



Karlsruher Institut für Technologie

**Regulation von frühen Endosomenpopulationen  
bei Transportprozessen und der Zellteilung in  
*Ustilago maydis***

Zur Erlangung des akademischen Grades eines

**DOKTORS DER NATURWISSENSCHAFTEN**

(Dr. rer. nat.)

Von der KIT-Fakultät für Chemie und Biowissenschaften  
des Karlsruher Instituts für Technologie (KIT)

genehmigte

**DISSERTATION**

von

**M. Sc. Karina Schneider**

aus

Walldorf

Dekan: Prof. Dr. Manfred Wilhelm

Referent: Prof. Dr. Jörg Kämper

Korreferent: Prof. Dr. Holger Puchta

Tag der mündlichen Prüfung: 08.02.2021



Die Untersuchungen zur vorliegenden Arbeit wurden zwischen dem 01. Januar 2017 und dem 30. Juni 2020 in der Abteilung Genetik am Institut für Angewandte Biowissenschaften des Karlsruher Instituts für Technologie in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Jörg Kämper durchgeführt.



Hiermit erkläre ich, dass ich meine Dissertation mit dem Titel „Regulation von frühen Endosomenpopulationen bei Transportprozessen und der Zellteilung in *Ustilago maydis*“ selbstständig verfasst, keine anderen als die angegebenen Quellen oder Hilfsmittel verwendet und alle Stellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten Schriften entnommen wurden, als solche kenntlich gemacht habe. Die Regelung zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis im Karlsruher Institut für Technologie (KIT), in gültiger Fassung vom 24.05.2018, habe ich beachtet.

---

Ort/Datum

---

Karina Schneider

## Abkürzungen und Fachbegriffe

Amp / Amp <sup>R</sup>	Ampicillin / Ampicillin-Resistenz	MM	Minimalmedium
<i>bE</i>	<i>bEast</i>	MTOC	Mikrotubuli-organisierendes Zentrum
<i>ble<sup>R</sup></i>	Phleomycin-Resistenzgen	Nat / Nat <sup>R</sup>	Nourseothricin / Nourseothricin-Resistenz
<i>bW</i>	<i>bWest</i>	N-terminal	Amino-terminal
Cbx / Cbx <sup>R</sup>	Carboxin / Carboxin-Resistenz	OD <sub>600</sub>	optische Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm
CM	Komplex-Medium	ORF	offener Leserahmen
CMAC	7-Amino-4-Chlormethylcumarin	p	(t-Test)
CORVET	Komplex zum Andocken von Endosomen und Vesikeln mit Klasse C Proteinkern	P <sub>xy</sub>	Promotor von Gen xy
C-terminal	Carboxy-terminal	Phleo / Phleo <sup>R</sup>	Phleomycin / Phleomycin-Resistenz
DIC	differenzielle Phasenkontrast-Mikroskopie	Primer	Startoligonukleotid für die DNA-Polymerase
DIG	Digoxigenin	Rab	Ras-verwandte kleine G-Proteine
GAP	GTPase Aktivierungsproteine	RNase	Ribonuklease
GDI	Rab GDP Dissoziations Inhibitor	rpm	Umdrehungen pro Minute
GDP	Guanosindiphosphat	RT	Raumtemperatur
GEF	Guanin-Nukleotid-Austauschfaktoren	SNARE	Domäne von Membranprotein mit Funktion bei Fusion
GTP	Guanosintriphosphat	Tub	Tubulin
GTPase	Guanosintriphosphatase	Vps	Hefeproteine mit Defekt bei Vakuolensortierung
HOPS	homotypischer Komplex für Fusionen und Proteinsortierung	(v/v)	Volumen pro Volumen
Hyg / Hyg <sup>R</sup>	Hygromycin / Hygromycin-Resistenz	WT	Wildtyp
<i>ip</i> -Locus	Gen für Untereinheit der Sukzinat-Dehydrogenase	(w/v)	Gewicht pro Volumen
Kan / Kan <sup>R</sup>	Kanamycin / Kanamycin-Resistenz	Ypt	Hefe Protein
mCherry	monomeres rot fluoreszierendes Protein	Δ	Deletion

## **Inhaltsverzeichnis**

Abkürzungen und Fachbegriffe.....	IV
Abbildungsverzeichnis.....	XI
Tabellenverzeichnis.....	XVI
1. Zusammenfassung.....	1
2. Einleitung.....	5
2.1. <i>Ustilago maydis</i> als Modellorganismus.....	5
2.2. Das Zytoskelett in eukaryotischen Zellen.....	9
2.3. Vesikuläre Transportprozesse.....	12
2.4. Endosomenpopulationen.....	14
2.4.1. Rab-GTPasen.....	15
2.4.2. Frühe Endosomen.....	17
2.5. Der CORVET-Komplex.....	25
2.6. Das Nma1-Protein.....	29
2.7. Die Mitose eukaryotischer Zellen.....	34
2.8. Zielsetzung.....	39
3. Ergebnisse.....	41
3.1. Charakterisierung der Endosomenpopulationen in <i>U. maydis</i> .....	42
3.1.1. Die Populationen von frühen und späten Endosomen in <i>U. maydis</i> sind deutlich separiert.....	42
3.1.2. Das Genom von <i>U. maydis</i> codiert für drei putative Rab5-ähnliche GTPasen.....	46
3.1.3. Die Deletionen von <i>rab5a</i> , <i>rab5b</i> und <i>rab5c</i> wirken sich unterschiedlich auf die Zellmorphologie und Pathogenität aus.....	50
3.1.4. Rab5a und Rab5b lokalisieren gemeinsam auf Endosomen.....	58
3.1.5. Die Rab5-GTPasen beeinflussen gegenseitig ihre Lokalisierung, Motilität und Proteinabundanz.....	63
3.1.6. Eine konstitutiv inaktive Mutante von Rab5a inhibiert die Motilität Rab5a-positiver Endosomen.....	71
3.1.7. Eine konstitutiv aktive Mutante von Rab5a zeigt genetische Interaktion mit Rab5b.....	74
3.1.8. Der Endosomenmarker Yup1 ist mit den GTPasen Rab5a und Rab5b assoziiert.....	77
3.2. Funktionsmechanismus des CORVET-Komplexes in <i>U. maydis</i> .....	84
3.2.1. Der CORVET-Komplex in <i>U. maydis</i> setzt sich aus den konservierten Bestandteilen zusammen.....	85
3.2.2. Der CORVET-Komplex in <i>U. maydis</i> enthält essenzielle Komponenten.....	87
3.2.3. Vps3 übt in <i>U. maydis</i> keine GEF-ähnliche Funktion für Rab5a aus.....	90
3.2.4. Komponenten des CORVET-Komplex lokalisieren auf den frühen Endosomen.....	93

3.2.5. Vps8 wird unabhängig von Vps3 mit den frühen Endosomen transportiert .....	99
3.2.6. Deletionen der Rab5-GTPasen beeinflussen die Motilität und die Colokalisierung von CORVET-Untereinheiten.....	102
3.2.7. Eine konstitutiv aktive Mutante von Rab5a kann Vps3 nicht an die frühen Endosomen rekrutieren.....	106
<b>3.3. Charakterisierung des Nma1-Proteins in <i>U. maydis</i>.....</b>	<b>109</b>
3.3.1. Nma1 interagiert unabhängig von Rab5a mit dem CORVET-Komplex.....	110
3.3.2. Nma1 hat keinen Einfluss auf die Komposition des CORVET-Komplexes .....	113
3.3.3. Die Interaktion von Nma1 mit dem CORVET-Komplex ist abhängig von Vps3 .....	115
3.3.4. Nma1 beeinflusst die Population der frühen Endosomen .....	117
3.3.5. Nma1 lokalisiert spezifisch auf den frühen Endosomen und den Mikrotubuli.....	137
<b>3.4. Die endozytotische Maschinerie ist bei mitotischen Teilungsprozessen in <i>U. maydis</i> involviert.....</b>	<b>149</b>
3.4.1. Nma1 und der CORVET-Komplex colokalisieren während mitotischen Teilungsvorgängen .....	150
3.4.2. Frühe Endosomen begleiten in <i>U. maydis</i> den Spindelpolkörper und die mitotische Spindel .....	152
3.4.3. Nma1 ist involviert in der Rekrutierung der Rab5a-Endosomen an die Spindel.....	159
3.4.4. Die mitosephasenabhängige Rekrutierung von Rab5a-Endosomen an die Mitosespindel basiert auf der Interaktion mit Vps3 .....	162
3.4.5. Rab5b wird im $\Delta nma1$ -Hintergrund früher an die Mitosespindel rekrutiert.....	165
3.4.6. Rab5a ist wichtig für die Stabilität der Mitosespindel .....	168
3.4.8. Die Deletion von <i>rab5a</i> verhindert die Beteiligung von Yup1-markierten Endosomen an der Mitose .....	174
3.4.9. Konstitutiv aktives Rab5a verdrängt Rab5b vom Sprosshals in der Zytokinese.....	175
3.4.10. Die Deletion von <i>rab5b</i> hat keinen Einfluss auf die Assoziation von Rab5a mit der Mitosespindel.....	178
3.4.11. Die Deletion von <i>rab5b</i> beeinträchtigt die mitotische Teilung nicht .....	180
<b>3.5. Die kleine GTPase Rab5b ist für die genomische Stabilität bei meiotischen Teilungsprozessen in <i>U. maydis</i> notwendig .....</b>	<b>185</b>
3.5.1. Die Deletion von <i>rab5b</i> führt zu Fehlern bei der Meiose.....	185
3.5.2. Sporidien aus einer Meiose von $\Delta rab5b$ -Stämmen sind in der Zellteilung beeinträchtigt.....	189
3.5.3. Die Defekte von $\Delta rab5b^M$ -Stämmen nach der Meiose beruhen auf genomischer Instabilität .....	200
<b>4. Diskussion .....</b>	<b>216</b>
<b>4.1. Charakterisierung der frühen und späten Endosomen in <i>U. maydis</i> .....</b>	<b>217</b>
4.1.1. Eine starke Expression der Rab-GTPasen stimuliert die Fusion der Endosomen.....	218
4.1.2. <i>U. maydis</i> hat deutlich separierte Populationen an frühen und späten Endosomen .....	219



4.1.3. Bioinformatische Analysen implizieren die Präsenz von drei Rab5-GTPasen Genen im Genom von <i>U. maydis</i> .....	220
4.1.4. Im Vergleich der Rab5-GTPasen hat Rab5a für Funktionen bei der Zellmorphologie, der Polarität und Pathogenität in <i>U. maydis</i> die größte Relevanz .....	221
4.1.5. Rab5a und Rab5b sind mit einer gemeinsamen Population an frühen Endosomen assoziiert.....	226
4.1.6. Der Transport von Rab5b ist überwiegend abhängig von Rab5a.....	227
4.1.7. Die konstitutive Inaktivierung von Rab5a unterbindet sämtliche endosomale Transportvorgänge .....	228
4.1.8. Konstitutiv aktives Rab5a verdrängt Rab5b von transportierten Endosomen .....	231
4.1.9. Die endosomale Partition von t-SNARE Yup1 ist mit Rab5a und Rab5b assoziiert .....	233
4.1.10. Regulation der Rab5-GTPasen in <i>U. maydis</i> .....	234
<b>4.2. Funktionsmechanismus des CORVET-Komplexes in <i>U. maydis</i> .....</b>	<b>238</b>
4.2.1. Der CORVET-Komplex besteht in <i>U. maydis</i> aus den evolutionär konservierten Komponenten.....	238
4.2.2 Der CORVET-Komplex in <i>U. maydis</i> enthält essenzielle Komponenten .....	240
4.2.3. Vps9 ist in <i>U. maydis</i> an der Membranintegration von Rab5b beteiligt.....	243
4.2.4. CORVET-spezifische Untereinheiten lokalisieren auf den frühen Endosomen .....	246
4.2.5. Die Colokalisierung und Motilität der CORVET-spezifischen Untereinheiten Vps3 und Vps8 wird durch Deletionen von Rab5-GTPasen beeinflusst.....	248
4.2.6. Die konstitutiv aktive Rab5a-Mutante rekrutiert Vps3 nicht an die frühen Endosomen .	249
4.2.7. CORVET-Komplex-vermittelte Fusion der frühen Endosomen in <i>U. maydis</i> .....	251
<b>4.3. Charakterisierung des Nma1-Proteins in <i>U. maydis</i>.....</b>	<b>253</b>
4.3.1. Die Interaktion von Nma1 mit dem CORVET-Komplex ist unabhängig von Rab5a .....	253
4.3.2. Nma1 hat keinen Einfluss auf die Zusammensetzung des CORVET-Komplexes .....	254
4.3.3. Nma1 interagiert nur in Anwesenheit von Vps3 mit dem CORVET-Komplex .....	255
4.3.4. Nma1 beeinflusst die Population der frühen Endosomen .....	255
4.3.5. Nma1 lokalisiert in Abhängigkeit von Vps3 auf frühen Endosomen.....	263
4.3.6. Nma1 stabilisiert den CORVET-Komplex in <i>U. maydis</i> und reguliert die Fusion der frühen Endosomen.....	265
<b>4.4. Die frühen Endosomen unterstützen die mitotische Teilung in <i>U. maydis</i>....</b>	<b>268</b>
4.4.1. Die frühen Endosomen und der CORVET-Komplex lokalisieren in <i>U. maydis</i> an der Mitosespindel.....	268
4.4.2. Die Rab5a-positiven Endosomen werden unter Beteiligung von Nma1 an die Spindel rekrutiert .....	275
4.4.3. Die stadienspezifische Rekrutierung von Rab5a-Endosomen an die Mitosespindel beruht auf der Interaktion mit Vps3 .....	277
4.4.4. Die fehlende Rekrutierung von Rab5a-Endosomen an die Spindel in Abwesenheit von Nma1 wird durch Rab5b-Endosomen ausgeglichen .....	278

4.4.5. Rab5a-Endosomen stabilisieren die Mitosespindel .....	279
4.4.6. Die Deletion von <i>rab5b</i> hat keinen Einfluss auf die mitotische Teilung.....	283
4.4.7. Nma1 und die frühen Endosomen unterstützen die Mitosespindel.....	284
<b>4.5. Rab5b ist für die genomische Stabilität während der Meiose in <i>U. maydis</i> notwendig.....</b>	<b>286</b>
4.5.1. Rab5b ist für die korrekte genetische Aufspaltung der Meioseprodukte notwendig.....	286
4.5.2. Die Meioseprodukte von $\Delta rab5b$ -Stämmen sind in der Zellteilung beeinträchtigt.....	287
4.5.3. Die Instabilität von $\Delta rab5b$ -Mioseprodukten ist auf den Verlust von chromosomalen Abschnitten zurückzuführen .....	289
<b>5. Material und Methoden .....</b>	<b>297</b>
<b>5.1. Material und Bezugsquellen.....</b>	<b>297</b>
5.1.1. <i>Escherichia coli</i> -Stamm.....	297
5.1.2. <i>Ustilago maydis</i> -Stämme .....	297
5.1.3. Chemikalien.....	311
5.1.4. Verwendete Kits .....	312
5.1.5. Enzyme und Proteine .....	312
5.1.6. Nukleinsäuren.....	314
5.1.7. Puffer und Lösungen .....	322
5.1.8. Medien .....	326
5.1.9. Plasmide .....	329
5.1.10. Sonstige Materialien.....	342
<b>5.2. Mikrobiologische und genetische Methoden .....</b>	<b>343</b>
5.2.1. Kultivierung von <i>Escherichia coli</i> .....	343
5.2.2. Kultivierung von <i>Ustilago maydis</i> .....	343
5.2.3. Bestimmung der Zelldichte in Flüssigkulturen .....	343
5.2.4. Transformation von <i>E. coli</i> -Stämmen.....	343
5.2.5. Protoplastierung und Transformation von <i>U. maydis</i> -Stämmen .....	344
5.2.6. Induktion von <i>U. maydis</i> -Stämmen für Protein- oder RNA-Extraktion .....	345
5.2.7. Zellbiologische Untersuchung von <i>U. maydis</i> -Stämmen.....	346
5.2.8. Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung von <i>U. maydis</i> -Stämmen an inversen Mikroskopen.....	347
5.2.9. CMAC.....	348
5.2.10. Propidiumiodid-Färbung .....	349
5.2.11. Fixierung von Zellen.....	349
5.2.12. DAPI-Färbung.....	350
5.2.13. Erstellung von Kymographen .....	350
5.2.14. Quantifizierung von Vesikeln .....	351

5.2.15. Analyse von Colokalisierung.....	351
5.2.16. Pflanzeninfektionsstudien.....	352
5.2.17. Sporenanalyse.....	352
5.2.18. Untersuchung des filamentösen Wachstums auf Aktivkohle.....	353
5.2.19. Kreuzung von <i>U. maydis</i> in Flüssigkultur.....	354
5.2.20. Pheromonstimulation in Flüssigkultur.....	354
<b>5.3. Molekularbiologische Standardmethoden.....</b>	<b>354</b>
5.3.1. Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren.....	354
5.3.2. Isolierung von Nukleinsäuren.....	355
5.3.3. In-vitro-Modifikationen von DNA.....	357
5.3.4. Gelelektrophorese.....	360
5.3.5. Transfer und Analyse von DNA auf Membranen.....	361
5.3.8. Gateway®-Klonierung.....	363
<b>5.4. PCR-Techniken.....</b>	<b>364</b>
5.4.1. Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	364
5.4.2. PCR-Generierung von Gen-Deletionskonstrukten für <i>U. maydis</i> .....	365
5.4.3. PCR-Generierung von Gen-Fusionskonstrukten für <i>U. maydis</i> .....	366
5.4.4. Gibson Assembly®.....	367
5.4.5 Real-Time-PCR (qRT-PCR).....	368
5.4.6. Mutagenese-PCR.....	369
<b>5.5. Sequenzanalysen und <i>in silico</i> Methoden.....</b>	<b>370</b>
5.5.1. Sequenzierung von DNA.....	370
5.5.2. Sequenzierung und Analyse von genomischer DNA.....	370
5.5.3. Analyse von LC-MS Daten.....	371
5.5.4. Sonstige Sequenz- und Strukturanalysen.....	371
<b>5.6. Biochemische Methoden.....</b>	<b>372</b>
5.6.1. Isolierung von Gesamtprotein.....	372
5.5.2. Aufreinigung von Proteinen und Proteinkomplexen.....	373
5.6.3. Auftrennung und Nachweis von Proteinen (SDS-PAGE).....	374
5.6.4. Nachweis von immobilisierten Proteinen (Western-Analyse).....	375
5.6.5. Analyse von Proteinen und Proteinkomplexen.....	377
<b>6. Literaturverzeichnis.....</b>	<b>380</b>
<b>7. Appendix.....</b>	<b>404</b>
7.1. Die Motilität von Rab5a- und Rab5b-positiven Endosomen ist von Kin3 abhängig.....	404

7.2. Die konstitutive Inaktivierung oder Aktivierung von Rab5a beeinflussen die Proteinstabilität der GTPase nicht.....	405
7.3. Die konstitutive Aktivierung von Rab5a stimuliert die Endosomenfusion .....	408
7.4. Die in den Datenbanken zur Verfügung stehende Sequenz von Vps8 enthält einen <i>contig</i> -Bruch .....	409
7.5. Die Deletion von <i>nma1</i> hat keinen Einfluss auf die Septenbildung in Filamenten .....	410
7.6. Die Deletion von <i>nma1</i> hat keinen Einfluss auf die Pathogenität von <i>U. maydis</i> .....	413
7.7. Die Deletion von <i>nma1</i> hat keine Auswirkungen auf die meiotische Aufspaltung .....	416
7.8. Eine Überexpression von <i>nma1</i> beeinträchtigt die Motilität des Nma1-Proteins .....	418
7.9. Die Deletion von <i>nma1</i> hat keinen Einfluss auf die Expression oder die Proteinabundanz der Rab5-GTPasen .....	419
7.10. Rohdaten der RT-PCR auf die genomische DNA von $\Delta rab5b^M$ -Stämmen.	422
7.11. Digitale Daten.....	423
Danksagung .....	426

## Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Lebenszyklus von <i>Ustilago maydis</i> .....	9
Abb. 2: Das Zytoskelett von <i>U. maydis</i> .....	11
Abb. 3: Komponenten der Endozytose .....	13
Abb. 4: GTPase-Zyklus.....	17
Abb. 5: Lokalisierung von Rab5 auf frühen Endosomen.....	24
Abb. 6: Modell und Bestandteile des CORVET-Komplexes.....	27
Abb. 7: Lokalisierung von Vps3 und Vps8 .....	29
Abb. 8: Lokalisierung des Nma1-Proteins.....	31
Abb. 9: Durch Co-Immunopräzipitation identifizierte Interaktionspartner von Nma1.	32
Abb. 10: Vps3 ist notwendig für den Transport von Nma1.....	33
Abb. 11: Die Deletion von <i>nma1</i> reduziert die Anzahl an frühen Endosomen .....	34
Abb. 12: Mitose in <i>U. maydis</i> .....	36
Abb. 13: Nma1 lokalisiert während der Mitose an den Spindelpolen.....	37
Abb. 14: Die Überexpression der Rab-GTPasen führte zu einer Reduktion der Vesikelquantität .....	44
Abb. 15: Frühe und späte Endosomen in <i>U. maydis</i> zeigen geringe Colokalisierung	45
Abb. 16: Rab5b ist die Rab5-GTPase aus <i>U. maydis</i> mit der nächsten Verwandtschaft zu den humanen Rab5-GTPasen .....	50
Abb. 17: Die Deletion von <i>rab5a</i> beeinträchtigt die Zellmorphologie .....	53
Abb. 18: Die Deletionen von <i>rab5a</i> und <i>rab5b</i> reduzieren die Pathogenität von solopathogenen Stämmen.....	54
Abb. 19: Rab5a ist notwendig für die Pathogenität von <i>U. maydis</i> .....	58
Abb. 20: Rab5a und Rab5b lokalisieren auf Vesikeln entlang der Mikrotubuli, Rab5c überwiegend zytoplasmatisch.....	60
Abb. 21: Rab5a und Rab5b werden überwiegend gemeinsam transportiert .....	62
Abb. 22: Die Deletion von <i>rab5a</i> beeinflusst den Transport von Rab5b .....	64
Abb. 23: Die Deletion von <i>rab5c</i> beeinflusst die Colokalisierung von Rab5a und Rab5b .....	66
Abb. 24: Die Doppeldelation von <i>rab5b</i> und <i>rab5c</i> beeinträchtigt weder Lokalisierung noch Motilität von Rab5a .....	67
Abb. 25: Die Expression der Rab5-GTPasen wird durch Deletion einer der anderen Rab5-GTPasen nicht verändert.....	69
Abb. 26: Die Proteinmenge von Rab5b ist in $\Delta rab5a$ -Stämmen erhöht .....	71
Abb. 27: Die konstitutive Inaktivierung von Rab5a beeinträchtigt die Zellmorphologie .....	73

Abb. 28: Die konstitutive Aktivierung von Rab5a beeinflusst Rab5b .....	76
Abb. 29: Yup1 colokalisiert partiell mit Rab5a und Rab5b .....	78
Abb. 30: Die Deletion von <i>rab5a</i> beeinträchtigt Yup1-positive Endosomen.....	82
Abb. 31: Die inaktive Mutante von Rab5a inhibiert endosomalen Transport .....	83
Abb. 32: Die Zusammensetzung des CORVET-Komplex in <i>U. maydis</i> ist nicht abhängig von Rab5a .....	87
Abb. 33: Die Deletion von <i>vps3</i> beeinflusst die Populationen Rab5a- und Rab5b-positiver Endosomen .....	89
Abb. 34: Weder Vps3 noch Vps9 erfüllen GEF-Funktionen für Rab5a .....	92
Abb. 35: Vps9 ist beteiligt an der Rekrutierung von Rab5b an die Membran der frühen Endosomen .....	93
Abb. 36: Vps3 und Vps8 werden gemeinsam bidirektional durch die Zelle transportiert .....	94
Abb. 37: Vps3 wird mit Rab5a- und Rab5b-positiven Endosomen transportiert .....	96
Abb. 38: Vps8 wird hauptsächlich gemeinsam mit Rab5a- und geringfügig mit Rab5b-positiven Endosomen transportiert.....	98
Abb. 39: Die Deletion von <i>vps3</i> reduziert die Motilität von Vps8.....	100
Abb. 40: Vps8 interagiert unabhängig von Vps3 mit den frühen Endosomen.....	101
Abb. 41: Deletionen der Rab5-GTPasen erhöhen die gemeinsame Lokalisierung von Vps3 und Vps8 .....	105
Abb. 42: Vps3 lokalisiert unabhängig von Rab5a an Rab5b-positive Endosomen .	106
Abb. 43: Die konstitutive GTP-Bindung von Rab5a verhindert die Lokalisierung von Vps3 mit den Rab5a-positiven Endosomen.....	108
Abb. 44: Nma1 interagiert unabhängig von Rab5a mit Bestandteilen des CORVET-Komplexes.....	112
Abb. 45: Nma1 beeinflusst die Komposition des CORVET-Komplexes nicht .....	115
Abb. 46: Die Interaktion von Nma1 mit dem CORVET-Komplex ist abhängig von Vps3 .....	117
Abb. 47: Nma1 beeinflusst die Anzahl an Rab5a-positiven Endosomen .....	120
Abb. 48: Die Deletion von <i>nma1</i> führt zu einer Durchmischung der Populationen an frühen und späten Endosomen.....	123
Abb. 49: Nma1 beeinflusst die Colokalisierung der GTPasen der frühen Endosomen .....	126
Abb. 50: Nma1 beeinflusst die Colokalisierung der CORVET-spezifischen Untereinheiten .....	128
Abb. 51: Nma1 beeinflusst den Langstreckentransport von Vps8 .....	129

Abb. 52: Nma1 stabilisiert die Lokalisierung von Vps3 mit Rab5a-positiven Endosomen .....	132
Abb. 53: Die Deletion von <i>nma1</i> zeigt nur minimale Auswirkungen auf die Colokalisierung von Vps8 mit Rab5a-positiven Endosomen.....	134
Abb. 54: Nma1 beeinflusst die Assoziation von Vps8 mit Rab5b-positiven Endosomen .....	137
Abb. 55: Der Transport von Nma1 mit Rab5a-positiven Endosomen ist abhängig von Vps3 .....	139
Abb. 56: Nma1 kann unabhängig von Rab5a mit Rab5b-positiven Endosomen transportiert werden.....	141
Abb. 57: Der Cotransport von Nma1 und Vps3 ist abhängig von Rab5a.....	144
Abb. 58: Der Transport von Nma1 mit Vps8-positiven Endosomen ist abhängig von Vps3 .....	146
Abb. 59: Nma1 wird nicht mit späten Endosomen transportiert.....	148
Abb. 60: Komponenten des CORVET-Komplex lokalisieren mit Nma1 an der mitotischen Spindel .....	151
Abb. 61: Rab5a begleitet die mitotische Spindel am Spindelpolkörper.....	155
Abb. 62: Rab5b wird erst in der Telophase an die mitotische Spindel rekrutiert.....	157
Abb. 63: Rab5a und Rab5b lokalisieren an der Zytoplasmabrücke während der Zellteilung .....	159
Abb. 64: Die Assoziation von Rab5a-Endosomen mit den Spindelpolen ist abhängig von Nma1 .....	162
Abb. 65: Die Deletion von <i>vps3</i> beeinträchtigt die Mitosespindel .....	165
Abb. 66: Durch die <i>nma1</i> -Deletion erfolgt eine verfrühte Rekrutierung von Rab5b an die Mitosespindel.....	168
Abb. 67: Die Deletion von <i>rab5a</i> beeinträchtigt die Ausbildung der Mitosespindel .	169
Abb. 68: Die Deletion von <i>rab5a</i> beeinflusst die Spindelelongation.....	171
Abb. 69: Rab5b ist in Abwesenheit von Rab5a mit der Mitosespindel assoziiert....	174
Abb. 70: Yup1-Endosomen lokalisieren ohne Rab5a nicht an den Spindelpolen während der Mitose .....	175
Abb. 71: Die konstitutive Aktivierung von Rab5a verhindert die Akkumulation von Rab5b an der Zytoplasmabrücke für die Zytokinese .....	178
Abb. 72: Die Lokalisierung von Rab5a an der Mitosespindel ist unabhängig von Rab5b .....	180
Abb. 73: Die Mitosespindel wird durch die Deletion von <i>rab5b</i> nicht beeinträchtigt	182
Abb. 74: Die Deletion von <i>rab5b</i> hat keinen Einfluss auf das Abstreifen der Zellkernhülle während der Mitose.....	184
Abb. 75: Stämme ohne Rab5b zeigen nach der meiotischen Teilung Instabilität ...	189

Abb. 76: Die $\Delta rab5b^M$ -Stämme zeigen Zytokinesedefekte und filamentöses Wachstum in Flüssigkultur.....	191
Abb. 77: $\Delta rab5b^M$ -Stämme haben Schwierigkeiten bei der mitotischen Teilung.....	194
Abb. 78: In $\Delta rab5b^M$ -Stämmen kommt es vermehrt zu Zelltod .....	197
Abb. 79: Die $\Delta rab5b^M$ -Stämme haben eine elongierte Verdopplungszeit .....	200
Abb. 80: Die instabilen $\Delta rab5b^M$ -Stämme zeigen Verluste von Chromosomen und Chromosomenbereichen .....	203
Abb. 81: Instabile $\Delta rab5b^M$ -Stämme verlieren Chromosomen und Chromosomenbereiche in kurzen Zeitspannen .....	208
Abb. 82: Die $\Delta rab5b^M$ -Mutanten verlieren vollständige Chromosomen .....	212
Abb. 83: Die $\Delta rab5b^M$ -Mutanten enthalten zusätzliche, vollständige Chromosomen .....	214
Abb. 84: In den $\Delta rab5b^M$ -Mutanten werden Bereiche von Chromosomen deletiert oder vervielfältigt.....	215
Abb. 85: Regulatorisches Zusammenspiel von Rab5a und Rab5b an den frühen Endosomen .....	237
Abb. 86: Rekrutierung des CORVET-Komplexes an die frühen Endosomen und Fusionsvermittlung .....	252
Abb. 87: Nma1 reguliert die CORVET-abhängige Fusion der frühen Endosomen .	267
Abb. 88: Die Mitose wird durch Nma1 und die frühen Endosomen unterstützt.....	285
Abb. 89: Rab5b erfüllt Funktionen bei der Separierung von Chromosomen während der Meiose.....	296
Abb. 90: DNA Größenstandards.....	314
Abb. 91: Kin3 ist in Transportprozesse von Rab5a- und Rab5b-positiven Endosomen involviert .....	405
Abb. 92: Die konstitutiv (in-) aktive Mutante von Rab5a ist nicht in der Proteinstabilität beeinflusst .....	407
Abb. 93: Die konstitutive Aktivierung von Rab5a stimuliert die Fusion der frühen Endosomen .....	408
Abb. 94: Sequenz offener Leserahmen <i>vps8</i> .....	410
Abb. 95: Die Deletion von <i>nma1</i> hat keinen Einfluss auf die Bildung von Retraktionssepten für filamentöse Wachstumsprozesse .....	412
Abb. 96: Die Deletion von <i>nma1</i> hat keinen Einfluss auf die Pathogenität von <i>U. maydis</i> .....	416
Abb. 97: Die Deletion von <i>nma1</i> hat keinen Einfluss auf die Meiose von <i>U. maydis</i> .....	417
Abb. 98: Eine starke Expression von <i>nma1</i> behindert die Motilität des Proteins ....	419



Abb. 99: Nma1 hat keinen Einfluss auf die Expression oder die Proteinmenge der Rab5-GTPasen..... 422

## **Tabellenverzeichnis**

Tabelle 1: Ausgangsstämme .....	297
Tabelle 2: In dieser Arbeit hergestellte Stämme .....	298
Tabelle 3: In dieser Arbeit verwendete Enzyme und Proteine .....	313
Tabelle 4: In dieser Arbeit verwendete Oligonukleotide.....	314
Tabelle 5: In dieser Arbeit verwendete Puffer und Lösungen .....	322
Tabelle 6: Medien für <i>Ustilago maydis</i> .....	326
Tabelle 7: Medien für <i>Escherichia Coli</i> .....	329
Tabelle 8: In dieser Arbeit verwendete Ausgangsplasmide .....	329
Tabelle 9: In dieser Arbeit hergestellte Plasmide.....	332
Tabelle 10: In dieser Arbeit verwendete Mikroskope und Binokulare .....	346
Tabelle 11: Verwendete Beads.....	374
Tabelle 12: Bei Western-Analysen verwendete Antikörper.....	376
Tabelle 13: CT-Werte der RT-PCR auf die genomische DNA von $\Delta rab5b^M$ -Stämmen .....	423

## 1. Zusammenfassung

Der Basidiomyzet *Ustilago maydis* ist ein wichtiger Modellorganismus für filamentöse, pflanzenpathogene Pilze. Die pathogene Phase beginnt im Anschluss an eine Fusion von zwei kompatiblen haploiden Sporidien, welche ein dikaryotisches Filament ausbilden. In diesem filamentösen Stadium ist der Langstreckentransport durch frühe Endosomen von besonderer Bedeutung, da diese Vesikel beispielsweise Proteine und mRNA in der Zelle verteilen.

Die Verteilung und Fusion der frühen Endosomen werden über den konservierten CORVET-Komplex gesteuert. Der CORVET-Komplex besteht aus den vier Kernkomponenten Vps11, Vps16, Vps18 und Vps33, welche gleichzeitig den Kern des HOPS-Komplexes an den späten Endosomen bilden. Beide Komplexe unterscheiden sich in zwei zusätzlichen Untereinheiten, welche die spezifische Bindung des CORVET-Komplex (Vps3, Vps8) an die frühen und des HOPS-Komplex (Vps39, Vps41) an die späten Endosomen vermitteln. Nma1 wurde in Vorarbeiten als Interaktionspartner der Vps3-Untereinheit identifiziert und nimmt über diese Bindung Einfluss auf die Funktion des CORVET-Komplexes und damit auf die Fusion der frühen Endosomen. Die Population der frühen Endosomen in *U. maydis* zeigt funktionelle Redundanz, in Bezug auf ihre beiden spezifischen Rab5-GTPasen Rab5a und Rab5b und deren Interaktion mit dem CORVET-Komplex. Nma1 beeinflusst den CORVET-Komplex über eine Maskierung der Interaktion der CORVET-spezifischen Untereinheit Vps3 mit den frühen Endosomen. Dadurch erfolgt eine Kontrolle der Fusionsrate von frühen Endosomen und stellt sicher, dass für die Langstreckentransportprozesse stets die benötigte Anzahl an frühen Endosomen zur Verfügung steht.

Neben der Lokalisierung von Nma1 über Vps3 auf den frühen Endosomen konnte auch eine Assoziation mit dem Mikrotubulizytoskelett beobachtet werden. Die Lokalisierung entlang der Mikrotubulifilamente ist unabhängig von endosomalen Transportvorgängen. Während der mitotischen Zellteilung ist die Rab5a-GTPase, welche mit den frühen Endosomen assoziiert ist, für die Spindelstabilität, die zyklusphasenabhängige Koordination der Ausbildung von astralen Mikrotubuli und die Zytokinese im Anschluss an die Mitose relevant. Über Nma1, welches eine SMC-Domäne enthält (structural maintenance of chromosomes), erfolgt die

## Zusammenfassung

Lokalisierung von Rab5a an die Spindelpolkörper. Eine Funktion der frühen Endosomen bei der Anheftung der Kinetochore an die Mitosespindel wurde auch für Säugetierzellen beschrieben. Ergänzend wurde die Lokalisierung von Rab5a und der zweiten Rab5-GTPase aus *U. maydis*, Rab5b, an der Zytoplasmabrücke für die Zytokinese nachgewiesen. Denkbar ist eine Funktion beim Transport von Septinen und Proteinen mit Relevanz für die Abschnürung von Mutter- und Tochterzelle.

Während Rab5a in *U. maydis* Funktionen an der Mitosespindel erfüllt, gibt es Anhaltspunkte, dass Rab5b essenziell für die korrekte Chromosomensegregation während der Meiose ist. Die Deletion von *rab5b* führt in Stämmen, welche die meiotische Teilung durchlaufen zu einer fehlerhaften Chromosomenverteilung und daraus resultierend zu genomischer Instabilität und Aneuploidie. Um die speziellen Anforderungen für die Zellteilung bei Meiose und Mitose zu erfüllen, kommen häufig verschiedene, jedoch strukturähnliche Proteine zum Einsatz. Eine Funktion der frühen Endosomen während Zellteilungsvorgängen, bisher in Pilzen nicht bekannt, wurde in Säugetierzellen nachgewiesen. Die beobachteten Funktionen von Rab5b bei der meiotischen Zellteilung und Funktionen von Rab5a bei der Mitose deuten auf einen evolutionär konservierten Mechanismus hin.

## Summary

The basidiomycete *Ustilago maydis* is an important model organism for plant pathogenic, filamentous fungi. The pathogenic stage starts after fusion of two compatible sporidia, which grow as a dikaryotic filament henceforward. Within the filament, long distance transport by early endosomes is of particular importance, as these vesicles for example transport protein cargo and mRNA through the cell.

Sorting of early endosomes and homotypic fusion events are mediated by the CORVET complex. CORVET consists of the four core components, Vps11, Vps16, Vps18 and Vps33, which are also represented in the late endosomal HOPS complex. Both complexes differ in two additional subunits which guarantee specific binding of CORVET (Vps3, Vps8) to early endosomes and of HOPS (Vps39, Vps41) to late endosomes for fusion of these endocytic compartments. We have previously identified Nma1 as an interactor for CORVET. Nma1 is influencing the function of CORVET complex in order to adjust the early endosomal fusion. The population of early endosomes in *U. maydis* shows functional redundancy regarding their specific Rab GTPases Rab5a and Rab5b and their interaction with CORVET complex. Nma1 influences the CORVET complex by protecting the binding of the specific subunit Vps3 to early endosomes, in order to control endosomal fusion. This mechanism guarantees an extended availability of the subpopulation of early endosomes involved in long distance transport processes.

An association of Nma1 with the microtubule cytoskeleton has been discovered in addition to localization of Nma1 via Vps3 to early endosomes even when endosomal transport has been abolished. During mitotic cell division the early endosome associated Rab5a GTPase ensures stability of the spindle, cell cycle dependent formation of astral microtubules and cytokinesis. In combination with Nma1, which contains a SMC domain (*structural maintenance of chromosomes*), Rab5a is localized at the spindle pole body. The importance of early endosomes for the proper attachment of chromosomal kinetochores to spindle microtubules has been described in mammalian cells. Additionally localization of both Rab5a and Rab5b at the cytoplasmic bridge for cytokinesis in *U. maydis* could be shown in this study. Presumably they fulfill functions for transport of septins and other proteins for successful separation of mother and daughter cells.

## Summary

While Rab5a in *U. maydis* is involved in the mitotic cell division Rab5b appears to be essential for proper segregation of chromosomes during meiosis. Deletion of *rab5b* causes incorrect chromosome separation during meiosis, resulting in genomic instability and aneuploidy. To fulfill the specialized requirements for meiosis and mitosis the usage of different yet structurally similar proteins is common. A function of early endosomes during nuclear cell division, previously not known in fungi, is known from mammalia. The observation of Rab5b functions for meiotic cell division and Rab5a functions for mitosis indicate an evolutionary conserved mechanism.

## 2. Einleitung

### 2.1. *Ustilago maydis* als Modellorganismus

Kalkulationen zufolge wird durch Pilzinfektionen jährlich die Getreidemenge, welche etwa 8,5 % der Weltbevölkerung ernähren könnte, unverwertbar (Oerke, 2006, Fisher *et al.*, 2012, Almeida *et al.*, 2019). Trotz einiger Versuche zur Verwendung von biologischen Kontrollmitteln bleibt die Hauptwaffe im Kampf gegen pilzliche Pflanzenpathogene nach wie vor der Einsatz von chemischen Fungiziden. Der Bedarf zeigt sich beispielsweise in einem jährlichen Absatz von 600 Millionen US\$ allein in den USA. Dieser Einsatz von chemischen Fungiziden ruft jedoch zahlreiche, unerwünschte Nebeneffekte hervor, wie beispielsweise toxische Effekte auf andere Organismen, daraus resultierende Ungleichgewichte in den Ökosystemen und sogar Auswirkungen auf den Konsumenten. Verwendete Fungizide können nur langsam degradiert werden und können durch den Verbleib in der Erde auch zu einer Kontamination von Wassersystemen führen (zusammengefasst in Shuping und Eloff, 2017). Neben den Einflüssen auf Nahrungsmittel können humanpathogene Pilze auch dem Menschen direkt gefährlich werden. Zu den bedeutendsten Krankheitserregern zählen hierbei *Candida albicans* und *Aspergillus fumigatus*. Eine vergleichsweise hohe Mortalitätsrate von 28 % zeigt den Optimierungsbedarf der Therapiemöglichkeiten auf (Bitar *et al.*, 2014, Zhang und Zhu, 2020). Die Behandlung von Pilzinfektionen im medizinischen Anwendungsfeld oder in der Agrarverwendung erfolgt hauptsächlich durch Antibiotika oder Fungizide, welche teilweise auf ähnlichen Stoffen und Wirkmechanismen beruhen. Durch den kontinuierlichen Einsatz eines bestimmten Stoffes zur Bekämpfung wird die Etablierung von Resistenzen auf Seiten der Mikroorganismen gefördert. Dies hat weitreichende Folgen: Medizinisch relevante Pilzarten können durch den Einsatz von Fungiziden in der Landwirtschaft Resistenzen entwickeln, wodurch sie auch im Kontext einer medizinischen Behandlung nicht mehr anfällig für den verwendeten Wirkstoff sind (Verweij *et al.*, 2009).

Eine Infektion durch *U. maydis* verursacht Ernteauffälle zwischen 2 % und 20 % (Martinez-Espinoza *et al.*, 2002, Fisher *et al.*, 2012). Einen weitaus größeren Schaden verursachen dagegen die verwandten Rostpilze (Vivek, 2009, Bandara *et al.*, 2020). Diese können jedoch im Gegensatz zu *U. maydis* nicht zu Untersuchungszwecken im

## Einleitung

Labor kultiviert werden. Der Maisbeulenbrand hat im Gegensatz zu den Rostpilzen einen dimorphen Lebenszyklus, welcher sowohl eine saprophytische als auch eine biotrophe Phase aufweist. Die saprophytische Phase ermöglicht eine simple Kultivierung der haploiden Sporidien im Labor. In der biotrophen Phase sind Studien über die Auswirkung von Veränderungen auf die Pilz-Pflanzen-Interaktion möglich. Der vollständige Lebenszyklus ist innerhalb weniger Wochen abgeschlossen, wodurch die Auswertung von Versuchsergebnissen bereits nach kurzer Zeit erfolgen kann. Die Verwandtschaft zu *U. maydis* ermöglicht es, gewonnene Erkenntnisse auf Rostpilze zu übertragen und somit möglicherweise Ernteverluste zu vermindern. Dadurch hat sich *U. maydis* inzwischen als einer der wichtigsten Modellorganismen für phytopathogene Pilze etabliert. Durch die Grundlagenforschung an Modellorganismen, die sich unter anderem durch die bereits beschriebene simple Kultivierung im Labor, aber auch durch eine gute genetische Zugänglichkeit auszeichnen, kann das Verständnis über grundlegende Prozesse im pilzlichen Metabolismus erweitert werden. Diese Erkenntnisse liefern neue Angriffspunkte für Fungizide in der Landwirtschaft oder für medizinische Behandlungen. Auch die Untersuchung der Signalwege, über welche die Kommunikation zwischen Pathogen und Wirtsorganismus abläuft, kann zu wichtigen Erkenntnissen im Kampf gegen Pilzinfektionen führen.

Das Genom von *U. maydis* ist durch die effiziente homologe Rekombination gut für Manipulationen zugänglich, welche durch die Veröffentlichung der vollständigen Genomsequenz erleichtert werden (Kämper *et al.*, 2006). Des Weiteren wurde ein bekanntes Modell von R. Holliday über die DNA-Reparaturmechanismen mittels homologer Rekombination mit Hilfe des Maisbeulenbrandes ausgearbeitet (Holliday, 1964).

Auch im Hinblick auf zellbiologische Aspekte hat sich *U. maydis* als hervorragender Modellorganismus etabliert (zusammengefasst in Steinberg und Perez-Martin, 2008, Matei und Doehlemann, 2016). Besonderes Augenmerk kann hierbei auf den Langstreckentransport, sowie die Endo- und Exozytose gelegt werden (siehe Kapitel 2.3). Filamentöse Pilze bilden Hyphenzellen aus, welche sich durch polares Spitzenwachstum verlängern. Phänotypisch sowie in Aspekten der Transportprozesse wurden bereits Ähnlichkeiten zwischen solchen Hyphenzellen und den Neuronen von Säugetieren nachgewiesen. Sowohl bei den Mikrotubuli in Neuronen als auch dem



Zytoskelett von *U. maydis* (Steinberg und Perez-Martin, 2008) (siehe Kapitel 2.2) fungieren die dynamischen Polymere aus Tubulin als Schienen für zielgerichtete, intrazelluläre Langstreckentransportprozesse entlang der Hyphen bzw. Axone (zusammengefasst in Gerdes und Katsanis, 2005). Eine weitere Gemeinsamkeit von filamentösen Pilzen und Neuronen (Yoon *et al.*, 2016) ist der zielgerichtete Langstreckentransport von RNA entlang der Mikrotubuli. Mit Rrm4 konnte in *U. maydis* ein Protein identifiziert werden, welches an mRNA bindet und gemeinsam mit dieser auf Endosomen entlang der Mikrotubuli transportiert wird. Dieser Prozess ist von hoher Wichtigkeit für das filamentöse Wachstum der Pilzhyphe (Becht *et al.*, 2006, König *et al.*, 2009, Olgeiser *et al.*, 2019).

Eine weitere Gemeinsamkeit mit Mammalia-Zellen, die *U. maydis* zu einem wertvollen Modellorganismus für zell- und entwicklungsbiologische Studien macht, ist die Mitose (zusammengefasst in Steinberg und Perez-Martin, 2008) (siehe Kapitel 2.7). Im Gegensatz zu den meisten anderen Pilzen, welche eine geschlossene Mitose durchlaufen (zusammengefasst in Heath, 1980), konnte in *U. maydis*, eine für höhere Eukaryoten charakteristische offene Mitose beobachtet werden. Des Weiteren läuft auch die Cyclin-vermittelte Regulation des Zellzyklus in *U. maydis* ähnlich wie für höhere Eukaryoten beschrieben ab (Furuno *et al.*, 1999, Garcia-Muse *et al.*, 2004). Basierend auf den genannten Parallelen zwischen *U. maydis* und höheren Eukaryoten, in Kombination mit der erwähnten molekulargenetischen Zugänglichkeit und der guten Kultivierbarkeit im Labor, können viele Abläufe von grundlegenden biologischen Vorgängen in diesem System untersucht und die Erkenntnisse anschließend auf höhere eukaryotische Zellen übertragen werden.

Der phytopathogene Pilz *Ustilago maydis* ist Auslöser des Maisbeulenbrandes, einer Krankheit, die tumorartige Auswüchse an verschiedenen Pflanzenteilen hervorruft. Wie der Name der Krankheit impliziert, ist das Wirtsspektrum von *U. maydis* sehr spezifisch und beinhaltet lediglich die Maispflanze selbst (*Zea mays*) sowie das nah verwandte Gras Teosinte (*Zea mays ssp. mexicana*), die Ursprungsform des heutzutage bekannten Kulturmais (Doebley, 1992). Systematisch wird *U. maydis* in das Subphylum *Ustilaginomycotina* der *Basidiomycota* (Ständerpilze) eingeordnet und gehört somit zu den Brandpilzen (Begerow *et al.*, 2006). Dieser Name rührt von der Morphologie der Sporen her, welche die befallene Pflanze verbrannt aussehen lassen

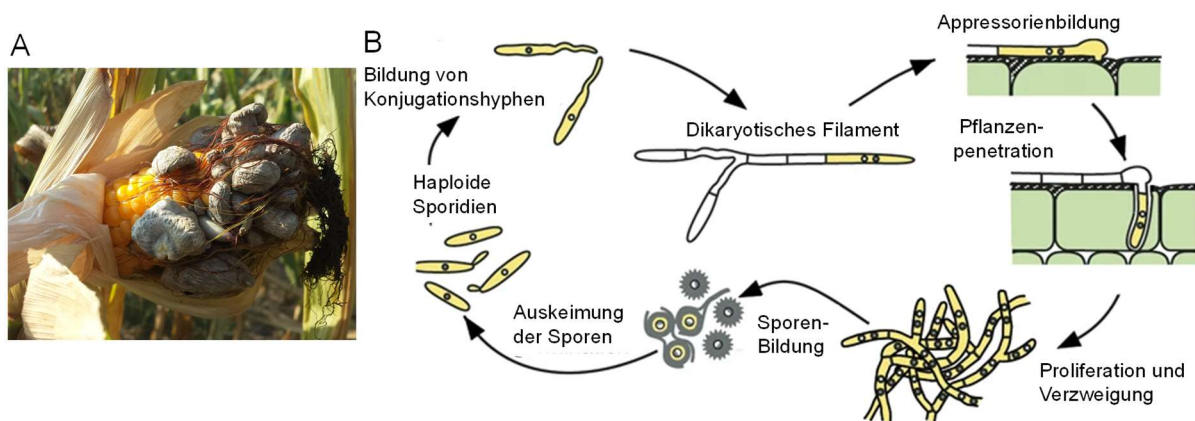
## Einleitung

(Abb. 1A). Nahverwandte und ebenfalls phytopathogene Pilze wie *Ustilago hordei* oder *Ustilago tritici* werden ebenfalls diesem Phylum zugeordnet.

Eine Infektion der Maispflanze durch *U. maydis* führt zu Tumorwachstum, welches an sämtlichen Pflanzenteilen mit Ausnahme der Wurzeln zu beobachten ist. Das Immunsystem der Pflanze reagiert auf den Befall mit der Bildung von Chlorosen und Anthocyanen. Dies führt zu Verfärbungen des pflanzlichen Gewebes ins Dunkelrote oder sogar Bläulich-Violette. Die Gallen einer infizierten Pflanze enthalten die durch Melanineinlagerung in der Sporenhülle dunkel verfärbten Teliosporen von *U. maydis*.

Der Lebenszyklus von *U. maydis* (Abb. 1B) besteht aus einer saprophytischen und einer biotrophen Phase. Die saprophytische Phase wird durch die Keimung der diploiden Teliosporen eingeleitet. Währenddessen durchlaufen die Zellen die Meiose. Die entstehenden haploiden Zellen vermehren sich durch hefeartige Knospung (zusammengefasst in Christensen, 1963). Erforderlich für die Infektion einer Pflanze ist die Verschmelzung zweier kompatibler haploider Zellen. Die gegenseitige Erkennung der beiden Zellen erfolgt über ein Pheromon-Rezeptorsystem, welches aus Sieben-Transmembrandomän-Rezeptoren und Lipopeptid-Pheromonen besteht (Spellig *et al.*, 1994, Szabo *et al.*, 2002). Die Kompatibilität zweier Sporidien ist genetisch von den Paarungstyploci abhängig. Miteinander kompatible Partner verschmelzen an den Spitzen, der Zellzyklus wird in der G2-Phase arretiert und die Plasmogamie eingeleitet (Snetselaar *et al.*, 1996). Es bildet sich ein filamentös wachsendes Dikaryon mit einer definierten Polaritätsachse, welches die infektiöse Form des Pilzes darstellt. In dieser biotrophen Phase wächst das Filament in engem Kontakt zur Pflanzenoberfläche, jedoch ohne sich zu teilen. Der dabei ablaufende Signalaustausch führt zur Ausbildung von appressorienähnlichen Strukturen (Mendoza-Mendoza *et al.*, 2009, Lanver *et al.*, 2010). Diese spezialisierten Infektionsstrukturen machen es *U. maydis* erst möglich in das pflanzliche Gewebe einzudringen. Erst im Anschluss wird der G2-Zellzyklusarrest aufgehoben und die Pilzhyphen wachsen auch intrazellulär. Dabei wird die pflanzliche Plasmamembran eingestülpt, bleibt somit intakt und es kann eine enge Interaktionszone zwischen den Pilzhyphen und kolonisierten Pflanzenzellen entstehen (Snetselaar und Mims, 1993). In späteren Infektionsstadien wächst der Pilz auch interzellulär Richtung Gefäßbündel (Doehlemann *et al.*, 2008). Die Wirtszellen zeigen eine stark erhöhte Teilungsrate, welche in der Bildung tumorähnlicher Strukturen resultiert. Nach der Karyogamie

durchläuft die Hyphe eine Fragmentierung, durch die jedes Fragment mit einem fusionierten Zellkern ausgestattet wird. Innerhalb der Gallen reifen die schwarzen, diploiden Teliosporen. Platzen die Gallen auf, können die Sporen mit Hilfe des Windes verbreitet werden. Unter geeigneten Bedingungen keimen die Teliosporen aus und bilden ein Promycelium, welches die Meiose durchläuft. Dadurch entstehen haploide Sporidien und der Lebenszyklus schließt sich (Christensen, 1963, Steinberg und Perez-Martin, 2008).



**Abb. 1: Lebenszyklus von *Ustilago maydis***

**A)** Bei Infektion durch *U. maydis* wächst jedes Maiskorn zu einem gallenartigen, weißen Tumor aus. Diese beherbergen die schwarzen, melaninhaltigen Teliosporen, welche zu Ausbreitungszwecken durch Aufplatzen der Gallen freigesetzt werden. Ebenfalls können Tumore an Blättern und Stamm entstehen (Aufgenommen August 2019 in einem Maisfeld in Böhl-Iggelheim, zur Verfügung gestellt von L. Baumann). **B)** Eine schematische Darstellung des Lebenszyklus des Maisbeulenbrandes mit Auskeimung der Sporen zu haploiden Sporidien, Verschmelzung kompatibler Sporen zu dikaryotischen Filamenten und anschließender Penetration der Pflanze. Im Inneren der Pflanze erfolgt die Proliferation der Pilzhyphen und die Bildung der Teliosporen (Abb. nach Kämper *et al.*, 2006).

## 2.2. Das Zytoskelett in eukaryotischen Zellen

Eukaryotische Zellen haben die Fähigkeit ihre Form als Reaktion auf Umgebungssignale anzupassen, auf chemische Stoffe zu reagieren, sich durch Gewebe zu bewegen und sich zu teilen. Alle diese Prozesse werden durch die (Dis-) Assemblierung von Zytoskelettproteinen gesteuert. Das eukaryotische Zytoskelett besteht aus drei Hauptbestandteilen: Aktin, Tubulin und Proteinen, die Intermediärfilamente bilden (zusammengefasst in Hohmann und Dehghani, 2019).

Das Mikrotubulizytoskelett besteht aus  $\alpha$ - und  $\beta$ -Tubulin Heterodimeren, welche am MTOC (*microtubule organization center*) entstehen. Dort wirkt  $\gamma$ -Tubulin

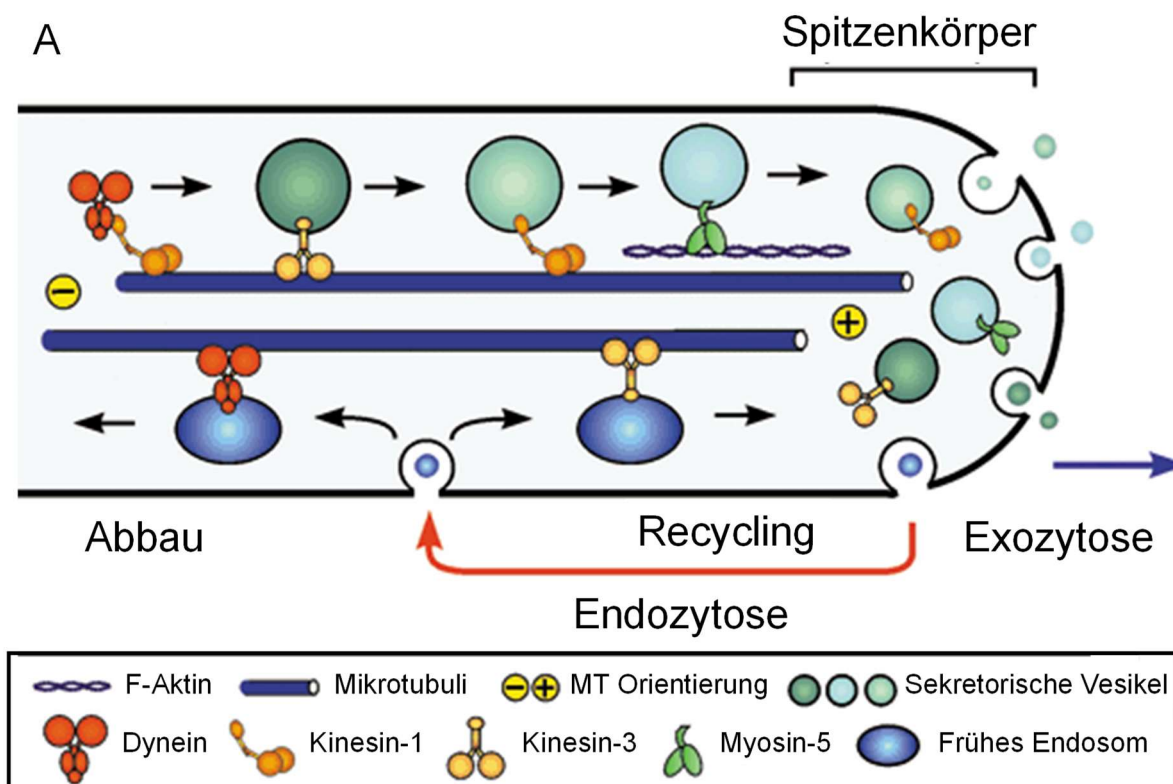
## Einleitung

(Oakley und Oakley, 1989) als Mikrotubuli-Nukleator, um erste Tubulin-Dimere zu rekrutieren und um Anker- sowie Adapterproteine am Minusende der Mikrotubuli anzuheften (zusammengefasst in Wu und Akhmanova, 2017, Job *et al.*, 2003). Diese MTOCs können mit dem Nukleus oder dem Spindelpolkkörper assoziiert sein, aber auch zytoplasmatisch auftreten (Straube *et al.*, 2003). Mikrotubuli zeigen ein dynamisches Instabilitätsverhalten mit einem plötzlichen Umschalten zwischen Wachstum, Wachstumsarrest und Depolymerisierung (Inoue und Sato, 1967, Mitchison und Kirschner, 1984). Während der Polymerisierungsphase assemblieren GTP-gebundene Tubulinheterodimere an dem Plusende und werden kurz darauf hydrolysiert. Dadurch entsteht eine sogenannte GTP-Kappe, welche vor Disassemblierung schützt. Das Minusende bleibt dagegen in Kontakt mit den MTOCs (zusammengefasst in Hohmann und Dehghani, 2019).

Auch für pilzspezifischen Vorgänge übernimmt das Zytoskelett wichtige Funktionen. Apikale Erweiterungen der Hyphenzellen sind die Grundlage für das Eindringen in Wirtsorganismen (zusammengefasst in Deising *et al.*, 2000), für die Kolonisierung von Substraten wie Erde oder Gewebe (zusammengefasst in Wessels, 1993) oder auch für symbiotische Interaktionen, wie sie Mykorrhizapilze eingehen (Genre *et al.*, 2005). Für die dafür notwendigen Umstrukturierungen sind Transportprozesse an die Hyphenspitze von enormer Bedeutung. Auch in *U. maydis* unterstützt der auf Endosomen und Vesikel basierende Transport das Hyphenwachstum und die pathogene Interaktion mit dem Wirtsorganismus (Wedlich-Söldner *et al.*, 2000, Fuchs *et al.*, 2006). Die dafür notwendigen Endosomen werden entlang des Mikrotubulizytoskeletts transportiert (Schuchardt *et al.*, 2005). Mit Tub1 (UMAG\_01221), dem  $\alpha$ -Tubulin (Steinberg *et al.*, 2001), Tub3 (UMAG\_10558) und Tub4 (UMAG\_05828), den beiden  $\beta$ -Tubulinen (Shiel, 2014), besitzt *U. maydis* drei Proteine, die für den Aufbau der Mikrotubulifilamente zuständig sind. Des Weiteren konnte auch ein  $\gamma$ -Tubulin, Tub2 (UMAG\_03803), identifiziert werden, welches am MTOC die Bildung von Mikrotubuli initiiert (Straube *et al.*, 2003). Sporidien von *U. maydis* enthalten in der Interphase drei bis sechs Mikrotubulistrukturen (Steinberg *et al.*, 2001), welche aus individuellen oder gebündelten Mikrotubuli bestehen (Straube *et al.*, 2006).

Die Proteinstrukturen des Mikrotubuli-Zytoskeletts dienen als Transportwege für die Motorproteine, welche den Langstreckentransport realisieren (Fuchs *et al.*, 2005).

Kin1 (UMAG\_04218) ist verantwortlich für den Transport von sekretorischen Vesikeln in Richtung des Spitzenkörpers (Lehmler *et al.*, 1997). Kin3 (UMAG\_06251) bewegt Endosomen zum Plusende der Mikrotubuli (Wedlich-Söldner *et al.*, 2002, Lenz *et al.*, 2006). Kin1 spielt jedoch eine weitere wichtige Rolle, in welcher es Dyneinmotoren an das Plusende der Mikrotubuli transportiert, damit diese dort ihre Transportfunktionen in Richtung des Minusendes weiter erfüllen können (Lenz *et al.*, 2006). Eine schematische Übersicht der Transportfunktion des Zytoskeletts ist in Abb. 2 dargestellt.



**Abb. 2: Das Zytoskelett von *U. maydis***

A) In *U. maydis* besteht das Zytoskelett aus Aktinfilamenten und Mikrotubuli, welche aus  $\alpha$ - und  $\beta$ -Tubulin Heterodimeren aufgebaut sind. Entlang dieser fibrillären Strukturen transportieren verschiedene Motorproteine in Vesikeln verpackte Fracht von der Spitze in das Innere der Zelle und umgekehrt. Für den Transport entlang der Aktinfilamente ist Myosin-5 stellvertretend dargestellt. Entlang der Mikrotubuli sorgen Kinesine für den Transport in Richtung des Plusendes, den Transport zum Minusende übernimmt Dynein. Um zu gewährleisten, dass ausreichend Dyneinmotoren am Plusende der Mikrotubuli bereitstehen, sorgt Kin1 für die Rückführung der Dyneinproteine. Abb. modifiziert nach (Steinberg, 2007).

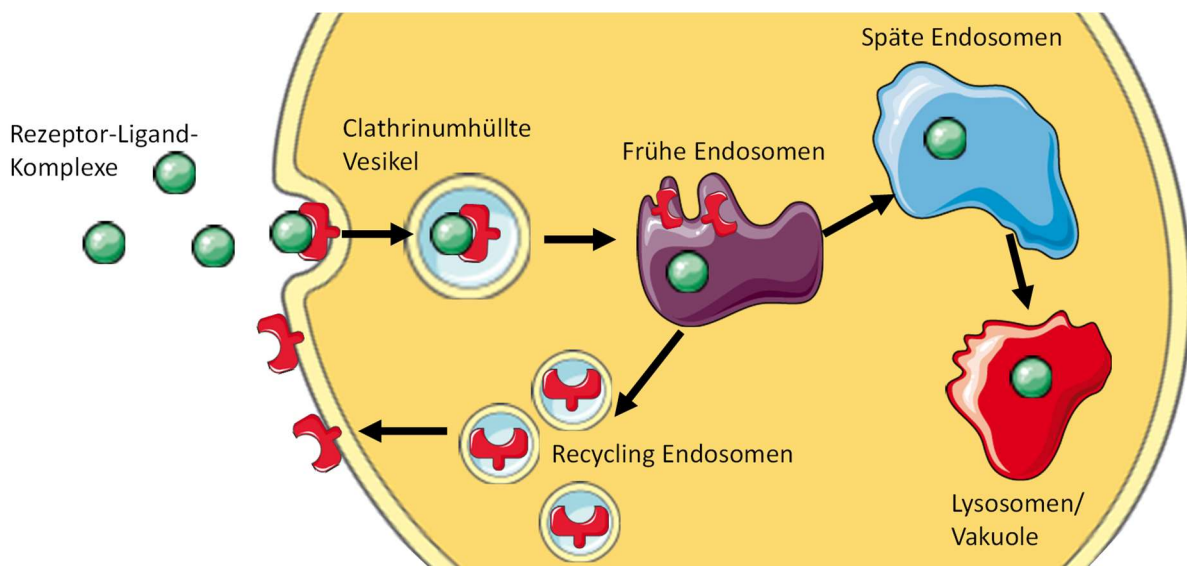
### 2.3. Vesikuläre Transportprozesse

Viele zelluläre Bestandteile, welche innerhalb der Zelle mobilisiert werden müssen, werden mithilfe von Komponenten der vesikulären Transportmaschinerie, wie beispielsweise Endosomen, transportiert. Der Vesikeltransport beschreibt grundlegende intrazelluläre Transportwege, um Substanzen von der Zellmembran in das Innere der Zelle und umgekehrt zu transportieren oder innerhalb der Zelle zwischen verschiedenen Organellen auszutauschen. Ein effizient ablaufender Vesikeltransport ist für apikales Wachstum, wie es beispielsweise bei filamentösen Pilzen vorkommt, ausschlaggebend (Penalva, 2010). Die apikale Extension der Hyphe erfordert eine kontinuierliche Lieferung von Membranen und Proteinen an den Spitzenkörper (Grove und Bracker, 1970, Crampin *et al.*, 2005). Transportvesikel sind ebenfalls zuständig für die Wiederverwertung nicht mehr benötigter Proteine und Lipide, wie Zellendmarker oder Rezeptoren, sowie für den Transport von Membranbestandteilen und zellwandmodellierenden Enzymen an ihren Bestimmungsort (Penalva *et al.*, 2012). Die relevanten Komponenten der endozytotischen Vorgänge sind sowohl in filamentösen Pilzen, wie *Neurospora crassa* oder *U. maydis*, als auch in nichtfilamentösen Pilzen, wie *Saccharomyces cerevisiae*, vertreten (Read, 2003, Fuchs und Steinberg, 2005).

Um die Homöostase innerhalb einer Zelle zu gewährleisten ist ein Prozess wie die Endozytose von essenzieller Bedeutung. Viele der molekularen Abläufe sind von Pilzen wie *S. cerevisiae* bis zum Mensch hochkonserviert und zeugen damit von ihrer Relevanz (Geli und Riezman, 1998). Dabei kommt es zu einer kontinuierlichen, jedoch streng regulierten Bildung von Membranvesikeln an der Plasmamembran. Die Endozytose ist unter anderem dafür zuständig, dass Protein- und Lipidkomponenten, die während sekretorischer Aktivitäten in die Plasmamembran eingebaut werden, zurückgewonnen werden können (Helenius, 1983). Des Weiteren werden metabolische und proliferative Signale weitergeleitet, essenzielle Nährstoffe aufgenommen, Mikroorganismen abgewehrt und die Interaktion mit der Umwelt reguliert. Die Membrankomponenten der endozytotischen Vesikel sind dabei ausschlaggebend, um den Bestimmungsort zuordnen zu können (Mellman, 1996). Viele zelluläre Komponenten in *Schizosaccharomyces pombe* werden bidirektional entlang von Mikrotubuli transportiert und sind damit auf sogenannte Adapterkomplexe angewiesen, welche gleichzeitig Motorproteine gegensätzlicher Polarität binden

können. Die Affinität dieser Bindung ist ausschlaggebend für die Transportrichtung (Akhmanova und Hammer, 2010).

Der detaillierte Ablauf der Endozytose in tierischen Zellen ist in Abb. 3 veranschaulicht. Für die Aufnahme von Stoffen in die Zelle erfolgt durch eine Interaktion zwischen Rezeptoren und Liganden zunächst die Bildung von Clathrin-umhüllten Vesikeln an der Plasmamembran. Die Initiierung dieses Prozesses erfolgt durch die Ansammlung von endozytotischen Hüllproteinen an der inneren Schicht der Plasmamembran und der Rekrutierung weiterer Hüllproteine aus dem Zytosol (Kalthoff *et al.*, 2002). Die sich im Aufbau befindliche Hülle leitet eine Aktin-vermittelte Membrankrümmung ein. Aufgrund der Polymerisierung von Aktinfilamenten und Nukleation neuer Filamente erfolgt die Einstülpung der Membran (Picco *et al.*, 2018). Durch das Mitwirken von assoziierten Proteinen wie Dynamin kommt es zu einer Kontraktion der Membran, wodurch sich das Vesikel abschnüren kann (Danino *et al.*, 2004, Shawn M Ferguson 2009, Shi *et al.*, 2019). Ebenfalls diskutierte Modelle sind die Einbringung eines Filters durch angelagerte Proteine, wodurch eine Lipidphasentrennung erfolgt und sich das Vesikel separieren kann (Liu *et al.*, 2006).



### Abb. 3: Komponenten der Endozytose

Rezeptoren und Liganden bewirken die Bildung von clathrinumhüllten Vesikeln an der Plasmamembran, welche die Rezeptor-Ligand-Komplexe zu den frühen Endosomen transportieren. Freie Rezeptoren akkumulieren in frühen Endosomen und werden durch Abknospung den Recycling-Endosomen zugeführt und zu der Plasmamembran zurückgebracht. Liganden und andere Makromoleküle werden anhand der Größe ausgeschlossen, bleiben in den frühen Endosomen zurück, welche zu späten Endosomen heranreifen (Abenza *et al.*, 2010). In den späten Endosomen und anschließend den Lysosomen kommt es zur Degradierung (Mellman, 1996). Abbildung modifiziert nach (Mellman, 1996).

## Einleitung

Diese Vesikel transportieren Rezeptor-Ligand-Komplexe zu den frühen Endosomen. In den frühen Endosomen herrscht durch eine ATP-getriebene Protonenpumpe ein leicht saurer pH-Wert, welcher für die Dissoziation der Komplexe sorgt (Al-Awqati, 1986, Forgac, 1992, Mellman *et al.*, 1986). Freigewordene Rezeptoren akkumulieren in den frühen Endosomen, werden durch Abknospung den Recycling-Endosomen zugeführt und an die Plasmamembran zurückgebracht. Da aus sich abtrennenden Regionen der frühen Endosomen Liganden und andere Makromoleküle aufgrund ihrer Größe ausgeschlossen werden, verbleiben diese in den frühen Endosomen (Mellman, 1996), welche dann zu späten Endosomen heranreifen können (Abenza *et al.*, 2010). In den späten Endosomen und anschließend den Lysosomen oder der Vakuole sorgen ein Absinken des pH-Wertes und lysosomale Enzyme für die Degradierung (Mellman, 1996, Suzuki und Emr, 2018). Auch der Golgi-Apparat ist in der Lage Clathrin-umhüllte Vesikel zu bilden und kann dadurch neu synthetisierte Enzyme an die Plasmamembran oder an die Endosomen liefern (Kornfeld und Mellman, 1989). Untersuchungen in *S. cerevisiae* haben gezeigt, dass die Endozytose für die Entstehung früher Endosomen keine Grundvoraussetzung ist. Nach Unterbindung der Clathrin-abhängigen und -unabhängigen Endozytosewege konnte beobachtet werden, dass durch das Trans-Golgi-Netzwerk gebildete frühe Endosomen weiterhin in der Zelle transportiert werden und die organelltypischen Proteine enthalten (Nagano *et al.*, 2019).

### 2.4. Endosomenpopulationen

Während der Endozytose werden mehrere Vesikelgruppen, zu denen auch verschiedene Populationen von Endosomen gehören, durchlaufen. Dabei wird zwischen frühen, späten und wiederaufbereitenden Endosomen unterschieden. Charakteristisch für jedes dieser Organellen sind verschiedene Rab-GTPasen (*Ras-like proteins from rat brain*) (Touchot *et al.*, 1987), die eine regulatorische Funktion während des Transports durch Vesikel ausüben.



### 2.4.1. Rab-GTPasen

Im Verlauf der Evolution entstand durch die Zunahme an Komplexität der Organismen die Notwendigkeit Moleküle zwischen membranumhüllten Organellen austauschen zu können (Stenmark, 2009). Aus diesem Grund ist mit steigender Komplexität des Organismus auch eine zunehmende Anzahl an Rab-GTPasen zu beobachten. In *S. cerevisiae* konnten beispielsweise elf Rab-Proteine identifiziert werden, während im menschlichen Organismus mehr als 60 Rab-Proteine bekannt sind (Pereira-Leal und Seabra, 2001, Klöpffer *et al.*, 2012). In *U. maydis* sind zwölf Rab-GTPasen beschrieben worden (Tian *et al.*, 2014): Rab1 (Pfeffer und Aivazian, 2004), Rab2 (Garcia-Ranea und Valencia, 1998), Rab4, Rab5a, Rab5b (Pereira-Leal, 2008), Rab6 (Bednarek *et al.*, 1994), zweimal Rab7, Rab8, Rab11, YptA und YptC (*yeast protein*) (Pereira-Leal, 2008).

Diese GTPasen sind spezifische Bestandteile der Membran-Transportprozesse (Bucci *et al.*, 1992) und gehören der Ras-Superfamilie der kleinen GTPasen an (Wennerberg *et al.*, 2005). Diese untergliedert sich in die Arf/Sar-, die Rab-, die Rho- und die Ral-Familie (Mizuno-Yamasaki *et al.*, 2012a).

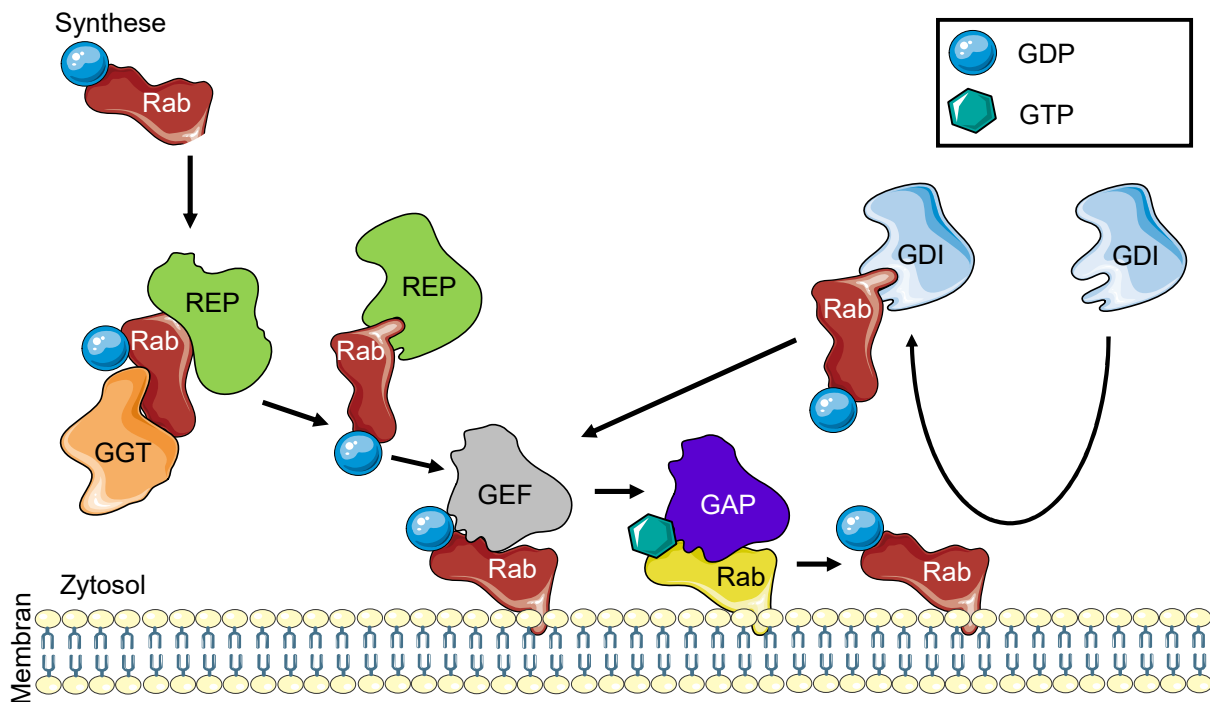
Rab-GTPasen bestehen aus einer kompakten, globulären GTP-Binde- und Hydrolysedomäne, verbunden mit einer C-terminalen Domäne, welche Einfluss auf die Lokalisierung an spezifischen Membranen hat (Itzen und Goody, 2011, Chavrier *et al.*, 1991). Für die Anlagerung an Membranen müssen die C-terminalen Cysteine durch eine Rab-Geranylgeranyltransferase (GGT) prenyliert werden. An diesem Prozess ist oft auch ein REP (*rab escort protein*) beteiligt (Andres *et al.*, 1993, Rak *et al.*, 2003). Die Membranen der verschiedenen Organellen unterscheiden sich in ihrer Lipidzusammensetzung, wodurch die Organell-Identität gewährleistet werden kann (zusammengefasst in Bigay und Antony, 2012). Durch die Prenylgruppen der Rab-Proteine zeigen diese, abhängig von Ladung und Membranzusammensetzung, eine Spezifität für ein bestimmtes Membrankompartiment (Kulakowski *et al.*, 2018).

In Säugetierzellen begleitet ein RabGDI (Rab GDP Dissoziations Inhibitor) die Rab-GTPasen im Zytosol und stabilisiert die inaktive Spezies dort, indem eine Dissoziation des gebundenen GDPs und eine Bindung von GTP verhindert wird (Sasaki *et al.*, 1990, Mottola, 2014). Über GDFs (*GDI displacement factor*) wird das Rab-Protein vom GDI gelöst und der Transport zur jeweiligen Membran vermittelt

## Einleitung

(Ullrich *et al.*, 1993, Schalk *et al.*, 1996, Dirac-Svejstrup *et al.*, 1997). Anschließend ist ein Übergang in den, von akzessorischen Proteinen kontrollierten, GTPase-Zyklus möglich (siehe Abb. 4).

Rab-Proteine pendeln in eukaryotischen Zellen zwischen dem Zytosol und der Membran des zugehörigen Transportkompartiments durch molekulares Umschalten zwischen GTP- und GDP-gebundener Konformation (Burton *et al.*, 1993). Guanin-Nukleotid-Austauschfaktoren (*guanine exchange factors*, GEFs) sorgen für die Integration der Rab-Proteine in die Membran des Zielorganells und sind damit ausschlaggebend für eine korrekte Lokalisierung. Durch eine gezielte Neulokalisierung von Rabex-5, dem GEF für die GTPase Rab5a, konnte gezeigt werden, dass anschließend die zugehörige GTPase ebenfalls an der artifiziellen Lokalisation des GEF nachgewiesen werden konnte (Blumer *et al.*, 2013). GEFs katalysieren zunächst die Entfernung von gebundenem GDP und erlauben damit die aktivierende Bindung von GTP (Ullrich *et al.*, 1994), (Mizuno-Yamasaki *et al.*, 2012b). Dieses liegt in einer so hohen zytosolischen Konzentration vor, dass sichergestellt ist, dass GTP immer bindet, sobald GDP freigesetzt wird (Stenmark, 2009). In GTP-gebundener Form können Rab-Proteine nun an ein spezifisches Set von Effektoren binden und dadurch auf die Transportmaschinerie Einfluss nehmen (Mizuno-Yamasaki *et al.*, 2012a). Zu diesen Effektoren gehören: Motoren für den Transport der Vesikel entlang des Zytoskeletts, Proteine für die Erkennung des Zielkompartimentes und Regulatoren für die Assemblierung der SNARE-Komplexe (Grosshans *et al.*, 2006). Da Rab-Proteine eine vergleichsweise langsame GTP-Hydrolyserate vorweisen, sind GTPase Aktivierungsproteine (GAPs) notwendig, um den Wechsel von Rab-GTP zu Rab-GDP durch Hydrolyse von GTP zu katalysieren (Walworth *et al.*, 1992) und terminieren dadurch die Aktivität des Rab-Proteins (Kabcenell *et al.*, 1990, Cabrera und Ungermann, 2013, Mottola, 2014). Die Rekrutierung der GAPs erfolgt jeweils durch das in der Regulationskaskade stromabwärtsliegende Rab-Protein für das vorherige Rab-Protein (Hutagalung und Novick, 2011), während dieses wiederum den GEF für seinen Nachfolger rekrutiert (Ortiz *et al.*, 2002), (Rana *et al.*, 2015). Der GDI kann durch Bindung an die Rab-Transformations-Region den Nukleotid-Status erkennen und geht einen Komplex mit geringer Bindeaffinität ein. Dadurch bindet der Geranylgeranyl-Membrananker des Rab-Proteins an den GDI, löst sich aus der Membran und wird der inaktiven, zytosolischen Rab-Population zugeführt (Pylypenko *et al.*, 2006).



#### Abb. 4: GTPase-Zyklus

Nach der Neusynthese müssen Rab-GTPasen durch eine Rab-Geranylgeranyltransferase (GGT) prenyliert werden, um eine Membranlokalisierung zu ermöglichen (Andres *et al.*, 1993, Rak *et al.*, 2003). Dieser Prozess wird von einem REP (*rab escort protein*) unterstützt. RabGDI (Rab GDP Dissoziations Inhibitor) stabilisieren die Rab-GTPasen im Zytosol (Sasaki *et al.*, 1990, Mottola, 2014). Im Laufe des GTPase-Zyklus findet ein Wechsel zwischen dem Zytosol und der Membran des zugehörigen Transportkompartiments durch molekulares Umschalten zwischen GTP- und GDP-gebundener Konformation statt (Burton *et al.*, 1993). GEFs sorgen für die Integration der Rab-Proteine in die Membran des Zielorganells, katalysieren die Entfernung von gebundenem GDP und erlauben damit die aktivierende Bindung von GTP (Ullrich *et al.*, 1994, Mizuno-Yamasaki *et al.*, 2012b). In GTP-gebundener Form können Rab-Proteine auf Effektorproteine Einfluss nehmen (Mizuno-Yamasaki *et al.*, 2012a). GTPase Aktivierungsproteine (GAPs) sind notwendig um den Wechsel von Rab-GTP zu Rab-GDP durch Hydrolyse von GTP zu katalysieren (Walworth *et al.*, 1992) und terminieren dadurch die Aktivität des Rab-Proteins (Kabaceni *et al.*, 1990, Cabrera und Ungermann, 2013, Mottola, 2014). Abbildung modifiziert nach (Zhen und Stenmark, 2015).

#### 2.4.2. Frühe Endosomen

Die Funktion der frühen Endosomen in eukaryotischen Zellen besteht in der physikalischen Separierung und Sortierung von freien Rezeptoren, dissoziierten Liganden und anderen Makromolekülen, welche über Endozytose aufgenommen wurden (Mellman, 1996). Auch die Aufnahme und der intrazelluläre Transport von Rezeptoren, wie z.B. G-Protein-gekoppelte- oder Antigenerkennungsrezeptoren, erfolgen durch die frühen Endosomen, wodurch sie eine direkte Funktion bei der Signaltransduktion ausüben (Yuan und Song, 2020). Aufgrund des leicht sauren pH-Wertes zwischen 6,2 und 6,8, erzeugt durch eine V-ATPase Protonenpumpe, dissoziieren Rezeptor-Ligand-Komplexe und werden damit einer Wiederverwendung

## Einleitung

zugänglich (Yamashiro *et al.*, 1984, Kornfeld und Mellman, 1989, Murphy *et al.*, 1984). Die frühen Endosomen fraktionieren aufgenommene Moleküle anhand deren Größe. Rezeptoren und Membranproteine sammeln sich aufgrund ihrer geringen Größe in schlauchförmigen Fortsätzen und werden zum Recycling abgeschnürt, während die löslichen Komponenten aufgrund ihres größeren Volumens in vesikulären Regionen akkumulieren und in die späten Endosomen überführt werden (Geuze *et al.*, 1983). Über die frühen Endosomen sind in *U. maydis* Transportprozesse zur Vakuole, die Verteilung von mRNA, die Unterstützung der schnellen Proteintranslation, welche während des Transportes an den Zielort stattfindet und allgemein die Verteilung der Translationsmaschinerie möglich (Becht *et al.*, 2006, Olgeiser *et al.*, 2019). Für das filamentöse Wachstum von Pilzen ist es erforderlich, dass sich frühe Endosomen entlang von Mikrotubuli bewegen können und notwendige Materialien für die apikale Extension der Zelle an die Hyphenspitze transportieren (Steinberg, 2014). Die frühen Endosomen binden für den retrograden Transport in Richtung der subapikalen Bereiche der Hyphenzelle über sogenannte Hook-Proteine an Dynein (Zhang *et al.*, 2010, Bielska *et al.*, 2014a). Für Bewegungen in anterograder Richtung dient Kinesin-3 den frühen Endosomen als Motor (Wedlich-Söldner *et al.*, 2002). Für die Identität der frühen Endosomen ist ein spezifisches Set an Rab-Proteinen zuständig. In Säugetierzellen sind das Rab4, Rab5a, Rab5b, Rab5c, Rab15, Rab18, Rab20 und Rab22 (Zerial und McBride, 2001). Das am meisten untersuchte und als Marker verwendete Rab-Protein auf frühen Endosomen ist Rab5a. Rab5a reguliert in eukaryotischen Zellen den membranumhüllten Vesikeltransport in und zwischen frühen Endosomen (Christoforidis *et al.*, 1999), die Bewegung von frühen Endosomen entlang von Mikrotubuli (Nielsen *et al.*, 1999), den Transport von clathrinumhüllten Vesikeln von der Plasmamembran zu den frühen Endosomen (Bucci *et al.*, 1992) und das Entladen ihrer Fracht (Semerdjieva *et al.*, 2008) sowie die homotypische Fusion der endozytotischen Vesikel oder der frühen Endosomen (Rink *et al.*, 2005, Mizuno-Yamasaki *et al.* 2012a, Diaz *et al.*, 1988). Für eine Fusion ist es notwendig, dass Rab5a sowohl auf der Donor- als auch auf der Akzeptormembran vorliegt (Barbieri *et al.*, 1998). Die meisten frühen Endosomen enthalten etwa  $2-3 \times 10^3$  Rab5-Moleküle und haben eine Halbwertszeit von circa zwei Minuten. Pro Minute werden in tierischen Zellen bis zu zwei homotypische Fusionen durchlaufen (Rink *et al.*, 2005).

