in *U. maydis* erinnerten.

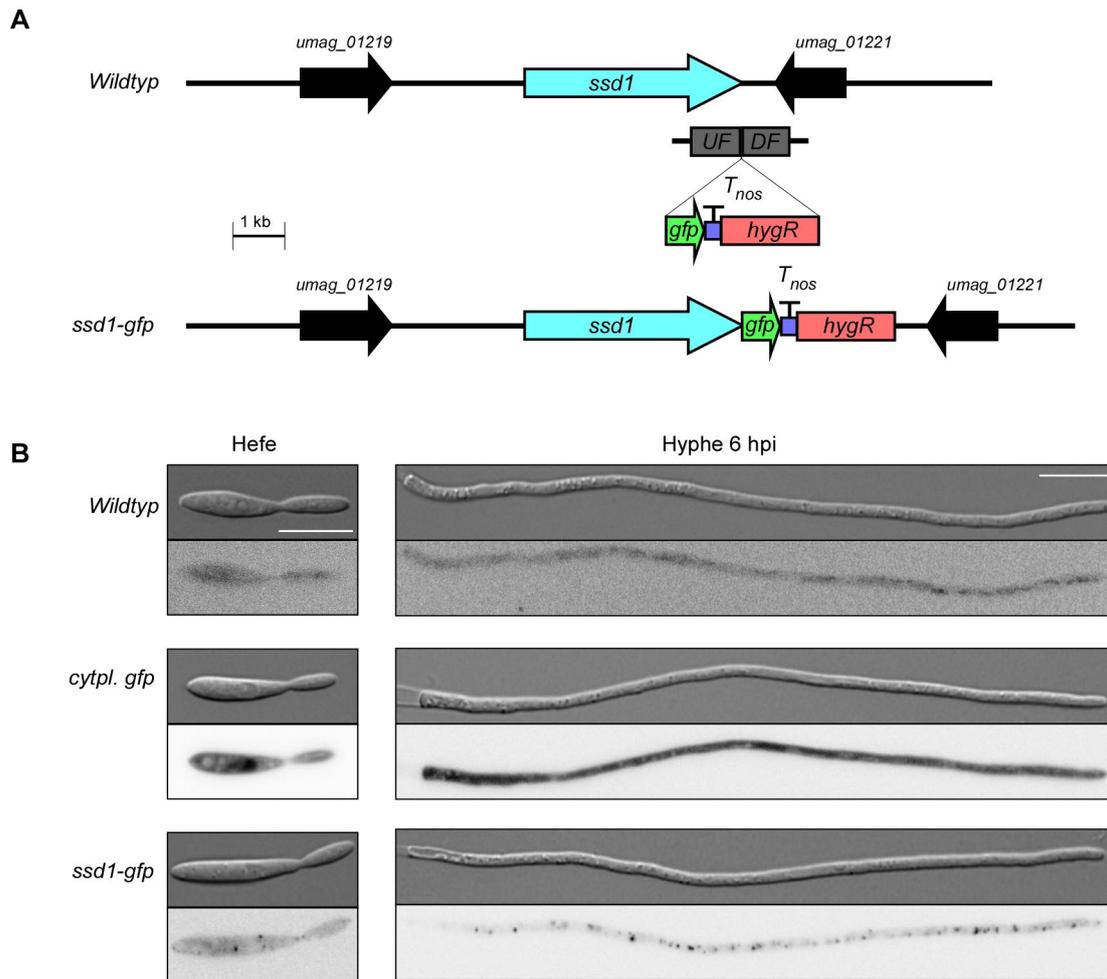


Abbildung 15: Herstellung und Untersuchung eines *ssd1-gfp*-Expressionsstamms.

A) Maßstäblich gezeichnete Darstellung des *ssd1*-Genlokus im Wildtyp und nach der *ssd1-gfp*-Stammherstellung. Durch die homologe Rekombination der Flanken (UF und DF) wird innerhalb des nativen Lokus ein *ssd1-gfp*-Fusionsprotein hergestellt. Zusätzlich wurden der *nos*-Terminator (*T_{nos}*) und eine Hygromycin B-Resistenzkassette (*hygR*) eingebracht. Die Skala entspricht 1 kb. B) Licht- und fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von *U. maydis* Hefezellen wie auch sechs Stunden alten Hyphen des wildtypartigen Laborstamms, des *gfp*- und des *ssd1-gfp*-Expressionsstamms. Die weiße Skala entspricht einer Distanz von 10 μ m.

2.3.3 Analyse der zellulären Lokalisation und Bewegungsmusters von Ssd1 im Vergleich zu anderen mRNA-bindenden Proteinen

Da die subzelluläre Lokalisation von Ssd1 der von Rrm4 ähnelte, wurde Ssd1 in weiteren Lokalisationsstudien mit Rrm4 und weiteren bekannten mRNP-Komplex-Komponenten verglichen. Für diesen direkten Vergleich wurden Rrm4 und Grp1 ausgewählt. Sollte Ssd1 Teil des endosomalen mRNP-Komplexes sein, so müssten sich die Partikel so verhalten wie die von Rrm4 und Grp1. Die fluoreszenzmikroskopische Untersuchung von Ssd1-Gfp, Rrm4-Gfp und Grp1-Gfp in Hyphen zeigte, dass jedes von ihnen in Partikeln lokalisierte, die in etwa gleichmäßig über die gesamte Hyphe verteilt waren (Abbildung 16 A). Während das Hintergrundsignal bei Ssd1-Gfp und Rrm4-Gfp gering war, kam bei Grp1-Gfp zu den Partikeln auch noch eine recht starkes Hintergrundsignal hinzu, welches es schwierig machte, Partikel mit einer schwächeren Signalintensität zu detektieren. Es wurde daraufhin überprüft, ob auch das Bewegungsverhalten der Partikel übereinstimmte. Dafür wurde im Gfp-Kanal von den Hyphen der jeweiligen Stämme 22,5 s lange Aufnahmen angefertigt, als Kymographen dargestellt und untereinander verglichen (Abbildung 16 B). Dabei konnte festgestellt werden, dass die Partikel von Ssd1-Gfp genau wie die von Rrm4-Gfp und Grp1-Gfp ähnlich bidirektional fortbewegten. Meistens bewegten sich die Partikel in dem gewählten Bildausschnitt nur in eine Richtung. Jedoch kam es auch öfter vor, dass sie anhielten und einen Richtungswechsel durchführten. Um auch quantitativ nachzuweisen, ob das Partikelbewegungsverhalten von Ssd1-Gfp dem von Rrm4-Gfp und Grp1-Gfp ähnelte, wurde eine Quantifizierung der Partikelanzahl und der Partikelgeschwindigkeit durchgeführt (Abbildung 16 C). Es wurden insgesamt zwölf Kymographen aus drei biologischen Replikaten ausgewertet. Hierfür wurde ein 30 μm großer Kymographenausschnitt vom Rand des Nukleus zum Wachstumspol ausgewählt und dort alle prozessiven Partikel, die mindestens 5 μm zurücklegten, ausgezählt. Pro Replikat wurde dann für die Anzahl und die Geschwindigkeit der Partikel ein Mittelwert und anschließend den Mittelwert der Mittelwerte gebildet. Die durchschnittliche Anzahl der prozessiven Partikel bei Ssd1-Gfp lag bei 15,8 pro 30 μm und die Geschwindigkeit bei 1,9 $\mu\text{m/s}$. Bei Rrm4-Gfp wurden 14,7 prozessive Partikel pro 30 μm mit einer Durchschnittsgeschwindigkeit von 1,8 $\mu\text{m/s}$ gemessen. Dagegen wurde bei Grp1-Gfp nur 8,3 Partikel pro 30 μm mit 1,9 $\mu\text{m/s}$ gezählt. Die geringere Anzahl von Grp1-Gfp Partikeln wurde wahrscheinlich durch den hohen cytoplasmatischen Hintergrund verursacht. Durch diesen hohen Hintergrund konnten Partikel mit geringeren Signalintensitäten nicht detektiert werden. Um zu ermitteln, ob die gemessenen Werte signifikante Unterschiede aufwiesen, wurde ein ungepaarter t-Test durchgeführt. Die Unterschiede bei der Anzahl prozessiver Partikel und bei den Geschwindigkeiten variierten nicht signifikant. Somit konnte bewiesen werden, dass Ssd1-Gfp sich von der Häufigkeit und dem

Bewegungsmuster genauso verhielt wie die beiden anderen Proteine des endosomalen mRNP-Komplexes. Dies deutete darauf hin, dass Ssd1 wie Rrm4 und Grp1 auf Endosomen transportiert wird.

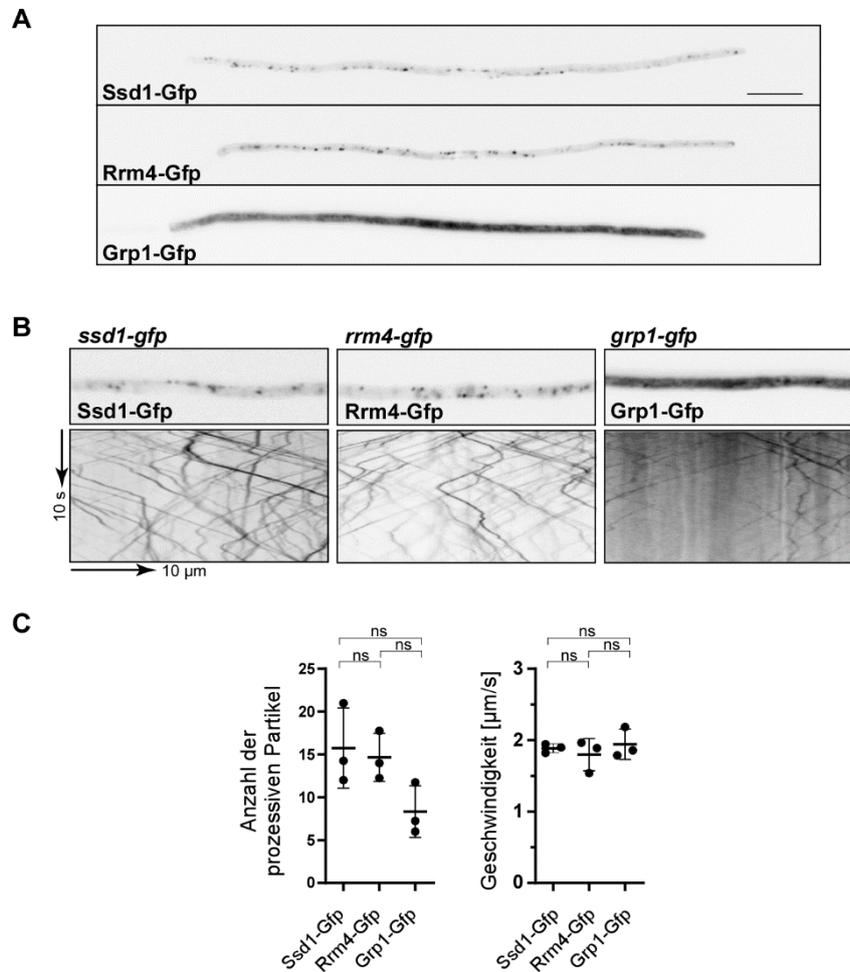


Abbildung 16: Vergleich des Ssd1-Gfp-Partikelbewegungsverhalten zu Rrm4-Gfp und Grp1-Gfp.

A) Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen einer sechs Stunden alten Hyphe des *ssd1-gfp*-, *rrm4-gfp*- und *grp1-gfp*-Expressionsstamms. Der schwarze Balken repräsentiert eine Distanz von 10 μm . B) 30 μm große Ausschnitte von fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen einer Hyphe mit dem entsprechenden Kymographen, welche die Bewegung der detektierten Partikel über einen Zeitraum von 22,5 s visualisieren. C) Statistische Auswertung der Anzahl der prozessiven Partikel und deren Geschwindigkeit ($\mu\text{m/s}$). Dargestellt sind die Mittelwerte der drei biologischen Replikate, von welchen wiederum der Mittelwert und die Standardabweichung bestimmt wurden. Mithilfe eines ungepaarten t-Tests wurde festgestellt, dass sich die Ergebnisse der jeweiligen Stämme nicht signifikant (ns) unterscheiden.

Um zu überprüfen, ob Ssd1 tatsächlich Teil des endosomalen mRNP-Komplexes ist, wurden Colokalisationsexperimente in *U. maydis* Hyphen durchgeführt (Abbildung 17). Dabei wurde zuerst kontrolliert, ob Ssd1-Gfp mit frühen Endosomen colokalisiert. Hierfür wurden Hyphen des *ssd1-gfp*-Reporterstamms mit FM4-64 gefärbt. FM4-64 ist ein lipophiler Farbstoff, der unter anderem dazu verwendet wird die Plasmamembran und die frühen Endosomen von *U. maydis* Zellen zu färben (Baumann et al., 2012; Fischer-Parton et al., 2000). Eine kurze Inkubation mit dem FM4-64 Farbstoff färbte die Zellmembran und die Endosomen der Zelle an, sodass sie im roten Fluoreszenzkanal des Fluoreszenzmikroskops sichtbar wurden. Daraufhin wurden zeitgleich 22,5 s lange Aufnahmen des grünen Kanals und des roten Kanals mit Hilfe der Dual-View-Fluoreszenzmikroskopie durchgeführt. Verglich man anschließend die Lokalisation der Partikel so konnte festgestellt werden, dass fast allen grünen Ssd1-Gfp-Partikeln ein roter FM4-64 Partikel zugeordnet werden konnte (Abbildung 17 A). Dabei konnte in den erstellten Kymographen genau nachvollzogen werden, dass die meisten der fahrenden Partikel konstant über den gesamten Zeitraum der Aufnahme colokalisierten (Abbildung 17 C). Dies wurde quantifiziert, indem ein 5 µm Ausschnitt aus einem Kymographen ausgewählt und gezählt wurde, wie viele der prozessiven FM4-64-Signale mit den prozessiven Ssd1-Gfp-Signalen colokalisierten. Die durchschnittliche Colokalisationsrate wurde dann aus drei unabhängigen Experimenten mit insgesamt 12 Hyphen ermittelt (Abbildung 17 D). Auf diese Art wurde festgestellt, dass 91% der mit FM4-64 gefärbten endosomalen Signale mit den Ssd1-Gfp-Signalen colokalisierten. Somit wurde erwiesen, dass Ssd1 auf Endosomen transportiert wird. Als nächstes wurde überprüft, ob Ssd1 mit Rrm4 colokalisiert. Dafür wurde ein *ssd1-gfp / rrm4-mkate2*-Reporterstamm hergestellt, bei welchem das *rrm4* Gen mit dem Gen für rotes Fluoreszenzprotein *mkate2* fusioniert wurde. Mit diesem Stamm wurde auch eine Colokalisationsstudie mit Hilfe eines Zweikanal-Bildwandlers durchgeführt (Abbildung 17 B). Man konnte auch bei diesem Stamm erkennen, dass sich die bewegenden Ssd1-Gfp- und Rrm4-mKate2-Partikel überwiegend colokalisierten. In den Kymographen des *ssd1-gfp / rrm4-mkate2*-Reporterstamms konnte sogar nachgewiesen werden, dass nur bis auf wenige Ausnahmen jedem Rrm4-mKate2-Signal ein Ssd1-Gfp-Signal zugeordnet werden konnte (Abbildung 17 C). Eine Quantifizierung dieser Daten ergab, dass 98 % der prozessiven Rrm4-mKate2-Signale mit einem prozessiven Ssd1-Gfp-Signal colokalisierten (Abbildung 17 D). Diese Ergebnisse bestätigten die Vermutung, dass Ssd1 zusammen mit Rrm4 auf frühen Endosomen transportiert wird. Die hohe Colokalisation von Ssd1 und Rrm4 spiegelte auch die hohe Anreicherung in den Ergebnissen der massenspektroskopischen Analyse der Rrm4-Immunpräzipitation wider. Somit wurde Ssd1 als neue Komponente des endosomalen mRNP-Komplexes betrachtet.

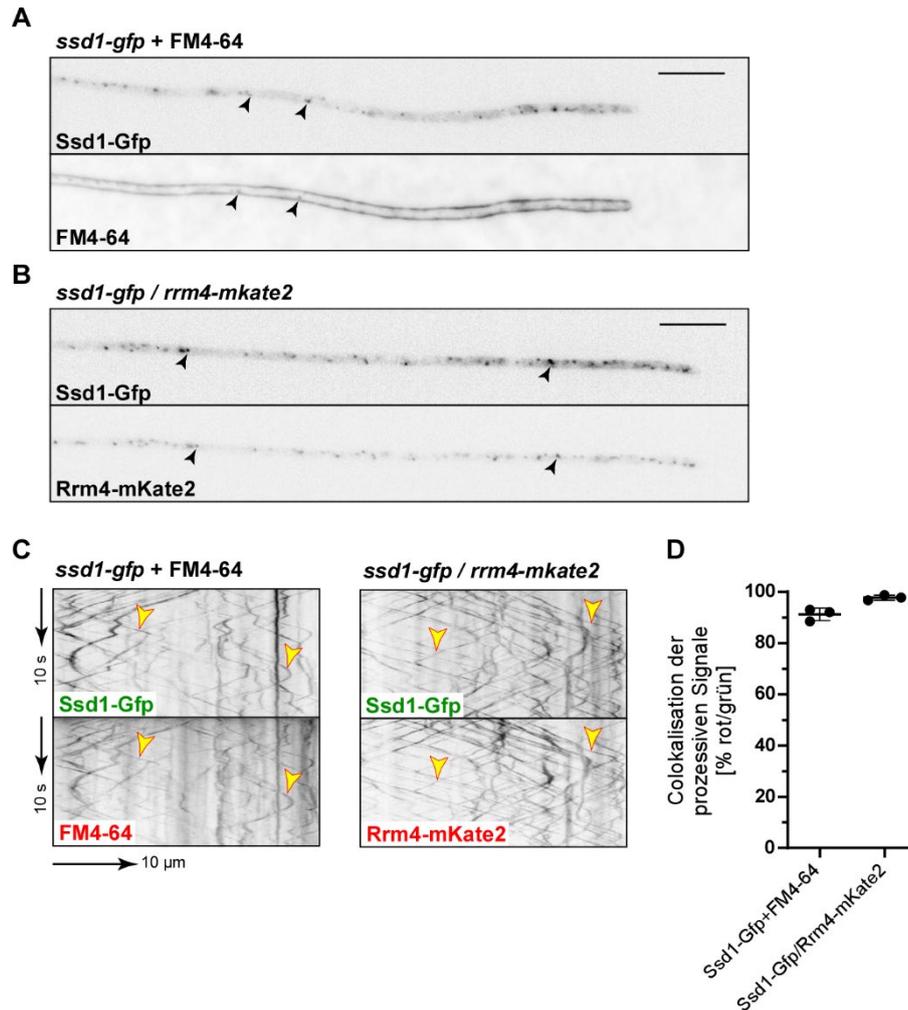


Abbildung 17: Ssd1-Gfp colokalisiert mit frühen Endosomen und Rrm4.

A) Fluoreszenzmikroskopische Zweikanalaufnahme einer mit dem lipophilen FM4-64-Farbstoff gefärbten Hyphe des *Ssd1-Gfp*-Reporterstamms. Die schwarzen Pfeilköpfe markieren einen colokalisierenden Partikel in dem jeweiligen Kanal. Die schwarze Skala stellt eine Distanz von 10 μm dar. B) Fluoreszenzmikroskopische Zweikanalaufnahme einer Hyphe des *ssd1-gfp*- und *rrm4-mkate2*-Expressionsstamms. C) Kymographen eines 30 μm großen Bereichs der in A und B abgebildeten Hyphen. Die gelben Pfeilköpfe markieren exemplarisch colokalisierende Signale. D) Quantifikation der colokalisierenden prozessiven Signale. Hierbei wurde bestimmt, wie vielen prozessiven roten Signalen ein prozessives grünes Signal zugeordnet werden konnte. Dargestellt sind Mittelwerte aus drei biologischen Replikaten, von denen der Mittelwert und die Standardabweichung bestimmt wurden.

2.3.4 Untersuchung der Lokalisation von Ssd1 innerhalb des endosomalen mRNP-Komplexes

Die nahezu hundertprozentige Colokalisation zwischen Rrm4 und Ssd1 ließen darauf schließen, dass Ssd1 tatsächlich ein Bestandteil des endosomalen mRNP-Komplexes ist. Um die Lokalisation innerhalb des mRNP-Komplexes zu untersuchen, ob der Ssd1-Transport abhängig vom endosomalen Rrm4-Transport ist, wurden Rrm4 sowie das mRNP-Linkerprotein Upa1 deletiert. Beide Deletionen führen zu einem Verlust bzw. einer Störung des endosomalen mRNP-Komplexes (Olgeiser et al., 2019; Pohlmann et al., 2015). Dies führt in beiden Fällen auch zu einem morphologischen Phänotyp, bei welchem die Hyphen bipolar auswachsen (Becht et al., 2006; Pohlmann et al., 2015).

Die Rrm4-Deletion diente hierbei als Positivkontrolle. Als Negativkontrolle wurde die Lokalisation des endosomalen Proteins Rab5a in dem jeweiligen Deletionstamm mikroskopiert.

Als erstes wurde die Abhängigkeit von Ssd1 zu Upa1 untersucht. Der Verlust von Upa1 stört den endosomalen Transport von Rrm4, sodass es zu einer deutlichen Abnahme prozessiver Rrm4-Signale kommt (Pohlmann et al., 2015). Es wurde ein *ssd1-gfp*-Reporterstamm generiert, in welchem *upa1* deletiert wurde. (Abbildung 18 A). Hierfür wurde eine fluoreszenzmikroskopische Analyse von verschiedenen bipolaren *upa1Δ*-Hyphen durchgeführt (Abbildung 18 B). In dieser Analyse wurden 22,5 s lange Aufnahmen angefertigt und dann Kymographen von 30 µm Ausschnitten, in denen sich der Nukleus in der Mitte befand, erstellt. Zwölf Kymographen aus drei unabhängigen biologischen Replikaten wurden dann für eine quantitative Analyse der Partikel ausgewertet (Abbildung 18 C). Dafür wurde der Mittelwert der Mittelwerte für die Anzahl der prozessiv fahrenden, der eingeschränkt fahrenden und der statischen Partikel bestimmt. Als prozessive Partikel wurden Signale identifiziert, die mindestens eine fünf µm lange Strecke zurücklegten. Eingeschränkt fahrende Partikel wurden dagegen als Signale definiert, die in der gesamten gemessenen Zeit nur Distanzen unter 5 µm zurücklegten und dabei den für sie typischen sehr häufigen Richtungswechsel vollzogen (Pohlmann et al., 2015). Als statische Partikel hingegen wurden Signale ohne messbare Bewegung definiert.

In diesem Experiment wurde ein *rab5a-gfp / upa1Δ*-Stamm als Negativkontrolle mikroskopiert. Das endosomale Protein Rab5a lokalisiert unabhängig von Upa1 an frühen Endosomen (Pohlmann et al., 2015). Deswegen sollte die Bewegung von Rab5a durch die *upa1*-Deletion nicht beeinträchtigt werden (Pohlmann et al., 2015). In Kymographen des *rab5a-gfp / upa1Δ*-Stamms wurde genau dies beobachtet. Rab5a-Gfp-Partikel bewegten sich wie gewohnt bidirektional in den bipolaren Hyphen. Die Quantifizierung der Partikel in den ausgemessenen 30 µm Ausschnitten ergab 51,3 prozessiv fahrende Rab5a-Gfp-

Partikel. Des Weiteren wurden 4,3 Partikel als eingeschränkt fahrend identifiziert. Der Mittelwert der statischen Partikel betrug dagegen nur 1,3 pro 30 μm .

Für die Positivkontrolle wurde der *rrm4-gfp / upa1 Δ* -Stamm genutzt. Rrm4 wird unter anderem durch die Protein-Protein-Interaktion mit Upa1 an die frühen Endosomen gebunden (Pohlmann et al., 2015). Daher führt das Fehlen von Upa1 zu Beeinträchtigungen beim Rrm4-Transport (Pohlmann et al., 2015). In vorangegangenen Arbeiten wurde gezeigt, dass in Abwesenheit von Upa1 die Anzahl der fahrenden Rrm4-Gfp-Partikel sinkt und die Anzahl der eingeschränkt fahrenden Partikel zunimmt (Pohlmann et al., 2015). Dies konnte auch in den Kymographen dieser Untersuchung beobachtet werden. Waren eingeschränkt fahrende Partikel bei der Negativkontrolle eher die Ausnahme, so wurden sie im *rrm4-gfp / upa1 Δ* -Stamm sehr häufig festgestellt. Die Anzahl der gemessenen prozessiv fahrenden Partikel betrug nur 11,3 pro 30 μm , während die Anzahl der eingeschränkt fahrenden Partikel bei 16 lag. Nur 0,7 Partikel pro 30 μm konnten als statische Partikel identifiziert werden. Der Verlust von Upa1 wirkte sich auch auf die Gesamtzahl aller Rrm4-Gfp-Partikel aus. Die Gesamtzahl war um 51 % niedriger als beim *rab5a-gfp / upa1 Δ* -Stamm.

Anhand der Positiv- und Negativkontrolle sollte es nun möglich sein zu bestimmen, ob Ssd1-Gfp sich in Abwesenheit von Upa1 wie eine mRNP-Komplex Komponente oder wie ein endosomal assoziiertes Protein verhält. Bei den Ergebnissen des *ssd1-gfp / upa1 Δ* -Stamms konnten ein ähnliches Partikelverhalten wie im *rrm4-gfp / upa1 Δ* -Stamm festgestellt werden. Neben einem leicht erhöhten cytoplasmatischen Hintergrund ähnlich wie beim *rrm4-gfp / upa1 Δ* -Stamm, wurde auch hier eine geringe Anzahl prozessiv fahrender Partikel und häufiges Auftreten von eingeschränkt fahrenden Partikeln beobachtet. Die Gesamtzahl der fahrenden Partikel pro 30 μm war um 56 % niedriger als bei der Negativkontrolle. Davon waren 11 Partikel prozessiv und 16 eingeschränkt fahrend. Statische Partikel wurden nicht beobachtet. Somit führte der Verlust des Linkerproteins Upa1 genau wie bei Rrm4 zu einem reduzierten Transport von Ssd1. Dieses Ergebnis bestärkte erneut die Feststellung, dass Ssd1 ein Teil der mRNP-Komplexes ist, und zeigt eine zumindest teilweise Upa1-abhängige Lokalisation innerhalb des mRNP-Komplexes. Als nächstes wurde überprüft, ob Rrm4 für die Lokalisation von Ssd1 notwendig ist. Hierfür wurde ein *ssd1-gfp / rrm4 Δ* -Stamm generiert. Sollte Ssd1 Teil des Rrm4-abhängigen mRNA-Transports sein, so würde eine Deletion von *rrm4* dazu führen, dass sich das Partikelfahrverhalten von Ssd1-Gfp ändert und keine Lokalisation im mRNP-Komplex möglich wäre (Abbildung 18 D). Eine fluoreszenzmikroskopische Analyse verschiedener bipolarer *rrm4 Δ* -Hyphen wurde durchgeführt (Abbildung 18 E) und auf die gleiche Art und Weise quantitativ ausgewertet wie bei dem vorangegangenen Experiment mit den *upa1 Δ* -Hyphen (Abbildung 18 F).

Rab5a wurde erneut als Negativkontrolle verwendet. Im *rab5a-gfp / rrm4Δ*-Stamm sollte sich der Verlust von Rrm4 nicht direkt auf die endosomale Lokalisation von Rab5a auswirken, da Rab5a unabhängig von Rrm4 an frühen Endosomen lokalisiert (Göhre et al., 2012). Dies konnte in den Kymographen des *rab5a-gfp / rrm4Δ*-Stamms nachgewiesen werden. Rab5a-Gfp-Partikel bewegten sich überwiegend prozessiv. Es wurden 42 prozessive Partikel pro 30 µm gezählt und im Durchschnitt nur 1,3 eingeschränkt fahrende Partikel. Die durchschnittliche Anzahl von statischen Partikeln lag bei 2,3 pro 30 µm. Der *upa1-gfp / rrm4Δ*-Stamm wurde in diesem Experiment als Kontrolle hinzugezogen, da die Lokalisation von Upa1 an den frühen Endosomen nicht durch die Deletion von *rrm4* beeinflusst wird (Jankowski et al., 2019). Sollte Ssd1 unabhängig von Rrm4 am endosomalen mRNP-Komplex lokalisieren, so würde das Partikelfahrverhalten von Ssd1-Gfp im *ssd1-gfp / rrm4Δ*-Stamm dem von Upa1-Gfp im *upa1-gfp / rrm4Δ*-Stamm ähneln. In den Kymographen des *upa1-gfp / rrm4Δ*-Stamms konnten viele prozessive Upa1-Gfp-Signale detektiert werden und nur wenige eingeschränkt fahrende Partikel. Die Quantifizierung ergab 42 prozessive Upa1-Gfp-Partikel pro 30 µm. Dagegen konnten nur 2,7 eingeschränkt fahrende Partikel gezählt werden. Statische Partikel konnten nicht beobachtet werden. Die Gesamtzahl der Upa1-Gfp-Partikel war ähnlich hoch wie die Gesamtzahl der Rab5a-Gfp-Partikel, was zu erwarten war, da beide Proteine unabhängig von Rrm4 an Endosomen lokalisieren (Jankowski et al., 2019).

Im Kontrast zu den beiden *rrm4Δ*-Kontrollstämmen verhielt sich die Ssd1-Gfp-Partikellokalisierung deutlich anders. Die *ssd1-gfp / rrm4Δ* bipolaren Hyphen besaßen nur sehr wenige Ssd1-Gfp-Partikel. In den Hyphen konnte eine verstärkte Anreicherung von cytoplasmatischem Hintergrundsignal festgestellt werden. Vor allem innerhalb der Initialzelle wurde viel Hintergrund detektiert. Dabei nahm die Signalstärke des Hintergrundsignals mit zunehmender Distanz zum Nukleus immer mehr ab. In den Kymographen wurden überhaupt keine prozessiv fahrenden Partikel beobachtet. Dagegen konnten im Schnitt 8,3 eingeschränkt bewegende Partikel und 1,7 statische Partikel pro 30 µm gezählt werden. In einigen Fällen befanden sich diese sichtbaren Partikel am Rande des Nukleus. Ob diese Ssd1-Gfp-Partikel mit der Kernhülle oder mit dem endoplasmatischen Retikulum colokalisierten, konnte in dieser Versuchsreihe nicht eindeutig festgestellt werden. Die Ergebnisse der *rrm4Δ*-Stämme ließen darauf schließen, dass die Lokalisation von Ssd1 an den frühen Endosomen und die prozessive Bewegung von Ssd1 innerhalb der Zelle Rrm4-abhängig ist. Somit wurde Ssd1 als Rrm4-abhängiger Bestandteil des endosomalen mRNP-Komplexes eingestuft.

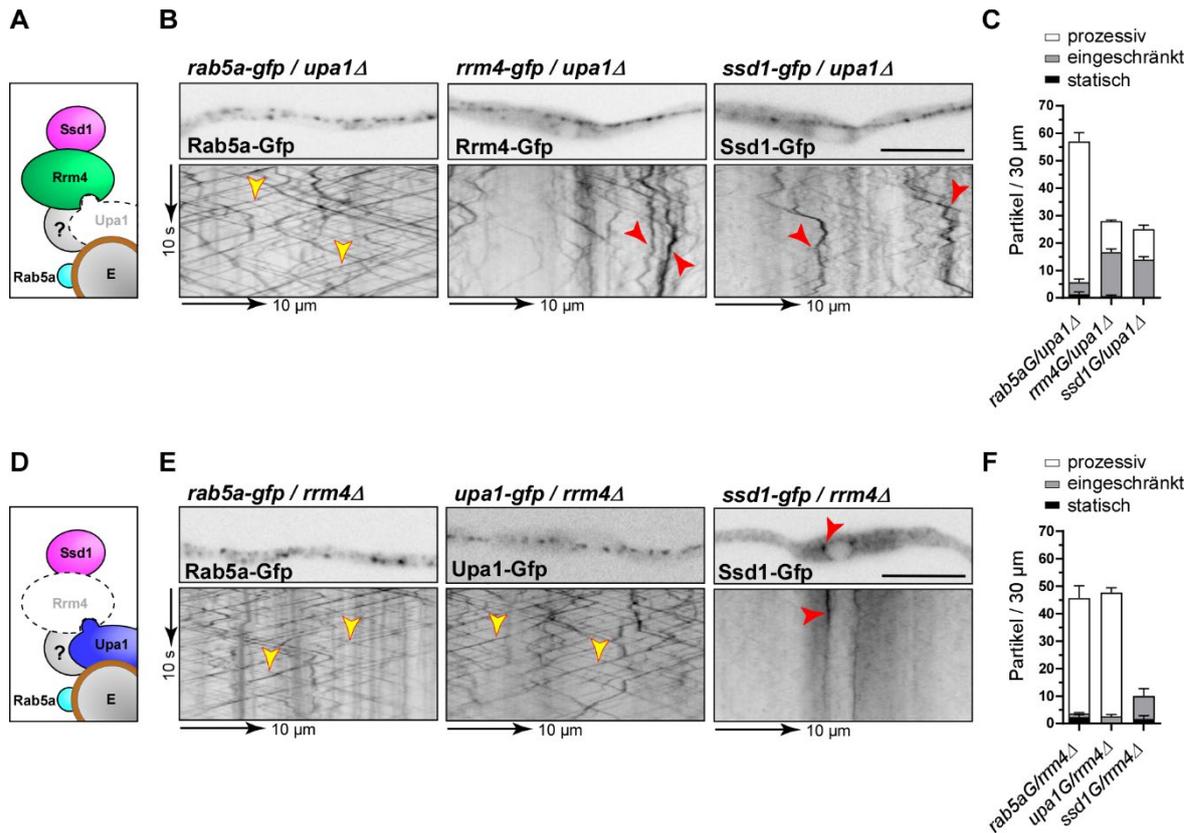


Abbildung 18: Ssd1-Gfp-Lokalisationsverhalten in Abhängigkeit von Upa1 und Rrm4.

A) Schematische Darstellung der vermuteten mRNP-Komplex-Zusammensetzung auf einem frühen Endosom (E) bei einer *upa1*-Deletion. B) 30 μm große Ausschnitte fluoreszenzmikroskopischer Aufnahmen und die daraus generierten Kymographen einer *rab5a-gfp*-, *rrm4-gfp*- und *ssd1-gfp*-exprimierenden Hyphe bei welcher *upa1* deletiert wurde. Gelbe Pfeile markieren exemplarisch prozessive Partikelbewegung. Rote Pfeile markieren eingeschränkt bewegende Partikel. C) Quantitative Auswertung der verschiedenen Partikelbewegungsarten der untersuchten *upa1*-Deletionsstämme. Dargestellt sind die Mittelwerte wie auch die Standardabweichungen aller prozessiven, eingeschränkt fahrenden und statischen Partikel pro 30 μm. D) Schematische Abbildung der vermuteten mRNP-Komplex-Zusammensetzung auf einem frühen Endosom (E) in Falle einer *rrm4*-Deletion. E) Ausschnitte von fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen und den dazugehörigen Kymographen einer *rab5a-gfp*-, *upa1-gfp*- und *ssd1-gfp*-exprimierenden Hyphe in welcher *rrm4* deletiert wurde. Gelbe Pfeile zeigen Beispiele für prozessive Partikelbewegungen, während der rote Pfeil exemplarisch auf einem statischen Partikel gerichtet ist. F) Quantitative Auswertung der verschiedenen Partikelbewegungsarten der *rrm4*-Deletionsstämme. Abgebildet sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aller prozessiven, eingeschränkt fahrenden und statischen Partikel pro 30 μm.

2.3.5 Untersuchung der Ssd1-Funktion durch Etablierung einer regulierbaren *ssd1*-Expression

Nach den Ergebnissen der Lokalisationsstudien von Ssd1 zu urteilen, ist Ssd1 ein Rrm4-abhängiger Teil des mRNP-Komplexes. Als nächstes sollte die Funktion von Ssd1 untersucht werden. Um den Einfluss einer *ssd1*-Deletion auf den Phänotyp von hyphalen Zellen zu analysieren, wurde zunächst versucht einen *ssd1Δ*-Stamm herzustellen, indem der Genlocus von *ssd1* durch eine Hygromycin B-Resistenzkassette ersetzt wurde. Trotz der generell hohen Rate an homologer Rekombination in *U. maydis* (Bösch et al., 2016) konnte selbst nach mehreren Versuchen kein *ssd1Δ*-Stamm hergestellt werden. Dieser Umstand überraschte, da in anderen Pilz-Spezies wie in *S. cerevisiae* und *N. crassa* das *ssd1*-Gen erfolgreich ausgeknockt wurde ohne einen letalen Phänotyp zu erhalten (Herold & Yarden, 2017; Kurischko & Broach, 2017). Da trotz wiederholten Versuchen und angepassten Transformationsprotokollen kein *ssd1*-Knockout generiert werden konnte, wurde eine andere Strategie verfolgt. Statt *ssd1* zu deletieren wurde versucht die *ssd1*-Expression auf ein Minimum zu reduzieren. Hierzu wurde die Expression von *ssd1* unter die Kontrolle des induzierbaren *U. maydis* *crg1*-Promotors (*Pcrg1*) des für die Arabinase kodierenden *crg1*-Gens verwendet (Andreas Brachmann et al., 2001). Mit diesem Promotor kann die Genexpression über die Kohlenstoffquelle gesteuert werden (Bottin et al., 1996). In Anwesenheit von Arabinose wird die Genexpression stark induziert, was zu einer Überexpression des gewünschten Gens führt (Bottin et al., 1996; Zheng et al., 2008). Ist jedoch keine Arabinose vorhanden wird die Expression inhibiert (Bottin et al., 1996). Somit wird die Genexpression bei einer Inkubation der Zellen in einem Glukose-haltigen Nährmedium herunterreguliert (Bottin et al., 1996).

Bei der Herstellung des regulierbaren *Pcrg1_ssd1-gfp*-Reporterstamms wurde im Genom des *ssd1-gfp*-Reporterstamms ein 1000 Nukleotide großer Bereich direkt vor dem Startcodon von *ssd1* durch den *Pcrg1*-Promotor und einer Nourseothricin-Resistenzkassette (*natR*) ersetzt (Abbildung 19 A). Die Deletion der 1000 Nukleotide sollte Teile des nativen Promotors entfernen und zusammen mit der Positionierung der Resistenzkassette vor dem *crg1*-Promotor die native Induktion der *ssd1*-Genexpression unterbinden.

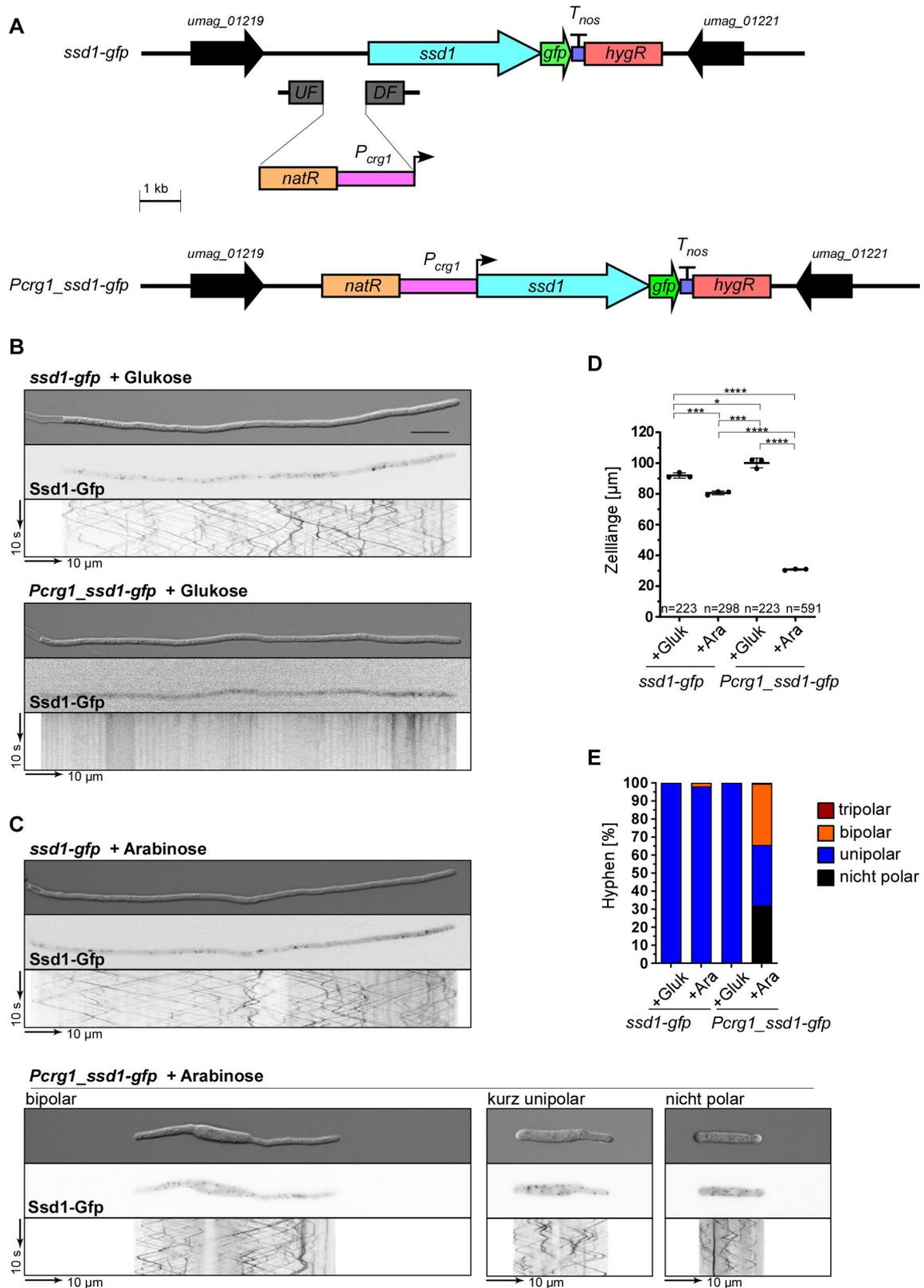


Abbildung 19: Herstellung und Analyse eines induzierbaren Ssd1-Gfp-Stamms.

A) Schematische Darstellung des *ssdl*-Genlokus des *ssdl-gfp*-Reporterstamms und dem induzierbaren *PcrG1_ssdl-gfp*-Stamms. Durch die homologe Rekombination der Flanken (UF und DF) wurden bei der Stammherstellung innerhalb des nativen *ssdl*-Lokus 1000 Basen vor dem Startcodon entfernt und durch eine Nourseothricin-Resistenzkassette (*natR*) wie auch dem induzierbaren *crG1*-Promotor (*PcrG1*) ersetzt. B) Lichtmikroskopische und

fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen einer sechs Stunden alten Hyphe des *ssd1-gfp*-Reporterstamms wie auch des induzierbaren *Pcrg1_ssd1-gfp*-Stamms unter reprimierenden Bedingungen mit Glukose-haltigem Medium. Zusätzlich sind die generierten Kymographen abgebildet, welche die Partikelbewegungen visualisieren. C) Lichtmikroskopische Aufnahmen, fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen und Kymographen von Hyphen der beiden zuvor genannten Stämme unter induzierenden Bedingungen mit Arabinose-haltigem Medium. Vom induzierbaren *Pcrg1_ssd1-gfp*-Stamm sind die drei häufigsten Phänotypen abgebildet. D) Quantifikation der Zelllänge beider Stämme unter reprimierenden (+Gluk) und induzierenden (+Ara) Bedingungen. Abgebildet sind die Mittelwerte der drei biologischen Replikate, von welchen der Mittelwert und die Standardabweichung bestimmt wurden. Der jeweilige Stichprobenumfang (n) jeder Messung ist angegeben. Mit Hilfe eines ungepaarten t-Test wurde die Signifikanz der Unterschiede berechnet (*= $p < 0,05$; **= $p < 0,01$; ***= $p < 0,005$; ****= $p < 0,001$). E) Quantifikation der beobachteten morphologischen Phänotypen der beiden Stämme unter reprimierenden (+Gluk) und induzierenden (+Ara) Bedingungen.

Zunächst wurde die Zellmorphologie und fluoreszenzmikroskopischen Signale einer reduzierten *ssd1-gfp*-Expression überprüft (Abbildung 19 B). Dafür wurden beide Stämme unter reprimierenden Bedingungen angezogen. Die Hyphen des *ssd1-gfp*-Kontrollstamms weisen in den DIC-Bildern eine normale Morphologie auf. Dabei wuchsen 100 % aller gemessenen Hyphen unipolar (Abbildung 19 E). Die Gfp-Bilder und die daraus resultierenden Kymographen zeigten die bereits bekannte Ssd1-Gfp-Lokalisation mit dem entsprechenden prozessiven Bewegungsmuster. Die Hyphen des regulierbaren *Pcrg1_ssd1-gfp*-Stamms wiesen zunächst keine morphologischen Unterschiede zum Ausgangsstamm auf. Bei der Quantifizierung der Zelllängen konnte jedoch festgestellt werden, dass die Hyphen im Durchschnitt 10 μm länger waren als die des Ausgangsstamms. Auch unter diesen Bedingungen wuchsen 100 % der Zellen unipolar aus. Bei der *ssd1-gfp*-Expression wurden im Gfp-Kanal nur sehr schwache statische Signale detektiert. Es konnten auch selten schwache prozessive Signale beobachtet werden. Die reduzierte Expression von *ssd1-gfp* war somit möglich, jedoch schien das Fehlen von messbaren prozessiven Ssd1-Gfp-Partikeln sich nur bedingt auf das hyphale Wachstum der Zelle auszuwirken. Ob nun die basale Menge von Ssd1-Gfp ausreichte, um gravierende phänotypische Veränderungen zu verhindern, konnte nicht geklärt werden.

Als nächstes wurde das Verhalten der Zellen unter Überexpressionsbedingungen untersucht (Abbildung 19 C). Bei der Inkubation des Kontrollstamms mit Arabinose konnten zunächst nur sehr geringe morphologische Unterschiede zum Wachstum in Glukose festgestellt werden. Die Durchschnittslänge der Hyphen war um 10 μm kleiner als unter reprimierenden Bedingungen (Abbildung 19 D). Auch waren 2 % der Zellen bipolar ausgewachsen (Abbildung 19 E). Diese Unterschiede könnten möglicherweise durch eine Stressreaktion ausgelöst worden sein, welche die Inkubation der Zellen mit Arabinose statt Glukose hervorrief. Im Gfp-Kanal ließen sich keine Unterschiede von Ssd1-Gfp im Lokalisations- und Bewegungsverhalten feststellen. Betrachtete man nun die Zellen des

Pcrp1_ssd1-gfp-Stamms so stellte man fest, dass diese sich morphologisch deutlich von allen vorherigen Zellen unterschieden (Abbildung 19 D, E). So waren 34 % der Zellen bipolar mit meist kurzen hyphalen Auswüchsen, in sehr seltenen Fällen (0,5 %) auch tripolar ausgewachsen. Nur 33,5 % der Zellen wuchsen unipolar aus. Jedoch waren diese unipolaren Hyphen ausschließlich extrem kurz und im Durchschnitt kaum länger als die Initialzelle. Des Weiteren wurden 32 % als nicht polare Zellen identifiziert. Diese Zellen bildeten weder einen klar definierten Wachstumspol noch Knospen, wie man es von nicht hyphal wachsenden Hefezellen erwarten würde. Die durchschnittliche Zelllänge betrug 30,8 µm, was nur einem Drittel der normalen durchschnittlichen Hyphenlänge entsprach. Trotz der extremen morphologischen Unterschiede, die die Überexpression auslöste, konnte in allen morphologischen Erscheinungsformen das übliche Lokalisations- und Bewegungsverhalten von Ssd1-Gfp festgestellt werden. Dabei konnten keine Anhäufung von Abnormitäten, wie zum Beispiel eingeschränkt bewegende oder statische Partikel beobachtet werden. Somit wurde in diesem Experiment entdeckt, dass eine Überexpression von *ssd1* zu einem bipolaren Phänotyp führte, welcher vergleichbar mit den publizierten Phänotypen von anderen mRNP-Komplex-Deletionsmutanten war (Jankowski et al., 2019; Pohlmann et al., 2015). Zusätzlich hatte die Überexpression auch gravierendere phänotypische Auswirkungen auf die Etablierung eines Wachstumspols bzw. auf das hyphale Wachstum selbst. Diese Beobachtungen deuteten darauf hin, dass Ssd1 eine Funktion als Negativregulator des endosomalen mRNA-Transports haben könnte.

3. Diskussion

Ziel dieser Arbeit war es, neue unbekannte Komponenten des Rrm4-abhängigen endosomalen mRNP-Komplexes von *U. maydis* zu identifizieren. Um dies zu erreichen wurden verschiedene Methoden zur Markierung und Isolierung von Proteinen, die sich in unmittelbarer Nähe zu Rrm4 befinden, getestet.

3.1 Die Ermöglichung der *in vivo*-Markierung von Proteinen in *U. maydis*

Eine dieser Methoden war die unspezifische Markierung von Proteinen mit Biotin-Phenoxy Radikalen durch das Protein APEX2. Die von APEX2 katalysierte Reaktion von Biotin-Phenol zu Biotin-Phenoxy-Radikalen sollte dabei nur durch die Zugabe von Wasserstoffperoxid induziert werden (Hung et al., 2016). Ein Rrm4-APEX2-Fusionsprotein sollte somit alle Proteine in einem Radius bis zu 20 nm markieren. Die markierten Proteine könnten dann mit Hilfe des Biotin-bindenden Proteins Streptavidin isoliert werden, um sie anschließend mit Hilfe der Massenspektrometrie zu identifizieren (Hung et al., 2016). In einer vorangegangenen Arbeit konnte bereits die *in vitro*-Funktionalität eines in *U. maydis* cytoplasmatisch lokalisierten Gfp-APEX2-Fusionsproteins nachgewiesen werden (Masterarbeit Tulinski 2016). Eine *in vivo*-Markierung war jedoch nicht möglich gewesen. Sogar die Entfernung der Zellwand führte zu keinem signifikanten Anstieg der unspezifischen Markierung. Diese Ergebnisse dienten dieser Arbeit als Ausgangssituation und wurden auf ihre Reproduzierbarkeit überprüft (Abbildung 5). Die *in vitro*-Funktionalität im Gesamtzellextrakt des *gfp-apex2* exprimierenden Stamms wurde erneut bestätigt. Auch die fehlende *in vivo*-Markierung in zellwandlosen *U. maydis* Hefezellen konnte reproduziert werden. Es wurde davon ausgegangen, dass Biotin-Phenol nicht ins Cytoplasma einer lebendigen *U. maydis* Hefezelle hineingelangt. Diese Ausgangshypothese berief sich auf den Fakt, dass Biotin-Phenol nicht membrangängig ist (Hung et al., 2016). Des Weiteren inhibiert das strukturell sehr ähnliche Molekül Biotinyl-p-nitrophenylester den in der Plasmamembran sitzenden Biotin-Transporter von *S. cerevisiae* (Becker et al., 1971). Somit könnte Biotin-Phenol auch den *U. maydis* Biotin-Transporter UMAG_11172 blockieren, welcher das Homolog zu dem *S. cerevisiae* Biotin-Transporter Vht1 ist. Um dieses Problem zu lösen wurden verschiedene Methoden getestet, welche die Aufnahme von Biotin-Phenol gewährleisten sollten.

3.1.1 Der alternative Biotin-Transporter SMVT

Ein möglicher Lösungsansatz für die Aufnahme von Biotin-Phenol war die Expression eines alternativen Biotin-Transporters in *U. maydis*. Hierfür wurde der Natrium-abhängige Multivitamin-Transporter SMVT aus *H. sapiens* untersucht. Dieser ist in der Lage verschiedene biotinylierte Moleküle in das Cytoplasma zu transportieren (Wang et al., 1999). Dabei können weitaus größere Moleküle als Biotin-Phenol aufgenommen werden, wie zum Beispiel biotinylierte PAMAM-Dendrimere (Hanurry et al., 2020; Van Dongen et al., 2013; Yang et al., 2009; Yellepeddi et al., 2009). Daher wurde eine für *U. maydis* Codon-optimierte *mcherry*-Fusion des *smvt* Gens *SLC5A6* stabil ins Genom integriert und exprimiert. *U. maydis* wurde bereits erfolgreich als heterologe Proteinexpressions-Plattform etabliert (Stock et al., 2012; Terfrüchte et al., 2018). Bislang wurde allerdings nicht untersucht, ob auch die Expression menschlicher oder generell Spezies-fremder eukaryotischer Membranproteine möglich ist. Mikroorganismen wie *S. cerevisiae* werden für die Expression von Membranproteinen durchaus genutzt, aber der Erfolg kann von Protein zu Protein variieren (Dilworth et al., 2018). Deshalb wird insbesondere im Bereich der strukturellen Biologie daran gearbeitet, die heterologe Expression von Membranproteinen zu verbessern (Carpenter et al., 2008; Pandey et al., 2016).

Die Ergebnisse zeigten, dass es möglich ist, Vollängen-Protein von SMVT-mCherry im Gesamtzellextrakt von *U. maydis* Hefezellen nachzuweisen (Abbildung 7 B). Im Immunblot wurden zudem auch Abbaubanden nachgewiesen. Es ist bekannt, dass heterolog exprimierte Proteine häufig instabil und anfälliger für proteolytische Degradation sind (Carpenter et al., 2008; Pandey et al., 2016). Daher war diese Beobachtung nicht unerwartet. Für weiterführende Arbeiten sollte überprüft werden, ob das Protein während des Zellaufschlusses degradierte oder ob die Stabilität des Proteins bereits vor dem Zellaufschluss innerhalb der Zelle beeinträchtigt war. In dieser Doktorarbeit konnte dies nicht geklärt werden, aber zukünftig könnten verschiedene Proteinisolierungsverfahren getestet werden.

Die fluoreszenzmikroskopische Untersuchung der *smvt-mcherry*-Expression (Abbildung 7 C) zeigte, dass SMVT-mCherry nicht wie gewünscht vorwiegend an der Plasmamembran lokalisierte, sondern entweder im endoplasmatischen Retikulum verblieb oder in den Vakuolen akkumulierte. Diese Beobachtungen ähnelten denen aus einer Überexpressionsstudie des Serotonin-Transporters (SERT) aus Säugetieren (Tate, 2001). Dieser Transporter enthält zwölf Transmembrandomänen und wie bei SMVT befinden sich sowohl der N- wie auch der C-Terminus im intrazellularen Bereich (Tate, 2001). Es wurde versucht SERT in verschiedenen Organismen wie *Escherichia coli*, *Pichia pastoris* und in Insektenzellen zu exprimieren (Tate, 2001). Dort beobachtete man, dass eine SERT-Überexpression in Insektenzellen zu einer Akkumulation im endoplasmatischen Retikulum

fürte (Tate, 2001). Für SERT wurde zusätzlich beschrieben, dass die Membranzusammensetzung für dessen Funktionalität eine wichtige Rolle spielt (Tate, 2001). Für ein funktionales SERT wird Cholesterin in der Membran benötigt (Tate, 2001). Pilze besitzen dagegen Ergosterin, welches nachweislich die Funktionalität von SERT beeinträchtigt (Tate, 2001). Ob diese Beobachtungen aber auch auf die SMVT-Ergebnisse übertragbar sind, ist nicht klar.

Interessanterweise konnte eine geringe Plasmamembranlokalisation von SMVT beobachtet werden. Es wurde aber nicht nachgewiesen, ob diese Signale tatsächlich mit der Plasmamembran co-lokalisieren. Hierbei könnte es sich auch um eine Lokalisation im peripheren endoplasmatischen Retikulum handeln. Studien zur Lokalisation des endoplasmatischen Retikulums in *U. maydis* offenbarten, dass das periphere endoplasmatische Retikulum durchaus unmittelbar an der Zellmembran lokalisiert (Wedlich-Söldner et al., 2002). Dies könnte zukünftig mit einer Färbung der Plasmamembran wie auch mit Hilfe eines endoplasmatischen Retikulum-Reporterstamms näher untersucht werden. Die Lokalisation von SMVT würde in diesen Fällen anhand der angefärbten Plasmamembran beziehungsweise des markierten endoplasmatischen Retikulums bestimmt werden.

Mit Hilfe von Biotin-Fluorescein wurde überprüft, ob das potentiell an der Plasmamembran lokalisierende SMVT-mCherry funktional war (Abbildung 7 D). Die Expression von SMVT-mCherry schien im Funktionalitätstest keine gesteigerte Aufnahme von Biotin-Fluorescein zu ermöglichen. Man erkannte eindeutig, dass die Fluoreszenz von Biotin-Fluorescein in den fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen im Vergleich zu dem wildtypartigen Labortstamm nicht signifikant stärker war. Falls sich SMVT-mCherry tatsächlich in der Plasmamembran befand, so war es scheinbar nicht funktionell. Der Transport durch SMVT ist Natrium-abhängig, da mit jedem Vitaminmolekül auch Natriumionen co-transportiert werden (Vadlapudi, Vadlapatla, & Mitra, 2012). Daher wurde in einem Pilotexperiment getestet, inwiefern die Funktionalität von SMVT durch eine Erhöhung der Natriumkonzentration im Nährmedium gesteigert werden konnte. Jedoch schien dies nicht zu funktionieren, da keine gesteigerte Biotin-Fluorescein-Fluoreszenz in den Zellen beobachtet wurde. Ob SMVT nicht funktional gewesen ist oder ob die Lokalisation an der Membran nicht korrekt war, konnte daher nicht eindeutig geklärt werden.

Diese Strategie wurde aus Zeitgründen vorerst nicht weiterverfolgt, jedoch bleibt das Interesse, diesen Transporter für *U. maydis* zu etablieren, um nicht membrangängige Substanzen in die Zelle zu transportieren. Zum Beispiel wurde versucht, die SNAP-Tag-Methode in *U. maydis* zu etablieren, was daran scheiterte, dass der Fluoreszenzfarbstoff unter nativen Bedingungen nicht in die Zellen transportiert werden konnte (Persönliche Kommunikation Carl Haag). Eine biotinylierte Version des Fluoreszenzfarbstoffs könnte

dagegen mit Hilfe von SMVT in die Zellen gelangen. Daher sollten in Zukunft weitere Versuche zur Optimierung der SMVT-Lokalisation unternommen werden. Über den Transport von SMVT zur Plasmamembran in humanen Zellen ist bis heute nicht viel bekannt. Es wird vermutet, dass SMVT möglicherweise mit Hilfe des Proteins PDZD11 (*PDZ domain-containing protein 11*) an die Membran lokalisiert wird (Nabokina et al., 2011). Es wurde beschrieben, dass PDZD11 ein direkter Interaktionspartner von SMVT ist, wobei auch der Transport anderer Membranproteine von PDZD11 reguliert wird (Nabokina et al., 2011). SMVT besitzt eine Klasse-I PDZ-Proteindomäne im C-terminalen Bereich welcher von PDZD11 erkannt wird (Nabokina et al., 2011). Daher wäre es von großem Interesse herauszufinden, ob die Lokalisation von SMVT verbessert werden könnte, wenn dieses Protein ebenfalls Codon-optimiert in *U. maydis* exprimiert würde. Es ist jedoch äußerst zweifelhaft, dass die Expression von PDZD11 ausreichen würde, um dies zu bewerkstelligen. Möglicherweise wird hierfür ein Proteinkomplex aus mehreren verschiedenen Proteinen benötigt. Da der genaue Lokalisierungsvorgang von SMVT bislang nicht bekannt ist, fehlen somit die nötigen Informationen, um diesen Mechanismus in *U. maydis* nachzuahmen.

Eine weitere Lösung für das Lokalisationsproblem könnte das Hinzufügen einer N-terminalen Signalpeptidsequenz eines bekannten *U. maydis* Membranproteins sein. Das Signalpeptid könnte sicherstellen, dass das Protein zur Plasmamembran co-translational transportiert wird. Im Zuge dessen wird das Signalpeptid durch eine Signalpeptidase entfernt. Eine Signalpeptidsequenz sollte somit die Integrität von SMVT nicht beeinflussen. Erste Pilotexperimente mit der Signalpeptidsequenz des gut studierten Msb2- (*multicopy suppressor of a budding defect 2*) Proteins aus *U. maydis* wurden bereits durchgeführt (Lanver et al., 2010). Es konnte gezeigt werden, dass die Msb2-Signalpeptidsequenz ausreicht, um selbst eine stark verkürzte Variante von Msb2 an die Plasmamembran zu lokalisieren (Fernández-Álvarez et al., 2012). Jedoch konnte im Pilotexperiment vorerst keine verbesserten SMVT-Lokalisation detektiert werden. Daher wurde diese Strategie zu Gunsten anderer Experimente nicht weiterverfolgt. Dabei sollte zukünftig systematisch überprüft werden, ob diese Strategie nicht doch zum Erfolg führen könnte. Hierfür sollten auch weitere Signalpeptide von anderen Membranproteinen von *U. maydis* getestet werden.

Die reichliche Akkumulation von SMVT-mCherry in den Vakuolen und im endoplasmatischen Retikulum könnte auch durch ein zu hohes Expressionsniveau hervorgerufen worden sein. Zu hohe Expressionsraten können sich negativ auf die Proteinfaltung auswirken. Dies führt zu nicht korrekt gefalteten Proteinen, die häufig im endoplasmatischem Retikulum verbleiben (Gasser et al., 2008). Daher wäre es möglicherweise vorteilhaft für die SMVT-Expression, zukünftig einen schwächeren

Promotor zu nutzen, wie zum Beispiel den Promotor des *adi1*- (*aconitate-Δ-isomerase 1*) Gens (Zambanini et al., 2017).

3.1.2 Nutzung eines Membranpermeabilisierungsverfahrens

Parallel zum Import von Biotin-Phenol wurde versucht, die Aufnahme durch Permeabilisierung der Plasmamembran zu erhöhen. Dies ist eine gängige Methode, um die Aufnahme von Substanzen in Mikroorganismen, wie zum Beispiel *S. cerevisiae* zu ermöglichen (Kippert, 1995; Stirke et al., 2014). Eine Permeabilisierung der Plasmamembran von *U. maydis* Hefezellen könnte dabei helfen, Biotin-Phenol in die Zelle zu transportieren. Dabei musste darauf geachtet werden, dass die Zellen innerhalb des kurzen Zeitraums, der für die Markierung mit APEX2 benötigt wird, nicht sterben und somit der *in vivo*-Aspekt dieses Experiments nicht verloren geht.

Bei der Untersuchung der Aufnahme von Biotin-Fluorescein durch verschiedene Permeabilisierungsansätze fiel auf, dass mit Digitonin die besten Ergebnisse erzielt werden konnten (Abbildung 8 A). Der hypertonische Stress erwirkte keine nennenswerte Biotin-Fluorescein-Aufnahme. Bei den hypotonischen Bedingungen mit Sorbitol dagegen konnte man starke punktuelle Akkumulationen innerhalb der Zelle beobachten. Dass das Biotin-Fluorescein nicht in der gesamten Zelle verteilt war, sprach für lokale Membraninternalisierungen, welche das Biotin-Fluorescein in dem gewählten Zeitrahmen nicht in das gesamte Cytoplasma abgaben. Digitonin dagegen überzeugte mit einer überaus homogenen Verteilung von Biotin-Fluorescein im gesamten Cytoplasma. Diese Beobachtung wurde erneut in den *in vivo*-Markierungstests mit cytoplasmatischem APEX2 bestätigt. Nur der Einsatz von Digitonin ermöglichte eine starke unspezifische Biotinylierung der Proteine. Dadurch wurde erwiesen, dass Biotin-Phenol durch die permeabilisierte Plasmamembran in das Cytoplasma der Zelle gelangen konnte. Gleichzeitig bestätigte dies auch die Hypothese, dass die Aufnahme von Biotin-Phenol das einzige Hindernis war, welches die *in vivo*-Biotinylierung durch APEX2 verhinderte. Interessanterweise konnte eine Inkubation der Zellen mit 1,2 M Sorbitol keine Biotinylierung ermöglichen, obwohl dies bereits für einen anderen Pilz beschrieben wurde. Mit Hilfe dieser Sorbitol-Konzentration wurde das APEX2-Markierungsverfahren in *S. pombe* etabliert (Hwang & Espenshade, 2016). Nach Überprüfung der Biotin-Transporter-Homologie ließ sich vermuten, dass dieser Hefepilz möglicherweise ebenfalls kein Biotin-Phenol aufnehmen kann, da dieser auch ein Vht1-Homolog besitzt. Das Protokoll dieser Publikation wurde übernommen, führte jedoch zu keinem Erfolg in *U. maydis* Hefezellen. Warum diese Methode in *U. maydis* Hefezellen nicht funktionierte, konnte nicht geklärt werden. Es wäre möglich, dass Unterschiede in der Zellwandzusammensetzung oder in der Plasmamembrancomposition zu diesen

abweichenden Ergebnissen geführt haben könnten. Bislang wurden keine weiteren Publikationen veröffentlicht, in denen diese Methode erfolgreich angewendet wurde. Daher wurde der Fokus auf die Digitonin-Methode gelegt. Diese Methode wurde bereits in vorhergegangenen Arbeiten dafür genutzt, um die Endochitinase Cts1 durch die permeabilisierte Plasmamembran aus der Zelle zu schleusen (Koepke et al., 2011).

Die für diese Publikation etablierte Digitonin-Methode wurde optimiert, wobei festgestellt wurde, dass eine finale Konzentration von 40 μM Digitonin im Nährmedium den besten Effekt erzielte. Höhere Digitonin-Konzentrationen führten zu einer hohen Letalität. Zusätzlich wurde einem Pilotexperiment mit hyphalen Zellen beobachtet, dass eine 80 μM Digitonin-Konzentration bereits einen inhibierenden Effekt auf den endosomalen Rrm4-Transport hatte.

Bei weiteren *in vivo*-Markierungsexperimenten mit Hilfe von Digitonin fiel auf, dass mit Digitonin behandelte Proben ohne den Reaktionsinduktor Wasserstoffperoxid bereits unspezifische Proteinbiotinylierung aufwiesen. Bei der systematischen Überprüfung dieser Beobachtung wurde festgestellt, dass in nur mit Biotin-Phenol und Digitonin inkubierten APEX2-Proben vergleichbare Mengen unspezifisch biotinylierten Proteins detektiert wurden, so wie man es bei Proben mit einer vollständig abgelaufenen Reaktion mit Wasserstoffperoxid beobachten konnte (Abbildung 8 D). Dies führte zu der Hypothese, dass die Behandlung mit Digitonin Zellstress verursacht. Zellstress kann zur Bildung von Wasserstoffperoxid oder reaktiven Sauerstoffspezies führen (Tomanek, 2015). Diese initiieren die Markierungsreaktion mit Hilfe von APEX2 und bilden somit die dafür benötigten Biotin-Phenoxy-Radikale. Unspezifische Biotinylierung konnte auch in mit Digitonin behandelten Proben ohne APEX2 nachgewiesen werden, obwohl hier wie in den vorherigen Experimenten ohne Digitonin nur nativ biotinylierte Proteine erwartet wurden. Jedoch verursachte der Digitonin-induzierte Zellstress, dass nun auch Zellen ohne APEX2 in der Lage waren, unspezifische Markierungen mit Biotin-Phenoxy durchzuführen. Dies war besonders ersichtlich in dem Vergleich der verschiedenen APEX2-Varianten, in denen der wildtypartige Laborstamm als Kontrolle diente. Zu erwarten wäre, dass jede Kompartiment-spezifische APEX2-Variante ein anderes Biotinylierungsmuster aufweisen würde und in dem Laborstamm keine unspezifische Biotinylierung zu finden wäre. Die Unterschiede zwischen den einzelnen APEX2-Stämmen waren zwar marginal, jedoch fand man auch im Laborstamm biotinylierte Proteine jeglicher Größe. Das Auftreten der unspezifischen Markierungsreaktion im Laborstamm durch eine Digitonin-Behandlung stellte dieses Projekt vor ein neues Problem. Neben den nativ biotinylierten Proteinen in *U. maydis* kamen zusätzlich noch die Digitonin-bedingt markierten Proteine hinzu, welche als falsch-positive Ergebnisse die Auswertung erschweren würden. Nativ biotinylierte Proteine könnten zukünftig identifiziert und als falsch-positive Proteine katalogisiert werden. Zufällige

unspezifische Biotinylierungen dagegen können nicht einfach als Hintergrund abgetan werden, da auch mRNP-Komplex-Komponenten in der Kontrolle biotinyliert werden könnten.

Ob nun die diese unspezifische Markierungsreaktion durch die nativen Peroxidasen von *U. maydis* katalysiert wurden oder Biotin-Phenol direkt durch andere reaktiven Moleküle zu Biotin-Phenoxyli oxidiert wurde, ist unklar. Jedoch ist deutlich geworden, dass eine Digitonin-Behandlung Zellstress in einem Ausmaß verursacht, der einen durch Wasserstoffperoxid zeitlich kontrollierten Reaktionsablauf unmöglich macht. Dieser massive Zellstress stellt auch den *in vivo*-Aspekt dieses Experiments in Frage. Die Grundidee war, die Proteine der Zellen nur kurzzeitig mittels APEX2 zu markieren, um eine Art Schnappschuss der vorliegenden nativen Zellsituation zu bekommen. Werden die Zellen bereits durch die Reaktionsvorbereitungen, bei welchen Digitonin zu Einsatz kommt, derartig gestresst, ist es fraglich, ob man eine native stressfreie Situation überhaupt noch vorfinden kann. Die dadurch gewonnenen Ergebnisse könnten nicht einfach auf ein natives stressfreies Modell übertragen werden und gelten somit nur für den eingeschränkten Digitonin-behandelten Fall. Man könnte nun weitere Tests mit einer geringeren Konzentration von Digitonin oder einer geringeren Digitonin-Inkubationszeit durchführen, um zu prüfen, ob es noch möglich wäre den Zellstress auf ein Minimum zu reduzieren. In dem Versuch zur Bestimmung der optimalen Digitonin-Konzentration wurden schließlich mit einer 20 μM Konzentration vergleichbare Ergebnisse zu der genutzten 40 μM Standardkonzentration nachgewiesen. Man könnte aber auch andere permeabilisierende Methoden testen, um Biotin-Phenol in die Zelle zu befördern. Zum Beispiel könnten man eine Elektroporation der Zellen durchführen. Dabei wird die Zellmembran mit Hilfe eines kurzen elektrischen Pulses permeabilisiert (Kotnik et al., 2015). Erste Pilotexperimente zeigten jedoch anhand der Zellmorphologie der Hefezellen, dass diese Methode zu großem Zellstress führte (persönliche Kommunikation Kira Müntjes). Dennoch wäre es möglicherweise einen Versuch wert, diese Methode für APEX2 zu optimieren. Eine andere Option könnte die Nutzung von Liposomen für den Transport von Biotin-Phenol in die Zelle sein. Liposomen sind künstlich generierte, aus einer Membrandoppelschicht bestehende Vesikel, die genutzt werden können, um nicht membrangängige Moleküle aus ihrem Inneren in Zellen zu transportieren. Dabei fusionieren die Liposomen mit der Zellmembran und setzen dabei ihre Fracht ins das Cytoplasma der Zelle frei (Lai et al., 2019). Diese Methode wurde bereits als Transformationsprotokoll für einen anderen basidiomycetischen Pilz angewendet, um DNA in die Zellen zu befördern (Shi et al., 2017). Daher ist diese Methode sehr erfolgversprechend und sollte zukünftig für *U. maydis* mit Biotin-Phenol gefüllten Liposomen etabliert werden. Alternativ könnten andere Markierungssubstrate getestet werden. Für die APEX2-Methode wurden bereits verschiedene neuartige Biotin-

basierte Markierungssubstrate entwickelt, welche sogar die unspezifische Umgebungsmarkierung von Nukleotiden möglich machen (Zhou et al., 2019). Für *U. maydis* sollte jedoch ein nicht Biotin-basiertes Substrat getestet werden. In einer Publikation, bei der APEX2 in *E. coli* und *Mycobacterium smegmatis* für die Untersuchung von periplasmatischen Proteinen genutzt wurde, wurden zwei solcher Substrate getestet (Ganapathy et al., 2018). Dort wurden Tyramid-Azid und Tyramid-Alkin eingesetzt, um den hohen Hintergrund der nativ biotinylierten Proteine zu vermeiden (Ganapathy et al., 2018). Da in *U. maydis* auch sehr viele nativ biotinylierte Proteine vorhanden sind, könnte der Einsatz dieser Substrate sehr vorteilhaft sein. Jedoch ist unklar, wie diese Substanzen von den bakteriellen Zellen aufgenommen wurden und ob sie von *U. maydis* Zellen aufgenommen werden könnten.