Die Rekrutierung von Rab5a an die Membran der Endosomen erfolgt, wie Untersuchungen mit verschiedenen menschlichen und tierischen Zelllinien zeigen, durch Rabaptin-5 (Stenmark *et al.*, 1995). Nach der Rekrutierung von Rab5a an die Membran der Endosomen muss die Aktivierung durch den Nukleotidaustauschfaktor Rabex-5 oder Vps9 erfolgen. Die aktive Form von Rab5a akkumuliert lokal und kann an zahlreichen Effektoren binden. Vps3 und Vps8, Komponenten des CORVET-Komplex (*class C core vacuole/endosome tethering*) in *S. cerevisiae*, können Vps21, das Hefe-Homolog zu Rab5a, binden und vermitteln dadurch Fusionen der frühen Endosomen (Plemel *et al.*, 2011). Zu den Effektoren von Rab5a zählt ebenfalls Vps34, eine Klasse III Phosphoinositid3-Kinase (PI3K). Durch diese wird der PI(3)P-Status (*phosphatidyl-inositol-3-phosphate*) der Endosomenmembranen verändert und es können PI(3)P-Bindeproteine rekrutiert werden (Schu *et al.*, 1993, Volinia *et al.*, 1995, Burd und Emr, 1998, Corvera *et al.*, 1999).

Die Inaktivierung des Rab5a-Proteins erfolgt gemäß dem GTPase-Zyklus mit einem GAP, dem RabGAP-5 (Haas *et al.*, 2005). In Säugetierzellen konnte belegt werden, dass die Erkennung von inaktiven, membrangebundenen Rab5-Proteinen durch den GDI erfolgt, welcher durch die Komplexbildung mit dem Rab-Protein zur Umorientierung angeregt wird. Rab5 besitzt zwei Cysteinreste für posttranslationelle Geranylgeranylierung am C-Terminus (Munzberg und Stein, 2019). Diese Geranylgeranylketten werden bei der inaktiven Form im Zytoplasma zur Stabilisierung in den transient hydrophoben Bindetaschen des GDI deponiert (Edler und Stein, 2019).

Um die Funktionen der aktiven und inaktiven Form der Rab-GTPasen besser zu verstehen, wurden in BHK- (*baby hamster kidney*) und HeLa-Zelllinien (Henrietta Lacks) Mutanten generiert, welche durch Punktmutationen in den Rab-GTPasen präferenziell GTP (Q79L-Mutation, konstitutiv aktive Mutante) oder GDP (S34N-Mutation, inhibitorische Mutante) binden. Die Q79L-Mutante zeigte eine dauerhafte Membranassoziation und löste durch eine effektivere Interaktion zwischen Donor- und Akzeptorvesikeln und damit der Stimulation der Fusionen vergrößerte endozytotische Strukturen aus und erhöhte die Sekretionsrate. Ein vergleichbarer Effekt tritt auch bei erhöhten Expressionsleveln auf. Die inhibitorische Mutante verhindert dagegen die Fusion der Endosomen (Stenmark *et al.*, 1994, Messenger *et al.*, 2015).

## Einleitung

Rab5 gehört zu den evolutionär konservierten GTPasen. Vergleichende Studien verschiedener Genome zeigten, dass unabhängige Rab5-Duplikationen (Rab5a und Rab5b) bei den Basalpilzen, den Apicomplexa und den Kinetoplastida stattgefunden haben. Weitere unabhängige Duplikationen haben bei der Entstehung der Saccharomycotina und der *Angiospermae* stattgefunden. Bei den Vertebraten hingegen liegen Rab5-Isoformen sogar vierfach vor (Rab5a, Rab5b, Rab5c und Rab17) (Klöpffer *et al.*, 2012). Untersuchungen der verschiedenen Isoformen zeigten teilweise redundante, jedoch auch differenzierte Funktionen, auf.

In Mammalia-Zellen weisen Rab5A, Rab5B und Rab5C eine 80-90 %ige Sequenzidentität auf (Bucci *et al.*, 1995). Die Unterschiede zwischen den Sequenzen liegen hauptsächlich am Amino- und am Carboxyterminus, welcher die hypervariable Domäne trägt. Konserviert sind dagegen die Guanin-Nukleotid-Bindetasche, sowie Effektorbindedomänen bei Rab5A und Rab5B, was eine Interaktion mit ähnlichen Proteinen nahelegt. Die Lokalisierung (Abb. 7E) wird an der Plasmamembran, an Clathrin-umhüllten Vesikeln, sowie an frühen Endosomen beschrieben (Gorvel *et al.*, 1991, Bucci *et al.*, 1992, Wilson und Wilson, 1992). Die Funktion von Rab5C ist dagegen weitestgehend unerforscht. Erste Erkenntnisse konnten jedoch in Bezug auf eine Funktion bei der Aufnahme und Verteilung von Wachstumsfaktoren (Chen *et al.*, 2014), Antisense-Oligonukleotiden (Linnane *et al.*, 2019) oder Adhäsionsrezeptoren (Barbera *et al.*, 2019) gewonnen werden.

In *S. cerevisiae* weisen die Rab5-Isoformen (Ypt51/Vps21, Ypt52 und Ypt53) etwa 54 % Sequenzidentität und 70 % Homologie auf. Da für Hefezellen die Endozytose nicht überlebensnotwendig ist, ist keine der drei GTPasen essenziell und auch Mutanten mit Deletionen aller drei Gene sind vital. Deletionsmutanten von *vps21* oder die Tripelmutante zeigen jedoch Defekte in der Pheromondegradierung und akkumulieren Transportintermediate (Singer-Krüger *et al.*, 1994). Für Ypt52 konnte eine spezifische Interaktion mit dem F-Box Protein Roy1 identifiziert werden. Roy1 bindet dabei gezielt GDP-gebundenes oder Nukleotid-freies Ypt52, reduziert damit die Aktivierungsrate des Proteins und kann durch die damit erfolgende Unterbrechung des GTPase-Zyklus die Funktion blockieren. Der beschriebene Phänotyp von  $\Delta vps21$ -Zellen kann durch eine gleichzeitige Deletion von *roy1* komplementiert werden, da in diesem Fall die vermehrte Aktivierung von Ypt52 ermöglicht wird (Liu *et al.*, 2011). Ypt53 gewinnt dagegen an Bedeutung, wenn die Zelle einem

Nährstoffmangel ausgesetzt ist. In diesem Fall steigt das Expressionslevel von Ypt53, das Rab5-abhängige Signalnetzwerk wird ausgeweitet und damit, gemeinsam mit Vps21, der intrazelluläre Transport gewährleistet (Nakatsukasa *et al.*, 2014). Die Proteinabundanz der Rab5-Isoformen ist dabei abhängig von regulatorischen Elementen, die Einfluss auf die mRNA nehmen. Experimente, in denen *ypt53* durch die 3'- und 5'-UTR (*untranslated region*) von *vps21* exprimiert wurde, konnten den Phänotyp der *vps21*-Deletion kompensieren (Schmidt *et al.*, 2017). Vps21, Ypt52 und Ypt53 lokalisieren in *S. cerevisiae* an Endosomenmembranen (Gerrard *et al.*, 2000, Frei *et al.*, 2006). Die GTPasen wurden auf einzelnen Strukturen im Zytoplasma beobachtet, welche Vesikel aufnehmen, sich zunächst von der Membran entfernen und später durch das Zytoplasma wandern (Abb. 5A) (Frei *et al.*, 2006, Kim *et al.*, 2006).

In *A. nidulans*, einem gut verstandenen Modellsystem für filamentöse Pilze, konnten zwei Rab5-Paraloge identifiziert werden. RabA und RabB zeigen eine Colokalisierung an den frühen Endosomen. Dies gilt sowohl für kleinere, über Langstreckentransport bewegte Endosomen, als auch für größere, statische, reife Endosomen (Abb. 5B). Auch bei *A. nidulans* scheinen die Rab5-GTPasen teilweise unterschiedliche Aufgaben zu übernehmen. Die Motilität der frühen Endosomen ist lediglich in der  $\Delta rabB$ -Mutante reprimiert, nicht jedoch in  $\Delta rabA$ -Stämmen. Auch die Rekrutierung der Rab5-typischen Effektorproteine wird entweder durch RabB übernommen (z.B. Vps34 PI3K) oder zeigt zumindest eine Präferenz für RabB (z.B. CORVET) (Abenza *et al.*, 2010).

In *U. maydis* bewegt sich Rab5a ebenfalls bidirektional entlang der Mikrotubuli (Abb. 5C) (Bielska *et al.*, 2014a, Schneider, 2016). Die Deletion von *rab5a* führt in *U. maydis* dazu, dass Yup1-markierte frühe Endosomen an den Zellpolen akkumulieren und ihre Motilität unterbunden wird (Bielska *et al.*, 2014b) (Abb. 5D). Yup1 ist ein t-SNARE und lokalisiert gemeinsam mit Rab5a an den frühen Endosomen (Wedlich-Söldner *et al.*, 2000).

In eukaryotischen Zellen wird die endozytotische Fracht, welche für die Degradierung bestimmt ist, zunächst in Rab5a-positive frühe Endosomen aufgenommen und gelangt später in Rab7-positive späte Endosomen (Rink *et al.*, 2005). Für die Umwandlung von Rab5a- zu Rab7-positiven Endosomen gibt es zwei unterschiedliche Theorien. Die erste besagt, dass der HOPS-Komplex (*homotypic fusion and protein sorting*) in

## Einleitung

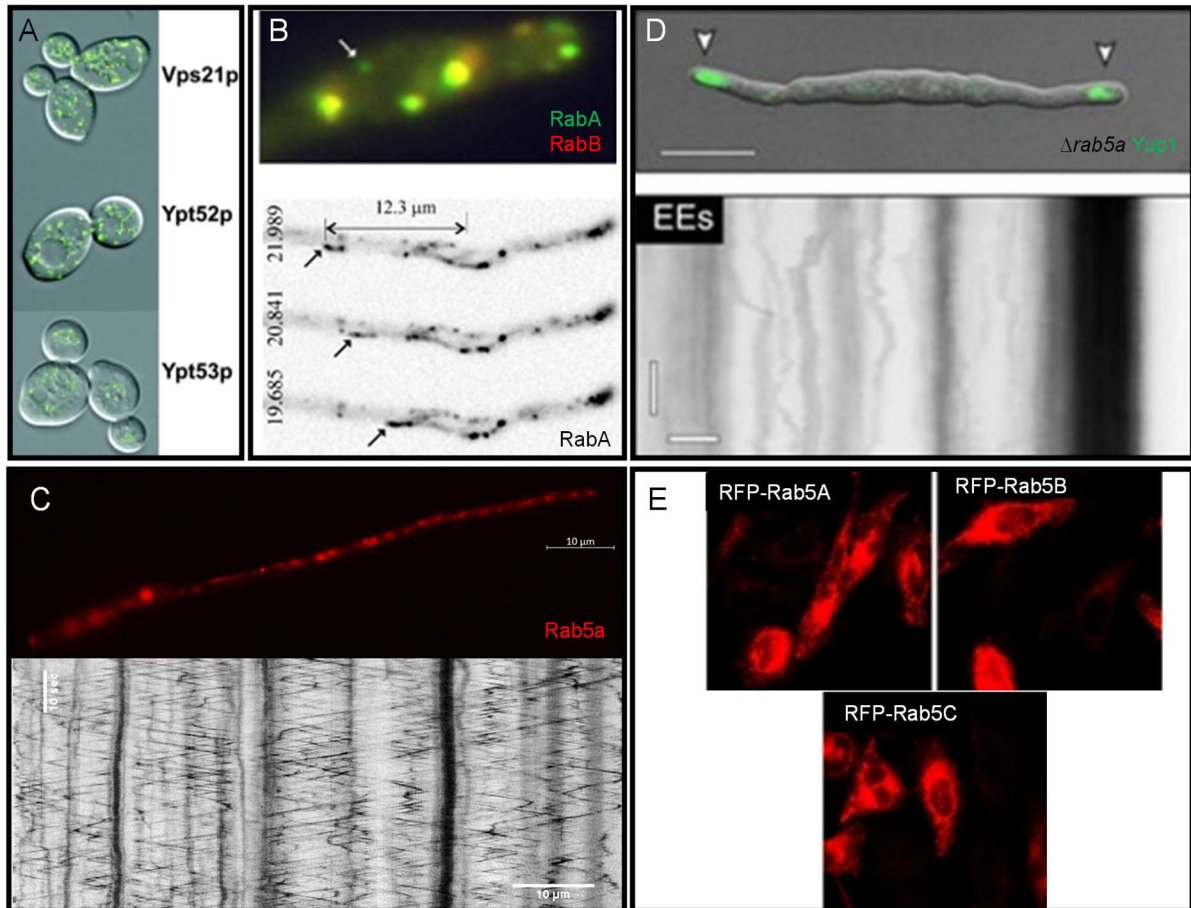
*S. cerevisiae* Rab5-GTP bindet und eine der Komponenten des Komplexes, Vps39p, eine GEF-Aktivität für Rab7 ausüben kann. Die daraus resultierende Aktivierung von Rab7 bewirkt die Reifung der frühen Endosomen zu späten Endosomen (Seals *et al.*, 2000, Wurmser *et al.*, 2000). Die zweite Theorie beschreibt den Vorgang etwas komplexer unter Involvierung eines zweiten Komplexes. In *Caenorhabditis elegans*, sowie in HeLa-Zellen und *S. cerevisiae*, wird Mon1 (*monensin sensitivity 1*) durch eine direkte Interaktion mit Rabex-5 und PI-3-P an die Membran rekrutiert, unterbricht die weitere Aktivierung von Rab5a und geht einen stabilen Komplex mit Ccz1 (*calcium caffeine zinc sensitivity 1*) ein. Der Mon1-Ccz1-Komplex kann durch Interaktion mit dem HOPS-Komplex Rab7 rekrutieren und wirkt anschließend als GEF auf Rab7 (Poteryaev *et al.*, 2010, Rana *et al.*, 2015). Die Zunahme von Rab7 in eukaryotischen Zellen führt parallel zu dem Verlust von Rab5a, wodurch die Membran konvertiert wird. Dies geschieht in Kulturen humaner Zellen durch einen direkten Rab7-Effektor, WDR91 (*tryptophan (W), aspartic acid (D) repeat protein*), welcher die Reprimierung von PI-3-P auf den Membranen der Endosomen, bewirkt (Casanova und Winckler, 2017, Liu *et al.*, 2017). Rab5-Effektoren dissoziieren gemeinsam mit Rab5 von konvertierenden Organellen (Rink *et al.*, 2005, Shearer und Petersen, 2019). Untersuchungen im filamentösen Pilz *A. nidulans* unterstützen ebenfalls das Reifungsmodell. Frühe Endosomen, welche RabA/RabB<sup>Rab5</sup> enthalten, rekrutieren RabS<sup>Rab7</sup> für die Reifung zu späten Endosomen (Abenza *et al.*, 2012). Ein gewisser Anteil an Colokalisierung zwischen Rab5a und Rab7 wurde auch in Säugetierzellkulturen beschrieben und spricht dafür, dass die Lokalisierung beider Marker sich überlappt. Zum Teil konnten Rab5a-Signale auch gemeinsam mit Markern für Lysosomen detektiert werden, weshalb davon auszugehen ist, dass Rab5a nicht vollständig aus der Membran entfernt wird (Shearer und Petersen, 2019).

Im Vergleich zu den frühen Endosomen ist der pH-Wert in den späten Endosomen der Säugetiere niedriger (Luzio *et al.*, 2007). Die späten Endosomen, auch bekannt als prälysosomales Kompartiment, sind in eukaryotischen Zellen neben Degradierungsprozessen auch für die Prozessierung von Antigenen zuständig (Berg *et al.*, 1995). In Säugetierzellen sind Rab7 und Rab9 für die Identität der späten Endosomen zuständig (Zerial und McBride, 2001). Das am meisten untersuchte und als Marker verwendete Rab-Protein ist Rab7. In Säugetieren gibt es zwei Rab7-Proteine, Rab7a und Rab7b. Diese beiden Proteine können aufgrund einer



Sequenzhomologie von lediglich 50 % und Abweichungen bei der Lokalisierung und Funktion nicht als Isoformen bezeichnet werden (Yang *et al.*, 2004). Rab7a lokalisiert an den späten Endosomen und reguliert den Transport von den frühen zu den späten Endosomen und von dort zu den Lysosomen (Chavrier *et al.*, 1990, Bucci *et al.*, 2000). Dagegen hat Rab7b einen Einfluss auf den Transport von Endosomen zum Golgi-Apparat und lokalisiert neben späten Endosomen auch am Trans-Golgi-Netzwerk (Bucci *et al.*, 2010, Progida *et al.*, 2010). In neuen Studien konnte jedoch gezeigt werden, dass auch Rab7a über die Rekrutierung des Retromer-Komplexes an die Endosomen Einfluss auf den Transport von integrativen Membranproteinen zum Trans-Golgi-Netzwerk nimmt (Modica *et al.*, 2017). In der Literatur sowie in dieser Arbeit ist mit der Bezeichnung Rab7 immer das Protein Rab7a gemeint (Guerra und Bucci, 2016).

## Einleitung



### Abb. 5: Lokalisierung von Rab5 auf frühen Endosomen

**A)** Lokalisierung der Rab5-Isoformen Vps21p (Ypt51p), Ypt52p und Ypt53p in *S. cerevisiae* auf punktuellen Strukturen im Zytoplasma, die sich zunächst von der Membran weg- und später durch das Zytoplasma bewegen (Frei *et al.*, 2006). **B)** Colokalisierung der Rab5-Homologe RabA und RabB in *A. nidulans* auf motilen Endosomen, die sich bidirektional über lange Strecken entlang der Mikrotubuli bewegen (Abenza *et al.*, 2009, Abenza *et al.*, 2010). **C)** Lokalisierung des Rab5-Homologs Rab5a in *U. maydis*: Rab5a bewegt sich auch in diesem Organismus bidirektional entlang der Mikrotubuli (Bielska *et al.*, 2014a), (Schneider, 2016). **D)** Die Deletion von *rab5a* in *U. maydis* und Markierung der frühen Endosomen durch Yup1:GFP zeigt eine Akkumulation der frühen Endosomen an den Zellpolen sowie das Ausbleiben der Motilität (Bielska *et al.*, 2014b). **E)** In Säugetierzellen lokalisieren alle drei Rab5-Isoformen an membrannahen, clathrinumhüllten Vesikeln und an motilen frühen Endosomen (Chen *et al.*, 2009).

## 2.5. Der CORVET-Komplex

Der CORVET-Komplex (*class C core vacuole/endosome tethering*), mit einem Molekulargewicht von etwa 700 kDa, enthält Klasse C Verbindungsproteine, welche Funktionen an den Endosomen übernehmen und eine wichtige Rolle für den Transport zwischen Endosomen und Vakuolen in Hefe spielen (Peplowska *et al.*, 2007). Er ist in der Lage sich unabhängig von anderen endosomalen Faktoren für die Andockung an endosomale Membranen anzulagern (Cabrera *et al.*, 2013), die homotypische Fusion von Endosomen auszulösen (Balderhaar und Ungermann, 2013) sowie den endosomalen Transport Richtung Lysosom zu koordinieren (Solinger und Spang, 2013). Zusätzlich zu der Verbindungsfunktion werden die CORVET- und HOPS-Komplexe für die Reifung von Endosomen und Vakuolen benötigt (Peplowska *et al.*, 2007), da sie als Effektor von Rab5a in menschlichen Zelllinien unter anderem die GTPase Rab7 der späten Endosomen an die Membran der frühen Endosomen rekrutieren (Rink *et al.*, 2005, Perini *et al.*, 2014). Der Kern dieses hexameren Komplexes besteht in *S. cerevisiae* aus den Klasse C Proteinen Vps11 (*vacuolar protein sorting*), Vps16, Vps18 und Vps33 (Abb. 12B) (Bankaitis *et al.*, 1986), welche gleichzeitig auch den Kern eines zweiten Komplexes, dem HOPS-Komplex (*homotypic fusion and vacuole protein sorting*) bilden (Plemel *et al.*, 2011). Der Kernkomplex ist wiederum in der Lage mit jeweils zwei spezifischen Untereinheiten zu interagieren. Bei dem CORVET-Komplex sind das Vps3 und Vps8, der HOPS-Komplex enthält zusätzlich zum Kernkomplex Vps39 und Vps41. Die komplexspezifischen Untereinheiten sind für die korrekte Lokalisierung an den Endosomenmembranen zuständig und vermitteln die Funktionalität der Komplexe. Vps3 und Vps8 können an Vps21, dem Hefe-Homolog zu Rab5a, binden, überbrücken damit die Donor- und die Akzeptormembran zweier Vesikel und vermitteln dadurch die Fusion der frühen Endosomen. Vps39 und Vps41 dagegen binden Ypt7, das Homolog zu Rab7 und sind damit für die Fusion der späten Endosomen verantwortlich (Plemel *et al.*, 2011, Ostrowicz *et al.*, 2010, Balderhaar *et al.*, 2013, Ungermann und Kümmel, 2019).

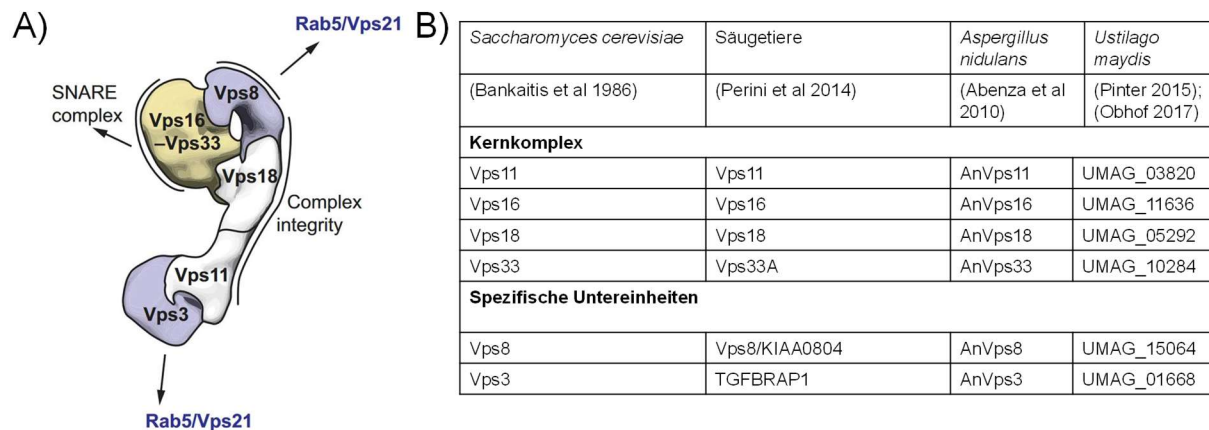
Die Einteilung der *vps*-Mutanten in Klassen erfolgte durch die Identifikation von Mutanten, welche verschiedene Defekte in ihrer Vakuolenmorphologie aufweisen. Klasse C-Mutanten, zu denen auch Deletionen von Vps11, Vps16, Vps18 und Vps33 gehören, enthalten stark fragmentierte Vakuolen (Raymond *et al.*, 1992,

## Einleitung

Banta *et al.*, 1988, Raymond *et al.*, 1990). Klasse D-Mutanten, zu denen auch Deletionen von Vps3 und Vps8 zählen, enthalten vergrößerte Vakuolen (Raymond *et al.*, 1992, Bowers und Stevens, 2005, Balderhaar und Ungermann, 2013, Raymond *et al.*, 1990). Die Einflüsse auf die Vakuolenmorphologie lassen sich durch Einbußen in der endosomalen Fusion und der Beeinträchtigung des Transportes zu den Vakuolen erklären (Cabrera *et al.*, 2013). Auch in filamentösen Pilzen wie *A. nidulans* gibt es Hinweise darauf, dass der CORVET- und HOPS-Komplex vergleichbar aufgebaut sind und agieren (Abenza *et al.*, 2010, Abenza *et al.*, 2012). Eine Deletion der CORVET-Untereinheiten führt zu schwerwiegenden Wachstumsdefekten (Lopez-Berges *et al.*, 2017). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die Organisation der beiden Komplexe von Hefe bis zum Menschen konserviert ist und homologe Proteine zu allen acht Untereinheiten gefunden wurden. Der CORVET-Komplex in Säugetieren besteht aus: TGFBRAP1 (*transforming growth factor-beta receptor-associated protein 1*) (entspricht Vps3), Vps8, Vps11, Vps16, Vps18 und Vps33A (Abb. 6B) (van der Kant *et al.*, 2015, Perini *et al.*, 2014). Die Rolle des CORVET-Komplexes in Säugetieren ist jedoch durch multiple endosomale Kompartimente mit verschiedener biochemischer Zusammensetzung und Funktion deutlich komplexer als in Hefe (Perini *et al.*, 2014).

Alle CORVET- und HOPS-Untereinheiten, mit Ausnahme von Vps33, haben, sowohl in Hefe als auch in Säugetieren ähnliche Sekundärstrukturen. Sie bestehen aus einer N-terminalen  $\beta$ -Propellerdomäne und einem C-terminalen  $\alpha$ -Solenoid (Nickerson *et al.*, 2009). Die Rab-spezifischen Untereinheiten Vps3 und Vps8 aus Hefe, sind verantwortlich für die Lokalisierung, die Zusammenlagerung des Komplexes sowie dessen Funktion (Epp und Ungermann, 2013). Vps33 in Hefe dagegen besteht aus einer  $\alpha$ -Helix, gehört zu den SNARE-interagierenden Proteinen und ermöglicht dem CORVET- sowie dem HOPS-Komplex die Bindung an t-SNAREs (Seals *et al.*, 2000, Balderhaar und Ungermann, 2013). Dadurch ist es sowohl dem CORVET-Komplex, als auch dem HOPS-Komplex möglich, mit Rab-Proteinen an der einen und mit SNARE-Proteinen an der anderen Membran zu interagieren, wodurch die Fusion von Membrankompartimenten stimuliert und reguliert wird (Ostrowicz *et al.*, 2010, Ungermann und Kümmel, 2019). Als Modell für den Aufbau des Komplexes hat sich folgende Anordnung in Hefe etabliert (Abb. 6A): Vps3 und Vps8 liegen an gegenüberliegenden Enden und die mit dem HOPS-Komplex gemeinsamen Untereinheiten im Zentrum (Balderhaar und Ungermann, 2013). Die

Kern-Untereinheiten präsentieren außerdem Vps33 für die Interaktion mit SNAREs an der Seite (Balderhaar und Ungermann, 2013, Plemel *et al.*, 2011).



**Abb. 6: Modell und Bestandteile des CORVET-Komplexes**

**A)** Der Kern des CORVET-Komplexes besteht aus den vier Proteinen Vps11, Vps16, Vps18 und Vps33. Vps11 und Vps18 tragen die Rab5-bindenden Untereinheiten Vps3 und Vps8 an gegenüberliegenden Enden (Blau). Seitlich exponiert liegt die SNARE-bindende Untereinheit Vps33 (Gelb), welche dafür sorgt, dass der CORVET-Komplex mit Rab5 an der einen Membran und mit einem t-SNARE an der anderen Membran interagieren kann (Reproduziert mit freundlicher Erlaubnis von Journal of Cell Science: Balderhaar und Ungermann 2013, Journal of Cell Science, Volume 126: Seiten 1307-1316). **B)** Bestandteile des CORVET-Komplexes in Hefe sowie homologe Proteine in Säugetierzellen, *A. nidulans* und *U. maydis*.

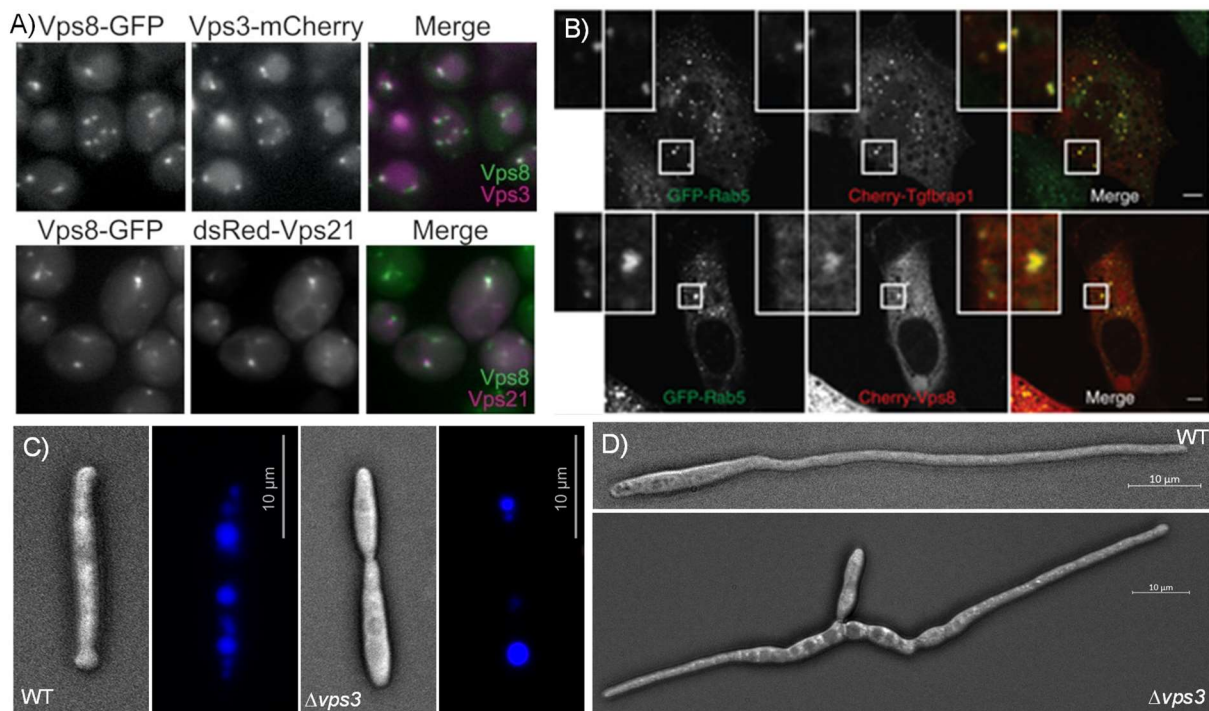
Der CORVET-Komplex bindet in Hefe als Effektor exklusiv an Vps21-GTP, wobei die Untereinheiten Vps3 und Vps8 bei der Lokalisierung von Vps21 kooperieren und Vps3, durch eine Präferenz für Vps21-GDP, eine GEF-ähnliche Funktion ausübt (Peplowska *et al.*, 2007, Pawelec *et al.*, 2010). Die Deletion von Vps21 führt zu einem partiellen Verlust der endosomalen Lokalisierung von Vps3 und Vps8. Der CORVET-Komplex ist in der Lage, zwei unterschiedliche Rab5-Homologe für die Lokalisierung an den Endosomen zu nutzen, und erst die Doppeldeletion von Vps21 und dem Rab5-Homolog Ypt52 führt zu einer kompletten Fehllokalisierung (Cabrera *et al.*, 2013).

Deletionen von CORVET-Untereinheiten bewirken einen Defekt bei der Sortierung von Proteinen in den Endosomen sowie unvollständige Endosomenfusionen (Cabrera *et al.*, 2013). Die Endozytose ist für *S. cerevisiae* nicht überlebensnotwendig, daher ist es der Hefe möglich, ohne die CORVET- und HOPS-Komplexe auszukommen. In höheren Eukaryoten dagegen, sind Deletionen oder Funktionsverluste letal (Solinger und Spang, 2013).

## Einleitung

Eine Deletion von *vps8* in Hefe zeigt einen Defekt bei der Endosomenreifung und hat zur Folge, dass die Vakuolen in einer Hybridform vorliegen, die sowohl Vps21 als auch Ypt7 enthält (Peplowska *et al.*, 2007). Vps8 zeigt in *S. cerevisiae* eine Membranassoziiierung, welche unabhängig von Vps21 auftritt und sogar noch in der  $\Delta vps21\Delta ypt52\Delta ypt53$ -Mutante beobachtet werden kann. Der CORVET-Komplex und Vps3 stabilisieren die Membranassoziiierung von Vps8, jedoch ist sie trotz allem in CORVET- oder *vps3*-Deletionsmutanten noch vorhanden (Pawelec *et al.*, 2010).

Vps3 besteht sowohl in Hefe als auch in Säugetierzellen aus einer N-terminalen  $\beta$ -Propellerdomäne und einer C-terminalen  $\alpha$ -Solenoiddomäne (Nickerson *et al.*, 2009). Ohne die C-terminale Domäne kann sich der Hefe-CORVET-Komplex nicht zusammenlagern. Der Phänotyp von Mutanten, in denen die C-terminale Domäne von Vps3 oder Vps8 fehlt, entspricht dem Deletionsphänotyp und zeigt vergrößerte Vakuolen. Die N-terminale Domäne hat keine Auswirkungen auf die Assemblierung des Komplexes, sondern auf dessen Funktion. Fehlt lediglich eine N-terminale Domäne von Vps3 oder Vps8 kann der Komplex seine Funktion weiterhin ausüben. Die Deletion beider N-terminaler Domänen von Vps3 und Vps8 stört die Funktion des CORVET-Komplexes und bewirkt, dass die Untereinheiten im Zytoplasma lokalisieren. Die N-terminale Domäne von Vps3 ist essenziell für die Interaktion mit Vps21 und damit auch für die Funktion im endosomalen Transport (Epp und Ungermann, 2013). Eine Deletion von *vps3* hat verschiedene Auswirkungen auf die Vakuolenmorphologie und -funktion aufgrund von Defekten bei der Sortierung von Proteinen in den Vakuolen (Rothman und Stevens, 1986, Raymond *et al.*, 1990). Vps3 ist ein lösliches Protein mit einer hydrophilen Aminosäuresequenz, welches zu gleichen Anteilen an Membranen von Endosomen und Vakuolen gebunden und im Zytoplasma vorliegt (Peplowska *et al.*, 2007, Raymond *et al.*, 1990). Vps3 lokalisiert in Hefe entlang der Membran der Vakuolen (Abb. 7A) (Epp und Ungermann, 2013) und in menschlichen HeLa-Zellen wurde eine Colokalisierung mit Rab5a auf Strukturen endosomalen Ursprungs beobachtet (Abb. 7B). Diese Lokalisierung ist abhängig von der Präsenz von aktivem Rab5a, sowie von Vps8 (Perini *et al.*, 2014). Das Homolog zu Vps3 in *U. maydis* ist UMAG\_01668. Eine Deletion führt, wie bereits für *S. cerevisiae* beschrieben, zu einer Zunahme der Größe bei gleichzeitiger Reduktion der Anzahl von Vakuolen (Abb. 7C). Deletionsstämme zeigen außerdem einen Zytokinesedefekt, bei dem sich die Sporidien nach der Teilung nicht separieren können und einen Polaritätsdefekt der Filamente (Abb. 7D) (Schneider, 2016).



**Abb. 7: Lokalisierung von Vps3 und Vps8**

**A)** Lokalisierung von Vps3 und Vps8 in *S. cerevisiae*. Die Proteine colokalisieren an punktuellen Strukturen an der Membran der Vakuolen, sowie mit dem Rab5a-Homolog Vps21 (Cabrera *et al.*, 2013). **B)** Lokalisierung in HeLa-Zellen. Tgfbp1 (Vps3, oben) und Vps8 (unten) colokalisieren jeweils mit Rab5a auf endosomalen Strukturen (Perini *et al.*, 2014). **C)** und **D)** Phänotyp einer *vps3*-Deletion in *U. maydis*. Die Deletion führt zu vergrößerten Vakuolen (**C**) und Defekten bei polaren Wachstumsprozessen (**D**) (Schneider, 2016).

## 2.6. Das Nma1-Protein

Im Lebenszyklus von *U. maydis* spielt das filamentös wachsende Dikaryon eine wichtige Rolle, da es für den Übergang in die pathogene Phase relevant ist. Proteine wie Num1 (*nuclear migration 1*) haben einen großen Einfluss auf das polare und filamentöse Hyphenwachstum, sowie auf den Zellzyklus und die DNA-Reparatur. Anhand einer Interaktion mit Kin1 wurde zudem eine Beteiligung an zellulären Transportprozessen vermutet. Num1 hat als Komponente des NTC (*Nine-Teen-Complex*), einer Untereinheit des Spleißosoms, auch eine Auswirkung auf die Spleißeffizienz von *U. maydis* (Kellner *et al.*, 2014).

Nma1 (*Num1-interacting microtubule-associated protein 1*, UMAG\_00933) wurde bei einer genomweiten Hefe-Zwei-Hybrid-Überprüfung als putativer Interaktionspartner von Num1 identifiziert (Kellner, 2009). Bei bioinformatischen Analysen konnten weder Ähnlichkeiten von Nma1 zu Proteinen mit bekannter Funktion noch konservierte

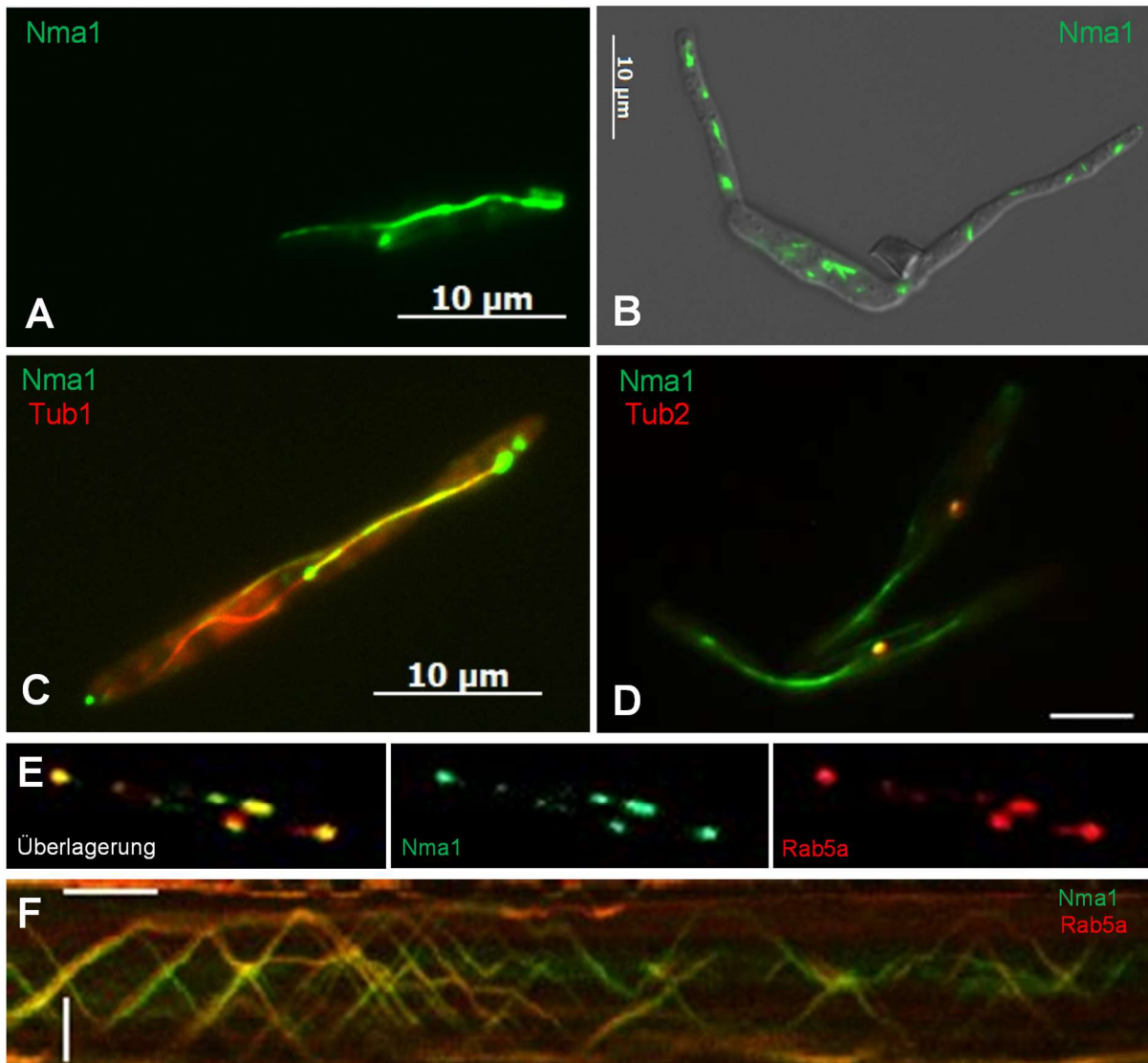
## Einleitung

Proteindomänen identifiziert werden. Mit Hilfe von WoLF PSORT, einem Programm, das potentielle Lokalisierungen anhand der Proteinsequenz und -struktur bioinformatisch bestimmt, wurde eine Lokalisierung im Zellkern und im Zytoplasma vorhergesagt.

Die Markierung des Nma1-Proteins mit GFP zeigte eine Lokalisierung auf fibrillären Strukturen und vereinzelt, feststehenden Punkten in der Zelle (Abb. 8A). Nach der Behandlung der Zellen mit Benomyl zur Inhibierung des Mikrotubulizytoskeletts verlagerte sich das Signal von den fibrillären Strukturen in das Zytoplasma (Abb. 8B). Eine Bestätigung der Lokalisierung von Nma1 auf dem Mikrotubulizytoskelett erfolgte durch eine Colokalisierung mit fluoreszenzmarkiertem  $\alpha$ -Tubulin (Tub1) (Abb. 8C) (Pinter, 2012). Da Mikrotubuli in Form der Mitosespindel auch eine wichtige Rolle für die Zellteilung ausüben, wurde die Lokalisierung von Nma1 auch im Hinblick auf die Mitose untersucht. Die Colokalisierung von Nma1 und  $\gamma$ -Tubulin (Tub2) (Abb. 8D) zeigten eine zusätzliche Lokalisierung am MTOC (Obhof, 2017). Auf die Mitose und die Lokalisierung von Nma1 während der Zellteilung wird im darauffolgenden Kapitel näher eingegangen. Das Nma1-Protein zeigte Bewegungen entlang der Mikrotubuli (Pinter, 2012). Da es aufgrund einer fehlenden Motordomäne nicht in der Lage ist sich aktiv in der Zelle zu bewegen, ist davon auszugehen, dass es gemeinsam mit motilen Zellbestandteilen transportiert wird. Dieser bidirektionale Transport erfolgt gemeinsam mit Rab5a-positiven frühen Endosomen (Abb. 8E+F) (Obhof, 2017). Eine Deletion von *rab5a* führt zu einer fast vollständigen Reduktion der Nma1-Motilität, die Mikrotubuli-Assoziation bleibt jedoch erhalten (Schneider, 2016). Auch eine Deletion der Motoren *kin3*, welcher direkt für den Transport der frühen Endosomen zuständig ist (Wedlich-Söldner *et al.*, 2002, Lenz *et al.*, 2006), oder *kin1*, welcher durch die Rückführung von Dynein indirekt für den Transport der frühen Endosomen sorgt (Lenz *et al.*, 2006), reduziert die Nma1-Motilität (Obhof, 2017). Als Protein mit der größten Übereinstimmung bei der bioinformatisch vorhergesagten Lokalisierung wurde ApsB aus *A. nidulans* identifiziert (Pinter, 2012). ApsB ist vorwiegend mit dem Spindelpolkörper assoziiert, befindet sich jedoch auch an den Septen und auf sich bewegenden Partikeln entlang von Mikrotubuli (Veith *et al.*, 2005, Zekert *et al.*, 2010). Das ApsB-Homolog Mto1 (Mod 20p) aus *Schizosaccharomyces pombe* bewegt sich ebenfalls in antero- oder retrograder Richtung auf den Mikrotubuli. Mto1 ist zudem verstärkt an Mikrotubuliorganisationszentren lokalisiert (Sawin *et al.*, 2004). Das



Nma1-Protein selbst ist jedoch in den Ustilaginaceae (Brandpilzverwandte) hoch konserviert (Pinter, 2012).



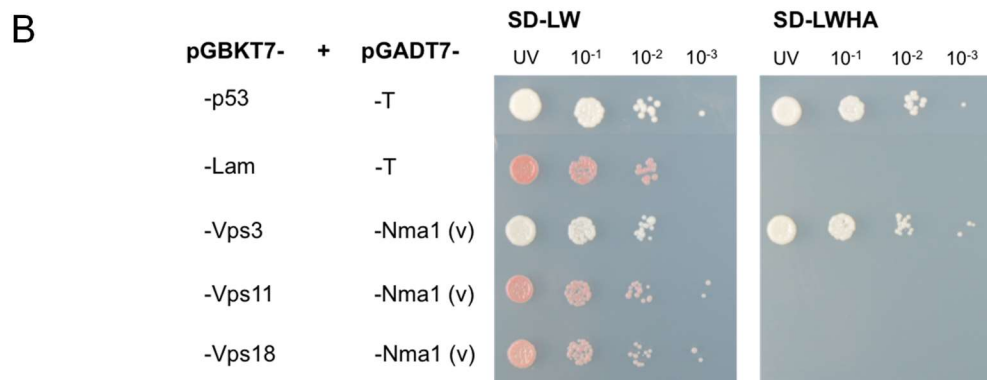
**Abb. 8: Lokalisierung des Nma1-Proteins**

**A)** Das Nma1:gfp-Protein ist entlang von fibrillären Strukturen und in vereinzelt Punkten im Zytoplasma beschrieben (Pinter, 2012). **B)** Behandlung der Zellen mit Benomyl zur Inhibierung des Mikrotubulizytoskeletts bewirkt die Auflösung der fibrillären Strukturen (Pinter, 2012). **C)** Nma1 lokalisiert an Tub1-markierten Mikrotubuli (Pinter, 2012). **D)** Nma1 und Tub2 zeigen eine Colokalisierung am Spindelpolkörper (Obhof, 2017). **E)** Nma1 colokalisiert mit Rab5a, dem Marker für frühe Endosomen und wird gemeinsam mit diesem bidirektional transportiert (**F)** (Obhof, 2017).

## Einleitung

Erste Hinweise auf einen Transportmechanismus von Nma1 entlang der Mikrotubuli erlaubten Untersuchungen von möglichen Interaktionspartnern. Eine Co-Immunopräzipitation (Co-IP) mit anschließender Massenspektrometrie (MS) konnte vier potenzielle Interaktionspartner identifizieren (Abb. 9A). Die Proteine UMAG\_01668, UMAG\_013820 und UMAG\_05292 wurden dabei als Proteine mit den am häufigsten gefundenen Peptiden bestimmt. Die Homologe dieser drei Proteine in Hefe sind die Bestandteile des CORVET-Komplexes Vps3, Vps11 und Vps18 (Pinter, 2015). Die Interaktion von Nma1 mit den Untereinheiten des CORVET-Komplexes wurde in einem Hefe-Zwei-Hybrid-System überprüft wobei lediglich für Vps3 eine direkte Interaktion nachgewiesen werden konnte (Abb. 9B) (Obhof, 2017).

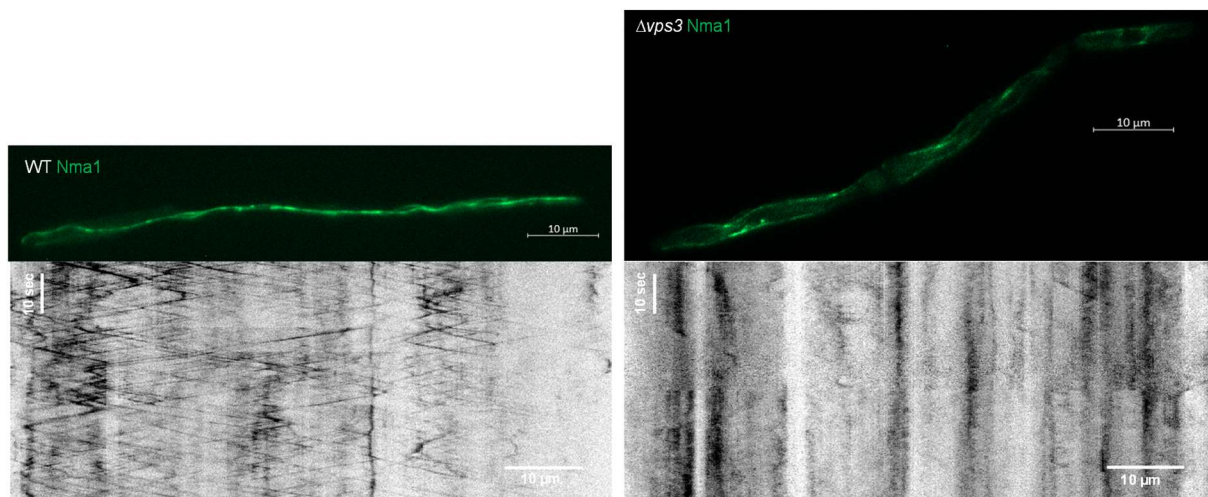
A	PSM nach Immunopräzipitation		Beschreibung
	Nma1:3xeGFP	Nma1:3xHA	
Accessions-Nummer			
UMAG_00933	986	4460	Nma1
UMAG_01668	25	463	Vps3
UMAG_03820	3	286	Vps11
UMAG_05292	2	188	Vps18
UMAG_00584	3	4	Casein Kinase-1 Hhp1



### Abb. 9: Durch Co-Immunopräzipitation identifizierte Interaktionspartner von Nma1

**A)** Als Protein mit den meisten Peptidzählungen nach einer Co-IP und anschließender MS mit Nma1 als Köder wurde UMAG\_01668 (Vps3) bestimmt. Ebenfalls als potenzielle Interaktionspartner konnten UMAG\_03820 (Vps11) und UMAG\_05292 (Vps18) identifiziert werden. Alle drei potenziell interagierenden Proteine sind Bestandteile des CORVET-Komplexes (Pinter, 2015). **B)** Die Interaktion der in A) identifizierten Proteine wurde in einem Hefe-Zwei-Hybrid-Test verifiziert. Lediglich Vps3 zeigte eine direkte Interaktion mit Nma1 (Obhof, 2017).

Auch der potenzielle Interaktionspartner Vps3 hat einen Einfluss auf die Motilität des Nma1-Proteins. In *vps3*-Deletionsstämmen ist die Motilität von Nma1 gravierend beeinträchtigt und in Kymographen (Abb. 10) dieser Stämme ist das typische, bidirektionale Bewegungsmuster nicht mehr zu erkennen. Vergleichbar mit  $\Delta rab5a$ -Stämmen, bleibt auch im  $\Delta vps3$ -Hintergrund die Assoziierung von Nma1 mit den Mikrotubuli erhalten (Schneider, 2016).

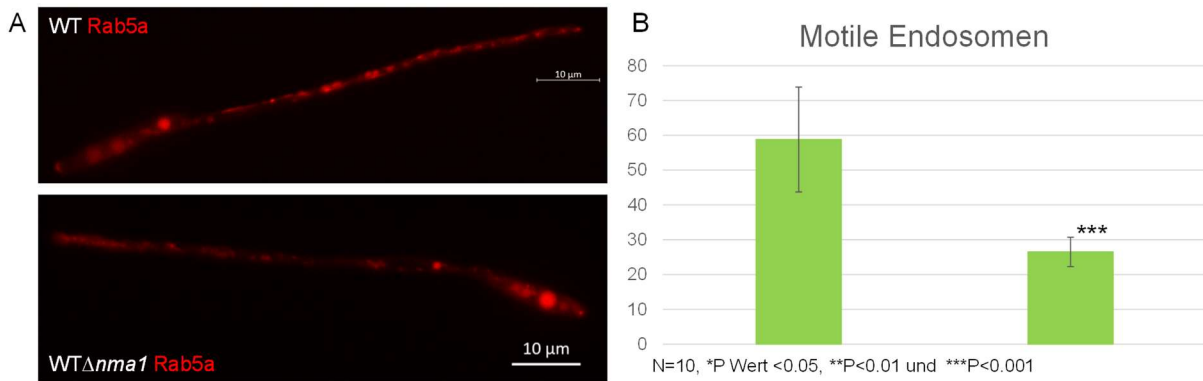


**Abb. 10: Vps3 ist notwendig für den Transport von Nma1**

Im Wildtyp (links) zeigt Nma1 ein bidirektionales Bewegungsmuster, sowie eine Mikrotubuli-Lokalisierung. Das Bewegungsmuster ist im Kymographen über die aufgenommene Zeit und die zurückgelegte Strecke aufgetragen. Wird *vps3* deletiert (rechts), kommt die Bewegung zum Erliegen, die Lokalisierung entlang der Mikrotubuli ist nicht beeinträchtigt (Schneider, 2016).

Die Deletion von *nma1* hat spezifisch Auswirkungen auf die Population der frühen Endosomen in *U. maydis*. Andere Elemente des zellulären Transportes, wie der Exozyst-Komplex, die sekretorischen Vesikel, die Chitosomen oder Rab7-positive späte Endosomen werden durch die Deletion nicht beeinträchtigt. Die Anzahl der Rab5a-positiven frühen Endosomen dagegen ist in den Deletionsstämmen signifikant reduziert (Abb. 11). Durch das Fehlen von Nma1 wird eine verstärkte Fusionsrate der Endosomen vermutet, welche zu einer verringerten Anzahl der Endosomen in der Zelle führt (Schneider, 2016).

## Einleitung



**Abb. 11: Die Deletion von *nma1* reduziert die Anzahl an frühen Endosomen**

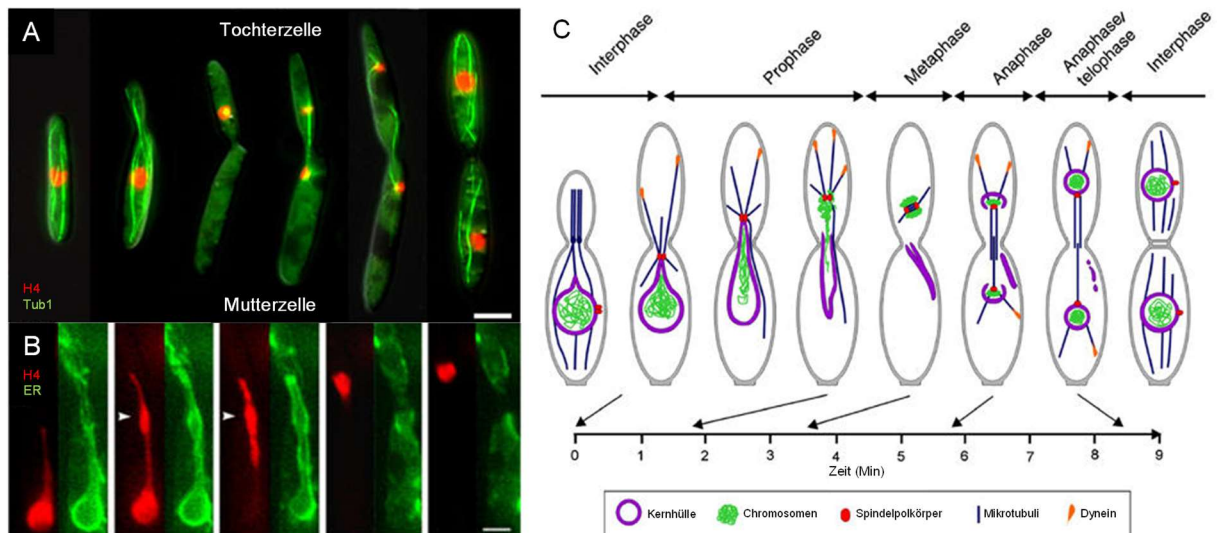
A) Lokalisierung von Rab5a-markierten frühen Endosomen unter dem konstitutiv starken  $P_{ter}$  im Wildtyp (oben) und in einer *nma1*-Deletion. Die frühen Endosomen sind in beiden Stämmen im Filament verteilt. Wie in B) quantifiziert, ist jedoch durch die Deletion von *nma1* die Anzahl der markierten Endosomen reduziert (Schneider, 2016).

## 2.7. Die Mitose eukaryotischer Zellen

Während der Interphase sind die dekondensierten Chromosomen umgeben von der Zellkernhülle und mit dieser verankert. Bei der Vorbereitung auf die Mitose werden die Chromosomen von der Kernhülle abgelöst, kondensieren und es erfolgt eine Umorganisation der zytoplasmatischen Mikrotubuli zur Mitosespindel. Diese hat während der Mitose die Funktion zu elongieren und damit die Chromosomenverteilung zu gewährleisten. Dabei wird zwischen zwei Hauptformen der Mitose unterschieden: Die geschlossene und die offene Mitose. Bei der geschlossenen Mitose bleibt die Zellkernhülle intakt, umgibt die Chromosomen ununterbrochen und durch Spindelpolkörper, welche in die Kernhülle eingebettet sind, erfolgt die Spindelbildung innerhalb des Zellkerns. Diese Form der Mitose ist beispielsweise bei *S. cerevisiae* oder *S. pombe* zu beobachten. Bei der offenen Mitose dagegen wird die Zellkernhülle aufgelöst, die Zellkernlamina und die Zellkernporenkomplexe disassemblieren und die Zellkernhülle wird innerhalb des endoplasmatischen Retikulums (ER) reorganisiert. In Säugetierzellen ist die offene Form der Mitose gängig (zusammengefasst in Sazer *et al.*, 2014). Auch *U. maydis* durchläuft eine offene Mitose (Straube *et al.*, 2005). Die Mitose wird in der Prophase durch die Elongation des Nukleus eingeleitet. Dieser ragt in die Tochterzelle hinein, die Chromosomen kondensieren und migrieren gemeinsam mit der Kernhülle (O'Donnell und McLaughlin, 1984, Straube *et al.*, 2005). Die Zellkernhülle wird zunächst permeabel, die Chromosomen beginnen zum Abschluss der Prophase bereits die Kernhülle zu verlassen, welche an der Spitze der

Kernextension bricht, kollabiert und in der Mutterzelle zurückbleibt (Abb. 12B) (Straube *et al.*, 2005). Die Migration des Nukleus in die Tochterzelle wird durch astrale Mikrotubuli und Dynein realisiert, welche den Spindelpolkörper am Nukleus, sowie die Kernhülle, in die entstehende Tochterzelle transportieren und später auch für das Entfernen der Kernhülle sorgen (Straube *et al.*, 2005). Auch der Zellkernporenkomplex disassembliert während der Prophase und die Kernporen lokalisieren anschließend im Zytoplasma oder an den Chromosomen selbst (Theisen *et al.*, 2008). Um die in der Metaphase gebildete Spindel sammeln sich die Chromosomen (Steinberg *et al.*, 2001). Während der Anaphase A wird eine kurze Mitosespindel in der Tochterzelle ausgebildet, welche während der Anaphase B von Dynein abhängig elongiert und die Chromosomen dabei segregiert (Abb. 12A) (Fink *et al.*, 2006). Die Nukleation der Spindel erfolgt am  $\gamma$ -Tubulin-haltigen Spindelpolkörper, welcher am Nukleus lokalisiert ist und im Vorfeld der Mitose dupliziert wird (Straube *et al.*, 2003). Während der Spindelelongation erfolgt eine Rekrutierung des ER an die Chromosomen sowie eine Ausbildung von astralen Mikrotubuli an den Spindelpolen (Fink *et al.*, 2006, Theisen *et al.*, 2008). Dabei verbleibt jeweils die Hälfte der Chromosomen in der Tochterzelle, während die andere Hälfte zurück in die Mutterzelle transportiert wird (Straube *et al.*, 2005). In der Telophase lagern sich die Kernporenkomplexe wieder zusammen und der Aufbau der Zellkernhülle und der Kernporen erfolgt unter Kooperation des Aktin- und Mikrotubulizytoskeletts (Theisen *et al.*, 2008). Die Chromosomen dekondensieren und unter Einbringung zweier Septen an der Teilungszone erfolgt die Zytokinese (schematisch veranschaulicht in Abb. 12C) (Straube *et al.*, 2005).

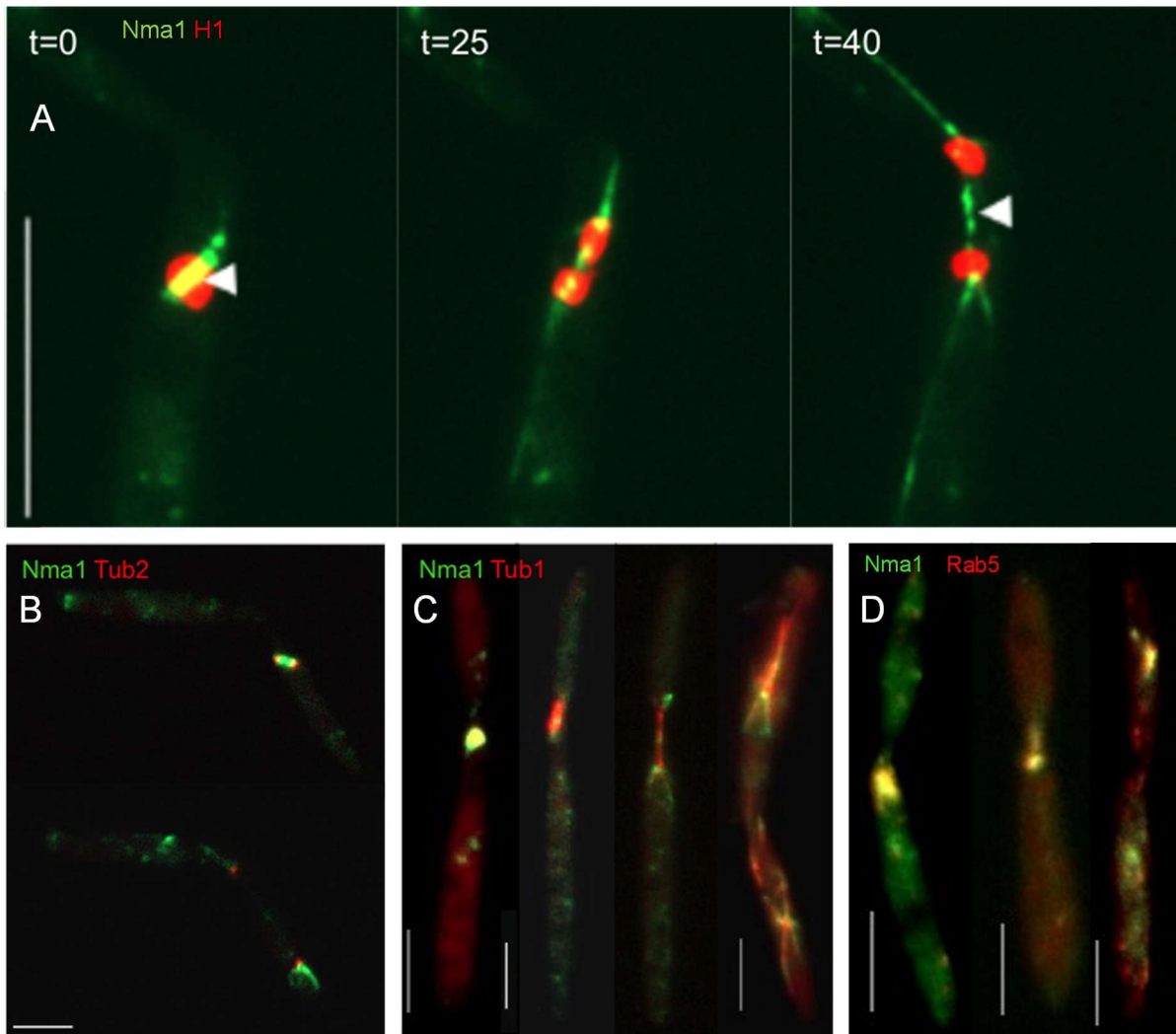
## Einleitung



**Abb. 12: Mitose in *U. maydis***

**A)** Der Transport des Nukleus in die Tochterzelle erfolgt durch astrale Mikrotubuli (Straube *et al.*, 2005). Um die in der Metaphase gebildete Spindel sammeln sich die Chromosomen (Steinberg *et al.*, 2001). Während der Anaphase A wird eine kurze Mitosespindel in der Tochterzelle ausgebildet, welche während der Anaphase B elongiert und die Chromosomen dabei segregiert (Fink *et al.*, 2006). An den Spindelpolen beginnt die Ausbildung von astralen Mikrotubuli (Fink *et al.*, 2006, Theisen *et al.*, 2008). Die Einbringung zweier Septen an der Teilungszone initiiert die Zytokinese (Straube *et al.*, 2005). **B)** In der Prophase elongiert der Nukleus und ragt in die Tochterzelle hinein, gemeinsam mit den kondensierten Chromosomen (O'Donnell und McLaughlin, 1984, Straube *et al.*, 2005). Die Zellkernhülle wird zunächst permeabel, die Chromosomen beginnen die Kernhülle zu verlassen, welche kollabiert und in der Mutterzelle zurückbleibt (Straube *et al.*, 2005). **C)** Schematische Darstellung der in **A)** und **B)** veranschaulichten offenen Mitose in *U. maydis*. (Abb. A), B) und C) reproduziert mit freundlicher Erlaubnis von EMBO: Straube, Weber und Steinberg 2005: *A novel mechanism of nuclear envelope break-down in a fungus: nuclear migration strips off the envelope*, The EMBO Journal, Volume 24: Seiten 1674-1685)

Wie bereits in Abb. 8 gezeigt, lokalisiert Nma1 entlang der Mikrotubuli (Pinter, 2012) und mit dem Spindelpolkörper in *U. maydis* (Obhof, 2017). Untersuchungen der Lokalisierung im Verlauf der Mitose haben ergeben, dass sich das Nma1-Signal an der Histon1-markierten DNA in der Metaphase konzentriert (Abb. 13A) (Pinter, 2015), gemeinsam mit dem Tub2-markierten Spindelpolkörper (Abb. 13B) die Verteilung der Chromosomen in der Anaphase begleitet und mit Tub1 an den Polen der Mitosespindel sowie den astralen Mikrotubuli, lokalisiert (Abb. 13C) (Obhof, 2017). Außerdem wurde, wie in Abb. 13D zu sehen, eine Colokalisierung von Rab5a und Nma1 während der Mitose gezeigt. Durch den Vergleich der Lokalisierungen von Nma1 und Rab5a-positiven Endosomen während verschiedenen Mitosestadien, kann eine Lokalisierung von Rab5a-positiven Endosomen in *U. maydis* während der Mitose an der Spindel vermutet werden (Obhof, 2017).



**Abb. 13: Nma1 lokalisiert während der Mitose an den Spindelpolen**

**A)** Konzentration des Nma1-Signals am Histon1-markierten Zellkern (H1) in der Metaphase. Nma1 begleitet die Chromosomenseparierung in der Anaphase (Pinter, 2015). **B)** Der Tub2-markierte Spindelpolkörper zeigt eine Colokalisierung mit Nma1 während der mitotischen Teilung (Obhof, 2017). **C)** Nma1 lokalisiert an den Polen der Tub1-markierten Mitosespindel (Obhof, 2017). **D)** Rab5a und Nma1 colokalisieren während der Mitose (Obhof, 2017).

Auch in anderen Organismen wurden bereits Funktionen der Endosomen während der Mitose und Zytokinese beschrieben (zusammengefasst in Daeden und Gonzalez-Gaitan, 2018). In Säugetierzellen wurde eine Lokalisation von Rab5-Vesikeln an den duplizierten Zentrosomen beobachtet, beginnend in der späten G2-Phase bis in die Prophase hinein (Serio *et al.*, 2011, Lanzetti, 2012). Zentrosomen sind das funktionelle Äquivalent zu den bereits beschriebenen Spindelpolkörpern aus *S. cerevisiae* (zusammengefasst in Kilmartin, 2014). Rab5 verbleibt an den Zentrosomen bis die Kernhülle aufgelöst wird und die Zelle in die Prometaphase übergeht. In der Metaphase sind Rab5-Endosomen nicht mehr an den Spindelpolen lokalisiert,

## Einleitung

wandern jedoch entlang der Spindel-Mikrotubuli, um sich in der späten Telophase erneut an den Zentrosomen anzusammeln. Es wird vermutet, dass die Endosomen in dieser mitotischen Phase ihre Fracht über die Spindel auf die beiden entstehenden Zellen verteilen (Lanzetti, 2012). Auswirkungen in Rab5a-Mutanten sind Defekte in der Chromosomenverteilung, binukleare Zellen und Verzögerungen der Prometaphase (Kouranti *et al.*, 2006, Serio *et al.*, 2011). Dieser Phänotyp ist einer Verzögerung der Auflösung der Zellkernhülle geschuldet, da wichtige Proteine für diesen Prozess nicht korrekt an der Kernmembran lokalisieren können. Dadurch beeinträchtigt wird auch die korrekte Anordnung der Chromosomen in der Metaphaseplatte. Die Chromosomenanordnung in der Äquatorialebene ist abhängig von dynamischen Interaktionen der Chromosomen mit den Mikrotubuli. Dabei assemblieren an den Zentromeren die Kinetochore, eine Proteinstruktur, welche die Anheftung der Chromosomen an die Spindelmikrotubuli vermittelt. Für eine präzise und synchrone Verteilung aller Chromosomen ist ausschlaggebend, dass die Chromosomen korrekt in der Metaphaseplatte angeordnet und alle Kinetochore verankert sind. Dieser sogenannte Spindelassemblierungskontrollpunkt liegt in der frühen Prophase und leitet, nachdem alle Chromosomen überprüft wurden die Trennung der Chromosomen ein. Durch die Lokalisierung von Rab5 an den Zentrosomen wird davon ausgegangen, dass durch die frühen Endosomen wichtige Proteine für die Vermittlung der Kinetochorfunktion in die Nähe der Kinetochore gebracht werden. Fehlt diese Funktion von Rab5, könnte die Ursache der beobachteten Verzögerung der Prometaphase die Fehlfunktion der Kinetochore sein, wodurch die Chromosomen nicht korrekt für die bevorstehende Trennung verankert werden können und der Spindelassemblierungskontrollpunkt erst später überwunden werden kann (Lanzetti, 2012).



## 2.8. Zielsetzung

Das Nma1-Protein wurde als motiles Protein mit Lokalisierung auf fibrillären Strukturen beobachtet. Diese Strukturen wurden durch Benomyl-Inhibierung und Colokalisierung mit Tub1 als Mikrotubuli identifiziert (Pinter, 2012). Die Motilität von Nma1 entlang der Mikrotubuli erfolgte bidirektional (Pinter, 2012) und konnte auf einen Transport gemeinsam mit frühen Endosomen eingeschränkt werden (Schneider, 2016, Obhof, 2017). Die Suche nach Interaktionspartnern lieferte ebenfalls Hinweise auf die Funktion und den Transportmechanismus von Nma1. Als Nma1-Interaktionspartner konnten Komponenten des CORVET-Komplexes nachgewiesen werden (Pinter, 2015, Peplowska *et al.*, 2007). Ein Einfluss von Nma1 auf die Endosomenmotilität konnte bereits beobachtet werden (Schneider, 2016).

Für die filamentöse Phase des Pflanzenpathogens *U. maydis* ist der Langstreckentransport über die frühen Endosomen von enormer Relevanz. Dadurch wird ein Austausch mit der Wirtspflanze, die erfolgreiche Infektion, Spitzenelongation der Hyphenzellen oder die Verteilung von mRNA in der Zelle gewährleistet (Penalva, 2010, Becht *et al.*, 2006, Steinberg, 2014). Aus diesem Grund ist es naheliegend, dass ein Mechanismus vorliegt, der die Lebensspanne der frühen Endosomen verlängert und die Reifung zu späten Endosomen hinauszögert, um zu gewährleisten, dass ausreichend Transportvesikel vorliegen. Da sich Informationen über die Funktionsweise des CORVET-Komplexes auf die publizierten Erkenntnisse in *S. cerevisiae* und Mammalia-Zellen beschränken, sollte der CORVET-Komplex in *U. maydis* zunächst charakterisiert werden, um erzielte Beobachtungen korrekt einordnen zu können. Dazu sollte die Komplexstruktur über proteinbiochemische Analysen ermittelt und durch zellbiologische Untersuchungen von fluoreszenzmarkierten Fusionsproteinen der CORVET-spezifischen Untereinheiten, sowie Deletionsmutanten von CORVET-Bestandteilen weiterführende Erkenntnisse über die Funktionsweise des Komplexes in *U. maydis* gewonnen werden. Der Mechanismus, welcher der Interaktion von Nma1 mit dem CORVET-Komplex zugrunde liegt und die dadurch mögliche Einflussnahme auf die Population der frühen Endosomen sollte in dieser Arbeit durch weitere MS-Analysen und mikroskopische Untersuchungen von *nma1* Deletionen auf CORVET-Untereinheiten genauer untersucht werden. Dazu wurde der Einfluss von Nma1 auf die Bewegungsprofile dieser Proteine anhand von Kymographen und Colokalisierungsanalysen an

## Einleitung

konfokalen Fluoreszenzmikroskopen analysiert, welche durch eine schnelle Detektionsmethode das parallele Beobachten von zwei unterschiedlichen Signalen ermöglichen. Für das Verständnis des Mechanismus sollten auch die frühen Endosomen genauer charakterisiert werden. Bisherige Untersuchungen beschränkten sich auf die in der Literatur vorherrschend verwendete GTPase Rab5a (Wedlich-Söldner *et al.*, 2000, Bielska *et al.*, 2014b, Bielska *et al.*, 2014a). Neben Rab5a besitzt *U. maydis* jedoch ebenfalls eine Rab5b-GTPase, welche in die Untersuchungen miteinbezogen werden sollte. Dazu muss zunächst die Funktion und Lokalisierung dieser bisher in *U. maydis* nicht charakterisierten GTPase analysiert werden.

Neben der Colokalisierung von Nma1 mit dem Mikrotubulizytoskelett und dem MTOC zeigten weiterführende Untersuchungen, dass Nma1 gemeinsam mit dem Spindelpolkörper und der mitotischen Spindel in der Mitose lokalisiert (Pinter, 2015). Eine Colokalisierung von Nma1 und Rab5a in denselben Mitosestadien (Obhof, 2017) lässt vermuten, dass auch die frühen Endosomen an der Mitose beteiligt sind. Das Zusammenspiel und die Funktion von Nma1 und den frühen Endosomen im Verlauf der mitotischen Teilung gilt es nun im Rahmen dieser Arbeit mit weiteren Markerproteinen für mitotische Teilungsprozesse zellbiologisch zu verifizieren und charakterisieren. Basierend auf einer potenziellen Funktion während der Mitose ist es naheliegend, dass sowohl Nma1 als auch die GTPasen der frühen Endosomen auch eine Funktion bei der meiotischen Teilung übernehmen können. Um dieses Stadium zu untersuchen, ist es notwendig, dass *U. maydis* einen vollständigen Lebenszyklus durchläuft. Die Meioseprodukte sollen durch Rückkreuzungen mit Teststämmen definierter Genotypen auf ihre korrekte Verteilung der genetischen Marker hin untersucht werden, um damit einen Einfluss der beschriebenen Proteine auf die meiotische Teilung zu untersuchen.

### 3. Ergebnisse

Für die zur erfolgreichen Infektion der Wirtspflanze relevante filamentöse Phase des Pflanzenpathogens *U. maydis* ist der Langstreckentransport mittels der frühen Endosomen von enormer Relevanz. Aus diesem Grund ist es naheliegend, dass sich ein Mechanismus etabliert hat, der die Lebensspanne der frühen Endosomen elongiert und die Reifung zu späten Endosomen hinauszögert, um zu gewährleisten, dass stets eine ausreichende Anzahl an Transportvesikeln vorliegt. Die dabei zugrundeliegenden Regulationsmechanismen der frühen Endosomen, des an Fusionsprozessen beteiligten CORVET-Komplexes und die Interaktion des *U. maydis*-spezifischen Nma1-Proteins mit der Maschinerie der frühen Endosomen ist bisher nur in Ansätzen verstanden und sollen in dieser Arbeit charakterisiert werden.

Wenn nicht anders gekennzeichnet wurde für alle in dieser Arbeit durchgeführten Analysen der Stamm AB31 (Brachmann, 2001) und AB31-Derivate verwendet. Dieser Stamm zeichnet sich dadurch aus, dass die für das filamentöse Wachstum ausschlaggebenden *b*-Gene unter dem (*crg1*-Promotor)  $P_{crg1}$  (Bottin *et al.*, 1996) exprimiert werden. Durch einen Wechsel der einzigen Kohlenstoffquelle im Medium von reprimierender Glukose zu induzierender Arabinose wird das bE/bW-Heterodimer exprimiert und induziert das filamentöse Wachstum. Wenn nicht explizit aufgeführt, betrug die Induktionsdauer für Studien während filamentöser Wachstumsprozesse 15-18 h. Zellbiologische Analysen erfolgten durch die in Tabelle 10 (Kapitel 5.2.7, Material und Methoden) aufgeführten Mikroskope und Binokulare. Die jeweils zugeordnete Mikroskopnummer ist bei den entsprechenden Experimenten angemerkt. Fluoreszenzaufnahmen wurden durch die GFP-, RFP- und DAPI-Kanäle realisiert (Wellenlängen und Belichtungszeit siehe Material und Methoden Kapitel 5.2.7). Der RFP-Kanal wird in dieser Arbeit zur deutlicheren Veranschaulichung einheitlich in magenta dargestellt und zeigt bei einer Überlagerung mit dem GFP-Kanal ein weißes Signal an.

Für die Analysen von Transportvorgängen wurden Bewegungsmuster in Kymographen ausgedrückt. Dafür wurde aus einem 30 sek oder einminütigen Video die Bewegung der Signale anhand der zurückgelegten Strecke gegen die Zeit aufgetragen. Darin visualisieren vertikal verlaufende Linien statische Signale, während motile Signale, welche sich bidirektional bewegen, durch ein Zickzackmuster veranschaulicht werden.

## Ergebnisse

Scheitelpunkte bedeuten dabei eine Änderung der Bewegungsrichtung. Die Steigung der Bewegungsgeraden gibt Rückschlüsse auf die Geschwindigkeit, mit der die Signale fortbewegt werden.

### 3.1. Charakterisierung der Endosomenpopulationen in *U. maydis*

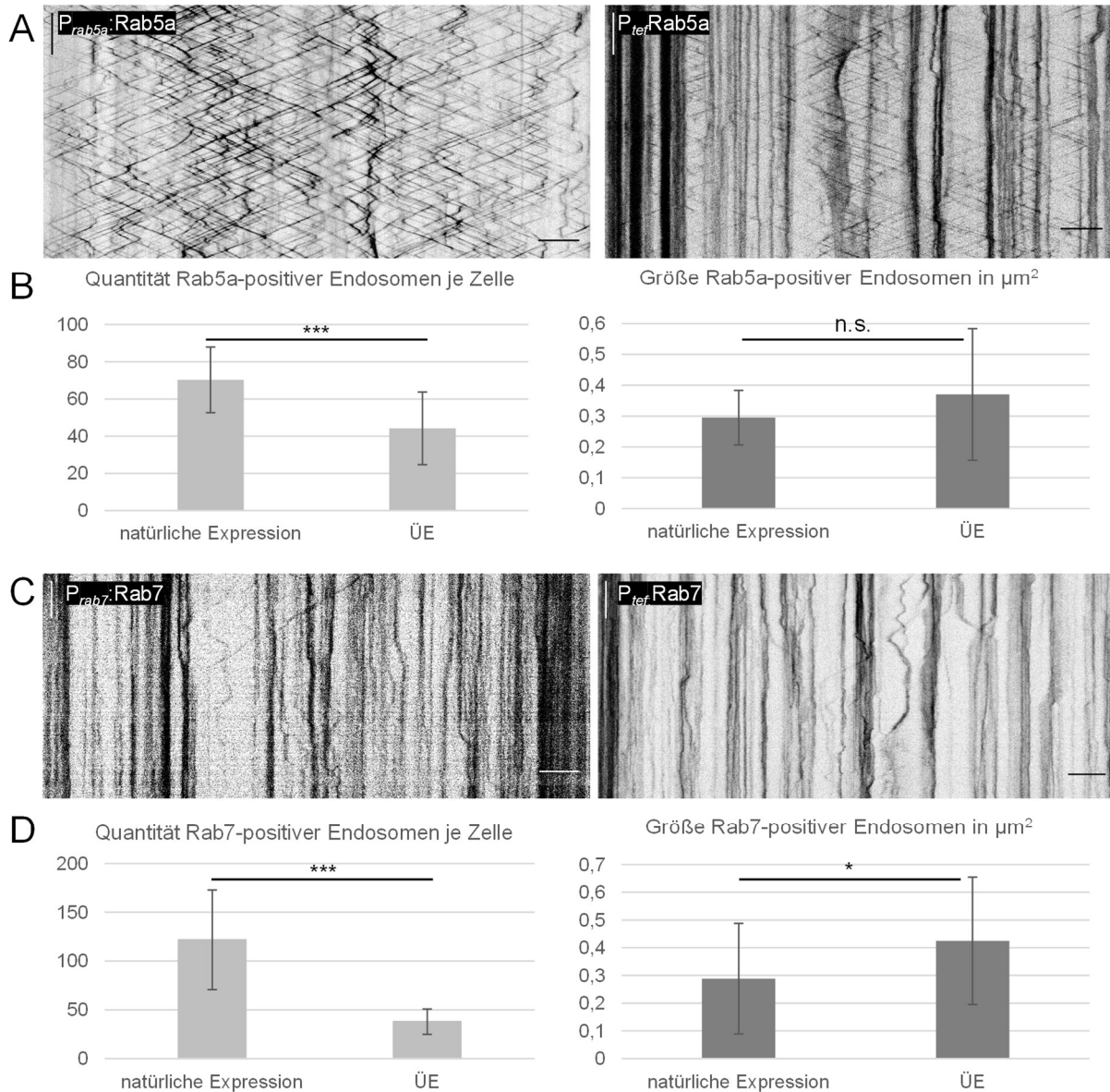
Für die Gewährleistung der Homöostase innerhalb einer Zelle ist der Prozess der Endozytose von essenzieller Bedeutung. Viele der grundlegenden Abläufe sind hochkonserviert von Pilzen wie *S. cerevisiae* bis zum Mensch und zeugen damit von ihrer hohen Relevanz (Geli und Riezman, 1998). Für biotrophe oder pflanzenpathogene Pilze, wie *U. maydis*, sind die Endosomen wichtige Organelle für die Kommunikation mit der Wirtspflanze (zusammengefasst in Deising *et al.*, 2000). Auch für das filamentöse Wachstum, für welches eine Extension an der Spitze der Filamentzelle notwendig ist, werden benötigte Materialien über Endosomen transportiert (Steinberg, 2014). Bisher in *U. maydis* durchgeführte Studien zu den Endosomen beschränkten sich weitestgehend auf die Verwendung lipophiler Färbemittel wie FM4-64 oder der GTPase Rab5a zur Visualisierung des Einflusses von Gendelektionen auf die Endosomenbewegung oder zur Verifizierung des Transportes untersuchter Proteine mit den Endosomen (Wedlich-Söldner *et al.*, 2000, Fuchs *et al.*, 2006, Higuchi *et al.*, 2014). Für das Verständnis der in *U. maydis* ablaufenden Langstreckentransportprozesse besteht daher die Notwendigkeit, die Endosomenpopulationen näher zu beschreiben.

#### 3.1.1. Die Populationen von frühen und späten Endosomen in *U. maydis* sind deutlich separiert

Die Einteilung der Endosomen, welche für den Prozess der Endozytose verantwortlich sind, erfolgt in frühe, späte und recycelnde Endosomen. Da für die Aufnahme und Verteilung von Stoffen, sowie den Langstreckentransport hauptsächlich die frühen Endosomen verantwortlich sind (Steinberg, 2014), welche durch den Reifungsprozess eng mit den späten Endosomen vernetzt sind (Rink *et al.*, 2005), wurde auf diese beiden Populationen das Hauptaugenmerk gelegt. In *U. maydis* erfolgte die Visualisierung der frühen Endosomen standardmäßig mit der GTPase Rab5a

(UMAG\_10615) (Fuchs *et al.*, 2006), die der späten Endosomen mit Rab7 (UMAG\_05511) (Higuchi *et al.*, 2014). In allen bekannten Publikationen erfolgte die Visualisierung durch Fusion der GTPase mit einem fluoreszierenden Protein unter einem stark konstitutiv exprimierten Promotor wie  $P_{tef}$  (Fuchs *et al.*, 2006, Higuchi *et al.*, 2014, Spellig *et al.*, 1996). Die Integration dieser Konstrukte erfolgt in den Wildtyphintergrund und resultiert in Kombination mit dem nativen Promotor in einer Überexpression. Aus Säugetier-Zellkulturen ist bekannt, dass eine Überexpression von Rab5a, durch die Erhöhung der Anzahl an aktiven Rab5a-Molekülen in den Membranen der Endosomen, für eine effektivere Interaktion zwischen Donor- und Akzeptorvesikeln sorgt, damit die Fusionsrate stimuliert wird und in einer Steigerung der Vesikelgröße resultiert (Bucci *et al.*, 1992). Deshalb wurden neben den bereits in Vorarbeiten etablierten überexprimierten Fusionsproteinen (Schneider, 2016, Obhof, 2017) für beide Marker Fusionen im natürlichen Locus unter der Expression ihres eigenen Promotors generiert. Wie in Abb. 14A dargestellt, wurden zunächst die über Kymographen veranschaulichten Bewegungsmuster verglichen. Unter der Expressionsstärke des nativen Promotors waren für Rab5a nahezu ausschließlich motile Signale zu beobachten, welche bidirektionale Bewegungsmuster zeigten (UKS91/UKS92/UKS93: AB31  $P_{rab5a}:gfp:rab5a$ ). Die Expression von Rab5a mit dem starken konstitutiven  $P_{tef}$  führte zu einer Zunahme an statischen Signalen (UKS16/UKS17: AB31  $P_{tef}:mCherry:rab5a$ ). Eine Quantifizierung und Größenbestimmung der Vesikel durch ImageJ (Material und Methoden Kapitel 5.2.14) ( $P_{rab5a}$  N=24,  $P_{tef}$  N=22) zeigte eine signifikante Reduktion der gesamten Vesikelanzahl durch die Überexpression (p-Wert  $1,59 \cdot 10^{-5}$ ). Die Endosomengröße war nicht signifikant angestiegen (p-Wert 0,128). Abb. 14B zeigte einen vergleichbaren Effekt der Expressionsstärke auf die Rab7-positiven Endosomen. Da Rab7-positive Endosomen weitestgehend statisch sind, war kein deutlicher Effekt auf die Motilität der Endosomen zu erkennen. Die Auswertung der Quantität und Größe der Vesikel ( $P_{rab7}$  N=20; UKS258/UKS259/UKS260: AB31  $P_{rab5a}:gfp:rab5a$ ,  $P_{rab7}:mCherry:rab7$ ;  $P_{tef}$  N=23; UKS18/UKS19/UKS20: AB31  $P_{tef}:mCherry:rab7$ ) zeigte jedoch ebenfalls eine signifikante Minderung der Vesikelquantität durch eine gesteigerte Expression (p-Wert  $2,32 \cdot 10^{-7}$ ) sowie aus der Überexpression mit  $P_{tef}$  resultierend eine signifikante Größenzunahme (p-Wert 0,039).

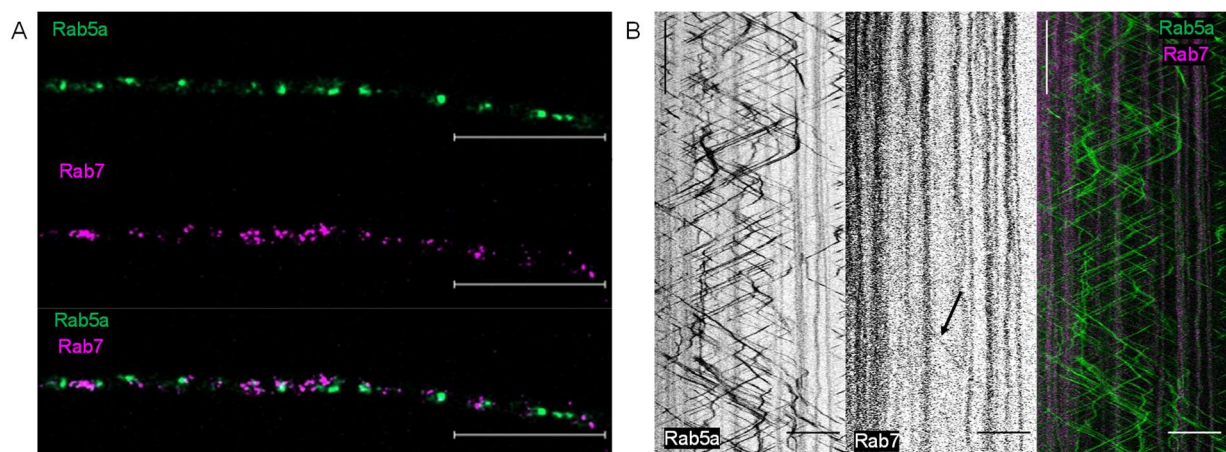
## Ergebnisse



### Abb. 14: Die Überexpression der Rab-GTPasen führte zu einer Reduktion der Vesikelquantität

**A)** Unter der natürlichen Expressionsstärke (links oben) waren für Rab5a in Filamenten nahezu ausschließlich motile Signale zu beobachten, welche bidirektionale Bewegungsmuster zeigten. Die Expression von Rab5a mit einem starken konstitutiv aktiven Promotor (rechts) führte vermehrt zu statischen Signalen. **B)** Eine Quantifizierung und Größenbestimmung der Vesikel ( $P_{rab5a}$  N=24,  $P_{tef}$  N=22) zeigte eine signifikante Reduktion der Vesikelanzahl (links) durch die Überexpression (p-Wert  $1,59 \cdot 10^{-5}$ ). Die Endosomengröße (rechts) war nicht signifikant gesteigert (p-Wert 0,128). **C)** Da Rab7-positive Endosomen weitestgehend statisch sind, war in den analysierten Filamenten kein deutlicher Effekt auf die Motilität der Endosomen in den Kymographen zu erkennen. **D)** Die Auswertung der Quantität (links) und Größe (rechts) der Vesikel ( $P_{rab7}$  N=20,  $P_{tef}$  N=23) zeigte jedoch ebenfalls eine signifikante Reduktion der Vesikelquantität durch die erhöhte Expression (p-Wert  $2,32 \cdot 10^{-7}$ ) sowie daraus resultierend eine signifikante Größenzunahme (p-Wert 0,039). Horizontaler Maßstab: 10  $\mu\text{m}$ , vertikaler Maßstab: 10 sek. Signifikanz \* p-Wert<0,05 \*\* p-Wert<0,01 \*\*\* p-Wert<0,001. Analyse der Zellen mit Mikroskop 1.

Aufgrund der gezeigten Effekte einer Überexpression von Rab-GTPasen war es notwendig für eine realitätsgetreue Veranschaulichung und Analyse der Populationen der frühen und späten Endosomen sowohl Rab5a als auch Rab7 durch ihren natürlichen Promotor zu exprimieren. Wie in Abb. 15 dargestellt, zeigten Rab5a und Rab7 (UKS258: AB31 *gfp:rab5a*, *mCherry:rab7*) nur eine geringfügige Colokalisierung. Basierend auf Resultaten aus der Literatur wurde eine strikte Aufgabentrennung der frühen und späten Endosomen erwartet (Rink *et al.*, 2005), im Rahmen des Reifungsprozesses von frühen zu späten Endosomen wurden jedoch auch teilweise überlappende Lokalisierungen der spezifischen Rab-GTPasen beider Endosomenpopulationen beschrieben (Shearer und Petersen, 2019). Der Großteil der in *U. maydis* beobachteten Signale lag separat auf punktuellen Strukturen vor. Eine Analyse der Bewegungsmuster zeigte, dass lediglich Rab5a-Signale schnelle bidirektionale Bewegungsmuster durchführten. Rab5a war zusätzlich jedoch auch in einigen statischen Signalen detektierbar, welche sich in diesen Punkten mit dem immobilien Rab7-Signal überlappten. Die Rab7-positiven Endosomen waren weitestgehend statisch, vereinzelt war eine unidirektionale Bewegung über eine kurze Strecke mit geringer Geschwindigkeit zu erkennen.



**Abb. 15: Frühe und späte Endosomen in *U. maydis* zeigen geringe Colokalisierung**

**A)** Rab5a (oben) und Rab7 (Mitte) colokalisierten (unten) nur in einigen wenigen punktuellen Strukturen. Der überwiegende Anteil der Signale lag einzeln in punktuellen Strukturen vor. **B)** Für das Rab5a-Protein (links) konnte ein vorherrschend bidirektionales Bewegungsmuster detektiert werden mit einigen zusätzlichen immobilien Signalen. Diese statischen Signale zeigten eine Überlappung (rechts) mit den statischen Rab7-Signalen (Mitte). Rab7 war größtenteils auf unbeweglichen Strukturen zu finden, vereinzelt wurden jedoch auch von den späten Endosomen kurze Strecken zurückgelegt (Pfeil). Farbwahl: Rab7 magenta, Rab5a grün, Überlagerung der Signale zeigt sich in weiß. Horizontaler Maßstab: 10  $\mu\text{m}$ , Vertikaler Maßstab: 10 sek. Analyse der Zellen mit Mikroskop 2.

### 3.1.2. Das Genom von *U. maydis* codiert für drei putative Rab5-ähnliche GTPasen

Neben der als Marker für die Population der frühen Endosomen etablierten Rab5-GTPase Rab5a wurde eine weitere, verwandte GTPase im Genom von *U. maydis* identifiziert (Fuchs *et al.*, 2006). Weiterführende Analysen von Rab5b in *U. maydis* sind nicht bekannt. Eine wiederholte bioinformatische Analyse bestätigte die Verwandtschaft der beiden Proteine zu den Rab5-GTPasen. Eine Übersicht der durchgeführten Vergleiche zwischen den *U. maydis*-, *S. cerevisiae*-, und *H. sapiens*-Proteinen ist in Abb. 16A dargestellt. Dabei konnte Rab5a (UMAG\_10615) mit jeweils etwa 50 % Identität zu den humanen Rab5-GTPasen über das bioinformatische BLAST-Programm (NCBI) zugeordnet werden. Die Identität von UMAG\_10615 zu der Rab5A-GTPase aus *Homo sapiens* betrug 56,63 %, bei einem E-Wert von  $7 \cdot 10^{-69}$ , zu der Rab5B-GTPase 48,61 % mit einem E-Wert von  $4 \cdot 10^{-70}$  und zu Rab5C 49,38 % bei einem E-Wert von  $2 \cdot 10^{-70}$ . Der E-Wert wird bei bioinformatischen Analysen wie BLAST unter Berücksichtigung der Gesamtanzahl an verfügbaren Aminosäuren oder Nukleinsäuren in der Datenbank und der Länge der Abfragesequenz bestimmt. Dabei gibt der E-Wert die Anzahl an Sequenzen an, von denen erwartet wird, dass sie basierend auf zufällige Zuordnung als passend gewertet werden. Je kleiner der dargestellte E-Wert ist, desto vertrauenswürdiger ist die gefundene Übereinstimmung (Kerfeld und Scott, 2011). Bei einem Vergleich mit dem Genom von *S. cerevisiae* wurden als Proteine mit der größten Ähnlichkeit Vps21 (Identität 59,49 %, E-Wert  $2 \cdot 10^{-75}$ ) und Ypt53 (Identität 49,48 %, E-Wert  $8 \cdot 10^{-62}$ ) identifiziert. Die Analyse der konservierten Domänen (NCBI) bestimmte für UMAG\_10615 eine Rab5-assoziierte Domäne mit einem E-Wert von  $1,96 \cdot 10^{-104}$ , eine für Proteine der Ras-Familie spezifische Domäne mit einem E-Wert von  $6,77 \cdot 10^{-80}$  und eine Domäne spezifisch für Rab-Proteine mit Funktion in vesikulären Transportprozessen mit einem E-Wert von  $2,37 \cdot 10^{-74}$ . Das Rab5b Protein von *U. maydis* (UMAG\_02485) zeigte insgesamt etwa 70 % Identität zu den Rab5-GTPasen von *H. sapiens*. Im genauen Vergleich lag die Identität von UMAG\_02485 zu der Rab5A-GTPase von *H. sapiens* bei 70,83 %, mit einem E-Wert von  $1 \cdot 10^{-81}$ , zu der Rab5B-GTPase 68,6 % mit einem E-Wert von  $3 \cdot 10^{-81}$  und zu Rab5C 68,13 % bei einem E-Wert von  $4 \cdot 10^{-83}$ . Bei einem Vergleich mit dem Genom von *S. cerevisiae* wurde als Protein mit der größten Ähnlichkeit Ypt52 (Identität 57 %, E-Wert  $6 \cdot 10^{-67}$ ) identifiziert. Die Analyse der konservierten Domänen (NCBI) für



UMAG\_02485 identifizierte eine Rab5-assoziierte Domäne mit einem E-Wert von  $1,6 \cdot 10^{-115}$ , eine für Proteine der Ras-Familie spezifische Domäne mit einem E-Wert von  $3,62 \cdot 10^{-86}$  und eine Domäne spezifisch für Rab-Proteine mit Funktion in vesikelbasierten Transportprozessen mit einem E-Wert von  $8,84 \cdot 10^{-83}$ . Neben den beiden bereits bekannten Rab5-GTPasen konnte auch ein Protein mit einer Rab5c-ähnlichen Domäne identifiziert werden. Rab5c ist nach bisherigen Erkenntnissen im Verlaufe der Evolution erst nach der Entstehung der Vertebraten nachweisbar, sowie bei einer unabhängigen Genomduplikation bei *S. cerevisiae*. Basale Gruppen von pilzlichen Organismen enthalten lediglich Rab5a und Rab5b (Klöpper *et al.*, 2012). UMAG\_11007, im Folgenden Rab5c genannt, wies eine Identität von 48 % zu den Rab5-GTPasen von *H. sapiens* auf. Im genauen Vergleich konnte die Identität von UMAG\_11007 zu der Rab5A-GTPase von *H. sapiens* mit 46,32 %, bei einem E-Wert von  $2 \cdot 10^{-37}$  bestimmt werden. Zu der Rab5B-GTPase war UMAG\_11007 47,55 % identisch mit einem E-Wert von  $9 \cdot 10^{-39}$  und zu Rab5C 47,06 % bei einem E-Wert von  $2 \cdot 10^{-38}$ . Bei einem Vergleich mit dem Genom von *S. cerevisiae* wurde als Protein mit der größten Ähnlichkeit Ypt53 (Identität 46,88 %, E-Wert  $5 \cdot 10^{-32}$ ) identifiziert. Die Analyse der konservierten Domänen (NCBI) für UMAG\_11007 zeigte eine Rab-assoziierte Domäne mit einem E-Wert von  $6,95 \cdot 10^{-60}$ . Eine Domäne spezifisch für Proteine der RabGTPasen-Familie, assoziiert mit Rab5 und der Regulation der Fusion von frühen Endosomen, wurde mit einem E-Wert von  $4,87 \cdot 10^{-58}$  nachgewiesen und eine Domäne spezifisch für Rab-Proteine mit Funktion in vesikulären Transportprozessen mit einem E-Wert von  $3,22 \cdot 10^{-54}$ .

Vergleicht man die Rab5-GTPasen in *U. maydis* untereinander, so zeigte sich, dass zwischen den einzelnen Proteinen Ähnlichkeiten von 40-50 % bestehen. Rab5a ist zu 49,41 % identisch mit Rab5b (E-Wert  $3 \cdot 10^{-75}$ ) und zu 43,55 % mit Rab5c (E-Wert  $5 \cdot 10^{-34}$ ). Rab5b und Rab5c sind untereinander 42,94 % identisch (E-Wert  $2 \cdot 10^{-34}$ ).

Um die Verwandtschaftsverhältnisse genauer zu analysieren wurde mit dem Programm MABL ein Stammbaum erstellt (Abb. 16B). Dabei wurden für den Vergleich der *U. maydis* Proteine die Rab5- und Rab7-GTPasen von *H. sapiens* und *S. cerevisiae* herangezogen, sowie als Vertreter für weitere filamentöse Pilze *A. nidulans* und *N. crassa*. Deutlich zu sehen war, dass die Rab7-GTPasen aller in die Analyse miteinbezogenen Organismen im Vergleich zu den Rab5-GTPasen eine Außengruppe bildeten. Dabei zeigten die Rab7-GTPasen aus *A. nidulans* und

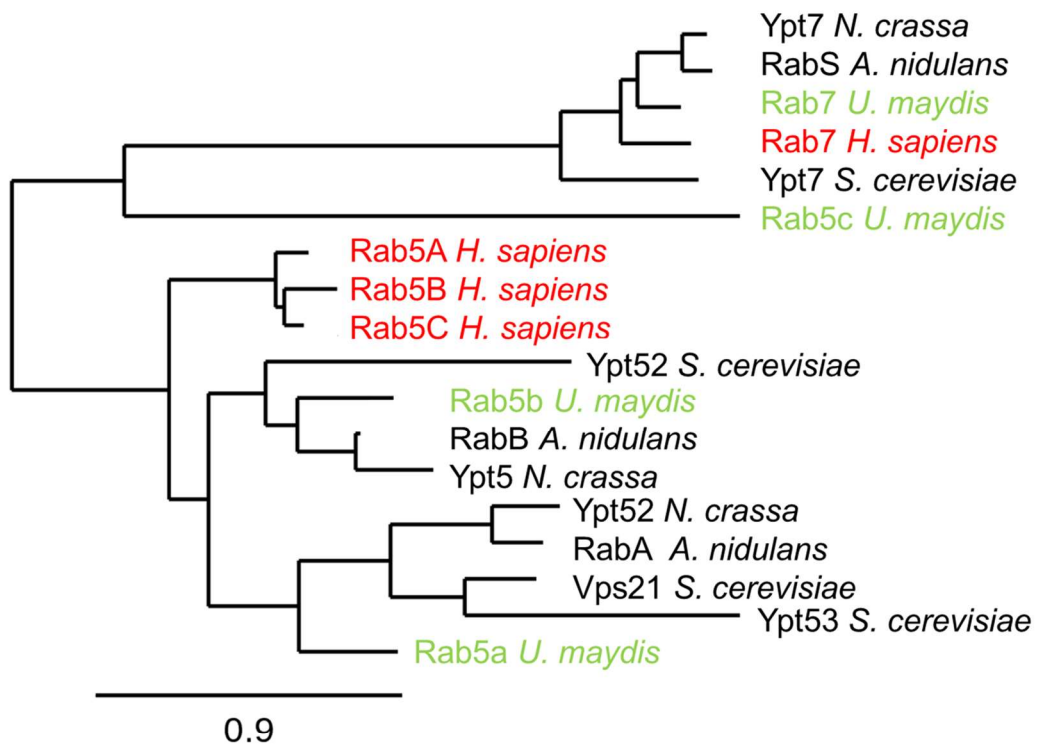
## Ergebnisse

*N. crassa* den höchsten Verwandtschaftsgrad, dicht gefolgt von *U. maydis*. Sowohl *H. sapiens* als auch *S. cerevisiae* bildeten verwandtschaftlich weiter entfernte Abzweigungen im Phylogramm. Betrachtete man lediglich die Rab5-GTPasen, so zeigte Rab5c von *U. maydis* am wenigsten Ähnlichkeit mit den übrigen Rab5-GTPasen aller anderen untersuchten Organismen. Die nächste Verwandtschaft zu allen drei Rab5-GTPasen von *H. sapiens* zeigten Ypt52 aus *S. cerevisiae*, Rab5b von *U. maydis*, Ypt5 von *N. crassa*, sowie RabB von *A. nidulans*. Die durch die Genomduplikation in Hefe entstandenen Rab5-GTPasen Vps21 und Ypt53 waren dagegen näher verwandt mit Rab5a aus *U. maydis*, RabA aus *A. nidulans* und Ypt52 aus *N. crassa*.

A

<i>U. maydis</i>	Rab5a (UMAG_10615)			Rab5b (UMAG_02485)			Rab5c (UMAG_11007)		
Ähnlichkeit zu <i>H. sapiens</i>	Rab5A	Rab5B	Rab5C	Rab5A	Rab5B	Rab5C	Rab5A	Rab5B	Rab5C
	56,63 %	48,61 %	49,38 %	70,83 %	68,6 %	68,13 %	46,32 %	47,55 %	47,06 %
	7·10 <sup>-69</sup>	4·10 <sup>-70</sup>	2·10 <sup>-70</sup>	1·10 <sup>-81</sup>	3·10 <sup>-81</sup>	4·10 <sup>-83</sup>	2·10 <sup>-37</sup>	9·10 <sup>-39</sup>	2·10 <sup>-38</sup>
Ähnlichkeit zu <i>S. cerevisiae</i>	Vps21	Ypt52	Ypt53	Vps21	Ypt52	Ypt53	Vps21	Ypt52	Ypt53
	59,49 %	43,65 %	49,48 %	51,38 %	57 %	43,52 %	45,74 %	44,7 %	46,88 %
	2·10 <sup>-75</sup>	3·10 <sup>-62</sup>	8·10 <sup>-62</sup>	9·10 <sup>-68</sup>	6·10 <sup>-67</sup>	6·10 <sup>-56</sup>	4·10 <sup>-31</sup>	8·10 <sup>-32</sup>	5·10 <sup>-32</sup>
Konservierte Domänen (mit steigendem E-Wert)	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Rab5-assoziiert</li> <li>- Ras-Familien-Domäne</li> <li>- Rab-Proteine mit Funktion im Vesikeltransport</li> </ul>			<ul style="list-style-type: none"> <li>- Rab5-assoziiert</li> <li>- Ras-Familien-Domäne</li> <li>- Rab-Proteine mit Funktion im Vesikeltransport</li> </ul>			<ul style="list-style-type: none"> <li>- Rab-assoziiert</li> <li>- RabGTPasen-Domäne assoziiert mit Rab5 und der Regulation der frühen Endosomen</li> <li>- Rab-Proteine mit Funktion im Vesikeltransport</li> </ul>		

B



## Ergebnisse

### **Abb. 16: Rab5b ist die Rab5-GTPase aus *U. maydis* mit der nächsten Verwandtschaft zu den humanen Rab5-GTPasen**

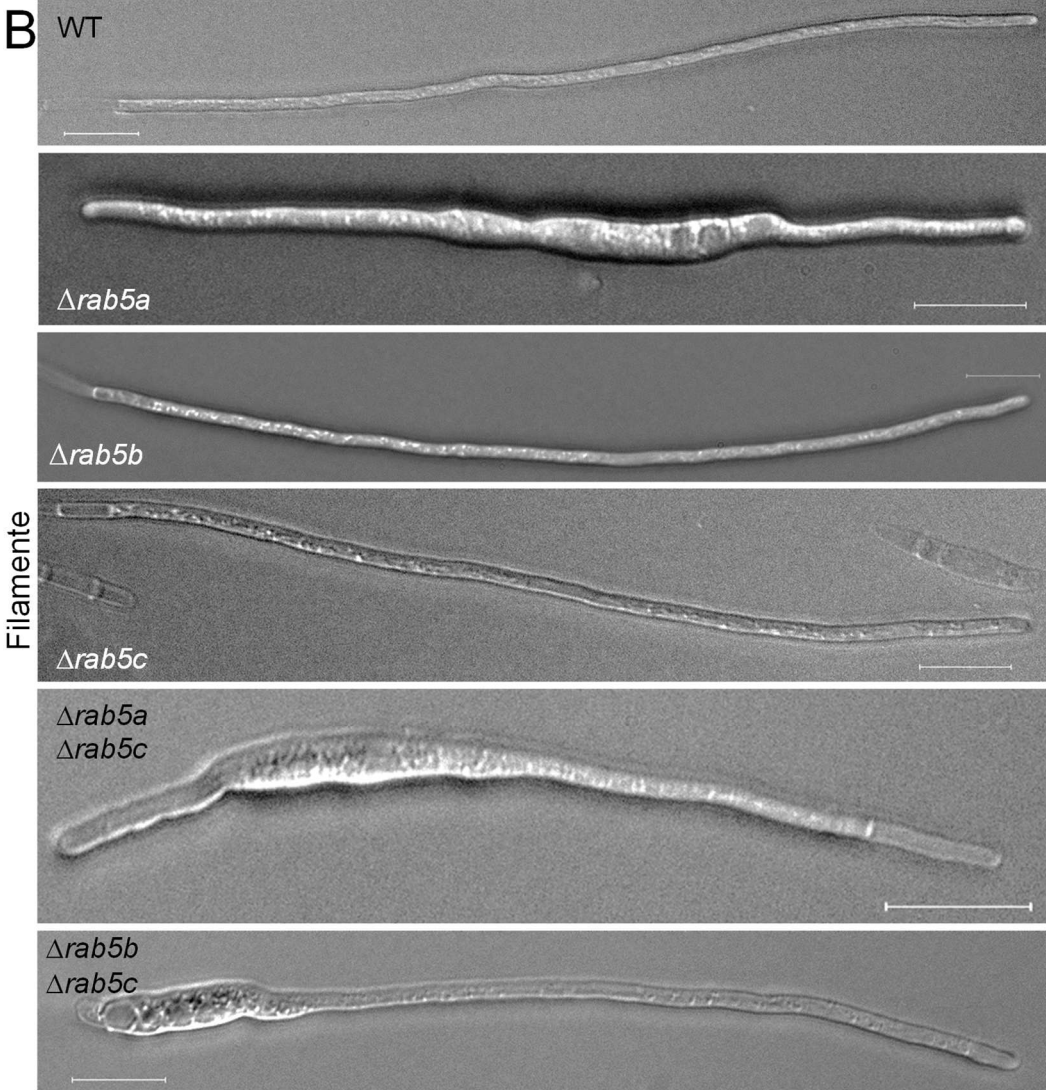
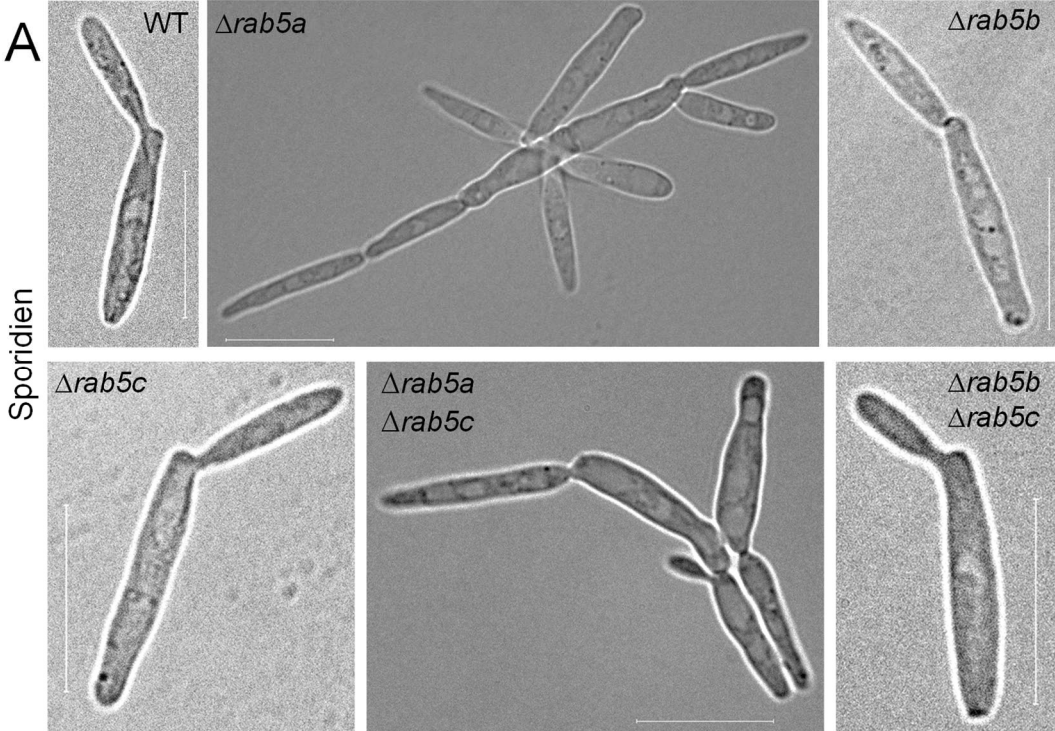
**A)** Übersicht der durch BLAST-Analysen (NCBI) ermittelten Ähnlichkeiten auf Proteinebene zwischen den Rab5-GTPasen aus *U. maydis*, *S. cerevisiae* und *H. sapiens*. Darstellung von Identität (in %) und E-Wert. Rab5a aus *U. maydis* zeigte die größte Ähnlichkeit zu Vps21 aus Hefe. Das Rab5b aus *U. maydis* war im Vergleich mit den beiden anderen Rab5-GTPasen aus *U. maydis* am ähnlichsten zu allen drei humanen Rab5-GTPasen. Rab5c aus *U. maydis* zeigte die größte Ähnlichkeit zu dem humanen Rab5B und Rab5C. Alle drei Rab5-GTPasen aus *U. maydis* enthielten typische Proteindomänen, welche mit Rab-Proteinen und dem Vesikeltransport in Verbindung gebracht werden konnten. **B)** Vergleich der Verwandtschaftsverhältnisse der Rab5- und Rab7-GTPasen aus dem humanen Genom (rot), *S. cerevisiae* und den filamentösen Pilzen *U. maydis* (grün), *A. nidulans* und *N. crassa*. Die Rab7 Proteine bildeten eine Außengruppe, während bei den Rab5-GTPasen Rab5c aus *U. maydis* die entfernteste Verwandtschaft zu den übrigen analysierten GTPasen zeigten. Eine Untergruppe mit naher Verwandtschaft konnte für *U. maydis* Rab5a, *S. cerevisiae* Vps21 und Ypt53, *N. crassa* Ypt52 und RabA aus *A. nidulans* beobachtet werden. Die Rab5-GTPasen aus *H. sapiens* bildeten eine eigene Untergruppe, zu welchen Rab5b aus *U. maydis* die nächste Verwandtschaft zeigte. Der Maßstab bezieht sich auf die Anzahl an Merkmalsunterschieden (Weigand, 2015).

### 3.1.3. Die Deletionen von *rab5a*, *rab5b* und *rab5c* wirken sich unterschiedlich auf die Zellmorphologie und Pathogenität aus

Da Rab5 zu den evolutionär konservierten GTPasen gehört, die verschiedenen Isoformen jedoch nur teilweise redundante Funktionen aufweisen (Klöpper *et al.*, 2012), wurden zunächst die Einflüsse der drei putativen Rab5-GTPasen auf die Zellmorphologie von *U. maydis* untersucht. Zellen, denen *rab5a* fehlte, zeigten Beeinträchtigungen bei der Zytokinese (Abb. 17). Die Sporidien von UKS47 (*AB31Δrab5a*) konnten sich nach der Mitose nicht immer separieren, wodurch aneinanderhängende Ketten von Zellen entstanden. Auswirkungen der *rab5a*-Deletion auf das filamentöse Wachstum wurden bereits beschrieben und deckten sich mit den Beobachtungen dieser Arbeit (Bielska *et al.*, 2014b, Schneider, 2016). Filamente, denen *rab5a* fehlte, zeigten Störungen der Zellpolarität und wuchsen bipolar. Zellen, in denen *rab5b* deletiert wurde (URS3: *AB31Δrab5b*), zeigten jedoch keine Beeinträchtigung der Zellmorphologie. Diese Beobachtung deckte sich mit Ergebnissen von Vorarbeiten (Suhrborg, 2017). Die Sporidien lagen separiert vor und waren morphologisch mit dem Wildtyp vergleichbar. Induzierte Filamente zeigten ein unipolares Wachstum mit langen und dünnen Zellen, welche ebenfalls dem Wildtyp glichen. Eine Deletion von *rab5c* (UKS393: *AB31Δrab5c*) hatte ebenfalls keine Auswirkungen auf die Zellmorphologie. Sowohl die Sporidien als auch die Filamente unterschieden sich morphologisch nicht von Wildtypzellen. Analysen der Rab5-GTPasen in *S. cerevisiae* konnten jedoch eine funktionelle Redundanz beschreiben (Singer-Krüger *et al.*, 1994). Aus diesem Grund wurden auch in *U. maydis* Doppeldeletionen der GTPasen untersucht, um konkrete Rückschlüsse auf die

Funktionen der einzelnen Proteine und eine mögliche Funktionsübernahme bei Verlust einer der GTPasen durch die übrigen beiden ziehen zu können. Die Analyse der generierten Stämme wurde, wie für die Einzeldelationen beschrieben, durchgeführt. Eine Doppeldelation von *rab5b* und *rab5c* (UKS424: AB31 $\Delta$ *rab5b* $\Delta$ *rab5c*) hatte, wie bereits die jeweiligen Einzeldelationen, keinerlei Auswirkungen auf die Zellmorphologie. Die Doppeldelation von *rab5a* und *rab5c* (UKS396: AB31 $\Delta$ *rab5a* $\Delta$ *rab5c*) führte, wie bereits die Deletion von *rab5a* allein zu Sporidien mit Zytokinesedefekt und Polaritätsstörungen bei filamentösen Wachstumsvorgängen. Zahlreiche Versuche einen Stamm zu generieren, in dem *rab5a* und *rab5b* gemeinsam deletiert waren, scheiterten. Da die Möglichkeit besteht, dass die Rab5-basierte Endozytose in *U. maydis* einen essenziellen Prozess darstellt wurde versucht, durch ein Kreuzungsexperiment nachzuweisen, ob Stämme mit einer Doppeldelation lebensfähig sind. Bei der Kreuzung zweier kompatibler Stämme, von denen jeweils einer die Deletion von *rab5a* und der andere die von *rab5b* trägt, fusionieren die Zellen vor der Pflanzeninfektion. Im Verlauf der Proliferation in der Pflanze kommt es zur Fusion der Zellkerne. Beim Auskeimen der Sporen durchlaufen die Zellen eine meiotische Teilung und es werden erneut haploide Sporidien gebildet (Steinberg und Perez-Martin, 2008). Die Meioseprodukte sollten durchschnittlich in allen Kombinationsmöglichkeiten mit der gleichen Häufigkeit auftreten (Banuett und Herskowitz, 1989). Bei der Kreuzung der Stämme UKS88 (FB1, *a1b1* $\Delta$ *rab5a*) und URS6 (FB2, *a2b2* $\Delta$ *rab5b*) waren theoretisch folgende Kombinationen nach der meiotischen Aufspaltung möglich: *rab5a/rab5b*,  $\Delta$ *rab5a/rab5b*, *rab5a*/ $\Delta$ *rab5b*,  $\Delta$ *rab5a*/ $\Delta$ *rab5b*. Die Deletionen sind in den Ausgangsstämmen mit verschiedenen Resistenzmarkern gekoppelt. Eine Doppeldelation kann folglich an der Ausbildung beider Resistenzen identifiziert werden. Von 48 analysierten Sporenkolonien konnte kein Stamm mit einer Doppeldelation identifiziert werden (Daten nicht gezeigt). Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass die Doppeldelation von *rab5a* und *rab5b* letal ist.

Ergebnisse



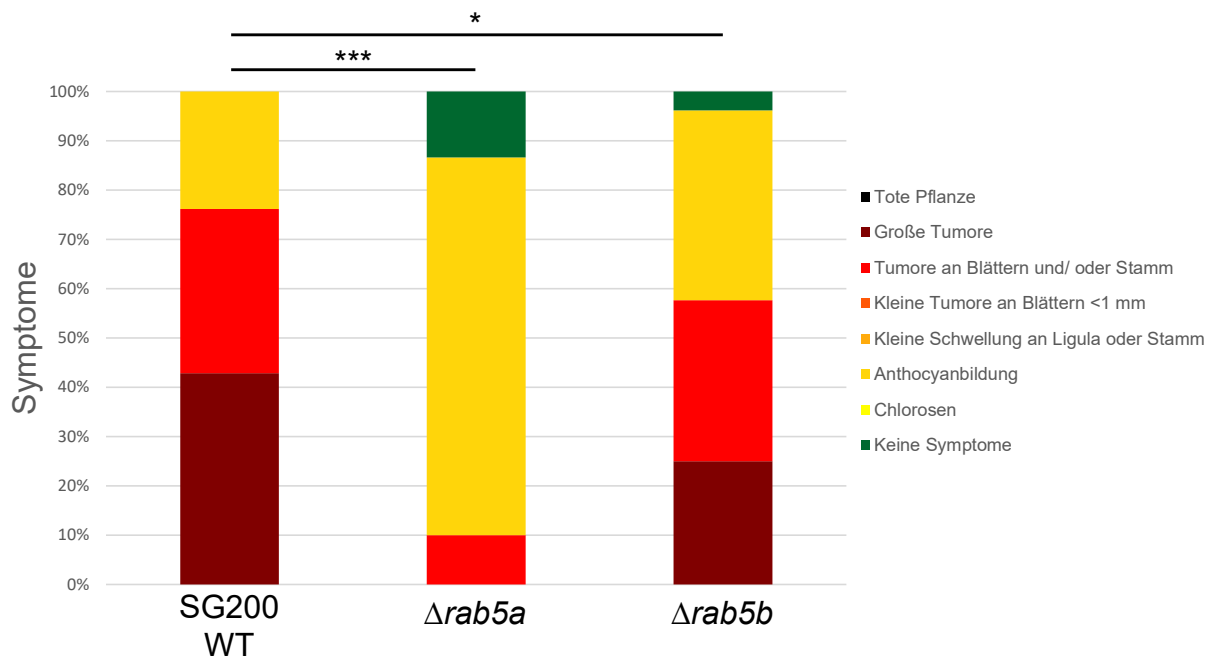
**Abb. 17: Die Deletion von *rab5a* beeinträchtigt die Zellmorphologie**

**A)** Untersuchungen der Morphologie von Sporidien im DIC-Kanal ergaben unterschiedlich schwerwiegende Effekte der Deletionen von *rab5a*, *rab5b*, *rab5c* oder Kombinationen aus diesen Deletionen. Weder die Deletion von *rab5b* noch von *rab5c* oder einer Kombination aus beiden Deletionen führte zu morphologischen Veränderungen der Sporidien. Das Fehlen von *rab5a* dagegen bewirkte Zytokinesedefekte. Eine zusätzliche Deletion von *rab5c* führte zu keiner bemerkenswerten Verschlimmerung des Phänotyps. **B)** Ein ähnliches Bild ergab die Analyse des filamentösen Wachstums. Deletionen von *rab5b*, *rab5c* oder beiden GTPasen in einem Stamm hatten keine sichtbaren Auswirkungen auf das filamentöse Wachstum. Die Deletion von *rab5a* dagegen führte zu Polaritätsstörungen, welche auch in Stämmen mit zusätzlicher Deletion von *rab5c* beobachtet werden konnten. Untersuchung der Zellen durch Mikroskop 1 im DIC-Kanal. Maßstab: 10 µm.

Im Filament spielt die endozytotische Maschinerie an der wachsenden Zellspitze eine wichtige Rolle für die Etablierung der polaren Achse und der effektiven Interaktion mit der Wirtspflanze für eine erfolgreiche Kolonisierung des Wirtsgewebes. Störungen in den Abläufen der Endozytose haben nachweislich Einschränkungen auf die Pathogenität von *U. maydis* (Lehmler *et al.*, 1997, Fuchs *et al.*, 2006, Valinluck *et al.*, 2014, Bielska *et al.*, 2014b). Aufgrund der unterschiedlichen Auswirkungen der Deletionen von *rab5a* und *rab5b* auf das filamentöse Wachstum von *U. maydis* (vgl. Abb. 17), wurde auch der Einfluss auf die Pathogenität überprüft. Dazu wurden zunächst beide Deletionen einzeln in den solopathogenen Stamm SG200 (Bölker *et al.*, 1995a) eingebracht, jeweils sieben Tage alte Maispflanzen des Typs Early Golden Bantam mit je drei unabhängigen Transformanten infiziert und die Symptome 7 dpi, im Vergleich zu einer Infektion des SG200-Wildtypstammes, analysiert. Die Auswertung von jeweils einer repräsentativen Infektion ist in Abb. 19 dargestellt. Der Anteil an Tumorwachstum war zwischen dem SG200-Wildtyp und SG200 $\Delta$ *rab5b*-Stämmen ähnlich. Zusätzlich konnten ausschließlich bei der Infektion mit den *rab5b*-Deletionsstämmen in manchen Fällen keine Symptome ausgelöst werden. Dennoch konnte die geringe Reduktion der Pathogenität durch die Deletion von *rab5b* im Vergleich mit dem Wildtyp in zwei von drei Infektionen als signifikant gewertet werden (SG200 $\Delta$ *rab5b*, URS7-1 p-Wert 0,1196; URS7-2 p-Wert 0,0279; URS7-3 p-Wert 0,00938). Die Beurteilung der Signifikanz erfolgte durch einen Mann-Whitney-U-Test. Im Gegensatz dazu konnten bei Stämmen, denen *rab5a* fehlte, eine deutlich reduzierte Pathogenität analysiert werden. Keiner der  $\Delta$ *rab5a*-Stämme war in der Lage die Bildung von großen Tumoren auszulösen. Es wurden entweder keine Symptome, lediglich Anthocyaninduktion oder zu geringen Anteilen die Bildung von kleinen Tumoren beobachtet. Die Reduktion der Pathogenität im Vergleich mit dem SG200-Wildtyp wurde für alle drei durchgeführten Infektionen mit unabhängigen

## Ergebnisse

Transformanten als signifikant eingestuft (SG200 $\Delta rab5a$ , UKS97 p-Wert  $3,3 \cdot 10^{-12}$ ; UKS98 p-Wert  $1,5 \cdot 10^{-8}$  und UKS99 p-Wert  $4,5 \cdot 10^{-8}$ ). Der Test auf Signifikanz erfolgte durch einen Mann-Whitney-U-Test.



**Abb. 18: Die Deletionen von *rab5a* und *rab5b* reduzieren die Pathogenität von solopathogenen Stämmen**

Sieben Tage alte Maispflanzen der Sorte Early Golden Bantam wurden mit dem solopathogenen Stamm SG200, sowie mit 3 unabhängigen Transformanten SG200 $\Delta rab5a$  (UKS97, UKS98 und UKS99) und SG200 $\Delta rab5b$  (URS7-1, URS7-2 und URS7-3) infiziert und die Symptome 7 Tage nach Infektion ausgewertet. Dargestellt wurde jeweils eine repräsentative Infektion aus drei durchgeführten Studien. Im Vergleich zum SG200 WT zeigten alle drei  $\Delta rab5a$ -Stämme eine signifikant reduzierte Pathogenität, und konnten lediglich Anthocyanbildung oder die Bildung kleiner Blatttumore induzieren. SG200 $\Delta rab5b$  dagegen konnte die Maispflanzen ähnlich stark wie der Wildtyp infizieren. Die geringfügig schwächere Infektion durch SG200 $\Delta rab5b$  im Vergleich mit dem Wildtyp wurde in zwei von drei Infektionen als signifikant eingestuft. Die Überprüfung der Signifikanz erfolgte durch einen Mann-Whitney-U-Test. Signifikanz \* p-Wert<0,05 \*\* p-Wert<0,01 \*\*\* p-Wert<0,001.

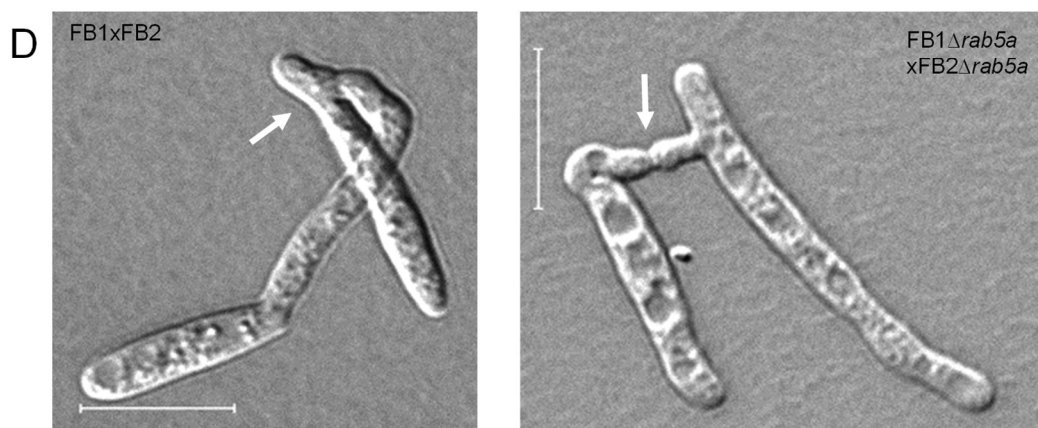
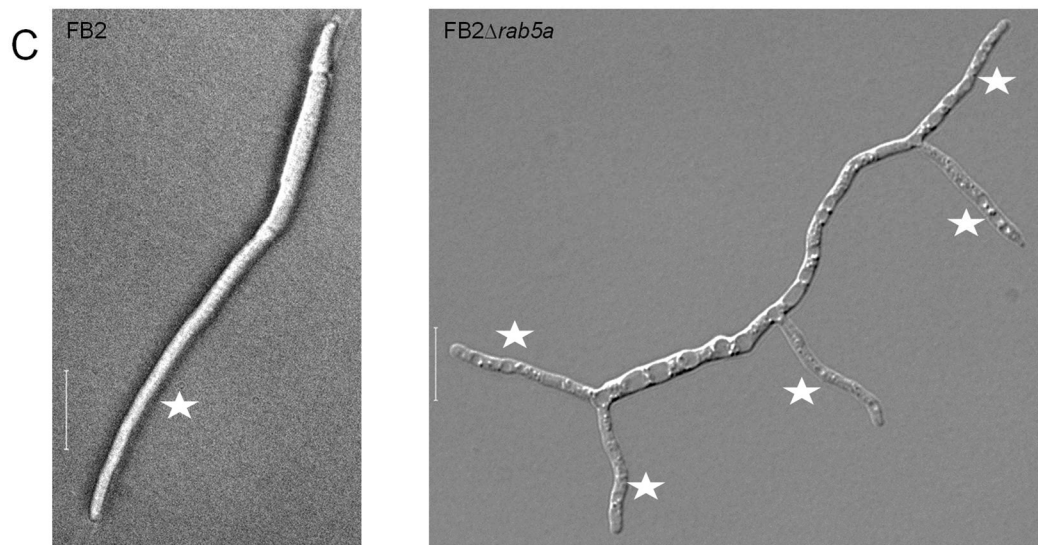
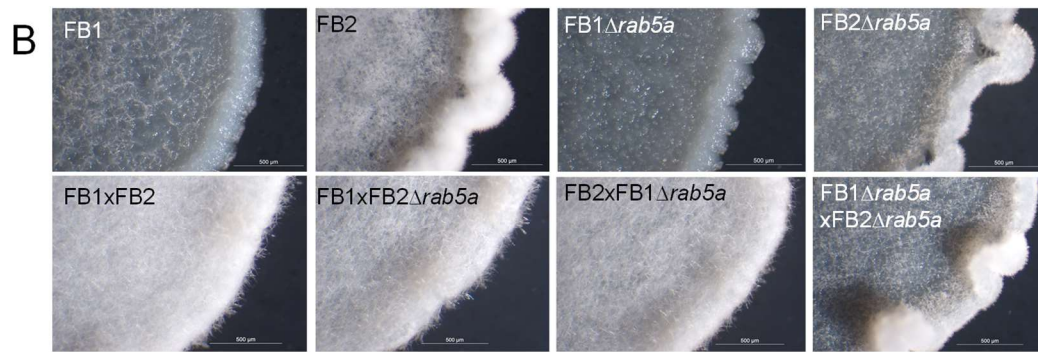
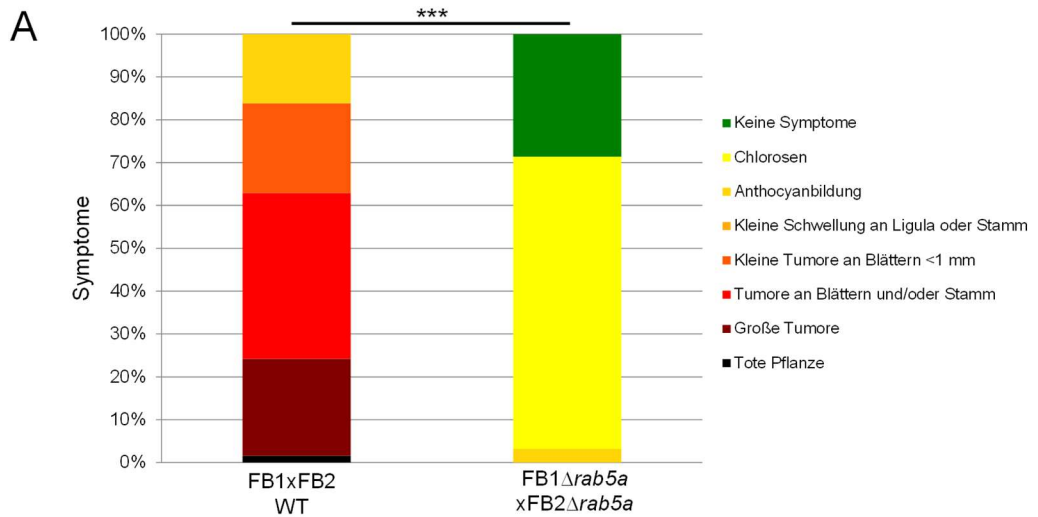
Da die Infektion mit dem solopathogenen Stamm SG200 einen artifiziellen Versuchsaufbau darstellt und die Pilzhyphen im Gegensatz zu der natürlichen Gegebenheit vor der Penetration der Pflanze keine Fusion eingehen müssen, wurden erneute Infektionsstudien mit dem Vergleich einer Kreuzung der Stämme FB1+FB2 und FB1 $\Delta rab5a$ +FB2 $\Delta rab5a$  durchgeführt. FB1 (*a1b1*) und FB2 (*a2b2*) unterscheiden sich in den beiden, für die Paarung ausschlaggebenden, genetischen Loci und können dadurch miteinander fusionieren, ein filamentöses Dikaryon bilden und die Pflanze infizieren. Wie in Abb. 19A für eine repräsentative Infektion dargestellt, wurde diese Infektion zweimal unabhängig mit verschiedenen Transformanten wiederholt. Es



wurden erneut sieben Tage alte Maispflanzen infiziert und die Symptome der Infektion nach weiteren sieben Tagen quantifiziert. Die Infektion mit den Wildtypstämmen FB1+FB2 induzierte in 70-80 % Tumore und nur in wenigen Fällen wurden schwache Infektionssymptome beobachtet. Im Gegensatz dazu waren die *rab5a*-Deletionsstämmen nur in begrenztem Umfang in der Lage die Pflanzen erfolgreich zu infizieren. 20-30 % der Pflanzen waren asymptomatisch. Mehr als die Hälfte der infizierten Pflanzen zeigte lediglich die Ausbildung von Chlorosen, Anthocyanbildung konnte bei weniger als 10 % der Pflanzen beobachtet werden. Die Auswirkungen der Deletion von *rab5a* auf die Pathogenität wurden im Vergleich mit der Wildtypinfektion als signifikant gewertet (UKS88xUKS555 p-Wert  $6,6 \cdot 10^{-15}$ ; UKS89xUKS556 p-Wert 0). Eine Einstufung der Signifikanz der beobachteten Effekte erfolgte durch einen Mann-Whitney-U-Test. Da bei der Infektion der FB1+FB2 Stämme im Gegensatz zu der Infektion mit dem SG200-Stamm eine Zell-Zell-Erkennung, der Austausch von Pheromonen und die anschließende Zellfusion für eine erfolgreiche Infektion notwendig ist, wurden diese Fähigkeiten in den Mutantenstämmen überprüft. Dazu wurden kompatible Stämme auf aktivkohlehaltiges Medium aufgetragen, welches die Zellfusion und das filamentöse Wachstum induziert. Die Filamentbildung wird durch die Entstehung von Kolonien mit weißem Myzel sichtbar (Laity *et al.*, 1995, Banuett und Herskowitz, 1988). Als Vergleich wurden die zu untersuchenden Stämme einzeln aufgebracht und zeigten im Falle von FB1 und FB1 $\Delta rab5a$  keine, oder im Falle von FB2 und FB2 $\Delta rab5a$  geringfügig weiß gefärbte Kolonien (Abb. 19B). Durch Untersuchungen der Kolonien unter Zuhilfenahme des Binokulars 5 konnte die weiße Färbung als Filamentbildung bestätigt werden. Die Kreuzung von FB1 und FB2 führte zu weißen, filamentösen Kolonien. Ebenfalls filamentöse Kolonien wurden ausgebildet, wenn mindestens einer der Kreuzungspartner im Besitz des *rab5a* Gens war. So waren sowohl FB1xFB2 $\Delta rab5a$ , als auch FB1 $\Delta rab5a$ xFB2 in der Lage filamentös zu wachsen. Fehlte beiden Kreuzungspartnern *rab5a*, so war lediglich das geringfügig filamentöse Wachstum zu beobachten, wie es bereits FB2 $\Delta rab5a$  einzeln zeigte. Aus diesem Grund wurde die Fähigkeit der Deletionsstämmen überprüf Konjugationshyphen als Fusionsinitiation auszubilden. Dazu wurde der FB2-Wildtypstamm, sowie FB2 $\Delta rab5a$  mit synthetischem  $\alpha 1$ -Pheromon 24 h lang inkubiert und die Zellen anschließend mikroskopisch analysiert (Abb. 19C). Der Wildtyp bildete durch die Pheromonstimulation von den Zellpolen ausgehende Konjugationshyphen. FB2 $\Delta rab5a$  zeigte stattdessen eine Ausbildung von

## Ergebnisse

Konjugationshyphen in der Zellmitte, sowie in verzweigter Ausführung an den Zellpolen. Da die Mutanten jedoch generell in der Lage zu sein schienen Konjugationshyphen auszubilden, wurde die Paarung der kompatiblen Stämme für mikroskopische Analysen in Flüssigkultur mit Aktivkohlezugabe 24 h stimuliert (Abb. 19D). Die Wildtypstämme FB1 und FB2 zeigten die Bildung von Konjugationshyphen, eine Erkennung von kompatiblen Zellen, sowie erste Fusionierungsschritte an den Zellpolen mit anschließender gemeinsamer Wuchsrichtung.  $FB1\Delta rab5a$  und  $FB2\Delta rab5a$  konnten ebenfalls ihre Kompatibilität überprüfen und durch die Ausbildung von Konjugationshyphen aufeinander zuwachsen. Die Bildung dieser Konjugationshyphen erfolgte jedoch oftmals von der Zellmitte aus, so dass die beiden Zellen durch die räumliche Anordnung an einem filamentösen Wachstum gehindert wurden. Mikroskopische Beobachtungen lassen vermuten, dass die Zellwand an der Kontaktstelle der beiden Zellen nicht aufgelöst wurde, sodass keine Aussage getroffen werden kann ob die Zellen tatsächlich in der Lage waren zu fusionieren.



## Ergebnisse

### **Abb. 19: Rab5a ist notwendig für die Pathogenität von *U. maydis***

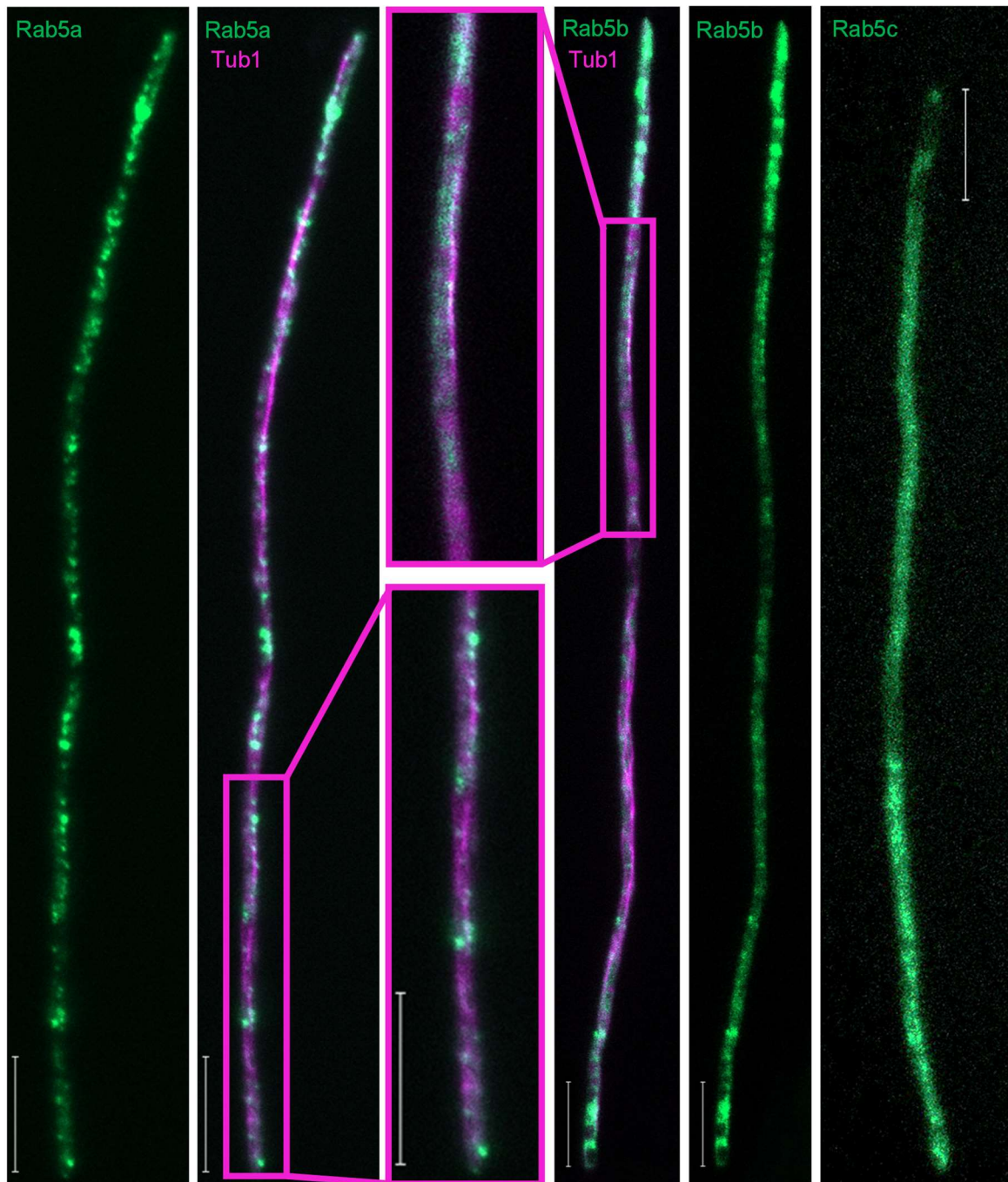
**A)** Sieben Tage alte Maispflanzen der Sorte Early Golden Bantam wurden mit den genetisch kompatiblen Stämmen FB1 und FB2, sowie mit je zwei unabhängigen Transformanten FB1 $\Delta$ *rab5a* (UKS88, UKS89) und dem dazu kompatiblen FB2 $\Delta$ *rab5a* (UKS555, UKS556) infiziert und die Symptome sieben Tage nach Infektion ausgewertet. Es wurde jeweils eine repräsentative Infektion dargestellt. Die Kreuzung der Wildtypstämme (FB1xFB2) löste starke Infektionssymptome bei den Maispflanzen aus und führte in etwa 70 % der Pflanzen zu Tumorbildung. Die Infektion mit den *rab5a*-Deletionsstämmen war dagegen apathogen und die Maispflanzen zeigten entweder keine Symptome, Chlorosen oder in wenigen Fällen Anthocyanbildung. Tumorbildung wurde bei keiner der mit  $\Delta$ *rab5a* infizierten Pflanzen induziert. Der beobachtete Einfluss der *rab5a*-Deletion auf die Pathogenität wurde durch einen Mann-Whitney-U-Test als signifikant eingestuft. Signifikanz \* p-Wert<0,05 \*\* p-Wert<0,01 \*\*\* p-Wert<0,001. **B)** Test auf filamentöses Wachstum auf aktivkohlehaltigen Platten. Um eine Selbststimulation der Stämme auf Aktivkohle auszuschließen, wurden die verwendeten Stämme einzeln auf CM-Aktivkohle getropft (oben). FB1 und FB1 $\Delta$ *rab5a* zeigten kein filamentöses Wachstum, bei FB2 und FB2 $\Delta$ *rab5a* konnte eine leichte Filamentbildung beobachtet werden. Kreuzung der genetisch kompatiblen Stämme auf CM-Aktivkohle (unten) zur Überprüfung der Fusionsfähigkeit. Die beiden Wildtypen FB1 und FB2 zeigten deutlich weiße, filamentöse Kolonien. Auch bei der Kreuzung von entweder FB1 $\Delta$ *rab5a* oder FB2 $\Delta$ *rab5a* mit dem jeweils kompatiblen Wildtypstamm konnte eine Filamentbildung beobachtet werden. Die Kreuzung zwischen FB1 $\Delta$ *rab5a* und FB2 $\Delta$ *rab5a* zeigte lediglich ein geringfügig filamentöses Wachstum, wie es bereits bei FB2 $\Delta$ *rab5a* ausgeprägt war. Analyse der Kolonien durch Binokular 5. Maßstab: 500  $\mu$ m. **C)** Induktion von Konjugationshyphen bei FB2 (links) und FB2 $\Delta$ *rab5a* (rechts) über 24 h mit synthetischem a1-Pheromon. Der Wildtyp zeigte eine polare Konjugationshyphe (Stern). Durch die Deletion von *rab5a* bildeten die Zellen multiple Konjugationshyphen aus, welche sich verzweigten, sowie auch Konjugationshyphen, die nicht an den Zellpolen ihren Ursprung hatten (Sterne). Aufnahmen im DIC-Kanal mit Mikroskop 1. Maßstab: 10  $\mu$ m. **D)** Die Zugabe von Aktivkohle zu Flüssigmedium induzierte über 24 h die paarungstypgesteuerte Zellfusion. Bei den Wildtypstämmen FB1 und FB2 (links) konnte eine Zell-Zell-Erkennung, sowie eine augenscheinliche Verschmelzung der Zellen beobachtet werden (Pfeil). Dazu wuchsen zwei kompatible Zellen an je einem der Pole aus, um nach der Fusion gemeinsam in eine Richtung die Filamentbildung zu initiieren. Im Gegensatz dazu wuchsen  $\Delta$ *rab5a*-Zellen an mehreren Stellen aus, zeigten an zellmittig gebildeten Konjugationshyphen Fusionsansätze (Pfeil), an welchen jedoch nicht deutlich erkennbar war, ob die Zellwand zwischen den Zellen aufgelöst wurde. Die Kontaktaufnahme bildete ein räumliches Hindernis für die weitere Ausbildung der Konjugationshyphen. Aufnahmen im DIC-Kanal von Mikroskop 1. Maßstab: 10  $\mu$ m.

#### 3.1.4. Rab5a und Rab5b lokalisieren gemeinsam auf Endosomen

Um die Funktion von Rab5a, Rab5b und Rab5c näher beschreiben zu können, sollte zunächst die Lokalisierung innerhalb der Zelle untersucht werden. Für Rab5a sind bereits einige Beschreibungen der Lokalisierung und des Transportes bekannt, diese Untersuchungen wurden jedoch mit überexprimierten Fusionskonstrukten (Fuchs *et al.*, 2006, Higuchi *et al.*, 2014). Wie in 3.1.1 beschrieben, hatte eine solche Überexpression Einfluss auf die Lokalisierung und Bewegung der Endosomen. Rab5a lokalisierte auch bei Expression unter dem nativen Promotor auf Tub1-markierten Mikrotubulibündeln (UKS135: AB31 *gfp:rab5a*, *P<sub>terf</sub>:mCherry:tub1*) (Abb. 20). Bisher unbekannt war die Lokalisierung von Rab5b in *U. maydis*. Auch Rab5b konnte während des filamentösen Wachstums von *U. maydis* als punktförmige Strukturen entlang von Tub1-markierten Mikrotubuli beobachtet werden (UKS480: AB31 *gfp:rab5b*, *P<sub>terf</sub>:mCherry:tub1*) (Abb. 20). Im Vergleich zu Rab5a erschien das

Rab5b-Signal jedoch deutlich schwächer. Neben der erstmaligen Beschreibung der Rab5b-Lokalisierung in *U. maydis* (Suhrborg, 2017 und diese Arbeit) wurde auch die putative und bisher unbeschriebene Rab5c-GTPase analysiert. Die Lokalisierung von Rab5c (Abb. 20) war vorwiegend zytoplasmatisch mit vereinzelt punktuellen Strukturen, welche im Bereich der Zellspitze gehäuft auftraten (UKS493: AB31  $P_{nar1}:gfp:rab5c$ ). Rab5c wurde aufgrund des in Microarray-Daten ausgewerteten schwachen Expressionslevels (Heimel *et al.*, 2010, Daten nicht gezeigt) im *ip*-Locus unter Expression des starken  $P_{nar1}$  (Banks *et al.*, 1993) für 17 h durch Wechsel der Stickstoffquelle im Medium von Ammonium zu Nitrat induziert. Da die Fusion von Tub1 im nativen Locus vermutlich aufgrund der sterischen Hinderung nicht möglich ist und immer natives Protein vorhanden sein muss, kann die Visualisierung von Tub1 nur über eine ektopische Kopie des Fusions-Konstruktes erfolgen (Steinberg *et al.*, 2001) und eine Colokalisierung mit Rab5c war in diesem Kontext nicht realisierbar.

## Ergebnisse

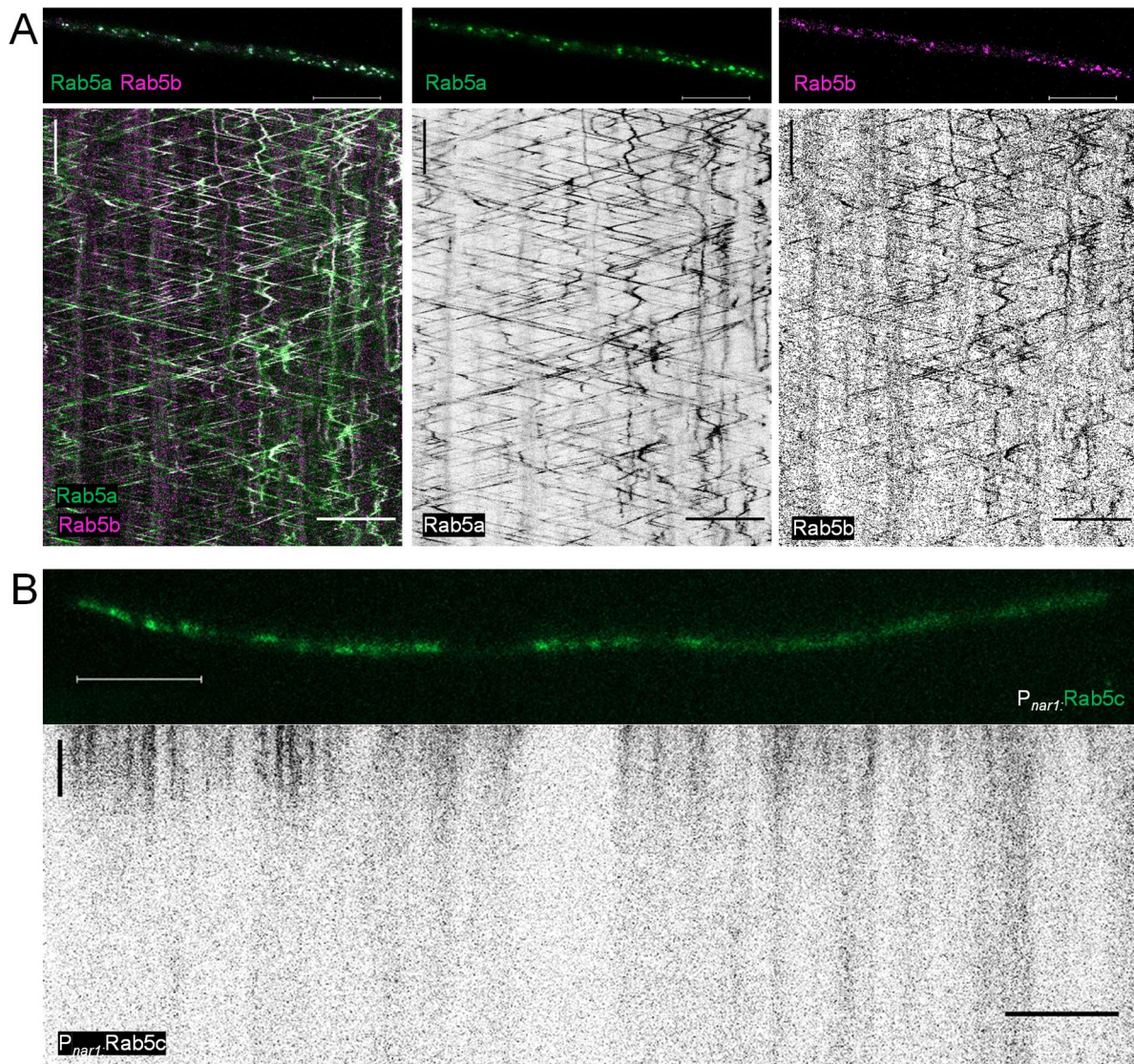


**Abb. 20: Rab5a und Rab5b lokalisieren auf Vesikeln entlang der Mikrotubuli, Rab5c überwiegend zytoplasmatisch**

Die Colokalisierung von Rab5a (links) mit Tub1 zeigte, dass sich die GTPase auf punktuellen Strukturen entlang der Mikrotubuli lokalisiert. Vergleichende Lokalisierungsstudien mit Rab5b (Mitte) und Tub1 implizierten eine ähnliche Lokalisierung. Die Lokalisierung von Rab5c (rechts) war überwiegend zytoplasmatisch mit vereinzelt punktuellen Strukturen, besonders im Bereich der Filamentspitze. Farbwahl: Tub1 magenta, Rab5a/Rab5b grün, Überlagerung der Signale zeigt sich in weiß. Maßstab: 10  $\mu$ m. Analysen durch Mikroskop 1.

Im Hinblick auf die fehlenden Auswirkungen der Deletion von *rab5b* auf die Morphologie der Zellen im Gegensatz zu der *rab5a*-Deletion musste eine Funktion als Rab5-GTPase aufgeklärt werden. Des Weiteren sollte untersucht werden, ob die GTPasen gemeinsam auf Endosomen lokalisieren oder ob auch in *U. maydis*, wie es bereits für andere Organismen beschrieben wurde, verschiedene Populationen an frühen Endosomen mit unterschiedlicher Markerzusammensetzung vorkommen (Miaczynska *et al.*, 2004). Eine partielle Colokalisierung von Rab5b mit dem überexprimierten Fusionskonstrukt von Rab5a sowie ein gemeinsamer Transport konnte in *U. maydis* in Vorarbeiten bereits gezeigt werden (Suhrborg, 2017). Wie in Abb. 21A zu sehen, zeigten Rab5a und Rab5b (UKS273: AB31 *gfp:rab5a, mCherry:rab5b*) auch mit der Expression unter dem nativen Promotor eine deutliche Colokalisierung, jedoch waren von beiden GTPasen auch einzelne Signale zu identifizieren. Diese waren überwiegend Rab5a-positiv. Mit Hilfe eines Kymographen wurde auch die gemeinsame Motilität beider Proteine visualisiert. Hierbei wurde deutlich, dass sich Rab5a und Rab5b vorwiegend gemeinsam auf Endosomen fortbewegen und dabei bidirektionale Bewegungsmuster zeigen. Die Bewegungen erfolgten dabei sowohl in Richtung der Hyphenspitze als auch in Richtung der Initialzelle. Aufgrund des trotz Expression unter  $P_{nar1}$  (Banks *et al.*, 1993) extrem schwachen Signals von Rab5c (Abb. 21B) und der rapide abnehmenden Signalintensität (Induktion Filamente und  $P_{nar1}$  über 17 h) war es schwierig einen Kymographen zu erstellen, um die Motilität des Proteins zu beurteilen (UKS493: AB31  $P_{nar1}:gfp:rab5c$ ). In den ersten detektierten Sekunden waren Bewegungsansätze zu beobachten, um eine konkrete Aussage treffen zu können sind jedoch weitere Versuchsansätze notwendig.

## Ergebnisse



### Abb. 21: Rab5a und Rab5b werden überwiegend gemeinsam transportiert

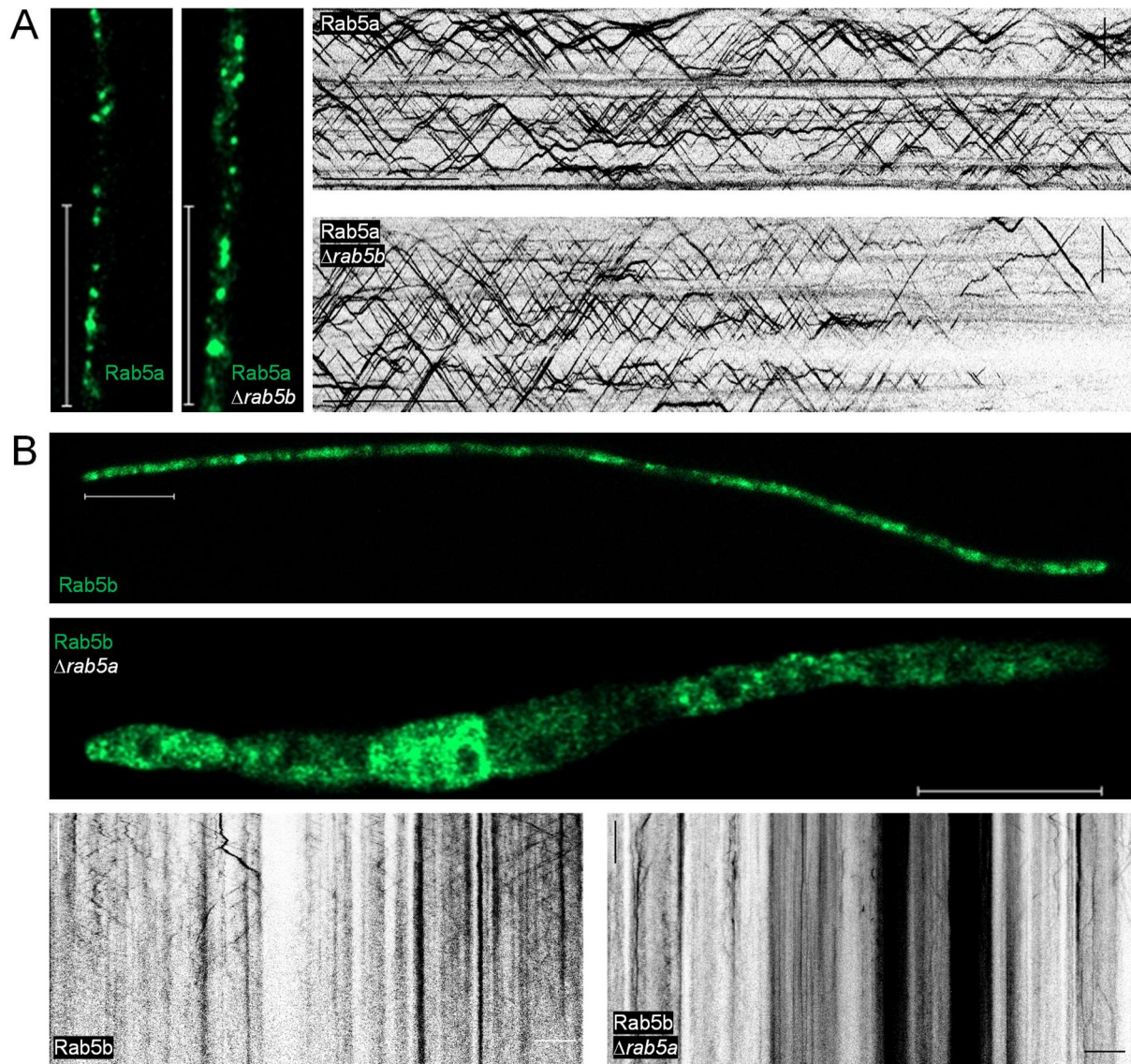
**A)** Eine parallele Detektion von Rab5a (Mitte) und Rab5b (rechts) veranschaulichte in der Überlagerungsdarstellung (links), dass sich beide GTPasen sowohl gemeinsam auf Endosomen befinden und zusammen transportiert wurden als auch jeweils einzeln vorlagen. Sowohl Rab5a als auch Rab5b wurden dabei bidirektional mit häufigen Richtungsänderungen durch die Zelle transportiert. Induktion des filamentösen Wachstums über 18 h, Analyse durch Mikroskop 3. **B)** Trotz Expression von Rab5c durch  $P_{nar1}$  konnte lediglich ein schwaches Signal detektiert werden, welches zusätzlich durch schnellen Intensitätsverlust gekennzeichnet war. Rab5c lokalisierte auf punktuellen Strukturen mit gleichmäßiger Verteilung im Filament. Im Kymographen konnten Ansätze von Bewegungsmustern beobachtet werden, welche durch die drastische Signalabnahme jedoch nicht weiterverfolgt werden konnten. Farbwahl: Rab5b magenta, Rab5a/Rab5c grün, Überlagerung der Signale zeigt sich in weiß. Analyse mit Mikroskop 1. Horizontaler Maßstab: 10  $\mu$ m, vertikaler Maßstab: 10 sek.



### 3.1.5. Die Rab5-GTPasen beeinflussen gegenseitig ihre Lokalisierung, Motilität und Proteinabundanz

Neben den in Abb. 18 beobachteten Auswirkungen der *rab5* Deletionen auf die Zellmorphologie und die Teilungsfähigkeit der Zellen sollte untersucht werden, ob sich die GTPasen auch gegenseitig beeinflussen. Zunächst wurde der Einfluss der Deletion von *rab5a* auf die Lokalisierung von Rab5b mikroskopisch analysiert, sowie der Effekt der *rab5b*-Deletion auf die Lokalisierung von Rab5a. Wie in Abb. 22A veranschaulicht, konnte keine Auswirkung der *rab5b*-Deletion auf die Motilität oder Lokalisierung von Rab5a festgestellt werden. Sowohl in Wildtypstämmen mit markiertem Rab5a (UKS91: AB31 *gfp:rab5a*) als auch in  $\Delta$ *rab5b*-Stämmen (UKS355: AB31 *gfp:rab5a*,  $\Delta$ *rab5b*) konnte ein bidirektionales Bewegungsmuster nachgewiesen werden. Aufgrund der veränderten Zellmorphologie in  $\Delta$ *rab5a*-Stämmen war es schwierig eine Aussage über einen Einfluss auf die Rab5b-Lokalisierung zu treffen. In der verdickten und bipolar wachsenden Hyphe konnten jedoch Ansammlungen an Rab5b-Signal beobachtet werden (Abb. 22B). Diese Signalakkumulationen traten vorwiegend im Bereich der Initialzelle auf, waren jedoch auch in den Filamentausläufern vorzufinden. Im Gegensatz zu den Transportmustern von Rab5b im Wildtyphintergrund (URS1: AB31 *gfp:rab5b*) führte die eingebrachte Deletion von *rab5a* zu einer Reduktion der Rab5b-Motilität (UKS115: AB31 *gfp:rab5b*,  $\Delta$ *rab5a*).

## Ergebnisse



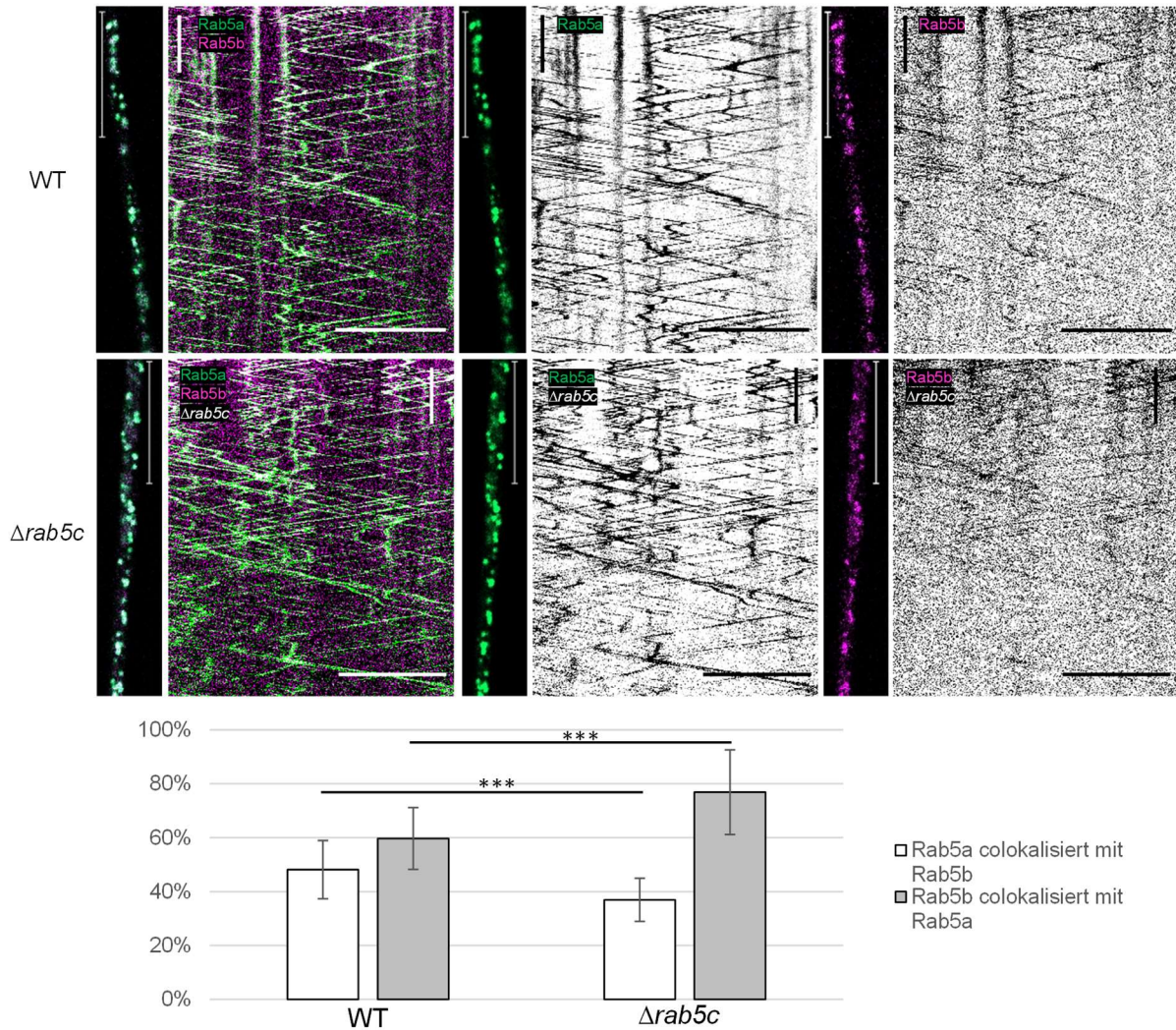
**Abb. 22: Die Deletion von *rab5a* beeinflusst den Transport von Rab5b**

**A)** Durch die Deletion von *rab5b* konnte keine Änderung in der Lokalisation oder der Bewegung von Rab5a festgestellt werden. Analyse mit Mikroskop 2. Horizontaler Maßstab: 10 sek, vertikaler Maßstab: 10  $\mu\text{m}$ . **B)** Fluoreszenzmarkiertes Rab5b zeigte in  $\Delta rab5a$ -Stämmen Signalansammlungen. Analytierte Bewegungsmuster in Kymographen zeigten, dass die Rab5b-Bewegung im *rab5a*-Deletionshintergrund beeinträchtigt wurde. Analyse mit Mikroskop 1. Horizontaler Maßstab: 10  $\mu\text{m}$ , vertikaler Maßstab: 10 sek.

Betrachtete man die Deletion von *rab5c*, so schien diese keinen Einfluss auf die Motilität der beiden anderen Rab5-GTPasen zu haben. Wie in Abb. 23 dargestellt, zeigten Rab5a und Rab5b sowohl im Wildtyp (UKS273: AB31 *gfp:rab5a*, *mCherry:rab5b*) als auch in  $\Delta rab5c$ -Stämmen (UKS376: AB31 *gfp:rab5a*, *mCherry:rab5b*,  $\Delta rab5c$ ) bidirektionale, gemeinsame Bewegungen. Die Lokalisierung auf Vesikeln, welche gleichmäßig in der Zelle verteilt waren, erschien unbeeinträchtigt. Um diese Beobachtung objektiv auswerten zu können, wurde die Colokalisierung mit Hilfe von ImageJ quantifiziert. Dabei wurde die gesamte Signalfäche jedes Signals in

die Analyse miteinbezogen und der prozentuale Anteil an Signalüberlagerung bestimmt. Die Analysen der Colokalisierung ergaben, dass im Vergleich mit dem Wildtyp (N=41), in welchem die Colokalisierung von Rab5a und Rab5b etwa bei 50 % lag, die Rab5a-Signale, welche mit Rab5b colokalisierten in  $\Delta rab5c$ -Stämmen (N=35) signifikant auf etwa 40 % reduziert war (p-Wert  $1,95 \cdot 10^{-6}$ ). Dementsprechend war der Anteil an Rab5a-Signalen, welche nun einzeln vorlagen, durch die Deletion erhöht. Der Anteil an Rab5b-Signalen, welche mit Rab5a-Signalen überlappten, war dagegen signifikant auf fast 80 % erhöht, wodurch insgesamt weniger Vesikel ausschließlich Rab5b-positiv waren (p-Wert  $1,33 \cdot 10^{-6}$ ).