Am vielversprechendsten könnte jedoch ein vor kurzem veröffentlichtes Einfrierverfahren sein, welches die Markierungsreaktion in *S. cerevisiae* ermöglichte (Singer-Krüger et al., 2020). Auch bei diesem Pilz konnte Biotin-Phenol nicht durch den Biotin-Transporter Vht1 in die Zellen gelangen. Um dieses Problem zu lösen, wurden APEX2-exprimierende Zellen in einem Glycerol-haltigen Puffer für mindestens einen Tag bei -80 °C eingefroren. Für die Markierungsreaktion wurden die Zellen drei Minuten lang bei Raumtemperatur aufgetaut und dann mit Biotin-Phenol versetzt. Die Reaktion wurde dann sofort mit Wasserstoffperoxid gestartet. Durch das Einfrieren entstehen Eiskristalle, welche die Plasmamembran der Zellen beschädigen. Somit wird diese permeabel für Biotin-Phenol. Bei diesem für *S. cerevisiae* optimierten Verfahren wurde explizit darauf geachtet, dass keine stressbedingte unspezifische Biotinylierung auftreten könne (Singer-Krüger et al., 2020). Genau diese stressbedingte Biotinylierung ist das, was den Digitonin-Ansatz für *U. maydis* nicht realisierbar machte. Daher sollte künftig dieses Einfrierverfahren unbedingt für *U. maydis* getestet werden. Allerdings ist dabei zu beachten, dass wegen den offensichtlichen morphologischen Unterschieden zwischen *U. maydis* Hefezellen und Hyphen das Protokoll möglicherweise für den jeweiligen Zelltyp angepasst werden müsste. Sollte es dadurch bei *U. maydis* auch zu keinen stressbedingten Biotinylierungen kommen so wäre es durchaus denkbar, dass diese APEX2-Methode erfolgreich in zukünftigen Experimenten angewendet werden könnte.

3.2 Identifikation neuer Komponenten durch eine massenspektrometrische Analyse

Als alternativer Ansatz wurde eine Gfp-Trap-basierte Rrm4-Immunpräzipitation durchgeführt, welche mit einer massenspektrometrischen Analyse gekoppelt wurde. Die GFP-Trap-Immunpräzipitation ist eine geläufige Methode zur Identifikation von Proteinkomplexen sowie RNA-Protein-Interaktionsnetzwerken und wurde bereits erfolgreich in vorrangegangenen Arbeiten in *U. maydis* genutzt (Fedorova & Dorogova, 2020; Licatalosi et al., 2020; Olgeiser et al., 2019). Um neue Rrm4-abhängige mRNP-Komplex-Kandidaten zu identifizieren, wurden daher alle co-immunpräzipitierten Proteine einer Rrm4-Gfp-Immunpräzipitation massenspektrometrisch analysiert. Die identifizierten Proteine wurden zunächst unter den verschiedenen Proben verglichen, um potentielle Kandidaten zu identifizieren und dann anschließend auf eine mögliche Rolle im endosomalen mRNP-Komplex untersucht.

3.2.1 Die Immunpräzipitation von Rrm4

Für diese Methode wurden Rrm4-Gfp, Rrm4^{mRRM1}-Gfp und Gfp aus den jeweiligen Expressionsstämmen mit Hilfe des GFP-Trap-Aufreinigungsverfahrens immunpräzipitiert. Dabei wurde das entsprechende Vollängen-Protein isoliert, wobei bei Rrm4-Gfp und Rrm4^{mRRM1}-Gfp spezifische Rrm4-Degradationsbanden auftraten. Dieses Degradationsmuster wurde bereits öfter beobachtet, weshalb Rrm4 gerade zu diesen distinkten Größen degradiert, wurde bislang nicht aufgeklärt (König et al., 2009). So könnten möglicherweise Regionen in Rrm4 vorhanden sein, welche instabil werden, wenn Rrm4 seine Funktion im endosomalen mRNP-Komplex nicht erfüllt. Dabei könnten die Abbaubanden den stabilen Bereichen innerhalb der Proteinstruktur von Rrm4 entsprechen, welche durch Degradierung der instabilen Regionen voneinander getrennt werden. Dies könnte durch intensivere proteinbiochemische Untersuchungen nachgewiesen werden, wie zum Beispiel mit der Überprüfung durch Proteinstrukturvorhersagen und Analyse der Aminosäuresequenz mit Hilfe massenspektrometrischer Verfahren.

Bei der Qualitätskontrolle der für die massenspektrometrische Untersuchung generierten Proben fiel auf, dass bei allen Rrm4^{mRRM1}-Gfp Proben weniger Vollängen-Protein vorhanden war (Abbildung 11 B). Eine Erklärung hierfür könnte sein, dass insgesamt weniger Rrm4^{mRRM1}-Gfp isoliert wurde als Rrm4-Gfp. So könnte bei in den bipolar auswachsenden Hyphen des *rrm4^{mRRM1}-gfp*-Expressionsstamms eine geringere Menge an Rrm4 vorhanden sein als bei den voll ausgewachsenen Hyphen des *rrm4-gfp*-Expressionsstamms. Sollte diese Theorie zutreffen, sollte es möglich sein, dies zukünftig

durch eine Proteinkonzentrationsbestimmung nachzuweisen. Was jedoch gegen diese Theorie sprach, war die Intensität der Abbaubanden von Rrm4^{mRRM1}-Gfp, welche ein geringes Verhältnis von Vollängen-Protein zu Abbaubanden aufwies. So wird deutlich, dass die Proteinmenge der jeweiligen Abbaubanden deutlich höher war als die des Vollängen-Proteins. Des Weiteren konnte in bisherigen Arbeiten zu Rrm4^{mRRM1} keine verringerte Proteinmenge festgestellt werden (Becht et al., 2006). Eine weitere Theorie, die dies erklären könnte, basiert auf der Möglichkeit, dass durch die Integration der Mutationen in der ersten RRM-Domäne als Konsequenz das Protein eine erhöhte Instabilität bei den vorherrschenden Pufferverhältnissen der angewandten Immunpräzipitation aufwies. Dies könnte durch andere Pufferverhältnisse getestet werden.

3.2.2 Posttranslationale Modifikationen von Rrm4

Mit Hilfe der durchgeführten massenspektrometrischen Analyse der Rrm4-Gfp-Immunpräzipitation war es möglich, posttranslationale Proteinmodifikationen zu identifizieren (Larsen et al., 2006). Wenn eine Aminosäure posttranslational modifiziert wurde, erhöhte sich ihre molekulare Masse (Larsen et al., 2006). Diese Abweichung der Masse wird detektiert und je nach Abweichung einer Modifikation zugeordnet (Larsen et al., 2006). Daher wurden die posttranslationalen Proteinmodifikationen von Rrm4 neben der Suche nach neuen mRNP-Komplex-Komponenten als zusätzlicher Aspekt in dieser Doktorarbeit analysiert.

Hierfür wurde untersucht, ob eine der drei am besten studierten Proteinmodifikationen, Phosphorylierung, Acetylierung und Methylierung (Drazic et al., 2016), bei Rrm4 vorliegen (Abbildung 20). RNA-bindende Proteine werden oftmals posttranslational modifiziert und damit posttranslational reguliert (Y. Xu et al., 2019). Ob Rrm4 posttranslational modifiziert wird, war bislang unbekannt. Mit den generierten massenspektrometrischen Daten konnte man einen ersten Eindruck davon bekommen, inwiefern Rrm4 modifiziert wurde. So wurden die eingeschickten Rrm4-Gfp-Immunpräzipitationen auf diese posttranslationalen Proteinmodifikationen untersucht. Dabei konnten bei Rrm4 alle drei oben genannten Modifikationsarten gefunden werden. Die beiden C-terminal liegenden MLLE-Domänen wiesen vor allem vermehrte Acetylierungen auf.

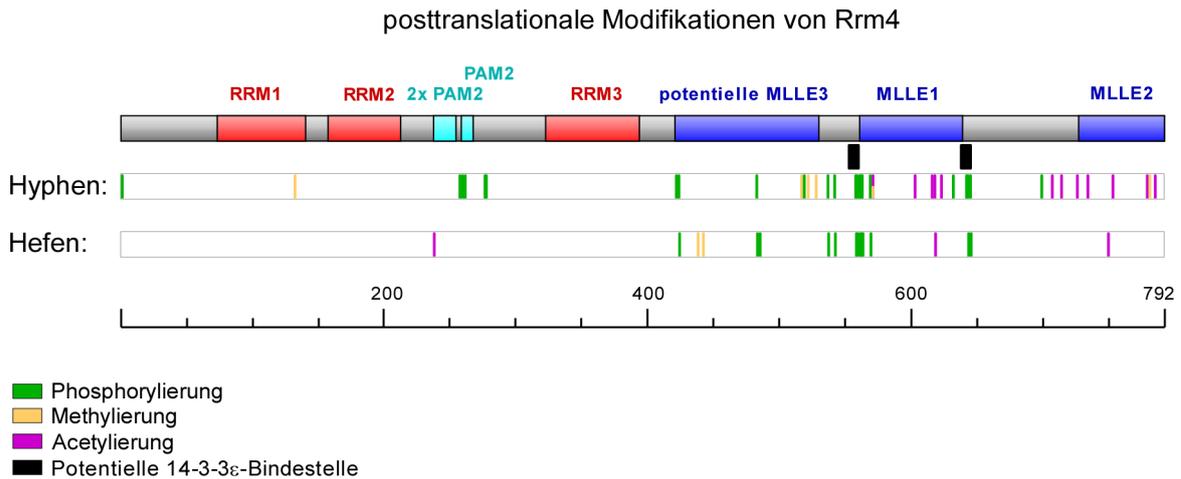


Abbildung 20: Identifizierte posttranslationale Modifikationen von Rrm4.

Schematische Darstellung der identifizierten posttranslationalen Modifikationen und ihrer genauen Position innerhalb des Rrm4-Proteins in Hefen und Hyphen von *U. maydis*. Die Skalierung bezeichnet die Aminosäureposition.

Die posttranslationale Acetylierung von Lysin ist eine bereits intensiv untersuchte Proteinmodifikation (Drazic et al., 2016). Dabei wird der Aminosäure Lysin eine Acetylgruppe hinzugefügt (Drazic et al., 2016). Dieser Form der Proteinmodifikation wurden viele unterschiedliche Funktionsmechanismen zugeordnet. Zum Beispiel wird die katalytische Aktivität von Enzymen oder die Proteindegradation durch Acetylierungen reguliert (Narita et al., 2019). Es wurde auch die Regulation von Protein-Protein-Interaktionen beschrieben (Narita et al., 2019). Dabei kann diese Modifikation die Protein-Protein-Interaktion je nach Wirkungsmechanismus inhibieren oder fördern (Narita et al., 2019). Beim humanen poly(A)-bindenden Protein PABP1 wurde nachgewiesen, dass die Acetylierung in der MLLE-Domäne, welche als PABC-Domäne bekannt ist, die MLLE-PAM2-Interaktion reguliert (Brook et al., 2012). Die bei Rrm4 gefundenen Acetylierungen kommen ebenfalls ausschließlich in den MLLE-Domänen MLLE1 und MLLE2 vor. Daher wäre es möglich, dass wie bei der MLLE-Domäne von PABP1 die Protein-Protein-Interaktion der MLLE-Domänen von Rrm4 ebenfalls durch Acetylierungen reguliert werden. Ob es sich dabei um eine positive oder negative Regulation handelt, könnte zukünftig mit Rrm4-Varianten untersucht werden, bei denen die einzelnen acetylierten Lysine mutiert beziehungsweise ausgetauscht werden. Interessanterweise wurden in der potentiellen dritten MLLE-Domäne keine Acetylierungen gefunden.

Dort wurden stattdessen Methylierungen nachgewiesen. Bei PABP1 wurde eine mögliche Verbindung zwischen Acetylierung und Methylierung von Lysin gefunden (Brook et al., 2012). Dabei soll je nachdem welche Lysin-Modifikation vorhanden ist, die Affinität der

MLLE-Domäne zu verschiedenen PAM2-Domänen reguliert werden (Brook et al., 2012). Zwar sind die ersten beiden Methylierungen in der neu entdeckten potentiellen dritten MLLE-Domäne (MLLE3) (persönliche Kommunikation Senthil Devan) Arginin-Modifikationen, jedoch können Protein-Protein-Interaktionen auch durch Arginin-Methylierungen reguliert werden. Dabei kann ein methyliertes Arginin als eine Interaktionsfläche für Protein-Protein-Interaktionen dienen. In der ersten RRM-Domäne konnte auch eine Arginin-Methylierung detektiert werden. Auch Protein-Nukleotid-Interaktionen können durch Arginin-Methylierungen beeinflusst werden (Murn & Shi, 2017). Ob die RNA-Affinität von Rrm4 durch Arginin-Methylierungen beeinflusst wird, müsste in zukünftigen Mutationsexperimenten untersucht werden.

Es wurden auch Phosphorylierungen bei Rrm4 identifiziert. Diese lokalisierten meist außerhalb der Proteindomänen von Rrm4. Dabei war es auffällig, dass sie vermehrt an beiden Grenzen der MLLE1-Domäne detektiert wurden. Phosphorylierungen können strukturelle Eigenschaften der modifizierten Proteinsequenz beeinflussen (Nishi et al., 2011). So können Phosphorylierungen nahe einer Proteinbindedomäne einen direkten Einfluss auf deren Funktion haben (Nishi et al., 2011). Phosphorylierte Proteine können durch bestimmte Proteine identifiziert und gebunden werden (Yaffe, 2002). Das 14-3-3-Protein wurde als solch eine Phosphorylierung erkennendes Protein beschrieben (Yaffe, 2002). Dieses Protein bindet an Proteine mit einer bestimmten phosphorylierten Aminosäuresequenz (Yaffe, 2002). Für *U. maydis* wurde diese Sequenz bereits publiziert (Mielnichuk & Pérez-Martín, 2008). Die Bindesequenz besteht aus einer hydrophoben Aminosäure gefolgt von einer beliebigen Aminosäure, einem Arginin, zwei beliebigen Aminosäuren, einem phosphorylierten Serin, einer beliebigen Aminosäure und einer weiteren hydrophoben Aminosäure (Mielnichuk & Pérez-Martín, 2008). So konnten durch die ermittelten Phosphorylierungen zwei 14-3-3-Bindestellen in Rrm4 gefunden werden. Diese beiden Bindestellen grenzen jeweils an einer Seite der MLLE1-Domäne. Das 14-3-3-Protein wurde als regulatorisches Protein beschrieben, welches durch seine Bindung an das phosphorylierte Protein Konformationsänderungen verursacht (Yaffe, 2002). Je nach Konformationsänderung können Regionen des Proteins für andere Proteine erreichbar oder unerreichbar gemacht werden (Yaffe, 2002). Daher könnte so die MLLE1-Domäne durch posttranslationale Modifikationen reguliert werden. Durch die Phosphorylierung der 14-3-3-Bindestellen wird das 14-3-3-Protein rekrutiert, was die Struktur der Domäne verändern könnte. In der potentiellen MLLE3-Domäne wurden auch Phosphorylierungen gefunden, aber keine 14-3-3-Bindesequenzen. Auch ohne das 14-3-3-Protein könnten die dortigen Phosphorylierungen einen regulatorischen Effekt haben. Eine weitere Stelle von Rrm4, die vermehrt phosphoryliert wurde, ist die Peptidsequenz, die zwischen den potentiellen PAM2-Domänen liegt. Dies ist insofern interessant, da beschrieben wurde, dass in unmittelbarer

Nähe bekannter PAM2-Motive von PABP1-interagierenden Proteinen Cluster von Phosphorylierungen vorkommen (Huang et al., 2013). So wird vermutet, dass die PAM2-MLLE-Interaktion durch Phosphorylierungen geregelt wird (Huang et al., 2013). Bei Rrm4 wurden drei potentielle PAM2-Motive in unmittelbarer Nähe zueinander entdeckt (persönliche Kommunikation Thomas Pohlmann). Ob es sich bei diesen Motiven tatsächlich um PAM2-Domänen handelt, muss zukünftig bewiesen werden. Jedoch könnten die vermehrten Phosphorylierungen in dieser Region ein Indiz für eine PAM2-Domäne sein.

Um zu untersuchen, ob sich die posttranslationalen Modifikationen von Rrm4 je nach Zelltyp unterscheiden, wurde auch Rrm4 aus Hefezellen massenspektrometrisch analysiert. Bei dem Vergleich der gefundenen posttranslationalen Modifikationen von Rrm4 aus *U. maydis* Hyphen mit den Rrm4-Modifikationen aus *U. maydis* Hefezellen sind deutliche Unterschiede aufgefallen. So sind die meisten Acetylierungen und Methylierungen in den MLLE-Domänen nicht vorhanden. Des Weiteren sind die Phosphorylierungen in der potentiellen PAM2-Region nicht gefunden worden. Diese Ergebnisse könnten ein Hinweis darauf sein, dass Rrm4 möglicherweise je nach Zelltyp posttranslational reguliert wird. Es wurde bereits in anderen Organismen davon berichtet, dass die Funktion von RNA-bindenden Proteinen durch posttranslationale Modifikationen reguliert wird (Y. Xu et al., 2019). So werden zum Beispiel die Stabilität, Lokalisation und die RNA-Bindeaffinität des menschlichen hnRNPK (*heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K*)-Proteins massiv durch Phosphorylierungen beeinflusst (Y. Xu et al., 2019). Inwiefern sich die Anwesenheit beziehungsweise die Abwesenheit einzelner Modifikationen auf Rrm4 auswirken, sollte zukünftig in weiteren Untersuchungen geklärt werden.

3.2.3 Auswertung der massenspektrometrischen Analyse

Die jeweils vier besten der insgesamt sechs generierten biologischen Replikate der Rrm4-Gfp-, Rrm4^{mRRM1}-Gfp- und Gfp-Immünpräzipitationen wurden für die massenspektrometrische Analyse zum IMB (Institute of Molecular Biology) in Mainz verschickt. Die Ergebnisse der dort quantitativ analysierten Proben wurden anschließend ausgewertet. Dabei handelte es sich um eine durch das MaxQuant-Programm (Tyanova et al., 2016) erstellte Liste aller identifizierten Proteine. Je nach Anreicherung und Signifikanzwert der jeweiligen Proteine konnte so ermittelt werden, ob ein Protein im direkten Vergleich zu der Kontrolle signifikant angereichert war.

Für Rrm4 konnte eine Vielzahl potentieller Interaktionspartner identifiziert werden. Die Ergebnisse überraschten mit einer relativ hohen Anzahl an signifikant angereicherten Proteinen in den Rrm4-Gfp- gegen Gfp- und in den Rrm4^{mRRM1}-Gfp- gegen Gfp-Vergleichen. So wurden für Rrm4-Gfp 280 signifikant angereicherte Proteine identifiziert. Bei Rrm4^{mRRM1}-

Gfp lag die Zahl der signifikant angereicherten Proteine bei 390. In einer bereits vorausgegangenen Rrm4-Tap-Tag-Immunpräzipitation wurden zum Vergleich nur 23 Proteine als signifikant angereichert identifiziert (Olgeiser et al., 2019). Von diesen 23 Proteinen stimmten nur sechs Proteine mit den Ergebnissen der hier beschriebenen Rrm4-Gfp-Immunpräzipitation überein. Diese Proteine sind Rrm4, Upa2, die Phosphatase UMAG_05365, die beiden Hitzeschock Proteine UMAG_03791 und UMAG_10526, wie auch das ribosomale Protein UMAG_11719. Interessanterweise wurde Grp1, welches in der Tap-Tag-Aufreinigung identifiziert wurde (Olgeiser et al., 2019), nicht in den Ergebnissen in der Gfp-Trap-Immunpräzipitation gefunden. Weshalb so viel mehr Proteine als signifikant angereichert identifiziert wurden und warum nur sechs von denen in beiden Aufreinigungen gefunden wurden, ist unklar. Es wäre durchaus möglich, dass die Gfp-Trap-Aufreinigung bessere Ergebnisse erzielt als die Tap-Tag-Aufreinigung. Möglicherweise wurde bei der Tap-Tag-Aufreinigung stringenter gewaschen oder bei dessen Auswertung stringenter gefiltert.

Bei genauerer Betrachtung der signifikant angereicherten Proteine fiel auf, dass in den jeweiligen Datensätzen Komponenten des endosomalen mRNP-Komplexes, Fracht-Proteine und endosomal assoziierte Proteine identifiziert wurden (Abbildung 12 C). So wurde zum Beispiel der direkte Interaktionspartner Upa1, das Fracht-Protein Cdc11 und das endosomale Protein Rab5a sowohl bei Rrm4-Gfp als auch bei Rrm4^{mRRM1}-Gfp signifikant angereichert vorgefunden. Aufgrund dessen ist es sehr wahrscheinlich, dass innerhalb des Datensets auch bislang unbekannte Komponenten des endosomalen mRNP-Komplexes vorhanden sind. Im qualitativen Vergleich der Ergebnisse von Rrm4-Gfp und Rrm4^{mRRM1}-Gfp ist aufgefallen, dass sie sich bei der signifikanten Anreicherung von Upa2 unterschieden. Upa2 war bei den Ergebnissen von Rrm4^{mRRM1}-Gfp nicht signifikant angereichert. Upa2 ist ein Rrm4-abhängiger Teil des mRNP-Komplexes, welcher mit seinen vier PAM2-Sequenzen mit dem poly(A)-bindenden Protein Pab1 interagiert (Jankowski et al., 2019). Es wurde bereits gezeigt, dass eine Mutation der ersten RRM-Domäne ausreichend ist, damit dieses Protein nicht mehr mit dem endosomalen mRNP-Komplex transportiert wird (Jankowski et al., 2019). Daher war die fehlende signifikante Anreicherung von Upa2 bei Rrm4^{mRRM1}-Gfp durchaus zu erwarten. Dieses Ergebnis unterstützt sogar die Grundhypothese, in welcher Rrm4^{mRRM1}-Gfp genutzt werden könnte, um eine Reduktion der RNA-abhängigen Proteine zu erhalten. Somit sollte wegen der massiv reduzierten RNA-Bindfähigkeit des mutierten Rrm4-Proteins nur die Kernkomponenten des endosomalen mRNP-Komplexes im Rrm4^{mRRM1}-Gfp-Datensatz vorhanden sein. Bei dem direkten quantitativen Vergleich der Daten von Rrm4-Gfp und Rrm4^{mRRM1}-Gfp erhielt man die Proteine, die eindeutig der entsprechenden Probe als signifikant angereichert zugeordnet werden konnten. So waren bei diesem Vergleich 36 Proteine bei Rrm4-Gfp und 106

Proteine bei Rrm4^{mRRM1}-Gfp signifikant angereichert. Wie erwartet war Upa2 bei Rrm4-Gfp signifikant angereichert. Außerdem fand man Rrm4 selbst bei Rrm4-Gfp signifikant angereichert, was möglicherweise durch die geringere Menge von Vollängen-Protein in den Rrm4^{mRRM1}-Gfp-Proben erklärt werden könnte. Eine geringe Proteinmenge oder eine stärkere Proteindegradation von Rrm4 in den Rrm4^{mRRM1}-Gfp-Proben könnte zu diesem Umstand geführt haben. Abzüglich Rrm4 und Upa2 waren somit 34 Proteine exklusiv in Rrm4-Gfp angereichert. Proteine, die in beiden Proben häufig identifiziert wurden, wurden nach der Normalisierung als insignifikant betrachtet. Daher wurde weder Upa1 noch Rab5a oder Cdc11 als signifikant angereichert vorgefunden. Diese Form des Vergleiches eignet sich daher, um RNA-abhängige Komponenten des Rrm4-Gfp-Datensatzes zu identifizieren. Um RNA-unabhängige Kernkomponenten des endosomalen mRNP-Komplexes zu identifizieren, war die vorangegangene quantitative Analyse besser geeignet. Dort konnte festgestellt werden, dass die Datensätze der signifikant angereicherten Proteine von Rrm4-Gfp und Rrm4^{mRRM1}-Gfp 235 Übereinstimmungen haben. Darunter befanden sich Upa1, Rab5a und Cdc11 wie auch viele bislang nicht charakterisierte Proteine. Die 36 exklusiv in Rrm4-Gfp angereicherten und 235 mit Rrm4^{mRRM1}-Gfp übereinstimmenden Proteine wurden daher weiteren Analysen unterzogen.

3.2.4 Die vielversprechendsten Kandidaten der massenspektrometrischen Analyse

Für die Identifikation neuer Rrm4-abhängiger Komponenten des endosomalen mRNP-Komplexes wurden die ausgewählten Proteine kategorisiert. Dabei wurde versucht, die Funktion des Proteins zu ermitteln. War für einen Kandidaten keine Funktion in *U. maydis* bekannt, so wurde mit Hilfe von Proteindomänenvorhersagen und Homologievergleichen versucht, eine mögliche Funktion zu ermitteln. Zur Vereinfachung wurden die Kandidaten in verschiedene funktionelle Kategorien eingeteilt. Darunter waren neben RNA-assoziierten Proteinen auch ribosomale Proteine, Translationselongationsfaktoren, Motorproteine, DNA-assoziierte Proteine wie RNA-Polymerasen, Histone, mitochondriale Proteine, vakuoläre Proteine, Phosphatasen, endosomal assoziierte Proteine und uncharakterisierte Proteine. Die Anreicherung von ribosomalen Proteinen und Translationselongationsfaktoren ist sehr interessant, da vermutet wird, dass während des Rrm4-vermittelten mRNA-Transports je nach mRNA durchaus Translationsereignisse stattfinden (Zander et al., 2016). So könnte beispielsweise die mRNA des *cdc11* Gens schon während des Transports translatiert und das entstandene Protein als Fracht-Protein weiter transportiert werden (Zander et al., 2016). Mit den vorliegenden Daten lässt sich bislang nur vermuten, dass die angereicherten mitochondrialen Proteine der Rrm4-Proben auf den Endosomen während des mRNA-

Transportes translatiert wurden. Die mRNAs für einige mitochondriale Proteine wurden mit Hilfe von iCLIP-Experimenten als Rrm4-gebundene mRNAs identifiziert (Olgeiser et al., 2019). Ob nun die Translation der mRNA auf frühen Endosomen schon während des Transportes oder erst am Zielort in der Zelle stattfindet, ist Gegenstand aktueller Untersuchungen.

Ob ein Protein Teil des endosomalen mRNP-Komplexes ist oder zumindest endosomal assoziiert ist, kann jedoch nicht einfach durch die potentielle Funktion des Proteins allein festgelegt werden. Da der mRNA-Transport inmitten des Cytoplasmas stattfindet, könnten in der Immunpräzipitation auch viele falsch-positive Kandidaten immunpräzipitiert worden sein. Für die Immunpräzipitation mit den GFP-Trap-Verfahren wurden die Zellen lysiert, wodurch auch Proteine, die eigentlich durch Zellkompartimente getrennt sind, in Kontakt zueinandergelassen sein könnten. Um den Datensatz besser kategorisieren zu können, sollte man zukünftig in Betracht ziehen, die Liste der Proteine mit den Ergebnissen aus publizierten Endosom-Proteomikstudien zu vergleichen. Es wurden bereits Studien zu der Komposition von späten Endosomen in Neuronen aus Mäusen durchgeführt (Debaisieux et al., 2016). Zwar können in der Proteinkomposition von frühen Endosomen durchaus speziesbedingte Unterschiede zwischen *U. maydis* und *Mus musculus* auftreten, jedoch sollten auch einige Proteine in beiden Spezies auf Endosomen vorzufinden sein, wie zum Beispiel das Markerprotein Rab5a. Durch so einen Vergleich könnte man zukünftig endosomale Proteine einfacher identifizieren. Je nach Filterverfahren könnte man so auch die Anzahl möglicher falsch-positiver mRNP-Komplex-Kandidaten senken. Man kann aber auch nicht gänzlich ausschließen, dass ein in *M. musculus* gefundenes endosomales Protein nicht doch noch eine zusätzliche Funktion im Rrm4-abhängigen mRNP-Komplex von *U. maydis* haben könnte.

Um die Erfolgchancen für die Identifizierung von neuen mRNP-Komplex-Komponenten zu maximieren, wurde in dieser Arbeit der Fokus primär auf RNA-assoziierte Proteine gelegt (Tabelle 3). Proteine mit unbekanntem oder nicht RNA-assoziierten Funktionen wurden ebenfalls berücksichtigt (Tabelle 4). Schließlich ist es durchaus möglich, dass bei der Suche nach neuen endosomalen mRNP-Komplex-Komponenten auch neue unbekannte Interaktionsmechanismen gefunden werden könnten. Die RNA-assoziierten Proteine sollten eine erhöhte Wahrscheinlichkeit aufweisen, Teil des endosomalen RNA-Transports zu sein. Eine solche Vorgehensweise könnte unter Umständen zum fälschlichen Ausschluss von Proteinen führen, die Teil des mRNP-Komplexes sind, aber kein RNA-Bindefähigkeit aufweisen, wie zum Beispiel Upa1. Daher wurde zusätzlich eine Suche nach potentiellen PAM2-Motiven durchgeführt. In *U. maydis* interagiert die MLL- Domäne von Pab1 mit der PAM2-Domäne von Upa1 (Pohlmann et al., 2015). Neueste Studien weisen darauf hin, dass Rrm4 drei solcher MLL- Domänen besitzen könnte (Persönliche

Kommunikation Senthil Devan). Es ist bekannt, dass die MLL-E-Domäne von Rrm4 mit der PAM2L-Domäne von Upa1 interagiert (Pohlmann et al., 2015). Jedoch ist es nicht abwegig, dass eine der beiden anderen MLL-E-Domänen von Rrm4 mit einer PAM2-Domäne eines anderen co-immunpräzipitierten Proteins interagieren könnte. Neben der PAM2-Domäne wurde daher auch nach potentiellen PAM2L-Domänen gesucht, wobei hier die publizierten Konsensussequenzen von Upa1 genutzt wurden (Pohlmann et al., 2015). Jedoch wurden keine weiteren PAM2L-Domänen in der Kandidatenliste gefunden.

Es wurden insgesamt fünfzehn Kandidaten aus den 269 untersuchten Proteinen für weitere Studien ausgesucht (Tabelle 3 & 4). Von diesen fünfzehn Kandidaten wurden Clu1 und Ssd1 als erstes ausgewählt. Clu1 wurde bereits als ein mRNA-bindendes Protein unter anderem in *S. cerevisiae* beschrieben (Gao et al., 2014). Dabei bindet es mit Hilfe der TPR-Domäne an die mRNA (Sen & Cox, 2016). Clu1 erweckte vor allem wegen den beschriebenen mitochondrialen Ziel-mRNAs großes Interesse, da auch Rrm4 mitochondriale mRNAs bindet (Sen & Cox, 2016). Deletionsmutanten des *clu1*-Gens in *S. cerevisiae* wiesen abnormale mitochondriale Morphologien auf (Fields et al., 1998). Daher stellte sich die Frage, ob vielleicht Rrm4 gemeinsam mit Clu1 mitochondriale mRNAs transportiert. Bei der Überprüfung der Lokalisation eines Clu1-Gfp-Fusionsproteins konnten in einem Pilotexperiment jedoch keine prozessiven Partikel beobachtet werden. Somit war es fraglich, ob es sich bei Clu1 tatsächlich um eine integrale Komponente des endosomalen mRNP-Komplexes oder möglicherweise um ein Fracht-Protein handelte. Publikationen zu Clu1 deuten auf eine Möglichkeit, in der Clu1 benötigt wird um die Translationsprodukte der von Clu1 gebundenen mRNA durch den mitochondrialen Importer, dem TOM-Komplex, zu befördern (Gao et al., 2014). TOM20 wie auch TOM40 wurden neben einigen anderen mitochondrialen Importern in der Rrm4-Gfp-Immünpräzipitation angereichert vorgefunden. Möglicherweise werden sowohl Clu1 wie auch Teile des TOM-Komplexes durch den Rrm4-abhängigen endosomalen mRNP-Komplex zu den Mitochondrien transportiert.

Ssd1 wurde als zweithöchstes signifikant angereichertes Protein in der Rrm4-Gfp-Immünpräzipitation identifiziert. Bei Rrm4^{mRRM1}-Gfp war es sogar das am stärksten signifikant angereichertste Protein. Es besitzt sowohl eine RNA-bindende RNB-Domäne als auch eine potentielle PAM2-Domäne. Lokalisationsexperimente mit Ssd1-Gfp wiesen ein ähnlich prozessives Bewegungsverhalten wie Rrm4 auf. Somit wurde Ssd1 näheren Untersuchungen unterzogen, welche es als potentiellen endosomalen mRNP-Komplex-Kandidaten bestätigten.

3.2.5 Weitere Optimierungen der massenspektrometrischen Analysen

Auf Basis der gewonnenen Ergebnisse der massenspektrometrischen Analyse könnten für zukünftige ähnliche Vorhaben einige Verbesserungen vorgenommen werden. Zum einen könnte man Rrm4-Gfp-Immunpräzipitationen in einem Ribonuklease (RNase) -freien Verfahren durchführen. Dadurch könnte man idealerweise so viele RNA-Protein-Interaktionen wie möglich während der Immunpräzipitation aufrechterhalten. Wird die RNA durch RNasen degradiert, könnte dies zum Verlust RNA-abhängiger mRNP-Komplex-Komponenten führen. Dadurch bestehe vielleicht die Möglichkeit, mehr RNA-abhängige Proteine des mRNP-Komplexes zu identifizieren. Denkbar wäre ebenfalls einen UV-Kreuzvernetzungsschritt in das Verfahren zu inkorporieren, um sowohl Proteine wie auch RNA aneinander zu vernetzen (Lenz et al., 2007; O'Reilly & Rappsilber, 2018; Sinz, 2018). Dadurch sollten Komplexe stabilisiert werden und so mehr Interaktionspartner isoliert werden (O'Reilly & Rappsilber, 2018; Sinz, 2018). Dabei sollte man beachten, dass eine solche UV-Behandlung auch unerwünschte Nebenwirkungen haben könnte (Sinz, 2018). So könnten durch diese Behandlung Proteinkomplexe zerfallen oder falsch-positive Proteininteraktionen entstehen. Daher ist es fragwürdig, ob die Vorteile einer UV-Behandlung die Nachteile überwiegen.

Eine andere Methode wäre die Behandlung der Rrm4-Gfp-Proben mit RNasen, um einen gegenteiligen Effekt zur RNase-freien Behandlung zu erzielen (Brannan et al., 2016). Werden die Proben vor der Immunpräzipitation mit RNasen inkubiert, so sollte die mRNA degradiert werden, was dazu führen könnte, dass weniger RNA-abhängige Proteine isoliert werden. Dadurch wäre es womöglich leichter, Kernkomponenten des endosomalen mRNP-Komplexes zu identifizieren, die nicht durch die RNA-Bindung, sondern durch Protein-Protein-Interaktionen in dem Komplex verankert sind. Dieses Verfahren wäre ideal, um den Rrm4^{mRRM1}-Gfp-Ansatz zu ersetzen. Infolgedessen könnten die Nachteile dieser mutierten Rrm4-Variante, wie zum Beispiel die potentiell verringerte Proteinstabilität beim Proteinaufschluss, umgangen werden. Somit ließen sich zukünftig die RNase-freien mit den RNase-verdauten Proben vergleichen, um ein genaueres Bild des endosomalen mRNP-Komplexes zu erhalten.