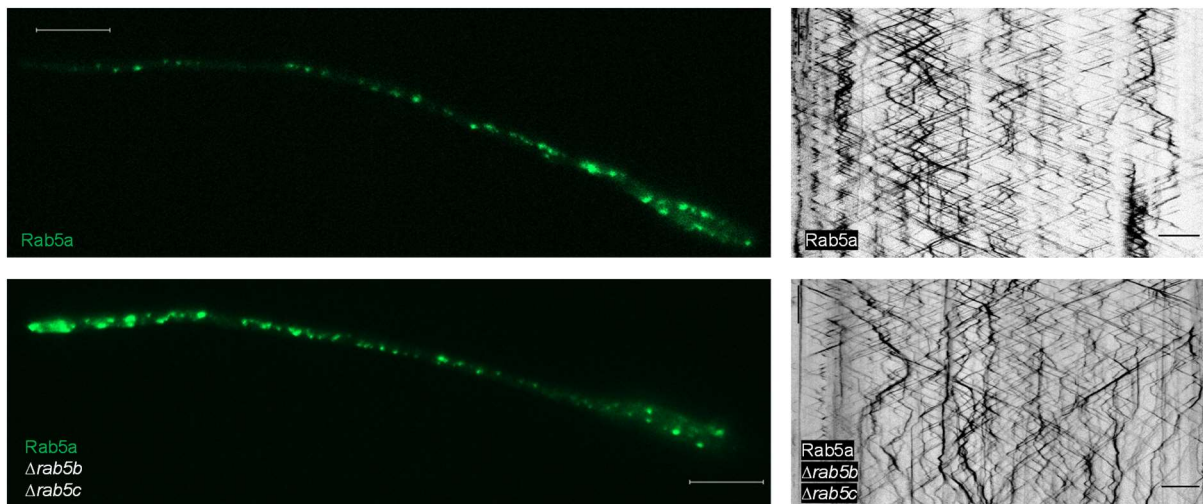
## Ergebnisse



### Abb. 23: Die Deletion von *rab5c* beeinflusst die Colokalisierung von Rab5a und Rab5b

Oben: Die Motilität und Lokalisierung von Rab5a und Rab5b auf Vesikeln, welche gleichmäßig in der filamentösen Zelle verteilt waren, war in  $\Delta rab5c$ -Stämmen im Vergleich mit dem Wildtyp unverändert. Analyse durch Mikroskop 2. Horizontaler Maßstab: 10  $\mu\text{m}$ , vertikaler Maßstab: 10 sek. Unten: Quantifizierung der Colokalisierung von Rab5a und Rab5b im Wildtyp (N=41), sowie in  $\Delta rab5c$ -Stämmen (N=35) mit Hilfe von JACoP (ImageJ). Im Wildtyp colokalisierten Rab5a und Rab5b etwa 50 %. Die *rab5c*-Deletion reduzierte die Überlappung des Rab5a-Signals mit Rab5b signifikant auf unter 40 % (p-Wert  $1,95 \cdot 10^{-6}$ ), während die Überlappung des Rab5b-Signals mit dem Rab5a-Signal signifikant auf fast 80 % gesteigert war (p-Wert  $1,33 \cdot 10^{-6}$ ). Farbwahl: Rab5b magenta, Rab5a grün, Überlagerung der Signale zeigt sich in weiß. Signifikanz \* p-Wert<0,05 \*\* p-Wert<0,01 \*\*\* p-Wert<0,001.

Die Deletionen von *rab5b* oder *rab5c* hatten jeweils keine oder nur geringfügige Auswirkungen auf die Rab5a-GTPase. Aus diesem Grund wurde auch der Effekt einer Doppeldeletion analysiert. Wie in Abb. 24 gezeigt, konnte in einem Stamm mit Markierung von Rab5a und gleichzeitiger Deletion von *rab5b* und *rab5c* (UKS424: AB31 *gfp:rab5a*,  $\Delta rab5b$ ,  $\Delta rab5c$ ) kein Unterschied bezüglich der Lokalisierung oder Motilität von Rab5a im Vergleich zum Wildtyp (UKS91: AB31 *gfp:rab5a*) festgestellt werden. In beiden Stämmen lokalisierte Rab5a mit einer gleichmäßigen Verteilung auf punktuellen Strukturen. Ebenfalls konnten sowohl im Wildtyp als auch im  $\Delta rab5b\Delta rab5c$ -Hintergrund die für Rab5a typischen bidirektionalen Langstreckenbewegungen detektiert werden.



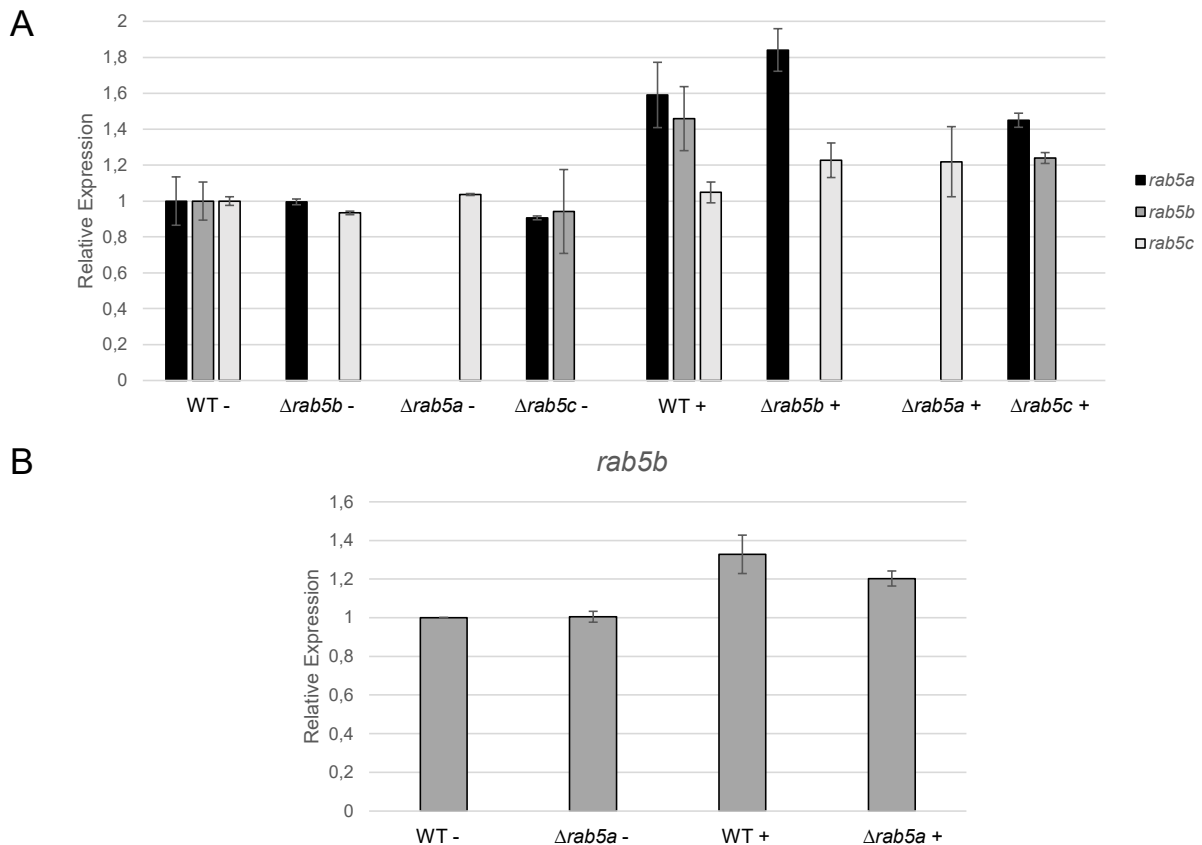
**Abb. 24: Die Doppeldeletion von *rab5b* und *rab5c* beeinträchtigt weder Lokalisierung noch Motilität von Rab5a**

Im Wildtyp (oben) und in  $\Delta rab5b\Delta rab5c$  Stämmen (unten) konnte keine Veränderung der Rab5a-Lokalisierung festgestellt werden. In beiden Fällen lokalisierte Rab5a auf gleichmäßig in der Zelle verteilten, punktförmigen Strukturen. Auch die Auswertung von Kymographen (rechts) ergab keinen Unterschied zwischen dem Wildtyp und den Deletionsstämmen. Horizontaler Maßstab: 10  $\mu\text{m}$ , vertikaler Maßstab: 10 sek. Analysen durch Mikroskop 1.

Neben visuellen Beurteilungen der Auswirkungen von *rab5a*, *rab5b* oder *rab5c* Deletionen auf die übrigen Rab5-GTPasen wurden auch die Expressionslevel und die Proteinabundanz überprüft. Die beobachteten Rab5b-Akkumulationen in  $\Delta rab5a$ -Zellen (vgl. Abb. 22), welche durch ihre gestörte Zellmorphologie eine vergleichende Einschätzung der Signalstärke durch Vergleich mit den Wildtypzellen erschwerten, schienen ein stärkeres Rab5b-Signal zu enthalten als die Wildtypzellen. Daher wurden Auswirkungen auf die RNA-Menge und das Proteinlevel analysiert. In einer RT-PCR wurde die Expression der verschiedenen *rab5*-Gene untersucht

## Ergebnisse

(Abb. 25). Dabei wurden jeweils Sporidien (nicht induziert, -) und Filamente (induziert, +) ausgewertet. Die Induktion der Filamente erfolgte 7 h über den bE/bW-Transkriptionsfaktor, dessen *crg1*-Promotor durch die Zugabe von Arabinose in das Medium angeschaltet wurde. Die Induktion der Stämme wurde durch die Transkriptmenge von *crg1* in der RT-PCR verifiziert und erfolgte in sämtlichen Stämmen vergleichbar (Daten nicht gezeigt). Die Gene *rab5a*, *rab5b* und *rab5c* wurden jeweils im Wildtyp (AB31),  $\Delta rab5b$  (URS3: AB31  $\Delta rab5b$ ),  $\Delta rab5a$  (UKS47: AB31  $\Delta rab5a$ ) und  $\Delta rab5c$  (UKS393: AB31 *rab5c*) gemessen, mit dem Referenzgen *eIF2B* normalisiert und bezogen auf die nicht induzierte Kontrolle (AB31-) dargestellt. Die Messung von *rab5b* im  $\Delta rab5a$ -Hintergrund erfolgte in einem zusätzlichen Experiment und ist deshalb separat dargestellt (Abb. 25B). Für alle drei Gene konnte beobachtet werden, dass durch die Filamentinduktion auch die Expression im Vergleich zur nicht induzierten Kontrolle erhöht war. Für keine der GTPasen konnte ein verändertes Expressionslevel durch die Deletion einer der anderen GTPasen festgestellt werden.



**Abb. 25: Die Expression der Rab5-GTPasen wird durch Deletion einer der anderen Rab5-GTPasen nicht verändert**

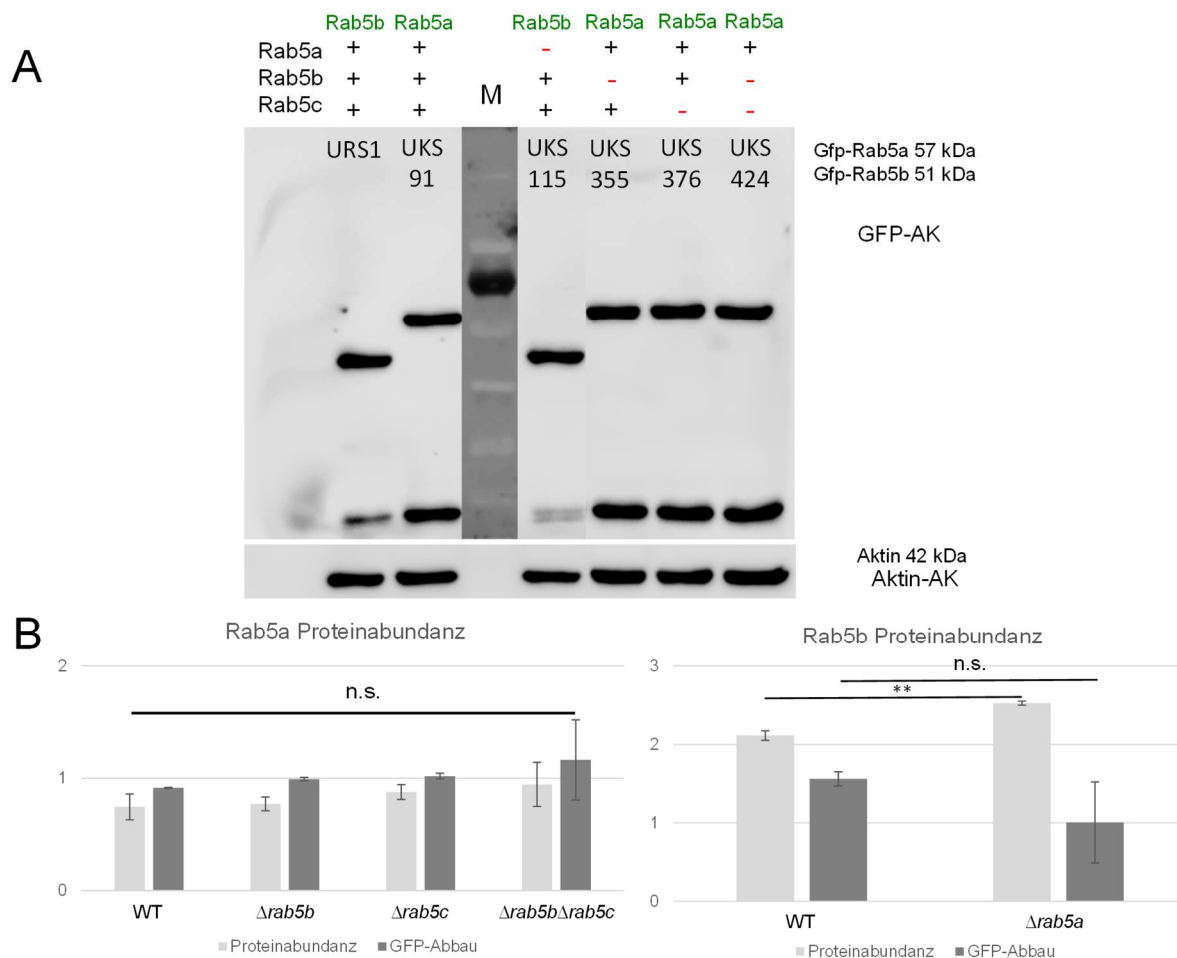
**A)** Es wurden jeweils mittels RT-PCR Sporidien (nicht induziert, -) und Filamente (induziert, +) ausgewertet. Die Filamentinduktion erfolgte über den bE/bW-Transkriptionsfaktor, dessen  $P_{crg1}$  durch die Zugabe von Arabinose in das Medium angeschaltet wurde. Induktion der Stämme wurde durch *crg1* in der RT-PCR verifiziert und erfolgte in allen Stämmen in vergleichbarer Menge (Daten nicht gezeigt). *Rab5a*, *rab5b* und *rab5c* wurden im Wildtyp (AB31),  $\Delta rab5b$  (URS3),  $\Delta rab5a$  (UKS47) und  $\Delta rab5c$  (UKS393) gemessen, mit *eIF2B* normalisiert und bezogen auf die nicht induzierte Kontrolle (AB31-) dargestellt. **B)** Die Messung von *rab5b* im  $\Delta rab5a$ -Hintergrund erfolgte in einem anderen Experiment und wird daher separat dargestellt. Für alle drei Gene wurde durch die Filamentinduktion auch die Expression im Vergleich zur nicht induzierten Kontrolle erhöht. Für keine der GTPasen konnte ein verändertes Expressionslevel durch die Deletion einer der anderen GTPasen festgestellt werden.

Neben der Untersuchung der RNA-Level sollte auch die Proteinmenge von Rab5a und Rab5b im Wildtyp und in  $\Delta rab5a$ -,  $\Delta rab5b$ - sowie  $\Delta rab5c$ -Stämmen bestimmt werden. Abb. 26A zeigt einen repräsentativen von drei durchgeführten Western Blots für die Analyse von jeweils drei unabhängigen Proteinextraktionen pro verwendetem Stamm. Für Rab5a konnten augenscheinlich keine Unterschiede in der Proteinmenge durch eine der eingebrachten Deletionen festgestellt werden. Die GFP-Abbaubande von  $Rab5b\Delta rab5a$  schien im Vergleich mit dem Wildtyp vermindert. Um eine objektive Aussage über die Proteinmenge zu erhalten wurden die Signalintensitäten durch die Software ImageJ quantifiziert. Die Menge des Rab5a-Proteins wurde im Wildtyp (UKS91: AB31 *gfp:rab5a*), in  $\Delta rab5b$  (UKS355: AB31 *gfp:rab5a*,  $\Delta rab5b$ ),  $\Delta rab5c$

## Ergebnisse

(UKS376: AB31 *gfp:rab5a*, *mCherry:rab5b*,  $\Delta rab5c$ ) und in  $\Delta rab5b\Delta rab5c$  (UKS424: AB31 *gfp:rab5a*,  $\Delta rab5b$ ,  $\Delta rab5c$ ) bestimmt. Die Proteinabundanz von Rab5b wurde im Wildtyp (URS1: AB31 *gfp:rab5b*) und in  $\Delta rab5a$  (UKS115: AB31 *gfp:rab5b*,  $\Delta rab5a$ ) quantifiziert. Da sich ein Abbau oder eine Stabilisation des Proteins in einer gesteigerten oder verminderten GFP-Abbaumenge nachweisen kann, wurde neben der Proteinmenge an GFP-gekoppeltem Protein auch die GFP-Abbaubande quantifiziert. Eine Normalisierung der Proteinmenge hinsichtlich Zellmenge und Präparationseffizienz erfolgte durch die Signalintensität von Aktin in der jeweiligen Probe. In Abb. 26B ist die Auswertung der Quantifizierung nach der durchgeführten Normalisierung mit Aktin dargestellt. Die Rab5a-Proteinmenge zeigte in keiner der untersuchten Bedingungen signifikante Unterschiede zu der im Wildtyp bestimmten Menge. Für Rab5b konnte ein signifikanter Anstieg in der Proteinmenge in  $\Delta rab5a$ -Stämmen im Vergleich zum Wildtyp festgestellt werden. GFP-Abbauprodukte waren jedoch nicht signifikant reduziert.





### Abb. 26: Die Proteinmenge von Rab5b ist in $\Delta rab5a$ -Stämmen erhöht

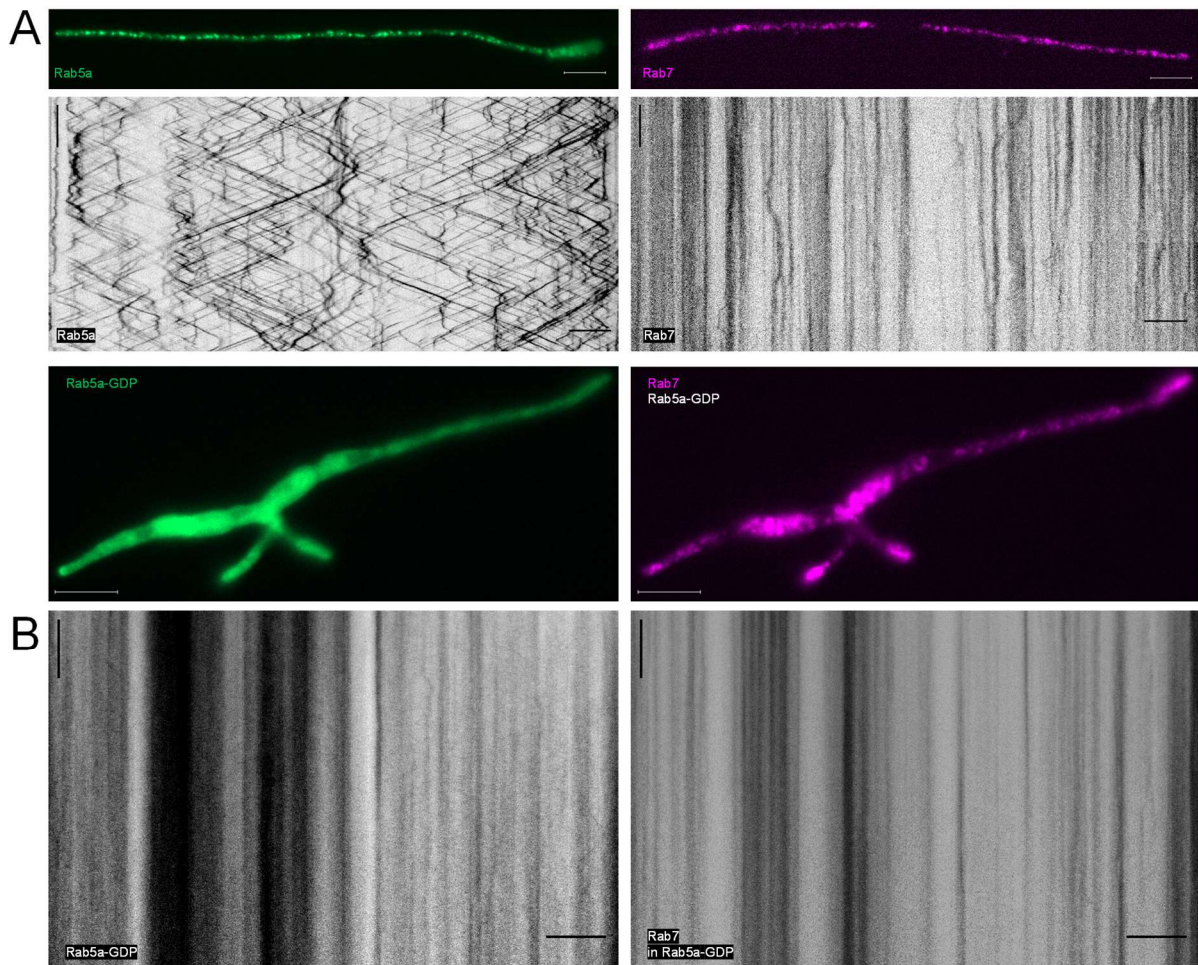
**A)** Repräsentativer Western Blot, für die Analyse von jeweils drei unabhängigen Proteinextraktionen pro verwendetem Stamm. Die Proteinmenge von Rab5a wurde im Wildtyp (UKS91: AB31 *gfp:rab5a*), in  $\Delta rab5b$  (UKS355: AB31 *gfp:rab5a*,  $\Delta rab5b$ ),  $\Delta rab5c$  (UKS376: AB31 *gfp:rab5a*, *mCherry:rab5b*,  $\Delta rab5c$ ) und in  $\Delta rab5b \Delta rab5c$  (UKS424: AB31 *gfp:rab5a*,  $\Delta rab5b$ ,  $\Delta rab5c$ ) bestimmt. Die Analyse von Rab5b erfolgte im Wildtyp (URS1: AB31 *gfp:rab5b*) und in  $\Delta rab5a$  (UKS115: AB31 *gfp:rab5b*,  $\Delta rab5a$ ). Der Blot wurde zusammenhängend detektiert, zwischen UKS115 und UKS355 wurde eine für dieses Experiment irrelevante Bandenspur entfernt. **B)** Quantifizierung nach der durchgeführten Normalisierung mit Aktin. Die Rab5a-Proteinmenge in den Deletionsstämmen zeigte keine signifikanten Unterschiede zu der im Wildtyp bestimmten Menge. Für Rab5b konnte ein signifikanter Anstieg der Proteinmenge in  $\Delta rab5a$ -Stämmen im Vergleich zum Wildtyp festgestellt werden (p-Wert 0,0026). GFP-Abbauprodukte waren nicht signifikant reduziert.

### 3.1.6. Eine konstitutiv inaktive Mutante von Rab5a inhibiert die Motilität Rab5a-positiver Endosomen

Neben den bereits beobachteten Auswirkungen der Deletion von *rab5a* sollte analog zu der für HeLa- und BHK-Zellen beschriebenen Vorgehensweise eine Mutation in *rab5a* eingeführt werden, welche durch die eingebrachte Mutation präferenziell GDP bindet und damit in der inaktiven Form vorliegt. Dabei wurde Serin, Aminosäure an Position 34, durch ein Asparagin ersetzt (Stenmark *et al.*, 1994). Die Proteinsequenz

## Ergebnisse

des humanen Rab5-Proteins wurde mit Rab5a aus *U. maydis* verglichen und analog dazu die entsprechende Aminosäure an Position 45 ausgetauscht (S45N). Die eingefügte Mutation wurde entsprechend der für *U. maydis* üblichen Translationspräferenzen di-codonoptimiert und das konstitutiv inaktive Protein mit einem N-terminalen GFP-Tag versehen (Klein, 2019). Die dauerhaft inaktive Form von Rab5a wird in dieser Arbeit mit Rab5a-GDP bezeichnet. Es wurden die Auswirkungen der dauerhaften Inaktivierung von Rab5a auf die Lokalisierung von Rab5a-GDP untersucht, sowie auf die Zellen insgesamt. Im gleichen Ansatz wurde auch beobachtet, ob die konstitutiv inaktive Rab5a-GDP-Form Einfluss auf die späten Endosomen hatte. Da das publizierte Modell der Endosomenreifung vorsieht, dass die aktive Form der Rab5a-GTPase die Aktivierung von Rab7 initiiert (Seals *et al.*, 2000, Wurmser *et al.*, 2000), waren Effekte auf Rab7 zu erwarten. Abb. 27 stellt die Lokalisierung von Rab5a-GDP und Rab7 (UKS279: AB31 *gfp:rab5a<sup>S45N</sup>, mCherry:rab7*) im Vergleich zu einem Stamm mit der Wildtyp-Form von Rab5a und Rab7 (UKS258: AB31 *gfp:rab5a, mCherry:rab7*), wie sie im Wildtyp vorkommt, dar. In der Wildtyp-Form lokalisierte Rab5a auf gleichmäßig in der Zelle verteilten Vesikelstrukturen, welche bidirektional transportiert wurden. Rab7 lokalisierte auf größeren punktuellen Strukturen im Vergleich zu Rab5a und war überwiegend statisch mit wenigen langsamen Bewegungsvorgängen über kurze Distanzen. Durch die konstitutive Bindung von GDP an Rab5a zeigten die Zellen morphologische Veränderungen durch Polaritätsdefekte. Rab5a-GDP konnte auf keinerlei vesikulären Strukturen mehr identifiziert werden und lokalisierte stattdessen im Zytoplasma. Die Untersuchung der Motilität durch Kymographen zeigte ergänzend ein vollständiges Ausbleiben der Bewegungsmuster. Rab5a-GDP war ausschließlich in statischen Signalen detektierbar. Die Rab7-Signale waren ebenfalls völlig statisch. Die Kurzstreckenmotilität, wie sie im Wildtyp vorhanden war, konnte durch die konstitutive Inaktivierung von Rab5a nicht mehr beobachtet werden. Auch die Verteilung des Rab7-Signals schien beeinträchtigt. Es konnten Akkumulationen in den Zellpolen beobachtet werden, sowie große Strukturen in den bauchigen Initialzellen.



**Abb. 27: Die konstitutive Inaktivierung von Rab5a beeinträchtigt die Zellmorphologie**

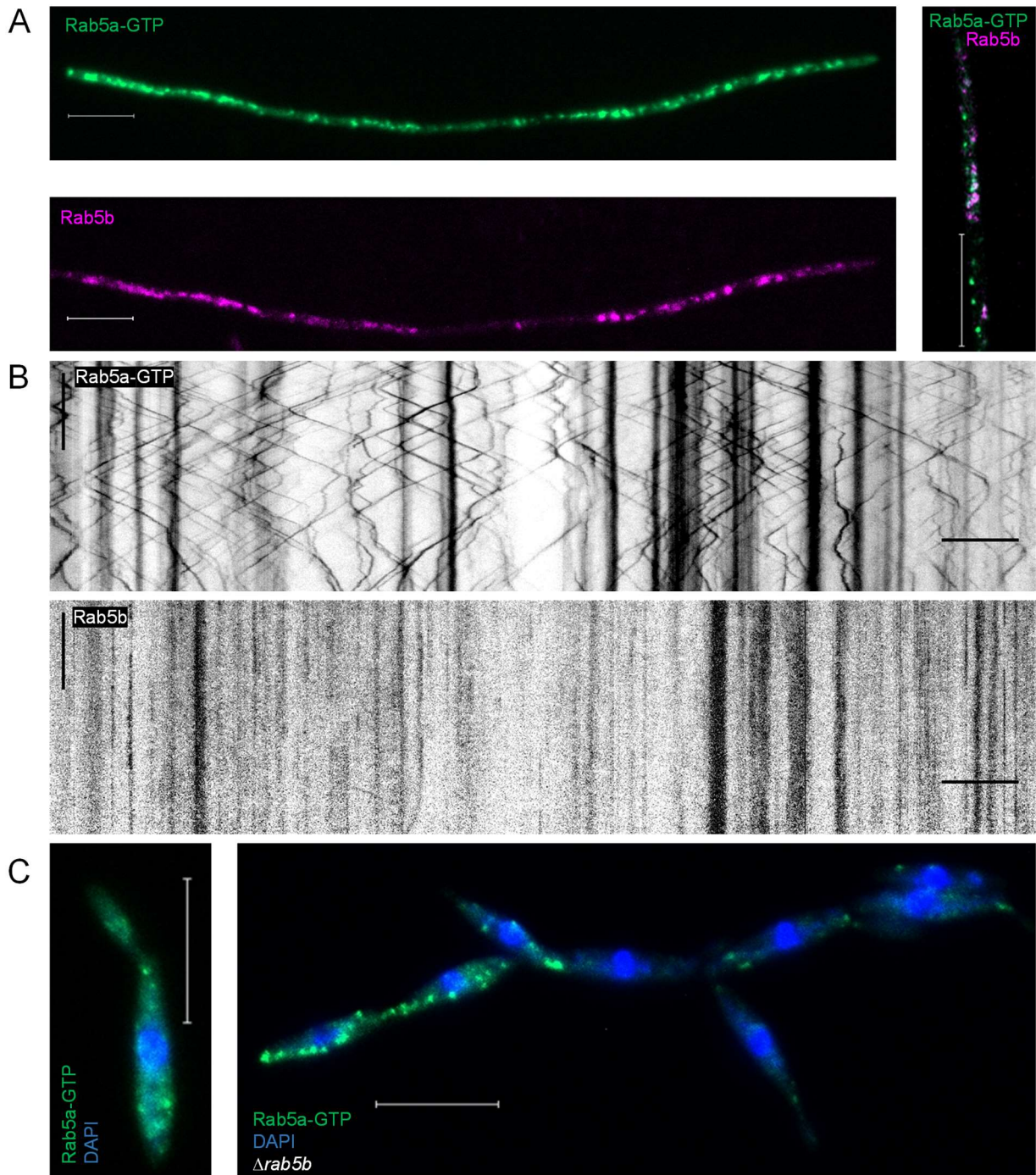
**A)** Die zyklische Form von Rab5a zeigte bidirektionale Bewegungsmuster und Lokalisation auf vesikulären Strukturen mit gleichmäßiger Verteilung innerhalb der 17 h induzierten Filamente. Im gleichen Stamm lokalisierte Rab7 auf vesikulären Strukturen gleichmäßiger Größe und war überwiegend statisch mit gelegentlichen Transportvorgängen über kurze Strecken. **B)** Die konstitutive Inaktivierung von Rab5a durch dauerhafte Bindung an GDP nach Aminosäurenaustausch (S45N) führte zu bipolaren Filamenten. Das Rab5a-GDP-Signal war durch die Mutation zytoplasmatisch lokalisiert und zeigte keinerlei Motilität mehr. Durch die Inaktivierung von Rab5a akkumulierte Rab7 an den Zellpolen und in größeren Strukturen in den verdickten Initialzellen. Die Motilität von Rab7 war gleichermaßen inhibiert. Farbwahl: Rab7 magenta, Rab5a-GDP grün, Überlagerung der Signale zeigt sich in weiß. Horizontaler Maßstab: 10  $\mu\text{m}$ , vertikaler Maßstab 10 s. Mikroskopische Analysen durch Mikroskop 1.

### 3.1.7. Eine konstitutiv aktive Mutante von Rab5a zeigt genetische Interaktion mit Rab5b

Um einen Eindruck zu bekommen, ob die Regulation von Rab5a in *U. maydis* wie bereits für Mammalia-Zellen und *S. cerevisiae* publiziert ebenfalls über einen GTPase-Zyklus abläuft und Rab5a von der inaktiven in die aktive Form und umgekehrt überführt werden kann, wurde eine konstitutiv aktive Mutante von Rab5a generiert. Dies erfolgte ebenfalls analog zu den konstitutiv aktiven Rab5a-Varianten in BHK- und HeLa-Zellen. Dabei wurde ein Glutamin an Position 79 der Aminosäuresequenz durch ein Leucin ersetzt, wodurch die GTP-Hydrolysefunktion von Rab5 beeinträchtigt wird (Stenmark *et al.*, 1994). Auch in diesem Fall erfolgte ein Vergleich der Aminosäuresequenz des Rab5-Proteins aus *H. sapiens* mit Rab5a aus *U. maydis* und die entsprechende 90. Aminosäure wurde unter Beachtung der Dicondonpräferenz ausgetauscht (Q90L) (Klein, 2019). Die konstitutiv aktive Form von Rab5a wird in dieser Arbeit mit Rab5a-GTP bezeichnet. Die Auswirkungen dieser Mutation auf die Lokalisierung und Motilität des nun konstitutiv aktiven Rab5a-Proteins, sowie die Auswirkungen auf Rab5b, wurden analysiert (UKS321: AB31 *gfp:rab5a<sup>Q90L</sup>, mCherry:rab5b*) (Abb. 28). Rab5a-GTP lokalisierte, wie bereits für den Wildtyp beschrieben, auf punktuellen Strukturen gleichmäßig verteilt im gesamten Filament. Die Proteine bewegten sich bidirektional durch die Hyphen und lokalisierten auch in statischen Ansammlungen. Rab5b wurde ebenfalls in der Hyphe verteilt auf punktuellen Strukturen vorgefunden. Interessanterweise konnte jedoch im Gegensatz zum Wildtyp keine für Endosomen typische bidirektionale Motilität mit hoher Geschwindigkeit beobachtet werden. Die Rab5b-Signale waren durch die konstitutive Aktivierung von Rab5a überwiegend statisch, in Einzelfällen wurden langsame Bewegungen über kurze Strecken detektiert. Bei einem Vergleich der Colokalisierung von Rab5a-GTP und Rab5b zeigte sich eine Colokalisierung lediglich in größeren statischen Ansammlungen, der überwiegende Anteil der Proteine zeigte keine Colokalisierung. Die konstitutive Aktivierung von Rab5a hatte keine Auswirkungen auf die Zellmorphologie. Sporidien konnten sich wie Wildtypzellen teilen und das filamentöse Wachstum zeigte keine Beeinträchtigung. Da Rab5b durch die konstitutive Aktivierung von Rab5a beeinträchtigt scheint, wurde dieser Zusammenhang durch Einbringen einer Deletion von *rab5b* zusätzlich zu der Mutation von Rab5a genauer untersucht (UKS306: AB31 *gfp:rab5a<sup>Q90L</sup>, Δrab5b*). Die Deletion von *rab5b*, bei

gleichzeitiger dauerhafter Aktivierung von Rab5a, zeigte einen Zytokinesedefekt der Sporidien. Die Sporidien wurden nach der Mitose nicht voneinander separiert, sondern bildeten aneinanderhängende Ketten. Eine Analyse der Verteilung von Rab5a-GTP in diesen Mutanten ergab eine Störung der Endosomenverteilung von Rab5a-GTP-positiven Endosomen. In einer Kette von aneinanderhängenden Sporidien wurden in manchen Zellen viele Endosomen beobachtet, während andere Zellen nur vereinzelte Endosomen enthielten. Der beobachtete Effekt konnte nicht auf eine Störung bei der Verteilung der Zellkerne zurückgeführt werden, da jede Zelle einen einzelnen DAPI-gefärbten Zellkern enthielt.

## Ergebnisse



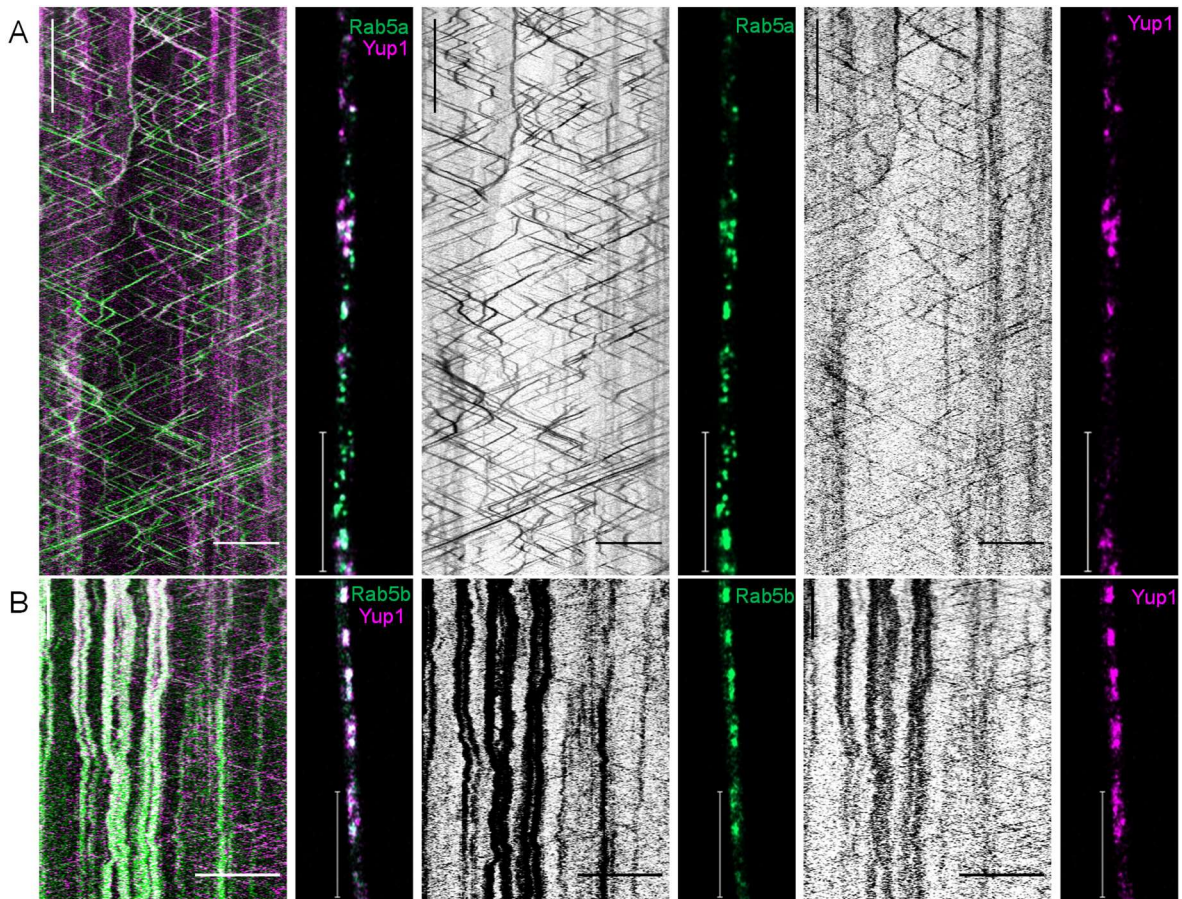
**Abb. 28: Die konstitutive Aktivierung von Rab5a beeinflusst Rab5b**

**A)** Sowohl Rab5a-GTP (links oben), als auch Rab5b (links unten) lokalisierten auf punktuellen Strukturen, welche gleichmäßig in den Hyphen verteilt waren (Mikroskop 1). Die Analyse der Colokalisierung (rechts, Mikroskop 2) zeigte lediglich einen geringen Anteil an überlagerten Signalen und viele einzeln vorliegende Proteine. Farbwahl: Rab5b magenta, Rab5a-GTP grün, Überlagerung der Signale zeigt sich in weiß. Maßstab: 10  $\mu\text{m}$ . **B)** Rab5a-GTP (oben) zeigte bidirektionale Bewegungen in der gesamten Zelle und einige statische Signale. Die Motilität von Rab5b (unten) wurde auf gleiche Weise mit Mikroskop 1 analysiert. Rab5b wurde überwiegend in statischen Signalen lokalisiert, lediglich wenige Signale zeigten langsame Bewegungen über kurze Strecken. Horizontaler Maßstab: 10  $\mu\text{m}$ , vertikaler Maßstab: 10 sek. **C)** Die gleichzeitige Deletion von *rab5b* in Stämmen mit konstitutiv aktiviertem Rab5a führte zu einem Zytokinesedefekt in Sporidien. In Deletionsstämmen waren Rab5a-GTP-positive Endosomen ungleichmäßig verteilt, wohingegen die Verteilung der Zellkerne (DAPI) nicht beeinträchtigt war. Mikroskopische Analysen an Mikroskop 1. Maßstab: 10  $\mu\text{m}$ .

### 3.1.8. Der Endosomenmarker Yup1 ist mit den GTPasen Rab5a und Rab5b assoziiert

Neben den besprochenen Rab5-GTPasen als Marker früher Endosomen wurde auch das t-SNARE-Protein Yup1 als weiterer Marker etabliert. Für Yup1 wurde beschrieben anteilig sowohl mit den frühen Endosomen und Rab5a als auch mit den Vakuolen zu colokalisieren (Wedlich-Söldner *et al.*, 2000, Fuchs *et al.*, 2006). Aus diesem Grund ist davon auszugehen, dass Yup1 nicht direkt durch die Regulationszyklen der Rab-GTPasen Rab5a und Rab5b beeinflusst wird und damit einen Rab5-unabhängigen Marker der frühen Endosomen darstellt. Für eine Analyse der Auswirkung von Deletionen oder Mutationen auf die Endosomenpopulationen im Allgemeinen ist ein Marker sinnvoll, der nicht direkt durch gegenseitige Beeinflussung der Rab5-GTPasen beeinträchtigt werden könnte. Um dies zu bestätigen wurde zunächst die Colokalisierung und die gemeinsame Bewegung von Yup1 mit Rab5a und Rab5b überprüft. Für Rab5a und Yup1 wurden bereits Aussagen über eine partielle Colokalisierung und einen gemeinsamen Transport publiziert (Fuchs *et al.*, 2006), für Rab5b dagegen gab es bisher keinerlei Untersuchungen. Wie bereits beschrieben lokalisierte Yup1 auf mobilen und statischen Signalen und zeigte dabei eine überlappende Lokalisierung sowie ein gemeinsames, bidirektionales Bewegungsmuster mit Rab5a (UGB15: AB31 *gfp:rab5a*, *P<sub>tef</sub>:yup1:mCherry*) (Abb. 29A). Rab5a lokalisierte in geringem Maße auch auf den statischen, Yup1-positiven Strukturen. Yup1 zeigte im Vergleich mit Rab5a deutlich weniger bidirektionale Motilität. Die vorhandene Motilität war jedoch mit Rab5a übereinstimmend. Bei Betrachtung der Colokalisierung von Rab5b und Yup1 (UEB4: AB31 *gfp:rab5b*, *P<sub>tef</sub>:yup1:mCherry*) konnten starke statische Signale beobachtet werden, auf welchen beide Proteine gemeinsam vorzufinden waren (Abb. 29B). Dennoch konnte auch hier für beide Endosomenmarker ein bidirektionales Bewegungsmuster in Kymographen veranschaulicht werden, welches auf eine partielle gemeinsame Bewegung hinweist.

## Ergebnisse



**Abb. 29: Yup1 colokalisiert partiell mit Rab5a und Rab5b**

**A)** Erstellung der Kymographen durch Aufzeichnung eines Videos von 1 min Dauer und Umwandlung der Signale in Fortbewegung auf Strecke pro Zeit. Rab5a und Yup1 zeigten partielle Colokalisierung, sowohl auf statischen als auch auf mobilen Signalen, welche sich gemeinsam in beide Richtungen bewegten. **B)** Generierung der Kymographen erfolgte durch Detektion der Fluoreszenzsignale in 30 sek Videoaufnahmen und Auftragung der zurückgelegten Strecke gegen die dafür benötigte Zeit. Rab5b und Yup1 colokalisierten zu einem hohen Anteil in statischen Signalen, es wurden jedoch auch gemeinsame Bewegungen detektiert. Farbwahl: Yup1 magenta, Rab5a grün, Überlagerung der Signale zeigt sich in weiß. Die Zellen wurden mit Mikroskop 2 ausgewertet. Maßstab Kymographen: horizontal: 10  $\mu\text{m}$ , vertikal: 10 sek; Maßstab Mikroskopaufnahmen: 10  $\mu\text{m}$ .

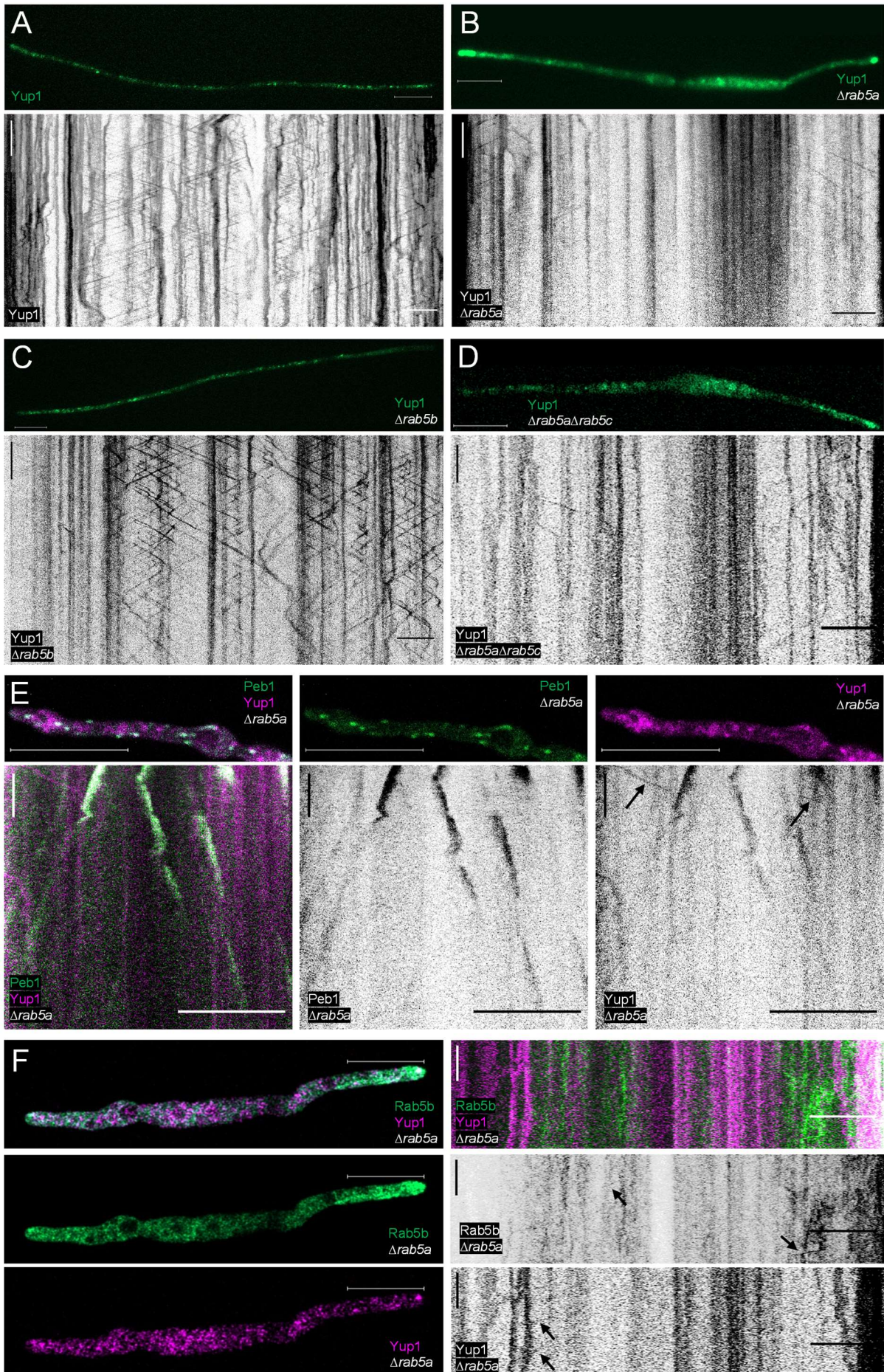
Nachdem eine Colokalisierung von Yup1 sowohl mit Rab5a als auch mit Rab5b bestätigt werden konnte, sollten im Weiteren die Einflüsse der Deletionen von Rab5-GTPasen auf die Lokalisierung und Motilität von Yup1-positiven Endosomen untersucht werden. Neben der gegenseitigen Einflussnahme der Rab5-GTPasen besteht auch die Möglichkeit, dass Populationen von frühen Endosomen weder durch Rab5a noch Rab5b, sondern durch Rab5c oder Yup1 visualisiert werden könnten. Durch die beschriebenen Schwierigkeiten der Rab5c-Darstellung wurde der Fokus auf Yup1 gelegt. Wie in Abb. 30 dargestellt, zeigten die Deletionen einer oder mehrerer der Rab5-GTPasen verschieden schwerwiegende Effekte auf die Lokalisierung und den Transport von Yup1-Endosomen. Im Wildtyp (UKS244: AB31 *P<sub>terf</sub>:yup1:gfp*) wurde



das bereits beschriebene Bewegungsmuster von Yup1 sowohl in Richtung Hyphenspitze als auch in Richtung der Initialzelle von Filamenten beobachtet. Zusätzlich waren einige statische Signale detektierbar. Durch eine Deletion von *rab5a* sammelten sich, wie bereits veröffentlicht (Bielska *et al.*, 2014b), Yup1-positive Signale an den Zellpolen von polaritätsgestörten Deletionsstämmen (UKS213: AB31 *P<sub>tef</sub>:yup1:gfp, Δrab5a*). Zusätzlich konnte eine Lokalisierung an kreisrunden Strukturen in der Initialzelle sowie Filamentausläufern dargestellt werden. Entgegen der veröffentlichten Beschreibung konnte das vollständige Ausbleiben endosomaler Bewegungen nicht bestätigt werden. Die Motilität der Yup1-markierten Endosomen war deutlich reduziert im Vergleich zum Wildtyp, jedoch konnten vorwiegend in Bereichen der Hyphenspitzen bidirektionale Bewegungen beobachtet werden. Durch die Deletion von *rab5b* (UKS282: AB31 *P<sub>tef</sub>:yup1:gfp, Δrab5b*) zeigten sich die Yup1-markierten Endosomen nicht beeinträchtigt. Es konnten mit dem Wildtyp vergleichbare, bidirektionale Bewegungsmuster beobachtet werden und eine Lokalisierung auf statischen Signalen. Yup1-positive Endosomen wurden mit gleichmäßiger Verteilung im Filament beschrieben. In Stämmen mit einer Doppeldelation von *rab5a* und *rab5c* (UKS396: AB31 *P<sub>tef</sub>:yup1:gfp, Δrab5a, Δrab5c*) konnte keine additive Wirkung zu den bereits für *Δrab5a* beschriebenen Effekten nachgewiesen werden. Auch in diesen Zellen akkumulierten Yup1-positive Signale an den Zellpolen bipolarer Zellen, zeigten jedoch ansonsten eine gleichmäßige Verteilung in der Zelle. Der Transport von Yup1-Vesikeln war, wie bereits für *Δrab5a* beschrieben, gestört, besonders im Bereich der Filamentspitzen konnten jedoch Bewegungen aufgezeichnet werden. Um zu analysieren ob die verbleibenden Bewegungsmuster von Yup1 im *Δrab5a*-Hintergrund von Rab5a unabhängige endosomale Transportvorgänge waren oder lediglich durch De-/Polymerisierungsprozesse der Mikrotubuli entstanden, wurde der Marker für die Plusenden der Mikrotubuli, Peb1, in *Δrab5a*-Stämme eingebracht (UKS599: AB31 *P<sub>tef</sub>:yup1:gfp, peb1:gfp, Δrab5a*) und die Bewegungsmuster von Peb1 in 17 h-induzierten Filamenten mit denen von Yup1 verglichen (Abb. 30E). Dabei wurde beobachtet, dass Bewegungen von Yup1 über kurze Distanzen gemeinsam mit Peb1 stattfanden. Gleichzeitig wurden jedoch auch Transportvorgänge über längere Strecken festgehalten, die ohne ein gleichzeitiges Peb1-Signal durchgeführt wurden. Da die Peb1-unabhängigen Bewegungsmuster aufgrund der Richtungswechsel und der Geradensteigung an endosomale Transportvorgänge erinnerten, wurde analysiert ob Yup1 in *Δrab5a*-Stämmen

## Ergebnisse

gemeinsam mit Rab5b transportiert wird (UKS387: AB31 *gfp:rab5b*, *P<sub>tef</sub>:yup1:mCherry*,  $\Delta rab5a$ ). Es wurde im *rab5a*-Deletionshintergrund geringfügige Motilität von Yup1 und Rab5b beobachtet, die jedoch separiert stattfand (Abb. 30F).

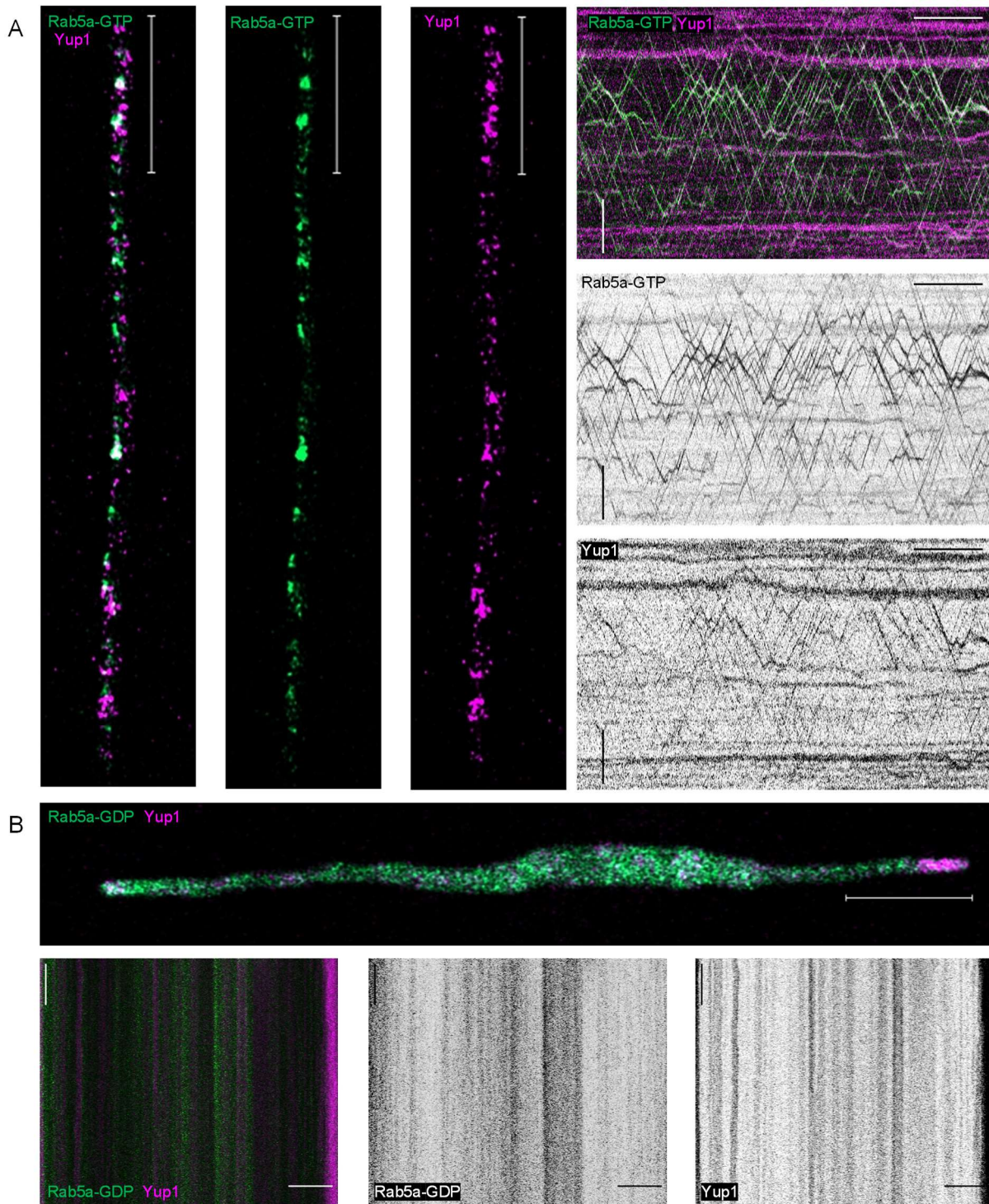


## Ergebnisse

### **Abb. 30: Die Deletion von *rab5a* beeinträchtigt Yup1-positive Endosomen**

**A)** In Wildtypstämmen zeigte Yup1 eine gleichmäßige Verteilung in der Zelle, sowie ein bidirektionales Bewegungsmuster mit zusätzlichen statischen Signalen. **B)** Die Deletion von *rab5a* bewirkte, wie publiziert (Bielska *et al.*, 2014b), die Akkumulation von Yup1-Signalen an den Zellpolen, sowie an statischen kreisförmigen Strukturen. Im Bereich der Spitze konnte ein bidirektionaler Transport beobachtet werden. **C)** Die Deletion von *rab5b* beeinträchtigte die Yup1-positiven Endosomen nicht. Es konnten Lokalisierungen und Motilitäten vergleichbar mit dem Wildtyp beobachtet werden. **D)** Die zusätzliche Deletion von *rab5c* zu der Deletion von *rab5a* führte zu keiner merklichen Effektsteigerung. Auch hier wurden Ansammlungen von Yup1 in den Zellpolen detektiert und statische Signale in der Zellmitte. Nahe der Hyphenspitzen konnten bidirektionale Bewegungen aufgezeichnet werden. Analysen an Mikroskop 1. **E)** Gemeinsame Lokalisierung von Yup1 mit dem Marker der Mikrotubuli-Enden Peb1 in  $\Delta rab5a$ -Stämmen zeigte, dass Yup1-Motilität über kurze Distanzen gemeinsam mit Peb1 und den Wachstumszyklen der Mikrotubuli stattfand, jedoch auch davon unabhängige Bewegungsmuster detektiert werden konnten (Pfeile). Farbwahl: Yup1 magenta, Peb1 grün, Überlagerung der Signale zeigt sich in weiß. **F)** In  $\Delta rab5a$ -Stämmen wurden sowohl von Rab5b als auch von Yup1 Transportvorgänge (Pfeile) beobachtet, welche jedoch nicht gemeinsam stattfanden. Farbwahl: Yup1 magenta, Rab5b grün, Überlagerung der Signale zeigt sich in weiß. Die Analysen erfolgten an Mikroskop 3. Horizontaler Maßstab: 10  $\mu\text{m}$ , vertikaler Maßstab: 10 sek.

Zusätzlich zu den bereits beschriebenen Effekten der *rab5a* Deletion auf Yup1-positive Endosomen wurde die Abhängigkeit der Lokalisierung und Motilität von Yup1 und dem Nukleotidstatus von Rab5a untersucht. Dazu wurden die konstitutiv aktiven (Rab5a-GTP) und inaktiven Mutanten von Rab5a (Rab5a-GDP) verwendet (Klein, 2019). Wie in Abb. 31 gezeigt, hatte die aktive Mutante von Rab5a keine merklichen Effekte auf die Lokalisierung und Motilität von Yup1 (UGB21: AB31 *gfp:rab5a*<sup>Q90L</sup>, *P<sub>tef</sub>:yup1:mCherry*). Rab5a und Yup1 colokalisierten nach wie vor partiell und wurden gemeinsam transportiert. Yup1 lokalisierte weiterhin an statischen, Rab5a-negativen Organellen. Die konstitutiv inaktive Version von Rab5a bewirkte die Inhibierung des endosomalen Transportes (UGB25: AB31 *gfp:rab5a*<sup>S45N</sup>, *P<sub>tef</sub>:yup1:mCherry*). Dieser Effekt galt sowohl für die Rab5-GDP-Signale, als auch für Yup1-Signale. Die statischen Signale von Rab5a-GDP und Yup1 zeigten jedoch nur geringfügige Überlappung. Wie bereits für  $\Delta rab5a$  beschrieben, führte auch die inaktive Mutante von Rab5a zu Akkumulationen Yup1-positiver Signale an den Zellpolen der bipolaren Zellen. Für beide Signale konnten zudem statische Lokalisationen mit gleichmäßiger zytoplasmatischer Verteilung beobachtet werden.



**Abb. 31: Die inaktive Mutante von Rab5a inhibiert endosomalen Transport**

**A)** Rab5a-GTP und Yup1 zeigten gemeinsamen bidirektionalen Transport sowie separate Signale. Yup1 lokalisierte zusätzlich auch wie im Wildtyp an statischen Signalen. Horizontaler Maßstab: 10 sek, vertikaler Maßstab: 10  $\mu\text{m}$ . **B)** Die konstitutiv inaktive Mutante von Rab5a inhibierte sowohl die Bewegungen von Rab5a als auch von Yup1. Es wurden Akkumulationen an den Zellpolen beobachtet, jedoch auch Signale im gesamten Zytoplasma. Farbwahl: Yup1 magenta, Rab5a-GTP/Rab5a-GDP grün, Überlagerung der Signale zeigt sich in weiß. Horizontaler Maßstab: 10  $\mu\text{m}$ , vertikaler Maßstab: 10 sek. Analyse der Zellen an Mikroskop 2.

### 3.2. Funktionsmechanismus des CORVET-Komplexes in *U. maydis*

Endozytose ist der Mechanismus in der Zelle, welcher an einer Vielzahl von Abläufen, wie beispielsweise Nährstoffaufnahme oder Sortierungs- und Transportfunktionen, beteiligt ist (zusammengefasst in Deising *et al.*, 2000, Steinberg, 2014). Die Sortierungsfunktion, welche die Überbrückung zwischen verschiedenen Membrankompartimenten voraussetzt, kann nur mit Hilfe von Proteinkomplexen, sogenannten Verbindungskomplexen (*tethering complexes*), erfüllt werden. Da durch diese Komplexe die Spezifität der Fusionen zwischen einzelnen Membrankompartimenten gewährleistet wird, sind sie ausschlaggebend für die Aufnahme und Verteilung von Stoffen innerhalb der Zelle (zusammengefasst in Ungermann und Kümmel, 2019). Um die Transportprozesse zu verstehen, welche maßgeblich über die frühen Endosomen ablaufen, ist es somit unerlässlich den Aufbau und die Funktionsweise der dafür zuständigen Proteinkomplexe nachzuvollziehen. Für die frühen Endosomen koordiniert der CORVET-Komplex über seine Interaktion mit Rab5a die Transportprozesse. CORVET spielt damit eine wichtige Rolle für den Transport zwischen Endosomen und Vakuolen, die Fusionsprozesse der Endosomen aber auch die Reifung von frühen zu späten Endosomen (Peplowska *et al.*, 2007, Balderhaar und Ungermann, 2013, Solinger und Spang, 2013). Über die Funktionsweise und den Aufbau des CORVET-Komplexes in *U. maydis* gab es bisher keine Studien. Im Gegensatz zu den bereits publizierten Ergebnissen aus *S. cerevisiae* liegt bei filamentösen Pilzen wie *U. maydis* ein Fokus auf dem Langstreckentransport. Dieser ist unerlässlich für die Infektion der Wirtspflanzen, um den Lebenszyklus abschließen zu können (Bielska *et al.*, 2014b). Aus diesem Grund ist es naheliegend, dass die Regulation der Endosomenfusionen oder Reifungsprozesse an die veränderte Ausgangssituation angepasst wurde und sich Unterschiede in der Zusammensetzung oder Funktionsweise des Komplexes im Laufe der Evolution etabliert haben, welche es nun zu untersuchen gilt.

### 3.2.1. Der CORVET-Komplex in *U. maydis* setzt sich aus den konservierten Bestandteilen zusammen

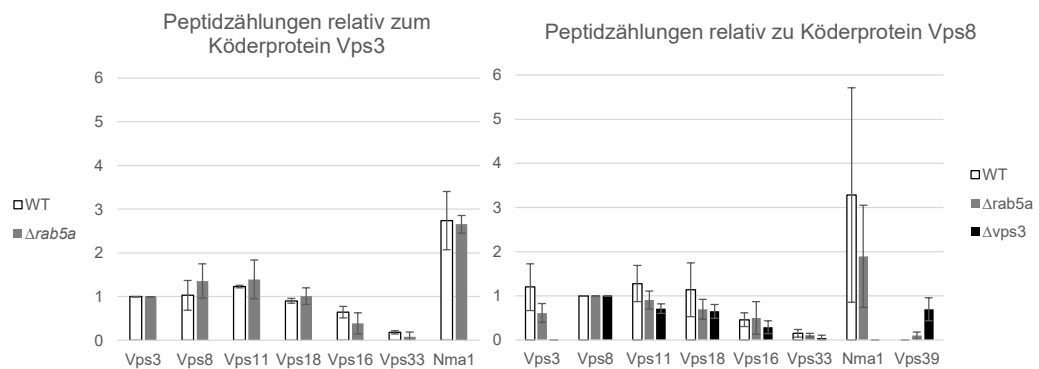
Der CORVET-Komplex in den hauptsächlich untersuchten Organismen *S. cerevisiae* und *H. sapiens* setzt sich aus folgenden Komponenten zusammen: Die Kernkomponenten Vps11, Vps16, Vps18, Vps33 und die für frühe Endosomen spezifischen Untereinheiten Vps3 und Vps8 (Bankaitis *et al.*, 1986, Guo *et al.*, 2013). Um zu überprüfen, ob die tatsächliche Zusammensetzung des Komplexes in *U. maydis* analog zu denen aus bisher publizierten Organismen, wie *S. cerevisiae* oder den Säugetierzellen ist (vgl. Bankaitis *et al.*, 1986, Guo *et al.*, 2013), wurden mit einer Co-Immunoprecipitation (Co-IP) und anschließender Massenspektrometrie (MS) die Bestandteile ermittelt. Gleichzeitig wurde die Fragestellung adressiert, ob sich der Komplex bereits im Zytoplasma vollständig zusammenlagert. Eine andere Theorie wäre, dass eine der für frühe Endosomen spezifischen Untereinheiten oder beide zuerst an die Rab5a-GTPasen an den Endosomenmembranen binden und anschließend den Komplex rekrutieren. Die Co-IP wurde mit je zwei unabhängigen Transformanten in unabhängigen Experimenten durchgeführt. Um die Situation des CORVET-Komplexes während des Langstreckentransportes abzubilden, wurden die Proteine aus filamentös wachsenden Kulturen extrahiert. Nach 7 h filamentösem Wachstum wurden die Kulturen geerntet und die Proteinextraktion, Co-IP und anschließende MS durchgeführt. Die MS erfolgte durch Kooperationspartner (Serviceeinheit LCMS Proteinanalytik, Georg-August-Universität Göttingen). Für die Analyse wurden jeweils Stämme mit 3xHA-markiertem Vps3 oder 3xMyc-markiertem Vps8 im Wildtyphintergrund und  $\Delta rab5a$  verglichen. Da Vps3 oder Vps8 laut Literatur erst durch die Interaktion mit Rab5a mit den Endosomen verbunden werden (Peplowska *et al.*, 2007, Pawelec *et al.*, 2010), wurde angenommen, dass ohne *rab5a* alle Komponenten des Komplexes zytoplasmatisch vorliegen müssten. Durch die Verwendung von  $\Delta rab5a$ -Stämmen könnte dadurch die Option einer vollständigen Zusammenlagerung des Komplexes bereits im Zytoplasma untersucht werden. Ebenfalls wurde untersucht, ob sich eine veränderte Komplexzusammensetzung ergibt, wenn *vps3* deletiert wird. Verwendet wurden für die Co-IP mit Vps3 als Köderprotein Wildtypstämme (UKS163/UKS164: AB31 *vps3:3xHA*) und *rab5a*-Deletionsstämme (UKS486/UKS487: AB31 *vps3:3xHA*,  $\Delta rab5a$ ). Für Vps8 als Köderprotein wurde der Wildtyphintergrund (UKS179/UKS180: AB31 *vps8:3xMyc*),

## Ergebnisse

sowie  $\Delta vps3$  (UKS483/UKS484: AB31 *vps8:3xMyc*,  $\Delta vps3$ ) und  $\Delta rab5a$  (UKS489/UKS490: AB31 *vps8:3xMyc*,  $\Delta rab5a$ ) untersucht. Die Ergebnisse der MS-Analysen sind in Abb. 32 dargestellt. Es erfolgte eine Filterung der Ergebnisse, bei denen sämtliche Peptide entfernt wurden, die in einer der Negativkontrollen nachgewiesen werden konnten. Als Negativkontrolle wurden Proteinproben aus den jeweiligen Wildtypstämmen ohne Markierung mit den gleichen Beads inkubiert, wie die jeweiligen Proben und diese anschließend ebenfalls mittels MS analysiert. Um unspezifische, in geringer Menge vorkommende Proteine zu eliminieren wurde ein Grenzwert von 5 Peptidzählungen gewählt und alle Proteine dargestellt, die diesen in den Analysen überschritten. Es konnten unter allen untersuchten Bedingungen alle 6 durch Bioinformatik vorhergesagten Untereinheiten des CORVET-Komplex gefunden werden (mit Ausnahme von Vps3 in  $\Delta vps3$ ). Stattdessen wurde in  $\Delta vps3$ -Stämmen UMAG\_15000, das homologe Protein zu Vps39 und spezifitätsvermittelnde Untereinheit des HOPS-Komplexes, als Bestandteil des CORVET-Komplexes ermittelt. Ebenfalls in allen Proben, mit Ausnahme von  $\Delta vps3$ , zu finden war Nma1 (UMAG\_00933). Aufgrund der unterschiedlichen Effizienz der Co-IPs wurden die Peptidzählungen in Relation zu den Peptidzählungen des jeweiligen Köderproteins gesetzt und ein Mittelwert aus den unabhängigen Duplikaten berechnet. Dadurch konnte gezeigt werden, dass sich die Bestandteile des CORVET-Komplexes zwischen Wildtypstämmen und  $\Delta rab5a$ -Stämmen nicht signifikant unterscheiden. Lediglich  $\Delta vps3$ -Stämme unterscheiden sich durch das Fehlen von Nma1, Vps3 selbst und stattdessen dem Vorhandensein von Vps39 im Komplex.



		Vps3:3xHA		Vps3:3xHA		Vps8:3xMyc		Vps8:3xMyc		Vps8:3xMyc	
		WT		$\Delta rab5a$		WT		$\Delta vps3$		$\Delta rab5a$	
		UKS163	UKS164	UKS486	UKS487	UKS179	UKS180	UKS483	UKS484	UKS489	UKS490
Vps3	UMAG_01668	19	67	25	41	22	71			16	35
Vps8	UMAG_15064	15	85	27	67	14	86	33	74	21	76
Vps11	UMAG_03820	23	84	27	70	22	85	26	47	22	58
Vps18	UMAG_05292	18	58	22	47	22	61	25	40	18	41
Vps16	UMAG_11636	14	37	14	9	8	30	13	14	16	18
Vps33	UMAG_10284	3	14	4		3	8	3		3	6
Nma1	UMAG_00933	61	152	70	103	70	135			57	82
Vps39	UMAG_15000.2							29	38	1	12
	UMAG_05158							7	2		
	UMAG_03700							5	2	4	
	UMAG_10107								6		
Vps41	UMAG_01312						6				



### Abb. 32: Die Zusammensetzung des CORVET-Komplex in *U. maydis* ist nicht abhängig von Rab5a

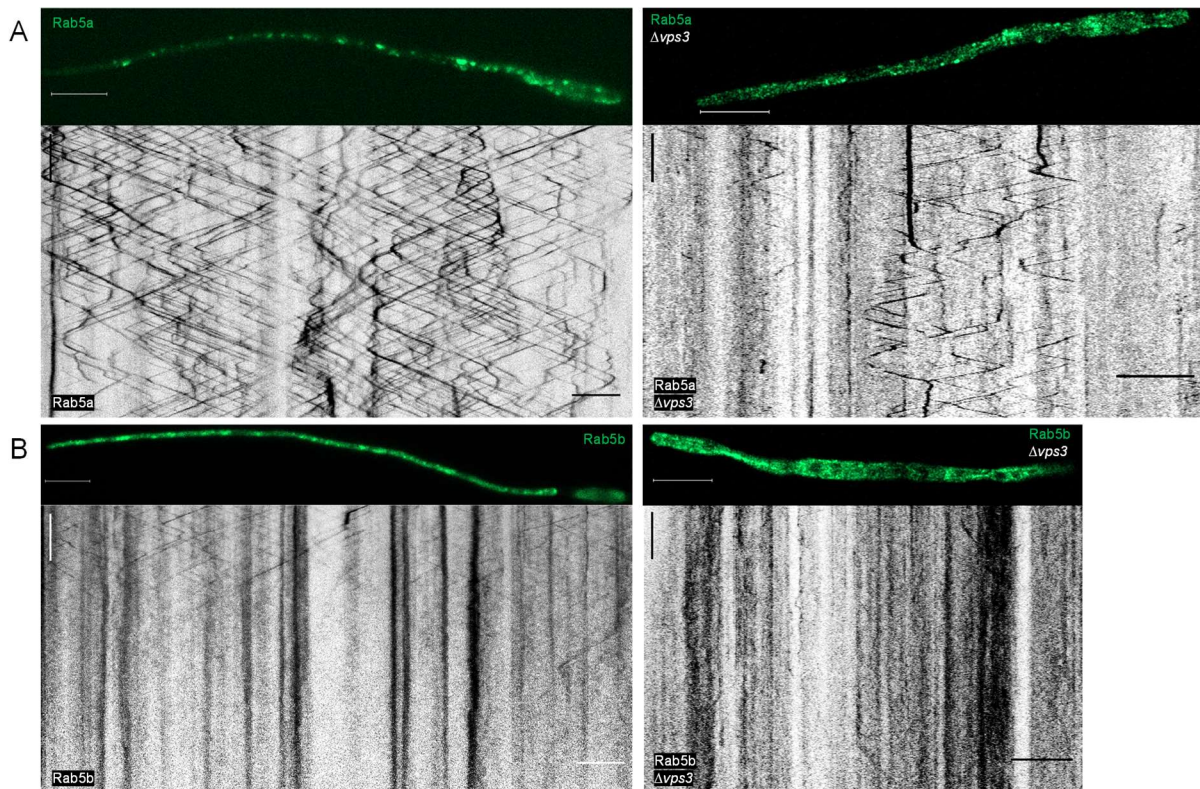
Induktion des filamentösen Wachstums erfolgte über 7 h. Durchführung einer Co-IP und anschließender MS mit je 2 unabhängigen Transformanden in 2 unabhängigen Experimenten. Auflistung der Proteine mit Peptidzählungen  $\geq 5$  Peptide in der Tabelle (oben). Als Köder verwendete Proteine sind grau unterlegt. Zur anschaulicheren Darstellung und zur Berücksichtigung der verschiedenen Co-IP-Effizienzen wurden die Peptidzählungen in Relation zu den Köderproteinen gesetzt und als Diagramm dargestellt (unten). Sowohl in Wildtypstämmen als auch in  $\Delta rab5a$  sind alle sechs erwarteten Proteine des Komplexes identifiziert worden. Ebenfalls konnte immer das Protein Nma1 (UMAG\_00933) gefunden werden. In  $\Delta vps3$  waren Vps3 und Nma1 nicht zu finden, stattdessen war Vps39 im Komplex vorhanden. Die Unterschiede zwischen den Peptidabundanz in den verschiedenen Stammhintergründen waren nicht signifikant.

### 3.2.2. Der CORVET-Komplex in *U. maydis* enthält essenzielle Komponenten

Nachdem bestätigt werden konnte, dass die Zusammensetzung des CORVET-Komplexes in *U. maydis* der konservierten Zusammensetzung, wie sie auch für Hefe und höhere Eukaryoten beschrieben ist, entspricht, wurde durch Deletionen der verschiedenen Bestandteile die Funktionsweise des Komplexes untersucht. Der morphologische Phänotyp von  $\Delta vps3$ -Zellen wurde bereits in Vorarbeiten analysiert. Spordien, denen *vps3* fehlt, zeigten Probleme bei der Zytokinese, konnten sich nach der Zellteilung nicht voneinander separieren und bildeten große, aneinanderhängende, sternförmige Strukturen. Eine Analyse der Vakuolen zeigte,

## Ergebnisse

dass die Anzahl der Vakuolen in den Deletionsstämmen reduziert war, was mit einer gleichzeitigen Größenzunahme verbunden war (Schneider, 2016). Dieser Phänotyp konnte in *S. cerevisiae* auf Proteinsortierungsdefekte zurückgeführt werden (Banta *et al.*, 1988, Raymond *et al.*, 1992). Auch das filamentöse Wachstum von  $\Delta vps3$ -Stämmen war beeinträchtigt. Die Filamente zeigten Polaritätsstörungen, Verzweigungen und Reduktionen des Längenwachstums (Schneider, 2016). Unter Verwendung des überexprimierten Fusionskonstruktes von Rab5a wurden auch erste Erkenntnisse über einen Einfluss der *vps3*-Deletion auf die Motilität der frühen Endosomen gewonnen. Die Lokalisierung von Rab5a-Signalen wurde in  $\Delta vps3$ -Zellen in den Vakuolen beschrieben (Obhof, 2017). Da bereits gezeigt werden konnte, dass die Überexpression von Rab-GTPasen artifizielle Effekte hervorruft, wurde mit den nativen Expressionsleveln von Rab5a, sowie erstmalig auch für Rab5b, analysiert, welche Auswirkung das Fehlen von Vps3 auf die Populationen der frühen Endosomen hat. Für den Vergleich der Auswirkung einer *vps3*-Deletion auf die Rab5a-positiven Endosomen wurden ein Wildtypstamm mit Rab5a-Markierung (UKS91: AB31 *gfp:rab5a*) und ein Stamm mit einer zusätzlichen *vps3*-Deletion (UKS216: AB31 *gfp:rab5a*,  $\Delta vps3$ ) herangezogen. Im Fall von Rab5b-positiven Endosomen wurde der Wildtyp (URS1: AB31 *gfp:rab5b*) mit  $\Delta vps3$  (UKS291: AB31 *gfp:rab5b*,  $\Delta vps3$ ) verglichen. Für den Vergleich, dargestellt in Abb. 33, wurden Lokalisierung der Proteinsignale und Motilität verglichen. Rab5a-positive Endosomen zeigten in  $\Delta vps3$ -Stämmen im Vergleich zum Wildtyp eine deutliche Reduktion der bidirektionalen Motilität, welche jedoch nicht vollständig unterbunden war. Die Lokalisierung von Rab5a-Signalen konnte weiterhin auf punktuellen Strukturen beobachtet werden, jedoch gab es zusätzlich größere statische Akkumulationen des Signals und fädige Strukturen an der Zellperipherie. Auch bei Rab5b-positiven Strukturen war in  $\Delta vps3$ -Stämmen eine Reduktion der Motilität zu beobachten, diese war jedoch nicht vollständig unterbunden, sondern schien auf kürzeren Strecken abzulaufen und im Verhältnis waren mehr statische Signale vorhanden als im Wildtyp. Wie bereits für Rab5a der Fall wurden auch bei Rab5b in den Deletionsstämmen Akkumulationen an fädigen Strukturen beobachtet.



**Abb. 33: Die Deletion von *vps3* beeinflusst die Populationen Rab5a- und Rab5b-positiver Endosomen**

**A)** Die Deletion von *vps3* führte zu einer Reduktion der bidirektionalen Motilität von Rab5a, während dessen Lokalisierung nur wenig beeinflusst wurde. Im Vergleich zum Wildtyp traten im Deletionshintergrund zusätzliche Akkumulationen von statischen Rab5a-Signalen auf, sowie eine Lokalisation an fädigen Strukturen in der Zellmitte und entlang der Zellmembran. **B)** Durch die Deletion von *vps3* wurde die bidirektionale Motilität von Rab5b reduziert. Zusätzlich zu der gewohnten Lokalisierung auf punktuellen Strukturen konnten Ansammlungen von Signal an fädigen Strukturen beobachtet werden. Zellbiologische Analyse mit Mikroskop 1. Horizontaler Maßstab: 10  $\mu\text{m}$ , vertikaler Maßstab: 10 sek.

Zusätzlich zu der Deletion von *vps3* sollte auch die Deletion der anderen Rab5-spezifischen Untereinheit des CORVET-Komplexes, *vps8*, untersucht werden. Mit diesem Experiment sollte analysiert werden, ob die beiden spezifitätvermittelnden Untereinheiten redundante Funktionen ausüben, um damit auch Erkenntnisse über die Funktionsweise des Komplexes zu gewinnen. Von Interesse war ebenfalls die Fragestellung, ob der CORVET-Komplex mit beiden spezifischen Untereinheiten gleichzeitig an Endosomen bindet, um die Verbindung der Membrankompartimente zu gewährleisten. Ebenfalls möglich wäre die Vorstellung, dass einer der beiden Untereinheiten den initialisierenden Schritt der Membranbindung darstellt. Vielzahlige Versuche Deletionen von *vps8* zu generieren verliefen erfolglos. Aus diesem Grund wurde der diploide Stamm FBD11 verwendet, um eines der beiden *vps8* Allele zu deletieren (UKS144: FBD11 *vps8*,  $\Delta vps8$ ). Bei der Sporenkeimung durchlaufen

## Ergebnisse

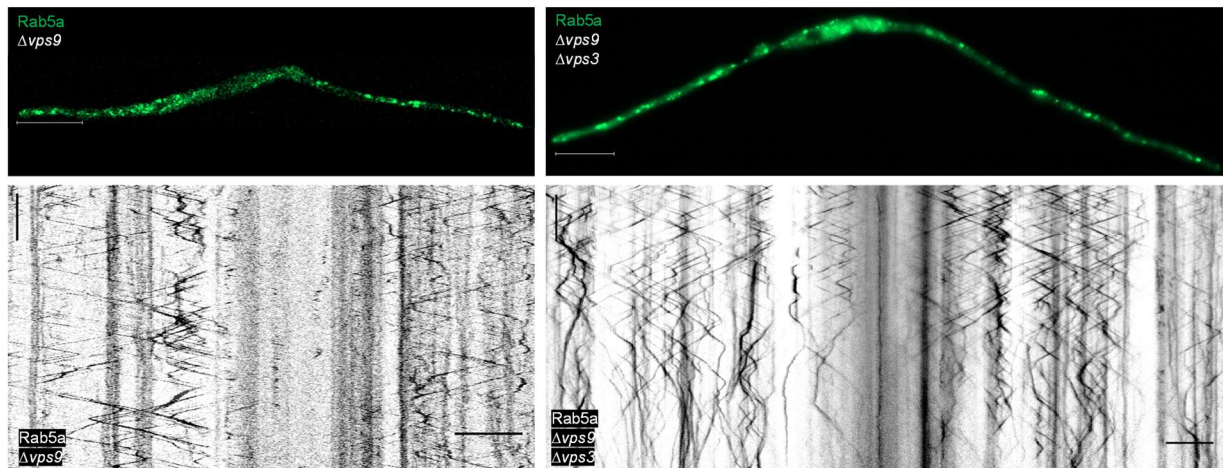
*U. maydis*-Zellen eine meiotische Teilung zur Bildung der haploiden Sporidien. Eine Analyse der Sporidien kann Aufschluss darüber geben, ob ein Gen essenziell ist. Im Falle eines nicht-essenziellen Gens wird eine 1:1 Aufspaltung zwischen Wildtyp-Gen und Gendeletion erwartet. Ist ein Gen essenziell, sterben alle Sporidien mit der Gendeletion und alle überlebenden Sporidien enthalten den Wildtypgenotyp. Da die Gendeletion durch Insertion eines dominanten Selektionsmarkers generiert wird, können Wildtyp und Deletionsstämme leicht unterschieden werden. Mit FBD11 $\Delta$ *vps8* wurden Maispflanzen infiziert, die Sporen geerntet und 60 ausgekeimte Sporen analysiert. Die Resistenz gegen das bei der Deletion von *vps8* verwendete Antibiotikum und damit die Deletion von *vps8* konnte in keinem der Stämme nachgewiesen werden. Aufgrund dieses Resultates kann davon ausgegangen werden, dass *vps8* in *U. maydis* ein essenzielles Gen darstellt. Neben den beiden Rab5-spezifischen Untereinheiten des CORVET-Komplexes, Vps3 und Vps8, wurde mit Vps11 stellvertretend auch eine der Kernkomponenten analysiert. Auch in diesem Fall blieben die Versuche, die Deletion von *vps11* in *U. maydis* einzubringen, erfolglos. Analog wie für *vps8* beschrieben, wurde auch die Deletion von *vps11* in FBD11 eingebracht (UKS154: FBD11 *vps11*,  $\Delta$ *vps11*) und die Sporen der erfolgreichen Infektion analysiert. Von 178 untersuchten ausgekeimten Sporenkolonien konnte bei keiner Sporidie die Deletion von *vps11* nachgewiesen werden. Daher konnte davon ausgegangen werden, dass auch *vps11* ein essenzielles Gen in *U. maydis* ist.

### 3.2.3. Vps3 übt in *U. maydis* keine GEF-ähnliche Funktion für Rab5a aus

Für Vps3 in *S. cerevisiae* wurde beschrieben, dass das Protein durch eine Präferenz für die inaktive Form von Rab5a eine GEF-ähnliche Funktion ausüben kann (Peplowska *et al.*, 2007). GEFs sind ausschlaggebend für eine korrekte Lokalisierung des zugehörigen Rab-Proteins, da sie die Umwandlung von der inaktiven in die aktive Form durch Entfernung des gebundenen GDPs katalysieren und so die Integration der GTPase in die Membran bewirken (Ullrich *et al.*, 1994, Blumer *et al.*, 2013). Eine Deletion des GEFs für eine GTPase sollte demnach deren Aktivierung verhindern und die zugehörigen Proteine in der inaktiven Form im Zytoplasma lokalisieren. Wie für die Deletion von *vps3* in Bezug auf die Lokalisation von Rab5a beobachtet (vgl. Abb. 33), wurden zwar Änderungen im Vergleich zum Wildtyp festgestellt, jedoch konnte nach

wie vor aktives, sich mit den Endosomen bidirektional durch die Zelle bewegendes Protein beobachtet werden. Bioinformatischen Analysen zufolge gibt es lediglich ein weiteres Protein im Proteom von *U. maydis*, welches als GEF für Rab5a in Frage kommt. Das Homolog zu Vps9 aus *S. cerevisiae* (UMAG\_10209) wurde in Vorarbeiten untersucht. In Kombination mit dem überexprimierten Fusionsprotein von Rab5a konnten keine drastischen Auswirkungen der *vps9*-Deletion auf die Motilität der Rab5a-markierten frühen Endosomen beobachtet werden. Die trotz der Deletion erfolgende Lokalisierung auf motilen frühen Endosomen zeigte, dass die Aktivierung und Rekrutierung von Rab5a an die Endosomenmembran nicht beeinträchtigt war (Obhof, 2017). Da nicht ausgeschlossen werden konnte, dass dieser Effekt dem erhöhten Proteinlevel von Rab5a geschuldet war, wurde die Deletion erneut in Kombination mit der nativen Expressionsstärke von *rab5a* untersucht. Wie in Abb. 34 dargestellt, hatte die Deletion von *vps9* auch auf das unter nativen Bedingungen exprimierte Rab5a-Protein keinen Effekt (UKS141: AB31 *gfp:rab5a*,  $\Delta vps9$ ). Die Zellen zeigten den bereits beschriebenen morphologischen Phänotyp der *vps9*-Deletion mit polaritätsgestörten Filamenten. Rab5a-Proteine lokalisierten jedoch nach wie vor auf sich bidirektional bewegendenden punktuellen Strukturen. Um auszuschließen, dass sich Vps3 und Vps9 in ihrer GEF-Funktion bei Fehlen eines der Proteine kompensieren können, wurde ebenfalls eine Doppeldelation beider Gene durchgeführt (Abb. 34). Auch die Stämme mit  $\Delta vps9\Delta vps3$  zeigten jedoch keine deutlichen Veränderungen in der Motilität oder Lokalisierung von Rab5a (UKS479: AB31 *gfp:rab5a*,  $\Delta vps3$ ,  $\Delta vps9$ ). Die motilen Signale sowohl bei  $\Delta vps9$ , als auch bei  $\Delta vps9\Delta vps3$  waren jedoch verstärkt in den filamentösen Auswüchsen zu beobachten, in der Initialzelle waren vorwiegend statische Signale vorhanden. Die Rekrutierung der Rab5a-GTPase an die Membran der frühen Endosomen konnte jedoch auch unabhängig von Vps3 und Vps9 stattfinden.

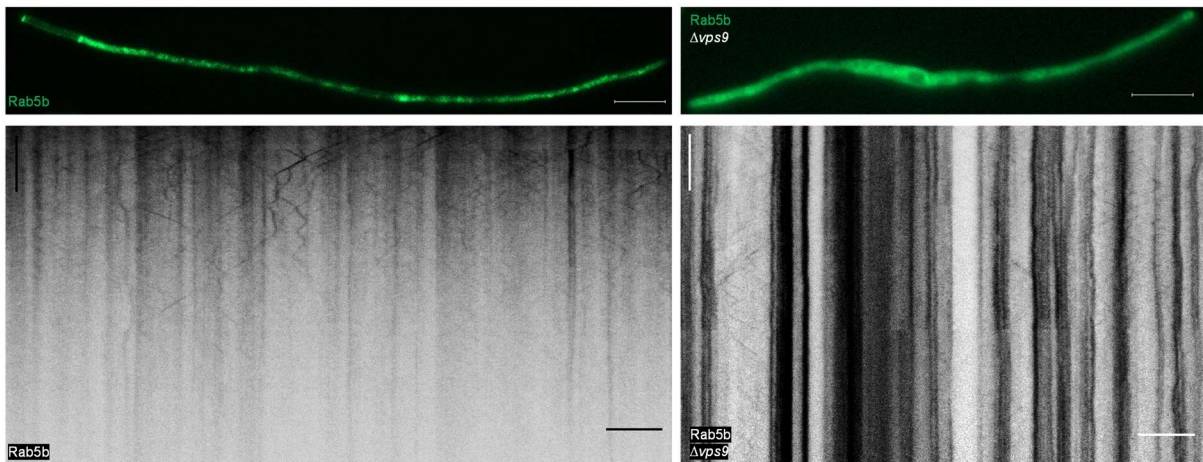
## Ergebnisse



### Abb. 34: Weder Vps3 noch Vps9 erfüllen GEF-Funktionen für Rab5a

Die Deletion des potenziellen GEFs *vps9* (links) führte zu keiner Beeinträchtigung der Motilität und der Lokalisierung von Rab5a auf punktuellen Strukturen. Auch die Doppeldeletion beider in Frage kommenden GEFs, *vps3* und *vps9* (rechts), bewirkte nicht die erwartete Umverteilung von der vesikulären zu einer zytoplasmatischen Lokalisation von Rab5a. Analyse der Zellen durch Mikroskop 1. Horizontaler Maßstab: 10  $\mu\text{m}$ , vertikaler Maßstab: 10 sek.

Da die Deletion von *vps9* nicht die erwartete Auswirkung auf die Rab5a-GTPase hatte, nach bioinformatischen Analysen jedoch kein anderer GEF bestimmt werden konnte, wurde untersucht, ob Vps9 für Rab5b eine GEF-Funktion ausüben kann. Für die Beurteilung der Rekrutierung der GTPase an die Endosomen und die damit erwartungsgemäß ablaufenden Transportprozesse erfolgte die Auswertung von Bewegungsmustern in Kymographen. Wie in Abb. 35 dargestellt, zeigte Rab5b im Wildtyp (URS1: AB31 *gfp:rab5b*) die bereits beschriebene Lokalisierung an punktuellen Strukturen und bidirektionale Transportprozesse. Durch die Deletion von *vps9* (UKS309: AB31 *gfp:rab5b*,  $\Delta vps9$ ) verlagerte sich die Lokalisierung weitestgehend ins Zytoplasma. Es waren fast keine punktuellen Strukturen mehr erkennbar. Die Auswertung der Motilität in Kymographen zeigte eine überwiegende Lokalisierung auf statischen Strukturen. In der Mehrzahl der Zellen konnten noch verbleibende bidirektionale Bewegungsmuster detektiert werden. Diese waren im Vergleich mit dem Wildtyp jedoch deutlich reduziert. Die übrigen Zellen zeigten ein völliges Ausbleiben der Motilität von Rab5b durch die Deletion von *vps9*. Dadurch wurde eine Beteiligung von Vps9 an der Rekrutierung von Rab5b an die Membranen der frühen Endosomen deutlich.



**Abb. 35: Vps9 ist beteiligt an der Rekrutierung von Rab5b an die Membran der frühen Endosomen**

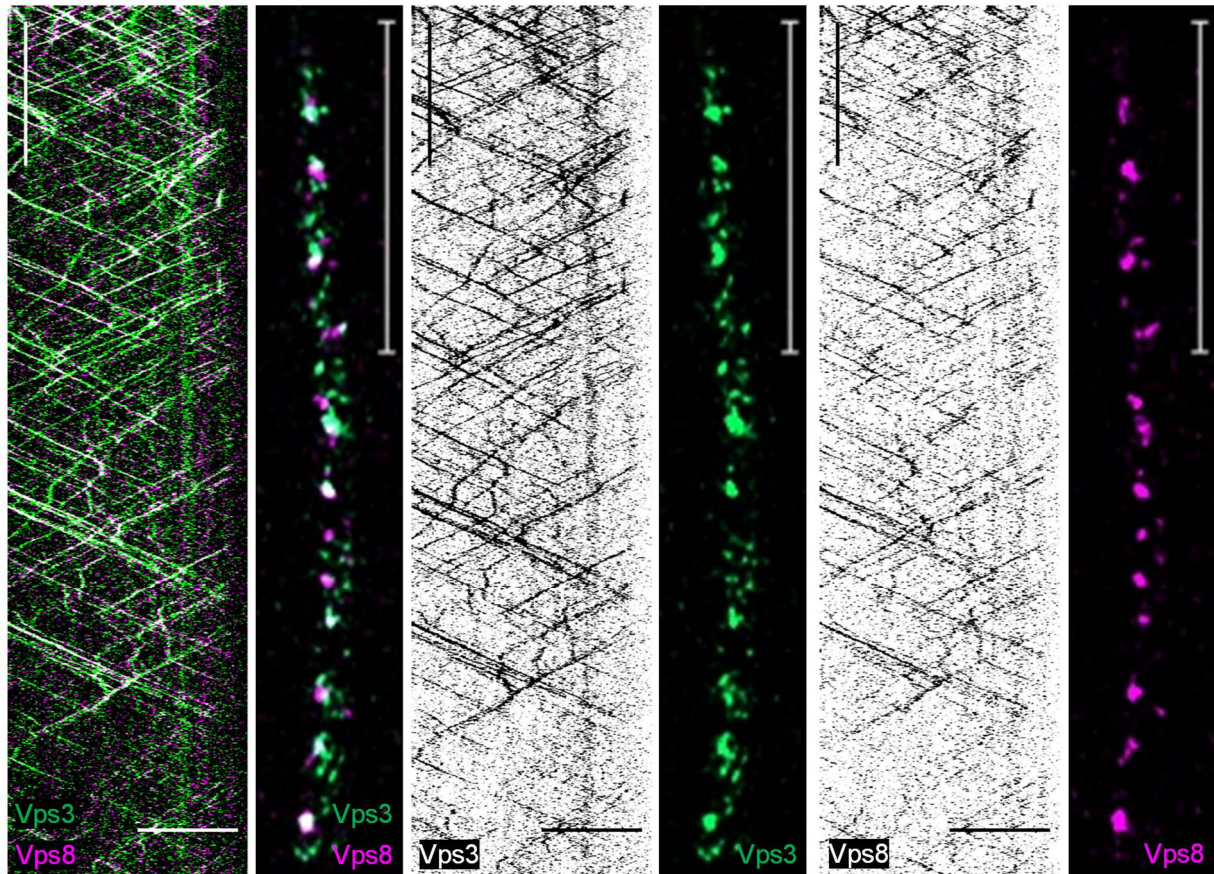
In Wildtypzellen (links) zeigte Rab5b eine Lokalisierung an punktuellen Strukturen und bidirektionale Bewegungsmuster. Durch die Deletion von *vps9* verlagerte sich die Lokalisierung von Rab5b überwiegend in das Zytoplasma und die Motilität wurde reduziert. In einem Großteil der Zellen waren neben einer Zunahme von statischen Signalen geringfügige bidirektionale Transportprozesse zu beobachten, die übrigen Zellen enthielten ausschließlich statische Rab5b-Signale. 16 h Induktion der Filamente. Analyse der Zellen durch Mikroskop 1. Horizontaler Maßstab: 10  $\mu\text{m}$ , vertikaler Maßstab: 10 sek.

#### 3.2.4. Komponenten des CORVET-Komplex lokalisieren auf den frühen Endosomen

Ergänzend zu den Analysen der Deletionsphänotypen war für eine Funktionsanalyse auch die Lokalisierung der CORVET-Komponenten von Interesse. Besonders im Hinblick auf die essenzielle Funktion von Vps8 sollte untersucht werden, ob diese Komponente in weiteren Prozessen mitwirkt, die sie unverzichtbar machen, oder ob Vps8 die ausschlaggebende Rolle bei der Assemblierung oder Rekrutierung des Komplexes an die frühen Endosomen spielt und damit eine funktionsvermittelnde Wirkung hat. Zunächst wurde die Lokalisierung der beiden CORVET-spezifischen Untereinheiten Vps3 und Vps8 analysiert, sowie die Colokalisierung der beiden Komponenten. Wie in Abb. 36 veranschaulicht, zeigten Vps3 und Vps8 eine gemeinsame Lokalisierung auf sich bewegendem punktuellen Strukturen (UKS236: AB31 *vps3:gfp*, *vps8:3xmCherry*). Es waren beide Signale auch in einzelnen Lokalisierungen zu beobachten, diese befanden sich jedoch auf kleineren punktuellen Strukturen. Größere Strukturen zeigten eine Colokalisierung beider Proteine. Der Transport erfolgte gemeinsam sowohl in Richtung der Hyphenspitze als auch zurück Richtung Initialzelle. Bestrebungen eine der Kernkomponenten des CORVET- und HOPS-Komplexes, Vps11, mit einem Fluoreszenzprotein zu fusionieren, um

## Ergebnisse

Aufschluss über das Verhältnis der Komplexe und deren Lokalisierung zu erhalten, waren jedoch in mehreren Transformationsversuchen nicht erfolgreich.



### **Abb. 36: Vps3 und Vps8 werden gemeinsam bidirektional durch die Zelle transportiert**

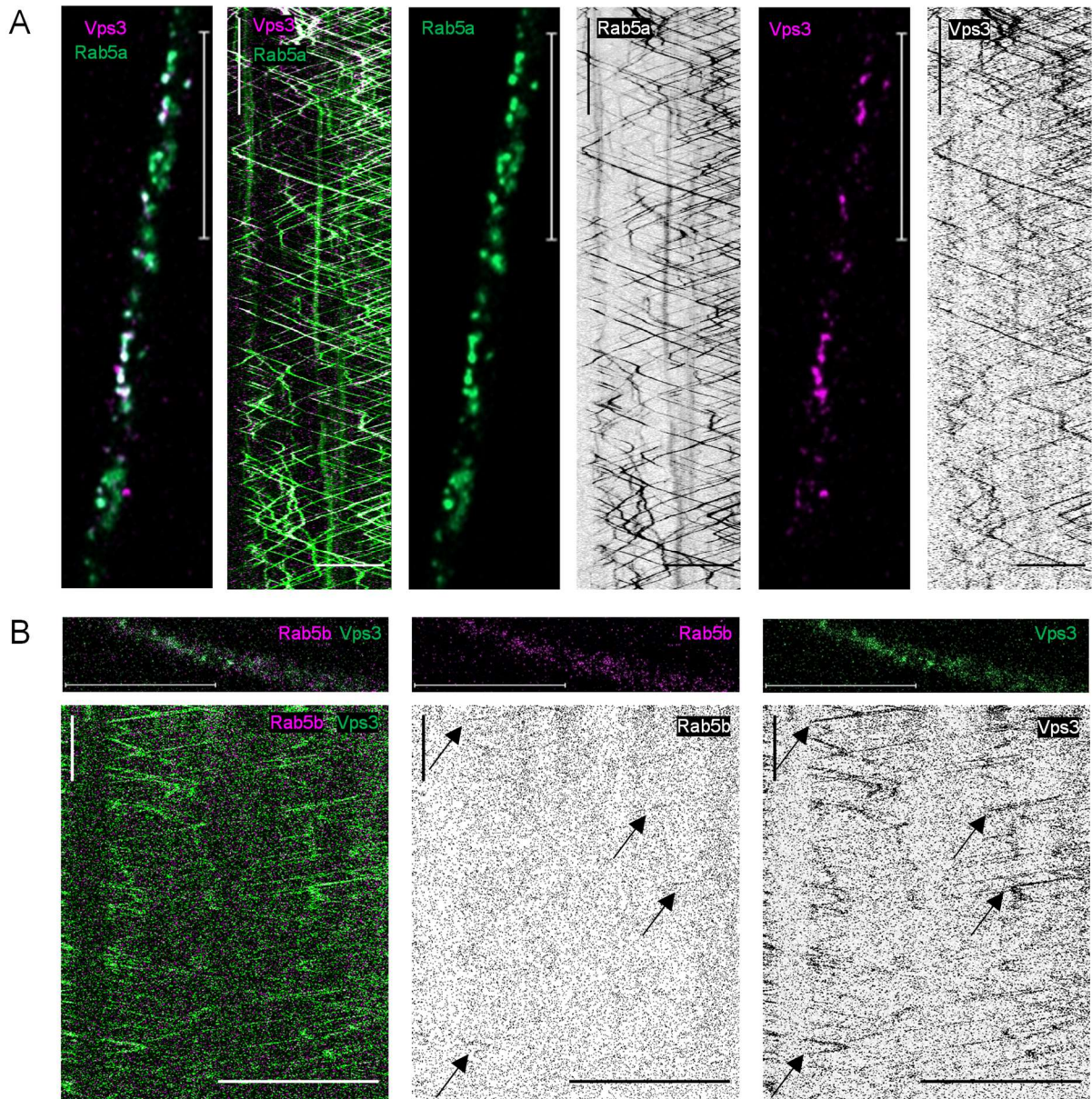
Die Analyse der Colokalisierung zeigte, dass Vps3 und Vps8 auf den gleichen punktuellen Strukturen lokalisierten, jedoch beide Proteine auch einzeln auf kleinen, punktuellen Strukturen vorkamen. Der Transport beider Proteine erfolgte gemeinsam sowohl in anterograder als auch in retrograder Richtung. Farbwahl: Vps8 magenta, Vps3 grün, Überlagerung der Signale zeigt sich in weiß. Analyse der Zellen durch Mikroskop 2. Kymographen: Horizontaler Maßstab: 10 µm, vertikaler Maßstab: 10 sek; Mikroskopaufnahmen: Maßstab 10 µm.

Um zu verifizieren, dass die beobachtete Lokalisierung von Vps3 und Vps8, sowie das bidirektionale Bewegungsmuster auf endosomale Transportprozesse zurückgeführt werden kann, wurden Colokalisierungen der CORVET-Untereinheiten mit den Rab5-GTPasen untersucht. Für Vps3 konnte beobachtet werden, dass die CORVET-Untereinheit gemeinsam mit Rab5a (UKS342: AB31 *gfp:rab5a*, *vps3:mKate2*) transportiert wurde (Abb. 37). Der Transport erfolgte, wie bereits für die frühen Endosomen beschrieben, bidirektional mit schnellen Richtungsänderungen. Es konnte eine Colokalisierung auf Rab5a-positiven Endosomen bestätigt werden, jedoch



waren auch einige Rab5a-positive Endosomen ohne zusätzliche Vps3-Lokalisierung und einige wenige einzelne Vps3-Signale vorhanden. Die Analyse der Colokalisierung mit Rab5b war aufgrund des schwachen Rab5b-Signals in dieser Konstellation schwierig (UKS414: AB31 *mCherry:rab5b, vps:gfp*), jedoch konnten auch in diesem Fall einzelne gemeinsame Transportprozesse und ein geringer Anteil an Colokalisierung beobachtet werden. Erneut wurden für beide Proteine auch einzelne Signale detektiert. Um zu analysieren ob Vps3 ausschließlich mit Rab5a interagiert, oder auch eine Interaktion mit Rab5b direkt möglich ist, wurden Co-IP-Experimente durchgeführt. Es konnte jedoch weder für Rab5b noch für die native Form von Rab5a oder die konstitutiv aktive oder inaktive Mutante von Rab5a eine Interaktion mit Vps3 nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Dieses Resultat war konsistent mit den publizierten Ergebnissen aus *S. cerevisiae*, da auch in diesem Organismus keine Interaktion *in vivo* gezeigt werden konnte. Sämtliche publizierten Interaktionen wurden mit aufgereinigten und angereicherten Proteinextrakten durchgeführt (Pawelec *et al.*, 2010, Plemel *et al.*, 2011).

## Ergebnisse

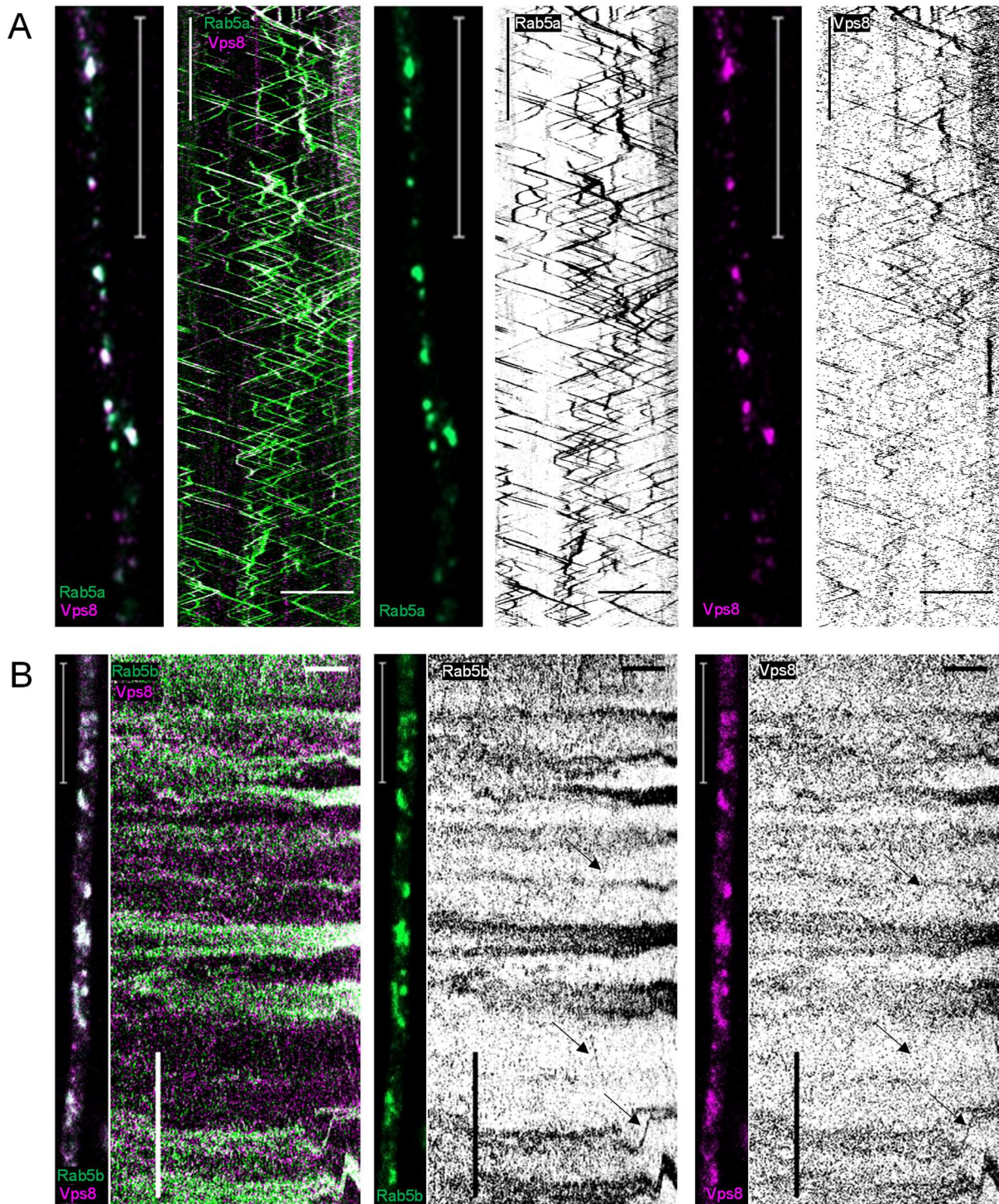


**Abb. 37: Vps3 wird mit Rab5a- und Rab5b-positiven Endosomen transportiert**

**A)** Vps3 und Rab5a zeigten anteilige Colokalisierungen, von beiden Signalen wurden jedoch auch einzelne Lokalisierungen beobachtet. Der Transport beider Proteine erfolgte gemeinsam bidirektional durch die Zelle. Farbwahl: Vps3 magenta, Rab5a grün, Überlagerung der Signale zeigt sich in weiß. Kymographen: Horizontaler Maßstab: 10  $\mu\text{m}$ , vertikaler Maßstab: 10 sek; Mikroskopaufnahmen: Maßstab 10  $\mu\text{m}$ . **B)** Rab5b und Vps3 wurden ebenfalls gemeinsam bidirektional transportiert (aufgrund des schwachen Signals von Rab5b wurden markante Stellen mit Pfeilen hervorgehoben). Es wurden colokalisierende Signale detektiert, jedoch auch einzelne Signale beider Proteine. Farbwahl: Rab5b magenta, Vps3 grün, Überlagerung der Signale zeigt sich in weiß. Analyse durch Mikroskop 3. Horizontaler Maßstab: 10  $\mu\text{m}$ , vertikaler Maßstab: 10 sek.

Die Colokalisierung der CORVET-Untereinheit Vps8 mit den frühen Endosomen wurde ebenfalls während des filamentösen Wachstums analysiert. Es konnte beobachtet werden, dass Vps8 und Rab5a (UKS233: AB31 *gfp:rab5a, vps8:3xmCherry*) einen hohen Anteil an übereinstimmender Lokalisierung aufwiesen (Abb. 38). Von beiden Proteinen waren lediglich wenige einzelne Signale zu sehen. Der Transport von Vps8

erfolgte sowohl anterograd als auch retrograd gemeinsam mit Rab5a-positiven Endosomen. Auch im Vergleich von Rab5b und Vps8 (UKS431: AB31 *gfp:rab5b, vps8:3xmCherry*) konnte eine überwiegende Colokalisierung beobachtet werden. Diese fand jedoch weitestgehend auf größeren, statischen oder sich über kurze Distanzen bewegendem Ansammlungen statt. Für diese Lokalisierungen konnte auch eine Fortbewegung in beide Richtungen detektiert werden. Diese war jedoch nur über kurze Strecken zu verzeichnen. Lediglich vereinzelt konnten Kymographienlinien mit steilerer Steigung beobachtet werden, was für motile Strukturen sprach, welche sich mit einer höheren Geschwindigkeit fortbewegten. In diesen Fällen fand der Transport von Rab5b und Vps8 gemeinsam statt und war in beide Richtungen möglich. Verglichen mit anderen Fusionskombinationen von Rab5b oder Vps8, wie beispielsweise der gemeinsamen Untersuchung mit Rab5a (vgl. Abb. 21/ Abb. 38A), war in dieser Kombination die Motilität von beiden Proteinen jedoch reduziert.



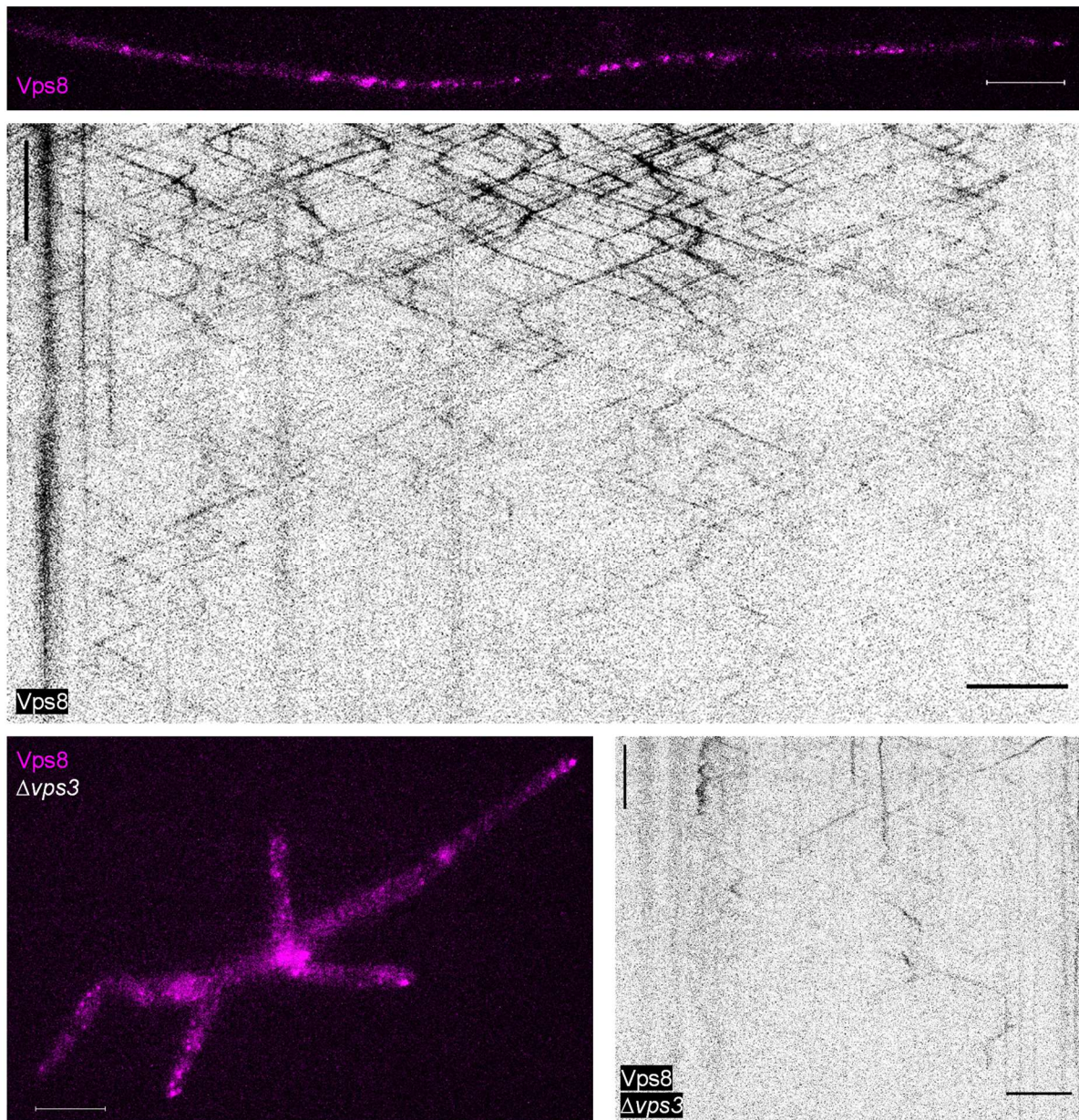
**Abb. 38: Vps8 wird hauptsächlich gemeinsam mit Rab5a- und geringfügig mit Rab5b-positiven Endosomen transportiert**

**A)** Vps8 und Rab5a zeigten in hohem Anteil Colokalisierung, von beiden Signalen wurden jedoch auch wenige einzelne Lokalisierungen beobachtet. Beide Proteine wurden gemeinsam bidirektional durch die Zelle transportiert. Kymographen: Horizontaler Maßstab: 10  $\mu\text{m}$ , vertikaler Maßstab: 10 sek; Mikroskopaufnahmen: Maßstab 10  $\mu\text{m}$ . **B)** Rab5b und Vps8 zeigten einen gemeinsamen bidirektionalen Transport (aufgrund der schwachen Signale wurden markante Stellen mit Pfeilen hervorgehoben). Es wurden überwiegend colokalisierende Signale detektiert, jedoch auch wenige einzelne Signale beider Proteine. Ein großer Anteil der Colokalisierung wurde auf statischen Signalen beobachtet. Farbwahl: Vps8 magenta, Rab5a/Rab5b grün, Überlagerung der Signale zeigt sich in weiß. Horizontaler Maßstab: 10 sek, vertikaler Maßstab: 10  $\mu\text{m}$ . Analyse der Zellen mit Mikroskop 3.

### 3.2.5. Vps8 wird unabhängig von Vps3 mit den frühen Endosomen transportiert

Um zu untersuchen, mit welchem Mechanismus der CORVET-Komplex seine Membranbindung und -überbrückung realisiert, wurde in Betracht gezogen, dass eine der beiden Untereinheiten den initialen Schritt der Membranbindung ausführt. Publierte Resultate aus *S. cerevisiae* zeigten jedoch auf, dass die korrekte Lokalisierung an die Endosomenmembranen und die Vermittlung der Funktionalität durch die komplexspezifischen Untereinheiten realisiert wird (Ostrowicz *et al.*, 2010, Plemel *et al.*, 2011). Es wurde eine gemeinsame Funktion von Vps3 und Vps8 bei der Bindung an Vps21, dem Hefe-Homolog zu Rab5a, beschrieben, wobei die Deletion von *vps8* dazu führte, dass die Interaktion von Vps3 mit Vps21-GTP reduziert war (Peplowska *et al.*, 2007). Um die Fragestellung weiterführend zu adressieren sollte der Einfluss der *vps3*-Deletion auf die Lokalisierung von Vps8 analysiert werden. Falls Vps3 als Bindeelement zwischen Endosomen und den übrigen Bestandteilen des CORVET-Komplexes fungiert, sollte durch eine Deletion von *vps3* die Lokalisierung von Vps8 gestört sein. Aus diesem Grund wurde zunächst die Lokalisierung von Vps8 im  $\Delta vps3$ -Hintergrund untersucht und analysiert, ob Vps8 in diesen Stämmen noch transportiert wird. Wie in Abb. 39 zu sehen ist, lokalisierte Vps8 in Filamenten des Wildtyps (UKS218: AB31 *vps8:3xmCherry*) an punktuellen Strukturen, welche gleichmäßig in der Zelle verteilt waren. Es konnte außerdem das bereits beschriebene bidirektionale Bewegungsmuster beobachtet werden. Wie aus Vorarbeiten bekannt war, zeichneten sich  $\Delta vps3$ -Stämme durch Filamente mit Polaritätsdefekten aus (Schneider, 2016). In Stämmen, in denen *vps3* deletiert war (UKS421: AB31 *vps8:3xmCherry*,  $\Delta vps3$ ) konnten ebenfalls Lokalisierungen auf vesikelförmigen Strukturen ausgemacht werden. Zusätzlich wurden jedoch auch größere Ansammlungen von statischen Signalen beobachtet. Der Vergleich der Kymographen zeigte, dass im  $\Delta vps3$ -Hintergrund noch bidirektionale Motilität von Vps8 vorhanden war, diese jedoch in Bezug auf den Wildtyp reduziert war.

## Ergebnisse

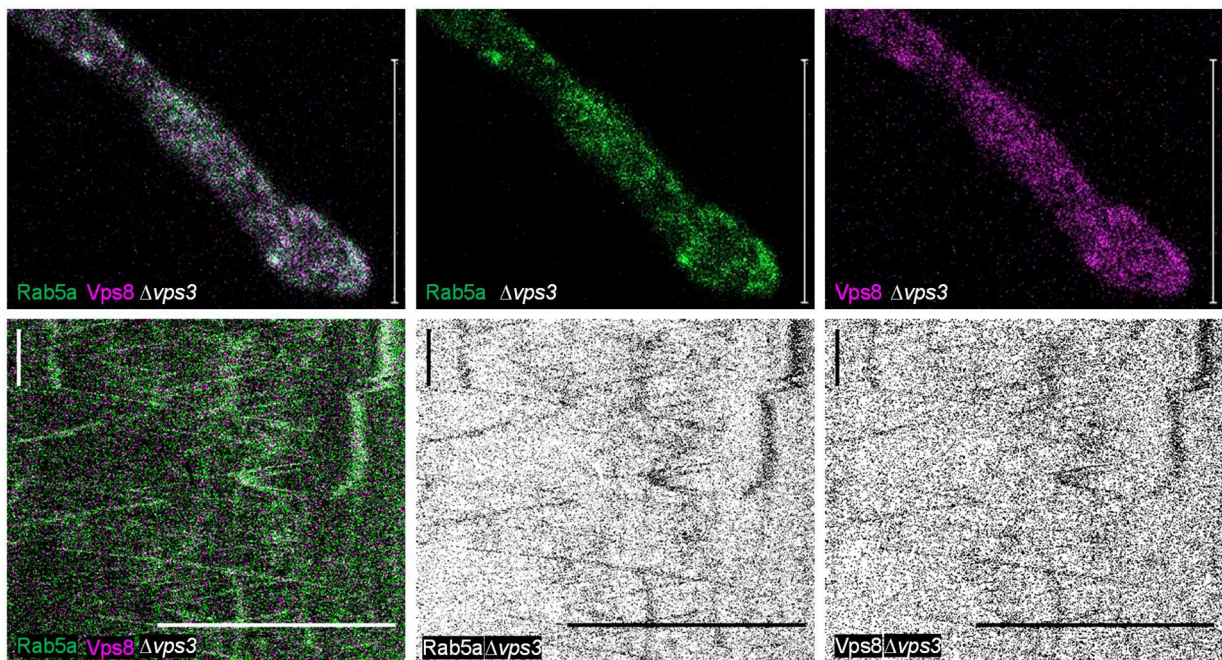


### **Abb. 39: Die Deletion von *vps3* reduziert die Motilität von Vps8**

Im Wildtyp (oben) war Vps8 gleichmäßig in den filamentösen Zellen verteilt und lokalisierte auf punktuellen Strukturen, welche sowohl retrograd als auch anterograd transportiert wurden. Die Deletion von *vps3* (unten) führte zu größeren, statischen Ansammlungen von Vps8, jedoch konnten nach wie vor Lokalisierungen auf sich bidirektional bewegendem Vesikeln detektiert werden. Insgesamt war die Motilität von Vps8 in  $\Delta vps3$ -Stämmen im Vergleich mit dem Wildtyp reduziert. Analyse durch Mikroskop 1. Horizontaler Maßstab: 10  $\mu\text{m}$ , vertikaler Maßstab: 10 sek.

Die verbleibende Motilität von Vps8 in  $\Delta vps3$ -Stämmen zeigte, dass Vps8 an die Endosomen rekrutiert wird, gemeinsam mit ihnen transportiert wird und damit möglicherweise auch unabhängig von Vps3 mit Rab5a interagieren kann. Um dies zu überprüfen wurde auch der Einfluss einer *vps3*-Deletion auf die Colokalisierung und den Rab5a-vermittelten Transport von Vps8 analysiert. Abb. 40 zeigt, dass Vps8 und Rab5a in Stämmen, in denen *vps3* deletiert wurde (UKS418: AB31 *gfp:rab5a*, 100

*vps8:3xmCherry, Δvps3*), wie bereits für den Wildtyp beschrieben (vgl. Abb. 38), auf punktuellen Strukturen colokalisierten. Eine Analyse der Bewegungsmuster zeigte, dass die beobachtete verbleibende Motilität in den Deletionsstämmen gemeinsam stattfand. Damit konnte gezeigt werden, dass Vps8 unabhängig von Vps3 in der Lage war mit den frühen Endosomen zu interagieren und dementsprechend gemeinsam mit ihnen transportiert zu werden. Um zu analysieren, ob die initiale Bindung von Vps8 an die Endosomen der exklusive Bindemechanismus des CORVET-Komplexes ist oder ob Vps3 ebenfalls in der Lage ist die Rekrutierung des Komplexes an die frühen Endosomen zu veranlassen, wäre eine reziproke Untersuchung notwendig. Aufgrund der essenziellen Funktion von *vps8* war es jedoch nicht möglich das Gen zu deletieren, um die Auswirkung auf Vps3 zu beobachten.



**Abb. 40: Vps8 interagiert unabhängig von Vps3 mit den frühen Endosomen**

Mikroskopische Analysen (oben) der Proteinlokalisierungen zeigten, dass Rab5a und Vps8 in  $\Delta vps3$ -Stämmen auf punktförmigen Strukturen colokalisierten. Maßstab: 10  $\mu\text{m}$ . In Kymographen (unten) wurden die, unabhängig von Vps3 ablaufenden, gemeinsamen bidirektionalen Transportvorgänge von Vps8 und Rab5a visualisiert. Farbwahl: Vps8 magenta, Rab5a grün, Überlagerung der Signale zeigt sich in weiß. Analyse durch Mikroskop 3. Horizontaler Maßstab: 10  $\mu\text{m}$ , vertikaler Maßstab: 10 sek.

### 3.2.6. Deletionen der Rab5-GTPasen beeinflussen die Motilität und die Colokalisierung von CORVET-Untereinheiten

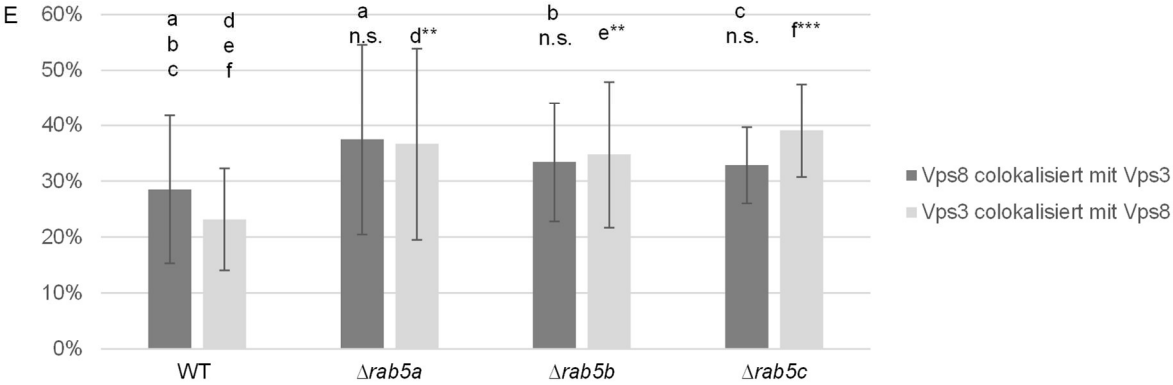
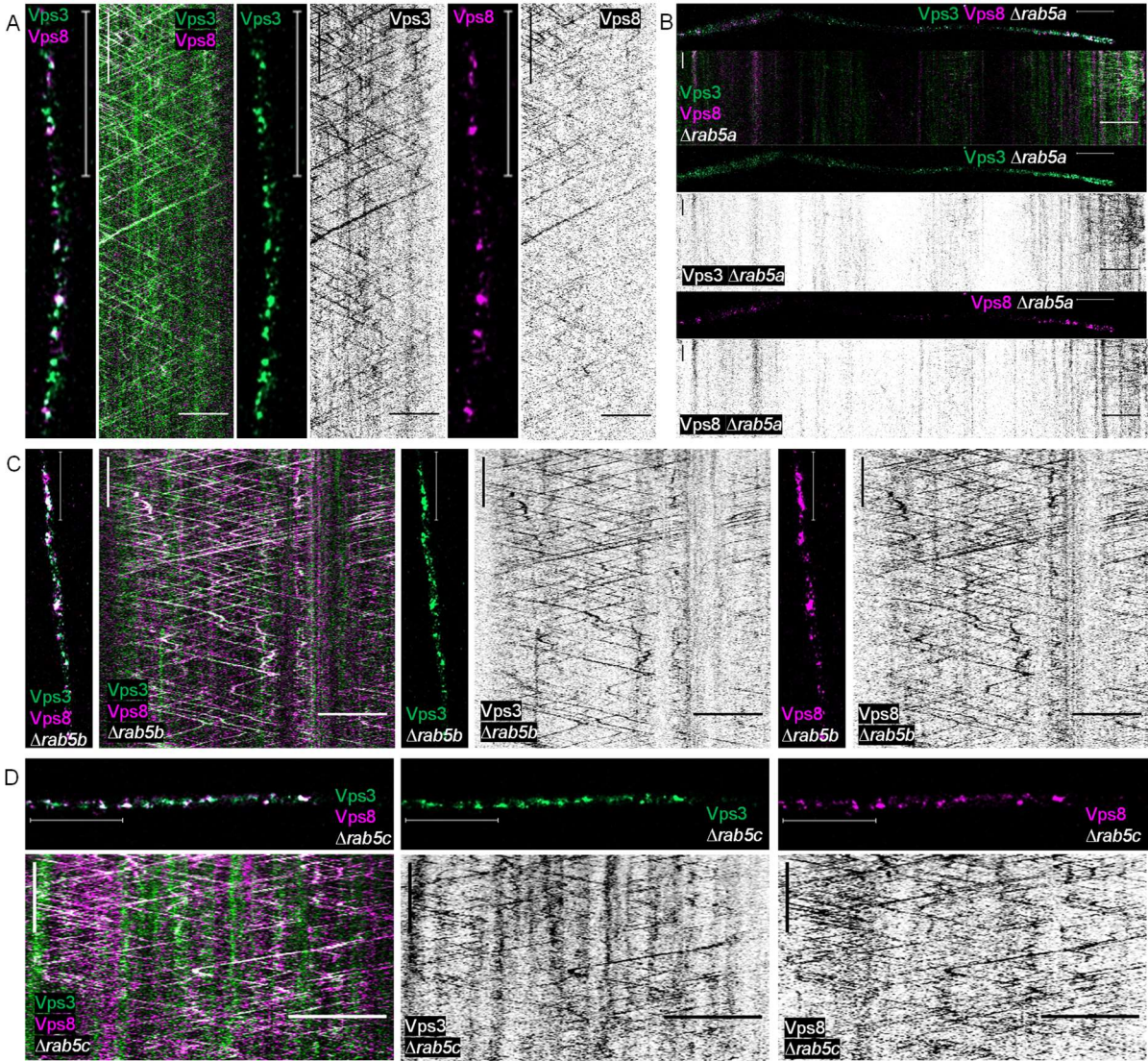
Vorausgegangene Studien in *S. cerevisiae* haben gezeigt, dass der CORVET-Komplex zwar eine Präferenz für Vps21, dem Hefe-Homolog zu Rab5a, besitzt (Peplowska *et al.*, 2007), die Bindung an die frühen Endosomen jedoch auch über zwei Rab5-Homologe stattfinden kann. Erst eine Doppeldeletion von *vps21* und *ypt52* führte zu einer Misslokalisierung, während die Deletion von *ypt53* keinen Effekt erwirkte (Cabrera *et al.*, 2013). Aus diesem Grund wurden die Auswirkungen einer Deletion der verschiedenen Rab5-GTPasen in *U. maydis* auf den CORVET-Komplex untersucht. Die Lokalisierung der CORVET-Untereinheiten Vps3 und Vps8 hatte bereits gezeigt, dass ein Transport sowohl mit Rab5a-, als auch mit Rab5b-positiven Endosomen möglich war (vgl. Abb. 37/Abb. 38). In beiden Experimenten war die jeweils andere Rab5-GTPase zwar mangels Markierung unsichtbar, jedoch vorhanden. Untersuchungen der Colokalisierung von Rab5a und Rab5b hatten bereits eine überwiegende gemeinsame Lokalisierung ergeben (vgl. Abb. 21), sodass ein gemeinsamer Transport mit Rab5b nicht zwangsläufig bedeutet, dass der CORVET-Komplex in der Lage ist mit Rab5b zu interagieren.

Aus diesem Grund wurden zunächst die Auswirkungen der Deletionen von *rab5a*, *rab5b* und *rab5c* auf die beiden CORVET-spezifischen Untereinheiten Vps3 und Vps8 untersucht (Abb. 41). In Wildtypzellen (UKS236: AB31 *vps3:gfp*, *vps8:3xmCherry*) zeigten Vps3 und Vps8 das bereits beschriebene bidirektionale gemeinsame Bewegungsverhalten, sowie eine teilweise Colokalisierung. Der Anteil an Colokalisierung wurde quantifiziert, wobei in die Analyse die gesamte Signalfläche der Proteine miteinbezogen wurden und der prozentuale Anteil der Signalüberlappung bestimmt wurde. Im Wildtyp konnten für Vps3 und Vps8 jeweils etwa 20-30 % Colokalisierung ermittelt werden. Fehlte die GTPase Rab5a, so war der Transportprozess massiv beeinträchtigt (UKS358: AB31 *vps3:gfp*, *vps8:3xmCherry*,  $\Delta$ *rab5a*). In diesen Stämmen war die Motilität von Vps3 und Vps8 stellenweise vollständig unterbunden oder auf geringfügige bidirektionale Bewegungen in den Hyphenspitzen reduziert. Die Beobachtungen der Colokalisierung von Vps3 und Vps8 in  $\Delta$ *rab5a*-Stämmen zeigten, dass sich die beiden Fluoreszenzsignale tendenziell stärker überlappten als es im Wildtyp zu beobachten war. Um zu analysieren, ob sich die Colokalisierung durch das Einbringen der Deletionen verändert hatte, wurde die



Überlagerung der beiden Fluoreszenzsignale quantifiziert (ImageJ). Das Programm ermittelt dabei die Gesamtfläche beider Signale pro Zelle und bestimmt in Relation dazu den prozentualen Anteil der Flächen, auf denen beide Signale sich überlagern. Bei Unterschieden in der Signalintensität kann es dabei vorkommen, dass Proteine auf demselben Organell lokalisieren, das Protein mit dem stärkeren Signal jedoch eine größere Fläche einnimmt als das mit der geringeren Intensität. Dabei überlappt das Protein mit dem schwächeren Signal an dieser Stelle vollständig, das mit dem stärkeren Signal dagegen nur partiell. Bei der anteiligen Überlagerung von Vps8 mit Vps3-Signalen konnte ein nicht signifikanter Anstieg von 29 % auf 38 % ermittelt werden (p-Wert 0,101), während die Überlagerung von Vps3 mit Vps8-Signalen signifikant von 23 % auf 37 % erhöht war (p-Wert 0,0035). Die Deletion von *rab5b* (UKS362: AB31 *vps3:gfp*, *vps8:3xmCherry*,  $\Delta$ *rab5b*) zeigte keine offensichtlichen Auswirkungen auf die Motilität von Vps3 oder Vps8. Vergleichbar mit  $\Delta$ *rab5a* wurde jedoch auch für  $\Delta$ *rab5b* eine Auswirkung auf die Colokalisierung der beiden CORVET-Untereinheiten beobachtet. Die Überlagerung von Vps8 mit Vps3 zeigte ebenfalls einen nicht signifikanten Anstieg von 29 % auf 33 % (p-Wert 0,3), während die anteilige Überlagerung von Vps3-Signalen mit Vps8 signifikant von 23 % auf 35 % erhöht war (p-Wert 0,005). Ähnliches konnte für die Deletion von *rab5c* (UKS390: AB31 *vps3:gfp*, *vps8:3xmCherry*,  $\Delta$ *rab5c*) festgestellt werden. Auch hier waren die Bewegungsmuster von Vps3 und Vps8 vergleichbar mit denen des Wildtyps, während die Signalüberlagerung Veränderungen aufwies. In der Gegenüberstellung war der Anteil der gemeinsamen Lokalisierung von Vps8 mit Vps3-Signalen nicht signifikant von 29 % auf 33 % erhöht (p-Wert 0,35), während der Anteil an Vps3-Signalen, welche mit Vps8 gemeinsam lokalisierten signifikant (p-Wert 0,000228) von 23 % auf 39 % gestiegen war.

Ergebnisse

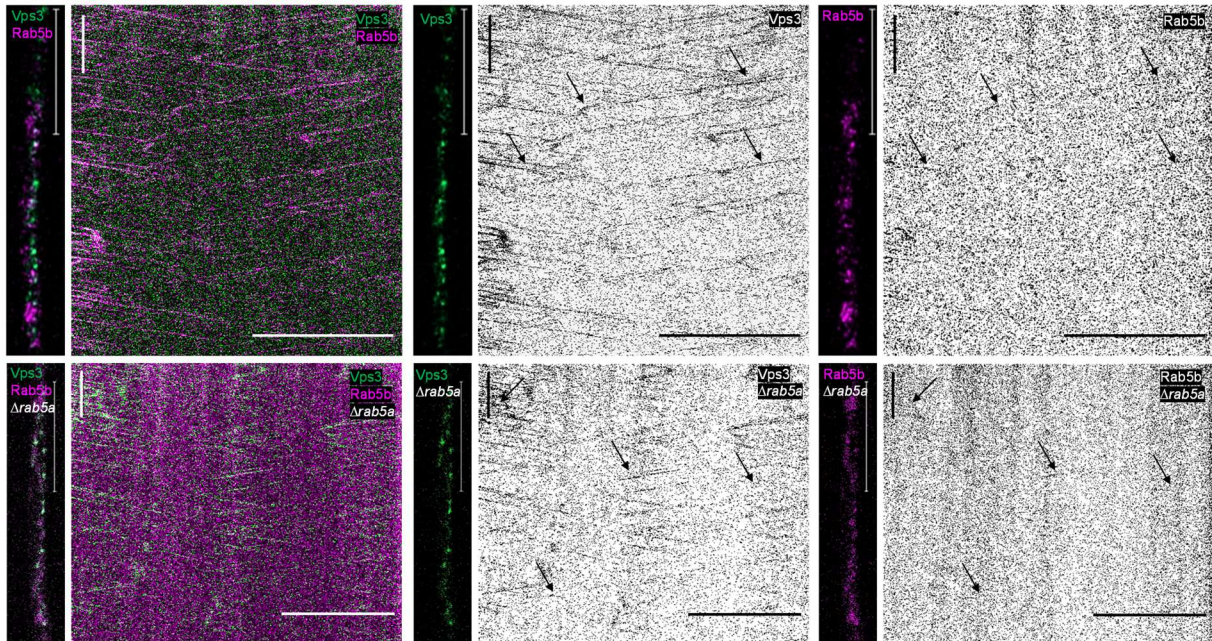


**Abb. 41: Deletionen der Rab5-GTPasen erhöhen die gemeinsame Lokalisierung von Vps3 und Vps8**

**A)** In Filamenten des Wildtyps zeigten Vps3 und Vps8 eine partielle Colokalisierung sowie ein bidirektionales Bewegungsmuster. **B)** Die Deletion von *rab5a* führte zu einer Reduktion des Transportes von Vps3 und Vps8 in Hyphenspitzen und zum Bewegungsstillstand in den übrigen Teilen der Zelle. Es wurde dennoch eine Colokalisierung beobachtet. **C)** In  $\Delta rab5b$ -Stämmen war die bidirektionale Motilität von Vps3 und Vps8 nicht beeinträchtigt und es konnten weiterhin colokalisierende Signale beider Proteine beobachtet werden. **D)** Die Deletion von *rab5c* beeinträchtigte den gemeinsamen Transport von Vps3 und Vps8 nicht und es konnten von beiden Proteinen gemeinsam lokalisierende sowie einzelne Signale detektiert werden. **E)** Quantifizierung der Colokalisierung von Vps3 und Vps8 im Wildtyp sowie in Rab5-GTPasen-Deletionsstämmen. Im Wildtyp zeigten Vps3 und Vps8 etwa 20-30 % Colokalisierung. Dabei wurde der prozentuale Anteil der Signalüberlagerung pro Gesamtsignalfäche bestimmt. Die Deletion von *rab5a* erhöhte die anteilige Überlagerung von Vps8 mit Vps3-Signalen nicht signifikant, während die Überlagerung von Vps3 mit Vps8-Signalen signifikant von 23 % auf 37 % erhöht war. Durch die Deletion von *rab5b* zeigte die Überlagerung von Vps8 mit Vps3, wie bereits für  $\Delta rab5a$  beobachtet, einen nicht signifikanten Anstieg von 29 % auf 33 %, während die anteilige Überlagerung von Vps3-Signalen mit Vps8 signifikant von 23 % auf 35 % erhöht war. Ein vergleichbares Muster konnte bei der Deletion von *rab5c* beobachtet werden. Der Anteil der gemeinsamen Lokalisierung von Vps8 mit Vps3-Signalen war nicht signifikant erhöht, während der Anteil an Vps3-Signalen, welcher mit Vps8 gemeinsam lokalisierte signifikant von 23 % auf 39 % gestiegen war. Farbwahl: Vps8 magenta, Vps3 grün, Überlagerung der Signale zeigt sich in weiß. Zellbiologische Analysen mit Mikroskop 2. Kymographen: Horizontaler Maßstab: 10  $\mu$ m, vertikaler Maßstab: 10 sek; Mikroskopaufnahmen: Maßstab 10  $\mu$ m. Signifikanz \* p-Wert<0,05 \*\* p-Wert<0,01 \*\*\* p-Wert<0,001.

Die verbleibende Motilität in den verschiedenen Deletionsstämmen der Rab5-GTPasen gab Hinweise darauf, dass der CORVET-Komplex auch in *U. maydis* in der Lage sein könnte mehrere Rab5-Homologe für die Lokalisierung an die frühen Endosomen zu nutzen. Um dieser Vermutung nachzugehen wurden die Lokalisierung und der Transport von Vps3 und Rab5b in einem  $\Delta rab5a$ -Stamm untersucht (UKS548: AB31 *vps3:gfp*, *mCherry:rab5b*,  $\Delta rab5a$ ). Ziel war es zu ermitteln, ob die CORVET-spezifische Untereinheit Vps3 auch in der Lage ist mit Rab5b-positiven Endosomen transportiert zu werden, wenn Rab5a fehlt. Wie in Abb. 42 gezeigt, war für Vps3 und Rab5b im Wildtyp (UKS414: AB31 *vps3:gfp*, *mCherry:rab5b*) ein geringer Anteil gemeinsame Lokalisierung und gemeinsamer bidirektionaler Transport zu beobachten. Aufgrund des schwachen Rab5b-Signals gestaltete sich die Analyse der Motilität in diesem Stammhintergrund jedoch schwierig. In Stämmen, in denen *rab5a* deletiert war, konnte, wie bereits für den Wildtyp festgestellt, eine geringfügige Colokalisierung analysiert werden. Wie auch schon im Wildtyp beobachtet konnte auch in  $\Delta rab5a$ -Zellen ein geringer Anteil an gemeinsamem Transport von Vps3 und Rab5b festgehalten werden. Dieser erfolgte sowohl in Richtung der Hyphenspitze als auch gegenläufig in Richtung Initialzelle.

## Ergebnisse



### Abb. 42: Vps3 lokalisiert unabhängig von Rab5a an Rab5b-positive Endosomen

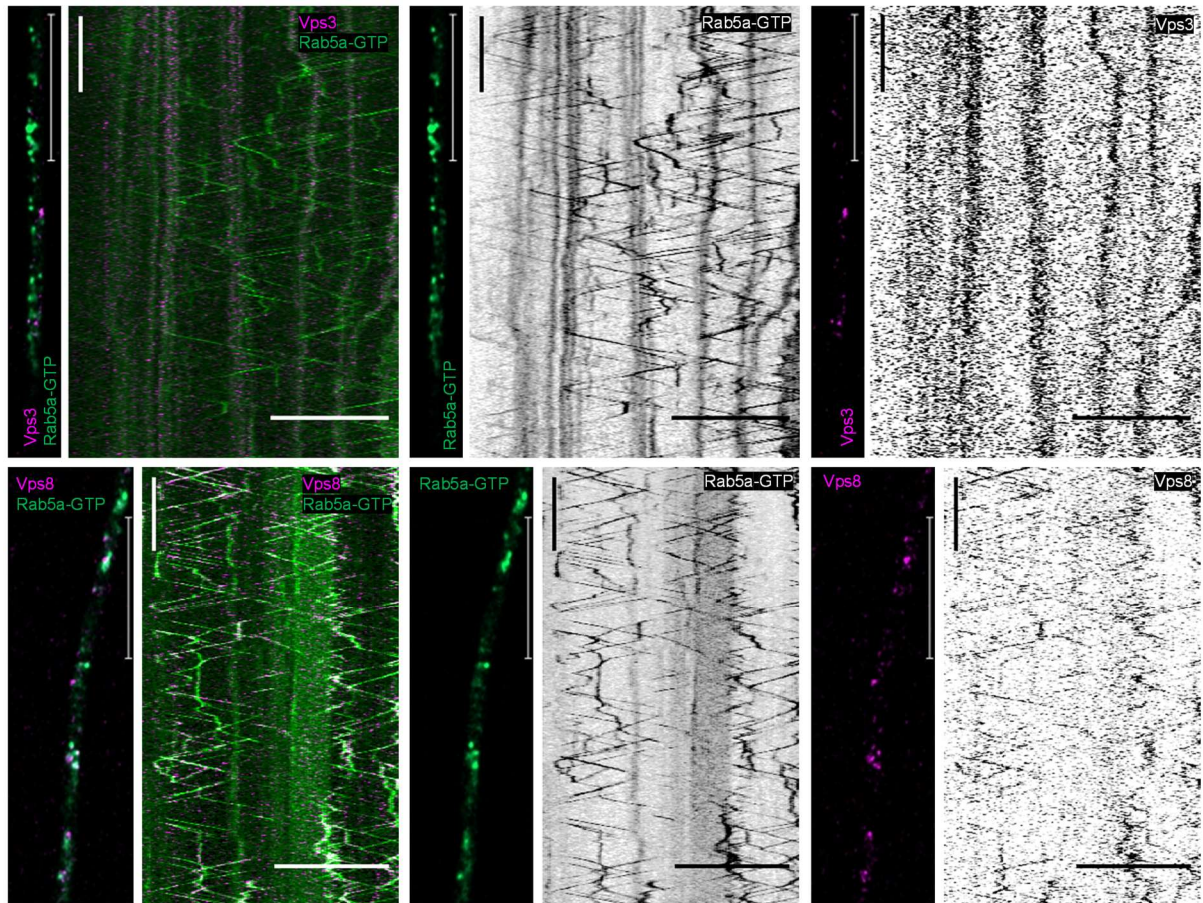
In Wildtypstämmen zeigten Vps3 und Rab5b (oben) eine partielle Colokalisierung, sowie Cotransport. Aufgrund des schwachen Rab5b-Signals wurden markante Stellen des gemeinsamen Transports hervorgehoben (Pfeil). In  $\Delta rab5a$ -Zellen konnte weiterhin eine geringfügige Colokalisierung und ein unveränderter Cotransport beobachtet werden (unten). Pfeile markieren aufgrund des schwachen Signals schwer erkennbare gemeinsame Bewegungsmuster. Farbwahl: Rab5b magenta, Vps3 grün, Überlagerung der Signale zeigt sich in weiß. Analyse durch Mikroskop 3. Kymographen: Horizontaler Maßstab: 10  $\mu\text{m}$ , vertikaler Maßstab: 10 sek; Mikroskopaufnahmen: Maßstab 10  $\mu\text{m}$ .

### 3.2.7. Eine konstitutiv aktive Mutante von Rab5a kann Vps3 nicht an die frühen Endosomen rekrutieren

Ergänzend zu den Analysen der Auswirkungen von Deletionen der Rab5-GTPasen auf den CORVET-Komplex, war auch die Beobachtung der konstitutiv aktiven Mutante von Rab5a von Interesse. Die Lokalisierung an die Endosomenmembranen erfolgt laut Literatur über die aktive Form der GTPase, welche nach ihrer Aktivierung mit Effektoren, zu denen auch der CORVET-Komplex gehört, interagieren kann. Beschreibungen der Funktion von Vps3 in *S. cerevisiae* zufolge kann Vps3 durch eine Präferenz für die inaktive Form von Rab5a eine GEF-ähnliche Funktion ausüben. Vps8 dagegen wurde in *S. cerevisiae* als Effektor für die Interaktion mit Rab5-GTP beschrieben, da im  $\Delta vps8$ -Hintergrund die Bindung von Vps3 an Vps21-GTP reduziert war (Peplowska *et al.*, 2007). Sollte Vps3 präferenziell an Rab5a-GDP binden, welches in der konstitutiv aktiven Rab5a-Mutante nicht vorhanden wäre, könnte die Lokalisierung von Vps3 an die frühen Endosomen beeinträchtigt sein. Da für Vps8 beschrieben ist, dass es die Bindung an die aktive Form der GTPase initiiert, müsste

für Vps8 eine verstärkte oder mit dem Wildtyp vergleichbare Lokalisierung an die frühen Endosomen zu beobachten sein. Um diese Fragestellung zu adressieren wurden Filamente für eine Dauer von 17 h induziert. Abb. 43 zeigt, dass Vps3 in der konstitutiv aktiven Mutante (UKS345: AB31 *gfp:rab5a<sup>Q90L</sup>*, *vps3:mKate2*) nur noch in geringem Maße auf punktuellen Strukturen lokalisierte, welche nicht mit Rab5a-GTP colokalisierten. Während Rab5a-GTP auch das für die frühen Endosomen gewohnte, bidirektionale Bewegungsmuster zeigte, konnten für Vps3 nur statische Signale oder geringfügige, langsame Bewegungen detektiert werden. Die CORVET-Untereinheit Vps8 dagegen colokalisierte überwiegend mit Rab5a-GTP (UKS327: AB31 *gfp:rab5a<sup>Q90L</sup>*, *vps8:3xmCherry*) und es wurden nur wenige einzeln vorliegende Signale detektiert. Der Transport von Vps8 erfolgte gemeinsam mit den Rab5a-GTP-positiven Endosomen bidirektional durch die Zellen.

## Ergebnisse



**Abb. 43: Die konstitutive GTP-Bindung von Rab5a verhindert die Lokalisierung von Vps3 mit den Rab5a-positiven Endosomen**

In Rab5a-GTP-Zellen lokalisierte Vps3 (oben) nur noch geringfügig auf punktuellen Strukturen, welche keine Colokalisierung mit Rab5a-GTP zeigten. Die Motilität von Vps3 war stark eingeschränkt und zeigte keinen Cotransport mit Rab5a-GTP-positiven Endosomen. Vps8 (unten) colokalisierte mit Rab5a-GTP-positiven Endosomen und zeigte gemeinsame, bidirektionale Transportprozesse. Farbwahl: Vps8/Vps3 magenta, Rab5a-GTP grün, Überlagerung der Signale zeigt sich in weiß. Analyse durch Mikroskop 2. Kymographen: Horizontaler Maßstab: 10  $\mu\text{m}$ , vertikaler Maßstab: 10 sek; Mikroskopaufnahmen: Maßstab 10  $\mu\text{m}$ .

### 3.3. Charakterisierung des Nma1-Proteins in *U. maydis*

Das Nma1-Protein wurde bei einer Hefe-Zwei-Hybrid Untersuchung als Interaktionspartner von Num1, einem Protein mit Funktion bei zellulären Transport- und Spleißprozessen, identifiziert (Kellner, 2009, Kellner *et al.*, 2014). Beobachtungen der Lokalisierung zeigten eine bidirektionale Motilität entlang der Mikrotubuli (Pinter, 2012), welche einem Transport gemeinsam mit frühen Endosomen zugrunde liegt (Schneider, 2016, Obhof, 2017). Als Nma1-Interaktionspartner konnten Komponenten des CORVET-Komplexes, einem Komplex mit wichtiger Funktion bei Endosomenfusionsprozessen, nachgewiesen werden (Pinter, 2015, Peplowska *et al.*, 2007). Diese Interaktion von Nma1 mit dem CORVET-Komplex konnte im Rahmen dieser Arbeit (Kapitel 3.1.2) bei Untersuchungen der Komplexkomposition bereits bestätigt werden (vgl. Abb. 32). Unabhängig der GTPase Rab5a wurde in einer Co-IP und anschließenden MS-Analysen Nma1 als Interaktionspartner des CORVET-Komplexes gefunden. Der Einfluss von Nma1 auf die Population der frühen Endosomen wurde in Vorarbeiten beschrieben (Schneider, 2016). Für das filamentöse Wachstum des Pflanzenpathogens *U. maydis* ist der Langstreckentransport mittels früher Endosomen von enormer Relevanz. Dadurch wird die Spitzenelongation der Hyphenzellen, die Verteilung von mRNA in der Zelle, der Signalaustausch mit dem Wirt und letztendlich die erfolgreiche Infektion ermöglicht (Penalva, 2010, Becht *et al.*, 2006, Steinberg, 2014). Aus diesem Grund ist es naheliegend, dass sich ein Mechanismus etabliert hat, mit welchem die Lebensspanne der frühen Endosomen verlängert und die Reifung zu späten Endosomen verzögert wird, um zu gewährleisten, dass eine ausreichende Menge an Vesikeln für die Transportprozesse zur Verfügung steht. Der Mechanismus, welcher der Interaktion von Nma1 mit dem CORVET-Komplex zugrunde liegt und die dadurch mögliche Einflussnahme auf die Population der frühen Endosomen wurde im nachfolgenden Kapitel genauer untersucht.

### 3.3.1. Nma1 interagiert unabhängig von Rab5a mit dem CORVET-Komplex

In Vorexperimenten wurde Nma1 über eine Co-IP und MS-Untersuchungen als Interaktionspartner des CORVET-Komplexes identifiziert (Pinter, 2015) und mittels Hefe-Zwei-Hybrid-Analysen als direkter Interaktionspartner der CORVET-spezifischen Untereinheit Vps3 ermittelt (Obhof, 2017). Wie im Rahmen dieser Arbeit (Kapitel 3.1.2) bereits beschrieben, konnte die Interaktion von Nma1 mit dem CORVET-Komplex sowohl unter Verwendung von Vps3 als auch von Vps8 als Köderprotein verifiziert werden. Diese Interaktion wurde sowohl in Stämmen mit Wildtyphintergrund als auch in  $\Delta rab5a$ -Hintergrund bestätigt und besteht somit unabhängig von Rab5a. Ergänzend zu diesen Experimenten wurde auch der Einfluss der *rab5a*-Deletion auf die Komplexzusammensetzung unter Verwendung von Nma1 als Köderprotein analysiert. Laut aktueller Literatur interagiert der Komplex mit den Komponenten Vps3 oder Vps8 über Rab5a mit den Endosomen (Peplowska *et al.*, 2007; Pawelec *et al.*, 2010). Entsprechend müssten in einer *rab5a*-Deletion die Komponenten des Komplexes zytoplasmatisch vorliegen. Mit einer Co-IP unter diesen Bedingungen soll gezeigt werden, ob Nma1 erst an den Endosomen oder bereits im Zytoplasma mit dem CORVET-Komplex in Verbindung kommt. Die Co-IP wurde mit unabhängigen Transformanden in zwei unabhängigen Experimenten durchgeführt. Um die Situation des Langstreckentransportes darzustellen, wurden die Proteine aus filamentös wachsenden Kulturen extrahiert. Nach 7 h Induktion des filamentösen Wachstums wurden die Kulturen geerntet, die Proteinextraktion, die Co-IP und anschließende MS durchgeführt. Die MS wurde am Kooperationsstandort der Universität Göttingen durchgeführt (Serviceeinheit LCMS Proteinanalytik, Georg-August-Universität Göttingen). Für die Analyse wurden Stämme mit GFP-markiertem Nma1 im Wildtyphintergrund (UNP1: AB31 *nma1:3xgfp*) und  $\Delta rab5a$  (UKS129/UKS130: AB31 *nma1:3xgfp*,  $\Delta rab5a$ ) verglichen. Die Ergebnisse der MS-Analysen sind in Abb. 44 dargestellt. Es erfolgte eine Filterung der Ergebnisse, bei denen sämtliche Peptide entfernt wurden, die in einer der Negativkontrollen nachgewiesen werden konnten. Als Negativkontrolle wurden Proteinextrakte aus AB31-Stämmen ohne markiertes Protein verwendet, identisch zu den anderen Proben mit Beads inkubiert und mittels MS analysiert. Dargestellt wurden alle Proteine, die in mindestens einer Probe mit  $\geq 5$  Peptidzählungen gefunden werden konnten. Das Köderprotein Nma1 konnte in allen Proben durch die Co-IP angereichert werden. In jeweils einer Probe

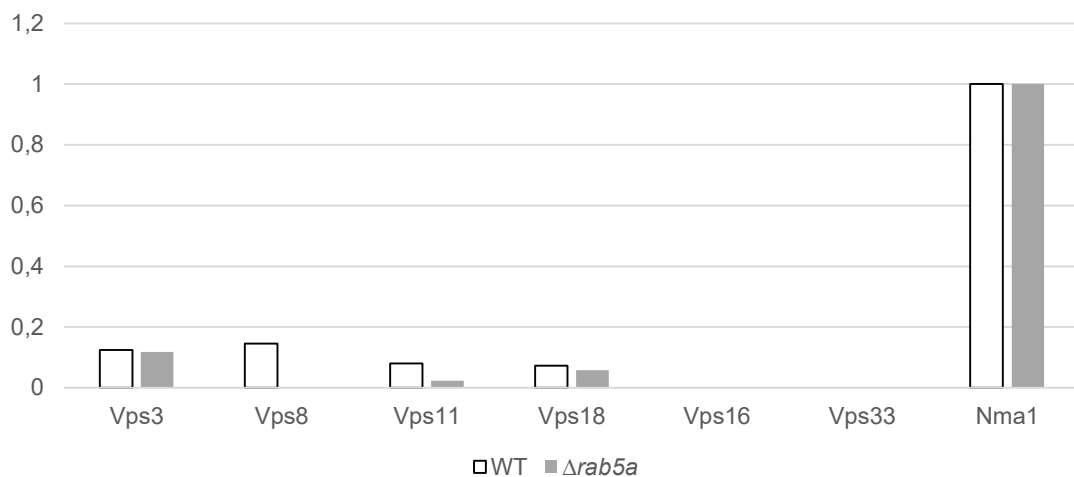


der Duplikate jeder Kondition konnten jedoch aufgrund mangelnder Probenqualität keine zusätzlichen Proteine identifiziert werden. Diese Proben wurden aus der vergleichenden Analyse ausgeschlossen. Weder im Wildtyp noch in der *Δrab5a*-Kondition konnten die Kernkomponenten Vps16 oder Vps33 identifiziert werden. Dennoch wurde im Wildtyp die CORVET-spezifische Untereinheit Vps8 gefunden. Vps3, Vps11 und Vps18 wurden unter beiden Konditionen als Bestandteile des Nma1-interagierenden Komplexes ermittelt. Diese drei CORVET-Bestandteile waren bereits in den MS-Analysen aus Vorarbeiten bekannt (Pinter, 2015).

## Ergebnisse

		Nma1-3xGfp WT		Nma1-3xGfp $\Delta rab5a$	
		UNP1	UNP1	UKS129	UKS130
Vps3	UMAG_01668	1	17	10	
Vps8	UMAG_15064		20		
Vps11	UMAG_03820		11	2	
Vps18	UMAG_05292		10	5	
Vps16	UMAG_11636				
Vps33	UMAG_10284				
Nma1	UMAG_00933	55	137	85	19

Peptidzählungen relativ zum Köderprotein Nma1



### Abb. 44: Nma1 interagiert unabhängig von Rab5a mit Bestandteilen des CORVET-Komplexes

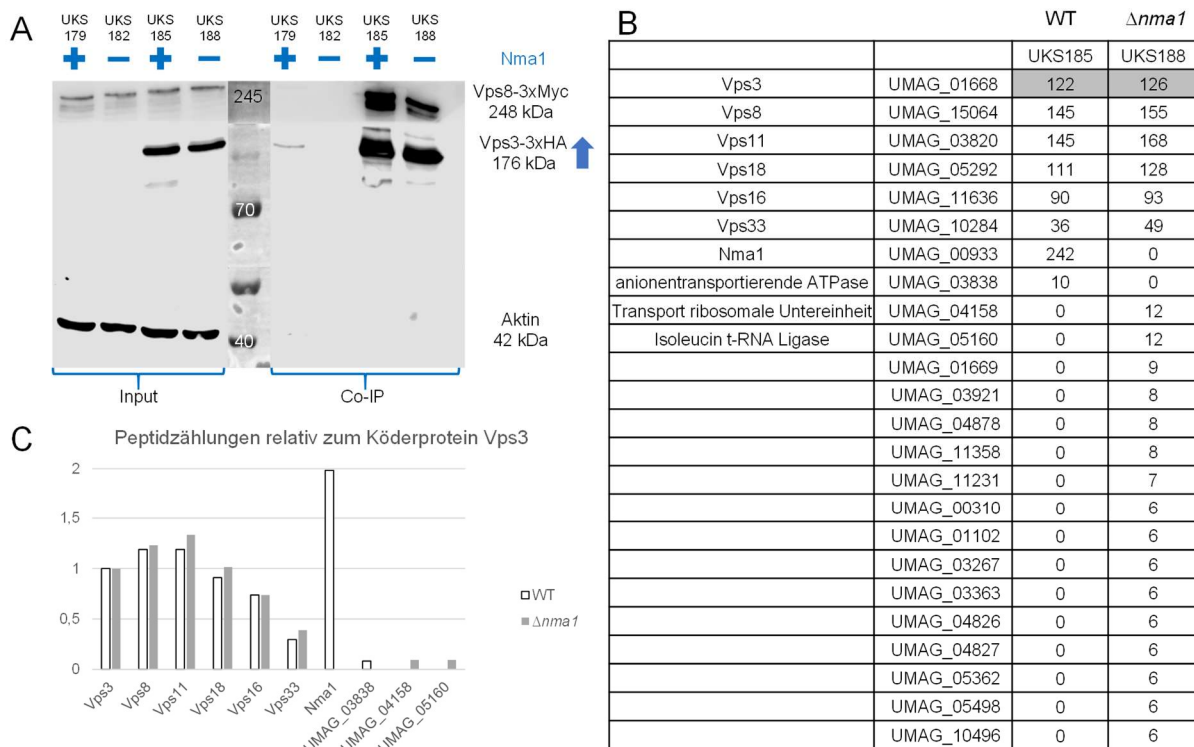
Die Induktion des filamentösen Wachstums erfolgte über 7 h. Die Proteinextrakte zweier unabhängiger Transformanten wurden in eine Co-IP mit anschließender MS in 2 unabhängig durchgeführten Experimenten eingesetzt. Auflistung der Proteine mit Peptidzählungen  $\geq 5$  Peptide in mindestens einer Probe in der Tabelle (oben). Das Köderprotein Nma1 wurde grau unterlegt. In einem der Duplikate wurde lediglich das Köderprotein Nma1 angereichert, weshalb diese aus der Darstellung der Peptidzählungen in Relation zu den Köderproteinen als Diagramm (unten) ausgeschlossen wurden. Es wurde kein Mittelwert gebildet und damit auch keine Standardabweichung ermittelt. Sowohl in Wildtypstämmen als auch in  $\Delta rab5a$  wurden Vps3, Vps11 und Vps18 als Interaktionspartner identifiziert. Vps8 konnte lediglich im Wildtyp gefunden werden, während Vps16 und Vps33 fehlten.

### 3.3.2. Nma1 hat keinen Einfluss auf die Komposition des CORVET-Komplexes

Anhand der sowohl in Vorarbeiten (Pinter, 2015, Obhof, 2017) als auch in dieser Arbeit mehrfach bestätigten Interaktion von Nma1 mit Komponenten des CORVET-Komplexes stellte sich die Frage, wie der Interaktionsmechanismus abläuft und welchem Zweck die Interaktion dient. Da der CORVET-Komplex hochkonserviert ist (Perini *et al.*, 2014, van der Kant *et al.*, 2015), jedoch keine homologen Proteine zu Nma1 außerhalb der *Ustilaginales* bioinformatisch identifiziert werden konnten (Pinter, 2012), gab es bisher keine Hinweise darauf wie Nma1 auf den CORVET-Komplex Einfluss nimmt. In Vorarbeiten wurde beobachtet, dass die *nma1*-Deletion die Population der Rab5a-positiven frühen Endosomen verminderte (Schneider, 2016). In MS-Analysen mit Nma1 als Köderprotein zeigte sich die Abwesenheit von Komplexbestandteilen (Pinter, 2015) und diese Arbeit) woraufhin untersucht wurde, ob Nma1 eine direkte Auswirkung auf die Zusammensetzung des CORVET-Komplexes ausübt. Dabei wurde zunächst eine Co-IP mit den beiden CORVET-spezifischen Untereinheiten Vps3 und Vps8 in Wildtyp- (UKS185: AB31 *vps3:3xHA*, *vps8:3xMyc*) und  $\Delta nma1$ -Hintergrund (UKS188: AB31 *vps3:3xHA*, *vps8:3xMyc*,  $\Delta nma1$ ) durchgeführt (Abb. 45A). Als Kontrolle für mögliche unspezifische Bindungen des angereicherten Proteins wurden Stämme verwendet, in denen das Köderprotein nicht mit der Markierung für die IP fusioniert war (UKS179: AB31 *vps8:3xMyc*; UKS182: AB31 *vps8:3xMyc*,  $\Delta nma1$ ). Zusätzlich wurde Aktin als Kontrolle für unspezifische Proteinbindung an die Beads detektiert. Um die Situation des Langstreckentransportes darzustellen, wurden die Proteine aus filamentösen Zellen extrahiert. Nach 7 h filamentösen Wachstums wurden die Kulturen geerntet, die Proteinextraktion, die Co-IP und anschließende Analyse mittels Western Blot durchgeführt. Unabhängig von der Anwesenheit von Nma1 konnte eine Interaktion von Vps3 und Vps8 nachgewiesen werden. Da sich Vps3 und Vps8 an den entgegengesetzten Seiten des Komplexes befinden (Balderhaar und Ungermann, 2013) (vgl. Einleitung Abb. 6) war zu erwarten, dass die Formierung von Subkomplexen in Unterschieden dieser beiden Untereinheiten deutlich würde. Es konnte durch visuelle Analyse des Western Blot kein deutlicher Unterschied in der Proteinmenge von Vps8 beobachtet werden. Die durchgeführte Co-IP wurde ebenfalls mit Proteinextrakten aus exponentiell wachsenden Sporidienkulturen durchgeführt, wobei ein vergleichbares Resultat erzielt werden konnte (Daten nicht gezeigt).

## Ergebnisse

Da diese Co-IP keinen Aufschluss über die vollständige Komplexzusammensetzung geben konnte, wurden ergänzende MS-Analysen durchgeführt (Abb. 45B + C). Alle sechs Untereinheiten des CORVET-Komplexes konnten in Wildtypzellen und in  $\Delta nma1$ -Zellen in vergleichbaren Peptidzahlen gefunden werden. Zusätzlich wurde ausschließlich im Wildtyp UMAG\_03838 gefunden und ausschließlich in  $\Delta nma1$ -Zellen UMAG\_04158 und UMAG\_05160. Im Vergleich zu den Peptidmengen der konservierten CORVET-Komplexkomponenten waren diese jedoch unterrepräsentiert. Dennoch wurden diese, lediglich unter einer der beiden Konditionen gefundenen Proteine, einer bioinformatischen Analyse unterzogen (BLAST, NCBI). Ergänzend zu den geringen Peptidzahlen deutete auch die potenzielle Funktion der Proteine (UMAG\_03838: anionentransportierende ATPase; UMAG\_04158: Transport der ribosomalen Untereinheit 40S; UMAG\_05160: Isoleucin t-RNA-Ligase) nicht auf eine Beteiligung bei endosomalen Transportprozessen hin und wurde daher als unspezifische Bindung eingestuft.



### Abb. 45: Nma1 beeinflusst die Komposition des CORVET-Komplexes nicht

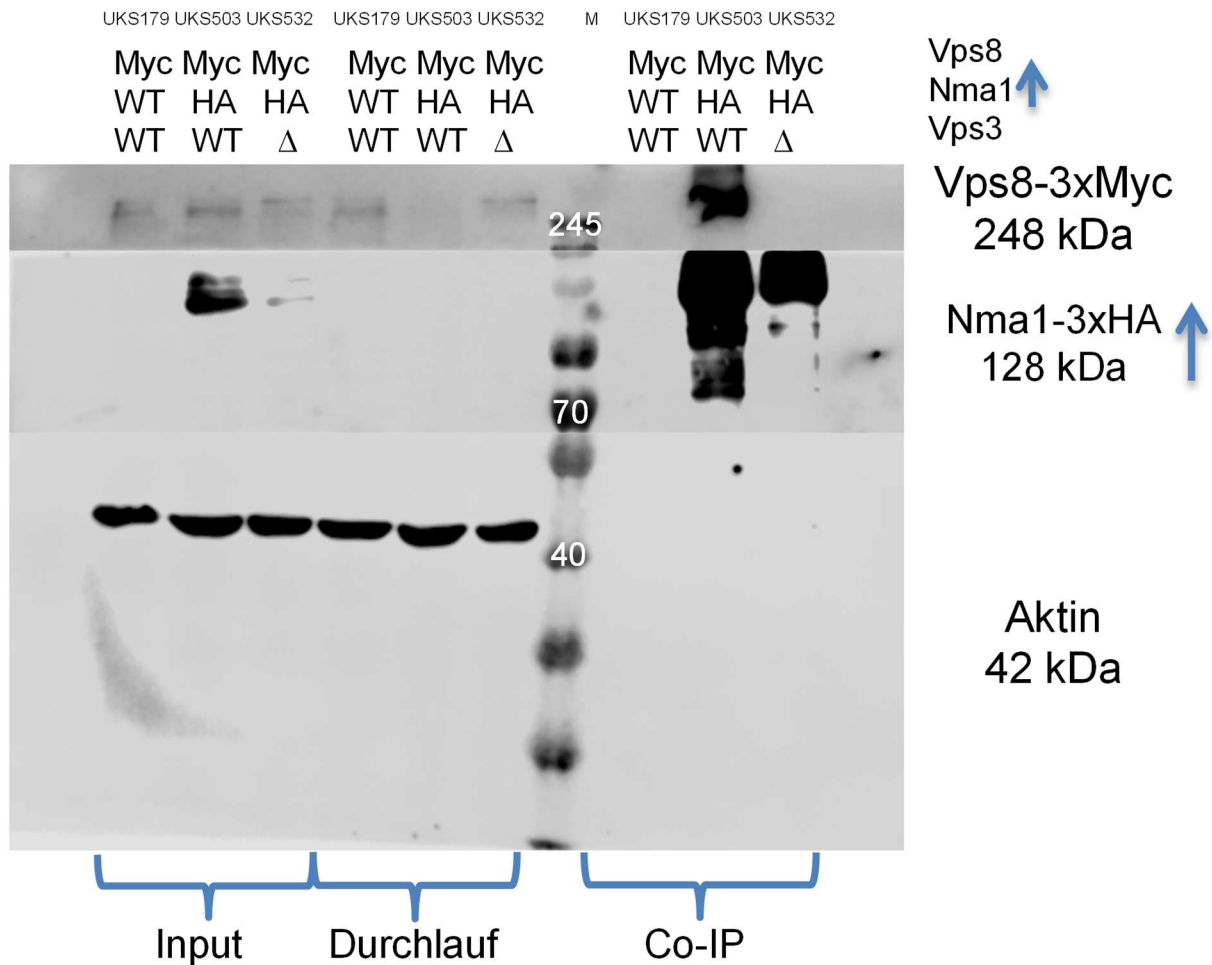
**A)** Induktion der Filamente über 7 h. Co-IP mit den CORVET-spezifischen Untereinheiten Vps3 und Vps8 im Wildtyp- und  $\Delta nma1$ -Hintergrund. Kontrolle der Spezifität der Co-IP ohne Markierung des Köderproteins. Aktin diente als Kontrolle für unspezifische Proteinbindungen. Unabhängig von der Anwesenheit von Nma1 wurde eine Interaktion von Vps3 und Vps8 detektiert, welche keine deutlichen Unterschiede in der Proteinmenge zeigte. **B)** Auflistung der Proteine mit Peptidzählungen  $\geq 6$  Peptide. Als Köder verwendetes Vps3 wurde grau unterlegt. **C)** Zur anschaulicheren Darstellung und zur Berücksichtigung der verschiedenen Co-IP-Effizienzen wurden die Peptidzählungen in Relation zu den Köderproteinen gesetzt und als Diagramm dargestellt. Sowohl in Wildtypstämmen als auch in  $\Delta nma1$  konnten alle sechs konservierten Proteine des CORVET-Komplexes in vergleichbaren Mengen identifiziert werden. Zusätzlich wurde UMAG\_03838 lediglich im Wildtyp gefunden und ausschließlich in  $\Delta nma1$ -Zellen UMAG\_04158 und UMAG\_05160.