Eine weitere Möglichkeit zur Reduzierung der falsch-positiven Kandidaten wäre, die Proben stringenter zu waschen. Somit könnte man durch mehrfaches Waschen mit einer erhöhten Salzkonzentration die Anzahl der co-immunpräzipitierten Proteine reduzieren. Dadurch sollten in der Theorie nur direkte Interaktionspartner aufgereinigt werden. Da eine Lokalisation im Rrm4-abhängigen endosomalen mRNP-Komplex nicht zwingend eine Protein-Protein-Interaktion mit Rrm4 voraussetzt, würde man durch stringenteres Waschen möglicherweise nicht in der Lage sein, alle Komponenten des mRNP-Komplexes aufzureinigen. Daher sollte man, statt stringenter zu waschen, eher die Ergebnisse

stringenter filtern, indem man den Mindestanreicherungswert, der für eine signifikante Anreicherung notwendig wäre, erhöht. Dabei könnte man sich an den Ergebnissen von Upa1 orientieren, welches einen geringeren Anreicherungswert aufwies, obwohl es direkt mit Rrm4 interagiert. Die Ergebnisse von Upa1 könnten somit als unterer Grenzwert für zukünftige Analysen dienen.

Für die weitere Erforschung des endosomalen mRNP-Komplexes wäre es empfehlenswert, zukünftig auch zeitgleich andere mRNP-Komponenten zu immunpräzipitieren. So sollten die co-immunpräzipitierten Proteine von Upa1- und Upa2-Proben massenspektrometrisch analysiert werden. Pab1 sollte man dagegen auslassen, da es auch an RNA bindet, die nicht im Rrm4-abhängigen mRNP-Komplex transportiert werden. Die Ergebnisse jeder dieser Komponenten sollten sich zu einem gewissen Grad überschneiden. Komponenten des mRNP-Komplexes sollten daher in allen Proben gefunden werden. Durch diese Art der Validierung könnte man möglicherweise neue mRNP-Komplex-Komponenten schneller und mit einer höheren Konfidenz identifizieren.

Mit der in dieser Arbeit angewandten Methode könnte man in Zukunft zusätzlich untersuchen, ob sich die Komposition des Rrm4-abhängigen endosomalen mRNP-Komplexes in Hyphen und Hefezellen unterscheidet. Dafür müsste Rrm4-Gfp sowohl aus Hyphen wie auch Hefezellen co-immunpräzipitiert und massenspektrometrisch analysiert werden. Die Ergebnisse vorangegangener RNAseq-Untersuchungen zeigten, dass die *rrm4*-, *upa1*- und *upa2*-Expression in den Hyphen deutlich gesteigert ist (Dissertation Lilli Olgeiser). Des Weiteren hat eine *rrm4*-Deletion bei Hefezellen keinen Einfluss auf deren Morphologie. Daher wäre es interessant zu klären, inwiefern sich die Proteinzusammensetzung des endosomalen mRNP-Komplexes in den beiden Zellzuständen unterscheidet.

In der massenspektrometrischen Analyse der Rrm4-Gfp-Immunpräzipitation wurden neben Ssd1 viele weitere potentielle Kandidaten identifiziert. Diese sollten mit Hilfe eines jeweiligen Gfp-Fusionsproteins darauf untersucht werden, ob sie auch ein für den endosomalen mRNA-Transport typisches prozessives Bewegungsmuster aufweisen. Dabei wurde sich in dieser Doktorarbeit ausschließlich auf Proteine mit bekannter RNA-Assoziation beschränkt. Zukünftig sollten dennoch auch andere Faktoren näher untersucht werden, da nicht alle Proteine im endosomalen mRNP-Komplex eine mRNA-Bindfunktion aufweisen müssen (Jankowski et al., 2019; Müller et al., 2019). Es sollte daher nach Kandidaten gesucht werden, die potentielle Protein-Protein-Interaktionen vermitteln oder an Lipide binden.

3.3 Charakterisierung der neuen endosomalen mRNP-Komplex-Komponente Ssd1

Ssd1 wurde in den Ergebnissen der massenspektroskopischen Analyse von Rrm4 und Rrm4^{mRRM1} als eines der am stärksten angereichertsten Proteine gefunden. Da dieses Protein eine RNA-bindende RNB-Domäne besitzt und bereits in anderen Pilzen als ein RNA-assoziiertes Protein beschrieben wurde, wurde Ssd1 eingehend untersucht.

3.3.1 Der mRNA-bindende Translationsrepressor Ssd1

Das als SSD1-Homolog betitelte Protein aus *U. maydis* wurde bislang noch nicht beschrieben. In *S. cerevisiae* wurde Ssd1 als ein mRNA-bindendes Protein klassifiziert, welches in der Lage ist, die letalen Effekte einer Deletion der Protein-Phosphatase SIT4 (*suppressor of initiation of transcription 4*) zu inhibieren (Sutton et al., 1991; Uesono et al., 1997). Die Abkürzung Ssd1 steht daher für Suppressor der SIT4-Deletion 1 (*suppressor of SIT4 deletion*) (Sutton et al., 1991). Ssd1 ist ein sehr stark konserviertes pilzliches Protein, was sich in den Ergebnissen Konservierungsanalyse widerspiegelt (Abbildung 14). Die C-terminale Hälfte ab der Aminosäureposition 540 des Ssd1-Proteins aus *U. maydis* war in allen untersuchten Pilzen stark konserviert. In diesem Bereich befinden sich die NLS-Sequenz und die RNB-Domäne, welche als katalytischen Domäne der 3' - 5'-Exoribonuklease klassifiziert wurde (Uesono et al., 1997). Diese Domäne ähnelt der des Exosom-Komplex Proteins Dis3 beziehungsweise Rrp44, die für die RNA-Degradation wichtig ist (Januszyk & Lima, 2010; Ohyama et al., 2010). Die RNB-Domäne von Ssd1 wurde eingehend in *S. cerevisiae* untersucht (Uesono et al., 1997). Mit dieser Domäne ist Ssd1 in der Lage, verschiedene mRNAs zu binden (Ohyama et al., 2010). Im Gegensatz zu einer Ribonuklease wurde bislang nicht beobachtet, dass die RNB-Domäne von Ssd1 mRNA degradiert (Uesono et al., 1997). Es wird vermutet, dass diese Domäne im Laufe der Evolution ihre katalytische Funktion verloren hat (Uesono et al., 1997). Eine aktuelle Studie aus *S. cerevisiae* konnte zeigen, dass die Proteinstruktur von Ssd1 den katalytischen Kern der RNB-Domäne blockiert (Bayne et al., 2020).

Bislang wurde nicht vollständig aufgeklärt, wie genau Ssd1 die mRNA mit der RNB-Domäne bindet und ob es sich dabei um eine zielgerichtete oder unspezifische Interaktion handelt (Wanless et al., 2014). Es wurde beschrieben, dass bei einigen von Ssd1 gebundenen mRNAs die A[G/U]UCAUCCUU-Nukleotidsequenz, welche als SEE (*Ssd1-enriched element*) -Sequenz bekannt ist, in den untranslatierten Regionen (UTR) der mRNA signifikant angereicht gewesen ist (Wanless et al., 2014). Jedoch besitzt der Großteil der mRNAs, die mit Ssd1 assoziieren, diese Nukleotidsequenz nicht (Wanless et al., 2014).

Daher konnte nicht eindeutig bewiesen werden, ob diese Nukleotidsequenz überhaupt für eine Interaktion mit Ssd1 benötigt wird (Wanless et al., 2014). Ssd1 ist in der Lage, in der 5'- und 3'-UTR bestimmter mRNAs zu binden (Wanless et al., 2014). Dabei ist es ebenfalls möglich, dass beide UTRs der mRNA zeitgleich von Ssd1 gebunden werden (Wanless et al., 2014). Neuste Studie zeigen jedoch, dass Ssd1 in *S. cerevisiae* primär an der 5' UTR von für Zellwand-Komponentenkodierenden mRNAs bindet (Bayne et al., 2020). Darüber hinaus wurde sowohl eine CNYUCNYU- als auch eine Hefe-spezifische CCAACU-Bindesequenz beschrieben (Bayne et al., 2020).

Nach derzeitigen Erkenntnissen ist Ssd1 durch das binden an den UTRs in der Lage, die Translation der mRNA zu regulieren (Wanless et al., 2014). Ssd1 in *S. cerevisiae* kontrolliert auf diese Art und Weise die Stabilität, Translation wie auch die Lokalisation der gebundenen mRNAs (Kurischko, Kim, et al., 2011; F. Xu et al., 2020). Es wird auch beschrieben, dass Ssd1 einen großen Einfluss auf viele zelluläre Prozesse wie den Zellzyklus, die Zellalterung, die mRNA-Prozessierung und die Stresstoleranz der Zelle hat (Kurischko, Kim, et al., 2011; F. Xu et al., 2020). Des Weiteren wurde publiziert, dass Ssd1 in *S. cerevisiae* die Toleranz von Aneuploidie wie auch die Vererbung von Mitochondrien beeinflusst (Hose et al., 2020). Beim humanpathogenen Hefepilz *Candida albicans* wurde Ssd1 sogar als Grund für die Resistenz gegen antimikrobielle Peptide identifiziert (Gank et al., 2008).

Eine wichtige regulatorische Funktion von Ssd1 ist die Zellwandbiosynthese (Miles et al., 2019). In *S. cerevisiae* kodieren einige der von Ssd1 gebundenen mRNAs für Proteine, die für die Zellwandsynthese notwendig sind (Miles et al., 2019). Die Abwesenheit einer funktionalen Ssd1-Variante im *S. cerevisiae* Stamm W303-1A wurde als eine der Ursachen der fehlenden Alkoholresistenz dieses Stamms beschrieben (Avrahami-Moyal et al., 2012). Als Grund hierfür wird eine veränderte Komposition der Zellwand vermutet, welche die Zellen anfälliger für Alkohol machen (Avrahami-Moyal et al., 2012). Durch die Regulation der Zellwandintegrität spielt Ssd1 auch eine Rolle in der Thermotoleranz der Hefezelle und hilft bei der Disaggregation des Hitzeschock-Proteins Hsp104 (Mir et al., 2009). Untersuchungen beim filamentösen humanpathogenen Schimmelpilz *Aspergillus fumigatus* ergaben, dass die von Ssd1 regulierte Zellwandzusammensetzung für die Umgehung der Immunantwort des Wirtswichtig ist (Thammahong et al., 2019). Der Einfluss von Ssd1 auf die Biosynthese von Chitin, das polarisierte Wachstum und Biofilmformation ist somit entscheidend für die Virulenz von *A. fumigatus* (Thammahong et al., 2019).

Ssd1 und seine Funktion als translationaler Regulator wird in *S. cerevisiae* durch die NDR-Proteinkinase Cbk1 (*cell wall biosynthesis kinase 1*) reguliert (Jansen et al., 2009). Cbk1 ist ebenfalls ein in Pilzen sehr stark konserviertes Protein (Wanless et al., 2014). Es ist eine essentielle Komponente, welche im RAM-Netzwerk (*regulation of Ace2 and polarized morphogenesis*) involviert ist (Jansen et al., 2009). Dieses Netzwerk steuert viele zelluläre

Prozesse, darunter auch die Zellwandsynthese und das polare Wachstum (Jansen et al., 2009; Kurischko, Kuravi, et al., 2011). Ssd1 wird von Cbk1 posttranslational modifiziert indem bestimmte Bereiche im N-Terminus phosphoryliert werden (Jansen et al., 2009). Diese Phosphorylierung hindert Ssd1 an der Repression der gebundenen mRNA, aber hat keinen Einfluss auf die mRNA-Bindeaffinität (Jansen et al., 2009). Je nachdem, ob Ssd1 phosphoryliert wurde oder nicht, ändert sich so die Funktion und Lokalisation von Ssd1 (Kurischko & Broach, 2017). Es wird angenommen, dass unmodifiziertes Ssd1 im Nukleus die Ziel-mRNA bindet (Kurischko & Broach, 2017). Dabei soll es an die C-terminale Domäne der RNA-Polymerase II binden und dort co-transkriptional die mRNA binden (Kurischko & Broach, 2017). Ssd1 verlässt gemeinsam mit der gebundenen mRNA den Nukleus und verhindert dabei die Translation der mRNA (Kurischko & Broach, 2017). Im Cytoplasma wird dann Ssd1 von Cbk1 phosphoryliert, was eine Aufhebung der mRNA-Translationsrepression bewirkt (Kurischko & Broach, 2017). Zusätzlich wird angenommen, dass Ssd1 im phosphorylierten Zustand mit der gebundenen mRNA transportiert wird (Kurischko & Broach, 2017). Dissoziiert Ssd1 von der gebundenen mRNA, kann es dank seiner NLS wieder in den Nukleus gelangen und die mRNA-Bindung erneut initiieren (Kurischko, Kuravi, et al., 2011). Der Wiedereintritt in den Nukleus ist jedoch nur im dephosphorylierten Zustand von Ssd1 möglich, da sonst die NLS nicht funktional ist (Kurischko, Kuravi, et al., 2011). Wird Ssd1 im Cytoplasma nicht von Cbk1 modifiziert, so fungiert dieses Protein weiterhin als Translationsrepressor für die gebundene mRNA (Kurischko, Kuravi, et al., 2011). Daraufhin assoziiert der Ssd1-mRNA-Komplex in P-bodies, wo es bis auf weiteres translational inaktiv bleibt (Kurischko, Kuravi, et al., 2011). Es wird vermutet, dass dieses Szenario, in dem keine Cbk1-vermittelte Phosphorylierungen vorhanden sind, möglicherweise stressbedingt induziert ist (Kurischko, Kim, et al., 2011). In *S. cerevisiae* konzentrieren sich die Phosphorylierungen vor allem im N-terminalen Bereich des Proteins (Kurischko & Broach, 2017). Dieser Bereich scheint auch wichtig für die Lokalisierung von Ssd1 zu sein. Dort befinden sich die beiden PLD- (*prion like domain*) Domänen, welche unter anderem für die Protein-Protein-Interaktion von Ssd1 mit der RNA-Polymerase II benötigt werden (Kurischko & Broach, 2017). Des Weiteren befindet sich auch die NLS in der N-terminalen Hälfte des Proteins (Kurischko, Kuravi, et al., 2011). So wird möglicherweise das Lokalisationsverhalten von Ssd1 durch die N-terminale Hälfte des Proteins definiert (Kurischko & Broach, 2017). Aus den Proteinvergleichen dieser Arbeit ist jedoch hervorgegangen, dass der N-terminale Bereich von *S. cerevisiae* Ssd1 nicht in *U. maydis* konserviert ist (Abbildung 14 A). Es wurden in der bioinformatischen Analyse keine PLD-Domänen in Ssd1 aus *U. maydis* gefunden. Dieser Unterschied könnte möglicherweise durch die unterschiedlichen mRNP-Komplex Transportsysteme erklärt werden. In *S. cerevisiae* wird die mRNA mit Hilfe des She2p-Komplexes entlang der

Aktinfilamente transportiert (Heym & Niessing, 2012). Ssd1 bindet einige mRNAs, die durch She2p transportiert werden. Daher ist es möglich, dass Ssd1 Teil dieses Komplexes sein könnte. In *U. maydis* dagegen findet der von Rrm4 vermittelte mRNA-Transport auf frühen Endosomen statt, welche entlang der Mikrotubuli transportiert werden. Möglicherweise ist der N-terminale Bereich von Ssd1 je nach mRNA-Transport des Organismus angepasst. Es wurde auch eine potentielle PAM2-Domäne in *U. maydis* Ssd1 gefunden, was ein Argument für diese Hypothese sein könnte. In den Basidiomyceten *C. cinerea* und *C. neoformans var. grubii*, welche Rrm4- und Upa2-Homologe besitzen (Müller et al., 2019), waren bestimmte Regionen des N-terminalen Bereichs ähnlich wie bei *U. maydis* (Abbildung 14 B). Auch besitzen diese beiden Spezies eine potentielle PAM2-Sequenz in deren Ssd1-Variante. Ob diese konservierten Bereiche möglicherweise eine unbekannte N-terminale Domäne markieren, die für eine Rrm4-Assoziation benötigt werden, ist unklar und sollte zukünftig geprüft werden. In *S. macrospora* wurde Ssd1 auch als ein auf frühen Endosomen fahrendes Protein identifiziert (Stein et al., 2020). Dort wird davon ausgegangen, dass der STRIPAK-Signalkomplex die Ssd1-Phosphorylierung reguliert (Stein et al., 2020). Jedoch ist in *S. macrospora* kein Rrm4-Homolog bekannt. Auch bei *M. globosa* ist kein Rrm4-Homolog vorhanden und dort ist der N-Terminus von Ssd1 ebenfalls nicht konserviert. Dies könnte erklären, warum keine N-terminale Übereinstimmung zu dem Ssd1 aus *S. macrospora* und *U. maydis* vorzufinden ist. Möglicherweise ist dieser Bereich nur vorhanden, wenn ein Rrm4-Homolog vorhanden ist. Dies könnte auf eine Rrm4-spezifische Funktion einer unbekannten Domäne im N-terminalen Bereich hindeuten. Tatsächlich wurden in Ssd1 aus *S. macrospora* PLD-Domänen nachgewiesen (Stein et al., 2020). Dennoch konnte in einem Proteinvergleich mit dem NCBI - Protein Blast Programms gezeigt werden, dass der N-terminale Bereich von *S. cerevisiae* Ssd1 nicht in *S. macrospora* Ssd1 konserviert ist. Dies könnte ein weiterer Hinweis darauf sein, dass die N-terminale Region von Ssd1 je nach mRNA-Transportsystem des Organismus angepasst ist.

Da in *U. maydis* der N-terminale Bereich von Ssd1 keine Ähnlichkeit zu dem von *S. cerevisiae* aufwies, stellte sich die Frage, inwiefern Ssd1 von Ukc1 phosphoryliert werden könnte. In den Ergebnissen der massenspektrometrischen Analyse der Rrm4-Gfp-Proben sind keine posttranslationalen Modifikationen bei Ssd1 gefunden worden. Es wurden aber die Aminosäuresequenzen ermittelt, welche für erfolgreiche Erkennung und Phosphorylierung durch Cbk1 benötigt werden. Da Cbk1 so stark konserviert ist, könnte die für Cbk1 publizierte HX(K/R)(K/R)X(S/T)-Aminosäuresequenz auch für Ukc1 zutreffen (Mazanka et al., 2008). Unter Berücksichtigung dieses Aminosäuremotives konnten verteilt im N-terminalen Bereich von Ssd1 aus *U. maydis* acht potentielle Phosphorylierungsstellen

identifiziert werden (Abbildung 21). Diese Vorhersage müsste jedoch zukünftig experimentell überprüft werden.

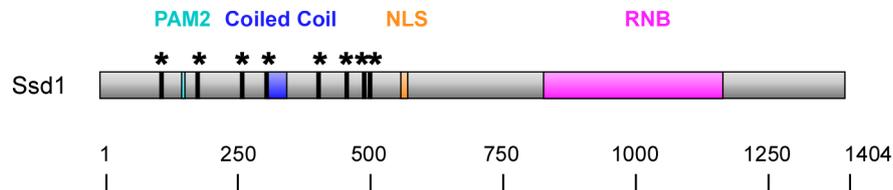


Abbildung 21: Potentielle Ukc1-Phosphorylierungspositionen in Ssd1 aus *U. maydis*.

Schematische Darstellung der Position möglicher Ukc1-Phosphorylierungspositionen innerhalb des Ssd1-Proteins. Hierbei wurden die gefundene Cbk1-Aminosäuresequenz HX(K/R)(K/R)X(S/T), welche möglicherweise auch für Ukc1 gelten könnte, mit schwarzen Sternchen markiert. Die angegebene Skala beschreibt die Aminosäureposition im Protein.

3.3.2 Ssd1 ist ein Rrm4-abhängiger Teil des endosomalen mRNP-Komplexes

Die Untersuchung des Lokalisationsverhaltens von Ssd1-Gfp in *U. maydis* wies ein Rrm4 gleichkommendes Lokalisations- und Bewegungsmuster auf (Abbildung 15). Die Ssd1-Gfp-Signale lokalisierten in distinkten Partikeln, die sich in Hefezellen wie auch in Hyphen in beide Richtungen der Zellen bewegten. Die Anzahl der Ssd1-Gfp-Partikel war ähnlich hoch wie die von Rrm4-Gfp-Partikeln. Auch die Geschwindigkeiten der Partikel waren sehr ähnlich zu denen der Rrm4-Gfp- und Grp1-Gfp-Partikel (Abbildung 16). Somit verhielten sich Ssd1-Gfp-Partikel wie die der beiden Endosom-assoziierten RNA-bindenden Proteine. Dass diese Partikel auch mit Endosomen co-lokalisierten, wurde in den Lokalisationsstudien mit dem Lipidfarbstoff FM4-64 nachgewiesen (Abbildung 17). Etwa 91% der Endosomsignale konnte ein entsprechendes Ssd1-Signal zugeordnet werden. Neben der endosomalen Assoziation wurde auch in Co-Lokalisationsexperimenten nachgewiesen, dass 98% der beobachteten Rrm4-mKate2-Partikel mit Ssd1-Gfp-Partikeln co-lokalisierten (Abbildung 17 D). Somit wurde bewiesen, dass Ssd1 ein Protein ist, dass mit Rrm4 auf den Endosomen transportiert wird. Dabei entspricht das gemessene Ssd1/Rrm4 Co-Lokalisationsverhalten dem bereits publizierten Rrm4/Upa2 Co-Lokalisationsverhalten (Jankowski et al., 2019). Diese Ergebnisse spiegeln die gemessenen Proteinanreicherungen der massenspektrometrischen Analyse von Rrm4 wider. Dort waren Upa2 und Ssd1 die beiden am höchsten angereicherten Proteine (Abbildung 12).

Die Position von Ssd1 innerhalb des endosomalen mRNP-Komplexes wurde durch die durchgeführten Lokalisationsexperimente mit den *upa1*- und *rrm4*-Deletionstämmen untersucht (Abbildung 18). Bei der Deletion des Linkerproteingens *upa1* wurde das Bewegungsverhalten der Ssd1-Gfp-Partikel auf nahezu identische Art und Weise gestört wie das der Rrm4-Gfp-Partikel im *upa1*-Deletionstamm. Die Anzahl der prozessiven Partikel sank enorm, wogegen die Anzahl der sich eingeschränkt bewegenden Partikel signifikant anstieg. Da die prozessive Bewegung von Ssd1 nicht komplett inhibiert wurde, ist anzunehmen, dass Ssd1 genauso wie Rrm4 über einen derzeit unbekanntes anderen Linker an den frühen Endosomen verankert wird (Pohlmann et al., 2015). Darüber hinaus suggerieren die Ergebnisse des *rrm4*-Deletionstamms, dass diese Verankerung von Ssd1 wahrscheinlich durch Rrm4 vermittelt wird. Die Deletion von *rrm4* führte nicht nur zum vollständigen Verlust jeglicher Bewegung von Ssd1-Gfp-Partikeln, sondern auch zum generellen Verlust von Ssd1-Partikelakkumulationen. Ssd1 war somit nur noch als starkes Hintergrundsignal im Cytoplasma der Zelle sichtbar. Ob das cytoplasmatische Ssd1-Signal mit mRNA co-lokalisiert, wurde in dieser Arbeit nicht überprüft. Ssd1 könnte, ähnlich wie Pab1, auch mRNAs binden, die nicht durch den endosomalen mRNP-Komplex transportiert werden. Wiederum wäre es auch möglich, dass die vom endosomalen mRNP-Komplex transportierten mRNAs ohne Rrm4 durch Diffusion und Plasmaströmung in der Zelle verteilt werden. Diese nicht zielgerichtete Form des Transports von Ssd1-gebundenen mRNAs könnte daher auch eine Erklärung für die cytoplasmatische Verteilung von Ssd1 sein. Neben der cytoplasmatischen Verteilung wurde in einigen Zellen ein Ring von verstärktem Ssd1-Signal rund um den Nukleus der Zelle detektiert. Selten wurden dabei auch ein bis zwei Partikel am Rande des Zellkerns beobachtet. Diese Form der Akkumulation könnte ein Zeichen dafür sein, dass Ssd1 in Abwesenheit von Rrm4 nicht an die Endosomen rekrutiert werden kann. Somit war sicher, dass Rrm4 für die endosomale Lokalisation von Ssd1 notwendig ist. Dabei könnte Ssd1 auch in *U. maydis* bereits im Nukleus an die mRNA binden und dann mit dieser ins Cytoplasma exportiert werden. An der Kernhülle könnte dann Ssd1 mit der gebundenen mRNA mit Hilfe von Rrm4 an das Endosom rekrutiert werden. Fehlt jedoch Rrm4, so verbleibt Ssd1 am Rande des Nukleus, was die ringartige Lokalisation an der Kernhülle erklären könnte. Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass Ssd1 ohne mRNA am Nukleus in einer Art Bereitschaftszustand verharrt. Möglicherweise könnte in Zukunft geklärt werden, wie die mRNA an den endosomalen mRNP-Komplex gelangt. So könnte die mRNA mit Hilfe von Ssd1 und einem unbekanntes Mechanismus zu Rrm4 gebracht werden. Ebenfalls möglich wäre jedoch auch, dass Rrm4 bereits mRNA gebunden hat und so Ssd1 zum mRNP-Komplex rekrutiert wird. Andererseits wäre es genauso denkbar, dass Rrm4 und Ssd1 direkt mRNA-unabhängig miteinander interagieren.

Durch die gewonnenen Ergebnisse lassen sich nun Vermutungen anstellen, welche Position Ssd1 im endosomalen mRNP-Komplex einnehmen könnte. Ssd1 ist eine mRNA-bindende Komponente des endosomalen mRNP-Komplexes, die mit Hilfe ihrer RNB-Domäne an die mRNA bindet. Der Transport von Ssd1 in *U. maydis* ist sowohl Endosomen-exklusiv wie auch Rrm4-abhängig. Dabei ist die endosomale Lokalisation von Ssd1 teilweise Upa1-abhängig (Abbildung 18 B, C). Der Verlust von Upa1 beeinträchtigt das prozessive Bewegungsverhalten von Ssd1 und dem gesamten endosomalen mRNP-Komplex-Transport (Pohlmann et al., 2015). Ssd1 ist daher möglicherweise über Rrm4 mit einem weiteren Linkerprotein an das Endosom gebunden. Die extreme Anreicherung von Ssd1 in den massenspektrometrischen Daten und die fast vollständige Co-Lokalisation mit Rrm4 lassen eine Protein-Protein-Interaktion von Ssd1 mit Rrm4 vermuten. Diese könnte durch eine unbekannte Domäne in der N-terminalen Region (NTR) vermittelt werden, wie auch durch eine potentielle PAM2-Sequenz. Jedoch ist nicht auszuschließen, dass eine weitere unbekannte Komponente Ssd1 und Rrm4 verbinden könnte. Des Weiteren besteht die Möglichkeit, dass Ssd1 nur durch die mRNA-Bindung Teil des endosomalen mRNP-Komplexes ist. Es wurde beschrieben, dass Ssd1 an die 5'-UTR, an die 3'-UTR oder an beide UTRs von spezifischen mRNAs binden kann (Wanless et al., 2014). Studien aus *S. cerevisiae* legen jedoch nahe, dass Ssd1 primär an die 5' UTR einiger Zellwand-Komponenten-kodierender mRNAs bindet (Bayne et al., 2020). Das mRNA-Bindeverhalten von Ssd1 in *U. maydis* sollte daher als nächstes untersucht werden. Dabei wäre es wichtig herauszufinden, welche mRNAs in *U. maydis* von Ssd1 gebunden werden und diese mit den von Rrm4 gebundenen mRNAs zu vergleichen. Dafür könnte man die bereits in *U. maydis* etablierte iCLIP-Methode beziehungsweise die Nachfolgemethode iCLIP2 in Betracht ziehen (Buchbender et al., 2020; Olgeiser et al., 2019). So könnte, wie für Rrm4 und Grp1, herausgefunden werden, welche mRNAs gebunden werden und wo genau in der mRNA diese Bindung erfolgt (Olgeiser et al., 2019). Dabei wäre man auch in der Lage, die genaue Nukleotid-Bindesequenz der RNB-Domäne zu ermitteln. Statt der iCLIP-Methode wäre auch die TRIBE-Methode möglich, wobei bei dieser Methode das Bindemotiv nicht ermittelt werden kann (McMahon et al., 2016). Die Ermittlung der gebundenen mRNA würde Aufschluss über die Funktion von Ssd1 geben.

In dem hier postulierten Modell des endosomalen mRNP-Komplexes bindet Ssd1 gemeinsam mit Rrm4 an dieselbe mRNA (Abbildung 22). Ssd1 bindet jedoch an die 5'-UTR der mRNA, wobei es auch in der Lage sein könnte, die 3'-UTR zu binden (Wanless et al., 2014). Ein bislang nicht geklärter Mechanismus einer im N-terminalen Region (NTR) liegenden Domäne von Ssd1 ist angedeutet, welcher womöglich Ssd1 im endosomalen mRNP-Komplex verankert.

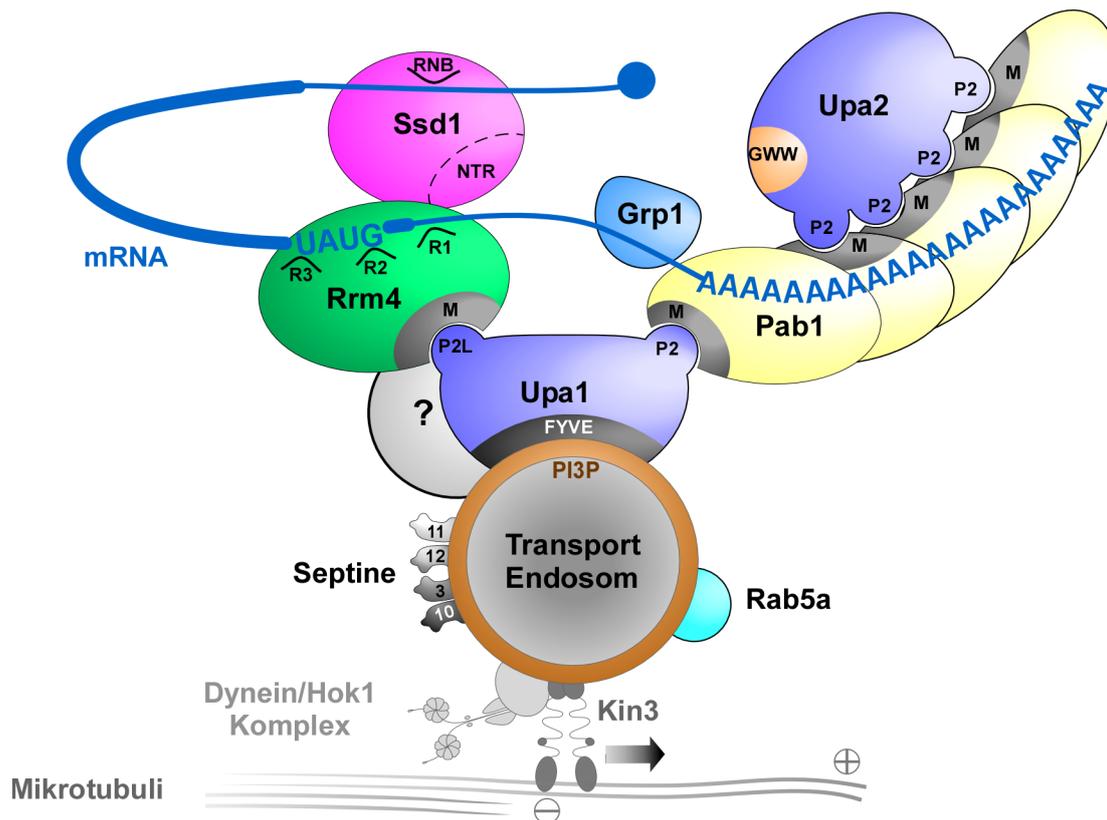


Abbildung 22: Modell des Rrm4-abhängigen endosomal mRNA-Transports mit Ssd1 als neue mRNA-bindende mRNP-Komplex-Komponente.

Darstellung des in dieser Arbeit postulierten erweiterten endosomal mRNA-Transport-Modells. Ssd1 bindet mit Hilfe der RNB-Domäne an die 5'-UTR der transportierten mRNA. Dabei vermittelt möglicherweise eine unbekannte Domäne in der N-terminalen Region (NTR) mit Hilfe eines unbekannten Mechanismus die Lokalisation an das Transport-Endosom. Die transportierte mRNA wird zusätzlich von Grp1 und Pab1 gebunden, wobei Pab1 wiederum von Upa2 gebunden wird. Die Lokalisation von Ssd1 ist Rrm4-abhängig, welches durch Upa1 und einem weiteren nicht bekannten Linkerprotein (?) an das frühe Endosom verankert ist. Das Endosom wird mit Hilfe der Motorproteine Dynein und Kinesin entlang der der Mikrotubuli transportiert. Auf dem Endosom befinden sich zusätzlich auch das endosomale Markerprotein Rab5a sowie die als Frachtproteine transportierten Septine.

Es ist nicht klar ob die Rrm4-vermittelte Lokalisation von Ssd1 an den Endosomen durch eine direkte Protein-Protein-Interaktion mit Rrm4 vermittelt wird oder durch die mRNA, die von Rrm4 transportiert wird. Für eine Protein-Protein-Interaktion würde die sehr hohe Anreicherung im Rrm4^{mRRM1}-Gfp-Datensatz sprechen. Durch die Mutation der ersten RRM-Domäne ist die mRNA-Bindefähigkeit von Rrm4 massiv beeinträchtigt (Becht et al., 2006). Daher sollte bei jedem Rrm4^{mRRM1}-Protein, das bei der massenspektrometrischen Analyse identifiziert worden ist, weniger mRNA und somit weniger mRNA-assoziierte Proteine vorzufinden sein. Somit sollten Kernkomponenten, die durch Protein-Protein-Interaktionen miteinander interagieren, stärker angereichert sein als RNA-abhängige Proteine. Ssd1 war jedoch das am stärksten angereicherte Protein bei den Rrm4^{mRRM1}-Gfp-Proben. Man

sollte jedoch nicht außer Acht lassen, dass Rrm4^{mRRM1} immer noch in der Lage ist, mRNA zu binden und man möglicherweise deswegen eine hohe Ssd1-Anreicherung beobachtet (Becht et al., 2006). Ein weiteres mögliches Indiz könnte die N-terminale Region von Ssd1 sein. Der Vergleich der Ssd1-Homologe wies auf, dass diese Region möglicherweise für die endosomale Lokalisation von Ssd1 verantwortlich sein könnte. Insbesondere die dort vorliegende potentielle PAM2-Domäne könnte für eine Interaktion mit einer der drei MLLE-Domänen von Rrm4 wichtig sein. Jedoch muss zunächst bewiesen werden, dass diese PAM2-Domäne tatsächlich existiert. N-terminal verkürzte Varianten von Ssd1 könnten hierbei Aufschluss geben, ob die N-terminale Region tatsächlich wichtig für die Ssd1-Lokalisation ist. Dabei könnte man herausfinden, ob die potentielle PAM2-Sequenz hierfür wichtig ist oder ob eine andere bislang unbekannte N-terminale Domäne die endosomale Lokalisation vermittelt. Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass die PAM2-Domäne beziehungsweise eine andere N-terminale Domäne möglicherweise mit einem anderen Protein interagiert. Auch wäre es möglich, dass Ssd1 nicht direkt mit Rrm4 interagiert, sondern indirekt über ein anderes unbekanntes Protein. Ob tatsächlich eine Ssd1-Rrm4 Protein-Protein-Interaktion vorliegt, sollte zukünftig mit Hilfe eines Hefe-Zwei-Hybrid-Systems untersucht werden (Brückner et al., 2009). Zusätzlich wäre es interessant herauszufinden, inwiefern die N-terminale Region an den endosomalen mRNP-Komplex von *U. maydis* angepasst ist. Dafür sollte zukünftig eine genauere phylogenetische Analyse nahe verwandter Spezies durchgeführt werden, um den zugrundeliegenden molekularen Mechanismus herauszufinden.