### 3.3.3. Die Interaktion von Nma1 mit dem CORVET-Komplex ist abhängig von Vps3

Nachdem bei der in Vorarbeiten durchgeführten Co-IP mit anschließender MS-Analyse mit Nma1 als Köderprotein lediglich die CORVET-Untereinheiten Vps3, Vps11 und Vps18 gefunden werden konnten (Pinter, 2015), wurde eine direkte Interaktion dieser Komponenten mit Nma1 im artifizialen Hefe-Zwei-Hybrid-System untersucht. Dabei konnte lediglich eine direkte Interaktion mit der CORVET-spezifischen Untereinheit Vps3 nachgewiesen werden (Obhof, 2017). Da im Hefesystem *U. maydis*-spezifische Cofaktoren für eine Interaktion fehlen könnten, gerade im Hinblick auf den in *S. cerevisiae* fehlenden Langstreckentransport, oder Proteine möglicherweise anders gefaltet werden, sollte die Interaktion von Nma1 mit dem CORVET-Komplex *in vivo* in

## Ergebnisse

*U. maydis*-Zellen genauer analysiert werden. Für die durchgeführte Untersuchung wurden Nma1 und das am entgegengesetzten Ende des Komplexes vermutete Vps8 mit einer Markierung versehen. Es wurde zunächst ergänzend zu den Co-IP/MS-Experimenten in Kapitel 3.3.1 ermittelt, ob Vps8 in der Wildtypsituation gemeinsam mit Nma1 präzipitiert werden kann. Außerdem wurde der Einfluss von Vps3 auf diese Interaktion analysiert und beobachtet, ob sich das Interaktionsverhalten durch eine Deletion von *vps3* ändert. Um diese Fragestellung beantworten zu können, wurden Co-IPs mit Proteinen aus 7 h filamentös gewachsenen Kulturen durchgeführt. Als Kontrolle für unspezifische Proteinbindungen in der Co-IP wurde ebenfalls ein Stamm analysiert, in welchem nur Vps8 und nicht das Köderprotein Nma1 mit der für den Nachweis verwendeten Markierung fusioniert war (UKS179: AB31 *vps8:3xMyc*). Zusätzlich wurde Aktin als Kontrolle für unspezifische Proteinbindung an den verwendeten Beads detektiert. In der Co-IP konnte gezeigt werden, dass Nma1 in der Wildtypsituation gemeinsam mit Vps8 im Komplex vorlag (UKS503: AB31 *nma1:3xHA, vps8:3xMyc*). Fehlte dagegen Vps3 konnte Vps8 nicht mehr gemeinsam mit Nma1 präzipitiert werden (UKS532: AB31 *nma1:3xHA, vps8:3xMyc, Δvps3*). In Abb. 46 ist ein repräsentativer Western Blot der Co-IP dargestellt. Dasselbe Ergebnis konnte in zwei zusätzlichen, unabhängigen Experimenten nachgewiesen werden (vgl. Abb. 32). Bei der durchgeführten Co-IP mit anschließender MS-Analyse mit Vps8 als Köderprotein konnte eine Interaktion mit Nma1 im Wildtyp verifiziert werden, welche in  $\Delta vps3$ -Zellen nicht mehr stattfinden konnte.



**Abb. 46: Die Interaktion von Nma1 mit dem CORVET-Komplex ist abhängig von Vps3**

Die Proteinextrakte für die Co-IP-Analyse wurden aus 7 h filamentös gewachsenen Kulturen isoliert. Als Kontrolle für unspezifische Proteinbindungen an den eingesetzten Beads wurde ein Stamm verwendet, in welchem nur Vps8 und nicht das Köderprotein Nma1 mit der für die Präzipitation verwendeten Markierung fusioniert war. Zusätzlich wurde Aktin als Kontrolle für eine unspezifische Proteinbindung detektiert. Nma1 war in der Wildtypsituation in der Lage mit Vps8 zu interagieren. In  $\Delta vps3$ -Stämmen konnte Vps8 nicht mehr gemeinsam mit Nma1 präzipitiert werden.

3.3.4. Nma1 beeinflusst die Population der frühen Endosomen

Wie in dieser Arbeit und in Vorarbeiten (Pinter, 2015, Obhof, 2017) bereits beschrieben, interagiert Nma1 mit dem CORVET-Komplex. Die Funktion dieser Interaktion ist bisher jedoch ungeklärt. Die komplexspezifischen Untereinheiten des CORVET-Komplexes, zu denen auch Vps3, der direkte Interaktionspartner von Nma1, zählt (Obhof, 2017), sind für die korrekte Lokalisierung des Komplexes an den Endosomenmembranen zuständig und vermitteln die Funktionalität. Vps3 und Vps8 können dazu an Vps21, dem Hefe-Homolog zu Rab5a, binden, überbrücken damit die Donor- und die Akzeptormembran zweier Vesikel und vermitteln die Fusion der frühen

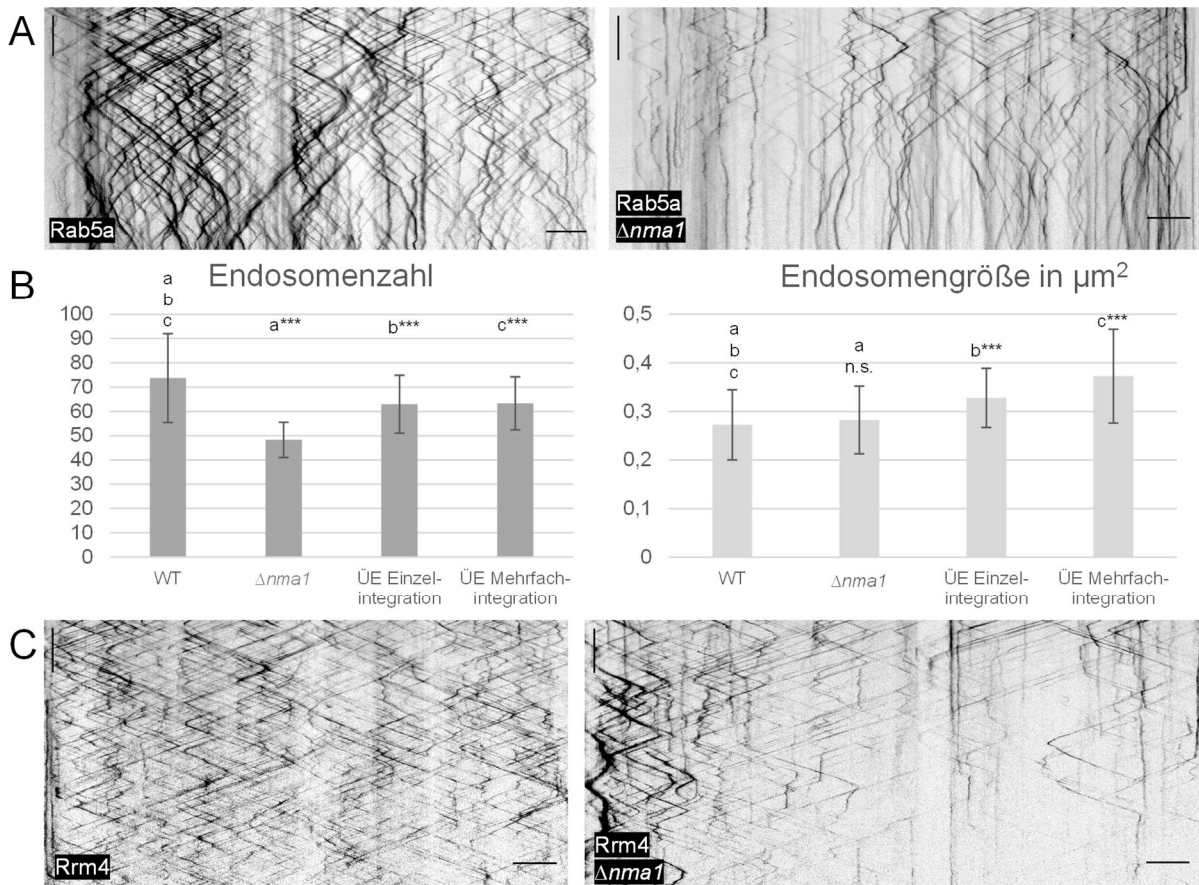
## Ergebnisse

Endosomen (Plemel *et al.*, 2011, Ungermann und Kümmel, 2019). Aufgrund dieser Vorkenntnisse wurde der Einfluss von Nma1 auf diesen wichtigen Interaktionspartner des CORVET-Komplexes untersucht. Wie bereits in Vorarbeiten gezeigt, konnte eine Reduktion der Anzahl an motilen frühen Endosomen, markiert durch das überexprimierte Fusionsprotein von Rab5a, in *nma1*-Deletionsstämmen beobachtet werden (Schneider, 2016). Um auszuschließen, dass dieser Effekt dem artifiziellen Expressionslevel geschuldet war, wurde die Quantifizierung der Endosomen mit Stämmen wiederholt, bei denen das Rab5a-Fusions-Gen unter dem nativen *rab5a*-Promotor exprimiert wird. Wie in Abb. 47A veranschaulicht, führte die Deletion von *nma1* (UKS138/UKS139/UKS140: AB31 *gfp:rab5a*,  $\Delta nma1$ ) auch bei nativer Proteinmenge von Rab5a zu einem verminderten Rab5a-Bewegungsverhalten in Kymographen im Vergleich mit dem Wildtyp (UKS91/UKS92/UKS93: AB31 *gfp:rab5a*). Diese Beobachtungen wurden weiterführend mit je drei unabhängigen Transformanden quantifiziert (Abb. 47B). Zusätzlich wurde in einem Versuchsansatz durch Überexpression von Nma1 unter dem stark konstitutiv aktiven  $P_{hxt1}$  in drei unabhängigen Transformanden analysiert, ob eine erhöhte Menge an Nma1-Protein den gegenteiligen Effekt der Deletion hervorruft (Einfachintegration: UKS541/UKS542/UKS543: AB31 *gfp:rab5a*,  $P_{hxt1}:nma1$ , Mehrfachintegration: UKS497/UKS544/UKS545: AB31 *gfp:rab5a*, ( $P_{hxt1}:nma1$ )-*n*). Durch die Integration des konstitutiv aktiven *hxt1*-Promotors zusätzlich zu der nativen Expression des *nma1*-Gens in Locus wurde ein erhöhtes Expressionslevel erzeugt. Dabei wurde jeweils durch das Computerprogramm ImageJ die Endosomenanzahl der Rab5a-markierten frühen Endosomen pro Zelle quantifiziert (siehe Material und Methoden Kapitel 5.2.14). In Wildtypzellen (N=50) wurden durchschnittlich  $74 \pm 18$  Endosomen pro Zelle vorgefunden. Die Anzahl der Rab5a-markierten frühen Endosomen war in  $\Delta nma1$ -Zellen (N=48) signifikant auf  $48 \pm 7$  Endosomen pro Zelle reduziert (p-Wert  $1,92 \cdot 10^{-13}$ ). Sowohl die Einfachintegration als auch die Mehrfachintegration des Überexpressionskonstruktes von Nma1 reduzierte die Endosomenanzahl signifikant auf  $63 \pm 11$  (Einfachintegration N=50: p-Wert 0,0007; Mehrfachintegration N=46: p-Wert 0,0009). Die Transformation des Überexpressionskonstruktes erfolgte jeweils in Stämme, die nach wie vor das native Nma1 enthielten. Zusätzlich zu der Bestimmung der Endosomenanzahl erfolgte in denselben Zellen auch eine Messung der durchschnittlichen Vesikelgröße. In Wildtypstämmen war die Fläche der Rab5a-markierten frühen Endosomen



durchschnittlich  $0,27 \pm 0,07 \mu\text{m}^2$  groß. Durch die Deletion von *nma1* erfolgte eine nicht signifikante Vergrößerung der Endosomen auf durchschnittlich  $0,28 \pm 0,069 \mu\text{m}^2$  (p-Wert 0,484). Zellen mit der Einzelintegration von  $P_{hxt1}:Nma1$  enthielten dagegen signifikant vergrößerte Endosomen im Vergleich mit dem Wildtyp von  $0,33 \pm 0,06 \mu\text{m}^2$  (p-Wert  $6,13 \cdot 10^{-5}$ ). Die Mehrfachintegration von  $P_{hxt1}:Nma1$  steigerte die durchschnittliche Endosomengröße ebenfalls signifikant im Unterschied zum Wildtyp auf  $0,37 \pm 0,096 \mu\text{m}^2$  (p-Wert  $1,2 \cdot 10^{-7}$ ). Neben den Auswirkungen auf die Rab5a-positiven Endosomen wurde auch ein weiterer Endosomenmarker für die Analyse hinzugezogen. Das RNA-Bindeprotein Rrm4 wird gemeinsam mit Rab5a-positiven, Yup1-positiven oder FM4-64-angefärbten Endosomen transportiert (Becht *et al.*, 2006, Higuchi *et al.*, 2014). Wie in Abb. 47C gezeigt, reduzierte die Deletion von *nma1* auch die in Kymographen veranschaulichten Bewegungsmuster von Rrm4-positiven Endosomen. Da dieser Effekt durch die Colokalisierung und den Cotransport von Rab5a und Rrm4 vermutlich auf eine Beeinflussung von Rab5a durch Nma1 zurückzuführen ist, sollte die Auswirkung der *nma1*-Deletion auf die verschiedenen Endosomenpopulationen weiter untersucht werden.

## Ergebnisse



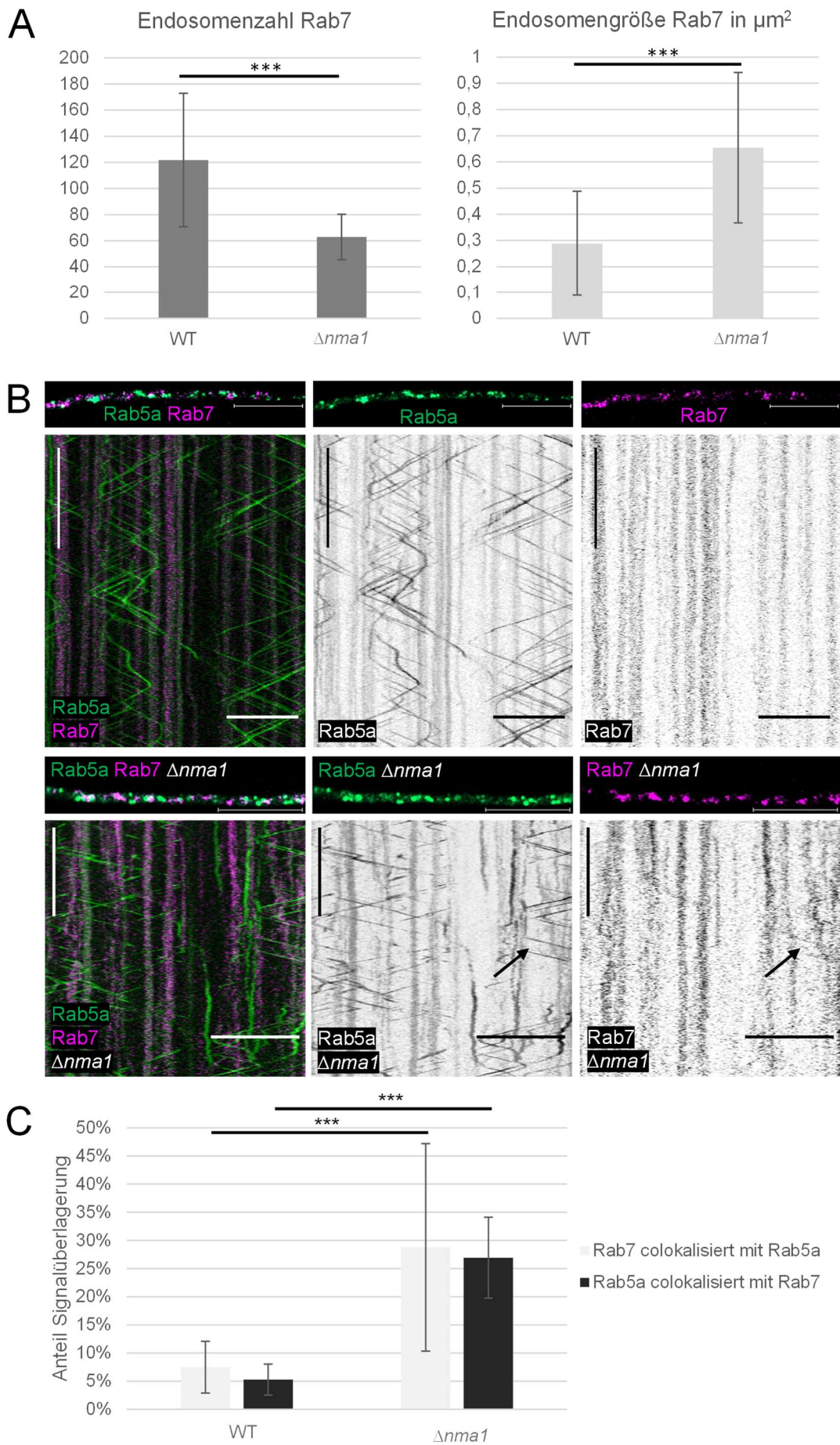
**Abb. 47: Nma1 beeinflusst die Anzahl an Rab5a-positiven Endosomen**

**A)** Durch die Deletion von *nma1* (rechts) entstand ein reduziertes Rab5a-Bewegungsmuster in Kymographen im Vergleich mit dem Wildtyp (links). **B)** Quantifizierung der Anzahl Rab5a-positiver Endosomen pro Zelle (links). Wildtypzellen enthielten durchschnittlich etwa 70 Endosomen pro Zelle. Die Anzahl der frühen Endosomen war in  $\Delta nma1$ -Zellen signifikant auf etwa 48 Endosomen pro Zelle reduziert (p-Wert  $1,92 \cdot 10^{-13}$ ). Sowohl eine Einfachintegration als auch eine Mehrfachintegration des Überexpressionskonstruktes  $P_{hxt1}:Nma1$  in den Wildtyphintergrund reduzierte die Endosomenanzahl signifikant auf circa 63 Endosomen pro Zelle (Einfachintegration: p-Wert 0,0007; Mehrfachintegration: p-Wert 0,0009). Messung der durchschnittlichen Vesikelgröße in denselben Zellen (rechts). In Wildtypstämmen waren die Rab5a-markierten frühen Endosomen von einer durchschnittlichen Größe von  $0,27 \mu\text{m}^2$ . Die Deletion von *nma1* führte zu einer nicht signifikanten Vergrößerung der Endosomen auf durchschnittlich  $0,28 \mu\text{m}^2$  (p-Wert 0,484). Zellen mit der Einzelintegration von  $P_{hxt1}:Nma1$  enthielten dagegen signifikant vergrößerte Endosomen mit etwa  $0,33 \mu\text{m}^2$  (p-Wert  $6,13 \cdot 10^{-5}$ ). Die Mehrfachintegration von  $P_{hxt1}:Nma1$  steigerte die durchschnittliche Endosomengröße ebenfalls signifikant im Unterschied mit dem Wildtyp auf  $0,37 \mu\text{m}^2$  (p-Wert  $1,2 \cdot 10^{-7}$ ). **C)** Das RNA-Bindeprotein Rrm4 wurde als zusätzlicher Endosomenmarker verwendet. Die Deletion von *nma1* reduzierte auch die in Kymographen veranschaulichten Bewegungsmuster von Rrm4-positiven Endosomen. Induktion der Filamente über 17 h, Analyse durch Mikroskop 1. Horizontaler Maßstab:  $10 \mu\text{m}$ , vertikaler Maßstab: 10 sek. Signifikanz \* p-Wert < 0,05 \*\* p-Wert < 0,01 \*\*\* p-Wert < 0,001.

Um zu untersuchen, ob die beobachtete Reduktion der Anzahl an frühen Endosomen auf eine erhöhte Fusionsrate oder Reifung zurückzuführen ist, wurde der Einfluss der *nma1*-Deletion auf die Populationen an frühen und späten Endosomen und die Endosomenquantität und -größe der Rab7-positiven, späten Endosomen, ausgewertet (Abb. 48). Analog wie für Rab5a-Endosomen beschrieben erfolgte die Bestimmung der

Endosomenparameter durch die Software ImageJ im Wildtyp-Hintergrund (UKS258: AB31 *gfp:rab5a, mCherry:rab7*) und in  $\Delta nma1$ -Zellen (UKS372: AB31 *gfp:rab5b, mCherry:rab7, \Delta nma1*). Die Anzahl von Rab7-positiven Endosomen konnte im Wildtyp auf durchschnittlich  $121,7 \pm 51$  Endosomen pro Zelle (N=20) bestimmt werden (vgl. Abb. 14). Durch die Deletion von *nma1* wurde die Anzahl der späten Endosomen signifikant auf etwa  $62,8 \pm 17,4$  Endosomen pro Zelle reduziert (N=45, p-Wert  $3,6 \cdot 10^{-5}$ ). Gleichzeitig konnte in  $\Delta nma1$ -Stämmen eine Zunahme der durchschnittlichen Endosomengröße beobachtet werden. Im Vergleich zu Wildtypzellen, bei denen die Endosomengröße auf  $0,289 \pm 0,2 \mu\text{m}^2$  bestimmt werden konnte (vgl. Abb. 14), zeigte sich durch die Deletion von *nma1* ein signifikanter Größenanstieg auf  $0,65 \pm 0,29 \mu\text{m}^2$  (p-Wert  $1,74 \cdot 10^{-7}$ ). Um die beobachteten Auswirkungen der *nma1*-Deletion auf die frühen und späten Endosomen einordnen zu können wurde die Lokalisierung von Rab5a und Rab7 in Wildtypstämmen (UKS258: AB31 *gfp:rab5a, mCherry:rab7*) mit  $\Delta nma1$ -Stämmen (UKS372: AB31 *gfp:rab5a, mCherry:rab7, \Delta nma1*) verglichen. In Wildtypzellen wurde überwiegend eine sich ausschließende Lokalisierung der beiden Markerproteine beobachtet. Durch die *nma1*-Deletion wurden auch vereinzelte Colokalisierungen beobachtet, der Großteil der Signale lag jedoch weiterhin einzeln vor. Die Quantifizierung der Signalüberlagerung von Rab5a- und Rab7-Signalen bestätigte diesen Eindruck. Für die Quantifizierung wurde die gesamte detektierte Signalfläche beider Signale korreliert und der Anteil an Überlappung bestimmt. Dabei konnte gezeigt werden, dass durch die *nma1*-Deletion der Anteil an Rab7-Signalen, welcher sich an gleicher Stelle wie Rab5a-Signale befand, von 7 % im Wildtyp (N=20) signifikant auf 29 % in den Deletionsstämmen (N=40) anstieg (p-Wert  $1,12 \cdot 10^{-8}$ ). Eine ähnliche Tendenz konnte für die Rab5a-Signale, welche mit Rab7-Signalen überlappten, bestätigt werden. Durch die Deletion von *nma1* stieg die Colokalisierung von 5 % im Wildtyp auf 27 % signifikant an (p-Wert  $2,38 \cdot 10^{-23}$ ). Vergleichende Analysen der Bewegungsmuster zeigten, dass im Wildtyp keine gemeinsamen Transportvorgänge von Rab5a- und Rab7-positiven Endosomen stattfanden, während in  $\Delta nma1$ -Zellen vereinzelt auch gemeinsame Motilität beobachtet werden konnte. Sowohl in Wildtyp- als auch in Deletionsstämmen konnten für Rab5a bidirektionale Bewegungsmuster nachgewiesen werden, wohingegen und Rab7 überwiegend als statisches Signal detektiert wurde.

# Ergebnisse



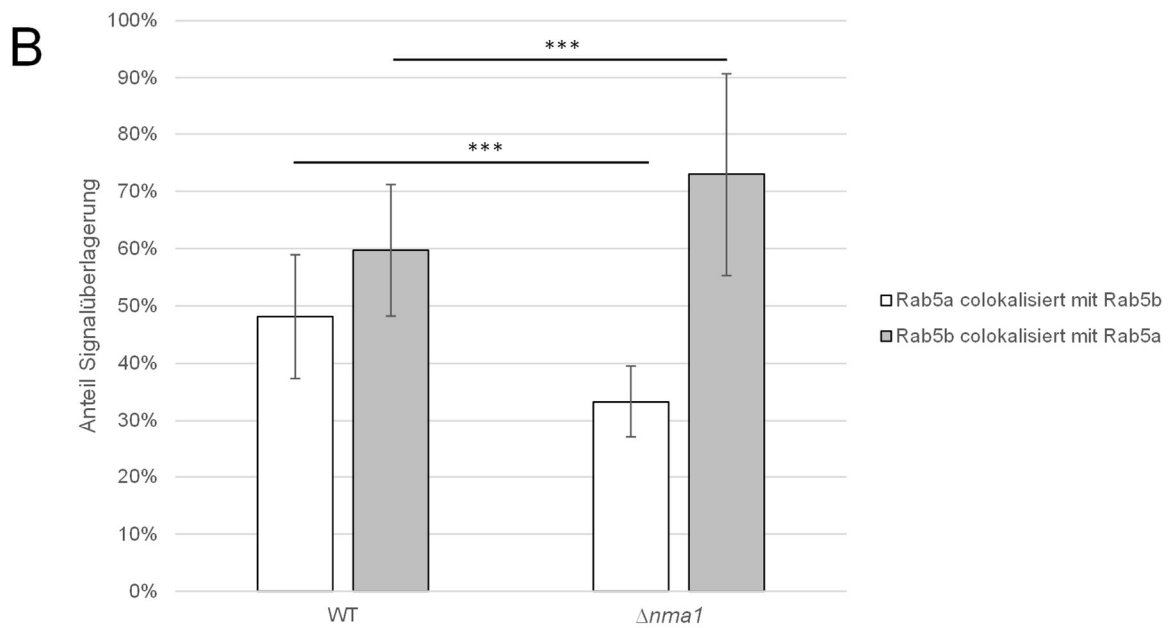
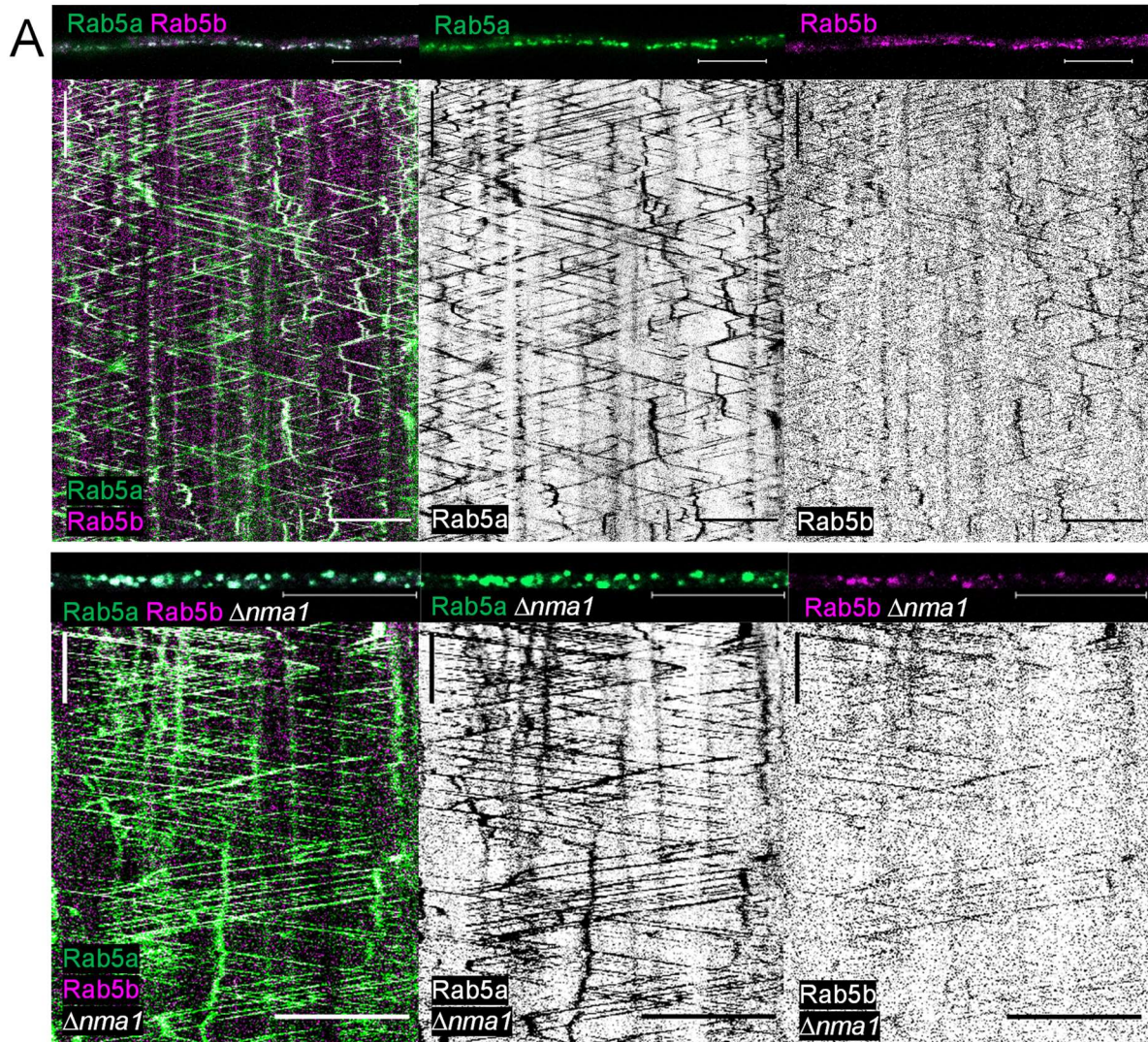
**Abb. 48: Die Deletion von *nma1* führt zu einer Durchmischung der Populationen an frühen und späten Endosomen**

**A)** Bestimmung der Endosomenquantität (links) und Endosomengröße (rechts) durch die Software ImageJ. Die Anzahl von Rab7-positiven Endosomen war in  $\Delta nma1$ -Stämmen im Vergleich mit dem Wildtyp signifikant um etwa 50 % reduziert. Parallel dazu wurde in  $\Delta nma1$ -Stämmen eine Vergrößerung der Endosomen festgestellt. Im Vergleich zu Wildtypzellen, bei denen die Endosomengröße auf  $0,289 \mu\text{m}^2$  gemessen werden konnte, zeigte sich durch die Deletion von *nma1* ein signifikanter Größenanstieg auf  $0,65 \mu\text{m}^2$ . Die Werte für den Wildtyp wurden ebenfalls als Vergleich in Abb. 14 herangezogen. **B)** In Wildtypstämmen (oben) konnte keine Colokalisierung von Rab5a und Rab7 beobachtet werden. Lediglich Rab5a zeigte ein bidirektionales Bewegungsmuster, für Rab7 wurden statische Signale detektiert. Durch die Deletion von *nma1* (unten) wurde ein geringfügiger Anteil an Colokalisierung zwischen Rab5a und Rab7 festgestellt. Außerdem konnten wenige gemeinsame Transportprozesse (Pfeil) beobachtet werden. Weiterhin zeigte Rab5a jedoch die gewohnte bidirektionale Motilität, während Rab7 überwiegend statisch war. **C)** Quantifizierung der Überlagerung von Rab7- und Rab5a-Signalen durch Korrelation der gesamten detektierten Signalfäche beider Signale. Dabei konnte gezeigt werden, dass die *nma1*-Deletion zu einem signifikanten Anstieg des Anteils an Rab7-Signalen, welcher sich an gleicher Stelle wie Rab5a-Signale befand, von 7 % im Wildtyp auf 29 % in den Deletionsstämmen führte (p-Wert  $1,12 \cdot 10^{-8}$ ). Eine ähnliche Tendenz konnte für Rab5a-Signale, welche mit Rab7-Signalen überlappten, beobachtet werden. Durch die Deletion von *nma1* stieg die Colokalisierung von 5 % im Wildtyp auf 27 % signifikant an (p-Wert  $2,38 \cdot 10^{-23}$ ). Farbwahl: Rab7 magenta, Rab5a grün, Überlagerung der Signale zeigt sich in weiß. Analyse durch Mikroskop 2. Horizontaler Maßstab: 10  $\mu\text{m}$ , vertikaler Maßstab: 10 sek. Signifikanz \* p-Wert $<0,05$  \*\* p-Wert $<0,01$  \*\*\* p-Wert $<0,001$ .

Für die weiterführenden Untersuchungen der Auswirkungen der *nma1*-Deletion auf die verschiedenen Populationen der frühen Endosomen wurde die Colokalisierung etablierter Endosomenmarker in Wildtypstämmen und in  $\Delta nma1$ -Stämmen verglichen. Nachdem bereits gezeigt werden konnte, dass die Deletion von *nma1* einen Einfluss auf die Rab5a-positiven Endosomen hatte, wurden zunächst die Colokalisierung von Rab5a und Rab5b und die Auswirkung einer *nma1*-Deletion auf diese beiden Endosomenpopulationen untersucht. Wie in Abb. 49 dargestellt, hatte die Deletion von *nma1* keinen Einfluss auf den gemeinsamen Transport von Rab5a- und Rab5b-positiven Endosomen. Sowohl in Wildtypzellen (UKS273: AB31 *gfp:rab5a*, *mCherry:rab5b*) als auch im  $\Delta nma1$ -Hintergrund (UKS365: AB31 *gfp:rab5a*, *mCherry:rab5b*,  $\Delta nma1$ ) zeigten Rab5a und Rab5b gemeinsame bidirektionale Bewegungsmuster. Die Colokalisierung der beiden Signale wurde mit Hilfe des Computerprogrammes ImageJ ausgewertet (vgl. Material und Methoden Kapitel 5.2.15). Das Programm bestimmt dabei die Gesamtfläche beider Signale pro Zelle und ermittelt in Relation dazu den prozentualen Anteil der Flächen, auf denen beide Signale sich überlagern. Bei Unterschieden in der Signalintensität kann es dabei vorkommen, dass beide Proteine auf einem Organell lokalisieren, das Protein mit dem stärkeren Signal jedoch eine größere Fläche einnimmt als das mit der geringeren Intensität. Dabei überlappt das Protein mit dem schwächeren Signal an dieser Stelle vollständig, das mit dem stärkeren Signal dagegen nur partiell. Im Wildtyp (N=40) war

## Ergebnisse

eine Signalüberlagerung von Rab5a- und Rab5b-Signalen von 50-60 % zu beobachten. Die Werte für den Wildtyp wurden ebenfalls für den Vergleich mit der *rab5c*-Deletion in Abb. 23 (Kapitel 3.1.5) herangezogen. In  $\Delta nma1$ -Stämmen (N=40) konnte eine Verlagerung der Signalkorrelation beobachtet werden. Rab5a-Signale, welche mit Rab5b-Signalen colokalisierten, waren von 48 % auf 33 % signifikant reduziert (p-Wert  $1,55 \cdot 10^{-10}$ ). Im Gegensatz dazu stieg der Anteil an Rab5b-Signalen, welcher eine Überlagerung mit Rab5a-Signalen zeigte, signifikant von 60 % im Wildtyp auf 73 % in der *nma1*-Deletion (p-Wert 0,00016).



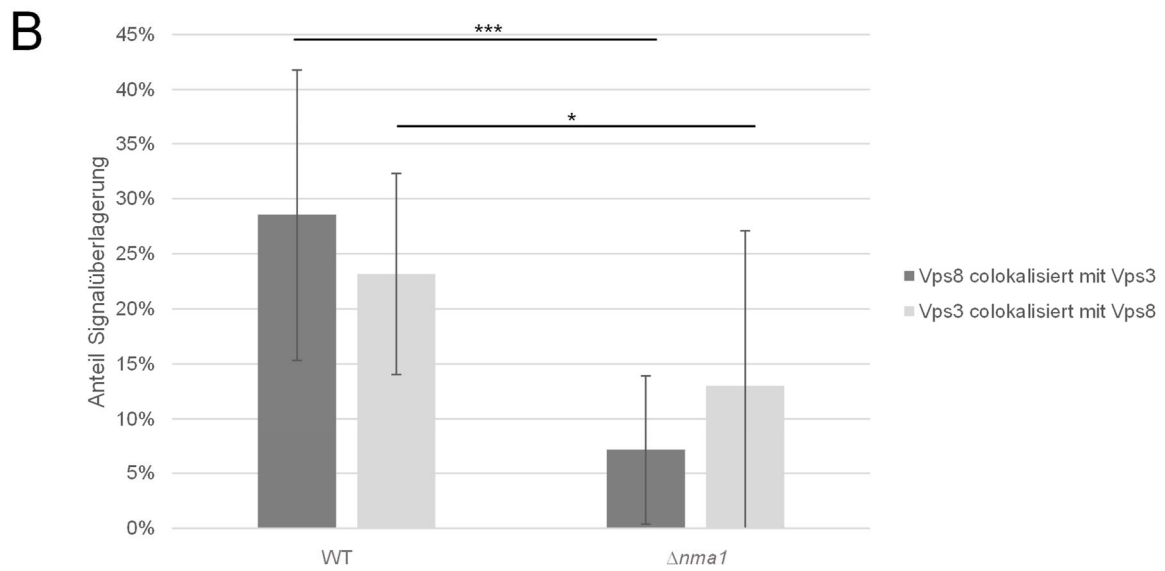
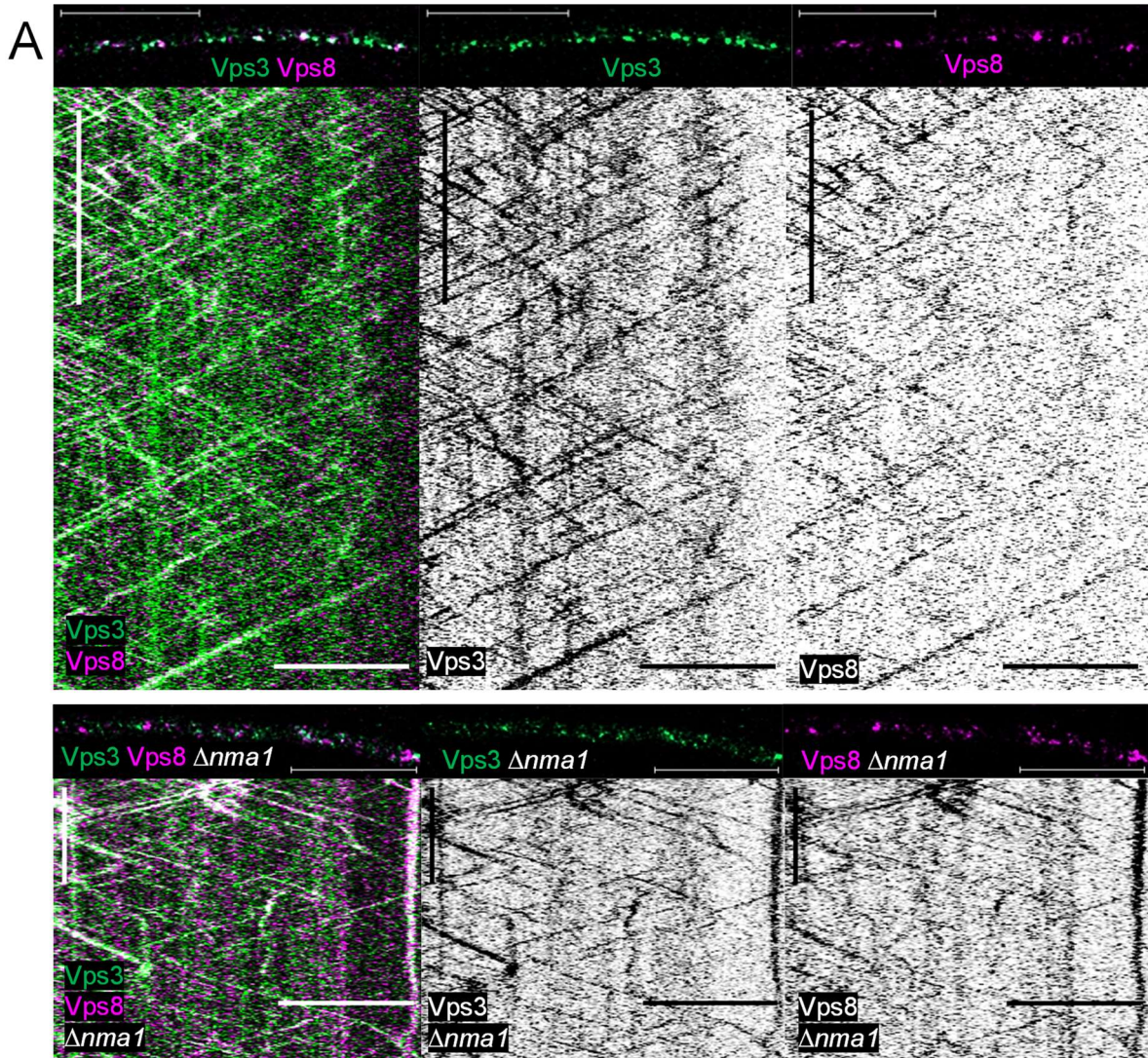
## Ergebnisse

### **Abb. 49: Nma1 beeinflusst die Colokalisierung der GTPasen der frühen Endosomen**

**A)** Die Deletion von *nma1* beeinflusste nicht den gemeinsamen Transport von Rab5a- und Rab5b-positiven Endosomen. Deletionsstämmen zeigten ein mit dem Wildtyp vergleichbares bidirektionales Bewegungsmuster. **B)** Für die Analyse der Colokalisierung wurde die Überlagerung der Signale auf die gesamte Signalfäche bezogen quantifiziert und korreliert. In Wildtypzellen konnte eine Signalüberlagerung von Rab5a- und Rab5b-Signalen von etwa 50-60 % beobachtet werden. Die Werte für den Wildtyp wurden ebenfalls für einen Vergleich mit der *rab5c*-Deletion in Abb. 23 (Kapitel 3.1.5) herangezogen. In  $\Delta nma1$ -Stämmen konnte eine Verschiebung der Anteile an Signalkorrelation beobachtet werden. Rab5a-Signale, welche mit Rab5b-Signalen überlappten, waren von 48 % im Wildtyp auf 33 % in  $\Delta nma1$  signifikant reduziert (p-Wert  $1,55 \cdot 10^{-10}$ ). Im Gegensatz dazu stieg der Anteil an Rab5b-Signalen, welcher gemeinsam mit Rab5a-Signalen lokalisierte, signifikant von 60 % auf 73 % (p-Wert 0,00016). Farbwahl: Rab5b magenta, Rab5a grün, Überlagerung der Signale zeigt sich in weiß. Analyse durch Mikroskop 2. Horizontaler Maßstab: 10  $\mu\text{m}$ , vertikaler Maßstab: 10 sek. Signifikanz \* p-Wert < 0,05 \*\* p-Wert < 0,01 \*\*\* p-Wert < 0,001.

Für die Analyse der Auswirkungen von *nma1*-Deletionen auf den direkten Interaktionspartner CORVET wurden die beiden spezifischen Untereinheiten Vps3 und Vps8 als Marker herangezogen. Wie bereits gezeigt werden konnte, interagiert Nma1 über eine direkte Interaktion mit Vps3 mit dem CORVET-Komplex (Pinter, 2015, Obhof, 2017 und diese Arbeit). Abb. 50 veranschaulicht, dass auch im *nma1*-Deletionshintergrund Vps3 und Vps8 weiterhin gemeinsam transportiert werden. Sowohl in Wildtypstämmen (UKS236: AB31 *vps3:gfp*, *vps8:3xmCherry*) als auch in  $\Delta nma1$ -Stämmen (UKS375: AB31 *vps3:gfp*, *vps8:3xmCherry*,  $\Delta nma1$ ) konnten bidirektionale Transportprozesse beider CORVET-Untereinheiten beobachtet werden. Zusätzlich gab es jedoch auch einige Lokalisierungen auf statischen Strukturen. Quantifizierungen der Colokalisierung zeigten, dass durch die Deletion von *nma1* eine Reduktion der gemeinsamen Lokalisierung der CORVET-spezifischen Untereinheiten hervorgerufen wurde. Die Quantifizierung bezog sich dabei auf die gesamte Fläche des jeweils gemessenen Signals und verrechnete die Signalüberlagerung. Im Wildtyp (N=10) konnte eine Überlappung von 29 % der Vps8-Signalen mit Vps3 nachgewiesen werden, während Vps3-Signale nur zu 23 % mit Vps8 gemeinsam lokalisierten. Durch die Deletion von *nma1* (N=32) reduzierte sich der Anteil an Vps8-Signalen, welcher mit Vps3 colokalisierte, signifikant auf 7 % (p-Wert 0,0005). Die Überlappung von Vps3-Signalen mit Vps8-Signalen reduzierte sich signifikant auf 13 % (p-Wert 0,0137).



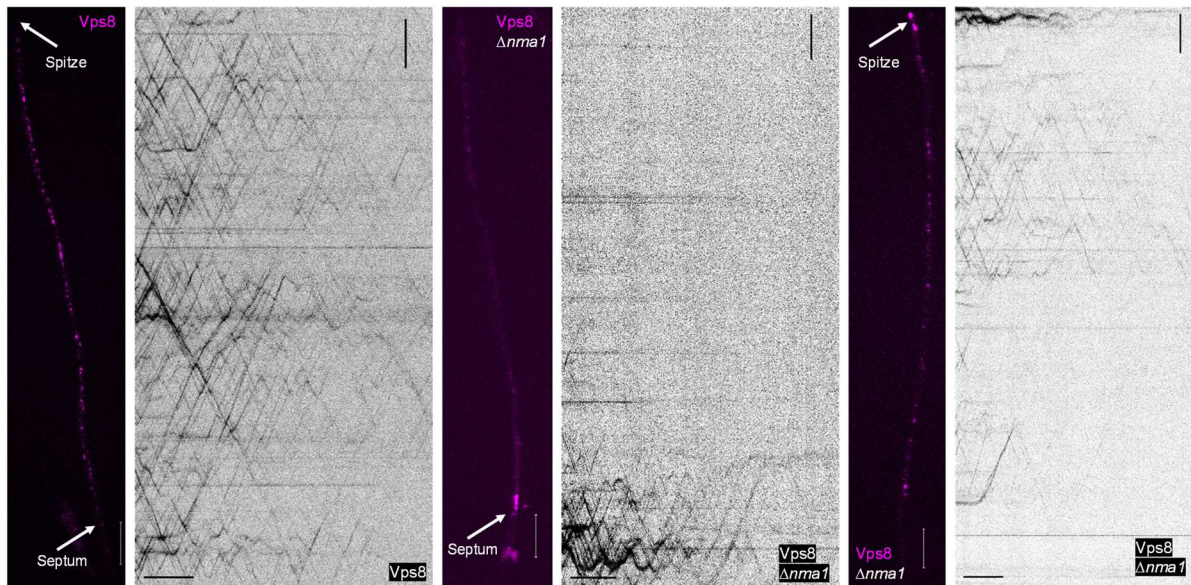


## Ergebnisse

### **Abb. 50: Nma1 beeinflusst die Colokalisierung der CORVET-spezifischen Untereinheiten**

**A)** Die Deletion von *nma1* beeinflusste den gemeinsamen Transport von Vps3 und Vps8 nicht. Deletionsstämme (unten) zeigten ein mit dem Wildtyp (oben) vergleichbares bidirektionales Bewegungsmuster. Zusätzlich gab es jedoch statische Signalansammlungen. **B)** Für die Analyse der Colokalisierung wurde die Überlagerung der Signale auf die gesamte Signalfäche bezogen quantifiziert und korreliert. In Wildtypzellen konnte eine Signalüberlagerung von Vps3- und Vps8-Signalen von etwa 25 % beobachtet werden. In  $\Delta nma1$ -Stämmen konnte eine Reduktion der Anteile an Signalkorrelation beobachtet werden. Vps8-Signale, welche mit Vps3-Signalen überlappten, waren von 28 % im Wildtyp auf 7 % in  $\Delta nma1$  signifikant reduziert (p-Wert 0,0005). Der Anteil an Vps3-Signalen, welcher gemeinsam mit Vps8-Signalen lokalisierte, reduzierte sich signifikant von 23 % auf 13 % (p-Wert 0,0137). Farbwahl: Vps8 magenta, Vps3 grün, Überlagerung der Signale zeigt sich in weiß. Analyse mit Mikroskop 2. Horizontaler Maßstab: 10  $\mu\text{m}$ , vertikaler Maßstab: 10 sek. Signifikanz \* p-Wert<0,05 \*\* p-Wert<0,01 \*\*\* p-Wert<0,001.

Neben der veränderten Colokalisierung der CORVET-spezifischen Untereinheiten Vps3 und Vps8 konnte eine Beeinträchtigung des Langstreckentransportes von Vps8 durch die *nma1*-Deletion beobachtet werden. Wie in Abb. 51 veranschaulicht, zeigte Vps8 in Wildtypstämmen (UKS218: AB31 *vps8:3xmCherry*) den gewohnten bidirektionalen Langstreckentransport durch die gesamte filamentöse Zelle mit gleichmäßiger Verteilung. Die Deletion von *nma1* (UKS221: AB31 *vps8:3xmCherry*,  $\Delta nma1$ ) führte zu Ansammlungen des Vps8-Signals in der Hyphenspitze oder am Septum, welches die Initialzelle von der wachsenden filamentösen Zelle abtrennt. An diesen Punkten konnten weiterhin bidirektionale Bewegungsmuster detektiert werden, die sich jedoch auf die unmittelbare Umgebung beschränkten und nicht wie im Wildtyp die gesamte Zelle durchliefen. Diese Beeinträchtigungen des Langstreckentransports von Vps8 mit den gezeigten Signalansammlungen wurden in  $\Delta nma1$ -Zellen in verschieden ausgeprägten Stadien beobachtet. Die Variation lag zwischen einer allgemeinen Reduktion des Signals und der Motilität oder der Anhäufung an den beschriebenen Punkten. Für Vps3 konnte eine solche Beeinträchtigung durch die *nma1*-Deletion nicht gezeigt werden (Daten nicht gezeigt).



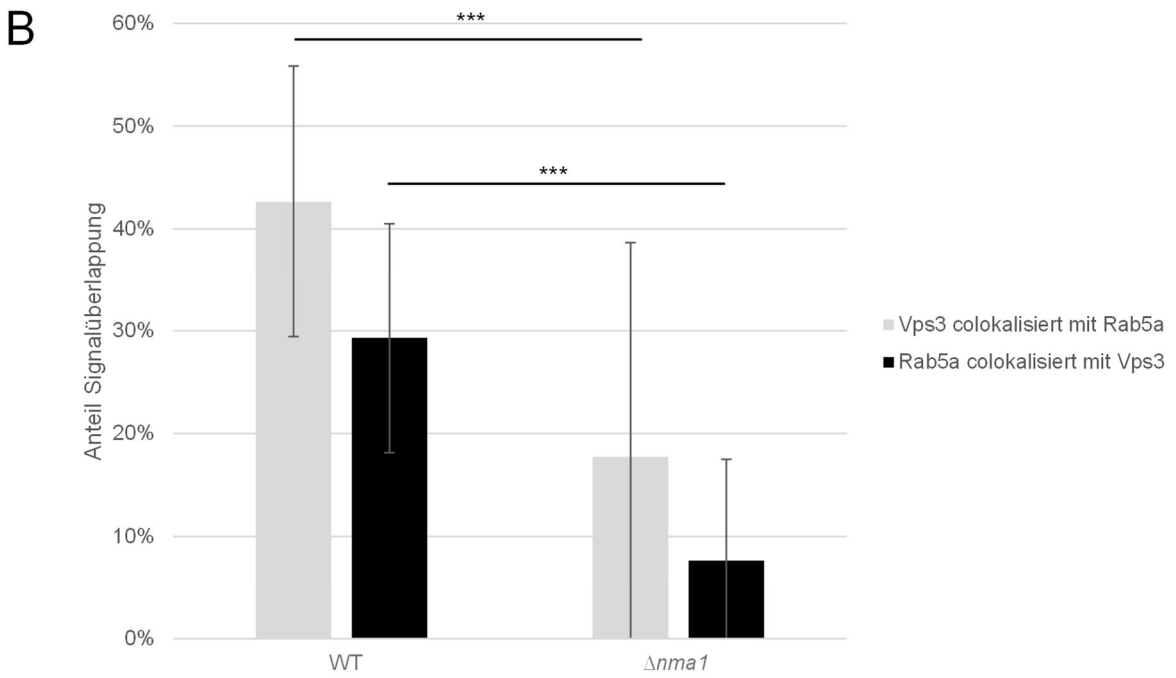
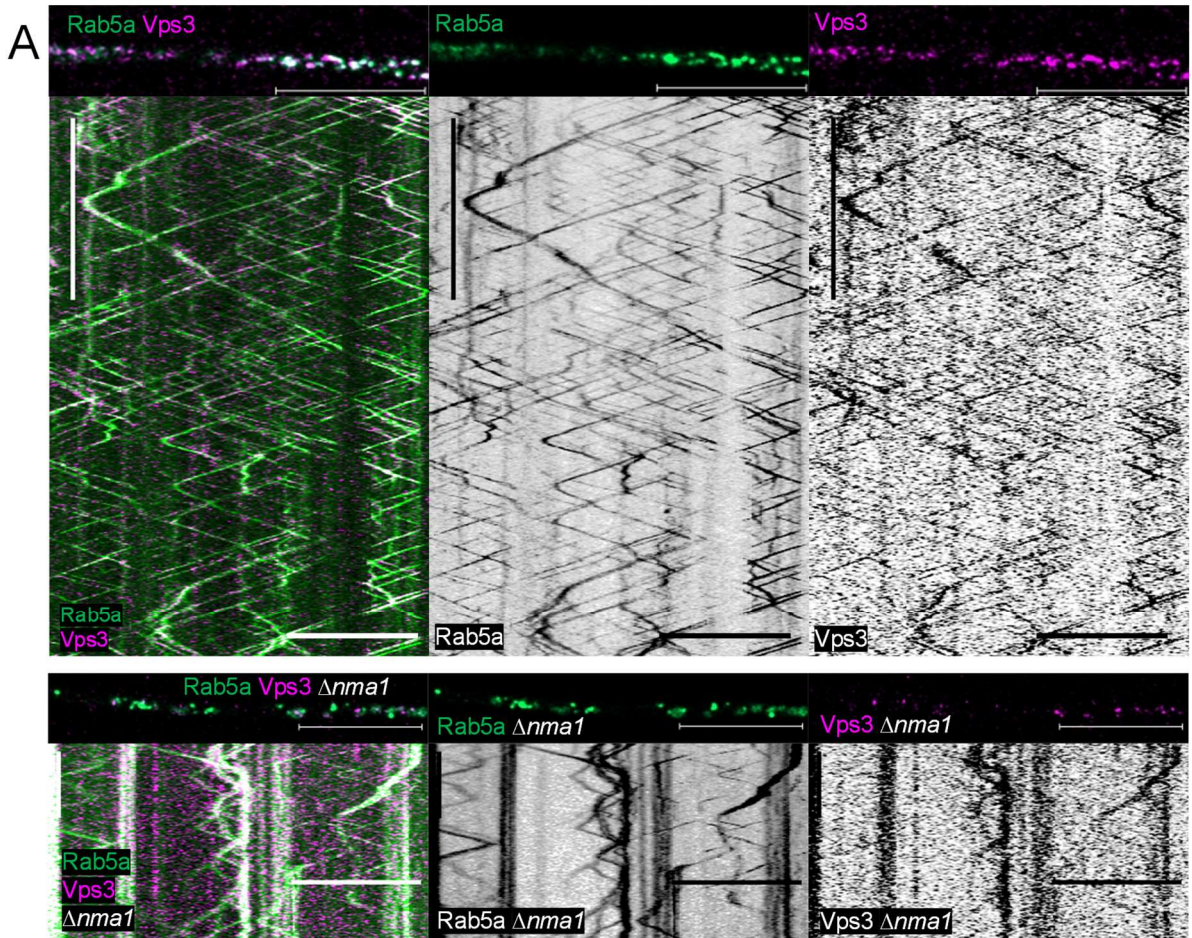
**Abb. 51: Nma1 beeinflusst den Langstreckentransport von Vps8**

Die Deletion von *nma1* (Mitte und rechts) beeinflusste den Langstreckentransport von Vps8 im Vergleich mit dem Wildtyp (links). Im Wildtyp wurde ein bidirektionales Transportverhalten über die gesamte Länge der Zellen mit einer gleichmäßigen Signalverteilung beobachtet. Durch die Deletion von *nma1* sammelte sich das Signal an den Enden der Zellen und war dort weiterhin bidirektional motil. Der Kymograph wurde ab dem eingezeichneten Septum nach der Initialzelle begonnen, da der Bereich der Initialzelle bereits kein Zytoplasma mehr enthielt. Analyse durch Mikroskop 1. Horizontaler Maßstab: 10 sek, vertikaler Maßstab: 10  $\mu$ m.

Um auszuwerten, ob die beobachteten Auswirkungen der *nma1*-Deletion auf die Rab5-GTPasen oder die CORVET-spezifischen Untereinheiten auf eine Nma1-abhängige Bindung des CORVET-Komplexes an die Rab5-GTPasen an den frühen Endosomen zurückzuführen sind, wurden Kollaborierungen von Rab5a mit Vps3 und Vps8 in Wildtyp- und  $\Delta nma1$ -Stämmen verglichen. Rab5a und Vps3 zeigten im Wildtyp (UKS342: AB31 *vps3:mKate2*, *gfp:rab5a*) sowohl kollaborierende als auch einzeln vorkommende Signale beider Proteine (Abb. 52A). Durch die Deletion von *nma1* (UKS368: AB31 *vps3:mKate2*, *gfp:rab5a*,  $\Delta nma1$ ) traten die Signale häufiger einzeln auf und zeigten weniger gemeinsame Lokalisierung. Die Quantifizierung der Signalüberlappung (Abb. 52B) bestätigte diese Beobachtung. Dabei wurde die gesamte Fläche der gemessenen Fluoreszenzsignale miteinander korreliert (vgl. Material und Methoden Kapitel 5.2.15). Vps3-Signale, welche im Wildtyp (N=25) zu 43 % mit den Signalen von Rab5a gemeinsam lokalisierten, zeigten in  $\Delta nma1$ -Stämmen eine signifikante Reduktion der Kollaborierung auf 18 % (p-Wert  $5,43 \cdot 10^{-7}$ ). Die Flächenüberlagerung von Rab5a-Signalen mit Vps3-Signalen war durch die Deletion von *nma1* (N=35) von 30 % im Wildtyp auf 8 % signifikant vermindert (p-Wert  $5,13 \cdot 10^{-10}$ ). Beobachtungen der gemeinsamen Transportprozesse

## Ergebnisse

von Vps3 mit Rab5a-positiven Endosomen zeigten in Wildtypstämmen das bekannte bidirektionale Bewegungsmuster. In *nma1*-Deletionsstämmen konnte für beide Proteine weiterhin gemeinsame bidirektionale Motilität detektiert werden, jedoch zusätzlich auch eine vermehrte gemeinsame Lokalisierung auf größeren, statischen Signalakkumulationen.

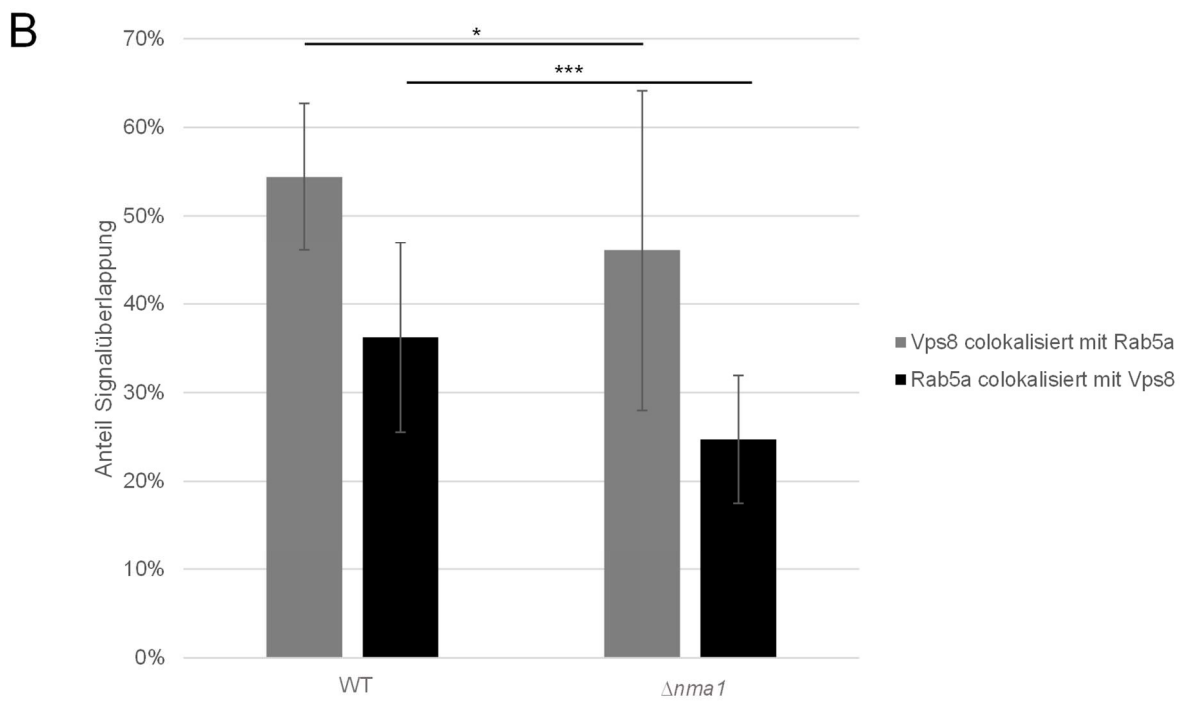
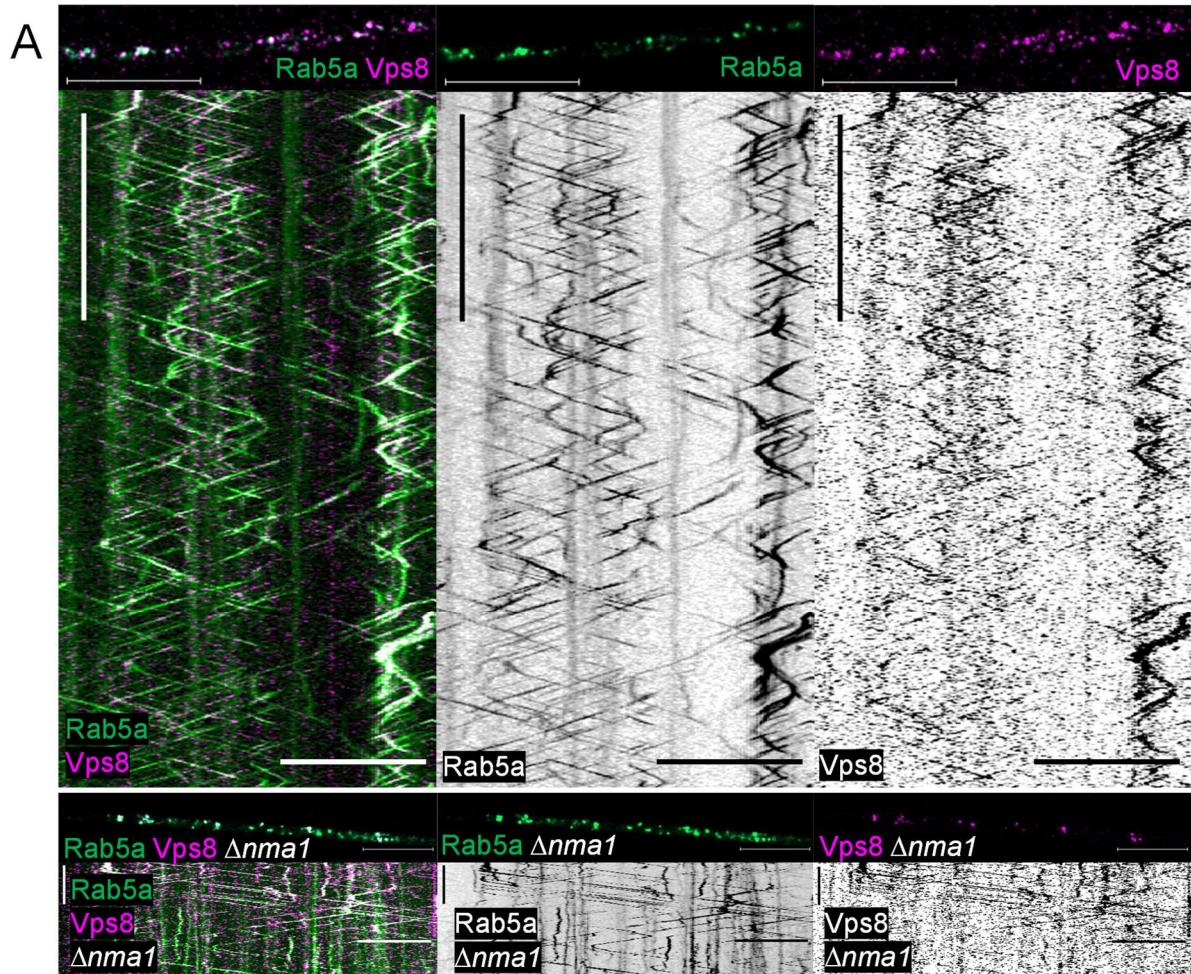


## Ergebnisse

### **Abb. 52: Nma1 stabilisiert die Lokalisierung von Vps3 mit Rab5a-positiven Endosomen**

**A)** In *nma1*-Deletionsstämmen (unten) wurde Vps3 weiterhin wie im Wildtyp (oben) mit Rab5a-positiven Endosomen transportiert. Es konnten jedoch ebenfalls Ansammlungen statischer Signale beobachtet werden. **B)** Korrelationen der gesamten Fläche der gemessenen Signale zeigten, dass Vps3-Signale, welche im Wildtyp zu 43 % mit den Signalen von Rab5a gemeinsam lokalisierten, in  $\Delta nma1$ -Stämmen auf 18 % signifikant reduziert waren (p-Wert  $5,43 \cdot 10^{-7}$ ). Die Überlagerung von Rab5a-Signalen mit Vps3-Signalen war durch die Deletion von *nma1* von 30 % im Wildtyp auf 8 % signifikant geringer (p-Wert  $5,13 \cdot 10^{-10}$ ). Farbwahl: Vps3 magenta, Rab5a grün, Überlagerung der Signale zeigt sich in weiß. Analyse durch Mikroskop 2. Horizontaler Maßstab: 10  $\mu\text{m}$ , vertikaler Maßstab: 10 sek. Signifikanz \* p-Wert<0,05 \*\* p-Wert<0,01 \*\*\* p-Wert<0,001.

Analog zu den Experimenten zur Beobachtung der Colokalisierung von Rab5a und Vps3 wurde auch der Einfluss der *nma1*-Deletion auf die Colokalisierung von Vps8 und Rab5a durchgeführt. Im Vergleich des Wildtyps (UKS233: AB31 *vps8:3xmCherry, gfp:rab5a*) mit der *nma1*-Deletion (UKS369: AB31 *vps8:3xmCherry, gfp:rab5a, \Delta nma1*) konnte in beiden Fällen sowohl einzelne Signale von Vps8 und Rab5a als auch gemeinsam lokalisierende Signale detektiert werden (Abb. 53). Es wurde ebenfalls ein durch die Deletion unbeeinträchtigter gemeinsamer Transport der beiden Proteine sowohl in Richtung der Hyphenspitze als auch in Richtung der Initialzelle beobachtet. Analysen der Colokalisierung, bei denen die gesamte Signalfläche miteinbezogen wurde, zeigten eine minimale Reduktion der Colokalisierung beider Signale durch die Deletion von *nma1*. Die Überlappung der Vps8-Signalfläche mit Rab5a war in Deletionsstämmen (N=35) im Vergleich mit dem Wildtyp (N=20) von 54 % auf 46 % signifikant reduziert (p-Wert 0,0235). Das Rab5a-Signal, welches an gleicher Stelle wie Vps8 auftrat, war von 36 % im Wildtyp signifikant auf 25 % in  $\Delta nma1$  reduziert (p-Wert 0,00018).



## Ergebnisse

### **Abb. 53: Die Deletion von *nma1* zeigt nur minimale Auswirkungen auf die Colokalisierung von Vps8 mit Rab5a-positiven Endosomen**

**A)** In *nma1*-Deletionsstämmen (unten) wurde Vps8 weiterhin wie im Wildtyp (oben) mit Rab5a-positiven Endosomen bidirektional transportiert. **B)** Der Vergleich der Lokalisierung der Proteinsignale auf die gesamte Signalfäche bezogen zeigte, dass Vps8-Signale, welche im Wildtyp zu 54 % mit Rab5a colokalisierten, in *nma1*-Deletionsstämmen signifikant auf 46 % reduziert war (p-Wert 0,0235). Das Rab5a-Signal, welches gemeinsam mit Vps8 auftrat, war von 36 % im Wildtyp signifikant auf 25 % in  $\Delta nma1$  verringert (p-Wert 0,00018). Farbwahl: Vps8 magenta, Rab5a grün, Überlagerung der Signale zeigt sich in weiß. Analyse durch Mikroskop 2. Horizontaler Maßstab: 10  $\mu\text{m}$ , vertikaler Maßstab: 10 sek. Signifikanz \* p-Wert<0,05 \*\* p-Wert<0,01 \*\*\* p-Wert<0,001.

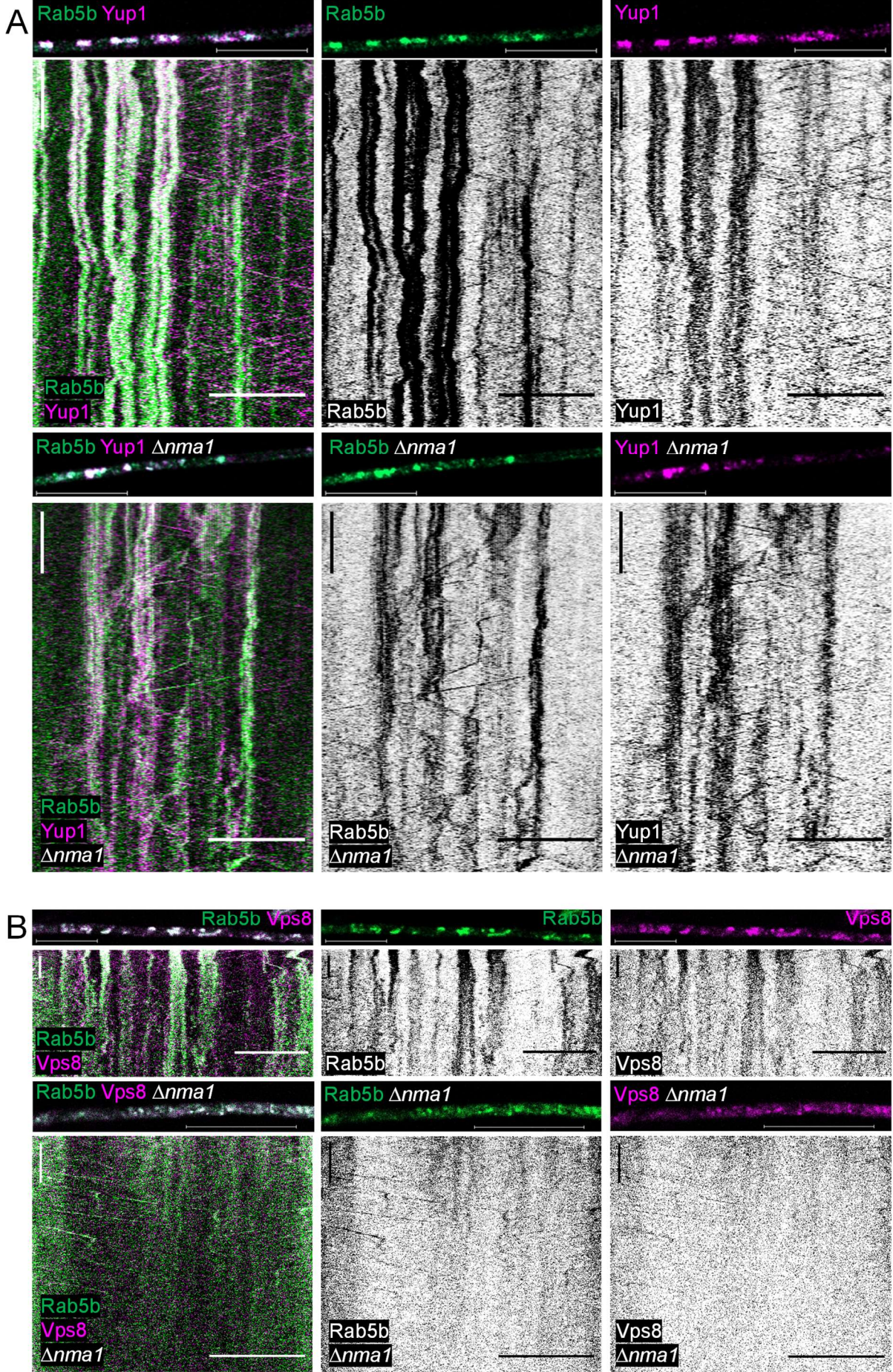
Neben den Rab5a-positiven Endosomen, welche bekanntermaßen mit dem CORVET-Komplex interagieren (Plemel *et al.*, 2011), wurde auch der Einfluss von Nma1 auf Rab5b-positive Endosomen untersucht. Da in Abb. 49 bereits gezeigt werden konnte, dass die Deletion von *nma1* Auswirkungen auf die Colokalisierung der beiden Rab5-GTPasen Rab5a und Rab5b hatte, wurde für weiterführende Untersuchungen der nicht direkt mit den GTPasen verbundene t-SNARE Endosomenmarker Yup1 herangezogen (Wedlich-Söldner *et al.*, 2000). Abb. 54A zeigt, dass sich die Colokalisierung von Rab5b und Yup1 durch die Deletion von *nma1* nicht maßgeblich unterschied. Sowohl in Wildtypstämmen (UEB4: AB31 *P<sub>ter</sub>:yup1:mCherry, gfp:rab5b*) als auch in  $\Delta nma1$ -Stämmen (UKS251: AB31 *P<sub>ter</sub>:yup1:mCherry, gfp:rab5b, \Delta nma1*) konnte eine überwiegende Colokalisierung der beiden Proteine beobachtet werden. Auch die Analyse der Bewegungsmuster zeigte, dass sich die gemeinsame Lokalisierung auf statischen Ansammlungen oder der gemeinsame bidirektionale Transport auf kleinen Vesikeln durch die Deletion von *nma1* nicht veränderte.

Die Deletion von *nma1* führte zur Reduktion der Colokalisierung der CORVET-spezifischen Untereinheiten Vps3 und Vps8 (Abb. 50). Zeitgleich führte diese Reduktion ebenfalls zu einer verminderten Colokalisation von Vps8 und Rab5a-positiven Endosomen (Abb. 53). Da jedoch hauptsächlich die Colokalisierung von Vps3 auf Rab5a-positiven Endosomen beeinträchtigt war (Abb. 52), blieb offen, wodurch die deutliche Reduktion der Colokalisierung von Vps8 mit Vps3-positiven Strukturen hervorgerufen wurde. Aus diesem Grund wurde ergänzend untersucht, ob dieser Effekt möglicherweise durch eine ausgleichende Wirkung von Rab5b auf auftretende Rab5a-Defekte auch unabhängig von einer *rab5a*-Deletion hervorgerufen werden kann und welchen Einfluss die Deletion von *nma1* damit auf die Colokalisierung von Vps8 und Rab5b ausübte. Wie in Abb. 54B veranschaulicht, zeigten Vps8 und Rab5b sowohl in Wildtypstämmen (UKS431: AB31 *vps8:3xmCherry,*



*gfp:rab5b*) als auch im  $\Delta nma1$ -Hintergrund (UKS506: AB31 *vps8:3xmCherry*, *gfp:rab5b*,  $\Delta nma1$ ) eine weitestgehend übereinstimmende Colokalisierung. Rab5b und Vps8 lokalisierten im Wildtyp auf größeren, statischen Signalakkumulationen, auf größeren Strukturen mit geringer Motilität und auf Strukturen von geringer Größe mit bidirektionaler Motilität. Durch die Deletion von *nma1* konnte eine Zunahme der Lokalisierung auf überwiegend motilen Strukturen geringer Größe beobachtet werden, während die Lokalisierung auf größeren statischen Strukturen im Vergleich zum Wildtyp reduziert war.

Ergebnisse



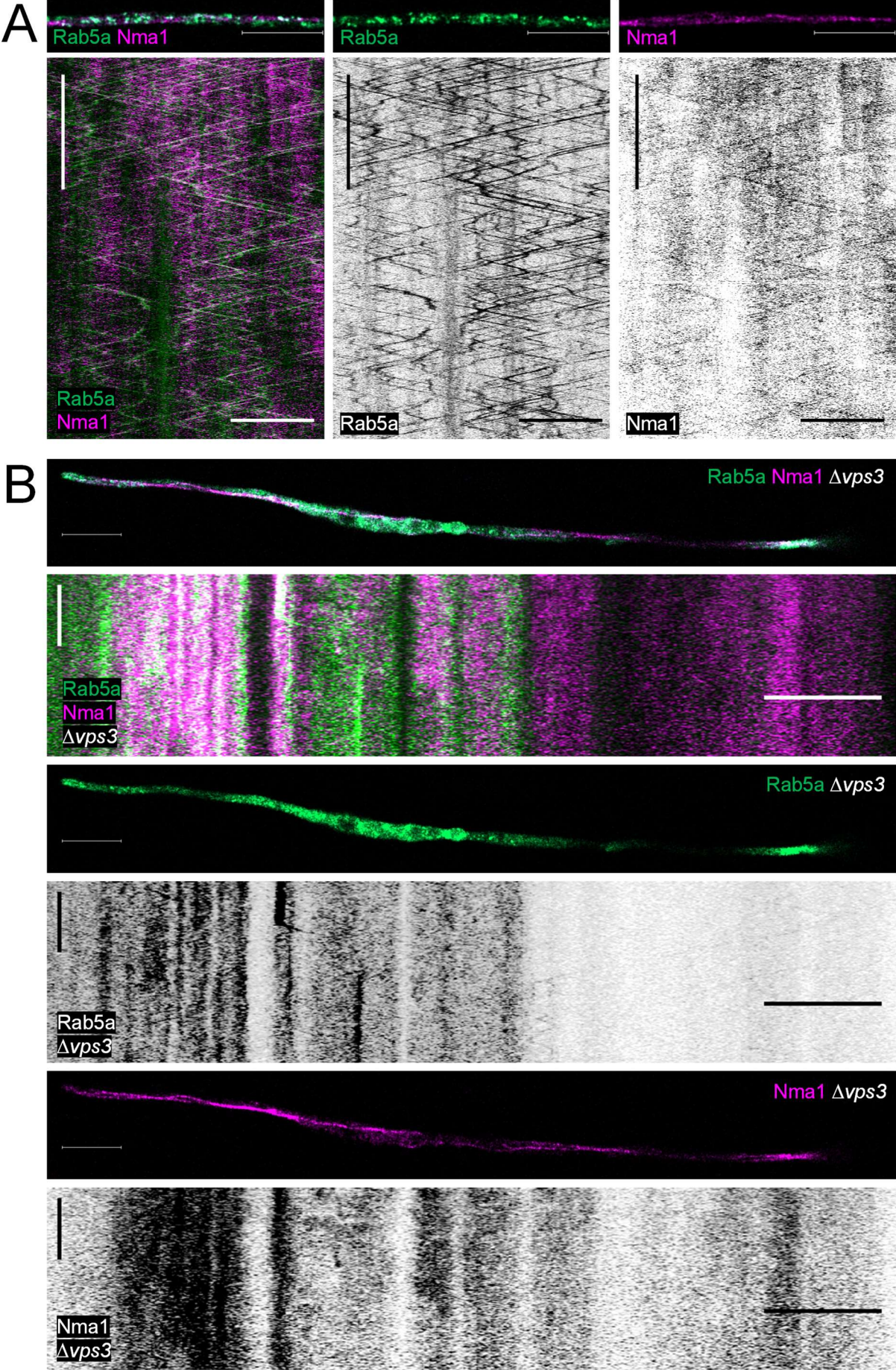
**Abb. 54: Nma1 beeinflusst die Assoziation von Vps8 mit Rab5b-positiven Endosomen**

**A)** Die Colokalisierung von Rab5b und Yup1 wurde durch die Deletion von *nma1* nicht maßgeblich beeinträchtigt. Sowohl in Wildtypstämmen als auch in  $\Delta nma1$ -Stämmen konnte eine nahezu vollständige Colokalisierung der beiden Proteine beobachtet werden. Auch die Auswertung der in Kymographen veranschaulichten Transportvorgänge zeigte, dass sich die gemeinsame Lokalisierung auf statischen Ansammlungen oder der gemeinsame bidirektionale Transport auf kleinen Vesikeln durch die Deletion von *nma1* nicht veränderte. Die Bilder und Kymographen des Wildtypstammes wurden bereits in Kapitel 3.1.8 Abb. 29 gezeigt. **B)** Vps8 und Rab5b lokalisierten sowohl in Wildtypstämmen als auch im  $\Delta nma1$ -Hintergrund überwiegend gemeinsam. Die Proteine wurden im Wildtyp auf größeren, statischen Signalakkumulationen, auf größeren Strukturen mit geringer Motilität und auf Strukturen von geringer Größe mit bidirektionaler Motilität detektiert. Die gezeigten Bilder und Kymographen des Wildtyps wurden bereits in Kapitel 3.2.3 Abb. 38 als Vergleich herangezogen. Durch die Deletion von *nma1* konnte eine vermehrte Lokalisierung auf überwiegend motilen Strukturen geringer Größe beobachtet werden. Farbwahl: Yup1/Vps8 magenta, Rab5b grün, Überlagerung der Signale zeigt sich in weiß. Analyse durch Mikroskop 2 (A) oder 3 (B). Horizontaler Maßstab: 10  $\mu$ m, vertikaler Maßstab: 10 sek.

3.3.5. Nma1 lokalisiert spezifisch auf den frühen Endosomen und den Mikrotubuli

Wie bereits in Vorarbeiten beschrieben, fanden die Nma1-Transportvorgänge durch Rab5a-positive, frühe Endosomen statt (Obhof, 2017). Da diese Untersuchungen durch ein artifiziell erhöhtes Expressionslevel von Rab5a beeinflusst sein könnten, dessen Auswirkungen im Rahmen dieser Arbeit gezeigt wurde (vgl. Abb. 14), sollte der gemeinsame Transport erneut mit der Rab5a-Expression unter dem nativen Promotor verifiziert werden. Wie in Abb. 55 gezeigt, colokalisierten Rab5a und Nma1 (UKS176: AB31 *gfp:rab5a*, *nma1:3xmCherry*) partiell auf vesikulären Strukturen. Der überwiegende Anteil der Nma1-Lokalisierung war jedoch entlang von Mikrotubulistrukturen zu finden. Es wurde auch ein Anteil des Rab5a-Signals ohne Nma1 auf Endosomen beobachtet. Die Auswertung der Transportprozesse durch Kymographen zeigte, dass Nma1-Transporte gemeinsam mit Rab5a-positiven Endosomen stattfanden. Rab5a wurde jedoch auch in vielen Fällen ohne Nma1 transportiert. Durch die Deletion von *vps3* (UKS381: AB31 *gfp:rab5a*, *nma1:3xmCherry*,  $\Delta vps3$ ) war Nma1 nicht mehr auf vesikulären Strukturen vorzufinden, die mit Rab5a colokalisierten. Auch der gemeinsame Transport von Nma1 mit Rab5a-positiven Endosomen war durch die Deletion von *vps3* unterbunden. Nma1 war vorwiegend statisch mit den Mikrotubuli assoziiert, während die Motilität von Rab5a durch die Deletion von *vps3* zwar beeinträchtigt, jedoch nicht völlig verhindert war. Es konnten nach wie vor bidirektionale Transportvorgänge von Rab5a-positiven Endosomen beobachtet werden, welche jedoch Nma1 nicht mitbewegten.