Ssd1 könnte möglicherweise nur durch seine Interaktion mit der mRNA Teil des endosomalen mRNP-Komplexes sein. Daher könnte Ssd1, wie Grp1, eine mRNA-assoziierte akzessorische Komponente des endosomalen mRNP-Komplexes sein (Olgeiser et al., 2019), welche nicht mit anderen Proteinen interagiert. Wie Ssd1 im Rrm4-abhängigen endosomalen mRNP-Komplex integriert ist, sollte daher zukünftig experimentell überprüft werden. Dafür könnte man zunächst überprüfen, ob Ssd1 und Rrm4 weiterhin co-lokalisieren, wenn keine mRNA im endosomalen mRNP-Komplex vorhanden ist. Dies könnte man erreichen, indem alle drei RRM-Domänen von Rrm4 mutiert (Olgeiser et al., 2019). Sollte Ssd1 trotz fehlender mRNA-Bindung an den frühen Endosomen lokalisieren, könnte dies auf eine Protein-Protein-Interaktion hindeuten.

3.3.3 Funktionsanalyse durch Regulation der *ssd1*-Expression

Es konnte gezeigt werden, dass Ssd1 ein Rrm4-abhängiger Teil des endosomalen mRNP-Komplexes ist. Jedoch ist über die Funktion von Ssd1 in *U. maydis* bislang noch nichts bekannt. Daher sollte eine Funktionsanalyse von Ssd1 durchgeführt werden. Zunächst

wurde versucht, einen *ssd1*-Knockout-Stamm herzustellen. Dabei sollte der Einfluss der *ssd1*-Deletion auf die Morphologie und den endosomalen mRNA-Transport überprüft werden. Es war jedoch trotz mehrfachen umfangreichen Versuchen nicht möglich, einen *ssd1*-Knockout-Stamm zu generieren. Dies würde normalerweise auf eine Letalität der *ssd1*-Deletion hinweisen. Jedoch wurde in keinen der anderen pilzlichen Organismen von einer Letalität eines *ssd1*-Knockouts berichtet. Für *S. cerevisiae* wurde beschrieben, dass *ssd1*-Null-Mutanten zwar einige Zellwand-assoziierte Defekte aufweisen, allerdings lebensfähig sind (Ibeas et al., 2001). In *A. fumigatus* war der *ssd1*-Knockout-Stamm ebenfalls lebensfähig (Thammahong et al., 2019). So auch in *N. crassa*, wo der Knockout von *ssd1* (dort als *gul1* betitelt) zu defekten in der Zellwandintegrität führte, was sich auch auf die Viskosität und Morphologie des Myzeliums auswirkte (Lin et al., 2018). Da *Ssd1* einen großen Einfluss auf die Zellwandsynthese hat, könnte möglicherweise das Transformationsprotokoll von *U. maydis* der Grund für das Problem sein. In diesem Standardtransformationsverfahren werden zellwandlose Protoplasten genutzt. Eventuell führt dieser Umstand dazu, dass bei einem Knockout des für die Zellwandsynthese wichtigen Gens die Protoplasten nicht regenerieren können und so durch den osmotischen Stress sterben. Eine andere Erklärung für dieses Phänomen könnten mitochondriale Defekte, ausgelöst durch die *ssd1*-Deletion, sein. In *S. cerevisiae* wurde Hinweise dafür gefunden, dass eine *ssd1*-Deletion zu Defekten in der Verteilung und Vererbung der Mitochondrien führt (Hose et al., 2020). So könnten gravierende mitochondriale Defekte womöglich ein Grund dafür sein, warum bislang kein *ssd1*-Deletionstamm generiert werden konnte. Es sollte zukünftig weiterhin versucht werden, einen *ssd1*-Deletions-Stamm zu generieren, wobei auch andere Transformationsmethoden getestet werden könnten, wie zum Beispiel die Elektroporation der Zellen. Alternativ könnte man mit C-terminal verkürzten *Ssd1*-Varianten arbeiten. Dadurch wäre man womöglich in der Lage, Mutanten herzustellen, in denen durch eine verkürzte RNB-Domäne die mRNA-Bindung von *Ssd1* noch möglich aber nicht mehr effizient ist. In *S. cerevisiae* wurde eine auf diese Art und Weise verkürzte *Ssd1*-Variante beschrieben, welche eine verringerte mRNA-Bindeaffinität aufwies (Avrahami-Moyal et al., 2012). Mit so einer verkürzten *Ssd1*-Variante könnte man die potentielle Letalität des *ssd1*-Knockouts in *U. maydis* vermeiden und den Einfluss einer ineffizienten mRNA-Bindung durch *Ssd1* studieren. Aus zeitlichen Gründen wurde jedoch statt eines *ssd1*-Knockouts, ein Stamm hergestellt, in dem die *ssd1*-Expression durch Arabinose reguliert werden konnte (Abbildung 19).

Mit Hilfe des regulierbaren *Pcrg1*-Promotors konnte so statt eines Knockouts zumindest ein Zustand herbeigeführt werden, bei dem die Zellen dauerhaft die Expression von *ssd1* herunterregulieren. Dafür wurde auch der native Promotor entfernt, indem ein eintausend Nukleotide großer Bereich vor dem *ssd1*-Startcodon durch den *Pcrg1*-Promotor ersetzt

wurde. Die Runterregulation von *ssd1-gfp* war erfolgreich, wobei eine basale Menge an Ssd1-Gfp als cytoplasmatisches Hintergrundsignal vorhanden war (Abbildung 19 B). In sehr seltenen Fällen wurde sogar ein einzelner prozessiv bewegender Ssd1-Gfp-Partikel beobachtet. Die Runterregulation bewirkte, dass die Hyphen im Schnitt zehn Prozent länger waren als bei dem als Kontrolle dienenden Ssd1-Gfp-Reporterstamm. Dieses verlängerte Hyphenwachstum erinnert an den Phänotyp des *grp1*-Knockouts, wobei dort die Zellen durchschnittlich länger waren (Olgeiser et al., 2019). Abgesehen von der Hyphenlänge wurden keine anderen phänotypischen Veränderungen beobachtet. Die Rolle von Ssd1 als Translationsrepressor könnte möglicherweise eine Erklärung für das Ausbleiben eines gravierenderen Phänotyps sein. Wenn Ssd1 nicht vorhanden ist, dann könnte die Translation der Ziel-mRNAs durch Ssd1 nicht mehr supprimiert werden. Daher wäre es annehmbar, dass die Zellen unter den gewählten Standard-Bedingungen keinen dominanten Phänotyp haben, da die Zellen das Fehlen der mRNA-Translationsrepression entweder kompensieren können oder nicht zu sehr darauf angewiesen sind. Unter verschiedenen Stressbedingungen könnte das hyphale Wachstum jedoch stärker beeinflusst sein. Die Publikationen zu Ssd1 legen nahe, dass Ssd1 bei der zellularen Stressantwort involviert ist (Kurischko, Kuravi, et al., 2011). Dies könnte sowohl durch stressbedingte Rekrutierung von Ssd1 in P-bodies wie auch durch direkte Kontrolle der mRNA-Translation bestimmter Proteine der Stressantwort geschehen. Daher sollte zukünftig das hyphale Wachstum unter verschiedenen Stressbedingungen getestet werden, wie zum Beispiel Hitze- oder Kälteschocks. Da angenommen wird, dass Ssd1 für den Zellwandaufbau wichtig ist, sollte vor allem das Verhalten der Zellen, in denen die *ssd1*-Expression herunterreguliert ist, bei Zellwandstress-induzierenden Bedingungen überprüft werden. Tests dieser Art wurden bereits bei der Untersuchung des RNA-bindenden Proteins Grp1 genutzt und könnten für Ssd1 angewandt werden (Olgeiser et al., 2019). Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass die Runterregulation der *ssd1*-Expression nicht ausreichend ist. Trotz der Regulation des *Pcrg1*-Promotors wird immer noch eine geringe Menge *ssd1-gfp* exprimiert. Diese basale Menge an Ssd1 könnte möglicherweise ausreichend sein, um die wichtigsten Ssd1-Funktionen aufrechtzuerhalten und somit gravierende Effekte auf die Zellmorphologie zu verhindern. Daher sollte künftig mit einer *U. maydis* *ssd1*-Deletionmutante weitergearbeitet werden, sofern es überhaupt möglich ist, diese zu generieren.

Durch die Regulation von *ssd1* durch den *Pcrg1*-Promotor war es auch möglich, die Konsequenzen einer potentiellen *ssd1*-Überexpression zu überprüfen (Abbildung 19 C). Bei der Überexpression von *ssd1-gfp* konnte man einen eindeutigen Effekt auf das hyphale Wachstum beobachten. Etwa ein Drittel der Hyphen wiesen einen bipolaren Phänotyp auf. Zwar war ein Drittel der Zellen unipolar gewachsen, aber bei diesen waren die Hyphen

extrem kurz. Zudem konnte bei einem weiteren Drittel der Zellen weder eine Polarität ermittelt werden noch konnten diese als hefeartig wachsende Zellen beschrieben werden. Trotz der verschiedenen Zellmorphologien konnten in allen Zellen prozessiv fahrende Ssd1-Gfp-Partikel beobachtet werden. Daher scheint der endosomale Ssd1-Transport trotz der Überexpression noch intakt. Ein bipolarer Phänotyp ist allerdings ein Indikator für eine Störung des endosomalen Transports in *U. maydis* (Becht et al., 2006; Göhre et al., 2012). Die Deletion eines mRNP-Komplex-Proteins, wie Rrm4, Upa1 und Upa2 oder einer anderen für die Funktion des endosomalen Transports wichtigen Komponente wie die Motorproteine, verursachen diesen Phänotyp (Becht et al., 2006; Göhre et al., 2012; Jankowski et al., 2019; Pohlmann et al., 2015). Auffällig ist jedoch, dass die bipolaren Zellen bei der *ssd1*-Überexpression deutlich kürzer sind als bei den anderen Mutanten des endosomalen Transportes (Olgeiser et al., 2019). Durch das bipolare Wachstum liegt somit die Vermutung nahe, dass eine Überexpression von *ssd1-gfp* die Funktion des endosomalen mRNA-Transports auf eine direkte oder indirekte Art und Weise stört.

Die verkürzten unipolaren und nicht polaren Zellen deuten zusätzlich auf eine integrale Rolle von Ssd1 in der Etablierung und Förderung des polaren Wachstums der Hyphen von *U. maydis* hin. In *C. albicans* und *A. fumigatus* wurden auch von *ssd1*-Überexpression induzierten Wachstumsdefekten berichtet (Lee et al., 2015; Thammahong et al., 2019). Als Grund wurde zwar vermutet, dass die Überexpression von *ssd1* einen negativen Effekt auf die Zellwandsynthese hat, aber der genaue Mechanismus ist bislang noch ungeklärt (Lee et al., 2015; Thammahong et al., 2019).

Womöglich ist eine nicht ausreichende Regulation der erhöhten Ssd1-Proteinmenge zur übermäßigen Repression der für die Zellwandsynthese benötigten mRNAs der Grund für den Überexpressionsphänotyp (Hu et al., 2018). Die translationale Repression der durch Ssd1 gebundenen mRNA wird durch Cbk1 reguliert. Eine Phosphorylierung von Ssd1 durch Cbk1 ermöglicht die Translation der mRNA (Kurischko & Broach, 2017). Möglicherweise ist das *U. maydis* Cbk1-Homolog Ukc1 durch die Überexpression nicht in der Lage, die erhöhte Menge an Ssd1 posttranslational zu modifizieren. Somit würde mangelnde Phosphorylierung die Translation der von Ssd1 gebundenen mRNAs inhibieren (Kurischko & Broach, 2017). Da Ssd1 unter anderem wichtig für die Zellwandsynthese ist (Herold & Yarden, 2017; Wanless et al., 2014), würde dies zu den beobachteten Wachstumsdefekten führen. Die Zellen würden sich dadurch in einem Zustand befinden, in dem die Zellen aufgrund mangelnder Zellwandsynthese nicht oder kaum hyphal auswachsen können. Dies könnte die geringen Hyphenlängen der unipolar auswachsenden Zellen erklären. Des Weiteren könnte diese Hypothese auch Grund für den bipolaren Phänotyp sein, welcher auf eine Störung im endosomalen mRNA-Transport hindeutet. So könnte die mRNA, die von dem nicht phosphorylierten Ssd1 gebunden wurde, gar nicht erst in den endosomalen

mRNP-Komplex gelangen. In den fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen wurde jedoch keine Zunahme an statischen Ssd1-Gfp-Partikeln beobachtet. Ssd1-Gfp bewegte sich unter Überexpressionsbedingungen trotz abnormaler Zellmorphologie vergleichbar prozessiv wie im *ssd1-gfp*-Reporterstamm. Man kann aber nicht ausschließen, dass das unmodifizierte Ssd1-Gfp, welches vielleicht nicht in Partikeln akkumuliert, gegebenenfalls unter den genutzten Bedingungen kaum detektierbar ist. Es ist auch nicht geklärt, ob eine Phosphorylierung von Ssd1 für den mRNA-Transport notwendig ist. Ob nicht modifiziertes Ssd1 dennoch in der Lage wäre, als Teil des endosomalen mRNP-Komplexes transportiert zu werden, ist unklar. Möglicherweise sind die prozessiven Ssd1-Gfp-Signale unter Überexpressionsbedingungen nur eine phosphorylierte Subpopulation von Ssd1-Gfp-Partikeln. Denkbar wäre aber auch, dass der N-Terminus von *U. maydis* Ssd1, der sich so gravierend von dem des *S. cerevisiae* Ssd1 unterscheidet, es dem Protein ermöglicht, ungeachtet des Modifikationszustandes Teil des endosomalen mRNP-Komplexes zu sein. Sollte dies zutreffen, würde das unmodifizierte Ssd1 die mRNA dauerhaft translational inhibieren, was dazu führen würde, dass trotz intaktem Transport eine lokalisierte Proteinexpression nicht möglich wäre. Dies ähnelt somit im übertragenen Sinne einer *rrm4*-Deletion, in der durch das Fehlen des mRNA-Transports die lokalisierte Proteinexpression bestimmter Proteine massiv beeinträchtigt wird (Zander et al., 2016). Dies könnte den bipolaren Phänotyp der *ssd1*-Überexpression erklären. Diese Hypothese der mangelnden Regulation von Ssd1 durch Cbk1 könnte zukünftig experimentell überprüft werden, indem die Phosphorylierungsstellen in Ssd1 mutiert werden.

Es ist hingegen nicht auszuschließen, dass ein anderer bislang nicht bekannter Mechanismus involviert ist und der *ssd1*-Überexpressionsphänotyp nicht nur allein auf eine mangelnde Phosphorylierung zurückzuführen ist. Interessanterweise wurde in *S. cerevisiae* berichtet, dass Ssd1 die mRNA des Cbk1-regulierenden Proteins Lre1 (*Laminarase Resistance 1*) bindet (Miles et al., 2019). Die translationale Inhibierung der *Ire1*-mRNA wurde als Mechanismus zur Regulierung der Zellproliferation beschrieben (Miles et al., 2019). Da Lre1 Cbk1 reguliert, wird Lre1 als übergeordneter Regulator von Ssd1 beschrieben (Mancini Lombardi et al., 2013; Miles et al., 2019). Ssd1 wiederum reguliert die Translation der Lre1-mRNA (Miles et al., 2019). Dies zeigt, dass Ssd1 in Komplexe regulatorische Wirkungsmechanismen involviert ist, welche auch durch die Überexpression von *ssd1* beeinflusst werden könnten.

Wie genau der Phänotyp durch Überexpression von *ssd1* zustande kommt, sollte zukünftig genauestens untersucht werden. Dabei wäre es auch interessant zu untersuchen, ob die *ssd1*-Überexpression einen Einfluss auf den Rrm4-abhängigen endosomalen mRNA-Transport hat.

3.4 Ausblick

Neben der erfolgreichen Identifizierung von Ssd1 als mRNP-Komplex-Komponente lassen sich die gewonnenen Ergebnisse dieser Doktorarbeit als Grundlagen für die weitere Erforschung des endosomalen mRNA-Transports nutzen. Somit könnte mit Hilfe zukünftiger Studien das Verständnis des endosomalen mRNP-Komplex-Transports erweitert und so weitere mRNP-Komplex-Komponenten identifiziert werden. Dabei könnten auch grundlegende universelle Mechanismen des endosomalen mRNA-Transports entdeckt werden, die auf den mRNA-Transport anderer eukaryotischer Lebewesen übertragbar sind.

Um die unspezifische Umgebungsmarkierung durch APEX2 in *U. maydis* anwenden zu können, muss der Import des Markierungssubstrats Biotin-Phenol gewährleistet werden. Die Ergebnisse der Digitonin-Behandlung zeigten zwar, dass es durchaus möglich ist, dies mit Hilfe einer Plasmamembranpermeabilisierung zu erreichen, jedoch hat der Nebeneffekt dieser Behandlung die Markierungsreaktion unkontrollierbar gemacht. Aus diesem Grund sollten zukünftig andere Permeabilisierungsmethoden getestet werden. Das für *S. cerevisiae* publizierte Einfrierverfahren erscheint dabei am vielversprechendsten (Singer-Krüger et al., 2020). In diesem Verfahren wurde Biotin-Phenol erfolgreich in Zellen geschleust, ohne dass stressbedingte ROS-Bildung detektiert wurde (Singer-Krüger et al., 2020). Daher sollte das Einfrierverfahren mit APEX2-exprimierenden *U. maydis* Hefen und Hyphen überprüft werden.

Die massenspektrometrische Analyse der Rrm4-Immunpräzipitation lieferte eine Liste an Proteinen die Kandidaten des mRNP-Komplexes sein könnten. Daher sollten diese Proteine systematisch untersucht werden. Hierbei sollte man sich nicht nur auf die RNA-bindenden Proteine beschränken. Mit Hilfe von Gfp-Fusionsproteinen könnte man überprüfen, ob die jeweiligen Proteine mit Rrm4 co-lokalisieren und sich somit für weitere Untersuchungen eignen. Des Weiteren sollten zusätzliche massenspektrometrische Analysen von Immunpräzipitationen der anderen mRNP-Komplex-Komponenten durchgeführt werden. Auf diese Weise sollten Upa1, Upa2 und Ssd1 untersucht und die Ergebnisse dann mit denen von Rrm4 abgeglichen werden. Somit könnte ein genaueres Bild von der Zusammensetzung endosomalen mRNP-Komplexes erstellt werden. Die durch die massenspektrometrische Analyse identifizierten posttranslationalen Modifikationen von Rrm4 sollten zukünftig auch weiterhin mit Hilfe von Mutationsexperimenten der Modifikationsstellen untersucht werden. Dabei sollte insbesondere näher auf die Unterschiede der posttranslationalen Modifikationen zwischen Rrm4 aus Hefen und Hyphen eingegangen werden.

Im Rahmen dieser Doktorarbeit konnte das Protein Ssd1 als neue Komponente des Rrm4-abhängigen endosomalen mRNP-Komplexes identifiziert werden. Bislang ist noch nicht

geklärt, inwiefern Ssd1 mit den anderen Komponenten des mRNP-Komplexes interagiert. Die gewonnenen Ergebnisse der massenspektrometrischen Analyse und der Co-Lokalisationsstudien zeigten jedoch, dass die endosomale Lokalisation von Ssd1 Rrm4-abhängig ist. Ob Ssd1 nun direkt mit Rrm4 durch eine Protein-Protein-Interaktion interagiert oder die Co-Lokalisation durch das Binden derselben mRNA vermittelt wird, sollte daher als nächstes untersucht werden. Darüber hinaus sollte geklärt werden, wie Ssd1 reguliert wird. Hiefür müsste untersucht werden, inwiefern Ukc1, welches das *U. maydis* Homolog des Ssd1 regulierenden Proteins Cbk1 aus *S. cerevisiae* ist, Ssd1 reguliert. Hierbei könnte man die potentiellen von Ukc1 vermittelten Phosphorylierungsstellen in Ssd1 untersuchen, indem die Ukc1-Erkennungssequenzen mutiert werden. Erkenntnisse über diesen Regulationsmechanismus könnten möglicherweise auch dabei helfen den Ssd1-Überexpressionsphänotyp zu verstehen. Zusätzlich sollte bei der Ssd1-Überexpression untersucht werden, ob der endosomale mRNA-Transport beeinträchtigt wird. Dabei wäre es besonders interessant zu überprüfen ob die Co-Lokalisation von Ssd1 mit Rrm4 weiterhin in dem hohen Maße wie unter den normalen Bedingungen besteht. All diese Untersuchungen sollten es ermöglichen, die genaue Funktion von Ssd1 innerhalb des Rrm4-abhängigen endosomalen Transports zu erforschen und somit zum weiteren Verständnis des endosomalen mRNA-Transportes beitragen.

4. Material und Methoden

4.1 Material und Bezugsquellen

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

Chemikalien

Alle Chemikalien, die in dieser Arbeit verwendet wurden, wurden in *pro analysi* (p.a.) Qualität von folgenden Firmen erworben: Ambion, Amersham, Applichem GmbH, BioRad, Biozym Scientific GmbH, Boehringer, Carl Roth, Difco, Duchefa Biochemicals, Fermentas, Finnzymes, Fisher BioReagents, Fluka Analytical, GE Healthcare, Gerbu, Invitrogen (Life Technologies), Merck, Promega, Riedel-de Haën, Roche, Serva, Sigma-Aldrich, Thermo Fisher Scientific, VWR Chemicals.

Puffer und Lösungen

Sämtliche hier verwendete Standard-Puffer und -Lösungen wurden nach den von Ausubel und Sambrook (Ausubel et al., 1987; Sambrook et al., 1989) beschriebenen Verfahren hergestellt. Die Herstellung von speziellen Puffern und Lösungen werden bei den jeweiligen Methoden beschrieben.

Medien

Die für die Kultivierung der jeweiligen Organismen benötigten Medien wurden nach deren Herstellung sterilisiert. Dafür wurden sie 5 min lang bei 121 °C autoklaviert.

Verwendete Medien für die Kultivierung von *E. coli*:

dYT-Flüssigmedium

(Sambrook et al., 1989)

1,6 % (w/v) Bacto Trypton

1,0 % (w/v) Hefeextrakt

0,5 % (w/v) NaCl

Mit H₂O_{bid.} auffüllen und autoklavieren.

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

YT-Festmedium

(Sambrook et al., 1989)

1,6 % (w/v) Bacto Trypton

1,0 % (w/v) Hefeextrakt

0,5 % (w/v) NaCl

1,5 % (w/v) Agar

Mit H₂O_{bid.} auffüllen und autoklavieren.

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

Verwendete Medien für die Kultivierung von *U. maydis*

Sofern nicht anders vermerkt wurden alle verwendeten Medien vor der Verwendung 5 Minuten lang bei 121 °C autoklaviert. Die Zugabe von 50 % Glukose-Lösung (1 % Endkonzentration) und ggf. Antibiotika erfolgte nach Autoklavieren und Abkühlen (ca. 60 °C) unter sterilen Bedingungen. Für die Regulierung des *Pcrg1* Promotors wurde statt Glukose eine 50 % Arabinose-Lösung (1 % Endkonzentration) verwendet.

CM (Complete Medium) -Medium

(Banuett und Herskowitz, 1989; Holliday, 1974)

0,15 % (w/v) NH₄NO₃
 0,25 % (w/v) Casaminosäuren
 0,05 % (w/v) DNA degradiert
 0,1 % (w/v) Hefeextrakt
 1,0 % (v/v) Vitamin-Lösung
 6,25 % (v/v) Salz-Lösung
 2 % (w/v) Agar (nur für Festmedium)
 mit H₂O_{bid.} auffüllen
 pH-Wert mit NaOH auf 7,0 einstellen

NM (Nitrat-Minimalmedium) -Medium

(Holliday, 1974)

0,3 % (w/v) KNO₃
 6,25 % (v/v) Salz-Lösung
 2 % (w/v) Agar (nur für Festmedium)
 mit H₂O_{bid.} auffüllen
 pH-Wert mit NaOH auf 7,0 einstellen

NSY-Glycerin

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

Regenerationsagar (light)

(Schulz et al., 1990)

Top-Agar:
 18,22 % (w/v) Sorbitol
 1,0 % (w/v) Hefeextrakt
 0,4 % (w/v) Bacto Pepton
 0,4 % (w/v) Saccharose
 1,5 % (w/v) Agar
 Mit H₂O_{bid.} auffüllen und autoklavieren

Bottom-Agar:

Wie Top-Agar mit Antibiotikum

Salz-Lösung

(Holliday, 1974)

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

Spurenelement-Lösung

(Holliday, 1974)

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

Vitamin-Lösung

(Holliday, 1974)

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

Antibiotika

Für die Selektion von *E. coli*:

Antibiotikum	Konzentration
Ampizillin	100 µg/mL
Kanamycin	50 µg/mL

Für die Selektion von *U. maydis*:

Antibiotikum	CM-Festmedium	Regenerationsagar
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

Enzym	Bezugsquelle
Alkalische Phosphatase	Roche
Lysozym	Merck
Novozym	Novo Nordisc
Glucanex	Sigma-Aldrich
Phusion DNA-Polymerase	NEB
Restriktionsendonukleasen	NEB
Ribonuklease A	Boehringer
T4-DNA-Ligase	Roche
Quick Ligase	NEB

Größenstandards

Für die DNA-Gelelektrophorese:

λ PstI: Mit dem Restriktionsenzym PstI geschnittene DNA des Phagen λ (genomische DNA von Thermo Scientific)

Generuler 1 kb DNA Ladder (Fermentas/Thermo Scientific)

Für SDS-PAGE:

Page Ruler (Fermentas/Thermo Scientific)

Kits

Alle in dieser Arbeit verwendeten Kits wurden nach den Vorgaben der Hersteller verwendet.

Name	Verwendungszweck	Hersteller
JETQUICK DNA Clean-Up Kit	Aufreinigung von PCR Produkten und Plasmide	Genomed
JETQUICK Gel Extraction Spin Kit	Gelextraktion von DNA- Fragmenten	Genomed
NucleoSpin Plasmid Kit	Plasmidpräparation aus <i>E. coli</i>	Machery-Nagel
PCR-DIG-Labeling Kit	Herstellung von Digoxigenin markierten DNA-Sonden	Roche
SureClean	Aufreinigung von PCR Produkten	Bioline
TOPO-TA Cloning Kit	Zwischenklonierung von DNA-Fragmenten	Life Technologies

4.1.2 Oligonukleotide

Die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide wurden bei der Firma Metabion GmbH synthetisiert. Alle für die Klonierung von Plasmiden verwendeten Oligonukleotide sind in der nachfolgenden Tabelle aufgelistet.

Tabelle 5: Liste aller in dieser Arbeit verwendeter Oligonukleotide.

Name	Nukleotid Sequenz (5' zu 3')
AB147	CATGCTCTTCCGTGCAATATTGGAACGGCTGGCCTG
AB148	CATGCTCTTCCGGCGTTAGCTTAGGGTCCACTC
AB149	CATGCTCTTCCCCTATGGACCGAGCAGACAATAATC
AB150	CCTGCTCTTCCGACAATATTGACCGAGTGTGGCG
MB261	AATTCATGGGCCCTCCAAAAAGAAGAGAAAGGTGAAACTAGTAT
MB262	CATGATACTAGTTTCGACCTTTCTCTTTTGGAGGGCCCATGG
MB263	GCCAGAGAATTCCCATGGTCGCACGCAAC
MB264	CATGATACTAGTACCGAGAACAGAGCGGTAACC
UM281	ATTGGTCTCCGGCCGTGAGCAGCTCGCGAAAGCTGGC
UM282	ATTGGTCTCGCTGCAATATTGGAATCTGCAATGAGCCGCC
UM283	ATTGGTCTCGCCTGCAATATTGACACTTCGTCTGGTGGCGCG
UM284	ATTGGTCTCCTGGCGCCACTAGCAAACGGATTCACCG
UP616	GCGGCCGCCAATTGAATATTGAGAGAAGCCATATTCGG
UP617	CATAGTGGCCGCGTTGGCCTTCTTGC GACTGGCTTTGCTTTTGCC
UP618	CGATCGCGCCTGAGTGGCCTCAAAAAGTTTCGATCCACGC
UP619	GCCGGCGCGGATCCAATATTCACGATTCGTGATTAGTAGTG

4.1.3 Plasmide

Alle die in dieser Arbeit verwendeten Plasmide werden in den beiden nachfolgenden Tabellen aufgelistet. In Tabelle 6 werden alle Plasmide aufgezählt, welche zu Beginn der Arbeit zur Verfügung standen. Dabei wurden diese entweder als Vorläufer für die Klonierung weiterer Plasmide oder für die Stammherstellung in *U. maydis* genutzt. In Tabelle 7 werden alle Plasmide gelistet, die im Rahmen dieser Arbeit hergestellt wurden. Alle Plasmide werden in der Plasmidsammlung des Instituts für Mikrobiologie an der

Heinrich-Heine-Universität unter Leitung von Prof. Dr. Michael Feldbrügge aufbewahrt und sind für die Mitarbeiter frei zugänglich.

Tabelle 6: Liste der Verwendeten Plasmide.

Plasmid	Besonderheit	Verwendungszweck	Referenz
pUMa321 natR_PcrgI	Lagerplasmid mit einer Nourseothricinresistenzkassette gefolgt von einem durch Arabinose regulierbaren <i>crgI</i> -Promotor.	Vorläufer für pUMa4348	Brachmann et al., 2004
pUMa496 rrm4-gfp_Tnos_natR	Integratives Plasmid für den Austausch des nativen <i>rrm4</i> -Gens in <i>U. maydis</i> mit einem <i>rrm4-gfp</i> -Fusionsgen gefolgt von dem <i>nos</i> -Terminator und einer Nourseothricinresistenzkassette.	Vorläufer für pUMa1874	Becht et al., 2006
pUMa1467 pDest_Bsal	Vektorrückgrad für die Golden-Gate-Klonierung, welches zwei Bsal-Schnittstellen enthält. Das Plasmid besitzt ein <i>lacZ</i> -Gen und eine Ampicillinresistenzkassette für die Selektion der <i>E. coli</i> Transformanten. Dieses Plasmid ist ein Derivat des kommerziell erwerblichen pUC57 Plasmides.	Vorläufer für pUMa3918	Terfrüchte et al., 2013
pUMa1546 Bsal_storage_vector_hygR	Lagerplasmid für die Golden-Gate-Klonierung. Dieses Plasmid besitzt eine von Bsal-Schnittstellen flankierte Hygromycinresistenzkassette.	Vorläufer für pUMa3918	Terfrüchte et al., 2013
pUMa1712 Ptef_gfp-rab5a_Tnos_cbxR	Integratives Plasmid für die Integration eines vom konstitutiven <i>tef</i> -Promotor regulierten <i>rab5a-gfp</i> -Fusionsgen im <i>ip</i> -Lokus von <i>U. maydis</i> . Die Terminierung der Transkription erfolgt durch den <i>nos</i> -Terminator. Die Integration des Plasmides vermittelt durch das Einbringen einer Punktmutation im <i>ip</i> -Gen eine Carboxinresistenz.	Vorläufer für pUMa2882 & pUMa3040	Pohlmann et al., 2015
pUMa1750 rrm4Δ_natR	Integratives Plasmid für den Knockout des <i>rrm4</i> -Gens in <i>U. maydis</i> . Das <i>rrm4</i> -Gen wird durch eine Nourseothricinresistenzkassette ersetzt.	Stammherstellung von UMa3125	-
pUMa1915 upa1Δ_genR	Integratives Plasmid für den Knockout des <i>upa1</i> -Gens in <i>U. maydis</i> . Das <i>upa1</i> -Gen wird durch eine Geneticinresistenzkassette ersetzt.	Stammherstellung von UMa2949	Pohlmann et al., 2015
pUMa2074 pUC57_ampR_SapI_dest	Vektorrückgrad für die Golden-Gate-Klonierung, welches zwei SapI-Schnittstellen enthält. Das Plasmid besitzt ein <i>lacZ</i> -Gen und eine Ampicillinresistenzkassette für die Selektion der <i>E. coli</i> Transformanten. Dieses Plasmid ist ein Derivat des kommerziell erwerblichen pUC57-Plasmides	Vorläufer für pUMa4349	Aschenbroich et al., 2018
pUMa2242 SapI_storage_vector_hygR	Lagerplasmid für die Golden-Gate-Klonierung. Dieses Plasmid besitzt eine von SapI-Schnittstellen flankierte Hygromycinresistenzkassette.	Vorläufer für pUMa4348	-
pUMa2611 gfp-apex2	Lagerplasmid für das Codon-optimierte <i>gfp-apex2</i> -Gen.	Vorläufer für pUMa1874 & pUMa2881	-
pUMa2851 grp1B-gfp_Tnos_natR	Integratives Plasmid für den Austausch des nativen <i>grp1B</i> -Gens in <i>U. maydis</i> mit einem <i>grp1B-gfp</i> -Fusionsgen gefolgt vom <i>nos</i> -Terminator und einer Nourseothricinresistenzkassette.	Vorläufer für pUMa3439	Olgeiser et al., 2019
pUMa2864 pln1-mCherry-3xMyc_Tnos_natR	Integratives Plasmid für den Austausch des nativen <i>pln1</i> -Gens in <i>U. maydis</i> mit einem <i>pln1-mCherry-3xMyc</i> -Fusionsgen gefolgt vom <i>nos</i> -Terminator und einer Nourseothricinresistenzkassette.	Vorläufer für pUMa3040	-
pUMa2985 rrm4Δ_rrm4-mKate2_Tnos_natR	Integratives Plasmid für den Austausch des nativen <i>rrm4</i> -Gens in <i>U. maydis</i> mit einem <i>rrm4-mKate2</i> -Fusionsgen gefolgt von dem <i>nos</i> -Terminator und einer Nourseothricinresistenzkassette.	Stammherstellung von UMa3049	-
pUMa3160 mKate2-TOPO	Lagerplasmid für das <i>mKate2</i> -Gen.	Vorläufer für pUMa3438	-
pUMa3244 myc-mKate2-mago_Tnos_hygR	Integratives Plasmid für den Austausch des nativen <i>mago</i> -Gens in <i>U. maydis</i> mit einem <i>myc-mKate2-mago</i> -Fusionsgen gefolgt von dem <i>nos</i> -Terminator und einer Hygromycinresistenzkassette.	Vorläufer für pUMa3438	-

Tabelle 7: Liste der in dieser Arbeit hergestellten Plasmide.

Plasmid	Besonderheit	Verwendungszweck	Referenz
pUMa1874 rrm4Δ_rrm4-gfp- apex2_Tnos_natR	Integratives Plasmid für den Austausch des nativen <i>rrm4</i> -Gens in <i>U. maydis</i> mit einem <i>rrm4-gfp-apex2</i> -Fusionsgen gefolgt von dem <i>nos</i> -Terminator und einer Nourseothricinresistenzkassette.	Stammherstellung von UMa1711	Diese Arbeit
pUMa2881 nls-gfp-apex2	Lagerplasmid für das <i>nls-gfp-apex2</i> -Gen.	Vorläufer für pUMa2882	Diese Arbeit
pUMa2882 Ptef_nls-gfp- apex2_2xTnos_cbxR	Integratives Plasmid für die Integration eines vom konstitutiven <i>tef</i> -Promotor regulierten <i>nls-gfp-apex2</i> -Fusionsgens im <i>ip</i> -Lokus von <i>U. maydis</i> . Die Terminierung der Transkription erfolgt durch zwei aufeinanderfolgende <i>nos</i> -Terminatoren. Die Integration des Plasmides vermittelt durch das Einbringen einer Punktmutation im <i>ip</i> -Gen eine Carboxinresistenz.	Stammherstellung von UMa1963; Vorläufer für pUMa2883	Diese Arbeit
pUMa2883 Ptef_mts-gfp- apex2_2xTnos_cbxR	Integratives Plasmid für die Integration eines vom konstitutiven <i>tef</i> -Promotor regulierten <i>mts-gfp-apex2</i> -Fusionsgens im <i>ip</i> -Lokus von <i>U. maydis</i> . Die Terminierung der Transkription erfolgt durch zwei aufeinanderfolgende <i>nos</i> -Terminatoren. Die Integration des Plasmides vermittelt durch das Einbringen einer Punktmutation im <i>ip</i> -Gen eine Carboxinresistenz.	Stammherstellung von UMa1964	Diese Arbeit
pUMa3040 Ptef_smtv-mcherry- 3xmyc_2xTnos _cbxR	Integratives Plasmid für die Integration eines vom konstitutiven <i>tef</i> -Promotor regulierten <i>smtv-mcherry-3xmyc</i> -Fusionsgens im <i>ip</i> -Lokus von <i>U. maydis</i> . Die Terminierung der Transkription erfolgt durch zwei aufeinanderfolgende <i>nos</i> -Terminatoren. Die Integration des Plasmides vermittelt durch das Einbringen einer Punktmutation im <i>ip</i> -Gen eine Carboxinresistenz.	Stammherstellung von UMa2016	Diese Arbeit
pUMa3041 pUCIDT- AMP_smtv_1	Ein kommerziell erworbenes Lagerplasmid von der Firma IDT, welches die erste Hälfte des für <i>U. maydis</i> Codon-optimierten <i>smtv</i> -Gens enthält.	Vorläufer Plasmid für pUMa3040	Diese Arbeit
pUMa3042 pUCIDT- AMP_smtv_2	Ein kommerziell erworbenes Lagerplasmid von der Firma IDT, welches die zweite Hälfte des für <i>U. maydis</i> Codon-optimierten <i>smtv</i> -Gens enthält.	Vorläufer Plasmid für pUMa3040	Diese Arbeit
pUMa3438 clu1Δ_clu1-mkate2- HA_Tnos_hygR	Integratives Plasmid für den Austausch des nativen <i>clu1</i> -Gens in <i>U. maydis</i> mit einem <i>clu1-mkate2-HA</i> -Fusionsgen gefolgt von dem <i>nos</i> -Terminator und einer Hygromycinresistenzkassette.	Vorläufer Plasmid für pUMa3439	Diese Arbeit
pUMa3439 clu1Δ_clu1- gfp_Tnos_natR	Integratives Plasmid für den Austausch des nativen <i>clu1</i> -Gens in <i>U. maydis</i> mit einem <i>clu1-gfp</i> -Fusionsgen gefolgt von dem <i>nos</i> -Terminator und einer Nourseothricinresistenzkassette.	Stammherstellung von UMa2118	Diese Arbeit
pUMa3918 ssd1- gfp_Tnos_hygR	Integratives Plasmid für die Generierung eines <i>ssd1-gfp</i> -Fusionsgens im nativen <i>ssd1</i> -Lokus von <i>U. maydis</i> . Hierbei wird das Stopcodon von <i>ssd1</i> durch ein <i>gfp</i> -Gen ersetzt. Die Terminierung der Transkription erfolgt durch den <i>nos</i> -Terminator. Als Selektionsmarker dient die Hygromycinresistenzkassette.	Stammherstellung von UMa2700	Diese Arbeit
pUMa4348 natR_PcrgI	Ein für nachfolgende Klonierungsschritte optimiertes Lagerplasmid mit einer Nourseothricinresistenzkassette gefolgt von einem durch Arabinose regulierbaren <i>crgI</i> -Promotor.	Vorläufer Plasmid für pUMa4349	Diese Arbeit
pUMa4349 natR_PcrgI_ssd1	Integratives Plasmid für die Generierung eines durch Arabinose regulierbaren nativen <i>ssd1</i> -Gens im nativen <i>ssd1</i> -Lokus von <i>U. maydis</i> . Hierbei wird der native <i>ssd1</i> -Promotor (ca. 1000 Nukleotide vor dem Startcodon) entfernt und durch eine Nourseothricinresistenzkassette gefolgt von einem durch Arabinose regulierbaren <i>crgI</i> -Promotor ersetzt.	Stammherstellung von UMa2950	Diese Arbeit

4.1.4 Stämme

Escherichia coli

Der *E. coli* Stamm TOP10 (Invitrogen) wurde für jegliche Standardklonierungen verwendet. Dieser Stamm besitzt folgenden Genotyp: *F-mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80lacZΔM15 ΔlacX74 nupG recA1 araD139 Δ(ara-leu)7697 galE15 galK16 rpsL(StrR) endA1 λ-*.

Ustilago maydis

Die *U. maydis* Stämme, die in dieser Arbeit verwendet wurden, werden in den beiden nachfolgenden Tabellen aufgelistet. Dabei werden in Tabelle 8 alle Stämme gelistet, welche bereits zu Beginn der Arbeit zur Verfügung standen und als Ausgangs- beziehungsweise als Kontrollstämme dienten. In Tabelle 9 sind die in dieser Arbeit hergestellten Stämme aufgezählt. Die Richtigkeit jedes Stamms wurde durch Southern Blot-Analysen verifiziert. Alle *U. maydis* Stämme werden in der -80 °C Stammsammlung des Instituts für Mikrobiologie an der Heinrich-Heine-Universität unter Leitung von Prof. Dr. Michael Feldbrügge aufbewahrt und sind für die Mitarbeiter frei zugänglich.

Tabelle 8: Liste der verwendete *U. maydis* Stämme.

Stamm	relevanter Genotyp	UMa-Nr.	Referenz
AB33	<i>a2 Pnar:bW2 bE1</i>	133	Brachmann et al., 2001
AB33 <i>rrm4Δ</i>	<i>rrm4Δ</i>	273	Becht et al., 2006
AB33 <i>rrm4-gfp</i>	<i>rrm4-gfp</i>	274	Becht et al., 2006
AB33 <i>rrm4^{mRRM1}-gfp</i>	<i>rrm4^{mRRM1}-gfp</i>	311	Becht et al., 2006
AB33 <i>gfp</i>	<i>gfp</i>	487	Koepke et al., 2011
AB33 <i>rrm4-gfp/upa1Δ</i>	<i>rrm4-gfp_upa1Δ</i>	856	T. Pohlmann, unveröffentlicht
AB33 <i>grp1B-gfp</i>	<i>grp1B-gfp</i>	911	T. Pohlmann, unveröffentlicht
AB33 <i>upa1-gfp/rrm4Δ</i>	<i>upa1-gfp_rrm4Δ</i>	1048	Jankowski et al., 2019
AB33 <i>rab5a-gfp/upa1Δ</i>	<i>rab5a-gfp_upa1Δ</i>	1344	T. Pohlmann, unveröffentlicht
AB33 <i>gfp-apex2</i>	<i>gfp-apex2</i>	1710	M. Tulinski, Masterarbeit 2016
AB33 <i>rab5a-gfp/rrm4Δ</i>	<i>rab5a-gfp_rrm4Δ</i>	2371	C. Haag, unveröffentlicht

Tabelle 9: Hergestellte *U. maydis* Stämme.

Stamm	relevanter Genotyp	UMa-Nr.	Ausgangsstamm	Integriertes Plasmid	Lokus
AB33 rrm4-gfp-apex2	<i>rrm4-gfp-apex2_Tnos_natR</i>	1711	AB33	pUMa1874	<i>rrm4</i>
AB33 nls-gfp-apex2	<i>Ptef_nls-gfp-apex2_2xTnos_cbxR</i>	1963	AB33	pUMa2882	<i>ip</i>
AB33 mts-gfp-apex2	<i>Ptef_mts-gfp-apex2_2xTnos_cbxR</i>	1964	AB33	pUMa2883	<i>ip</i>
AB33 smvt-mcherry-3xmyc	<i>Ptef_smvt-mcherry-3xmyc_2xTnos_cbxR</i>	2016	AB33	pUMa3040	<i>ip</i>
AB33 clu1-gfp	<i>clu1-gfp_Tnos_natR</i>	2118	AB33	pUMa3439	<i>clu1</i>
AB33 ssd1-gfp	<i>ssd1-gfp_Tnos_hygR</i>	2700	AB33	pUMa3918	<i>ssd1</i>
AB33 ssd1-gfp/upa1Δ	<i>ssd1-gfp_Tnos_hygR; upa1Δ_g418R</i>	2949	AB33_ssd1-gfp	pUMa1915	<i>upa1</i>
AB33 PcrG1_ssd1-gfp	<i>natR_PcrG1_ssd1-gfp_Tnos_hygR</i>	2950	AB33_ssd1-gfp	pUMa4349	<i>ssd1</i>
AB33 ssd1-gfp/rrm4-mkate2	<i>ssd1-gfp_Tnos_hygR; rrm4-mkate2-HA_Tnos_natR</i>	3049	AB33_ssd1-gfp	pUMa2985	<i>rrm4</i>
AB33 ssd1-gfp/rrm4Δ	<i>ssd1-gfp_Tnos_hygR; rrm4Δ_natR</i>	3125	AB33_ssd1-gfp	pUMa1750	<i>rrm4</i>

4.2 Mikrobiologische, zellbiologische und genetische Methoden

Alle Arbeiten mit Mikroorganismen wurde unter sterilen Bedingungen und unter Einhalten des Gentechnikgesetzes (Sicherstufe 1) durchgeführt. Jegliche mikrobiologischen Abfälle wurden vor der Entsorgung autoklaviert. Die hier aufgeführten Methoden stammen aus der Methodensammlung des Institutes für Mikrobiologie an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf unter der Leitung von Prof. Dr. Michael Feldbrügge.

4.2.1 Arbeiten mit *E. coli*

Kultivierung

Die Anzucht von *E. coli* wurde in dYT-Flüssigmedium und auf YT-Festmedium durchgeführt (Sambrook et al., 1989). Dabei wurden die Zellen unter aeroben Bedingungen bei 37 °C inkubiert. Dabei wurden Flüssigkulturen in Reagenzgläsern angezogen und dabei auf einem Drehrad mit 200 UpM geschüttelt. Zur Aufrechterhaltung des Selektionsdrucks wurde dem Medium je nach Resistenz das entsprechende Antibiotikum hinzugefügt (Abschnitt 4.1.1).

Bestimmung der Zelldichte von Flüssigkulturen

Die Zelldichte einer *E. coli* Flüssigkultur wurde mit Hilfe eines Novospec II Spektralphotometers (Pharmacia Biotech) gemessen. Hierfür wurde die optische Dichte (OD) bei einer Wellenlänge von 600 nm bestimmt. Für die Bestimmung des Blindwerts wurde das YT-Medium genutzt. Für das Erhalten von optimalen Messergebnissen wurde

die Proben soweit verdünnt, so dass die gemessene optische Dichte sich in dem linearen Messbereich zwischen OD_{600} : 0,2 und OD_{600} : 0,5 befand. Eine OD_{600} von 1,0 entspricht etwa 10^9 Zellen.

Herstellung von chemisch kompetenten Zellen

Chemisch kompetente *E. coli* Zellen wurden mit der Rubidiumchlorid-Methode nach Cohen et al. 1972 hergestellt. Hierfür wurden 100 mL dYT-Medium, welches mit 10 mM $MgCl_2$ und 10 mM $MgSO_4$ versetzt wurde, mit 1 mL einer *E. coli* TOP10 Übernachtskultur angeimpft. Diese Kultur wurde angezogen bis sie eine optisch Dichte von 0,5 erreicht hat. Anschließend wurde die Zellen geerntet (3000 UpM für 15 Minuten bei 4 °C). Das Zellpellet wurde danach in 33 mL RF1-Lösung aufgenommen und für 30 bis 60 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen erneut pelletiert (3000 UpM für 15 Minuten bei 4 °C) und dann in 5 mL RF2-Lösung aufgenommen. Die Zellsuspension wurde erneut für 15 Minuten auf Eis inkubiert. Nach Ablauf der Zeit wurden jeweils ein 50 μ L der Suspension in 1,5 mL Reaktionsgefäße aliquotiert. Daraufhin wurden die Reaktionsgefäße mit flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

RF1-Lösung

100 mM RbCl

50 mM $MnCl_2 \cdot 4 H_2O$

30 mM KAc

10 mM $CaCl_2 \cdot 2 H_2O$

15% (v/v) Glycerin in H_2O_{bid} .

Mit Essigsäure auf pH 5,8 einstellen und sterilfiltrieren

RF2-Lösung

10 mM MOPS

10 mM RbCl

75 mM $CaCl_2 \cdot 2 H_2O$

15% (v/v) Glycerin in H_2O_{bid} .

Mit NaOH auf pH 5,8 einstellen und sterilfiltrieren

Transformation von Plasmid-DNA

Für die Transformation von Plasmid-DNA in *E. coli* wurde ein 50 μ L-Aliquot der chemisch kompetenten Zellen für 10 Minuten auf Eis aufgetaut. Es wurden dann 1-10 μ L Plasmid-DNA (ca. 0,5 - 5 ng) zu der Zellsuspension hinzugegeben und erneut für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen einem 45 Sekunden langen Hitzeschock bei 42 °C unterzogen und dann mit 250 μ L dYT-Medium aufgefüllt. Die Zellsuspension wurden dann für 30 Minuten bei 37 °C schüttelnd inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die Zellsuspension auf YT-Festmediumplatten ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C kultiviert.

4.2.2 Arbeiten mit *U. maydis*

Kultivierung

U. maydis Zellen wurden bei 28 °C entweder auf CM-Festmedium oder CM-Flüssigmedium angezogen. Kulturen auf Festmedium wurden für eine Wiederverwendung bis zu vier Wochen bei 4 °C gelagert. Für mikroskopische Analysen wurden jedoch nur Zellen auf Festmedium genutzt die maximal eine Woche alt waren. Für Flüssigkulturen wurden zunächst Vorkulturen mit Zellmaterial von den Festmediumplatten in Reagenzgläsern mit CM-Medium angeimpft und über Nacht bei 28 °C mit 200 UpM rotierend auf einem Drehrad inkubiert. Mit den Vorkulturen wurden am nächsten Tag Hauptkulturen mit je nach Verwendungszweck 20 oder bis zu 100 mL Flüssigmedium in Schikanekolben inokuliert. Für eine optimale Sauerstoffzufuhr wurde darauf geachtet, dass die Menge des Flüssigmediums nicht mehr als ein Fünftel des Volumens des verwendeten Schikanekolbens ausmachte. Die Hauptkulturen wurden über Nacht bei 28 °C mit 200 UpM schüttelnd inkubiert. Am nächsten Tag konnte die Zelldichte der Hauptkultur bestimmt werden und für das jeweilige Experiment prozessiert werden.

Bestimmung der Zelldichte

Zur Bestimmung der Zelldichte einer *U. maydis* Flüssigkultur wurde die optische Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm mit Hilfe des Novospec II Spektralphotometers (Pharmacia Biotech) gemessen. Für den Blindwert wurde das verwendete CM-Medium genutzt. Die Proben wurden für die Messung der optischen Dichte soweit verdünnt, dass die gemessene optische Dichte sich in dem linearen Messbereich zwischen OD₆₀₀: 0,2 und OD₆₀₀: 0,5 befand.

Eine OD₆₀₀ von 1,0 entspricht etwa $2,5 \times 10^7$ Zellen.

Induktion des hyphalen Wachstums

Das hyphale Wachstum des Laborstamms AB33 und allen davon abstammenden Stämmen kann mit Hilfe eines Wechsels der Stickstoffquelle im Medium induziert werden (A. Brachmann et al., 2004). Dies basiert auf die Expression bzw. Repression von den beiden kompatiblen Transkriptionsfaktoruntereinheiten bW2 und bE1, welche durch den Stickstoff-regulierten *Pnar*-Promotor reguliert werden (A. Brachmann et al., 2004). Im CM-Medium wird die Expression durch das Ammonium im Medium reprimiert. Für die Induktion des hyphalen Wachstums musste somit das Medium der Hauptkultur mit dem Nitrat-haltigen NM Flüssigmedium ausgetauscht werden. Hierfür wurde die Hauptkultur nach dem Erreichen einer Ziel-OD₆₀₀ von 0,5 mit 3000 UpM für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Medium wurde in 20 mL NM Medium resuspendiert und erneut mit 3000 UpM für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde erneut verworfen und das

Pellet wurde erneut in 20 mL NM Medium resuspendiert. Die Zellsuspension wurde in neue Schiokanekolben überführt und für sechs Stunden bei 28 °C mit 200 UpM schüttelnd inkubiert. Nach den sechs Stunden wurde das hyphale Wachstum der Kultur unverzüglich mikroskopisch untersucht.

Herstellung von transformations-kompetenten Protoplasten

Für die Herstellung der *U. maydis* Protoplasten wurde ein modifiziertes Protokoll nach (Schulz et al. 1990; Gillissen et al. 1992; Bösch et al., 2016) verwendet. Hierfür wurde wie bereits beschrieben eine 50 mL *U. maydis* Hauptkultur mit einer Ziel-OD₆₀₀ zwischen 0,6 und 1,0 hergestellt. Die Zellen wurden mit 3000 UpM für 5 Minuten zentrifugiert und anschließend der Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde in 20 mL SCS-Puffer aufgenommen. Die Suspension wurde erneut mit 3000 UpM für 5 Minuten zentrifugiert und anschließend in 4 mL Glucanex (Trichoderma Lysing Enzymes; L1412 von Sigma Aldrich; Konzentration: 12,5 mg/mL SCS) resuspendiert und für zehn Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Protoplastierung der Zellen wurde dabei mikroskopisch überprüft und wenn diese bei circa 70 % der Zellen festgestellt wurde, wurde die Suspension mit 10 mL eiskalten SCS-Puffer versetzt. Die Suspension wurde vorsichtig gemischt und dann bei 4 °C mit 2400 UpM für fünf Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und der SCS-Waschschritt wurde noch zwei weitere Male durchgeführt. Das Pellet wurde danach in 10 mL eiskaltem STC-Puffer aufgenommen und erneut bei 4 °C mit 2400 UpM für fünf Minuten zentrifugiert. Anschließend wurde das Zellpellet in 1 mL STC-Puffer resuspendiert. Die Zellsuspension wurde in je 100 µL in vorgekühlte 2 mL Reaktionsgefäße aliquotiert und bis zur Verwendung für mehrere Jahre bei -80 °C gelagert.

SCS-Puffer:

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

STC-Puffer:

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

Transformation von Protoplasten mit Plasmid-DNA

Für die Transformation von *U. maydis* Protoplasten wurde ein 100 µL Protoplasten Aliquot aufgetaut, mit 1 µL Heparinlösung und 2-4 µg Plasmid-DNA auf Eis inkubiert. Nach zehn Minuten wurden der Suspension 500 µL STC/PEG hinzugegeben und für 15 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurde der Transformationsansatz auf Regenerationsagarplatten ausgestrichen und für circa sieben Tage bei 28 °C inkubiert. Die gewachsenen Kolonien wurden dann auf Antibiotika-haltigen CM-Festmediumplatten vereinzelt.

Heparinlösung:
15 mg/mL Heparin
in H₂O_{bid.} sterilfiltriert

STC/PEG
15 mL STC
10 g PEG 4000

4.3 Molekularbiologische Methoden

Die hier aufgeführten molekularbiologischen Standardtechniken wurden modifiziert nach Ausubel und Sambrook (Ausubel et al., 1987; Sambrook et al., 1989) durchgeführt.

4.3.1 Isolierung von Nukleinsäuren

Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Die Plasmid-DNA wurde mit Hilfe des nach Sambrook et al., 1989 modifizierten Protokolls der „kochenden Lyse“ aus *E. coli* isoliert. Hierfür wurde zunächst eine *E. coli* Übernachtskultur bei 37 °C angezogen. Von dieser Kultur wurden 1,5 mL mit 13000 UpM für 2 Minuten zentrifugiert. Das Zellpellet wurde anschließend mit 200 µL STET-Puffer und 20 µL Lysozym-Lösung versetzt und für eine Minute bei 95 °C inkubiert. Die Suspension wurde danach mit 13000 UpM für 15 Minuten zentrifugiert. Anschließend wurden die sich im Pellet befindenden Zelltrümmer der lysierten Zellen mit Hilfe eines sterilen Zahnstochers entfernt. Die Plasmid-DNA wurde aus der zurückgebliebenen Lösung durch die Zugabe von 20 µL 3 M Natriumacetat (pH 5,3) und 500 µL Isopropanol gefällt. Dabei wurde die Lösung mehrfach gut durchmischt und anschließend mit 13000 UpM für 10 Minuten zentrifugiert. Das Plasmid-DNA enthaltende Pellet wurde mit 200 µL 70 % Ethanol gewaschen und dann bei 37 °C für 10 Minuten getrocknet. Zum Schluss wurde das Pellet in 100 µL TE/RNase A-Puffer resuspendiert und bis zur Verwendung bei -20 °C gelagert.

STET-Puffer:
50 mM Tris-HCl, pH 8,0
50 mM NaCl
1 mM Na₂-EDTA
8 % (w/v) Saccharose
5 % (v/v) Triton X-100
in H₂O_{bid.} und autoklavieren

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

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

Präparation von genomischer DNA aus *U. maydis*

Für die Präparation der der genomischen DNA aus *U. maydis* wurde eine nach Bösch et al., 2016 modifizierte Methode verwendet. Hierfür wurde eine *U. maydis* Vorkultur hergestellt, welche abweichend vom Standardprotokoll für zwei Tage schüttelnd bei

Raumtemperatur inkubiert wurde. Von dieser Kultur wurden 2 mL in ein 2 mL Reaktionsgefäß überführt und mittels Zentrifugation bei 13000 UpM für zwei Minuten geerntet. Der Überstand wurde verworfen und dem Zellpellet wurden ungefähr 0,3 g Glasperlen hinzugefügt. Zusätzlich wurden 500 µL des Lysispuffers hinzugegeben welcher 1:1 mit 1x TE Puffer verdünnt wurde. Daraufhin wurde die Probe für 15 Minuten bei 1400 UpM auf einem Vibrax (IKA Werke) geschüttelt. Nach diesem Schritt wurde die Probe für 20 Minuten bei 65 °C erhitzt. Anschließend wurden 100 µL 8 M Kaliumacetat hinzugefügt, um Proteine zu präzipitieren. Der Ansatz wurde dann erneut für 15 Minuten bei 13000 UpM zentrifugiert. Der so gewonnene Überstand wurde in ein neues mit 400 µL Isopropanol versetztes 1,5 mL Reaktionsgefäß überführt, mehrfach invertiert und wieder für 15 Minuten bei 13000 UpM zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet wurde mit 200 µL 70 % Ethanol gewaschen. Nach einer fünfminütigen Zentrifugation bei 13000 UpM wurde der Überstand erneut entfernt und das Pellet für fünf Minuten in einem Heizblock bei 50 °C getrocknet. Das getrocknete DNA Pellet wurde in 50 µL TE/RNase A-Puffer aufgenommen und mit 400 UpM bei 50 °C für 30 Minuten resuspendiert. Die gewonnene genomische DNA wurde bis zur Verwendung bei -20 °C gelagert.

Lysispuffer

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

TE-Puffer1

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

4.3.2 Arbeiten mit Nukleinsäuren

Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentration von Nukleinsäuren wurde mit einem NanoDrop ND-2000c Spectrophotometer (Thermo Scientific) gemessen. Diese wurde durch eine Messung der Absorption bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt. Auch die Reinheit der Probe konnte anhand des Quotienten der gemessenen Werte bei 260 und 280 nm errechnet werden.

Restriktionsendonukleolytische Reaktionen

Sowohl für präparative wie auch für analytische Zwecke wurden Restriktionsenzyme von NEB (New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main, Deutschland) genutzt. Je nach Verwendungszweck wurde die eingesetzte Menge an DNA, Enzymen und das Gesamtvolumen angepasst. Die Inkubationstemperatur richtete sich nach den

Herstellervorgaben für das eingesetzte Enzym. Die Inkubationszeit wurde für den jeweiligen Verwendungszweck angepasst.

	<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 (10x)	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
Inkubationszeit	1-2 h	4-6 h	über Nacht	über Nacht

Ethanol-Salz Präzipitation von DNA

Mit Hilfe der Ethanol-Salz-Fällung konnten Nukleinsäuren aus einer wässrigen Lösung präzipitiert werden. Hierfür wurde ein Zehntel des Volumens der Nukleinsäurelösung an 3 M Natriumacetat (pH 5,3) wie auch das 2,5-fache Volumen an 100 % Ethanol hinzugegeben. Der Ansatz wurde mehrfach invertiert und dann mit 13000 UpM für 15 Minuten zentrifugiert. Das DNA-Pellet wurde mit dem 2,5-fachen Ausgangsvolumen gewaschen und noch einmal mit 13000 UpM für 15 Minuten zentrifugiert. Das Pellet wurde dann in TE/RNase A-Puffer aufgenommen und bei -20 °C gelagert.

Ligation von Nukleinsäurefragmenten

Nukleinsäurefragmente wurden meistens in einem 1:1 Verhältnis mit einer T4-DNA-Ligase von Roche ligiert. Dabei erfolgte die Ligationsreaktion über Nacht bei 16 °C.

Ligationsansatz

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

Golden-Gate-Klonierung

Die Golden-Gate-Klonierung ist eine Klonierungsmethode, bei welcher die Restriktion und Ligation wegen der Eigenschaften besonderer Restriktionsenzyme (BsaI oder SapI, NEB) in einem Reaktionsansatz durchgeführt werden können. Die durch spezielle Oligonukleotide generierten DNA-Fragmente enthalten ebenso wie das Speicher- und Zielplasmid die nötigen Restriktionsschnittstellen. Die Erkennungssequenz des verwendeten Restriktionsenzym wird während der Reaktion entfernt, wodurch variable Enden entstehen. Dadurch können gezielt Klonierungsreaktionen durchgeführt werden, bei

denen die kompatiblen Enden es mit Hilfe von den Speicher- und Zielplasmiden ermöglichen, ein Plasmid in der gewünschten Orientierung zu generieren.

<u>Reaktionsansatz</u>		<u>Thermocycler-Programm</u>	<u>Zyklen</u>
Speicherplasmid	75 ng	37 °C/2 min	50
Zielplasmid	75 ng	16 °C/5 min	50
DNA-Fragmente	40 ng	37 °C/25 min	1
T4-DNA-Ligase	0,75 µL	50 °C/5 min	1
Bsal-HF oder SapI-HF	0,5 µL	80 °C/5 min	1
NEB-Puffer (10x)	1,5 µL	16°C	∞
H ₂ O _{bid.}	ad 15 µL		

4.3.3 Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase Kettenreaktion (PCR) wurde nach einem modifizierten Protokoll von Innis et al. durchgeführt (Innis et al., 1990). Hierbei wurde für die Amplifizierung von DNA-Fragmenten mit der Phusion Polymerase von NEB gearbeitet. Für diverse diagnostische PCRs wurde eine selbst hergestellte Phusion Polymerase verwendet, welche weniger effizient ist als die kommerziell erhältliche Version. Die PCR wurde mit Hilfe des Thermocyclers PTC110 / 200 (MJ Research, St. Bruno, Quebec, Kanada) oder des Labcycler (SensoQuest GmbH, Göttingen, Deutschland) durchgeführt.

<u>Reaktionsansatz</u>		<u>Thermocycler -Programm</u>	
Matrizen-DNA	10-100 ng	Initiale Denaturierung	98 °C/30 s
dNTPs (25 mM)	0,5 µL	Amplifikation (30-34 Zyklen):	
Oligonukleotide (je 100 µM)	0,5 µL	Denaturierung	98 °C/10 s
DMSO	1,5 µL	Hybridisierung	65 °C/20 min
Phusion Polymerase	0,5 µL	Elongation	72 °C/ X s (1 kb/30 s)
Phusion HF Puffer (10x)	5 µL	Endelongation	72 °C/ 8 min
H ₂ O _{bid.}	ad 50 µL		

4.3.4 Auftrennung und Nachweis von Nukleinsäuren

Auftrennung von Nukleinsäuren durch Gelelektrophorese

Durch eine Gelelektrophorese konnten DNA-Fragmente ihrer Größe nach aufgetrennt werden. Hierfür wurde das TAE-Puffersystem genutzt. Agarosegele wurden unter Verwendung des TAE-Puffers hergestellt. Dabei wurde je nach Größe der erwarteten DNA-Fragmente eine Agarosekonzentration zwischen 0,8-2 % gewählt. Das Agarosegelgemisch wurde aufgekocht und auf circa 55 °C abgekühlt, mit Ethidiumbromid (1 µg/ml

Endkonzentration) versetzt und mit Hilfe eines Gelschlittens in Form gegossen. Die Taschen wurden im noch flüssigen Agarosegel durch einen entsprechend großen Kamm abgesteckt. Nach 30 Minuten konnte das Agarosegel verwendet werden. Dafür wurde es in eine Laufkammer gelegt, welche dann mit Laufpuffer aufgefüllt wurde. Die DNA-Proben wurden mit einem Auftragspuffer vermischt und in die jeweiligen Taschen des Agarosegels geladen. Anschließend wurde die Gelelektrophorese gestartet. Die Zeit und Stromspannung der Gelelektrophorese wurden je nach Größe der erwarteten DNA-Fragmente angepasst.

TAE-Laufpuffer (50x)

2 M Tris-Acetat 30 %
100 mM Na₂-EDTA
in H₂O_{bid.}

DNA-Auftragspuffer

30 % (v/v) Glycerin
0,4 % (w/v) Bromphenolblau
ad 20 µL H₂O_{bid.}

Präparation von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Nach einer erfolgreichen Auftrennung durch die Gelelektrophorese war es möglich DNA-Fragmente aus dem Gel herauszuschneiden. Hierfür wurde zunächst die mit Ethidiumbromid gefärbte DNA auf einem UV-Tisch (TCP-20.LM, Vilber Lourmat Deutschland GmbH, Eberhardzell, Deutschland) sichtbar gemacht. Das gewünschte DNA-Fragment konnte anschließend mit einem Skalpell aus dem Gel herausgeschnitten werden. Aus den so gewonnenen Agarosetücken konnte mit Hilfe des JETQUICK Gel Extraction Spin Kits (Genomed) die DNA-Fragmente eluiert werden.

Transfer von DNA auf eine Nylonmembran (Southern-Blot)

Der Transfer von DNA auf eine Nylonmembran wurde mit einem modifizierten Protokoll nach Southern durchgeführt (Southern, 1975). Hierfür wurde zunächst die bereits durch Restriktionsenzyme geschnittene genomische DNA durch eine Gelelektrophorese der Größe nach aufgetrennt. Das Agarosegel wurde danach für je 20 Minuten in 0,25 M HCl, DENAT- und RENAT inkubiert. Diese Schritte führten dazu, dass die DNA-Stränge aufgetrennt wurden. Mit Hilfe eines Kapillar-Blot wurden dann die DNA-Fragmente auf die Nylonmembran transferiert. Der Kapillar-Blot war dabei folgendermaßen aufgebaut: Es wurde eine Glasplatte über einem mit Transferlösung (20x SSC) gefüllten Behälter angebracht. Auf dieser Glasplatte wurde mit Whatman-Papier eine Salzbrücke aufgebaut, bei welcher die beiden Endseiten des Whatman-Papiers in die Transferlösung hineinragten. Auf diese Salzbrücke wurde das Agarosegel platziert. Auf das Agarosegel selbst wurde dann die passend zugeschnittene Nylonmembran (Hybond-N+, GE Healthcare Life Sciences) und zwei ebenso große Whatman-Papiere aufgelegt. Zum Schluss wurde ein Stapel Papiertücher mit einem Gewicht oben aufgelegt. Die Papiertücher sorgten dafür,

dass durch Kapillarkräfte die DNA-Fragmente zusammen mit der Transferlösung auf die Nylonmembran transferiert werden. Der Kapillar-Blot wurde über Nacht durchgeführt. Am nächsten Tag wurde der Blot abgebaut und die DNA-Fragmente mittels UV-Bestrahlung (120 mJ/cm²) in einer UV-Kammer (BLX-254; Vilber Lourmat) an die Membran fixiert.

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

Spezifischer Nachweis von immobilisierter DNA (Southern-Analyse)

Um die DNA-Fragmente auf der Nylonmembran nachzuweisen wurden genspezifische Sonden hergestellt. Diese Sonden wurden während ihrer Herstellung in der PCR mit Digoxigenin-11-dUTP (DIG-dUTP) markiert, was eine indirekte Detektion der DNA durch Chemilumineszenz ermöglicht. Die PCR wurde in einem Thermocycler PTC200 (MJ Research) durchgeführt. Die Nylonmembran mit den fixierten DNA-Fragmenten wurde für den Nachweis zunächst mit 20 mL Southern-Hybridisierungspuffer für 30 Minuten bei 65 °C in einer Hybridisierungsröhre prä-inkubiert. Anschließend wurde die hergestellte DIG-Sonde, welche in 15 mL Southern- Hybridisierungspuffer resuspendiert wurde, bei 99 °C für 10 Minuten aufgeköcht. Der Hybridisierungspuffer wurde dann aus der Hybridisierungsröhre entfernt und die aufgeköchte DIG-Sonde wurde zu der Membran hinzugegeben. Die Membran wurde so über Nacht mit der Sonde bei 65 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Nylonmembran jeweils einmal mit dem Southern-Waschpuffer I, Southern-Waschpuffer II und Southern-Waschpuffer III für je 15 Minuten bei 65 °C gewaschen. Anschließend wurde die Membran mit DIG-Waschpuffer für 5 Minuten bei Raumtemperatur gewaschen. Nach diesem Schritt wurde die Nylonmembran für 30 Minuten mit DIG2-Puffer blockiert. Danach wurde eine in DIG2-Puffer resuspendierte Antikörperlösung (Anti-Digoxigenin-AB Fab-Fragmente, Roche 1:10.000 in DIG2-Puffer) hinzugegeben. Nach einer 30 bis 60 Minuten langen Inkubationszeit wurde die Membran zweimal mit DIG-Waschpuffer gewaschen und dann für fünf Minuten mit DIG3 äquilibriert. Die Membran wurde dann mit der in DIG3 resuspendierten Chemilumineszenzlösung CDP-Star (Roche) (1:100 in DIG3) für fünf Minuten in einer Plastikfolie inkubiert. Abschließend konnten jegliche Chemilumineszenzsignale mit dem Aufnahmesystem ImageQuant LAS 4000 (GE Healthcare Life Sciences) detektiert werden.

Sonden-PCR-Reaktionsansatz

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

20x SSPE

3 M NaCl
200 mM Na ₂ HPO ₄
20 mM Na ₂ -EDTA
in H ₂ O _{bid.} pH- Wert 7,4

Denhardt-Lösung

2 % (v/v) 20BSA Fraktion V (Sigma A-9647)
2 % (v/v) Ficoll
52% (v/v) PVP (Sigma PVP-360)
in H ₂ O _{bid.}

Southern-

Hybridisierungspuffer

26 % (v/v) 20x SSPE
5 % (v/v) Denhardt-Lösung
5 % (v/v) (SDS 10%)
in H ₂ O _{bid.}

Southern-Waschpuffer I

2x 20x SSPE
0,1 % SDS (10 %)
in H ₂ O _{bid.}

Southern-Waschpuffer II

1x 20x SSPE
0,1 % SDS (10 %)
in H ₂ O _{bid.}

Southern-Waschpuffer III

0,1x 20x SSPE
0,1 % SDS (10 %)
in H ₂ O _{bid.}

DIG1

100 mM Maleinsäure
150 mM NaCl
in H ₂ O _{bid.} , pH-Wert 7,5

DIG2

1 % (w/v) Magermilchpulver in DIG1

DIG3

100 mM Tris-HCl
100 mM CaCl
in H ₂ O _{bid.} , pH-Wert 9,5

DIG-Waschpuffer

0,3 % Tweem-20 in DIG1

4.3.5 Sequenzierung

Die Sequenzierung der DNA wurde von der Firma Eurofins Genomics (Eurofins MWG GmbH, Ebersberg, Deutschland) durchgeführt. Die Sequenzierungsergebnisse wurden mit dem Programm CloneManager 9 ausgewertet. Für das Einsenden zum Sequenzieren wurden die Proben im folgenden Ansatz vorbereitet.