Ergebnisse

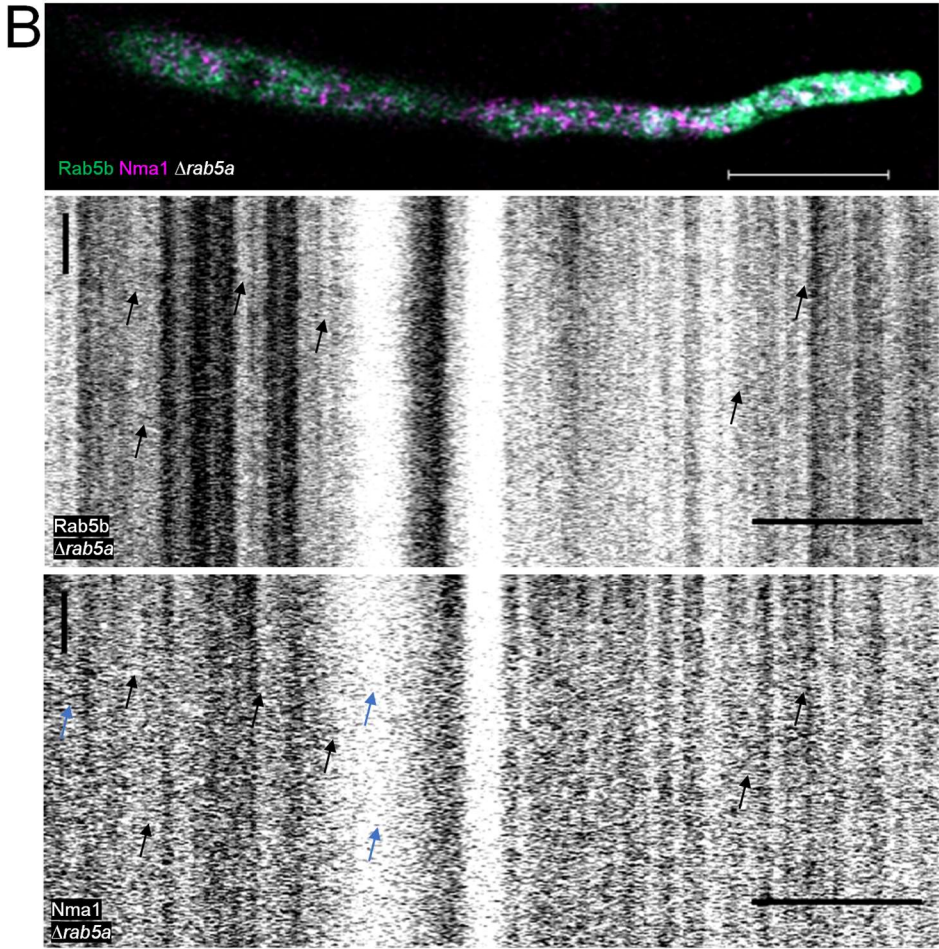
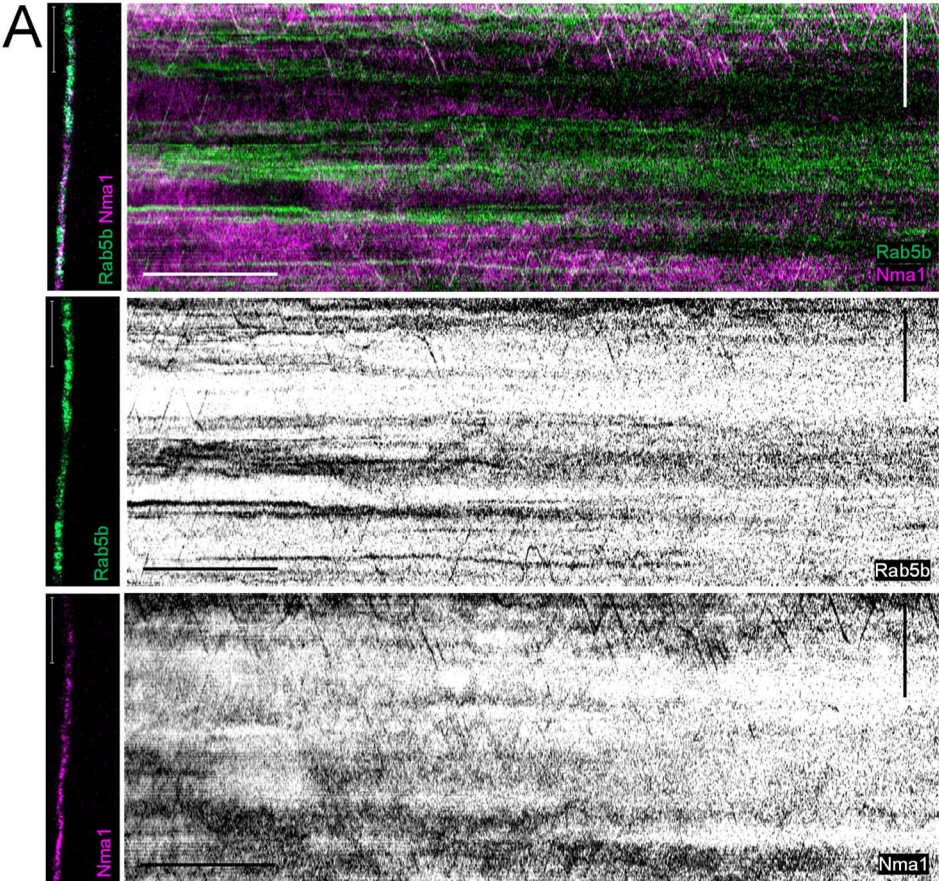


**Abb. 55: Der Transport von Nma1 mit Rab5a-positiven Endosomen ist abhängig von Vps3**

**A)** Rab5a und Nma1 zeigten partielle Colokalisierung auf vesikulären Strukturen. Hauptsächlich waren Nma1-Signale jedoch entlang von Mikrotubulistrukturen zu finden. Es wurde ebenfalls ein großer Anteil des Rab5a-Signals ohne Nma1 auf Endosomen beobachtet. Nma1-Transporte liefen gemeinsam mit Rab5a-positiven Endosomen ab. Rab5a wurde jedoch auch in vielen Fällen ohne Nma1 transportiert. **B)** Die Deletion von *vps3* verhinderte die Lokalisierung von Nma1 auf Rab5a-positiven Strukturen. Auch der gemeinsame Transport von Nma1 mit Rab5a-Endosomen war durch die Deletion von *vps3* unterbrochen. Nma1 war vorwiegend statisch mit den Mikrotubuli assoziiert, während die Motilität von Rab5a durch die Deletion von *vps3* zwar reduziert, jedoch nicht völlig unterbunden war. Es konnten weiterhin bidirektionale Transportvorgänge von Rab5a-positiven Endosomen beobachtet werden, welche jedoch Nma1 nicht mitführten. Farbwahl: Nma1 magenta, Rab5a grün, Überlagerung der Signale zeigt sich in weiß. Analyse durch Mikroskop 2. Horizontaler Maßstab: 10 µm, vertikaler Maßstab: 10 sek.

Nachdem die Funktion von Rab5a bei Nma1-Transportvorgängen nachgewiesen werden konnte, blieb die Frage offen, ob dieser Transport spezifisch mit Rab5a assoziiert ist, oder Endosomen allgemein als Transportvehikel genutzt werden und Nma1 folglich auch mit Rab5b transportiert werden kann. Abb. 56 zeigt, dass Nma1 auch gemeinsam mit Rab5b-positiven Endosomen (UKS266: AB31 *gfp:rab5b, nma1:3xmCherry*) transportiert werden konnte. Die statischen Signale von Rab5b waren jedoch nicht mit den statischen, mikrotubuliassoziierten Nma1-Signalen colokalisiert. Die Colokalisierung von Nma1 und Rab5b fand gemeinsam auf sich fortbewegenden Endosomen statt. Da im Rahmen dieser Arbeit eine überwiegende Colokalisierung von Rab5a und Rab5b beschrieben werden konnte (vgl. Abb. 21), waren weitere Analysen notwendig um einen Rab5a-unabhängigen Transport von Nma1 beurteilen zu können. Durch die Deletion von *rab5a* (UKS294: AB31 *gfp:rab5b, nma1:3xmCherry, Δrab5a*) wurde die Motilität von Nma1 und Rab5b gleichermaßen schwerwiegend beeinträchtigt und führte zu statischen Signalakkumulationen ohne Colokalisierung von Rab5b und Nma1. Dennoch konnten geringfügige Transportprozesse beider Proteine beobachtet werden. Diese fanden anhand der visuellen Beurteilung der Kymographen überwiegend gemeinsam, teilweise jedoch auch unabhängig voneinander statt. Die Deletion von *rab5b* hatte dagegen keinen Effekt auf die Lokalisierung oder Motilität von Nma1 (Daten nicht gezeigt).

Ergebnisse



**Abb. 56: Nma1 kann unabhängig von Rab5a mit Rab5b-positiven Endosomen transportiert werden**

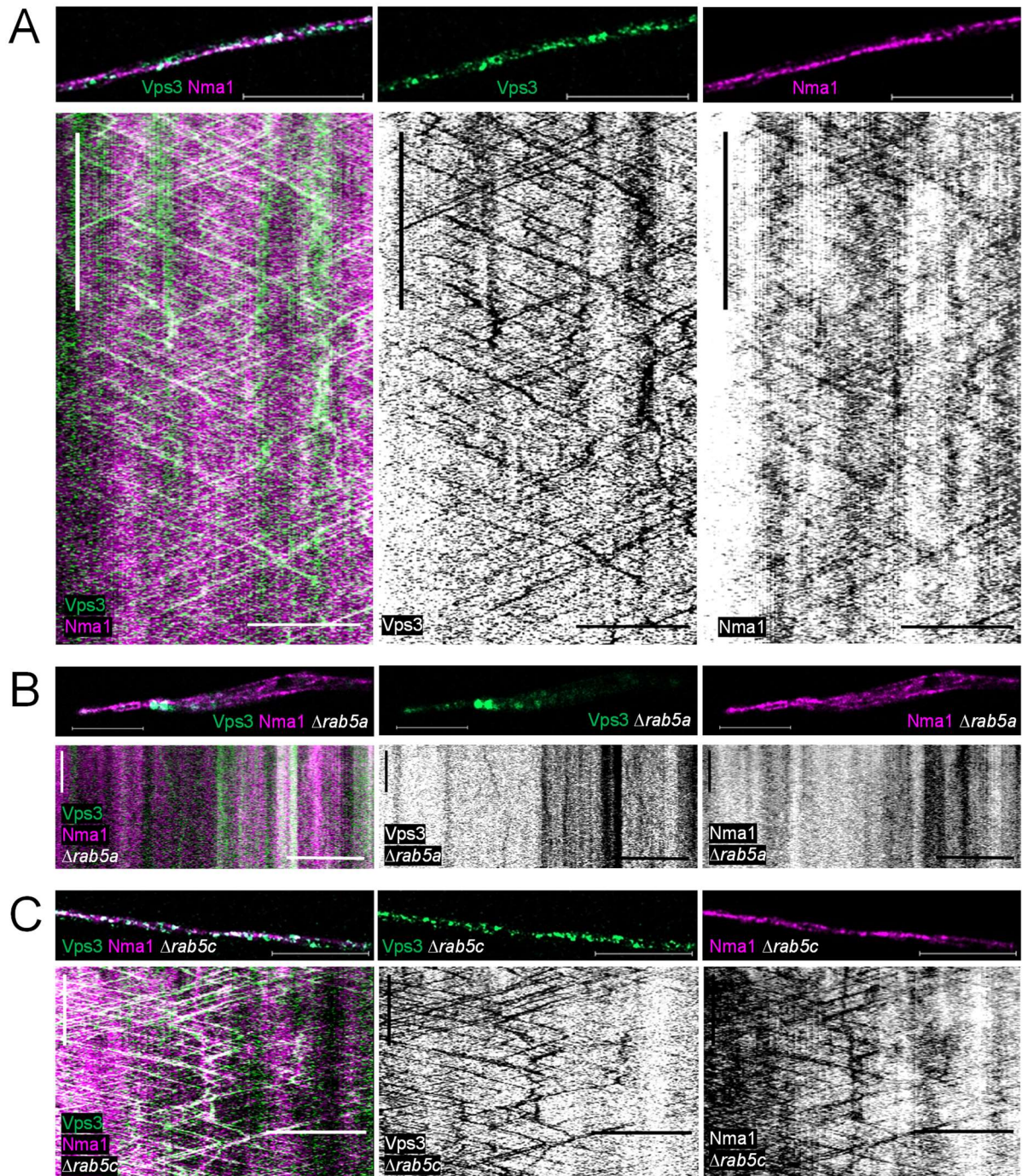
**A)** Nma1 konnte auch gemeinsam mit Rab5b-positiven Endosomen transportiert werden. Die statischen Signale von Rab5b waren nicht mit den statischen Nma1-Signalen entlang der Mikrotubuli colokalisiert. Die Colokalisierung von Nma1 und Rab5b fand auf sich gemeinsam fortbewegenden Endosomen statt. Horizontaler Maßstab: 10 sek, vertikaler Maßstab: 10  $\mu\text{m}$ . **B)** Durch die Deletion von *rab5a* wurde die Motilität von Nma1 und Rab5b gleichermaßen schwerwiegend beeinträchtigt und führte zu statischen Signalakkumulationen ohne Colokalisierung von Rab5b und Nma1. Dennoch konnten geringfügige Transportprozesse beider Proteine beobachtet werden. Diese fanden überwiegend gemeinsam (schwarze Pfeile), teilweise jedoch auch unabhängig voneinander (blaue Pfeile) statt. Farbwahl: Nma1 magenta, Rab5b grün, Überlagerung der Signale zeigt sich in weiß. Horizontaler Maßstab: 10  $\mu\text{m}$ , vertikaler Maßstab: 10 sek. Analysen durch Mikroskop 2.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte eine Funktion von Nma1 am CORVET-Komplex und an den frühen Endosomen, sowie eine direkte Interaktion mit der spezifischen Untereinheit Vps3 am CORVET-Komplex gezeigt werden. Zunächst wurde untersucht, ob sich die Interaktion von Nma1 mit der Vps3-Untereinheit des CORVET-Komplexes auch in einer gemeinsamen Motilität zeigt und die Interaktion möglicherweise auf den frühen Endosomen stattfindet, während der Komplex seine Funktion als Membranverbindungskomponente erfüllt (zusammengefasst in (Ungermann und Kümmel, 2019)). Wie in Abb. 57 veranschaulicht, wurden in Wildtypstämmen (UKS267: AB31 *nma1:3xmCherry, vps3:gfp*) Nma1-markierte Mikrotubuli beobachtet, welche mit Vps3- und Nma1-positiven Vesikeln dekoriert waren. Es konnten jedoch auch Vesikel identifiziert werden, die lediglich durch Vps3 angefärbt waren und kein Nma1-Signal zeigten. Die Analyse der Bewegungsmuster zeigte einen partiell stattfindenden gemeinsamen Transport von Vps3 und Nma1. Es konnte jedoch auch Vps3-Motilität ohne Nma1 beobachtet werden und statische Nma1-Signale, die lediglich mit den Mikrotubuli assoziiert waren. Im Falle eines Nma1-Transportvorganges fand dieser jedoch immer gemeinsam mit Vps3-positiven Vesikeln statt. Durch die Deletion des Bindegliedes des CORVET-Komplexes an die Endosomen, Rab5a, wurde eine Akkumulation des Vps3-Signals in großen, runden, statischen Strukturen beobachtet (UKS297: AB31 *nma1:3xmCherry, vps3:gfp,  $\Delta rab5a$* ). Nma1 zeigte keine Colokalisierung mit Vps3 in diesen Strukturen. Die gemeinsame Lokalisierung in statischen Signalen schien lediglich partiell durch zufällige gemeinsame Berührungspunkte mit den weiterhin Nma1-positiven Mikrotubulistrukturen aufzutreten. Es konnten für beide Signale minimale verbleibende Bewegungsmuster beobachtet werden, welche teilweise gemeinsam, teilweise jedoch auch einzeln von Vps3-positiven Strukturen durchgeführt wurden. Diese Bewegungsmuster zeigten jedoch nicht die typischen endosomalen Transportprozesse, wie sie im Wildtyp zu

## Ergebnisse

beobachten waren, sondern eher langsame Bewegungen mit geringer Distanz. Eine verbleibende geringfügige Motilität von Nma1 im  $\Delta rab5a$ -Hintergrund konnte bereits in Vorarbeiten beschrieben werden (Schneider, 2016). Dieser Effekt ist vermutlich spezifisch für die *rab5a*-Deletion. Eine Deletion von *rab5c* (UKS384: AB31 *nma1:3xmCherry, vps3:gfp, \Delta rab5c*) hatte dagegen keinen Effekt auf den gemeinsamen Transport von Nma1 und Vps3. In *rab5c*-Deletionsstämmen konnte eine mit dem Wildtyp vergleichbare Verteilung des Cotransportes von Nma1 und Vps3, sowie des Nma1-unabhängigen Transportes von Vps3 beobachtet werden. Auch die Assoziierung von Nma1 mit Mikrotubulistrukturen war unbeeinträchtigt. Die Auswirkung der *rab5b*-Deletion auf die gemeinsame Motilität von Vps3 und Nma1 wurde nicht untersucht.



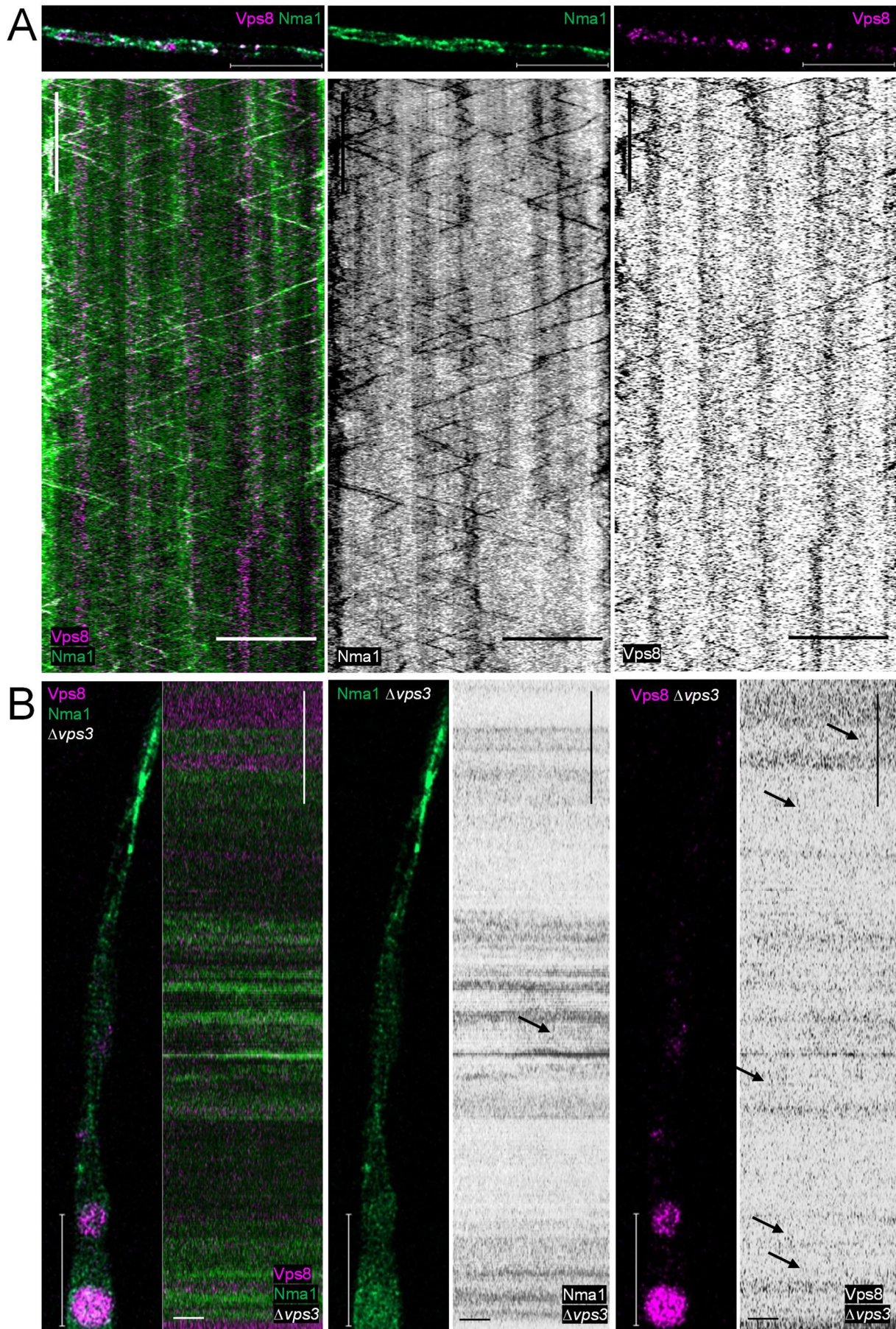


## Ergebnisse

### **Abb. 57: Der Cotransport von Nma1 und Vps3 ist abhängig von Rab5a**

**A)** Im Wildtyp wurden Nma1-markierte Mikrotubulistrukturen beobachtet, welche mit Vps3- und Nma1-positiven Vesikeln assoziiert waren. Zusätzlich wurden Vesikel detektiert, die lediglich durch Vps3 gefärbt waren und kein Nma1-Signal aufwiesen. Die Analyse der Bewegungsmuster zeigte einen gemeinsamen Transport von Vps3 und Nma1. Es konnten jedoch auch einzelne Vps3-Motilität und statische Nma1-Signale, die lediglich mit den Mikrotubuli assoziiert waren, gefunden werden. Im Falle einer Nma1-Motilität fand diese jedoch immer gemeinsam mit Vps3-positiven Vesikeln statt. **B)** Die Deletion von *rab5a* führte zur Akkumulation des Vps3-Signals in großen, runden, statischen Strukturen ohne Nma1-Signal an gleicher Stelle. Eine übereinstimmende Lokalisierung in statischen Signalen schien lediglich partiell durch Berührungspunkte mit den weiterhin Nma1-positiven Mikrotubulistrukturen aufzutreten. Beide Proteine zeigten minimale verbleibende Motilität, welche teilweise gemeinsam, teilweise jedoch auch von einzelnen Vps3-positiven Strukturen stattfand. Diese Bewegungsmuster zeigten jedoch nicht die typischen endosomalen Transportprozesse, wie sie im Wildtyp zu beobachten waren, sondern Bewegungen mit geringer Distanz und Geschwindigkeit. **C)** Die Deletion von *rab5c* hatte keinen Effekt auf den gemeinsamen Transport von Nma1 und Vps3. In *rab5c*-Deletionsstämmen konnte eine mit dem Wildtyp vergleichbare Verteilung des Cotransportes von Nma1 und Vps3, sowie des Nma1-unabhängigen Transportes von Vps3 beobachtet werden. Auch die Lokalisierung von Nma1 an Mikrotubulistrukturen war unbeeinträchtigt. Farbwahl: Nma1 magenta, Vps3 grün, Überlagerung der Signale zeigt sich in weiß. Analyse durch Mikroskop 2. Horizontaler Maßstab: 10 µm, vertikaler Maßstab: 10 sek.

Ergänzend zu der Interaktion mit der CORVET-Untereinheit Vps3, dem direkten Interaktionspartner von Nma1, konnte durch die Beobachtung von Vps8 das Zusammenspiel von Nma1 mit dem gesamten Komplex näher charakterisiert werden. Vps8 und Nma1 (UKS288: AB31 *vps8:3xmCherry, nma1:3xgfp*) zeigten eine partielle Colokalisierung (Abb. 58). Es konnten von beiden Proteinen jedoch auch einzelne Signale auf vesikelförmigen Strukturen beobachtet werden, sowie Nma1-markierte Mikrotubulistrukturen, welche keine Vps8-Signale enthielten. Die Motilität von Vps8 und Nma1 erfolgte jedoch, wie in den Kymographen veranschaulicht, stets gemeinsam. Vps8-positive Strukturen, welche keine Colokalisierung mit Nma1 zeigten, waren statisch. Die Deletion von *vps3* (UKS379: AB31 *vps8:3xmCherry, nma1:3xgfp, Δvps3*), die wie im Rahmen dieser Arbeit in Co-IP-Experimenten bereits gezeigt wurde (vgl. Abb. 46), die Verbindung von Nma1 mit dem CORVET-Komplex auflöste, führte zu überwiegend statischen Akkumulationen beider Signale. Vps8 akkumulierte im  $\Delta vps3$ -Hintergrund jedoch in großen, runden Strukturen, während Nma1 weiterhin mit Mikrotubulistrukturen assoziiert war oder zytoplasmatisch vorlag. Für Nma1 konnte bis auf eine Ausnahme, ein völliges Erliegen der Motilität beobachtet werden, wie es bereits in Vorarbeiten beschrieben wurde (Schneider, 2016). Vps8 war ebenfalls überwiegend statisch im  $\Delta vps3$ -Hintergrund, jedoch konnten auch hier einige Transportvorgänge detektiert werden. Diese fanden jedoch unabhängig von Nma1 statt.

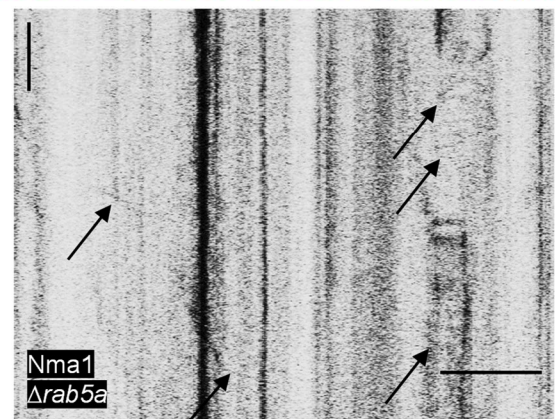
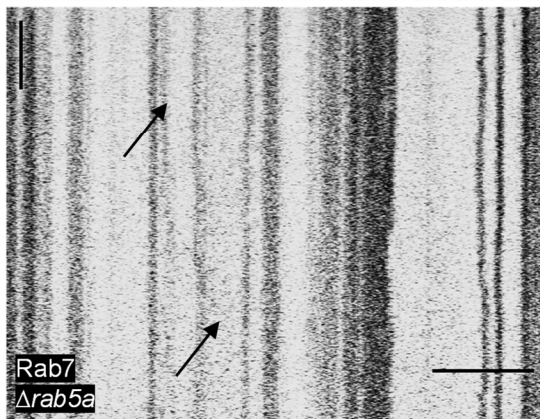
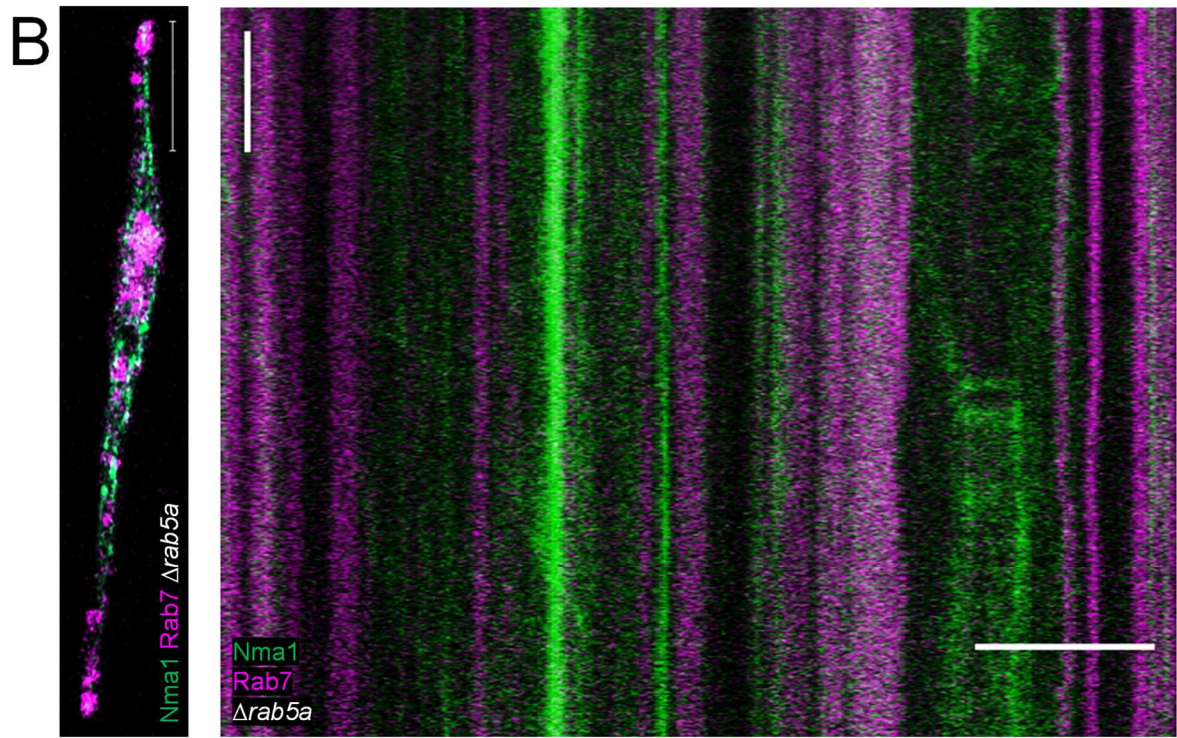
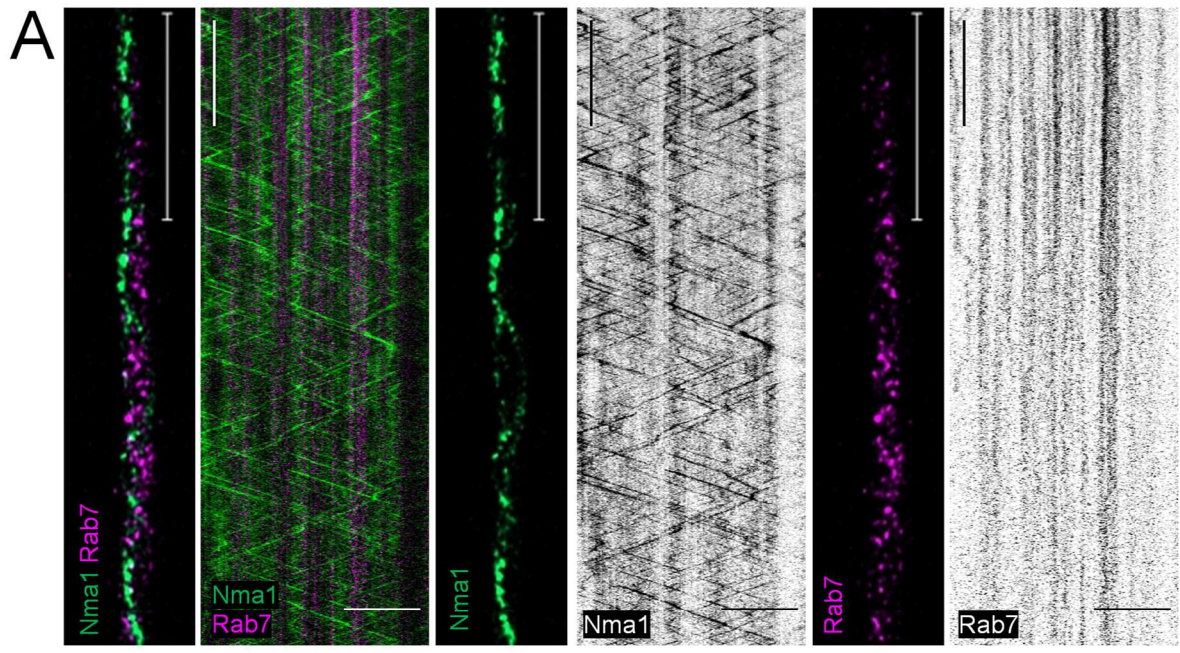


## Ergebnisse

### **Abb. 58: Der Transport von Nma1 mit Vps8-positiven Endosomen ist abhängig von Vps3**

**A)** Vps8 und Nma1 colokalisierten partiell und von beiden Proteinen konnten auch einzelne Signale auf vesikelförmigen Strukturen beobachtet werden, sowie Nma1-markierte Mikrotubulstrukturen, welche keine Vps8-Signale zeigten. Die Motilität von Vps8 und Nma1 erfolgte gemeinsam. Vps8-positive Strukturen, welche keine Colokalisierung mit Nma1 zeigten, waren statisch. Horizontaler Maßstab: 10  $\mu\text{m}$ , vertikaler Maßstab: 10 sek. **B)** Die Deletion von *vps3* führte zu hauptsächlich statischen Akkumulationen von Nma1 und Vps8. Vps8 akkumulierte dabei jedoch in großen, runden Strukturen, während Nma1 weiterhin mit Mikrotubulstrukturen assoziiert war oder zytoplasmatisch auftrat. Für Nma1 konnte bis auf eine Ausnahme (Pfeil), ein völliges Erliegen der Motilität beobachtet werden, wie es bereits in Vorarbeiten gezeigt wurde (Schneider, 2016). Vps8 war ebenfalls weitestgehend statisch im  $\Delta vps3$ -Hintergrund, es konnten jedoch auch hier vereinzelte Bewegungsmuster detektiert werden (Pfeile). Die selten detektierten Bewegungsmuster fanden jedoch unabhängig von Nma1 statt. Farbwahl: Vps8 magenta, Nma1 grün, Überlagerung der Signale zeigt sich in weiß. Analyse durch Mikroskop 2. Horizontaler Maßstab: 10 sek, vertikaler Maßstab: 10  $\mu\text{m}$ .

Um abschließend zu untersuchen, ob die Colokalisierung und der Transport von Nma1 spezifisch für die Population der frühen Endosomen sind, wurde ebenfalls die Colokalisierung von Nma1 mit der Rab7-GTPase der späten Endosomen untersucht. Im Wildtyphintergrund (UKS276: *AB31 mCherry:rab7, nma1:3xgfp*) konnte, wie in Abb. 59 dargestellt, keine Colokalisierung zwischen Rab7 und Nma1 beobachtet werden. Nma1 zeigte die beschriebene Motilität sowohl retrograd als auch anterograd und lokalisierte entlang der Mikrotubuli sowie an vesikulären Strukturen (Pinter, 2012, Schneider, 2016, Obhof, 2017 und diese Arbeit). Für Rab7 konnten die bereits gezeigten statischen Signale und minimale Transportvorgänge über kurze Distanzen mit geringer Geschwindigkeit detektiert werden (Schneider, 2016 und diese Arbeit). Es wurde kein gemeinsamer Transport von Nma1 mit Rab7-positiven, späten Endosomen beobachtet. Um zu analysieren, ob die in  $\Delta rab5a$ -Stämmen beobachtete verbleibende Motilität von Nma1 mit späten Endosomen zusammenhängen könnte, wurden weiterführende Studien vollzogen. Durch die Deletion von *rab5a* (UKS300: *AB31 mCherry:rab7, nma1:3xgfp, \Delta rab5a*) wurden Akkumulationen des Rab7-Signals in großen, runden Strukturen vorgefunden. Nma1 lokalisierte nicht mit diesen Rab7-positiven Strukturen, sondern blieb weiterhin mit den Mikrotubuli assoziiert. Durch die *rab5a*-Deletion konnte eine geringfügige Zunahme der Rab7-Motilität beobachtet werden, diese Transportvorgänge fanden jedoch ohne Nma1 statt. Die verbleibende Motilität von Nma1 war nicht basierend auf dem Transport mit Rab7-positiven, späten Endosomen.



### **Abb. 59: Nma1 wird nicht mit späten Endosomen transportiert**

**A)** Im Wildtyp Hintergrund wurde keine Colokalisierung oder -transport von Rab7 und Nma1 beobachtet. Nma1 zeigte die beschriebene bidirektionale Motilität und lokalisierte entlang der Mikrotubuli sowie an vesikulären Strukturen (Pinter, 2012, Schneider, 2016, Obhof, 2017 und diese Arbeit). Für Rab7 konnten die bereits gezeigten statischen Signale und vereinzelte Transportvorgänge über kurze Distanzen mit geringer Geschwindigkeit detektiert werden (Schneider, 2016 und diese Arbeit). **B)** Durch die Deletion von *rab5a* akkumulierte das Rab7-Signal in großen, runden Strukturen ohne Nma1. Dieses blieb weiterhin mit den Mikrotubuli assoziiert. Durch die *rab5a*-Deletion konnte eine geringfügige Steigerung der Rab7-Transportvorgänge beobachtet werden, diese fanden jedoch ohne Nma1 statt. Die verbleibende Motilität von Nma1 war unabhängig von Transportprozessen mit Rab7-positiven, späten Endosomen. Farbwahl: Rab7 magenta, Nma1 grün, Überlagerung der Signale zeigt sich in weiß. Analyse durch Mikroskop 2. Horizontaler Maßstab: 10 µm, vertikaler Maßstab: 10 sek.

Bei den Lokalisierungsstudien von Nma1 konnte gezeigt werden, dass durch Deletionen von Komponenten der frühen Endosomen lediglich die Motilität und die Verbindung mit den frühen Endosomen beeinträchtigt wurde, während die Assoziation mit dem Mikrotubulizytoskelett bestehen blieb. Aus diesem Grund kann vermutet werden, dass diese Lokalisierung auf eine zusätzliche Funktion von Nma1 zurückzuführen ist. Um diese Funktion aufzuklären, wurde die Lokalisierung und der Einfluss von Nma1 auf die verschiedenen Stadien der Zellteilung weiterführend analysiert (vgl. Kapitel 3.4).

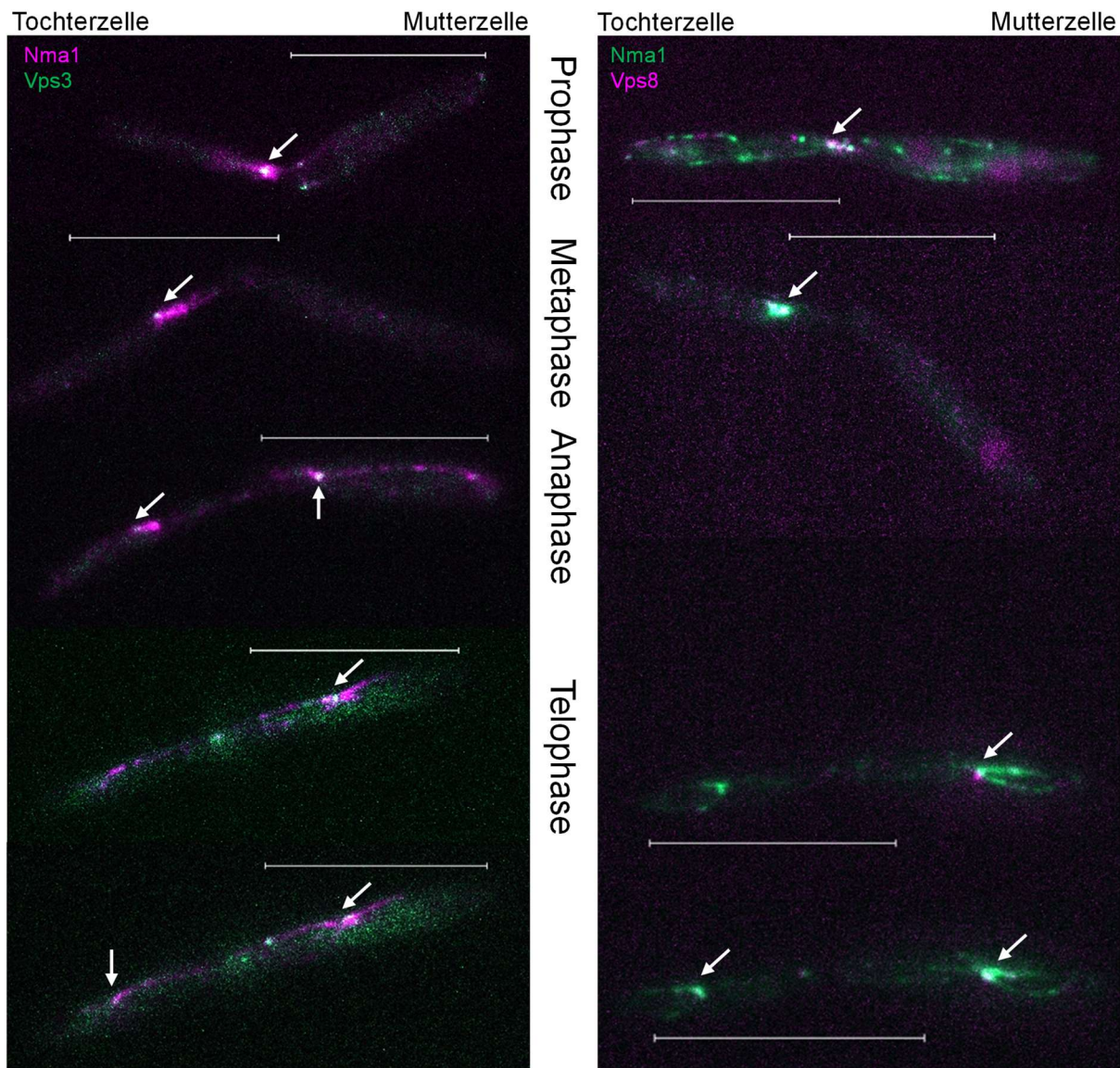
### 3.4. Die endozytotische Maschinerie ist bei mitotischen Teilungsprozessen in *U. maydis* involviert

Für Säugetiere wurden bereits Funktionen der Endosomen während der Mitose und Zytokinese beschrieben (zusammengefasst in Daeden und Gonzalez-Gaitan, 2018). Anhand von Lokalisierungsanalysen und Untersuchungen von Mutanten mit Defekten in endozytotischen Prozessen in Säugetierzellen wurde die Theorie aufgestellt, dass die Endosomen während der mitotischen Separierung ihre Fracht über die Spindel auf die beiden entstehenden Zellen verteilen und wichtige Komponenten der Teilungsprozesse anliefern (Lanzetti, 2012). Nma1 lokalisierte in *U. maydis* entlang der Mikrotubuli (Pinter, 2012) und am Spindelpolkkörper (Obhof, 2017). Bei den Lokalisierungsstudien von Nma1 (Kapitel 3.3.5) konnte gezeigt werden, dass Deletionen von Komponenten der frühen Endosomen lediglich die Motilität von Nma1 mit den frühen Endosomen beeinflussten, während die Assoziation von Nma1 mit dem Mikrotubulizytoskelett bestehen blieb. Diese Lokalisierung könnte auf eine zusätzliche Funktion von Nma1 zurückzuführen sein. Zur weiteren Analyse wurde daher die Lokalisierung und der Einfluss von Nma1 auf die verschiedenen Stadien der Zellteilung analysiert. Untersuchungen der Lokalisierung von Nma1 im Verlauf der Mitose haben bereits gezeigt, dass sich das Nma1-Signal gemeinsam mit der Histon1-markierten assoziierten DNA und dem Tub2-markierten Spindelpolkkörper konzentriert und die Verteilung der Chromosomen begleitet (Pinter, 2015, Obhof, 2017). Eine Colokalisierung von Nma1 und Rab5a in denselben Mitosestadien (Obhof, 2017) lässt eine Beteiligung der frühen Endosomen an der Mitose vermuten. Diese sollten im Rahmen dieser Arbeit unter Einbezug des CORVET-Komplexes, dem Nma1-Interaktionspartner, durch zellbiologische Analysen adressiert werden.

### 3.4.1. Nma1 und der CORVET-Komplex colokalisieren während mitotischen Teilungsvorgängen

In Vorarbeiten wurden Lokalisierungen von Nma1 an den Polen der Mitosespindel und dem Spindelpolkörper gezeigt. Ergänzend konnten Colokalisierungen von Nma1 und der Rab5a-GTPase der frühen Endosomen während der mitotischen Teilung beobachtet werden (Pinter, 2015, Obhof, 2017). In Lokalisierungsstudien (Kapitel 3.3.5) konnte gezeigt werden, dass die Colokalisierung von Nma1 mit den frühen Endosomen auf der CORVET-Untereinheit Vps3 basierte. Weiter sollte analysiert werden, ob der CORVET-Komplex ebenfalls gemeinsam mit Nma1 an der Mitosespindel lokalisiert. Dafür wurde sowohl die Lokalisierung von Vps3 (UKS267: AB31 *vps3:gfp, nma1:3xmCherry*), dem direkten Interaktionspartner von Nma1, als auch die von Vps8 (UKS288: AB31 *nma1:3xgfp, vps8:3xmCherry*), der zweiten CORVET-spezifischen Untereinheit des Komplexes, untersucht. Sowohl Vps3 als auch Vps8 colokalisierten beim Eintritt in die Prophase mit den kondensierenden Nma1-markierten Mikrotubuli (Abb. 60). Bei der Ausbildung der mitotischen, durch Nma1 markierten, Spindel in der Metaphase waren beide CORVET-Untereinheiten zunächst an einem Spindelpol lokalisiert und während der Spindelelongation im Anschluss mit beiden Spindelpolen assoziiert. Während sich die astralen Mikrotubulibündel in der Telophase an den MTOCs ausbildeten, waren Vps3 und Vps8 zunächst ausschließlich an dem MTOC in der Mutterzelle sichtbar, erschienen mit fortschreitender Phase jedoch an beiden MTOCs. Während dieser Phase zeigte sich eine gemeinsame Lokalisierung mit Nma1 jedoch nur am MTOC selbst und nicht an den Nma1-markierten, astralen Mikrotubuli. Durch den Vergleich der Colokalisierung von Vps3 und Vps8 mit Nma1 während der Mitosestadien konnte ausgeschlossen werden, dass lediglich die mit Nma1 direkt interagierende CORVET-Untereinheit Vps3 mit der Nma1-markierten Spindel assoziiert war. Die Lokalisierung von Vps8 an der Spindel impliziert stattdessen, dass der gesamte CORVET-Komplex während der Mitose an der Teilungsspindel lokalisiert ist.





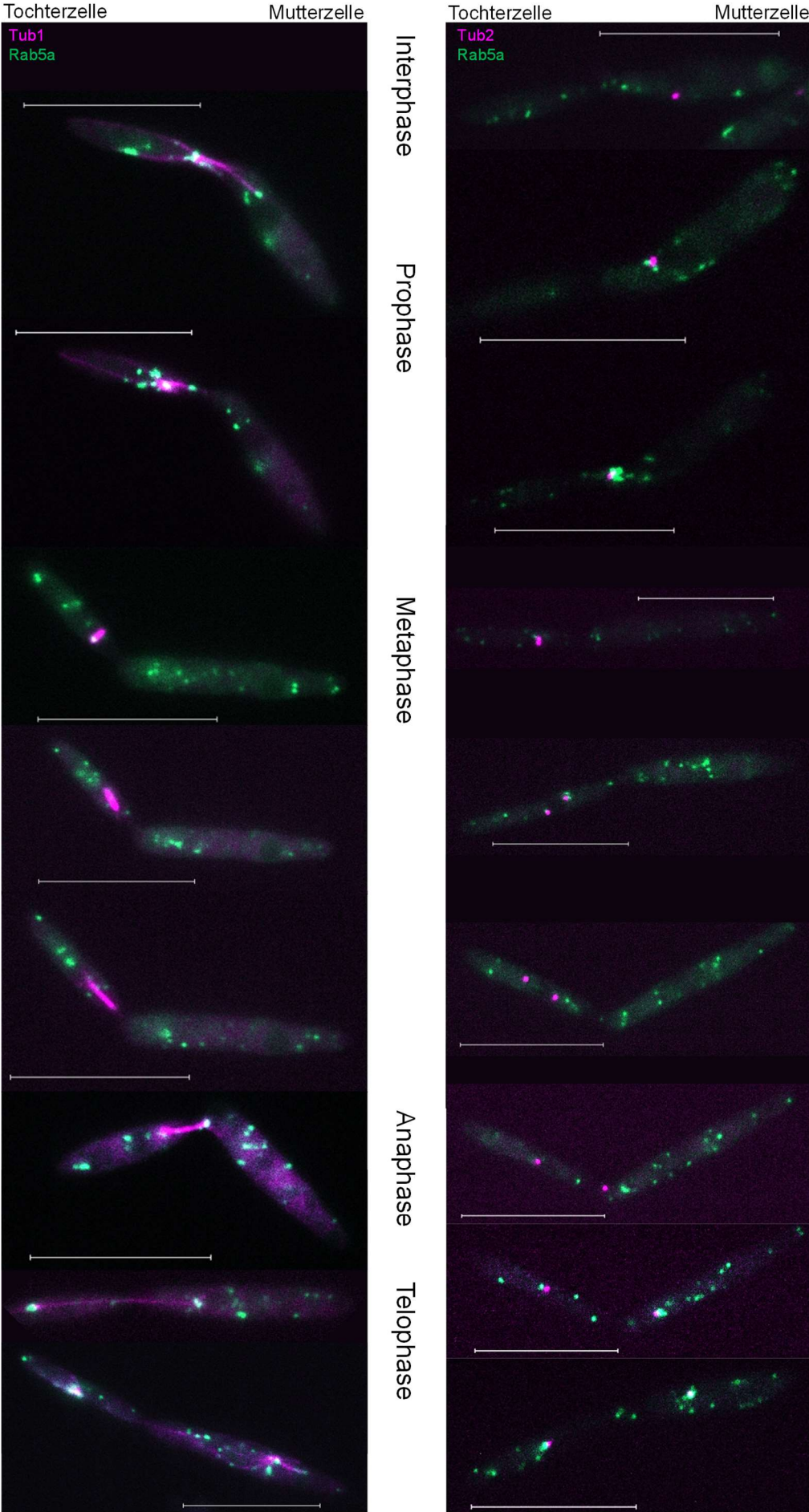
**Abb. 60: Komponenten des CORVET-Komplex lokalisieren mit Nma1 an der mitotischen Spindel**  
 Vps3 (links) und Vps8 (rechts) lokalisierten gemeinsam mit den kondensierten, Nma1-markierten Mikrotubuli während der Pro- und Metaphase. In der Metaphase waren beide CORVET-Untereinheiten an einem Spindelpol lokalisiert und blieben während der Spindelelongation in der Anaphase mit den Spindelpolen assoziiert. Bei Ausbildung der astralen Mikrotubuli an den MTOCs waren Vps3 und Vps8 zunächst ausschließlich in der Mutterzelle sichtbar, erschienen später jedoch an beiden MTOCs. Die gemeinsame Lokalisierung mit Nma1 beschränkte sich auf das MTOC selbst und erreichte nicht die Nma1-markierten, astralen Mikrotubuli. Farbwahl: linke Abb. Nma1 magenta, Vps3 grün; rechte Abb. Nma1 grün, Vps8 magenta. Colokalisierung zeigt sich durch weißes Signal. Maßstab: 10 µm, Mikroskop 1. Gezeigt sind Aufnahmen verschiedener Zellen.

### 3.4.2. Frühe Endosomen begleiten in *U. maydis* den Spindelpolkörper und die mitotische Spindel

In Vorarbeiten konnte bereits eine Colokalisierung von Nma1 und Rab5a während verschiedener Mitosestadien gezeigt werden (Obhof, 2017). Ergänzend dazu legte die gezeigte Colokalisierung von Nma1 und Komponenten des CORVET-Komplexes (Abb. 60) eine Funktion von Nma1 mit den frühen Endosomen während dieser Zellteilungsstadien nahe. Durch die gemeinsame Lokalisierung von Rab5a mit etablierten Markerproteinen für mitotische Vorgänge wurde die Rolle der Rab5a-positiven Endosomen während der Mitose weiterführend untersucht (Abb. 61). Tub1-markierte Mikrotubuli ermöglichten eine Visualisierung der mitotischen Spindel (UKS135: AB31 *gfp:rab5a*, *P<sub>otef</sub>:mCherry:tub1*). Im Übergang von der Interphase zur Prophase kondensierte das Rab5a-Signal am Sprosshals zwischen Mutter- und Tochterzelle. Parallel dazu begannen die Mikrotubuli ebenfalls zu kondensieren und wurden im Verlauf der Prophase in die Tochterzelle hineingezogen, um sich dort in einem Punkt zu sammeln. Während der Metaphase waren die Rab5a-positiven Endosomen nicht mit den Mikrotubuli assoziiert, sondern lagen bewegungslos im Zytoplasma verteilt vor. Zum Ende der Metaphase drehte sich die Spindel um etwa 90° und begann sich zurück in Richtung Mutterzelle zu elongieren. Während der Anaphase, nachdem die Spindel den Sprosshals durchquert hatte, wurden die Rab5a-Endosomen zurück an die Spindel rekrutiert und blieben mit den Polen der Spindel während der weiteren Elongation im Übergang zur Telophase verbunden. Hauptsächlich waren die Endosomen dabei statisch an den Polen lokalisiert und begleiteten deren Extension, gelegentlich konnte jedoch beobachtet werden, wie Endosomen entlang der mitotischen Spindel die Zelle wechselten. Während der Ausbildung der astralen Mikrotubuli am MTOC der Spindelpolkörper konnte weiterhin eine Verbindung der Endosomen mit dem MTOC, jedoch auch die Wiederaufnahme der endosomalen Transportvorgänge entlang des sich rekonstruierenden Mikrotubulizytoskeletts entdeckt werden. Durch sämtliche mitotische Phasen hinweg konnten immobile Rab5a-positive Endosomen im Zytoplasma nachgewiesen werden. Durch die Colokalisierung von Rab5a mit dem Spindelpolkörper-Marker Tub2 (UKS132: AB31 *gfp:rab5a*, *tub2:rfp*) konnten die beobachteten Prozesse genauer eingeordnet werden. So konnte beobachtet werden, dass der Spindelpolkörper in der späten Interphase aus der Mitte der Mutterzelle zum Sprosshals ohne die Beteiligung

von Rab5a gelangte. Vor Eintritt in den Sprosshals (Übergang Prophase) sammelten sich jedoch Rab5a-Endosomen am Spindelpolkörper und begleiteten diesen in die Tochterzelle. Wie bereits für die Tub1-visualisierte Spindel gezeigt werden konnte, waren Rab5a-positive Endosomen während der Metaphase nicht mit dem sich replizierenden Spindelpolkörper assoziiert. Auch die frühen Elongationsschritte der Spindel, welche an den beiden Polen von den Spindelpolkörpern begleitet wurde, liefen ohne Rab5a ab. Nachdem die Mitosespindel den Sprosshals zurück in Richtung Mutterzelle passierte, lokalisierte Rab5a erneut an beiden Spindelpolkörpern bis zur Ausbildung der astralen Mikrotubuli in der Telophase.

Ergebnisse

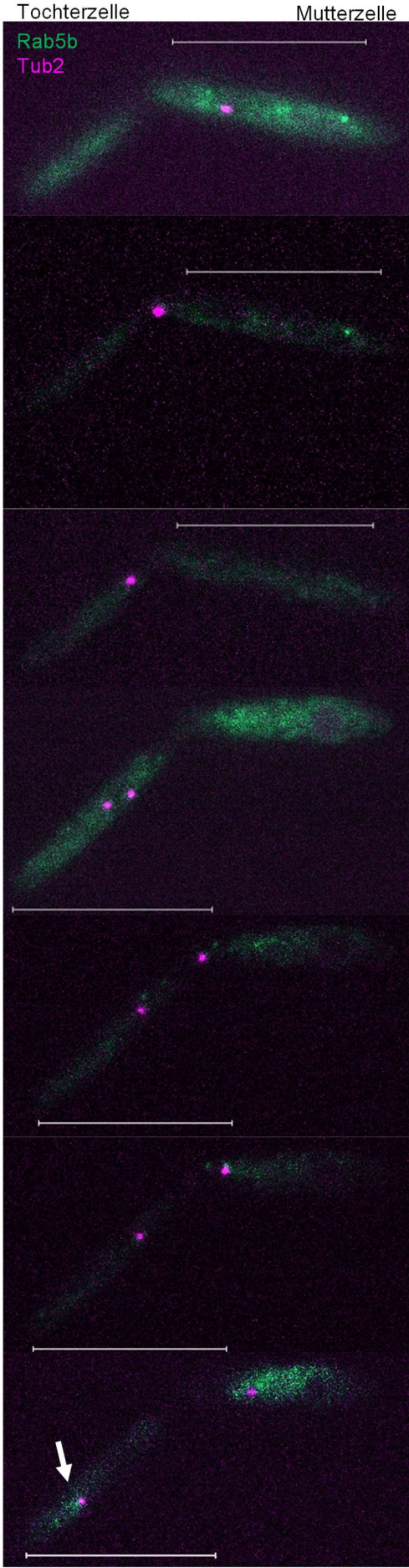
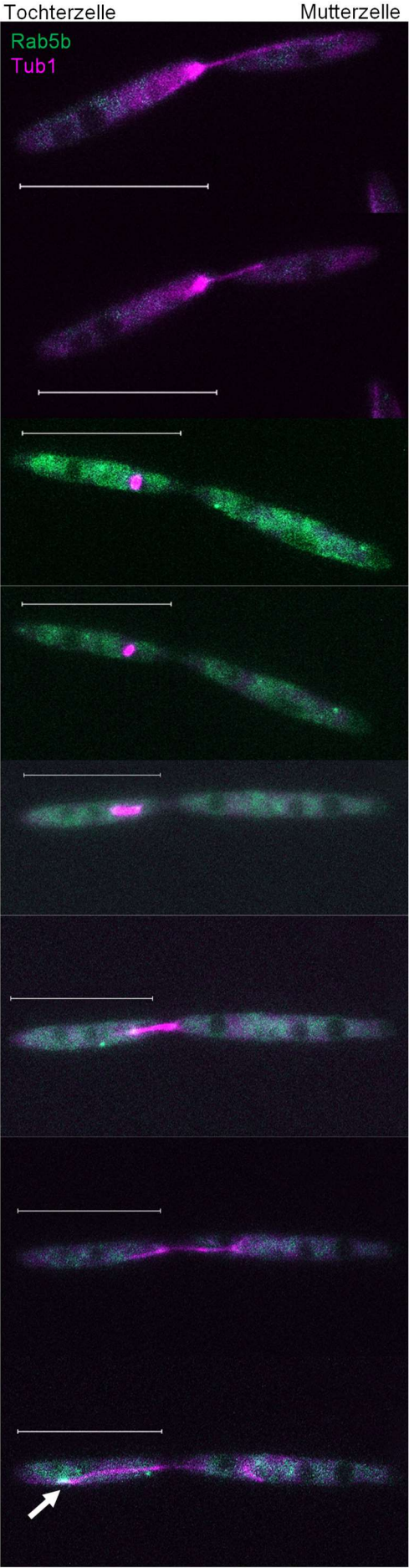


**Abb. 61: Rab5a begleitet die mitotische Spindel am Spindelpolkkörper**

Zwischen Interphase und Prophase kondensierten Rab5a-Signale gemeinsam mit Tub1-markierten Mikrotubuli (links) am Sprosshals zwischen Mutter- und Tochterzelle und wurden in der Prophase in die Tochterzelle hineingezogen, um dort in einem Punkt zu akkumulieren. Durch die Colokalisierung von Rab5a mit dem Spindelpolkkörper durch Tub2 (rechts) konnte beobachtet werden, dass der Spindelpolkkörper in der späten Interphase aus der Mitte der Mutterzelle zum Sprosshals ohne Beteiligung von Rab5a gelangte. Vor Eintritt in den Sprosshals (Übergang Prophase) sammelten sich jedoch Rab5a-Endosomen am Spindelpolkkörper und begleiteten diesen in die Tochterzelle. In der Metaphase waren die Endosomen nicht mit den Mikrotubuli assoziiert, sondern lagen immobil im Zytoplasma vor. Die Spindel drehte sich zum Abschluss der Metaphase um 90° und elongierte zurück in Richtung Mutterzelle. Während der Anaphase, nach Passage des Sprosshalses, kehrten die Endosomen an die Spindel zurück und blieben mit den Spindelpolkörpern an den Polen assoziiert. Einige Endosomen wanderten entlang der mitotischen Spindel. Während der Ausbildung der astralen Mikrotubuli in der Telophase waren die Endosomen weiterhin mit dem MTOC verbunden, jedoch erfolgte zeitgleich die Wiederaufnahme der endosomalen Transportvorgänge entlang des wiederaufgebauten Mikrotubulizytoskeletts. Während sämtlicher mitotischer Phasen lagen immobile Rab5a-positive Endosomen im Zytoplasma vor. Farbwahl: Tub1/Tub2 magenta, Rab5a grün, Überlagerung der Signale zeigt sich in weiß. Maßstab: 10 µm. Darstellung von verschiedenen Zellen, analysiert durch Mikroskop 1.

Die Lokalisierung von Nma1, Vps3, Vps8 und Rab5a während der Mitose gab Anlass zu der Vermutung, dass die Endosomen allgemein an mitotischen Vorgängen beteiligt sind. Um zu analysieren, ob dieser Vorgang spezifisch für Rab5a-Endosomen war oder ob alle Endosomenpopulationen eine Funktion während der Mitose erfüllen, wurde zum Vergleich Rab5b betrachtet. Analog zu den Studien von Rab5a wurde Rab5b gemeinsam mit den Tub1-markierten Mikrotubuli (UKS480: AB31 *gfp:rab5b*, *P<sub>otef</sub>:mCherry:tub1*) und dem Tub2-markierten Spindelpolkkörper (UKS348: AB31 *gfp:rab5b*, *tub2:rfp*) untersucht (Abb. 62). Während der Kondensierung des Mikrotubulizytoskeletts in der Prophase konnten keine klaren Rab5b-Signale an den Mikrotubuli oder im Zytoplasma detektiert werden. Im Gegensatz zu Rab5a (Abb. 61) konnte auch keine Beteiligung von Rab5b am Transport des Spindelpolkörpers von der Mutter- in die Tochterzelle beobachtet werden. Während der Metaphase erschienen vereinzelte Rab5b-Signale auf punktuellen Strukturen im Zytoplasma. Auch die Elongation der Spindel in der Anaphase verlief ohne gemeinsame Lokalisierung von Rab5b mit den Mikrotubuli oder den Spindelpolkörpern. Während in der Telophase die astralen Mikrotubuli ausgebildet wurden, waren in der Tochterzelle Akkumulationen von Rab5b an den Spindelpolkörpern vorzufinden. Im Vergleich zu Rab5a zeigte Rab5b jedoch deutlich weniger Beteiligung an den mitotischen Vorgängen zwischen Prophase und Telophase.

Ergebnisse

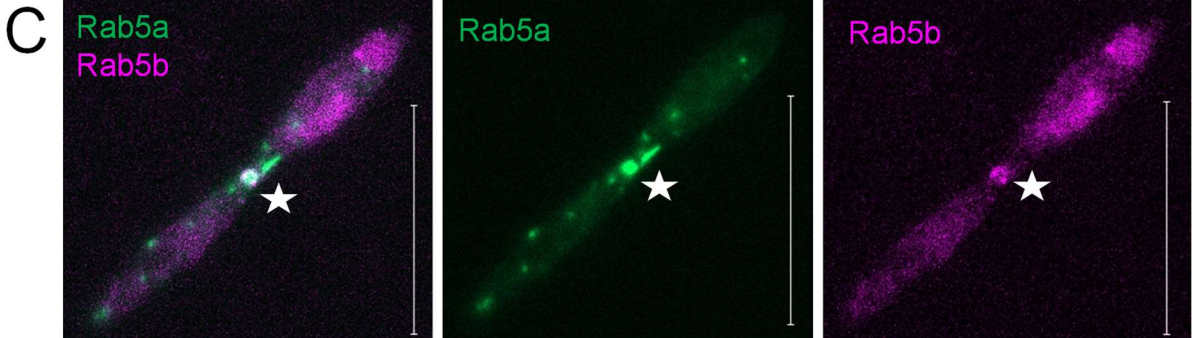
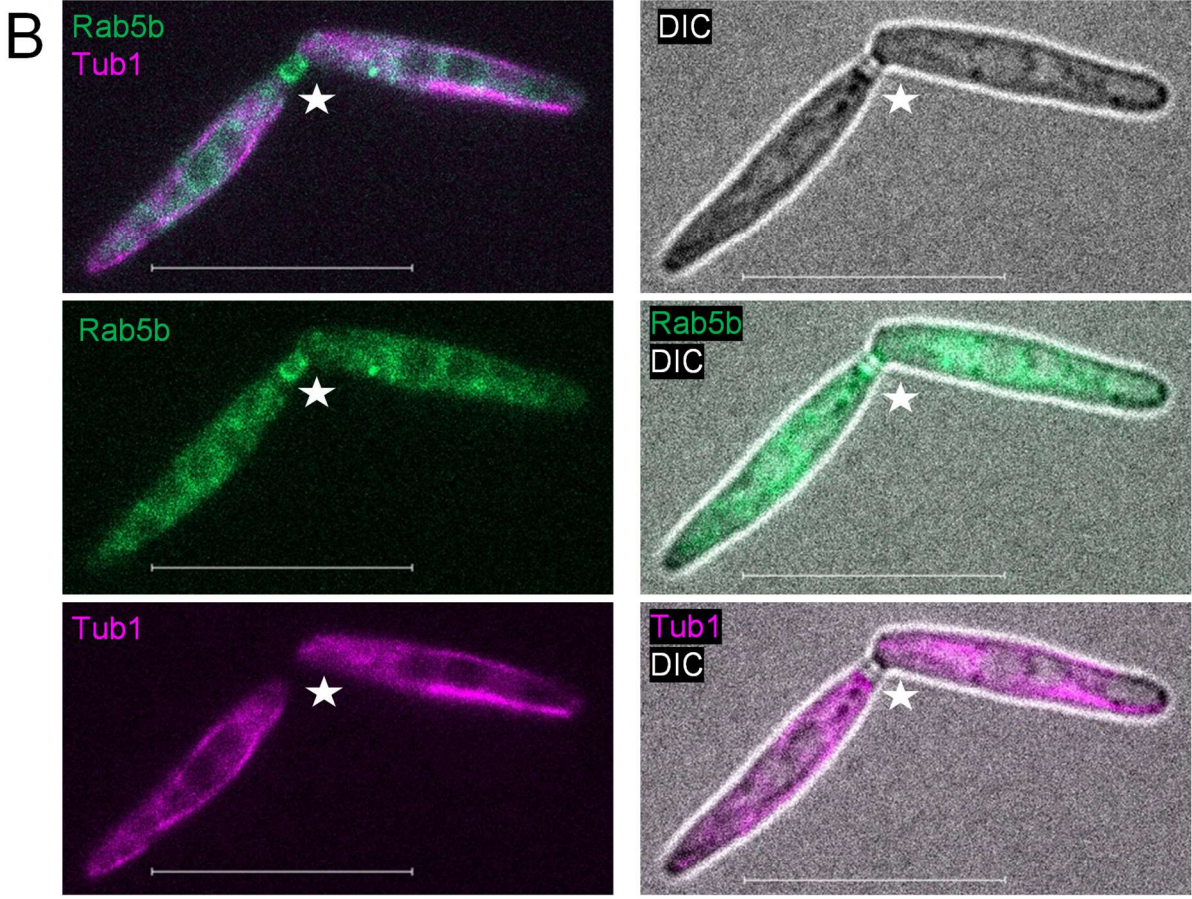
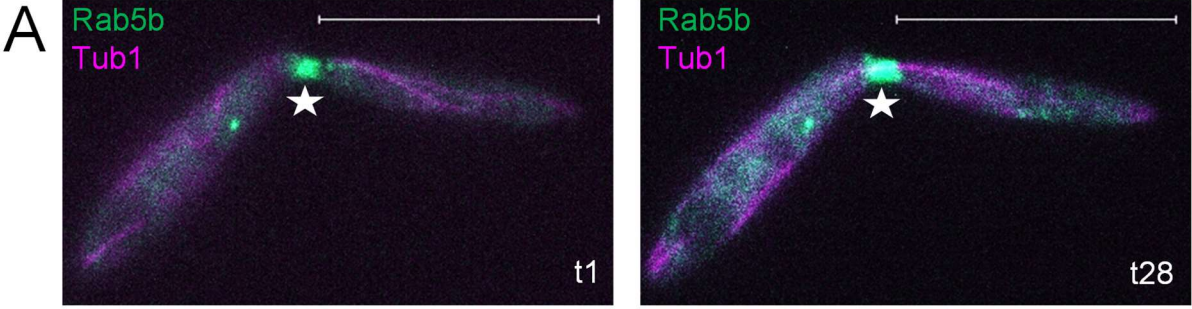


**Abb. 62: Rab5b wird erst in der Telophase an die mitotische Spindel rekrutiert**

Während das Mikrotubulizytoskelett in der Prophase kondensierte, konnten keine klaren Rab5b-Signale an den Mikrotubuli (links) oder im Zytoplasma beobachtet werden. Gleichzeitig erfolgte auch der Transport des Spindelpolkörpers (rechts) von der Mutter- in die Tochterzelle ohne Beteiligung von Rab5b. Während der Metaphase erschienen vereinzelte Rab5b-Signale auf deutlichen vesikulären Strukturen im Zytoplasma, welche weder mit den Spindelmikrotubuli noch mit den Spindelpolkörpern assoziiert waren. Während in der Telophase die Ausbildung der astralen Mikrotubuli erfolgte, waren in der Tochterzelle Akkumulationen von Rab5b an den Spindelpolkörpern vorzufinden (Pfeil). Farbwahl: Tub1/Tub2 magenta, Rab5b grün, Überlagerung der Signale zeigt sich in weiß. Maßstab: 10 µm. Darstellung von verschiedenen Zellen, analysiert durch Mikroskop 1.

Statt einer hauptsächlichlichen Beteiligung der Rab5b-Endosomen an der mitotischen Teilung konnte ein aktiver Transport mit resultierender zunehmender Akkumulation von Rab5b-Signalen an den Sprosshals nach Abschluss der mitotischen Telophase beobachtet werden (Abb. 63). Durch eine Colokalisierung mit Tub1 (UKS480: *AB31 gfp:rab5b*, *P<sub>otef</sub>:mCherry:tub1*) konnte in dieser Phase der Zellteilung gezeigt werden, dass Rab5b an der Zytoplasmabrücke zwischen Mutter- und Tochterzelle die beiden Zellpole markierte, während sich das Mikrotubulizytoskelett bereits vollständig separiert auf beide Zellen verteilt hatte. Im Gegensatz zu der Signalintensität von Rab5b während der mitotischen Teilung (vgl. Abb. 62) konnte während der Zytokinese eine deutliche Zunahme des Rab5b-Signals beobachtet werden (nicht quantifiziert). Eine Colokalisierung von Rab5a und Rab5b (UKS273: *AB31 gfp:rab5a*, *mCherry:rab5b*) während der Zytokinese (Abb. 63C) zeigte, dass beide Rab5-GTPasen in dieser Phase gemeinsam an der Zytoplasmabrücke lokalisiert waren.

Ergebnisse





**Abb. 63: Rab5a und Rab5b lokalisieren an der Zytoplasmabrücke während der Zellteilung**

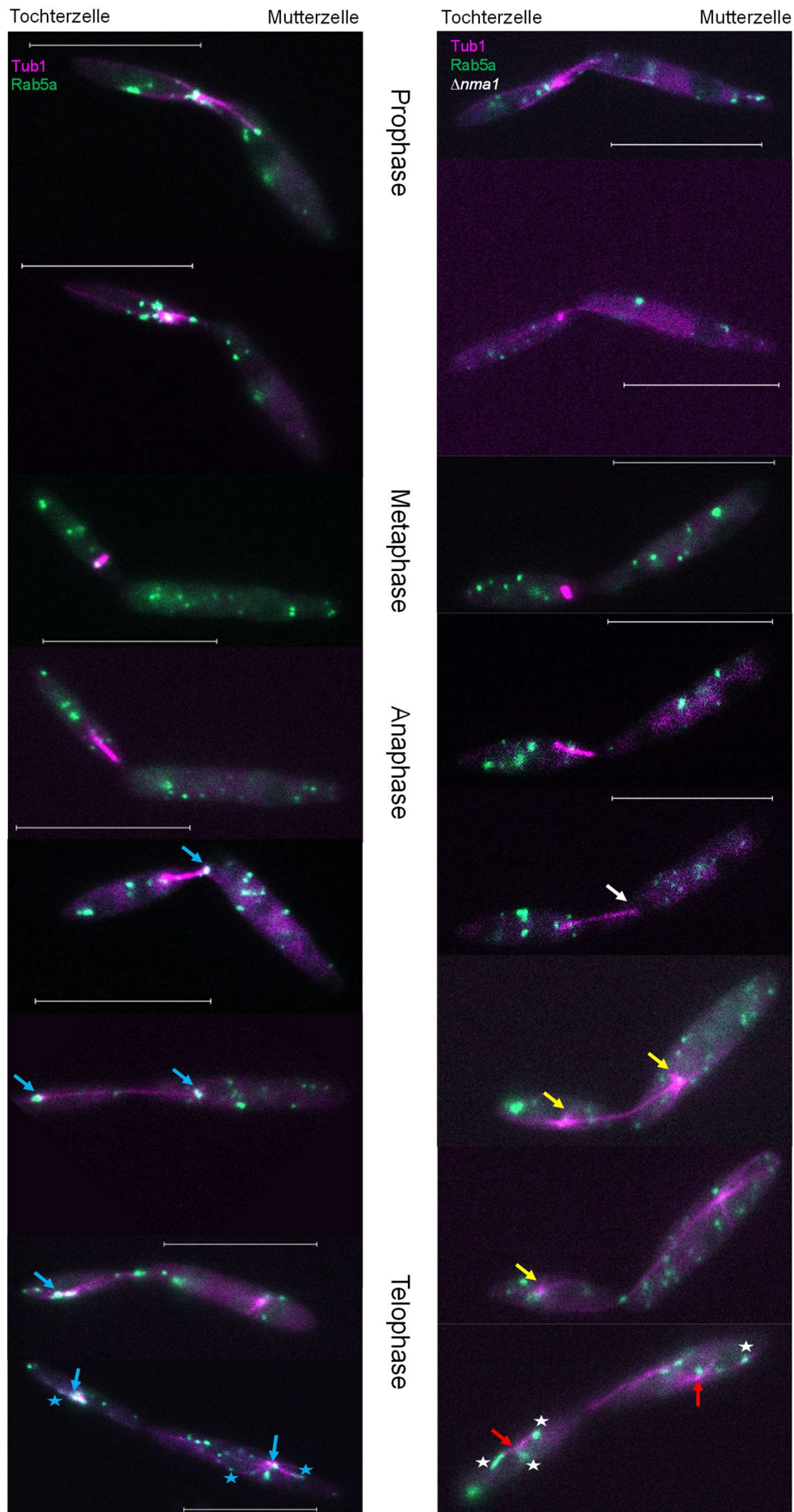
**A)** Nach Abschluss der Telophase erfolgte ein aktiver Transport mit resultierender zunehmender Akkumulation von Rab5b-Signalen an den Sprosshals (Stern). Zeit  $t$  in sek. **B)** Colokalisierung von Tub1 mit Rab5b und der Vergleich der Fluoreszenzkanäle mit der DIC-Aufnahme zeigte, dass Rab5b an der Zytoplasmabrücke zwischen Mutter- und Tochterzelle (Stern) die beiden Zellpole markierte, während sich das Mikrotubulizytoskelett bereits vollständig separiert in beiden Zellen neu gebildet hatte. **C)** Eine Colokalisierung von Rab5a und Rab5b während der Zytokinese zeigte, dass beide GTPasen in dieser Phase gemeinsam am Sprosshals (Stern) lokalisiert waren. Farbwahl: Tub1 magenta, Rab5a/Rab5b grün, Überlagerung der Signale zeigt sich in weiß. Maßstab: 10  $\mu\text{m}$ . Die Analysen erfolgten mit Mikroskop 1.

3.4.3. Nma1 ist involviert in der Rekrutierung der Rab5a-Endosomen an die Spindel

In den bisherigen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass Nma1 während der mitotischen Teilung gemeinsam mit verschiedenen Komponenten der endozytotischen Maschinerie an den Polen der mitotischen Spindel lokalisiert ist (Obhof, 2017 und diese Arbeit). Die Funktion dieser gemeinsamen Lokalisierung war jedoch bisher unbekannt. Vorarbeiten zeigten, dass eine Deletion von *nma1* keinen Einfluss auf das Mikrotubulizytoskelett und die Mitosespindel, das Abstreifen der Kernhülle oder die korrekte Verteilung der Zellkerne hatte (Obhof, 2017). Um einen Zusammenhang zwischen der Colokalisierung von Nma1 und den frühen Endosomen zu beobachten, wurde die Assoziation von Rab5a mit der Tub1-markierten mitotischen Spindel in einem  $\Delta nma1$ -Hintergrund (UKS173: AB31 *gfp:rab5a*,  $P_{otef}$ :*mCherry:tub1*,  $\Delta nma1$ ) mit dem Wildtyp (UKS135: AB31 *gfp:rab5a*,  $P_{otef}$ :*mCherry:tub1*) verglichen (Abb. 64). Die Kondensierung der Mikrotubuli in der Metaphase erfolgte im Wildtyp, wie bereits beschrieben, mit Rab5a-Assoziation. Durch die Deletion von *nma1* schien die Beteiligung von Rab5a-Endosomen an der Mikrotubulikondensierung reduziert. Die ersten Elongationsschritte der Mitosespindel im Übergang zur Anaphase erfolgten in den Deletionsstämmen, wie bereits für den Wildtyp beobachtet, ohne Rab5a-Endosomen. Nachdem der Pol der Mitosespindel, welcher Richtung Mutterzelle orientiert war, den Sprosshals zurück in die Mutterzelle durchquert hatte, erfolgte im Wildtyp eine gemeinsame Lokalisierung des Spindelpols mit Rab5a. Im weiteren Verlauf lokalisierte Rab5a auch am Spindelpol in der Tochterzelle. Diese Rekrutierung von Rab5a an die Spindelpole konnte in  $\Delta nma1$ -Zellen nicht beobachtet werden (N=7). Stattdessen konnte im Vergleich zum Wildtyp, basierend auf visueller Analyse der Spindellänge, eine frühzeitige Ausbildung von astralen Mikrotubuli an den Spindelpolen von  $\Delta nma1$ -Stämmen festgestellt werden. Erst bei der Wiederaufnahme der endosomalen Transportprozesse am sich rekonstruierenden

## Ergebnisse

Mikrotubulizytoskelett in der Telophase waren die Rab5a-Endosomen wieder mit den Mikrotubuli assoziiert. Im Gegensatz zum Wildtyp war jedoch nach wie vor keine Colokalisierung mit dem Zentrum der sich ausbildenden astralen Mikrotubuli in der *nma1*-Deletion zu beobachten. Die Rab5a-Signale befanden sich lediglich auf den davon ausgehenden astralen Mikrotubuli selbst. Im Wildtyp wurde in Zellen vergleichbarer Stadien sowohl eine Lokalisierung mit dem MTOC (vgl. Colokalisierung mit Tub2 in Abb. 61) als auch die Wiederaufnahme des Endosomentransports entlang der astralen Mikrotubuli beobachtet. Demzufolge war spezifisch die Rekrutierung von Rab5a-Endosomen an die Spindelpole durch die Deletion von *nma1* beeinträchtigt und nicht die endosomalen Transportvorgänge entlang des Mikrotubulizytoskeletts.



## Ergebnisse

### **Abb. 64: Die Assoziation von Rab5a-Endosomen mit den Spindelpolen ist abhängig von Nma1**

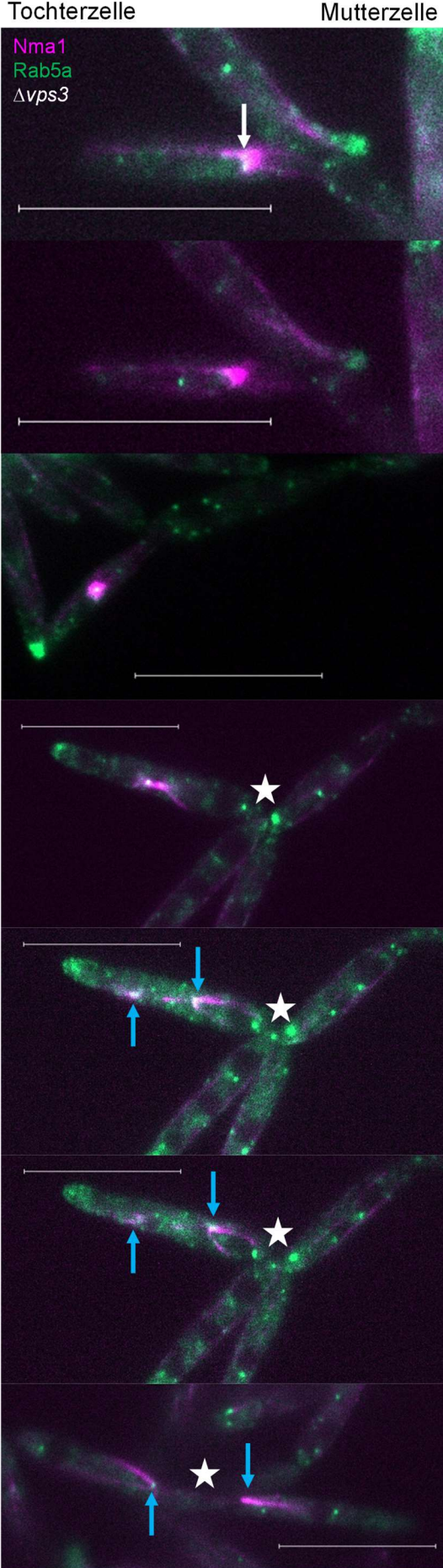
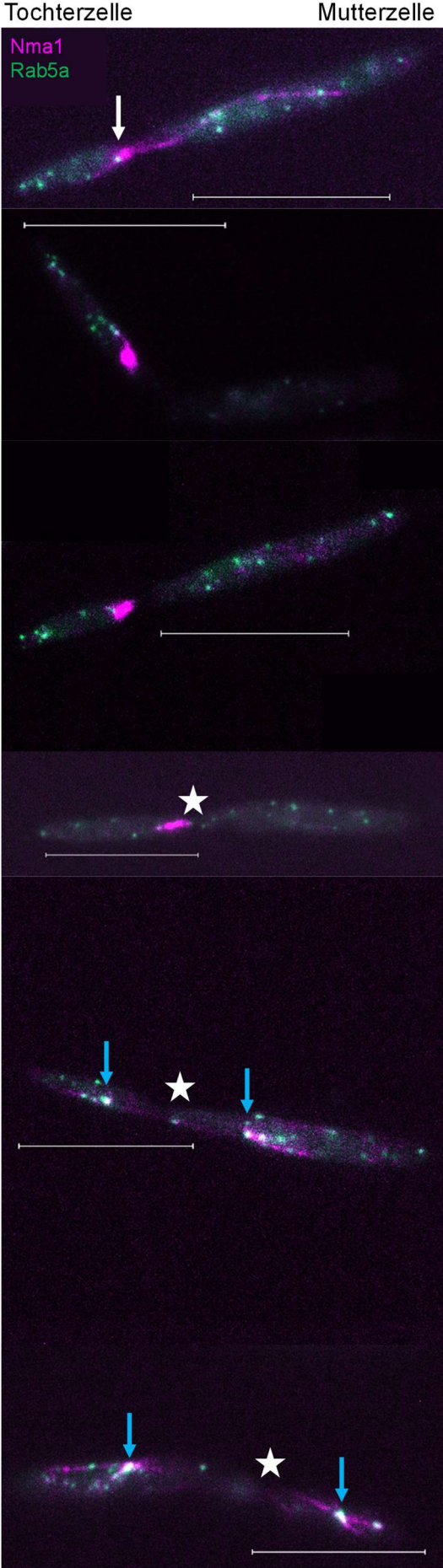
Analyse der Assoziation von Rab5a mit der Tub1-markierten mitotischen Spindel in einem  $\Delta nma1$ -Hintergrund (rechts) im Vergleich mit dem Wildtyp (links). Die Kondensierung der Mikrotubuli in der Metaphase erfolgte im Wildtyp unter Beteiligung von Rab5a-Endosomen. In  $\Delta nma1$ -Stämmen waren nur geringfügig Rab5a-Endosomen mit den kondensierenden Mikrotubuli lokalisiert. Die initiale Elongation der Mitosespindel im Übergang zur Anaphase erfolgte in den Deletionsstämmen und im Wildtyp ohne Rab5a-Assoziation. Nachdem der Pol der Mitosespindel in Richtung Mutterzelle den Sprosshals durchquert hatte, erfolgte im Wildtyp eine gemeinsame Lokalisierung des Spindelpols mit Rab5a (blauer Pfeil). Im weiteren Verlauf lokalisierte Rab5a auch an dem Spindelpol in der Tochterzelle (blauer Pfeil). Diese Verbindung von Rab5a mit den Spindelpolen fehlte in  $\Delta nma1$ -Zellen (weißer Pfeil). Stattdessen konnte, basierend auf vergleichende Beobachtung der Spindellänge, eine frühzeitige Ausbildung von astralen Mikrotubuli an den Spindelpolen von  $\Delta nma1$ -Stämmen analysiert werden (gelbe Pfeile). Erst bei der Rekonstitution der endosomalen Transportprozesse am Mikrotubulizytoskelett in der Telophase waren die Rab5a-Endosomen wieder mit den Mikrotubuli assoziiert (Sterne). Im Gegensatz zum Wildtyp, war jedoch keine Colokalisierung mit dem Zentrum der sich ausbildenden astralen Mikrotubuli in der  $nma1$ -Deletion zu beobachten (rote Pfeile), die Rab5a-Signale befanden sich lediglich auf den Mikrotubulienläufern (weiße Sterne). Im Wildtyp wurde in Zellen vergleichbarer Stadien sowohl eine Lokalisierung mit dem MTOC (blaue Pfeile) (vgl. Colokalisierung mit Tub2 in Abb. 61) als auch die Wiederaufnahme des Endosomentransports entlang der astralen Mikrotubuli (blaue Sterne) beobachtet. Farbwahl: Tub1 magenta, Rab5a grün, Überlagerung der Signale zeigt sich in weiß. Maßstab: 10  $\mu\text{m}$ . Darstellung von verschiedenen Zellen, analysiert durch Mikroskop 1. Darstellung der Wildtypzellen wurde partiell bereits für den Vergleich in Abb. 61 herangezogen.