Sequenzierungsansatz

aufgereinigte Plasmid-DNA (50-10 ng/µL)	15 µL
Oligonukleotid (10 µM)	2 µL

4.4 Proteinbiochemische Methoden

4.4.1 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Messung der Proteinkonzentration wurde mit einem modifizierten Protokoll nach Bradford durchgeführt (Bradford, 1976). Hierbei wurden 10 μL der zur messenden Proteinlösung mit 200 μL Bradford-Färbelösung (1:5 mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{bid.}}$ verdünnt, Bio-Rad Laboratories, München, Deutschland) vermischt und in eine Mikrotiterplatte pipettiert. Anschließend wurde die Absorption der Lösung bei einer Welllänge von 595 nm mit einem Fluoreszenzspektrometer (Infinite M200, Tecan) bestimmt. Diese Messung wurde mit den Messergebnissen einer Standardreihe (Proben mit jeweils 0, 50, 100, 150 und 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ BSA in $\text{H}_2\text{O}_{\text{bid.}}$) verglichen und so die Proteinkonzentration bestimmt. Waren die Ergebnisse nicht innerhalb des von den Messergebnissen der Standardreihe definierten Eichgeraden so wurde die Probe verdünnt. Von der verdünnten Probe wurde dann wie oben beschrieben erneut die Proteinkonzentration bestimmt.

4.4.2 Präparation von Proteinen aus *U. maydis*

Für die Präparation von Proteinen wurde der Gesamtzellextrakt aus den gewünschten *U. maydis* Zellen isoliert. Hierfür wurden je nach Bedarf eine 20, 50 oder 100 mL *U. maydis* Hauptkultur hergestellt. Für die Isolierung von Gesamtzellextrakt wurde das hyphale Wachstum der Zellen wie oben beschrieben induziert. Die Ziel OD_{600} betrug dabei je nach Expressionsstärke des nachzuweisenden Proteins zwischen 0,5 und 0,8. Die gewünschte *U. maydis* Hauptkultur wurde bei 7500 UpM und 4 °C für 10 Minuten zentrifugiert und der Überstand wurde entfernt. Das Pellet wurde dann in eiskaltem mit Proteaseinhibitoren versetzten Lysispuffer (2 mL pro 50 mL Ausgangsvolumen) resuspendiert. Die Suspension wurde in mit flüssigem Stickstoff vorgekühlte Mahlbecher überführt und schockgefroren. Zu den gefrorenen Pellets wurden zwei ebenso vorgekühlte Mahlkugeln (Durchmesser von 12 mm) hinzugegeben. Der Zellaufschluss wurde dann in einer Schwingmühle (MM400, Retsch, Haan, Deutschland) durchgeführt. Dabei wurden die Mahlbecher zweimal 7,5 Minuten bei 30 Hz geschwungen, wobei zwischen jedem Durchgang die Probe erneut mit flüssigem Stickstoff abgekühlt wurde. Das Zelllysate wurde in vorgekühlte Reaktionsgefäße transferiert und bei 4 °C mit 13000 UpM für 30 Minuten zentrifugiert. Der Zelltrümmer-freie Überstand wurde erneut in vorgekühlte Reaktionsgefäße transferiert und dann entweder sofort weiter prozessiert oder bei -80 °C gelagert.

Lysispuffer

50 mM Tris-HCl pH 7,4
150 mM NaCl
0,5 mM EDTA
0.5% NP40
H₂O

Proteaseinhibitoren

1 mM PMSF
5 mM Benzamidine
2 x Complete Proteaseinhibitoren EDTA frei

4.4.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Das SDS-PAGE-Verfahren wurden nach Laemmli modifiziert (Laemmli, 1970). Dabei wurde der isolierte Proteinextrakt unter denaturierenden Bedingungen bei der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese der Größe nach aufgetrennt. Für die Herstellung eines Sammel- und eines Trenngels wurde das Gel zwischen zwei Glasplatten in Form gegossen. Dabei wurde der Polyacrylamidanteil des Gels je nach erwarteter Proteingröße angepasst. Die Gesamtdicke des Gels betrug 1 mm. Vor dem Auftragen wurden die Proben mit 3x Laemmli-Probenpuffer versetzt und für fünf Minuten bei 95 °C aufgeköcht. Die Gelelektrophorese wurde dann mit einer Mini Protean II Apparatur (Bio-Rad) bei 30 mA pro Gel für eine Stunde durchgeführt.

3x Laemmli-Probenpuffer

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

Trenngel

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

Sammelgel

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

10x SDS-Laufpuffer

25 mM Tris pH8,4
192 mM Glyzin
0,1 % SDS
in H₂O_{bid.}

4.4.4 Western-Blot

Diese Methode wurde modifiziert nach Kyhse-Andersen (Kyhse-Andersen, 1984). Die durch die SDS-PAGE aufgetrennten Proteine wurden durch ein „semi trocken“-Verfahren auf eine Nitrocellulose-Membran (Hybond-ECL, GE Healthcare Sciences) transferiert. Hierfür wurde die Membran vor Beginn des Transfers für zwei Minuten in Anodenpuffer 2 äquilibriert. Anschließend wurde der Blot wie unten dargestellt aufgebaut und der Transfer wurde für 60 Minuten mit 75 mA pro Gel durchgeführt. Die Membran wurde dann für mindestens 30 Minuten schüttelnd mit 3 % Magermilchpulver in TBST blockiert. Danach wurde die Membran mit den für den gewünschten Nachweis spezifischen primären Antikörpern für mindestens zwei Stunden schüttelnd bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Hybridisierung mit dem primären Antikörper wurde die Membran dreimal für zehn Minuten mit TBST gewaschen. Dann erfolgte die Hybridisierung mit dem entsprechenden sekundären Antikörper. Diese Hybridisierung wurde eine Stunde lang schüttelnd bei Raumtemperatur durchgeführt. Hiernach wurde die Membran erneut dreimal zehn Minuten lang mit TBST und einmal fünf Minuten lang mit TBS gewaschen. Die Membran wurde dann in einer Plastikhülle für 1-3 Minuten mit der Chemilumineszenz-Lösung AceGlow (VWR Peqlab) inkubiert. Das Chemilumineszenzsignal wurde dann mit dem ImageQuant LAS 4000 (GE Healthcare Life Sciences) Detektionssystem nachgewiesen.

Schematischer Aufbau des Western-Blots (von oben nach unten)

Kathode

Drei Lagen Whatman-Papier in Kathodenpuffer

SDS-Gel

Nitrocellulose-Membran (Hybond-ECL, GE Healthcare Sciences)

Zwei Lagen Whatman-Papier in Anodenpuffer 2

Eine Lage Whatman-Papier in Anodenpuffer 1

Anode

TBS

20 mM Tris-HCl pH 7,6

136 mM NaCl

in H₂O_{bid.}

TBST

20 mM Tris-HCl pH 7,6

136 mM NaCl

0,05 (v/v) Tween 20

in H₂O_{bid.}

Kathodenpuffer

25 mM Tris-HCl pH 9,4

40 mM ε-Aminocapronsäure

15 % Methanol

in H₂O_{bid.}

Anodenpuffer 2

30 mM Tris-HCl pH 10,4

15 % Methanol

in H₂O_{bid.}

Anodenpuffer 1

300 mM Tris-HCl pH 10,4

15 % Methanol

in H₂O_{bid.}

Primärer Antikörper

α Gfp (Mischung der monoklonalen Antikörper 7.1 und 13.1, Maus IgG11K; Roche) 0,4 μ g/mL in TBST mit 3% Magermilchpulver

α c-Myc (Anti-c-Myc, monoklonaler Antikörper, Klon 9E10, Maus IgG11K; Roche) 0,1 μ g/mL in TBST mit 3% Magermilchpulver

Sekundärer Antikörper

α Maus (Anti-Mouse IgG HRP Konjugat aus der Ziege, Promega) 40 ng/mL in TBST mit 3% Magermilchpulver

4.4.5 Streptavidin Western-Blot

Für einen Nachweis von biotinylierten Proteinen wurde das oben beschriebene Western-Blot Protokoll mit dem nach Hung et al., 2016 publizierten Protokoll modifiziert. Dabei wurden folgende Schritte abgeändert: Statt des 3 % Magermilchpulvers in TBST wurde die Blockierungsreaktion mit 5 % Biotin-freiem BSA in PBST für 1,5 Stunden vollzogen. Anschließend wurde die Membran statt mit primären und sekundären Antikörpern mit einem Streptavidin-HRP-Konjugat (Life Technologies, cat. no. S-911) für 1,5 Stunden bei Raumtemperatur hybridisiert. Danach wurde die Membran dreimal zehn Minuten lang mit PBST und einmal fünf Minuten lang mit PBS gewaschen bevor sie mit der Chemilumineszenz-Lösung inkubiert wurde.

10x PBS

1,37 M NaCl

27 mM Na₂HPO₄

100 mM KCl

20 mM KH₂PO₄

in H₂O_{bid.}

PBST

1x PBS

0,05 (v/v) Tween 20

Streptavidin-HRP-Konjugat

Streptavidin-HRP S911 (Life Technologies, cat. no. S-911) 0,1 μ g/mL in PBST mit 5 % Biotin-freiem BSA

4.4.6 Coomassie-Blau-Färbung

Um Proteine in einem SDS-Gel sichtbar zu machen, wurde das Gel mit der InstantBlue Coomassie Färbelösung (VWR Expedeon) gefärbt. Hierfür wurde das SDS-Gel mit 25 mL der Färbelösung für eine Stunde schüttelnd bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Farblösung entfernt und das gefärbte Gel eingescannt.

4.4.7 Silberfärbung

Die Proteine in einem SDS-Gel konnten auch mit Hilfe einer Silberfärbung sichtbar gemacht werden. Hierbei wurde ein modifiziertes Protokoll nach Blum et al., 1987 verwendet. Zuerst wurde das SDS-Gel für eine Stunde in Fixierlösung inkubiert und dann dreimal je 20 Minuten mit 50 % Ethanol gewaschen. Das SDS-Gel wurde dann für 30 Minuten in einer Vorfärbelösung (40 mg/ml $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) inkubiert. Nach Ablauf der Zeit wurde das Gel dreimal kurz (ca. 20 s) mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{bid}}$ gewaschen und für 30 Minuten in der Silbernitratlösung inkubiert. Das SDS-Gel wurde erneut dreimal kurz (ca. 20 s) mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{bid}}$ gewaschen. Anschließend wurde das SDS-Gel in die Entwicklerlösung gelegt und so lange inkubiert bis die Proteinbanden deutlich erkennbar waren (ca. fünf Minuten). Daraufhin wurde die Reaktion durch Zugabe der Stopplösung abgebrochen und das SDS-Gel in einen Lagerpuffer überführt. Das so gefärbte SDS-Gel wurde schließlich eingescannt.

Fixierlösung

50 % Methanol
12 % Essigsäure (100 %)
0,054 % Formaldehyd (37 %)
ad 50 mL $\text{H}_2\text{O}_{\text{bid}}$.

Entwicklerlösung

3 g Na_2CO_3
0,2 % Formaldehyd (37 %)
0,3 % $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$
ad 50 mL $\text{H}_2\text{O}_{\text{bid}}$.

Lagerpuffer

20 % Glycerin
ad $\text{H}_2\text{O}_{\text{bid}}$.

Silbernitratlösung

2 mg/mL Silbernitrat
0,2 % Formaldehyd (37 %)
ad 50 mL $\text{H}_2\text{O}_{\text{bid}}$.

Stopplösung

75 % Methanol
18 % Essigsäure (100 %)
ad 50 mL $\text{H}_2\text{O}_{\text{bid}}$.

4.4.8 Unspezifische Umgebungsmarkierung durch APEX2

Für die unspezifische Biotinylierung von Proteinen durch APEX2 wurde ein modifiziertes Protokoll nach Hung et al., 2016 genutzt. Hierbei wurden je nach *in vitro*- oder *in vivo*-Ansatz dem Gesamtzellextrakt bzw. den in CM-Flüssigmedium befindenden *U. maydis* Zellen Biotin-Phenol (Iris Biotech GmbH) mit einer finalen Konzentration von 500 μM hinzugegeben. Die Probe wurde 30 Minuten lang schüttelnd bei 28 °C inkubiert. Anschließend wurde Wasserstoffperoxid (finale Konzentration von 1 mM) hinzugegeben, um die Markierungsreaktion zu starten. Die Probe wurde zehn Minuten lang schüttelnd bei 28 °C inkubiert. Bei einem *in vitro*-Ansatz wurde der Zellextrakt bis zur Untersuchung durch einen Streptavidin Western Blot bei -20 °C eingefroren. Bei einem *in vivo*-Experiment dagegen wurden die Zellen zunächst durch Zentrifugation mit 13000 UpM bei 4 °C geerntet. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in Lysispuffer mit Proteaseinhibitoren

aufgenommen. Anschließend wurde der Gesamtzellextrakt wie in Kapitel 4.4.1 beschrieben mit Hilfe von Mahlbechern extrahiert. Der so gewonnene Zellextrakt wurde bis zur Untersuchung durch einen Streptavidin Western-Blot bei -20 °C eingefroren.

Dieses Protokoll wurde für bei der Untersuchung verschiedener Membran-permeabilisierender Chemikalien erneut leicht abgewandelt. Für Digitonin wurde beim 30 Minuten langen Biotin-Phenol Inkubationsschritt zusätzlich Digitonin (finale Konzentration von 40 µM) hinzugegeben. Bei dem Versuch mit Sorbitol wurden die Zellen kurz vor dem Beginn in einer PBS-Sorbitol Lösung (finale Sorbitol Konzentration von 1,2 M) aufgenommen. Zusätzlich wurden bei einem Versuch die Zellen vor dem Versuchsbeginn in destilliertem Wasser statt Flüssigmedium aufgenommen.

4.4.9 Immunpräzipitation von Gfp-Fusionsproteinen

Für die Immunpräzipitation von Rrm4-Gfp, Rrm4^{mRRM1}-Gfp und cytoplasmatischem Gfp wurden magnetische GFP-Trap-Agarosekugeln (Chromotek; GFP-Trap_MA; (Rothbauer et al., 2008)) verwendet. Hierfür wurden zur Vorbereitung 30 µL der GFP-Trap-Agarosekugeln dreimal mit 500 µL eiskaltem Waschpuffer gewaschen. Es wurde der Gesamtzellextrakt aus 100 mL der jeweiligen *U. maydis* Hyphen, wie in Kapitel 4.4.1 beschrieben, mit Hilfe von Mahlbechern isoliert. Der Gesamtzellextrakt wurde in ein 5 mL Reaktionsgefäß überführt und es wurden die GFP-Trap-Agarosekugeln hinzugegeben. Das Zelllysate mit den GFP-Trap-Agarosekugeln wurde eine Stunde lang auf einem Drehrad rotierend bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurden die GFP-Trap-Agarosekugeln magnetisch separiert und der Überstand wurde verworfen. Die GFP-Trap-Agarosekugeln wurden erneut dreimal mit 1 mL eiskaltem Waschpuffer gewaschen und zum Schluss in 22,5 µL HPLC-reinem destilliertem Wasser resuspendiert. Die Probe wurde dann bis zur Verwendung bei -80 °C gelagert. Kurz vor der weiteren Verwendung wurde den Proben jeweils 7,5 µL NuPAGE 4x LDS Probenpuffer (Invitrogen) mit 2,5 % 2-Mercaptoethanol hinzugegeben und sie wurden für zehn Minuten bei 95 °C aufgekocht. Die GFP-Trap-Agarosekugeln wurden magnetisch separiert und der Überstand wurde in neue Reaktionsgefäße überführt. In diesem Zustand konnten die Proben weiter prozessiert werden bzw. für eine massenspektrometrische Analyse ins IMB Mainz verschickt werden.

GFP-Trap-Waschpuffer

10 mM Tris-HCl pH 7,4

150 mM NaCl

0,5 mM EDTA

H₂O

4.4.10 Massenspektrometrische Analyse der Gfp-Immupräzipitationen

Die jeweiligen Rrm4-Gfp-, Rrm4^{mRRM1}-Gfp- und Gfp-Immupräzipitationen wurden vom IMB Mainz durch eine Flüssigchromatographie mit Tandem-Massenspektrometrie-Kopplung (LC-MS/MS) analysiert. Die Rohdaten wurden dort mit dem MaxQuant-Programm ausgewertet. Hierfür wurde die für diese Doktorarbeit erstellte p3_t237631_Ust_maydi_v2GB_MkT_v1.fasta Datei als Referenzdatenbank verwendet. Diese Datenbank enthält die Aminosäuresequenzen aller bekannten Proteine von *U. maydis*. Zusätzlich wurde die UMAG_Gfp.fasta Datei, welche die Aminosäuresequenz der in *U. maydis* exprimierten *egfp*-Variante besitzt, hinzugezogen. Mit Hilfe einer markierungsfreien Quantifikation (LFQ) wurden alle Proteine, die in mindestens zwei der drei analysierten Replikate identifiziert wurden, für die weiteren Analysen genutzt. Von diesen Proteinen wurden Mittelwerte der LFQ-Werte in den jeweiligen Proben ermittelt. Für die vergleichenden Analysen wurden die Differenzen der LFQ-Mittelwerte für jedes Protein bestimmt und als ein log₂-Anreicherungswert dargestellt. Zusätzlich wurden für die Vergleiche die jeweiligen -log₁₀ Signifikanzwerte errechnet.

4.5 Mikroskopie und Bildverarbeitung

4.5.1 Mikroskop-Aufbau und Steuerung

Für mikroskopische Aufnahmen wurde das Weitfeldsystem Zeiss Axio Observer.Z1 System von der Firma Visitron Systems (München, Deutschland) genutzt. In diesem System ist mit einer Orca Flash 4.0-Kamera (Hamamatsu, Japan) ausgestattet. Außerdem verfügt sie über folgende Zeiss Objektivlinsen: 40x Plan-Neofluar (NA 1,3), 63x Plan-Apochromat (NA 1,4), 100x EC Plan-Neofluar (NA 1,3) und 100x a-Plan-Apochromat (NA 1,46). Das Mikroskop wurde mit dem VisiView Programm (Version 3.3.0.4, Visitron Systems, Puchheim, Deutschland) gesteuert.

Des Weiteren wurde auch das Zeiss (Oberkochen, Deutschland) Axio Imager M1 System von Visitron Systems verwendet. Dieses System besitzt eine Spot-Pursuit CCD-Kamera (charge-coupled device; Diagnostic Instruments, Sterling Heights, MI, USA) und die Plan Neofluar Objektivlinsen (40x und 100x, numerische Apertur [NA] 1,3; 63x, NA 1,25). Für die Steuerung dieses Mikroskops wurde das MetaMorph Programm (Version 7, Molecular Devices, Sunnyvale USA) verwendet.

4.5.2 Fluoreszenzmikroskopie

Bei fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen wurde beim Zeiss Axio Imager M1 System mit Hilfe einer HXP Halogen-Metalldampfampe (LEJ, Jena) die Fluoreszenzproteine angeregt. Beim Zeiss Axio Observer.Z1 System wurde dies mit Hilfe eines Lasers mit einer Wellenlänge von 488 nm/100 mW für die Anregung von eGfp und 561 nm/ 150 mW für mCherry/mKate2 bewerkstelligt. Hierbei wurden die folgenden Filter-Sets verwendet: ET 470/40x, ET525/50m, T495_PXR für eGfp, ET560/40x, ET630/75m, T581p für mCherry/mKate2.

4.5.3 Analyse der subzellularen Lokalisation

Für die Analyse der subzellularen Lokalisation von Proteinen in *U. maydis* Hyphen wurden zunächst, wie in Kapitel 4.2.2 beschrieben, sechs Stunden alte Hyphen-Kulturen generiert. Von diesen Hyphen wurden fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von einzelnen Hyphen gemacht und so 22,5 s lange Videos, bestehend aus 150 Einzelbildern, erstellt. Dabei wurden pro biologischem Replikat und Stamm mehrere Hyphen mikroskopiert. Die Videos wurden daraufhin mit dem MetaMorph-Programm zu Kymographen umgewandelt und quantifiziert. Für die Quantifikation wurden insgesamt drei unabhängige biologische Replikate mit den Messergebnissen von jeweils vier Hyphen ausgewertet. Dabei wurde je nach Fragestellung ein 30 μM großer Bereich ausgewählt. Für die Quantifikation der Anzahl und Geschwindigkeit der sich prozessiv bewegenden Partikel wurde ein 30 μM großer Bereich vom Nukleus in Richtung der Wachstumsspitze ausgewählt. In diesem Bereich wurden alle mindestens 5 μM weit fahrenden Partikel ausgezählt und deren Geschwindigkeit bestimmt ($\mu\text{m/s}$). Bei der Quantifizierung des Bewegungsverhaltens aller detektierbaren Partikel hingegen wurde ein 30 μM großer Bereich mit dem Nukleus in der Mitte ausgewählt. Dort wurden alle Signale, die zu Beginn der Aufnahme in diesem Bereich vorkamen, ausgezählt und katalogisiert. Partikel, die sich mindestens 5 μM weit bewegten, wurden als sich prozessiv bewegend eingestuft. Wenn die Partikel kürzere Distanzen zurücklegten und dabei vor allem häufig die Richtung wechselten wurden sie als eingeschränkt fahrende Partikel klassifiziert. Partikel, die keine Bewegung aufwiesen, wurden als statische Partikel deklariert.

4.5.4 Biotin-Fluorescein-Färbung

Um die Aufnahmefähigkeit von Biotin-Derivaten in *U. maydis* Hefen zu testen, wurde eine Biotin-Fluorescein Färbung durchgeführt. Dafür wurde eine *U. maydis* Hauptkultur mit einer

4. Material und Methoden

Ziel OD₆₀₀ von 0,3 bis 0,5 angezogen. 300 µL der Zellen wurden in ein 2 mL Reaktionsgefäß überführt, einmal gewaschen und je nach Versuchsansatz in dem entsprechenden Nährmedium resuspendiert. Anschließend wurde Biotin-5-Fluorescein (Merck) mit einer finalen Konzentration von 5 mM hinzugeben. Die Zellen wurden abgedunkelt für 30 Minuten schüttelnd bei 28 °C in einem Thermoblock inkubiert. Danach wurden die Zellen zwei Mal mit PBS gewaschen, wobei sie mit 8000 UpM für fünf Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert wurden. Zum Schluss wurden die Zellen erneut in PBS resuspendiert, abgedunkelt und schüttelnd bei 28 °C in einem Thermoblock inkubiert. Die Proben wurden dann unverzüglich fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Für die Anregung von Biotin-Fluorescein wurden dieselben Parameter genutzt wie für Gfp.

4.5.5 FM4-64-Färbung

Für die Visualisierung von frühen Endosomen wurden die Zellen mit dem lipophilen Farbstoff FM4-64 (Invitrogen, Darmstadt, Deutschland) gefärbt. Hierfür wurde FM4-64 mit einer finalen Konzentration von 0,8 µM zu 1 mL Zellsuspension gegeben und für 30 s inkubiert (Baumann et al., 2012). Anschließend wurden die Zellen mikroskopiert.

4.5.6 Colokalisationsstudien und deren Auswertung

Die Colokalisationsstudien wurden mit einem Zweikanal-Bildwandler (DV2, Photometrics, Tucson, USA) durchgeführt. Hierbei wurden ein dichroitischer Strahlteiler (dcxr565) und ein spezieller Anregungsfilter für eGfp und mCherry/mKate2 (Gfp/mCherry, Chroma Technology, USA) für die gleichzeitige Anregung und Detektion der jeweiligen Fluoreszenzproteine genutzt.

Die entsprechenden Wellenlängen der Fluoreszenzsignale wurden dabei durch einen zusätzlichen dichroitischen Strahlteiler innerhalb des Bildwandlers aufgeteilt. Die Fluoreszenz-Signale wurden auch durch einen entsprechenden Emissionsfilter (Gfp ET520/40; mCherry ET632/60) gefiltert.

Bei Quantifizierung wurde ein 5 µM breiter Bereich aus den Kymographen der beiden Kanäle ausgewählt und es wurde überprüft, ob die detektierten Signale in beiden Kanälen vorhanden waren. Dabei wurde das schwächere Signal des roten Kanals mit dem stärkeren Signal im grünen Kanal verglichen. Es wurden insgesamt drei unabhängige biologische Replikate mit den Messergebnissen von jeweils vier Hyphen für diese Analyse ausgewertet.

4.5.7 Untersuchung morphologischer Phänotypen

Für eine Analyse von morphologischen Unterschieden von *U. maydis* Hyphen wurden in drei unabhängigen biologische Replikaten über 200 Zellen untersucht. Dabei wurden die Zellen in Kategorien unterteilt. So konnten die Zellen als unipolar, bipolar oder tripolar auswachsend eingestuft werden. Zellen, bei denen kein eindeutiges hyphales Wachstum beobachtet werden konnte und die sich von wildtypischen Hefezellen unterschieden, wurden als unpolare Zellen klassifiziert. Von allen kategorisierten Zellen wurde auch die Zelllänge bestimmt. Bei dieser Messung wurden die leeren Sektionen nicht berücksichtigt.

4.6 Verwendete Computer-Programme und bioinformatische Analysen

Datenbanken und Online-Tools

PEDANT (<http://pedant.helmholtz-muenchen.de/>)

EnsemblFungi: *Ustilago maydis* (https://fungi.ensembl.org/Ustilago_maydis/Info/Index)

NCBI - Protein Blast (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE=Proteins>)

NCBI - Conserved Domains (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>)

SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>)

UniProt (<https://www.uniprot.org/>)

cNLS Mapper (http://nls-mapper.iab.keio.ac.jp/cgi-bin/NLS_Mapper_form.cgi)

Venny 2.1 (<https://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/>)

Codon-Optimierung (<http://dicodon-optimization.appspot.com>)

Literaturrecherche

NCBI - National Centre for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)

Computer-Programme

Clonemanager 9 (Scientific and Educational Software)

Canvas 15 (ACD Systems)

Prism 8 (GraphPad Software Inc.)

Microsoft Office 2016

Mendeley (Elsevier)

MetaMorph (Version 7, Molecular Devices)

5. Literaturverzeichnis

- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., & Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, 215(3), 403–410. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2)
- 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.
- Avrahami-Moyal, L., Braun, S., & Engelberg, D. (2012). Overexpression of PDE2 or SSD1-V in *Saccharomyces cerevisiae* W303-1A strain renders it ethanol-tolerant. *FEMS Yeast Research*, 12(4), 447–455. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2012.00795.x>
- Banuett, F., and Herskowitz, I. (1989). Different alleles of *Ustilago maydis* are necessary for maintenance of filamentous growth but not for meiosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 86, 5878-82.
- Baumann, S., Pohlmann, T., Jungbluth, M., Brachmann, A., & Feldbrügge, M. (2012). Kinesin-3 and dynein mediate microtubule-dependent co-transport of mrnps and endosomes. *Journal of Cell Science*, 125(11), 2740–2752. <https://doi.org/10.1242/jcs.101212>
- Bayne, R. A., Jayachandran, U., Kasprowicz, A., & Bresson, S. (2020). Yeast Ssd1 is a non-enzymatic member of the RNase II family with an alternative RNA recognition interface. *BioRxiv*, 1–30. <https://doi.org/https://doi.org/10.1101/2020.10.22.350314>
- Becht, P., König, J., & Feldbrügge, M. (2006). The RNA-binding protein Rrm4 is essential for polarity in *Ustilago maydis* and shuttles along microtubules. *Journal of Cell Science*, 119(23), 4964–4973. <https://doi.org/10.1242/jcs.03287>
- Becker, J. M., Wilchek, M., & Katchalski, E. (1971). Irreversible inhibition of biotin transport in yeast by biotinyl-p-nitrophenyl ester. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 68(10), 2604–2607. <https://doi.org/10.1073/pnas.68.10.2604>
- Béthune, J., Jansen, R. P., Feldbrügge, M., & Zarnack, K. (2019). Membrane-Associated RNA-Binding Proteins Orchestrate Organelle-Coupled Translation. *Trends in Cell Biology*, 29(2), 178–188. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2018.10.005>
- Blum, H., Beier, H., & Gross, H. J. (1987). Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis*, 8(2), 93–99. <https://doi.org/10.1002/elps.1150080203>
- Bölker, M. (2001). *Ustilago maydis* - A valuable model system for the study of fungal dimorphism and virulence. *Microbiology*, 147(6), 1395–1401. <https://doi.org/10.1099/00221287-147-6-1395>

- Bösch, K., Frantzeskakis, L., Vraneš, M., Kämper, J., Schipper, K., & Göhre, V. (2016). Genetic manipulation of the plant pathogen *Ustilago maydis* to study fungal biology and plant microbe interactions. *Journal of Visualized Experiments*, 2016(115), 1–9. <https://doi.org/10.3791/54522>
- Bottin, A., Kämper, J., & Kahmann, R. (1996). Isolation of a carbon source-regulated gene from *Ustilago maydis*. *Molecular and General Genetics MGG*, 253(3), 342–352. <https://doi.org/10.1007/pl00008601>
- Brachmann, A. (2001). Die frühe Infektionsphase von *Ustilago maydis*: Genregulation durch das bW/bE-Heterodimer. *Dissertation*. Ludwig-Maximilians-Universität München.
- Brachmann, A., König, J., Julius, C., & Feldbrügge, M. (2004). A reverse genetic approach for generating gene replacement mutants in *Ustilago maydis*. *Molecular Genetics and Genomics*, 272(2), 216–226. <https://doi.org/10.1007/s00438-004-1047-z>
- Brachmann, Andreas, Weinzierl, G., Kämper, J., & Kahmann, R. (2001). Identification of genes in the bW/bE regulatory cascade in *Ustilago maydis*. *Molecular Microbiology*, 42(4), 1047–1063. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2001.02699.x>
- Bradford M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72:248-254.
- Brannan, K. W., Jin, W., Huelga, S. C., Banks, C. A. S., Gilmore, J. M., Florens, L., Washburn, M. P., Van Nostrand, E. L., Pratt, G. A., Schwinn, M. K., Daniels, D. L., & Yeo, G. W. (2016). SONAR Discovers RNA-Binding Proteins from Analysis of Large-Scale Protein-Protein Interactomes. *Molecular Cell*, 64(2), 282–293. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2016.09.003>
- Brook, M., McCracken, L., Reddington, J. P., Lu, Z. L., Morrice, N. A., & Gray, N. K. (2012). The multifunctional poly(A)-binding protein (PABP) 1 is subject to extensive dynamic post-translational modification, which molecular modelling suggests plays an important role in co-ordinating its activities. *Biochemical Journal*, 441(3), 803–812. <https://doi.org/10.1042/BJ20111474>
- Brückner, A., Polge, C., Lentze, N., Auerbach, D., & Schlattner, U. (2009). Yeast two-hybrid, a powerful tool for systems biology. *International Journal of Molecular Sciences*, 10(6), 2763–2788. <https://doi.org/10.3390/ijms10062763>
- Buchbender, A., Mutter, H., Sutandy, F. X. R., Körtel, N., Hänel, H., Busch, A., Ebersberger, S., & König, J. (2020). Improved library preparation with the new iCLIP2 protocol. *Methods*, 178(May 2019), 33–48. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2019.10.003>
- Buxbaum, A. R., Haimovich, G., & Singer, R. H. (2015). In the right place at the right time: visualizing and understanding mRNA localization. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 16(2), 95–109. <https://doi.org/10.1038/nrm3918>

- Calderón-Celis, F., Encinar, J. R., & Sanz-Medel, A. (2018). Standardization approaches in absolute quantitative proteomics with mass spectrometry. *Mass Spectrometry Reviews*, 37(6), 715–737. <https://doi.org/10.1002/mas.21542>
- Carpenter, E. P., Beis, K., Cameron, A. D., & Iwata, S. (2008). Overcoming the challenges of membrane protein crystallography. *Current Opinion in Structural Biology*, 18(5), 581–586. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2008.07.001>
- 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., & Holt, C. E. (2019). Late Endosomes Act as mRNA Translation Platforms and Sustain Mitochondria in Axons. *Cell*, 176(1–2), 56–72.e15. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.11.030>
- Cohen, S. N., Chang, A. C., and Hsu, L. (1972). Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 69, 2110–4.
- Connelly, K. E., Hedrick, V., Paschoal Sobreira, T. J., Dykhuizen, E. C., & Aryal, U. K. (2018). Analysis of Human Nuclear Protein Complexes by Quantitative Mass Spectrometry Profiling. *PROTEOMICS*, 18(11), 1700427. <https://doi.org/10.1002/pmic.201700427>
- Cosson, P., Perrin, J., & Bonifacino, J. S. (2013). Anchors aweigh: Protein localization and transport mediated by transmembrane domains. *Trends in Cell Biology*, 23(10), 511–517. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2013.05.005>
- Debaisieux, S., Encheva, V., Chakravarty, P., Snijders, A. P., & Schiavo, G. (2016). Analysis of signaling endosome composition and dynamics using silac in embryonic stem cell-derived neurons. *Molecular and Cellular Proteomics*, 15(2), 542–557. <https://doi.org/10.1074/mcp.M115.051649>
- Dickey, T. H., Altschuler, S. E., & Wuttke, D. S. (2013). Single-Stranded DNA-Binding Proteins: Multiple Domains for Multiple Functions. *Structure*, 21(7), 1074–1084. <https://doi.org/10.1016/j.str.2013.05.013>
- Dilworth, M. V., Piel, M. S., Bettaney, K. E., Ma, P., Luo, J., Sharples, D., Poyner, D. R., Gross, S. R., Moncoq, K., Henderson, P. J. F., Miroux, B., & Bill, R. M. (2018). Microbial expression systems for membrane proteins. *Methods*, 147(January), 3–39. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2018.04.009>
- Drazic, A., Myklebust, L. M., Ree, R., & Arnesen, T. (2016). The world of protein acetylation. *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics*, 1864(10), 1372–1401. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2016.06.007>
- Eliscovich, C., Buxbaum, A. R., Katz, Z. B., & Singer, R. H. (2013). mRNA on the Move: The Road to Its Biological Destiny. *Journal of Biological Chemistry*, 288(28), 20361–20368. <https://doi.org/10.1074/jbc.R113.452094>

- Fedorova, S. A., & Dorogova, N. V. (2020). Protein trap: a new Swiss army knife for geneticists? *Molecular Biology Reports*, 47(2), 1445–1458. <https://doi.org/10.1007/s11033-019-05181-z>
- Feldbrügge, M., Kellner, R., & Schipper, K. (2013). The biotechnological use and potential of plant pathogenic smut fungi. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97(8), 3253–3265. <https://doi.org/10.1007/s00253-013-4777-1>
- Fernández-Álvarez, A., Marín-Menguiano, M., Lanver, D., Jiménez-Martín, A., Elías-Villalobos, A., Pérez-Pulido, A. J., Kahmann, R., & Ibeas, J. I. (2012). Identification of O-mannosylated virulence factors in *Ustilago maydis*. *PLoS Pathogens*, 8(3). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002563>
- Fields, S. D., Conrad, M. N., & Clarke, M. (1998). The *S. cerevisiae* CLU1 and *D. discoideum* cluA genes are functional homologues that influence mitochondrial morphology and distribution. *Journal of Cell Science*, 111(12), 1717–1727.
- Fischer-Parton, S., Parton, R. M., Hickey, P. C., Dijksterhuis, J., Atkinson, H. A., & Read, N. D. (2000). Confocal microscopy of FM4-64 as a tool for analysing endocytosis and vesicle trafficking in living fungal hyphae. *Journal of Microscopy*, 198(3), 246–259. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2818.2000.00708.x>
- Forrest, K. M., & Gavis, E. R. (2003). Live Imaging of Endogenous RNA Reveals a Diffusion and Entrapment Mechanism for nanos mRNA Localization in *Drosophila*. *Current Biology*, 13(14), 1159–1168. [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(03\)00451-2](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(03)00451-2)
- Frenkel, N., Makky, A., Sudji, I. R., Wink, M., & Tanaka, M. (2014). Mechanistic investigation of interactions between steroidal saponin digitonin and cell membrane models. *Journal of Physical Chemistry B*, 118(50), 14632–14639. <https://doi.org/10.1021/jp5074939>
- Ganapathy, U. S., Bai, L., Wei, L., Eckart, K. A., Lett, C. M., Previti, M. L., Carrico, I. S., & Seeliger, J. C. (2018). Compartment-Specific Labeling of Bacterial Periplasmic Proteins by Peroxidase-Mediated Biotinylation. *ACS Infectious Diseases*, 4(6), 918–925. <https://doi.org/10.1021/acsinfecdis.8b00044>
- Gank, K. D., Yeaman, M. R., Kojima, S., Yount, N. Y., Park, H., Edwards, J. E., Filler, S. G., & Fu, Y. (2008). SSD1 is integral to host defense peptide resistance in *Candida albicans*. *Eukaryotic Cell*, 7(8), 1318–1327. <https://doi.org/10.1128/EC.00402-07>
- Gao, J., Schatton, D., Martinelli, P., Hansen, H., Pla-Martin, D., Barth, E., Becker, C., Altmueller, J., Frommolt, P., Sardiello, M., & Rugarli, E. I. (2014). CLUH regulates mitochondrial biogenesis by binding mRNAs of nuclear-encoded mitochondrial proteins. *Journal of Cell Biology*, 207(2), 213–223. <https://doi.org/10.1083/jcb.201403129>

- Gasser, B., Saloheimo, M., Rinas, U., Dragosits, M., Rodríguez-Carmona, E., Baumann, K., Giuliani, M., Parrilli, E., Branduardi, P., Lang, C., Porro, D., Ferrer, P., Tutino, M., Mattanovich, D., & Villaverde, A. (2008). Protein folding and conformational stress in microbial cells producing recombinant proteins: A host comparative overview. *Microbial Cell Factories*, 7, 1–18. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-7-11>
- 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.
- Göhre, V., Vollmeister, E., Bölker, M., & Feldbrügge, M. (2012). Microtubule-dependent membrane dynamics in *Ustilago maydis*: Trafficking and function of Rab5a-positive endosomes. *Communicative and Integrative Biology*, 5(5), 485–490. <https://doi.org/10.4161/cib.21219>
- Han, S., Zhao, B. S., Myers, S. A., Carr, S. A., He, C., & Ting, A. Y. (2020). RNA-protein interaction mapping via MS2- or Cas13-based APEX targeting. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 117(36), 22068–22079. <https://doi.org/10.1073/pnas.2006617117>
- Hanurry, E. Y., Mekonnen, T. W., Andrgie, A. T., Darge, H. F., Birhan, Y. S., Hsu, W.-H., Chou, H.-Y., Cheng, C.-C., Lai, J.-Y., & Tsai, H.-C. (2020). Biotin-Decorated PAMAM G4.5 Dendrimer Nanoparticles to Enhance the Delivery, Anti-Proliferative, and Apoptotic Effects of Chemotherapeutic Drug in Cancer Cells. *Pharmaceutics*, 12(5), 443. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12050443>
- Herold, I., & Yarden, O. (2017). Regulation of *Neurospora crassa* cell wall remodeling via the cot-1 pathway is mediated by gul-1. *Current Genetics*, 63(1), 145–159. <https://doi.org/10.1007/s00294-016-0625-z>
- Heym, R. G., & Niessing, D. (2012). Principles of mRNA transport in yeast. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 69(11), 1843–1853. <https://doi.org/10.1007/s00018-011-0902-4>
- Holliday, R. (1974). Molecular aspects of genetic exchange and gene conversion. *Genetics* 78, 273-87.
- Holloman, W. K., Schirawski, J., & Holliday, R. (2008). The homologous recombination system of *Ustilago maydis*. *Fungal Genetics and Biology*, 45(1), S31–S39. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2008.04.006>
- Hose, J., Escalante, L. E., Clowers, K. J., Dutcher, H. A., Robinson, D., Bouriakov, V., Coon, J. J., Shishkova, E., & Gasch, A. P. (2020). The genetic basis of aneuploidy tolerance in wild yeast. *ELife*, 9, 1–26. <https://doi.org/10.7554/eLife.52063>

- Hu, Z., Xia, B., Postnikoff, S. D. L., Shen, Z. J., Tomoiaga, A. S., Harkness, T. A., Seol, J. H., Li, W., Chen, K., & Tyler, J. K. (2018). Ssd1 and Gcn2 suppress global translation efficiency in replicatively aged yeast while their activation extends lifespan. *ELife*, *7*, 1–24. <https://doi.org/10.7554/eLife.35551>
- Huang, K.-L., Chadee, A. B., Chen, C.-Y. A., Zhang, Y., & Shyu, A.-B. (2013). Phosphorylation at intrinsically disordered regions of PAM2 motif-containing proteins modulates their interactions with PABPC1 and influences mRNA fate. *RNA*, *19*(3), 295–305. <https://doi.org/10.1261/rna.037317.112>
- Hung, V., Udeshi, N. D., Lam, S. S., Loh, K. H., Cox, K. J., Pedram, K., Carr, S. A., & Ting, A. Y. (2016). Spatially resolved proteomic mapping in living cells with the engineered peroxidase APEX2. *Nature Protocols*, *11*(3), 456–475. <https://doi.org/10.1038/nprot.2016.018>
- Hwang, J., & Espenshade, P. J. (2016). Proximity-dependent biotin labelling in yeast using the engineered ascorbate peroxidase APEX2. *Biochemical Journal*, *473*(16), 2463–2469. <https://doi.org/10.1042/BCJ20160106>
- Ibeas, J. I., Yun, D. J., Damsz, B., Narasimhan, M. L., Uesono, Y., Ribas, J. C., Lee, H., Hasegawa, P. M., Bressan, R. A., & Pardo, J. M. (2001). Resistance to the plant PR-5 protein osmotin in the model fungus *Saccharomyces cerevisiae* is mediated by the regulatory effects of SSD1 on cell wall composition. *Plant Journal*, *25*(3), 271–280. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.2001.00967.x>
- 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.
- Jankowski, S., Pohlmann, T., Baumann, S., Müntjes, K., Devan, S. K., Zander, S., & Feldbrügge, M. (2019). The multi PAM 2 protein Upa2 functions as novel core component of endosomal mRNA transport. *EMBO Reports*, *20*(9), 1–15. <https://doi.org/10.15252/embr.201847381>
- Jansen, J. M., Wanless, A. G., Seidel, C. W., & Weiss, E. L. (2009). Cbk1 Regulation of the RNA-Binding Protein Ssd1 Integrates Cell Fate with Translational Control. *Current Biology*, *19*(24), 2114–2120. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2009.10.071>
- Januszyk, K., & Lima, C. D. (2010). Structural components and architectures of RNA exosomes. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, *702*, 9–28. https://doi.org/10.1007/978-1-4419-7841-7_2
- Kämper, J., Friedrich, M. W., & Kahmann, R. (2020). Creating novel specificities in a fungal nonself recognition system by single step homologous recombination events. *New Phytologist*. <https://doi.org/10.1111/nph.16755>

- Kämper, J., Kahmann, R., Bölker, M., Ma, L. J., Brefort, T., Saville, B. J., Banuett, F., Kronstad, J. W., Gold, S. E., Müller, O., Perlin, M. H., Wösten, H. A. B., De Vries, R., Ruiz-Herrera, J., Reynaga-Peña, C. G., Snetselaar, K., McCann, M., Pérez-Martín, J., Feldbrügge, M., ... Birren, B. W. (2006). Insights from the genome of the biotrophic fungal plant pathogen *Ustilago maydis*. *Nature*, *444*(7115), 97–101. <https://doi.org/10.1038/nature05248>
- Keilhauer, E. C., Hein, M. Y., & Mann, M. (2015). Accurate protein complex retrieval by affinity enrichment mass spectrometry (AE-MS) rather than affinity purification mass spectrometry (AP-MS). *Molecular and Cellular Proteomics*, *14*(1), 120–135. <https://doi.org/10.1074/mcp.M114.041012>
- Kellner, R., Vollmeister, E., Feldbrügge, M., & Begerow, D. (2011). Interspecific sex in grass smuts and the genetic diversity of their pheromone-receptor system. *PLoS Genetics*, *7*(12). <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002436>
- Kim, D. I., & Roux, K. J. (2016). Filling the Void: Proximity-Based Labeling of Proteins in Living Cells. *Trends in Cell Biology*, *26*(11), 804–817. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2016.09.004>
- Kippert, F. (1995). A rapid permeabilization procedure for accurate quantitative determination of β -galactosidase activity in yeast cells. *FEMS Microbiology Letters*, *128*(2), 201–206. [https://doi.org/10.1016/0378-1097\(95\)00113-J](https://doi.org/10.1016/0378-1097(95)00113-J)
- Koepke, J., Kaffarnik, F., Haag, C., Zarnack, K., Luscombe, N. M., König, J., Ule, J., Kellner, R., Begerow, D., & Feldbrügge, M. (2011). The RNA-binding protein Rrm4 is essential for efficient secretion of endochitinase Cts1. *Molecular and Cellular Proteomics*, *10*(12), 1–15. <https://doi.org/10.1074/mcp.M111.011213>
- König, J., Baumann, S., Koepke, J., Pohlmann, T., Zarnack, K., & Feldbrügge, M. (2009). The fungal RNA-binding protein Rrm4 mediates long-distance transport of *ubi1* and *rho3* mRNAs. *EMBO Journal*, *28*(13), 1855–1866. <https://doi.org/10.1038/emboj.2009.145>
- Kosugi, S., Hasebe, M., Tomita, M., & Yanagawa, H. (2009). Systematic identification of cell cycle-dependent yeast nucleocytoplasmic shuttling proteins by prediction of composite motifs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *106*(25), 10171–10176. <https://doi.org/10.1073/pnas.0900604106>
- Kotnik, T., Frey, W., Sack, M., Haberl Meglič, S., Peterka, M., & Miklavčič, D. (2015). Electroporation-based applications in biotechnology. *Trends in Biotechnology*, *33*(8), 480–488. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2015.06.002>

- Kurischko, C., & Broach, J. R. (2017). Phosphorylation and nuclear transit modulate the balance between normal function and terminal aggregation of the yeast RNA-binding protein Ssd1. *Molecular Biology of the Cell*, 28(22), 3057–3069. <https://doi.org/10.1091/mbc.E17-02-0100>
- Kurischko, C., Kim, H. K., Kuravi, V. K., Pratzka, J., & Luca, F. C. (2011). The yeast Cbk1 kinase regulates mRNA localization via the mRNA-binding protein Ssd1. *Journal of Cell Biology*, 192(4), 583–598. <https://doi.org/10.1083/jcb.201011061>
- Kurischko, C., Kuravi, V. K., Herbert, C. J., & Luca, F. C. (2011). Nucleocytoplasmic shuttling of Ssd1 defines the destiny of its bound mRNAs. *Molecular Microbiology*, 81(3), 831–849. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2011.07731.x>
- Kwon, S., Tisserant, C., Tulinski, M., Weiberg, A., & Feldbrügge, M. (2020). Inside-out: from endosomes to extracellular vesicles in fungal RNA transport. *Fungal Biology Reviews*, 34(2), 89–99. <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2020.01.001>
- Kyhse-Andersen, J. (1984). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose: simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *Journal of biochemical and biophysical methods* 10, 203-209.
- Laemmli, U. K. (1970): Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* 227 (5259), S. 680–685. DOI: 10.1038/227680a0.
- Lai, S., Wei, Y., Wu, Q., Zhou, K., Liu, T., Zhang, Y., Jiang, N., Xiao, W., Chen, J., Liu, Q., & Yu, Y. (2019). Liposomes for effective drug delivery to the ocular posterior chamber. *Journal of Nanobiotechnology*, 17(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/s12951-019-0498-7>
- Lanver, D., Mendoza-Mendoza, A., Brachmann, A., & Kahmann, R. (2010). Sho1 and Msb2-Related Proteins Regulate Appressorium Development in the Smut Fungus *Ustilago maydis*. *The Plant Cell*, 22(6), 2085–2101. <https://doi.org/10.1105/tpc.109.073734>
- Lanver, D., Müller, A. N., Happel, P., Schweizer, G., Haas, F. B., Franitza, M., Pellegrin, C., Reissmann, S., Altmüller, J., Rensing, S. A., & Kahmann, R. (2018). The Biotrophic Development of *Ustilago maydis* Studied by RNA-Seq Analysis. *The Plant Cell*, 30(2), 300–323. <https://doi.org/10.1105/tpc.17.00764>
- Larsen, M. R., Trelle, M. B., Thingholm, T. E., & Jensen, O. N. (2006). Analysis of posttranslational modifications of proteins by tandem mass spectrometry. *BioTechniques*, 40(6), 790–798. <https://doi.org/10.2144/000112201>
- Lécuyer, E., Yoshida, H., Parthasarathy, N., Alm, C., Babak, T., Cerovina, T., Hughes, T. R., Tomancak, P., & Krause, H. M. (2007). Global Analysis of mRNA Localization Reveals a Prominent Role in Organizing Cellular Architecture and Function. *Cell*, 131(1), 174–187. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.08.003>

- Lee, H. J., Kim, J. M., Kyu Kang, W., Yang, H., & Kim, J. Y. (2015). The NDR kinase Cbk1 downregulates the transcriptional repressor Nrg1 through the mRNA-binding protein Ssd1 in *Candida albicans*. *Eukaryotic Cell*, *14*(7), 671–683. <https://doi.org/10.1128/EC.00016-15>
- Lehmler, C., Steinberg, G., Snetselaar, K. M., Schliwa, M., Kahmann, R., & Bölker, M. (1997). Identification of a motor protein required for filamentous growth in *Ustilago maydis*. *EMBO Journal*, *16*(12), 3464–3473. <https://doi.org/10.1093/emboj/16.12.3464>
- Lenz, C., Kühn-Hölsken, E., & Urlaub, H. (2007). Detection of Protein-RNA Crosslinks by NanoLC-ESI-MS/MS Using Precursor Ion Scanning and Multiple Reaction Monitoring (MRM) Experiments. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, *18*(5), 869–881. <https://doi.org/10.1016/j.jasms.2007.01.013>
- Letunic, I., Goodstadt, L., Dickens, N. J., Doerks, T., Schultz, J., Mott, R., Ciccarelli, F., Copley, R. R., Ponting, C. P., & Bork, P. (2002). Recent improvements to the SMART domain-based sequence-annotation resource. *Nucleic Acids Research*, *30*(1), 242–244. <https://doi.org/10.1093/nar/30.1.242>
- Li, Y., Collins, M., An, J., Geiser, R., Tegeler, T., Tsantilas, K., Garcia, K., Pirrotte, P., & Bowser, R. (2016). Immunoprecipitation and mass spectrometry defines an extensive RBM45 protein–protein interaction network. *Brain Research*, *1647*(12), 79–93. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2016.02.047>
- Liao, Y. C., Fernandopulle, M. S., Wang, G., Choi, H., Hao, L., Drerup, C. M., Patel, R., Qamar, S., Nixon-Abell, J., Shen, Y., Meadows, W., Vendruscolo, M., Knowles, T. P. J., Nelson, M., Czekalska, M. A., Musteikyte, G., Gachechiladze, M. A., Stephens, C. A., Pasolli, H. A., ... Ward, M. E. (2019). RNA Granules Hitchhike on Lysosomes for Long-Distance Transport, Using Annexin A11 as a Molecular Tether. *Cell*, *179*(1), 147–164.e20. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.08.050>
- Licatalosi, D. D., Ye, X., & Jankowsky, E. (2020). Approaches for measuring the dynamics of RNA–protein interactions. *WIREs RNA*, *11*(1), 1–23. <https://doi.org/10.1002/wrna.1565>
- Lin, L., Sun, Z., Li, J., Chen, Y., Liu, Q., Sun, W., & Tian, C. (2018). Disruption of gul-1 decreased the culture viscosity and improved protein secretion in the filamentous fungus *Neurospora crassa*. *Microbial Cell Factories*, *17*(1), 1–15. <https://doi.org/10.1186/s12934-018-0944-5>
- Mancini Lombardi, I., Palani, S., Meitinger, F., Darieva, Z., Hofmann, A., Sharrocks, A. D., & Pereira, G. (2013). Lre1 directly inhibits the NDR/lats Kinase Cbk1 at the cell division site in a phosphorylation-dependent manner. *Current Biology*, *23*(18), 1736–1745. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2013.07.032>

- Martin, K. C., & Ephrussi, A. (2009). mRNA Localization: Gene Expression in the Spatial Dimension. *Cell*, 136(4), 719–730. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.01.044>
- Mazanka, E., Alexander, J., Yeh, B. J., Charoenpong, P., Lowery, D. M., Yaffe, M., & Weiss, E. L. (2008). The NDR/LATS family kinase Cbk1 directly controls transcriptional asymmetry. *PLoS Biology*, 6(8), 1778–1790. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0060203>
- McMahon, A. C., Rahman, R., Jin, H., Shen, J. L., Fieldsend, A., Luo, W., & Rosbash, M. (2016). TRIBE: Hijacking an RNA-Editing Enzyme to Identify Cell-Specific Targets of RNA-Binding Proteins. *Cell*, 165(3), 742–753. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.03.007>
- Mendoza-Mendoza, A., Berndt, P., Djamei, A., Weise, C., Linne, U., Marahiel, M., Vraneš, M., Kämper, J., & Kahmann, R. (2009). Physical-chemical plant-derived signals induce differentiation in *Ustilago maydis*. *Molecular Microbiology*, 71(4), 895–911. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2008.06567.x>
- Mielnichuk, N., & Pérez-Martín, J. (2008). 14-3-3 regulates the G2/M transition in the basidiomycete *Ustilago maydis*. *Fungal Genetics and Biology*, 45(8), 1206–1215. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2008.05.010>
- Miles, S., Li, L. H., Melville, Z., & Breeden, L. L. (2019). Ssd1 and the cell wall integrity pathway promote entry, maintenance, and recovery from quiescence in budding yeast. *Molecular Biology of the Cell*, 30(17), 2205–2217. <https://doi.org/10.1091/mbc.E19-04-0190>
- Mir, S. S., Fiedler, D., & Cashikar, A. G. (2009). Ssd1 Is Required for Thermotolerance and Hsp104-Mediated Protein Disaggregation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology*, 29(1), 187–200. <https://doi.org/10.1128/mcb.02271-07>
- Müller, J., Pohlmann, T., & Feldbrügge, M. (2019). Core components of endosomal mRNA transport are evolutionarily conserved in fungi. *Fungal Genetics and Biology: FG & B*, 126(January), 12–16. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2019.01.013>
- Murn, J., & Shi, Y. (2017). The winding path of protein methylation research: Milestones and new frontiers. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 18(8), 517–527. <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.35>
- Nabokina, S. M., Subramanian, V. S., & Said, H. M. (2011). Association of PDZ-containing protein PDZD11 with the human sodium-dependent multivitamin transporter. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology*, 300(4). <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00530.2010>
- Narita, T., Weinert, B. T., & Choudhary, C. (2019). Functions and mechanisms of non-histone protein acetylation. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 20(3), 156–174. <https://doi.org/10.1038/s41580-018-0081-3>

- Nishi, H., Hashimoto, K., & Panchenko, A. R. (2011). Phosphorylation in Protein-Protein Binding: Effect on Stability and Function. *Structure*, 19(12), 1807–1815. <https://doi.org/10.1016/j.str.2011.09.021>
- O'Reilly, F. J., & Rappsilber, J. (2018). Cross-linking mass spectrometry: methods and applications in structural, molecular and systems biology. *Nature Structural and Molecular Biology*, 25(11), 1000–1008. <https://doi.org/10.1038/s41594-018-0147-0>
- Ohyama, Y., Kasahara, K., & Kokubo, T. (2010). *Saccharomyces cerevisiae* Ssd1p promotes CLN2 expression by binding to the 5'-untranslated region of CLN2 mRNA. *Genes to Cells*, 15(12), 1169–1188. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2443.2010.01452.x>
- Olgeiser, L. (2019). Transkriptomweite Identifizierung von Ziel-Transkripten des endosomalen mRNPs mittels iCLIP in *Ustilago maydis*. *Dissertation*. Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.
- Olgeiser, L., Haag, C., Boerner, S., Ule, J., Busch, A., Koepke, J., König, J., Feldbrügge, M., & Zarnack, K. (2019). The key protein of endosomal mRNP transport Rrm4 binds translational landmark sites of cargo mRNAs. *EMBO Reports*, 20(1), 1–17. <https://doi.org/10.15252/embr.201846588>
- Olicón-Hernández, D. R., Araiza-Villanueva, M. G., Pardo, J. P., Aranda, E., & Guerra-Sánchez, G. (2019). New Insights of *Ustilago maydis* as Yeast Model for Genetic and Biotechnological Research: A Review. *Current Microbiology*, 76(8), 917–926. <https://doi.org/10.1007/s00284-019-01629-4>
- Pandey, A., Shin, K., Patterson, R. E., Liu, X.-Q., & Rainey, J. K. (2016). Current strategies for protein production and purification enabling membrane protein structural biology. *Biochemistry and Cell Biology*, 94(6), 507–527. <https://doi.org/10.1139/bcb-2015-0143>
- Pohlmann, T., Baumann, S., Haag, C., Albrecht, M., & Feldbrügge, M. (2015). A FYVE zinc finger domain protein specifically links mRNA transport to endosome trafficking. *ELife*, 4(MAY), 1–27. <https://doi.org/10.7554/eLife.06041>
- Quick, M., & Shi, L. (2015). The Sodium/Multivitamin Transporter (SMVT): a Multipotent System With Therapeutic Implications. In *Physiology & Behavior* (Vol. 176, Issue 3, pp. 63–100). <https://doi.org/10.1016/bs.vh.2014.12.003>
- Rothbauer, U., Zolghadr, K., Muyldermans, S., Schepers, A., Cardoso, M. C., and Leonhardt, H. (2008). A versatile nanotrap for biochemical and functional studies with fluorescent fusion proteins. *Molecular & Cellular Proteomics* 7, 282-9.
- Sambrook, J., Frisch, E. F. and Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbour Laboratory Press Cold Spring Harbour, New York, USA.
- Saville, B. J., Donaldson, M. E., & Doyle, C. E. (2012). Investigating Host Induced Meiosis in a Fungal Plant Pathogen. In *Meiosis - Molecular Mechanisms and Cytogenetic Diversity* (Issue February 2012). InTech. <https://doi.org/10.5772/30032>

- 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
- Sen, A., & Cox, R. T. (2016). Clueless is a conserved ribonucleoprotein that binds the ribosome at the mitochondrial outer membrane. *Biology Open*, 5(2), 195–203. <https://doi.org/10.1242/bio.015313>
- Shi, L., Chen, D., Xu, C., Ren, A., Yu, H., & Zhao, M. (2017). Highly-efficient liposome-mediated transformation system for the basidiomycetous fungus *Flammulina velutipes*. *Journal of General and Applied Microbiology*, 63(3), 179–185. <https://doi.org/10.2323/jgam.2016.10.003>
- Singer-Krüger, B., Fröhlich, T., Franz-Wachtel, M., Nalpas, N., Macek, B., & Jansen, R. (2020). APEX2-mediated proximity labeling resolves protein networks in *Saccharomyces cerevisiae* cells. *The FEBS Journal*, 287(2), 325–344. <https://doi.org/10.1111/febs.15007>
- Sinz, A. (2018). Cross-Linking/Mass Spectrometry for Studying Protein Structures and Protein–Protein Interactions: Where Are We Now and Where Should We Go from Here? *Angewandte Chemie - International Edition*, 57(22), 6390–6396. <https://doi.org/10.1002/anie.201709559>
- Southern, E. M. (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *Journal of Molecular Biology* 98, 503-17.
- Stein, V., Blank-Landeshammer, B., Müntjes, K., Märker, R., Teichert, I., Feldbrügge, M., Sickmann, A., & Kück, U. (2020). The STRIPAK signaling complex regulates dephosphorylation of GUL1, an RNA-binding protein that shuttles on endosomes. In *PLOS Genetics* (Vol. 16, Issue 9). <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1008819>
- Steinberg, G., & Perez-Martin, J. (2008). *Ustilago maydis*, a new fungal model system for cell biology. *Trends in Cell Biology*, 18(2), 61–67. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2007.11.008>
- Steinberg, G., Schliwa, M., Lehmler, C., Bölker, M., Kahmann, R., & McIntosh, J. R. (1998). Kinesin from the plant pathogenic fungus *Ustilago maydis* is involved in vacuole formation and cytoplasmic migration. *Journal of Cell Science*, 111(15), 2235–2246.
- Stirke, A., Zimkus, A., Balevicius, S., Stankevicius, V., Ramanaviciene, A., Ramanavicius, A., & Zurauskiene, N. (2014). Permeabilization of yeast *Saccharomyces cerevisiae* cell walls using nanosecond high power electrical pulses. *Applied Physics Letters*, 105(25). <https://doi.org/10.1063/1.4905034>

- Stock, J., Sarkari, P., Kreibich, S., Brefort, T., Feldbrügge, M., & Schipper, K. (2012). Applying unconventional secretion of the endochitinase Cts1 to export heterologous proteins in *Ustilago maydis*. *Journal of Biotechnology*, 161(2), 80–91. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2012.03.004>
- Subramanian, V. S., Marchant, J. S., Boulware, M. J., Ma, T. Y., & Said, H. M. (2009). Membrane targeting and intracellular trafficking of the human sodium-dependent multivitamin transporter in polarized epithelial cells. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, 296(4), 663–671. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00396.2008>
- Sutton, A., Lin, F., Sarabia, M. J. F., & Arndt, K. T. (1991). The SIT4 protein phosphatase is required in late G1 for progression into S phase. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 56(4), 75–82. <https://doi.org/10.1101/sqb.1991.056.01.011>
- Tate, C. G. (2001). Overexpression of mammalian integral membrane proteins for structural studies. *FEBS Letters*, 504(3), 94–98. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(01\)02711-9](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(01)02711-9)
- Terfrüchte, M., Reindl, M., Jankowski, S., Sarkari, P., Feldbrügge, M., & Schipper, K. (2017). Applying unconventional secretion in *Ustilago maydis* for the export of functional nanobodies. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(5). <https://doi.org/10.3390/ijms18050937>
- Terfrüchte, M., Wewetzer, S., Sarkari, P., Stollewerk, D., Franz-Wachtel, M., Macek, B., Schlepütz, T., Feldbrügge, M., Büchs, J., & Schipper, K. (2018). Tackling destructive proteolysis of unconventionally secreted heterologous proteins in *Ustilago maydis*. *Journal of Biotechnology*, 284(July), 37–51. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2018.07.035>
- Thammahong, A., Dhingra, S., Bultman, K. M., Kerkaert, J. D., & Cramer, R. A. (2019). An Ssd1 Homolog Impacts Trehalose and Chitin Biosynthesis and Contributes to Virulence in *Aspergillus fumigatus*. *MSphere*, 4(3). <https://doi.org/10.1128/msphere.00244-19>
- Tian, L., Doroshenk, K. A., Zhang, L., Fukuda, M., Washida, H., Kumamaru, T., & Okita, T. (2020). Zipcode RNA-Binding Proteins and Membrane Trafficking Proteins Cooperate to Transport Glutelin mRNAs in Rice Endosperm. *The Plant Cell*, 32(8), 2566–2581. <https://doi.org/10.1105/tpc.20.00111>
- Titeca, K., Lemmens, I., Tavernier, J., & Eyckerman, S. (2019). Discovering cellular protein-protein interactions: Technological strategies and opportunities. *Mass Spectrometry Reviews*, 38(1), 79–111. <https://doi.org/10.1002/mas.21574>
- Tomanek, L. (2015). Proteomic responses to environmentally induced oxidative stress. *Journal of Experimental Biology*, 218(12), 1867–1879. <https://doi.org/10.1242/jeb.116475>

- Tulinski, M. (2016). Establishing genetic and in vivo labeling approaches to identify components of endosomal mRNA transport in *Ustilago maydis*. *Masterarbeit*. Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.
- Tyanova, S., Temu, T., & Cox, J. (2016). The MaxQuant computational platform for mass spectrometry-based shotgun proteomics. *Nature Protocols*, *11*(12), 2301–2319. <https://doi.org/10.1038/nprot.2016.136>
- Uesono, Y., Toh-e, A., & Kikuchi, Y. (1997). Ssd1p of *Saccharomyces cerevisiae* associates with RNA. *Journal of Biological Chemistry*, *272*(26), 16103–16109. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.26.16103>
- Vadlapudi, A. D., Vadlapatla, R. K., & Mitra, A. K. (2012). Sodium Dependent Multivitamin Transporter (SMVT): A Potential Target for Drug Delivery. *Current Drug Targets*, *13*(7), 994–1003. <https://doi.org/10.2174/138945012800675650>
- Vadlapudi, A. D., Vadlapatla, R. K., Pal, D., & Mitra, A. K. (2012). Functional and molecular aspects of biotin uptake via SMVT in Human corneal epithelial (HCEC) and retinal pigment epithelial (D407) Cells. *AAPS Journal*, *14*(4), 832–842. <https://doi.org/10.1208/s12248-012-9399-5>
- Van Dongen, M. A., Vaidyanathan, S., & Banaszak Holl, M. M. (2013). PAMAM dendrimers as quantized building blocks for novel nanostructures. *Soft Matter*, *9*(47), 11188–11196. <https://doi.org/10.1039/c3sm52250d>
- Vazquez-Pianzola, P., Schaller, B., Colombo, M., Beuchle, D., Neuenschwander, S., Marcil, A., Bruggmann, R., & Suter, B. (2017). The mRNA transportome of the BicD/Egl transport machinery. *RNA Biology*, *14*(1), 73–89. <https://doi.org/10.1080/15476286.2016.1251542>
- Vollmeister, E., Schipper, K., Baumann, S., Haag, C., Pohlmann, T., Stock, J., & Feldbrügge, M. (2012). Fungal development of the plant pathogen *Ustilago maydis*. *FEMS Microbiology Reviews*, *36*(1), 59–77. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2011.00296.x>
- Wang, H., Huang, W., Fei, Y.-J., Xia, H., Yang-Feng, T. L., Leibach, F. H., Devoe, L. D., Ganapathy, V., & Prasad, P. D. (1999). Human Placental Na⁺-dependent Multivitamin Transporter. *Journal of Biological Chemistry*, *274*(21), 14875–14883. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.21.14875>
- Wanless, A. G., Lin, Y., & Weiss, E. L. (2014). Cell morphogenesis proteins are translationally controlled through UTRs by the Ndr/LATS target Ssd1. *PLoS ONE*, *9*(1). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0085212>
- Wedlich-Söldner, R., Irene, S., Straube, A., & Steinberg, G. (2002). Dynein Supports Motility of Endoplasmic Reticulum in the Fungus *Ustilago maydis*. *Molecular Biology of the Cell*, *13*, 965–977. <https://doi.org/10.1091/mbc.01-10-0475>.

- Xu, F., Byström, A. S., & Johansson, M. J. O. (2020). SSD1 modifies phenotypes of Elongator mutants. *Current Genetics*, *66*(3), 481–485. <https://doi.org/10.1007/s00294-019-01048-9>
- Xu, Y., Wu, W., Han, Q., Wang, Y., Li, C., Zhang, P., & Xu, H. (2019). Post-translational modification control of RNA-binding protein hnRNP function. *Open Biology*, *9*(3). <https://doi.org/10.1098/rsob.180239>
- Yaffe, M. B. (2002). How do 14-3-3 proteins work? - Gatekeeper phosphorylation and the molecular anvil hypothesis. *FEBS Letters*, *513*(1), 53–57. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(01\)03288-4](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(01)03288-4)
- Yang, W., Cheng, Y., Xu, T., Wang, X., & Wen, L. ping. (2009). Targeting cancer cells with biotin-dendrimer conjugates. *European Journal of Medicinal Chemistry*, *44*(2), 862–868. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2008.04.021>
- Yellepeddi, V. K., Kumar, A., & Palakurthi, S. (2009). Biotinylated poly(amido)amine (PAMAM) dendrimers as carriers for drug delivery to ovarian cancer cells in vitro. *Anticancer Research*, *29*(8), 2933–2943.
- Zambanini, T., Hartmann, S. K., Schmitz, L. M., Büttner, L., Hosseinpour Tehrani, H., Geiser, E., Beudels, M., Venc, D., Wandrey, G., Büchs, J., Schwarzländer, M., Blank, L. M., & Wierckx, N. (2017). Promoters from the itaconate cluster of *Ustilago maydis* are induced by nitrogen depletion. *Fungal Biology and Biotechnology*, *4*(1), 11. <https://doi.org/10.1186/s40694-017-0040-3>
- Zander, S., Baumann, S., Weidtkamp-Peters, S., & Feldbrügge, M. (2016). Endosomal assembly and transport of heteromeric septin complexes promote septin cytoskeleton formation. *Journal of Cell Science*, *129*(14), 2778–2792. <https://doi.org/10.1242/jcs.182824>
- Zarnack, K., & Feldbrügge, M. (2010). Minireviews microtubule-dependent mrna transport in fungi. *Eukaryotic Cell*, *9*(7), 982–990. <https://doi.org/10.1128/EC.00030-10>
- Zhen, Y., Haugsten, E. M., Singh, S. K., & Wesche, J. (2018). Proximity Labeling by a Recombinant APEX2-FGF1 Fusion Protein Reveals Interaction of FGF1 with the Proteoglycans CD44 and CSPG4. *Biochemistry*, *57*(26), 3807–3816. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.8b00120>
- Zheng, Y., Kief, J., Auffarth, K., Farfsing, J. W., Mahlert, M., Nieto, F., & Basse, C. W. (2008). The *Ustilago maydis* Cys2His2-type zinc finger transcription factor Mzr1 regulates fungal gene expression during the biotrophic growth stage. *Molecular Microbiology*, *68*(6), 1450–1470. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2008.06244.x>

5. Literaturverzeichnis

Zhou, Y., Wang, G., Wang, P., Li, Z., Yue, T., Wang, J., & Zou, P. (2019). Expanding APEX2 Substrates for Proximity-Dependent Labeling of Nucleic Acids and Proteins in Living Cells. *Angewandte Chemie - International Edition*, 58(34), 11763–11767. <https://doi.org/10.1002/anie.201905949>

Danksagung

Zuerst möchte ich mich bei Prof. Michael Feldbrügge für die Ermöglichung der Promotion in seinem Institut bedanken. Vielen Dank für die hervorragende Betreuung, das interessante Forschungsprojekt, die anregenden wissenschaftlichen Diskussionen und das Vertrauen.

Herrn Prof. Thomas Klein möchte ich für die Übernahme des Zweitgutachtens und für die Betreuung als Mentor danken.

Dr. Falk Butter aus dem Institut für Molekulare Biologie in Mainz möchte ich für die exzellente massenspektrometrische Analyse meiner Proben danken.

Bei Carl Haag möchte ich mich besonders für seine Hilfe und weisen Ratschläge bedanken.

Besonderen Dank auch an Elisabeth und Uli für den exzellenten Support.

Ich möchte mich auch bei allen Mitgliedern meiner Arbeitsgruppe RabLab und dem gesamten Institut für Mikrobiologie für die kollegiale Arbeitsatmosphäre, für all den Spaß den wir hatten und die gegenseitige Unterstützung bedanken. Durch euch hatte ich eine wirklich schöne Zeit im Institut.

Danke an meine Freunde für den erstklassigen moralischen Support, Hilfe und die nötige Ablenkung.

Ich möchte mich bei meiner Familie für all die Unterstützung bedanken. Vor allem bei meinen Eltern und meiner Schwester Olivia.

Ganz besonders bedanke ich mich bei Kristin, die immer für mich da ist.