### 3.4.4. Die mitosephasenabhängige Rekrutierung von Rab5a-Endosomen an die Mitosespindel basiert auf der Interaktion mit Vps3

Um den Mechanismus, mit dem Nma1 an der Rekrutierung von Rab5a-Endosomen an die Spindel beteiligt ist, genauer zu untersuchen, wurde der Einfluss der Deletion von *vps3*, dem Bindeglied zwischen der Interaktion von Nma1 mit den Rab5a-Endosomen (vgl. Kapitel 3.3.5), auf ihre Interaktion an der Mitosespindel analysiert. Dazu wurde die gemeinsame Lokalisierung von Nma1 und Rab5a in der Wildtypsituation (UKS176: AB31 *gfp:rab5a, nma1:3xmCherry*) während der Mitose verfolgt und mit einem  $\Delta vps3$ -Stamm (UKS381: AB31 *gfp:rab5a, nma1:3xmCherry, \Delta vps3*) verglichen (Abb. 65). Im Wildtyphintergrund wurde die Assoziation von Rab5a-Endosomen während der Prophase mit den Nma1-markierten, kondensierenden Mikrotubuli beobachtet. Diese Colokalisierung wurde durch die Deletion von *vps3* nicht beeinträchtigt. In der Metaphase und während der beginnenden Spindelelongation in der Anaphase wurden in Wildtypzellen keine Rab5a-Endosomen an der Mitosespindel festgestellt. Im  $\Delta vps3$ -Hintergrund waren wenige Rab5a-Signale auch während der Metaphase mit der kondensierten Spindel assoziiert und blieben auch in frühen Elongationsschritten während der Anaphase mit der Spindel verbunden. Ob die Abwesenheit von Rab5a in diesen Mitosephasen, wie sie im Wildtyp zu beobachten ist, eine regulatorische Funktion erfüllt, bedarf

weiterführender Untersuchungen. In den Deletionsstämmen wurden jedoch an den Spindelpolen bereits in der frühen Anaphase kurze astrale Mikrotubuli ausgebildet. Bei Erreichen der Telophase und dem Ausbilden der langen astralen Mikrotubuli wurde im Wildtyp die schon zuvor beobachtete Assoziation von Rab5a mit dem MTOC und die Wiederaufnahme der endosomalen Transportvorgänge entlang des sich rekonstituierenden Mikrotubulizytoskeletts festgestellt. Durch die Deletion von *vps3* erfolgte zwar ebenfalls eine Spindelelongation und die Ausbildung von langen astralen Mikrotubuli, an welchen Rab5a-Endosomen lokalisierten, jedoch wurde dabei der Sprosshals von der Mitosespindel zurück in Richtung Mutterzelle erst im Anschluss durchquert. Durch die beobachteten unstimmgigen Zeitabläufe in der Spindelelongation im Hinblick auf die Ausbildung von astralen Mikrotubuli und dem Durchqueren des Sprosshalses entstand jedoch keine Fehlverteilung der Zellkerne. Es wurden jeweils 100 Zellen des Wildtyps und 100 Zellen mit  $\Delta vps3$ -Hintergrund durch DAPI-Färbung analysiert, wobei ausschließlich Sporidien mit je einem Zellkern oder frühe Mitosestadien ohne Zellkern identifiziert wurden (Daten nicht gezeigt). Die  $\Delta vps3$ -Zellen zeigten den bereits in Vorarbeiten beschriebenen Zytokinesedefekt (Schneider, 2016).

Ergebnisse



**Abb. 65: Die Deletion von *vps3* beeinträchtigt die Mitosespindel**

In Wildtypzellen (links) wurde in der Prophase die Colokalisierung von Rab5a-Signalen mit den Nma1-markierten, kondensierenden Mikrotubuli beobachtet (weißer Pfeil). Diese Assoziation von Nma1 und Rab5a wurde durch die Deletion von *vps3* (rechts) nicht beeinträchtigt (weißer Pfeil). Während der Metaphase und der initialen Spindelelongation in der Anaphase war in Wildtypzellen keine Rab5a-Colokalisierung mit der Mitosespindel nachweisbar. In  $\Delta vps3$ -Stämmen lokalisierten wenige Rab5a-Signale auch während der Metaphase mit der kondensierten Spindel und blieben in ersten Elongationsschritten während der Anaphase mit der Spindel verbunden. Durch die Deletion von *vps3* wurden an den Spindelpolen bereits in der frühen Anaphase kurze astrale Mikrotubuli ausgebildet. Bei Erreichen der Telophase und dem Ausbilden der langen astralen Mikrotubuli erfolgte im Wildtyp die schon zuvor beobachtete Assoziation von Rab5a mit dem MTOC und die Wiederaufnahme der endosomalen Transportvorgänge entlang des sich rekonstituierenden Mikrotubulizytoskeletts (blaue Pfeile). Durch die Deletion von *vps3* erfolgte zwar ebenfalls eine Spindelelongation und die Ausbildung von langen astralen Mikrotubuli, welche mit Rab5a colokalisierten (blaue Pfeile), die Mitosespindel jedoch durchquerte den Sprosshals (Stern) zurück in Richtung Mutterzelle erst im Anschluss. Farbwahl: Nma1 magenta, Rab5a grün, Überlagerung der Signale zeigt sich in weiß. Darstellung von verschiedenen Zellen, analysiert mit Mikroskop 1. Maßstab: 10  $\mu\text{m}$ .

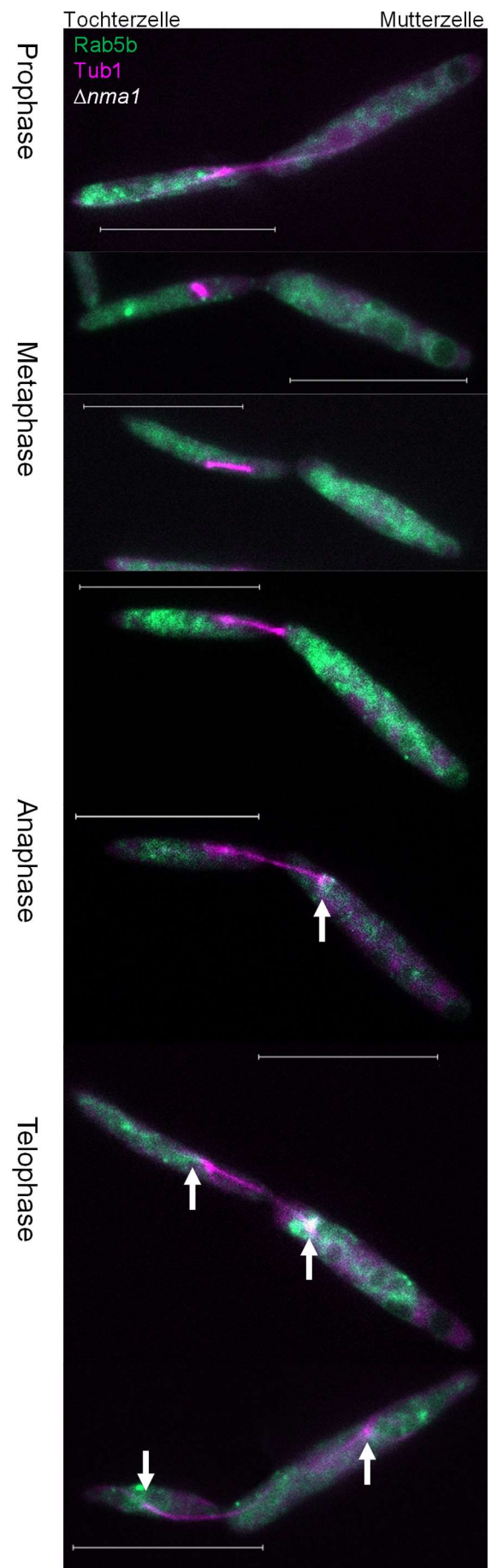
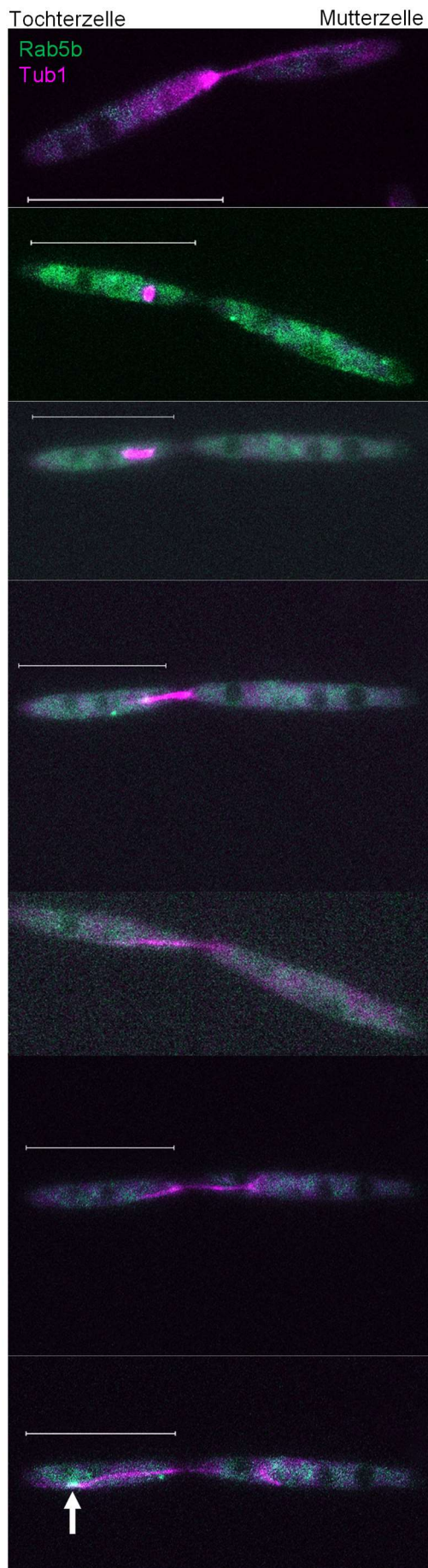
3.4.5. Rab5b wird im  $\Delta nma1$ -Hintergrund früher an die Mitosespindel rekrutiert

Durch die Deletion von *nma1* wurde eine fehlerhafte Rekrutierung der Rab5a-positiven frühen Endosomen an die Mitosespindel ausgelöst (vgl. Abb. 64). Dennoch wurde keine morphologische Auswirkung auf die Zellen in Form eines Zytokinesedefektes oder eine Beeinträchtigung der mitotischen Teilung beobachtet. Da eine partielle Funktionsübernahme von Rab5b im Falle einer *rab5a*-Deletion erfolgt (vgl. Kapitel 3.1.5), wurde die Lokalisierung von Rab5b-Endosomen während der mitotischen Teilung untersucht. Rab5b-Endosomen sind im Wildtyphintergrund erst in späteren Stadien der Spindelelongation mit den Spindelpolen assoziiert. Eine mögliche Erklärung für das Ausbleiben eines Effektes der Misslokalisierung von Rab5a-Endosomen während der Mitose durch die *nma1*-Deletion wäre eine Funktionsübernahme durch Rab5b. Dazu wurde die Lokalisierung von Rab5b und den Tub1-markierten Mikrotubuli im Wildtyp-Hintergrund (UKS480: AB31 *gfp:rab5b*, *P<sub>otef</sub>:mCherry:tub1*) mit einer *nma1*-Deletion (UKS615: AB31 *gfp:rab5b*, *P<sub>otef</sub>:mCherry:tub1*,  $\Delta nma1$ ) verglichen (Abb. 66). Im Wildtyphintergrund erfolgte eine Assoziation von Rab5b-Signalen mit den Spindelpolen erst bei der Ausbildung der astralen Mikrotubuli. Während den übrigen Mitosestadien war das Rab5b-Signal überwiegend zytoplasmatisch lokalisiert. Im  $\Delta nma1$ -Hintergrund wurden Rab5b-positive Endosomen in Verbindung mit dem kondensierenden Mikrotubulizytoskelett detektiert. Die Rekrutierung von Rab5b-positiven Endosomen an die Pole der Mitosespindel wurde im Vergleich mit dem Wildtyp zu einem früheren Zeitpunkt beobachtet. Hier lokalisierten erste schwache Signalansammlungen an den

## Ergebnisse

Spindelpolen, sobald die Mitosespindel den Sprosshals zurück in Richtung Mutterzelle passiert hatte. Dies spiegelt den Zeitpunkt wider, zu dem im Wildtyphintergrund die Rekrutierung der Rab5a-Endosomen an die Spindelpole erfolgt (vgl. Abb. 64).





## Ergebnisse

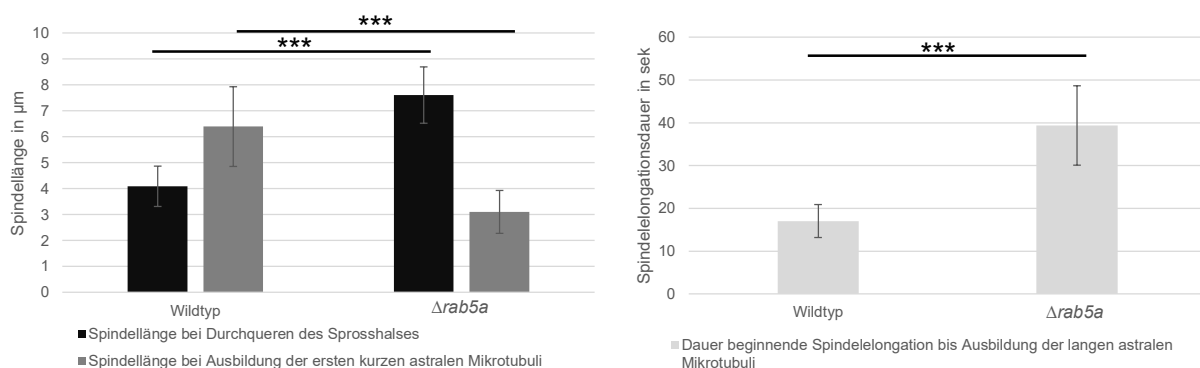
### **Abb. 66: Durch die *nma1*-Deletion erfolgt eine verfrühte Rekrutierung von Rab5b an die Mitosespindel**

Vergleich der Lokalisierung von Rab5b und Tub1-markierten Mikrotubuli im Wildtyp-Hintergrund (links) und einer *nma1*-Deletion (rechts). Im Wildtyp waren Rab5b-positive Endosomen erst bei der Ausbildung der astralen Mikrotubuli mit den Spindelpolen assoziiert (Pfeil). Während den übrigen Mitosestadien war das Rab5b-Signal überwiegend zytoplasmatisch lokalisiert. Die Abbildungen des Wildtyps wurden ebenfalls in Abb. 62 als Vergleich herangezogen. Im  $\Delta nma1$ -Hintergrund wurde eine Ansammlung von Rab5b-Signalen während der Mikrotubulikondensation in der Prophase festgestellt. Außerdem waren Rab5b-Signale an den Polen der Mitosespindel (Pfeile) zu beobachten, sobald die Mitosespindel den Sprosshals zurück in Richtung Mutterzelle passiert hatte. Rab5b-Endosomen begleiteten im *nma1*-Deletionshintergrund die Spindelelongation. Farbwahl: Tub1 magenta, Rab5b grün, Überlagerung der Signale zeigt sich in weiß. Analyse mit Mikroskop 1. Darstellung verschiedener Zellen. Maßstab: 10  $\mu\text{m}$ .

### 3.4.6. Rab5a ist wichtig für die Stabilität der Mitosespindel

Die fehlerhafte Lokalisierung von Rab5a-Endosomen an der Mitosespindel im  $\Delta nma1$ -Hintergrund wurde durch eine frühzeitige Rekrutierung von Rab5b-Endosomen ausgeglichen (vgl. Abb. 66). Um die Notwendigkeit der Lokalisierung von frühen Endosomen an den Polen der Mitosespindel zu verstehen, wurden  $\Delta rab5a$ -Zellen während der Mitose analysiert (Abb. 67). Hierfür wurden Stämme verwendet, in welchen die Mikrotubuli sowohl durch Tub1 als auch durch Nma1 markiert waren (UTO208: AB31 *nma1:3xgfp*, *P<sub>otef</sub>:mCherry:tub1*,  $\Delta rab5a$ ). Hierbei konnte, wie bereits in Vorarbeiten gezeigt, bestätigt werden, dass die Assoziation von Nma1 mit der Mitosespindel unabhängig von Rab5a erfolgt (Obhof, 2017). In Zellen, die den bereits beschriebenen  $\Delta rab5a$ -Zytokinesedefekt zeigten (vgl. Abb. 17), konnte eine mit dem Wildtyp (UNP2: AB31 *nma1:3xgfp*, *P<sub>otef</sub>:mCherry:tub1*) vergleichbare Kondensierung der Mikrotubuli zu Beginn der Metaphase beobachtet werden. Beim Übergang in die Anaphase, die sich in Wildtypzellen durch eine beginnende Auffächerung des Nma1-Signals an den Spindelpolen nach Durchqueren des Sprosshalses zurück in die Mutterzelle auszeichnete, zeigten sich jedoch Differenzen. In den  $\Delta rab5a$ -Stämmen begannen die Nma1-Signale bereits vor der Sprosshalspassage an beiden Polen auszustrahlen. Die dabei erreichte Spindellänge (Abb. 67) zum Zeitpunkt der ersten Ausbildung kurzer astraler Mikrotubuli war in  $\Delta rab5a$ -Zellen im Vergleich mit dem Wildtyp signifikant verkürzt ( $p$ -Wert  $5,64 \cdot 10^{-6}$ ), da deren Ausbildung bereits begann, während sich beide Spindelpole noch in der Tochterzelle befanden. Die Spindeln waren bei der Ausbildung dieser ersten astralen Mikrotubuli an den Spindelpolen im Wildtyp durchschnittlich 6,39  $\mu\text{m}$  lang dagegen in den Deletionsstämmen 3,1  $\mu\text{m}$  (jeweils  $N=10$ ). Dadurch ergab sich eine Reduktion der Spindellänge bei Ausbildung der kurzen

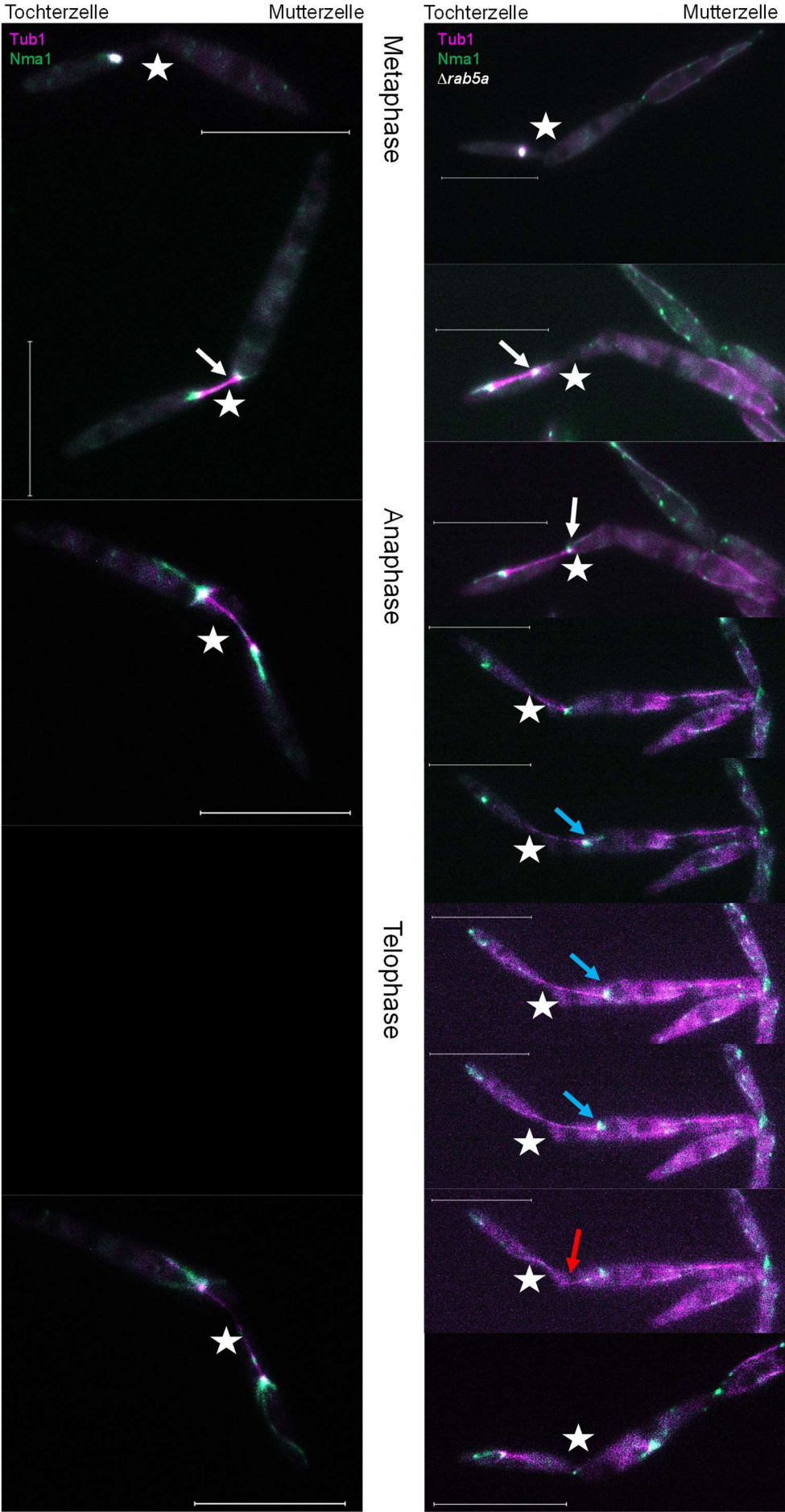
astralen Mikrotubuli um fast 50 % in den  $\Delta rab5a$ -Zellen. In den Deletionsstämmen erreichte die Spindel erst mit zunehmender Länge den Sprosshals. Bei Durchwandern des Sprosshalses hatten die Spindeln in den Deletionsstämmen etwa eine Länge von 7,6  $\mu\text{m}$ , während im Wildtyp der Spindelpol bereits mit etwa 4,09  $\mu\text{m}$  Länge der Spindel in die Mutterzelle eintrat (jeweils N=10). Dieser Unterschied wurde als signifikant eingestuft (p-Wert  $6,75 \cdot 10^{-8}$ ). Nachdem ein Pol der Mitosespindel in den  $\Delta rab5a$ -Zellen den Sprosshals durchquert hatte, konnte eine Pendelbewegung des Spindelpols in der Mutterzelle, in Kombination mit wellenförmigen Krümmungen der Spindelmikrotubuli, beobachtet werden, bevor im Anschluss die astralen Mikrotubuli an den Spindelpolen ausgebildet wurden (Abb. 68). Die benötigte Zeitspanne zwischen beginnender Spindelelongation in der Anaphase bis zum Ausbilden der astralen Mikrotubuli in der Telophase war dabei in den Deletionsstämmen mit etwa 39 sek (N=10) im Vergleich mit dem Wildtyp mit etwa 17 sek (N=13) signifikant verlängert (p-Wert  $5,1 \cdot 10^{-6}$ ). Zusammenfassend wurde beobachtet, dass durch die *rab5a*-Deletion die Ausbildung der ersten astralen Mikrotubuli verfrüht und dadurch an kürzeren Spindeln begann. Die Spindelelongation in den Deletionsstämmen war insgesamt verlängert und die Spindeln passierten erst zu einem späteren Zeitpunkt den Sprosshals im Vergleich mit dem Wildtyp.



#### Abb. 67: Die Deletion von *rab5a* beeinträchtigt die Ausbildung der Mitosespindel

Im  $\Delta rab5a$ -Hintergrund begannen die Nma1-Signale bereits vor der Sprosshalspassage an beiden Polen auszustrahlen. Die Spindellänge zum Zeitpunkt der ersten Ausbildung kurzer astraler Mikrotubuli war dadurch in  $\Delta rab5a$ -Zellen mit 3,1  $\mu\text{m}$  im Vergleich mit dem Wildtyp mit 6,39  $\mu\text{m}$  signifikant verkürzt, da deren Ausbildung bereits in der Tochterzelle begann (linkes Diagramm, dunkelgrau). In den Deletionsstämmen erreichte die Spindel erst mit zunehmender Länge den Sprosshals. Dadurch hatten die Spindeln in den Deletionsstämmen bei Passage des Sprosshalses etwa eine Länge von 7,6  $\mu\text{m}$ , während im Wildtyp der Spindelpol bereits mit etwa 4,09  $\mu\text{m}$  Länge der Spindel in die Mutterzelle eintrat (linkes Diagramm, schwarz). Die benötigte Zeitspanne zwischen beginnender Spindelelongation in der Anaphase bis zum Ausbilden der astralen Mikrotubuli in der Telophase war dabei in den Deletionsstämmen mit etwa 39 sek im Vergleich mit dem Wildtyp mit etwa 17 sek signifikant verlängert (rechtes Diagramm). Signifikanz \* p-Wert<0,05 \*\* p-Wert<0,01 \*\*\* p-Wert<0,001.

Ergebnisse



**Abb. 68: Die Deletion von *rab5a* beeinflusst die Spindelelongation**

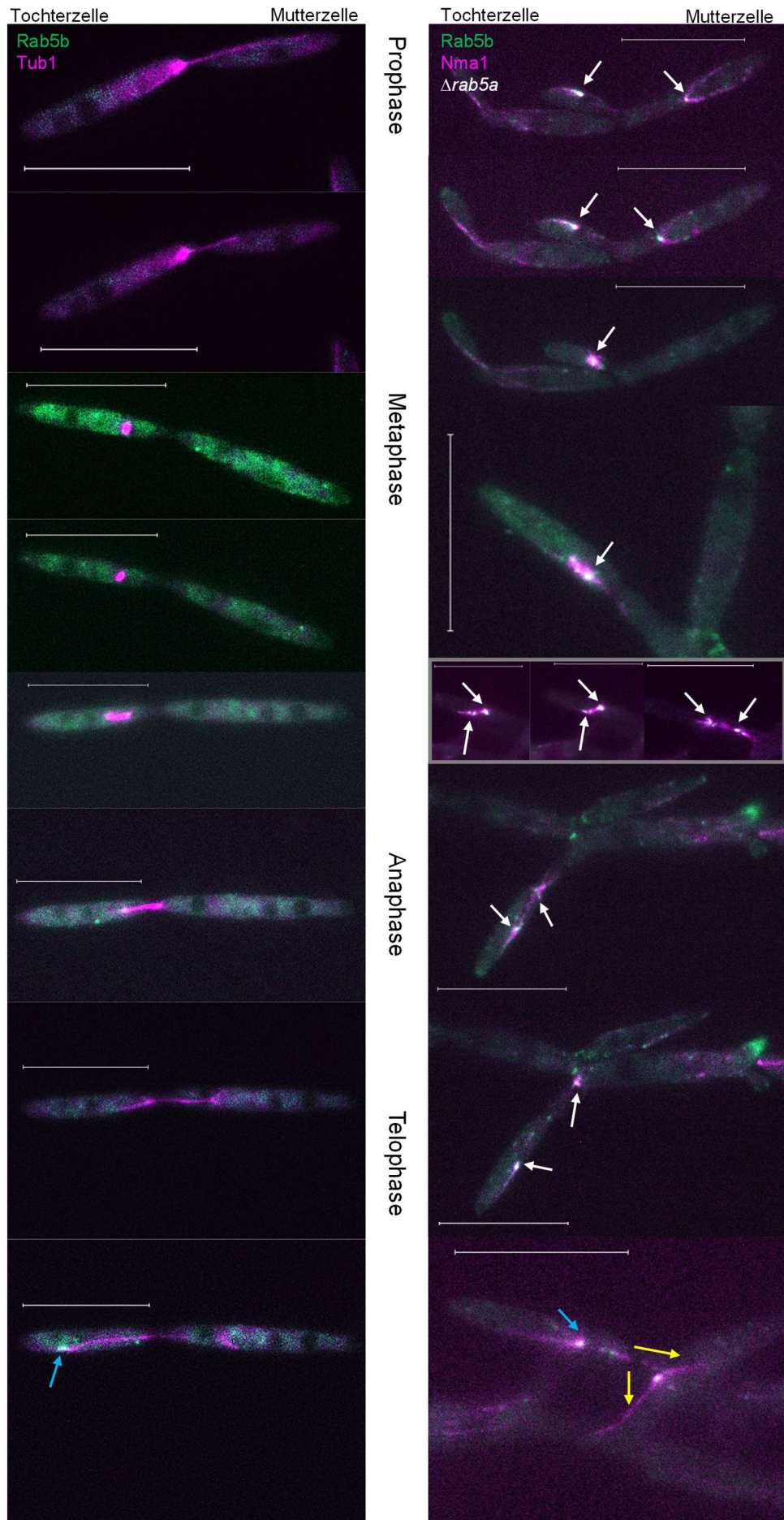
Die Assoziation von Nma1 mit der Mitosespindel erfolgt unabhängig von Rab5a (vgl. Obhof, 2017). Sowohl in  $\Delta rab5a$ -Zellen (rechts) als auch im Wildtyp (links) konnte eine vergleichbare Kondensierung der Mikrotubuli zu Beginn der Metaphase beobachtet werden. Beim Übergang in die Anaphase begann in Wildtypzellen das Nma1-Signal an den Spindelpolen nach Durchqueren des Sprosshalses (Stern) zurück in die Mutterzelle aufzufächern (weißer Pfeil). In den Deletionsstämmen konnte dieser Vorgang bereits vor der Sprosshalspassage an beiden Polen beobachtet werden (weißer Pfeil). In den Deletionsstämmen erreichte die Spindel erst mit zunehmender Länge den Sprosshals (Stern). Nachdem ein Pol der Mitosespindel in den  $\Delta rab5a$ -Zellen den Sprosshals durchquert hatte, konnte eine Pendelbewegung des Spindelpols in der Mutterzelle (blaue Pfeile), in Kombination mit wellenförmigen Krümmungen der Spindelmikrotubuli (roter Pfeil), beobachtet werden, bevor im Anschluss die astralen Mikrotubuli an den Spindelpolen ausgebildet wurden. Farbwahl: Tub1 magenta, Nma1 grün, Überlagerung der Signale zeigt sich in weiß. Maßstab: 10  $\mu\text{m}$ . Darstellung von verschiedenen Zellen, analysiert durch Mikroskop 1.

3.4.7. In der Abwesenheit von Rab5a begleitet Rab5b die Mitosespindel

Der Befund, dass die Doppeldeletion von *rab5a* und *rab5b* letal ist (vgl. Kapitel 3.1.3), könnte neben einer partiellen Komplementation der GTPasen bei endosomalen Transportvorgängen auch durch eine essenzielle Funktion von mindestens einem der beiden Proteine während der Mitose erklärt werden. Zur Überprüfung dieser Annahme wurde die Lokalisierung von Rab5b während der mitotischen Teilung im Wildtyp (UKS480: AB31 *gfp:rab5b*, *P<sub>otef</sub>:mCherry:tub1*) und im  $\Delta rab5a$ -Hintergrund (UKS294: AB31 *gfp:rab5b*, *nma1:3xmCherry*,  $\Delta rab5a$ ) verglichen (Abb. 69). In Wildtyp-Zellen konnte keine Rekrutierung von Rab5b-Endosomen an die kondensierenden Mikrotubuli in der Prophase festgestellt werden. Durch die Deletion von *rab5a* waren Rab5b-Signale mit den Mikrotubuli assoziiert und kondensierten gemeinsam in einem Punkt in der Tochterzelle. Rab5b blieb in den Deletionsstämmen während der gesamten Metaphase mit den Mikrotubuli verbunden, wohingegen im Wildtyp keinerlei Colokalisierung beobachtet wurde. Auch während der beginnenden Spindelelongation in der Anaphase und der Ausbildung der astralen Mikrotubuli zu Beginn der Telophase war im Wildtyp kein Rab5b-Signal mit der Spindel lokalisiert. Erst in der späten Telophase waren Rab5b-Endosomen mit den astralen Mikrotubuli assoziiert. Im Gegensatz dazu begleitete Rab5b die Mitosespindel im  $\Delta rab5a$ -Hintergrund kontinuierlich. Während der initialen Elongationsphase konnte jedoch trotz Rab5b-Lokalisierung an den Spindelmikrotubuli eine Desorientierung der Spindel beobachtet werden (nicht quantifiziert). Diese änderte mehrmals die Orientierung, bevor sie parallel zur Zellwand angeordnet blieb und die Ausbildung der ersten kurzen astralen Mikrotubuli einsetzte. Die Ausbildung dieser ersten astralen Mikrotubuli erfolgte in *rab5a*-Deletionszellen ausschließlich in der Tochterzelle, bevor

## Ergebnisse

die Spindel den Sprosshals zurück in Richtung Mutterzelle passierte. Es konnte ebenfalls eine erweiterte Ausbildung von astralen Mikrotubuli beobachtet werden, während sich der betroffene Spindelpol in der Sprosshalsregion befand. Nach dem Passieren des Sprosshalses teilte sich die Mitosespindel auf die beiden angrenzenden Zellen auf, so dass sie zu dieser Phase auf drei Zellen verteilt vorlag und weiterhin einen Elongationsvorgang ausführte. Durch den bereits beschriebenen Zytokinesedefekt der *rab5a*-Deletion (vgl. Abb. 17) blieben Sporidien in kettenförmigen Strukturen verbunden. Die hier beobachtete Aufteilung der Mitosespindel auf drei Zellen implizierte auch eine teilweise weiterhin bestehende Verbindung des Zytoplasmas von mehreren aneinanderhängenden Zellen. Rab5b war in dieser Phase vorwiegend mit den Zentren der sich ausbildenden astralen Mikrotubuli assoziiert.



## Ergebnisse

### **Abb. 69: Rab5b ist in Abwesenheit von Rab5a mit der Mitosespindel assoziiert**

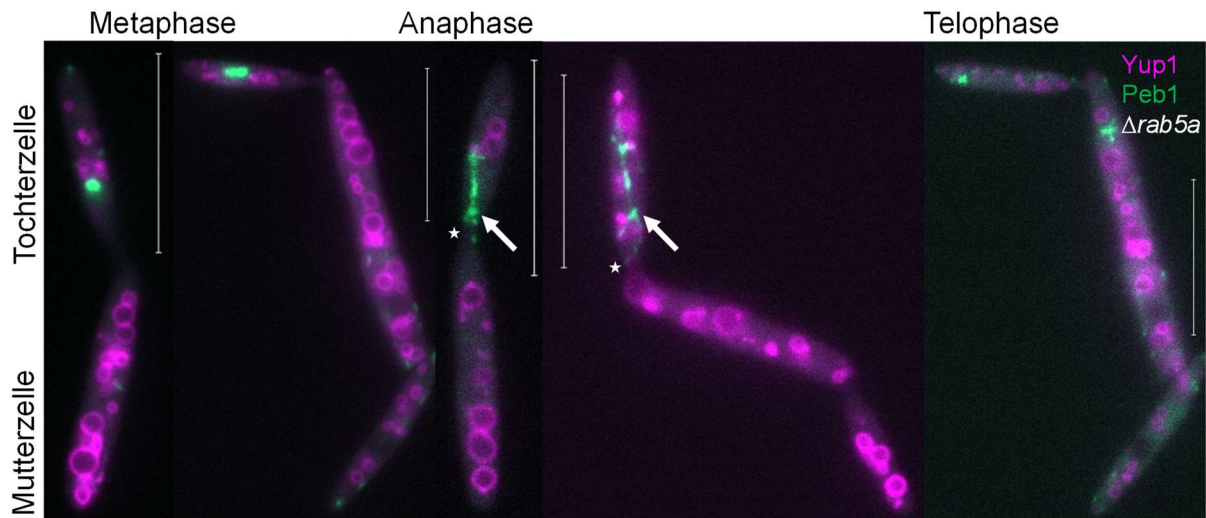
Im Wildtyp (links) war keine Assoziation von Rab5b-Endosomen an die kondensierenden Tub1-markierten Mikrotubuli in der Prophase, Metaphase oder Anaphase zu beobachten. Erst in der späten Telophase waren Rab5b-Endosomen mit den astralen Mikrotubuli assoziiert (blauer Pfeil). Durch die Deletion von *rab5a* (rechts) wurden Rab5b-Signale an die Mikrotubuli rekrutiert und kondensierten gemeinsam in einem Punkt in der Tochterzelle (weiße Pfeile). Rab5b blieb in  $\Delta rab5a$ -Stämmen während der gesamten Metaphase mit den Mikrotubuli verbunden (weiße Pfeile). Während den ersten Spindelelongationsschritten konnten jedoch trotz Rab5b-Lokalisierung an den Spindelmikrotubuli (weiße Pfeile) Orientierungsschwierigkeiten der Spindel beobachtet werden. Diese änderte mehrmals die Orientierung, bevor sie parallel zur Zellwand angeordnet blieb und erste kurze astrale Mikrotubuli noch in der Tochterzelle ausbildete (grauer Kasten). Die astralen Mikrotubuli elongierten, während sich der betroffene Spindelpol in der Sprosshalsregion befand. Rab5b war in diesen Phasen überwiegend mit dem Zentrum der astralen Mikrotubuli assoziiert (weiße Pfeile). Nach passieren des Sprosshalses teilte sich die Mitosespindel auf die beiden angrenzenden Zellen auf, so dass sie zu dieser Phase auf drei Zellen verteilt vorlag und weiterhin einen Elongationsvorgang ausführte (gelbe Pfeile). Die Zellen des Wildtyps wurden bereits als Vergleich in Abb. 62 verwendet. Farbwahl: Tub1/Nma1 magenta, Rab5b grün, Überlagerung der Signale zeigt sich in weiß. Darstellung von verschiedenen Zellen, analysiert durch Mikroskop 1. Maßstab: 10  $\mu\text{m}$ .

### 3.4.8. Die Deletion von *rab5a* verhindert die Beteiligung von Yup1-markierten Endosomen an der Mitose

Neben der beobachteten veränderten Lokalisierung von Rab5b-Endosomen durch die Deletion von *rab5a* wurde auch die Population der Yup1-positiven Endosomen untersucht. Für diese konnte in Vorarbeiten im Wildtyphintergrund eine mit Rab5a vergleichbare Assoziation mit den Spindelpolen während der mitotischen Teilungsvorgänge beschrieben werden (Obhof, 2017). Da Rab5a und Yup1 partiell auf frühen Endosomen colokalisieren (vgl. Abb. 29), waren weitere Analysen notwendig, um zu untersuchen, ob die Assoziation der Yup1-Endosomen mit der Mitosespindel durch Rab5a auf den Endosomenmembranen initiiert wird oder ob Yup1 unabhängig von Rab5a mit der Spindel assoziiert ist. Im Wildtyphintergrund wurde beschrieben, dass Yup1 während der gesamten Spindelelongation mit den Spindelpolen lokalisierte und bei der Wiederaufnahme der endosomalen Transportprozesse mit der Ausbildung der astralen Mikrotubuli entlang dieser motil war. Während allen Mitosestadien wurden zusätzliche punktuelle Lokalisierungen im Zytoplasma beobachtet (Obhof, 2017). Als Marker für die Mitosespindel wurde das mit dem Plusende der Mikrotubuli assoziierte Protein Peb1 verwendet und gemeinsam mit Yup1 im  $\Delta rab5a$ -Hintergrund (UKS599: AB31 *P<sub>tef</sub>:yup1:mCherry, peb1:gfp, \Delta rab5a*) analysiert (Abb. 70). Nachdem die Mikrotubuli in der Metaphase kondensiert waren, begann mit Übergang in die Anaphase die Spindelelongation. Dabei konnte erneut beobachtet werden, dass die Ausbildung der astralen Mikrotubuli an den Polen der Mitosespindel bereits vor Durchqueren des Sprosshalses initiiert wurde. Während der gesamten



Spindelelongation und der Ausbildung von astralen Mikrotubuli konnte keine Colokalisierung der Yup1-Signale mit der Mitosespindel festgestellt werden. Während der gesamten Mitose konnten zusätzlich statische Yup1-Signale auf ringförmigen Strukturen beobachtet werden.



**Abb. 70: Yup1-Endosomen lokalisieren ohne Rab5a nicht an den Spindelpolen während der Mitose**

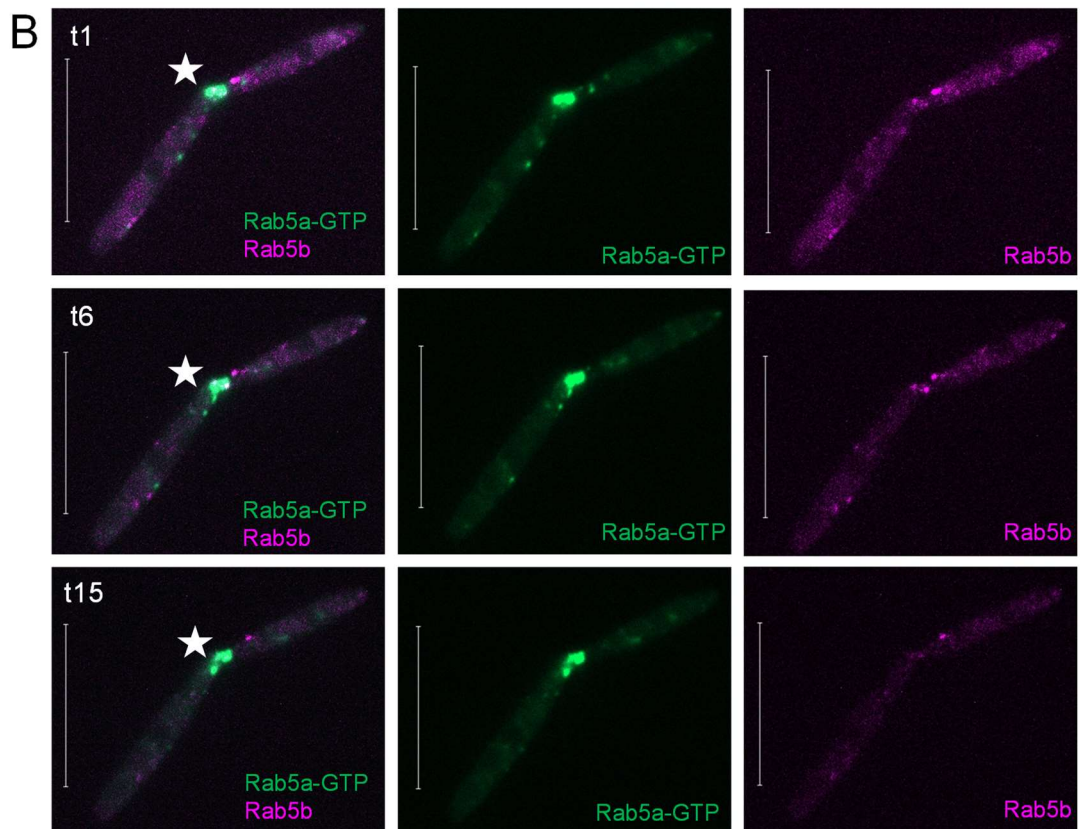
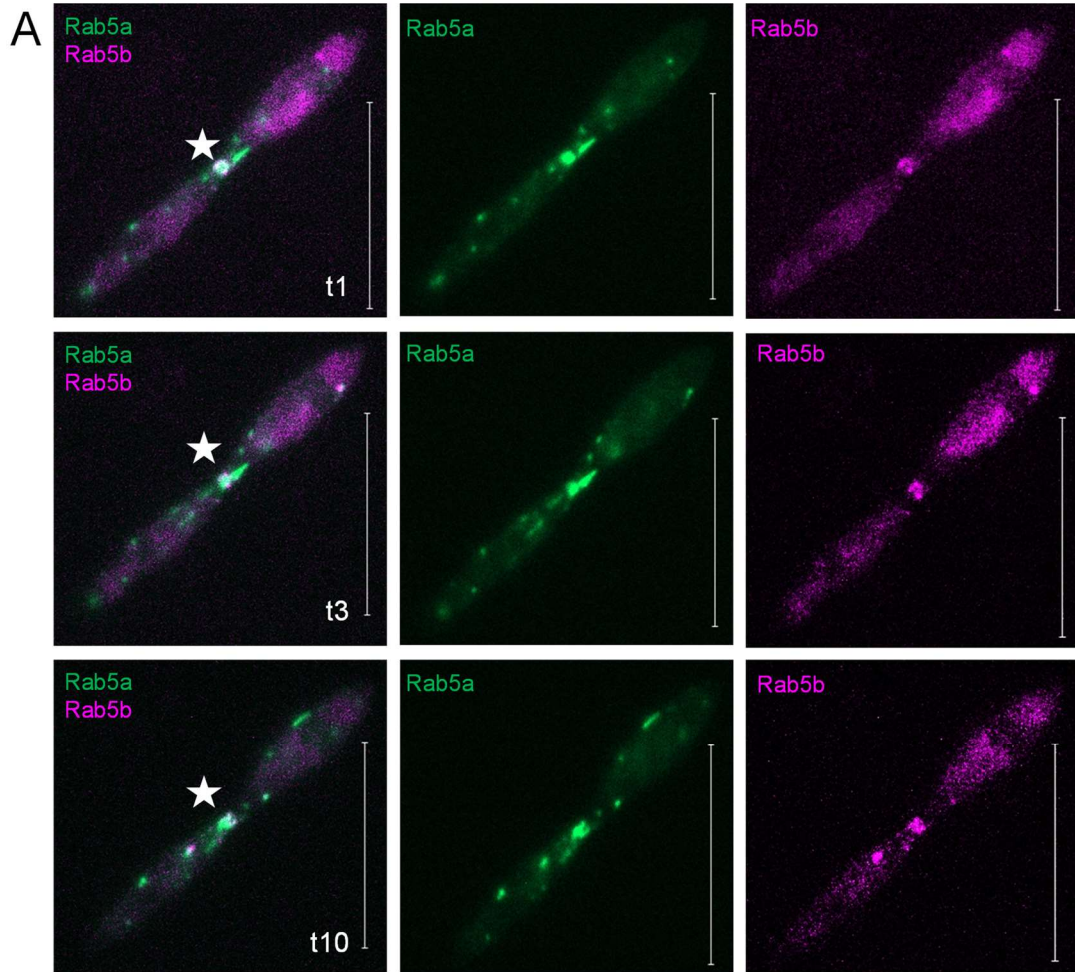
Nachdem in  $\Delta rab5a$ -Stämmen die Peb1-markierten Mikrotubuli in der Metaphase kondensiert waren, begann mit Übergang in die Anaphase die Spindelelongation. An den Polen der Mitosespindel (weißer Pfeil) wurde bereits vor Durchqueren des Sprosshalses (Stern) mit der Ausbildung der astralen Mikrotubuli begonnen. Während der Spindelelongationsphase und der Ausbildung der astralen Mikrotubuli fand keine Colokalisierung von Yup1-Endosomen mit der Mitosespindel statt. Yup1 lokalisierte ebenfalls während der gesamten Mitose auf ringförmigen Strukturen. Farbwahl: Yup1 magenta, Peb1 grün, Überlagerung der Signale zeigt sich in weiß. Maßstab: 10  $\mu\text{m}$ . Analyse durch Mikroskop 1.

### 3.4.9. Konstitutiv aktives Rab5a verdrängt Rab5b vom Sprosshals in der Zytokinese

Die Colokalisierung von Rab5a und Rab5b während der Zytokinese (vgl. Abb. 63) deuteten auf eine feinabgestimmte Regulation der Beteiligung beider GTPasen bei diesem Vorgang hin. Die Generierung und Analyse einer Mutante mit konstitutiv GTP-gebundenem, aktiven Rab5a, wurde bereits in Kapitel 3.1.7 beschrieben. Dabei konnte bereits ein kombinatorischer Effekt der Rab5a-GTP Mutation und der Deletion von *rab5b* bei der Zytokinese beobachtet werden (vgl. Abb. 28). In Rab5a-GTP  $\Delta rab5b$ -Stämmen separieren die Zellen nach der Zytokinese nicht. Um die Zusammenhänge zwischen dem Aktivitätsstatus von Rab5a und Rab5b aufzuklären, wurde die Lokalisierung von Rab5b in der Mutante mit konstitutiv aktivem

## Ergebnisse

Rab5a (UKS321: AB31 *gfp:rab5a<sup>Q90L</sup>, mCherry:rab5b*) im Vergleich mit dem Wildtyp (UKS273: AB31 *gfp:rab5a, mCherry:rab5b*) untersucht (Abb. 71). In Wildtypzellen erfolgte der bereits beschriebene Transport von Rab5a und Rab5b an die Zytoplasmabrücke in der Zytokinesephase und die Akkumulation beider Proteine im Sprosshals (vgl. Abb. 63). Die konstitutive Aktivierung von Rab5a beeinträchtigte nicht dessen Transport zum oder die Akkumulierung am Sprosshals. Stattdessen schien die dauerhafte GTP-Bindung von Rab5a die Akkumulation von Rab5b an der Zytoplasmabrücke zu verhindern. Es konnte nach wie vor ein Transport von Rab5b-positiven Vesikeln in Richtung der Zellgrenzen beobachtet werden, die im Wildtyp auftretende Ansammlung von Rab5b-Signal am Sprosshals blieb jedoch aus. Die Präsenz von Rab5a an dieser Stelle schien für die Zytokinese jedoch ausreichend zu sein, da durch die konstitutive Aktivierung keine Störung der Zellteilung hervorgerufen wurde.



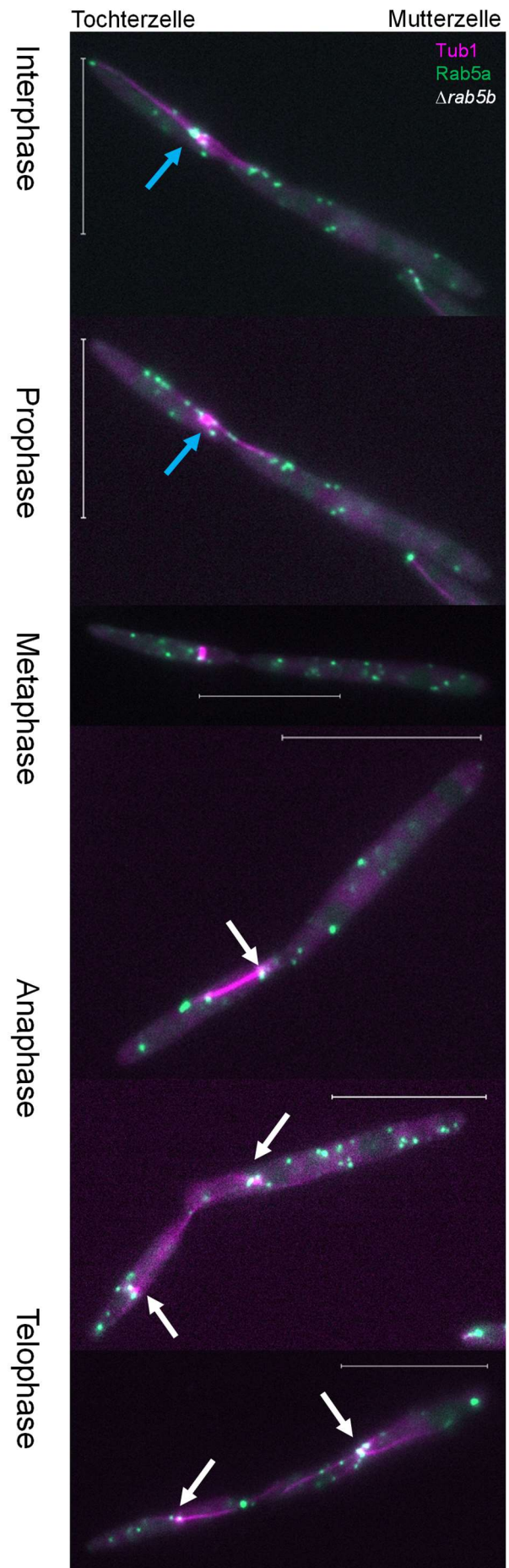
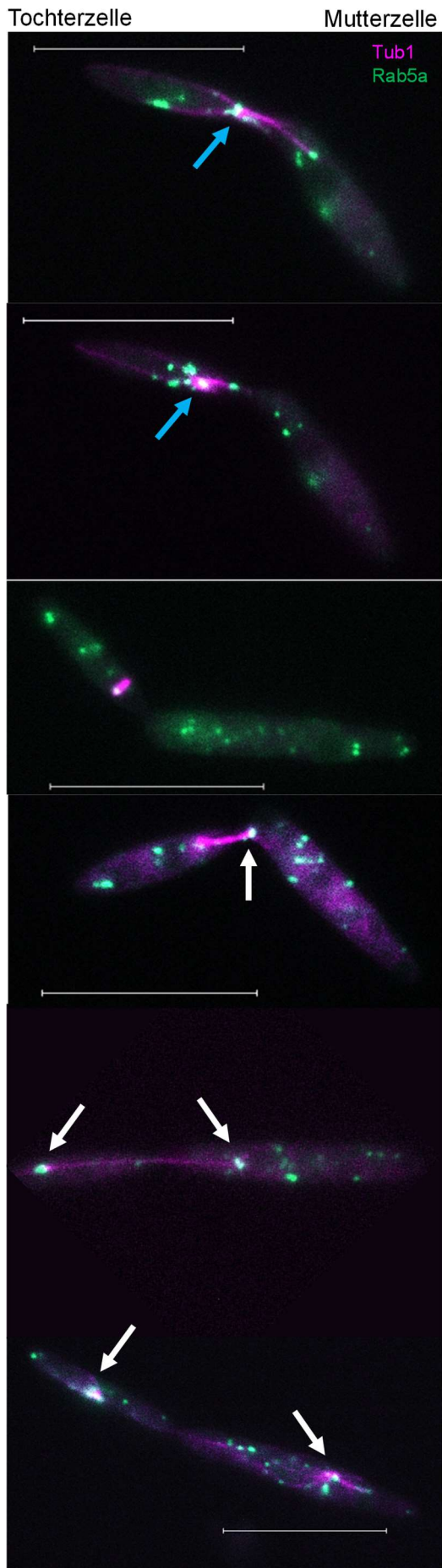
## Ergebnisse

### **Abb. 71: Die konstitutive Aktivierung von Rab5a verhindert die Akkumulation von Rab5b an der Zytoplasmabrücke für die Zytokinese**

**A)** In Wildtypzellen erfolgte der bereits beschriebene Transport von Rab5a und Rab5b an die Zytoplasmabrücke für die Zytokinese und die Akkumulation beider Proteine im Sprosshals (Stern). Teile dieser Abbildung wurden ebenfalls in Abb. 63 für die Darstellung der Wildtypsituation verwendet. **B)** Die konstitutive Aktivierung von Rab5a beeinträchtigte weder den Transport noch die Akkumulation am Sprosshals (Stern). Stattdessen verhinderte die dauerhafte GTP-Bindung von Rab5a die Akkumulation von Rab5b an der Zytoplasmabrücke. Es konnten weiterhin Transportvorgänge von Rab5b-positiven Vesikeln in Richtung der Zellgrenzen beobachtet werden, die im Wildtyp vorkommende Ansammlung von Rab5b-Signal am Sprosshals blieb jedoch aus. Farbwahl: Rab5b magenta, Rab5a-GTP grün, Überlagerung der Signale zeigt sich in weiß. Zeit t in sek. Maßstab: 10  $\mu$ m. Analysen erfolgten mit Mikroskop 1.

### 3.4.10. Die Deletion von *rab5b* hat keinen Einfluss auf die Assoziation von Rab5a mit der Mitosespindel

Die beobachteten Zusammenhänge zwischen Rab5a und Rab5b während der mitotischen Teilung lassen eine regulatorische Feinabstimmung zwischen den beiden GTPasen vermuten. Neben Colokalisierungen von Rab5a und Rab5b während der Ausbildung der astralen Mikrotubuli an der Mitosespindel (vgl. Abb. 61/63) und der Zytokinese (vgl. Abb. 63) wurden auch eine Beeinflussung von Rab5a auf Rab5b festgestellt. So führte die konstitutive Aktivierung von Rab5a zu einer Unterbindung der Rab5b-Lokalisierung an der Zytoplasmabrücke für die Zytokinese (vgl. Abb. 71). Im Gegensatz dazu wird Rab5b durch die *rab5a*-Deletion dazu stimuliert an der Mitosespindel zu lokalisieren (vgl. Abb. 69). Um eine gegenseitige Einflussnahme zu analysieren, erfolgte die Untersuchung der Lokalisierung von Rab5a während der Mitose im  $\Delta$ *rab5b*-Hintergrund. Die Lokalisierung von Rab5a und der Tub1-markierten Mitosespindel im Wildtyphintergrund (UKS135: AB31 *gfp:rab5a*, *P<sub>otef</sub>:mCherry:tub1*) wurde mit einer *rab5b*-Deletion (UKS616: AB31 *gfp:rab5a*, *P<sub>otef</sub>:mCherry:tub1*,  $\Delta$ *rab5b*) verglichen (Abb. 72). Sowohl im Wildtyp- als auch im  $\Delta$ *rab5b*-Hintergrund begleiteten Rab5a-positive Endosomen die Kondensierung des Mikrotubulizytoskeletts in der Tochterzelle. Während der Metaphase waren Rab5a-Signale nicht mit der Spindel assoziiert, sondern lokalisierten auf punktuellen Strukturen im Zytoplasma. Nachdem die Spindel in ihrer Elongationsphase den Sprosshals zurück in Richtung Mutterzelle durchquert hatte, lokalisierten Rab5a-Signale am Spindelpol in der Mutterzelle. Mit fortschreitender Elongation der Spindel waren Rab5a-positive Endosomen sowohl im Wildtyphintergrund als auch im  $\Delta$ *rab5b*-Hintergrund mit den Spindelpolen assoziiert. Durch die *rab5b*-Deletion wurde auch die Wiederaufnahme der endosomalen Transportvorgänge während der Ausbildung der astralen Mikrotubuli nicht beeinträchtigt.



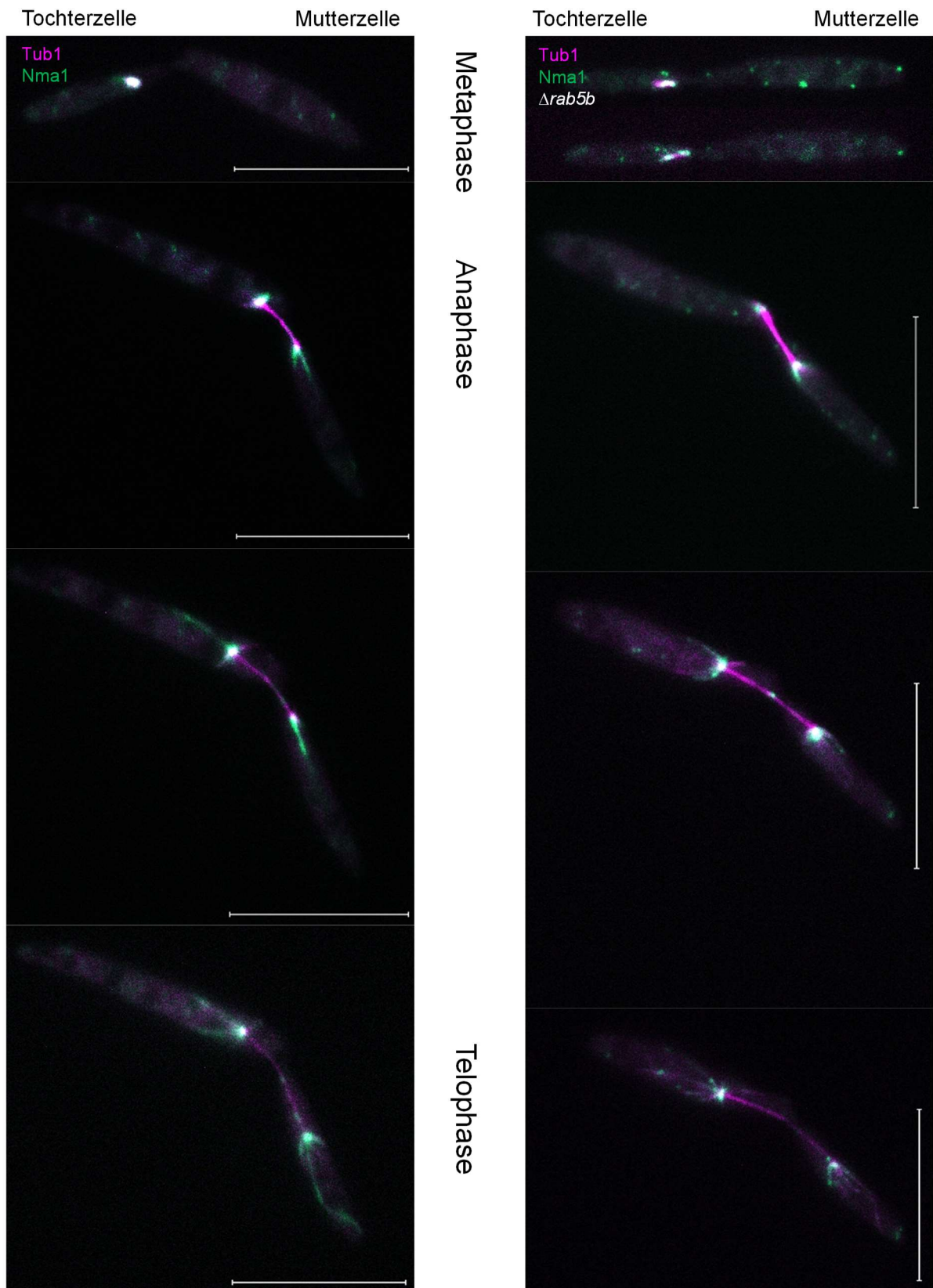
## Ergebnisse

### **Abb. 72: Die Lokalisierung von Rab5a an der Mitosespindel ist unabhängig von Rab5b**

Vergleich der Lokalisierung von Rab5a und der Tub1-markierten Mikrotubuli im Wildtyp-Hintergrund (links) im *rab5b*-Hintergrund (rechts). Sowohl im Wildtyp- als auch im  $\Delta rab5b$ -Hintergrund waren Rab5a-positive Endosomen während der Kondensierung des Mikrotubulizytoskeletts mit den Mikrotubuli assoziiert. Während der Metaphase waren Rab5a-Signale nicht an der Spindel lokalisiert, sondern auf punktuellen Strukturen im Zytoplasma. Nachdem die Spindel während der Elongation den Sprosshals zurück in Richtung Mutterzelle durchquert hatte, lokalisierten Rab5a-Endosomen am Spindelpol in der Mutterzelle (Pfeil). Mit fortschreitender Elongation der Spindel begleiteten Rab5a-positive Endosomen sowohl im Wildtyp- als auch im  $\Delta rab5b$ -Hintergrund die Spindelpole (Pfeile). Durch die *rab5b*-Deletion wurde auch die Rekonstitution der endosomalen Transportvorgänge während der Ausbildung der astralen Mikrotubuli nicht beeinträchtigt. Farbwahl: Tub1 magenta, Rab5a grün, Überlagerung der Signale zeigt sich in weiß. Darstellung von verschiedenen Zellen. Analyse der Zellen durch Mikroskop 1. Maßstab: 10  $\mu\text{m}$ .

### 3.4.11. Die Deletion von *rab5b* beeinträchtigt die mitotische Teilung nicht

Nachdem für die Deletion von *rab5a* bereits Auswirkungen auf die Spindelelongation gezeigt werden konnten, wurde auch der Einfluss der Deletion von *rab5b* auf diese Aspekte der Zellteilung analysiert. Dabei wurde zunächst die Mitosespindel durch Tub1-Markierung und die Assoziation von Nma1 mit den Spindelpolen im Wildtyp (UNP2: AB31 *nma1:3xgfp*, *P<sub>otef</sub>:mCherry:tub1*) mit einem *rab5b*-Deletionsstamm (URS5: AB31 *nma1:3xgfp*, *P<sub>otef</sub>:mCherry:tub1*,  $\Delta rab5b$ ) verglichen (Abb. 73). Die Colokalisierung von Nma1 mit den kondensierten Mikrotubuli oder die Verbindung mit den Polen der Mitosespindel war durch die Deletion von *rab5b* nicht beeinträchtigt. In der Metaphase zeigten  $\Delta rab5b$ -Stämme eine mit dem Wildtyp vergleichbare Kondensierung der Mikrotubuli. Die Spindel begann in der Anaphase zu elongieren und nachdem einer der Spindelpole den Sprosshals in Richtung Mutterzelle passiert hatte, konnten sowohl im Wildtyp als auch in den Deletionsstämmen die Ausbildung von kurzen astralen Mikrotubuli beobachtet werden. Diese kurzen astralen Mikrotubuli enthielten in beiden Stammhintergründen lediglich Nma1-Signal. Erst zum Abschluss der Telophase wurden lange astrale Mikrotubuli ausgebildet, die sowohl durch Nma1 als auch durch Tub1 markiert waren. Auch in dieser Phase konnte kein Unterschied zwischen dem Wildtyp und den  $\Delta rab5b$ -Zellen festgestellt werden.



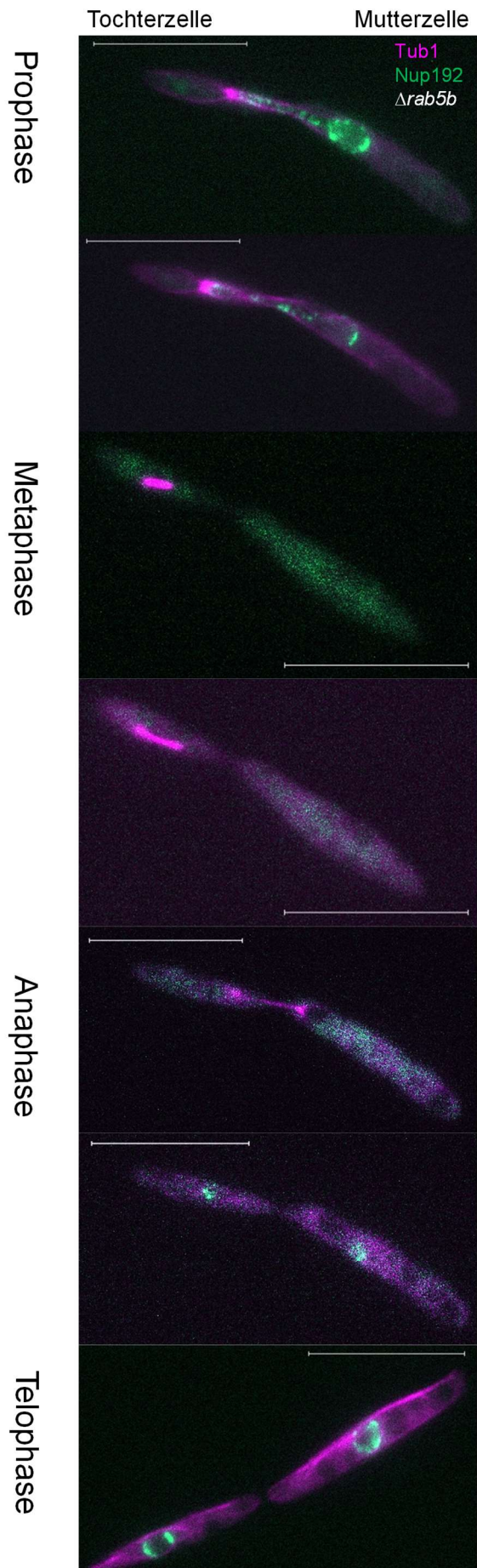
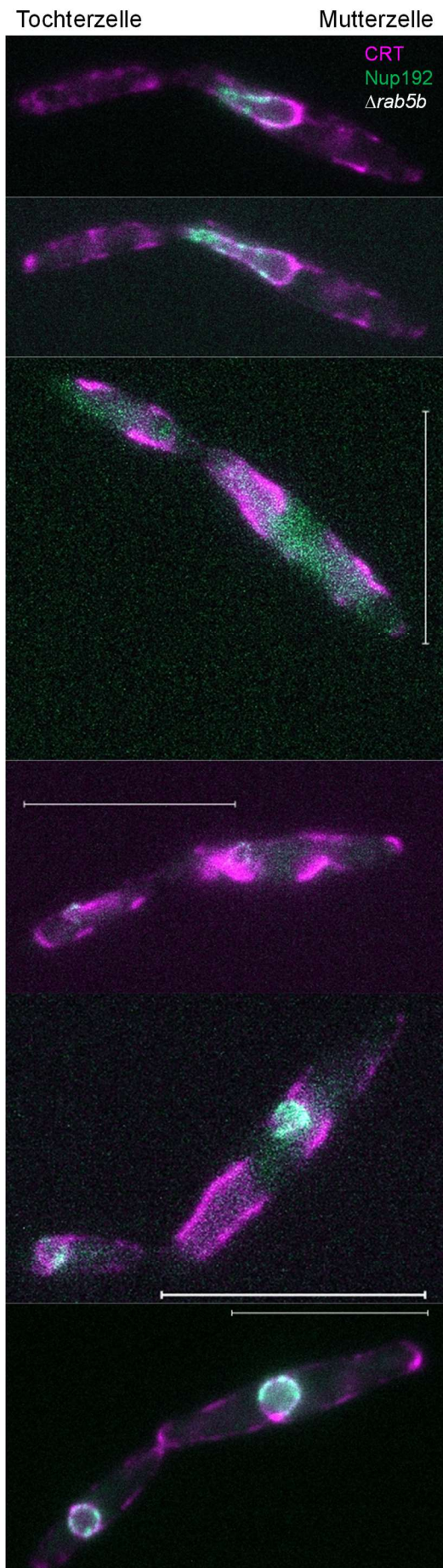
## Ergebnisse

### **Abb. 73: Die Mitosespindel wird durch die Deletion von *rab5b* nicht beeinträchtigt**

Die Colokalisierung von Nma1 mit den kondensierten Mikrotubuli oder die Verbindung mit den Polen der Mitosespindel war durch die Deletion von *rab5b* nicht beeinträchtigt. In der Metaphase wurde in  $\Delta rab5b$ -Stämmen (rechts) eine mit dem Wildtyp (links) vergleichbare Kondensierung der Mikrotubuli beobachtet. Die Spindel elongierte in der Anaphase und nachdem einer der Spindelpole den Sprosshals zurück in Richtung Mutterzelle durchlaufen hatte, konnten sowohl im Wildtyp als auch in den Deletionsstämmen die Ausbildung von kurzen astralen Mikrotubuli mit Nma1-Signal beobachtet werden. In der Telophase wurden lange astrale Mikrotubuli ausgebildet, die durch Nma1 und Tub1 markiert waren. Auch in der Telophase zeigte sich kein Unterschied zwischen dem Wildtyp und den  $\Delta rab5b$ -Zellen. Maßstab: 10  $\mu\text{m}$ . Farbwahl: Tub1 magenta, Nma1 grün, Überlagerung der Signale zeigt sich in weiß. Darstellung von verschiedenen Zellen, welche mit Mikroskop 1 analysiert wurden. Die Abbildungen des Wildtyps wurden teilweise bereits in Abb. 68 als Vergleich herangezogen.

Ergänzend zu den durchgeführten Analysen der Mitosespindel wurde auch der Einfluss der *rab5b*-Deletion auf das korrekte Abstreifen der Zellkernhülle für die offene Mitose von *U. maydis* und der Wiederaufbau dieser nach Abschluss der Teilung in Mutter- und Tochterzelle (Straube *et al.*, 2005 und Abb. 12) beobachtet. Dazu wurden Stämme analysiert, in welchen die Mitosespindel (Tub1) in Kombination mit einem Zellkernporenprotein (Nup192) als Marker für die Zellkernhülle markiert waren (UKS535: AB31 *nup192:3xgfp*, *P<sub>otef</sub>:mCherry:tub1*,  $\Delta rab5b$ ). Nup192 wurde als Bestandteil von Kernporen ursprünglich als Interaktionspartner des putativen Nma1-Interaktionspartners Num1 identifiziert (Hassinger, 2015). Des Weiteren wurden Stämme analysiert, in denen der bereits beschriebene Kernporenmarker Nup192 markiert war, in Kombination mit einer Calreticulinmarkierung (CRT) (UKS552: AB31 *nup192:3xgfp*, *P<sub>otef</sub>:CRT:mKate2*,  $\Delta rab5b$ ). CRT wurde als Protein mit Funktion im Lumen des endoplasmatischen Retikulums (ER) identifiziert zusammengefasst in (Michalak *et al.*, 1999). Wie aus der Literatur bekannt (Straube *et al.*, 2005), wurde die Zellkernhülle in der Prophase auch in  $\Delta rab5b$ -Stämmen (Abb. 74) abgestreift und aufgelöst, während die Mikrotubuli in der Tochterzelle kondensierten. Der Bereich des ER, welches den Zellkern ringförmig umgeben hatte, verblieb mit der abgestreiften Kernhülle in der Mutterzelle (vgl. Theisen *et al.*, 2008). Während der Metaphase waren ER-Bestandteile entlang der Zellmembran zu beobachten. Die Mitosespindel begann in der Anaphase zu elongieren und im Übergang zur Telophase formierten sich die Kernhüllen in Mutter- und Tochterzelle um die Spindelpole aus dem ER neu. Während den beobachteten Prozessen der Spindelelongation, der Zellkernhüllenauflösung und -Neubildung konnten in den *rab5b*-Deletionsstämmen keine Unregelmäßigkeiten im Vergleich zu den beschriebenen Vorgängen aus der Literatur festgestellt werden.





## Ergebnisse

### **Abb. 74: Die Deletion von *rab5b* hat keinen Einfluss auf das Abstreifen der Zellkernhülle während der Mitose**

Die Zellkernhülle (markiert durch das Kernporenprotein Nup192 links und rechts) wurde in der Prophase in  $\Delta rab5b$ -Stämmen wie für den Wildtyp in der Literatur beschrieben (vgl. Abb. 12, Straube *et al.*, 2005) abgestreift und aufgelöst, während die Mikrotubuli (Tub1-markiert, rechts) in der Tochterzelle im  $\Delta rab5b$ -Hintergrund kondensierten. Der Bereich des ER (CRT-markiert, links), welches den Zellkern ringförmig umgeben hatte, verblieb, wie für den Wildtyp bekannt, mit der abgestreiften Kernhülle in der Mutterzelle (vgl. Theisen *et al.*, 2008). Während der Metaphase lokalisierten ER-Bestandteile entlang der Zellmembran. Die Mitosespindel elongierte in der Anaphase, bevor sich im Übergang zur Telophase die Kernhüllen in Mutter- und Tochterzelle um die Spindelpole aus dem ER neu bildeten. Während der beobachteten Prozesse der Spindelelongation, des Abstreifens und der Neubildung der Zellkernhülle wurden in den *rab5b*-Deletionsstämmen keine Unregelmäßigkeiten im Vergleich zu den beschriebenen Vorgängen aus der Literatur beobachtet. Farbwahl: Tub1/CRT magenta, Nup192 grün, Überlagerung der Signale zeigt sich in weiß. Gezeigt sind Aufnahmen unterschiedlicher Zellen durch Analyse mit Mikroskop 1. Maßstab: 10  $\mu\text{m}$ .

Nachdem durch die beobachtete Lokalisierung von Rab5b an der Zytoplasmabrücke bei der Zytokinese zwar eine Funktion bei Zellteilungsvorgängen vermuten lässt, die Analyse der mitotischen Prozesse von Mikrotubulikondensierung und Öffnung der Zellkernhülle über Spindelelongation und Rekonstitution der Zellkernhülle jedoch keine Beeinträchtigung durch die Deletion von *rab5b* zeigten, sollte die Funktion der Rab5b-GTPase, während der meiotischen Teilung untersucht werden.

### 3.5. Die kleine GTPase Rab5b ist für die genomische Stabilität bei meiotischen Teilungsprozessen in *U. maydis* notwendig

Die Beobachtung, dass Rab5a und Rab5b an der Zytoplasmabrücke bei der Zytokinese nach der mitotischen Teilung lokalisieren lässt eine Funktion der Rab5-GTPasen in dieser Zellzyklusphase erwarten. Die Deletion von *rab5a* bewirkte einen Zytokinesedefekt und verzögerte die Spindelelongation, während die Deletion von *rab5b* auf die analysierten Stadien der Mitose oder Zytokinese keinen Effekt zeigte. Um den Lebenszyklus abzuschließen ist es nötig, dass *U. maydis* nach der erfolgreichen Pflanzeninfektion, für die Generierung haploider Sporidien aus den gebildeten Sporen, eine meiotische Teilung durchläuft (Christensen, 1963, Steinberg und Perez-Martin, 2008). Für die mitotische und meiotische Teilung kommen oft verschiedene, jedoch strukturähnliche Proteine zum Einsatz (zusammengefasst in Jessberger, 2003). Analog zu den Funktionen von Rab5a während der Mitose wäre eine vergleichbare Funktion von Rab5b während der Meiose denkbar. Für die Analyse wurden Untersuchungen der Funktion von Rab5b für die meiotische Teilung und die korrekte genetische Aufspaltung in die Meioseprodukte durchgeführt. Die stark reduzierte Pathogenität von  $\Delta rab5a$ -Stämmen (vgl. Abb. 19) führte dazu, dass der Einfluss von Rab5a während der Meiose nicht analysiert werden konnte.

#### 3.5.1. Die Deletion von *rab5b* führt zu Fehlern bei der Meiose

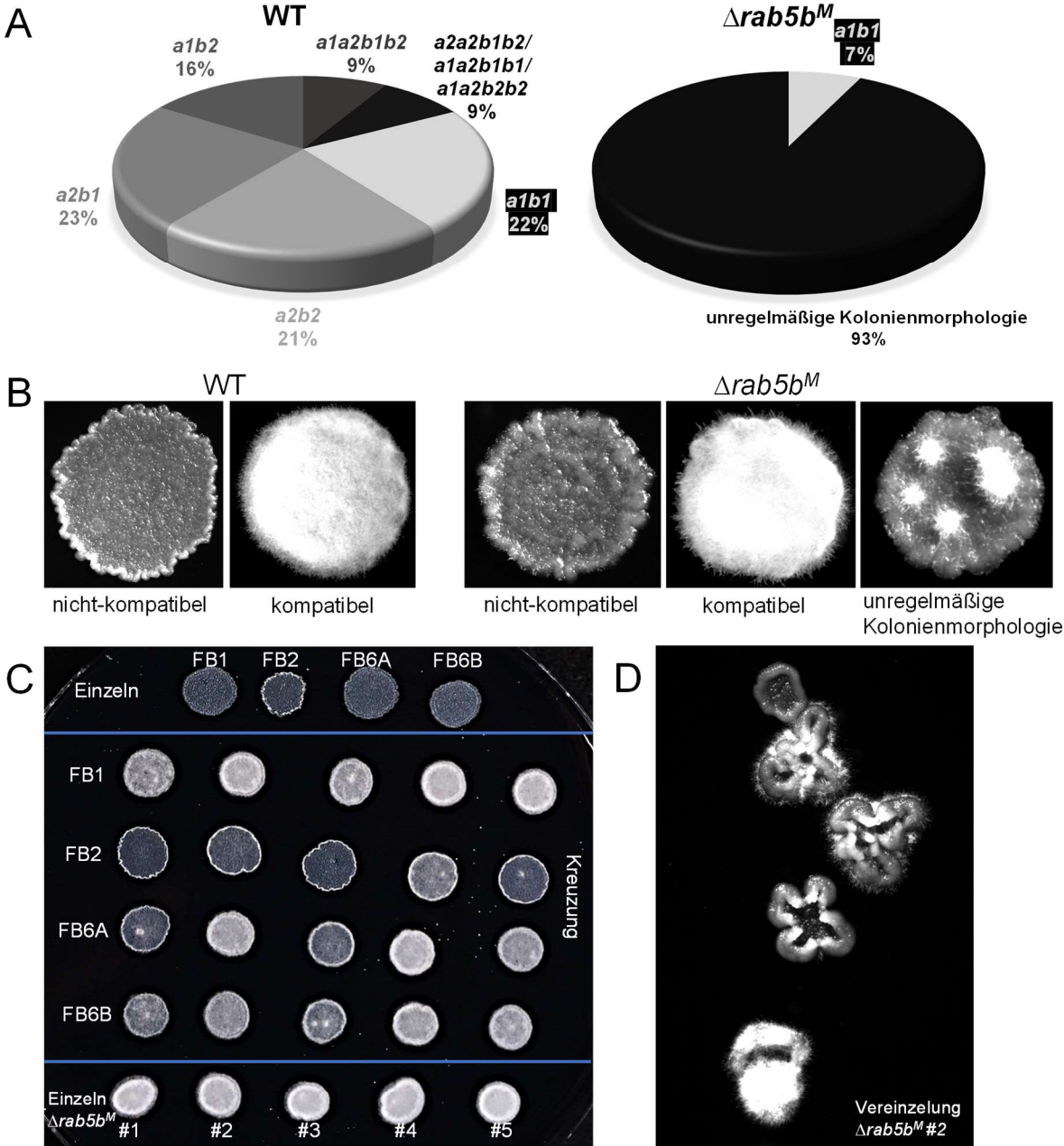
Um eine Funktion von Rab5b während der meiotischen Teilung zu untersuchen wurde mit  $\Delta rab5b$ -Stämmen der vollständige Lebenszyklus durchlaufen. Dafür wurden zunächst kompatible Stämme, in denen jeweils *rab5b* deletiert wurde (UKS352: FB1  $\Delta rab5b$  x URS6: FB2  $\Delta rab5b$ ), gemischt und sieben Tage alte Maispflanzen infiziert. Als Wildtypkontrolle wurde dieses Experiment mit den kompatiblen Stämmen FB1 und FB2 durchgeführt. Eine Woche nach Infektion konnte eine deutliche Tumorausbildung beobachtet werden, aus welchen nach zwei weiteren Wochen melaninhaltige Sporen geerntet werden konnten. Während dem Auskeimen der diploiden Sporen auf Agaroseplatten wird die Meiose durchlaufen und es bilden sich haploide Sporidien (Christensen, 1963, Steinberg und Perez-Martin, 2008). Die Zellen der aus einer einzelnen Spore entstandenen Kolonien wurden durch einen

## Ergebnisse

Vereinzelungsausstrich aufgetrennt und anschließend die Verteilung der Paarungsgenotypen in den Meioseprodukten durch Rückkreuzung bestimmt. Diese erfolgten durch eine Mischung von Flüssigkulturen der Teststämme mit den Referenzstämmen FB1 (*a1b1*), FB2 (*a2b2*), FB6A (*a2b1*) und FB6B (*a1b2*) und dem anschließenden Auftragen auf Aktivkohlemedium zur Analyse der Kompatibilität. Eine Fusion mit anschließender Filamentbildung ist nur dann möglich, wenn sich die Stämme sowohl in ihren *a*-Loci, als auch in ihren *b*-Loci unterscheiden (Banuett und Herskowitz, 1994, Banuett, 1995). Eine kompatible Interaktion wird durch weiße, „fuzzy“ Kolonien (Myzelbildung) angezeigt. Bei genetischer Inkompatibilität werden glatte, dunkle Kolonien auf dem Aktivkohlemedium produziert (Banuett und Herskowitz, 1988, Laity *et al.*, 1995). Durch die Rückkreuzung mit den beschriebenen Referenzstämmen definierten Paarungsgenotyps kann der Paarungsgenotyp des Teststammes eindeutig bestimmt werden. Neben den beiden Genotypen der Ausgangsstämme *a1b1* und *a2b2* entstehen auch die beiden Kombinationsmöglichkeiten *a1b2* und *a2b1*. Die Verteilung dieser Genotypen sollte, da die *a*- und *b*-Kreuzungstyploci nicht gekoppelt sind, bei einer unbeeinträchtigt ablaufenden Meiose etwa gleichmäßig sein (Banuett und Herskowitz, 1989). Es wurden in der Wildtypinfektion 32 ausgekeimte Sporen vereinzelt und im Anschluss 174 daraus entstandene Sporidien (Mioseprodukte) analysiert. Für die Deletion von *rab5b* wurden aus zwei unabhängigen Infektionen je 16 Sporen ausgekeimt, vereinzelt und im Anschluss der *a*- und *b*-Genotyp von insgesamt 111 aus der Meiose entstandenen Sporidien durch Rückkreuzung bestimmt (bezeichnet mit  $\Delta rab5b^M$ ). Wie in Abb. 75A dargestellt, konnte bei der Infektion der kompatiblen Wildtypstämme die erwartete gleichmäßige Verteilung der möglichen Genotypen beobachtet werden. Es entstand ebenfalls ein geringer Anteil an diploiden Stämmen (filamentöses Wachstum sowohl in Kreuzung mit allen vier Referenzstämmen als auch einzeln) und an partiell homo- und partiell heterozygot diploiden Stämmen (filamentöses Wachstum in Kreuzung mit mehr als einem Referenzstamm). Im Vergleich dazu konnte bei den *rab5b<sup>M</sup>*-Deletionsstämmen lediglich bei 7 % der entstandenen Sporidien der Paarungsgenotyp *a1b1* bestimmt werden. Die übrigen 93 % der getesteten Stämme zeigten eine unregelmäßige Koloniemorphologie (Abb. 75B). Nach der Kreuzung mit den Referenzstämmen bildeten sich glatte Kolonien, die zusätzlich unterschiedlich große Anteile von weißen, myzelhaltigen Regionen aufwiesen. Die weitere Analyse von fünf ausgewählten Stämmen (UKS455, UKS456, UKS457, UKS458, UKS459)

zeigte, dass die Stämme in der Lage waren, auch ohne Kreuzungspartner weiße, myzelbedeckte Kolonien zu bilden. In der wiederholten Kreuzung zwischen den Stämmen bildeten alle fünf Teststämme gemeinsam mit FB1 und FB6B weiße Kolonien. Dabei konnten jedoch manche Stämme flächiges Myzel ausbilden, während andere erneut Regionen mit unterschiedlich dichtem weißem Myzel zeigten. Mit FB6A bildeten zwei von fünf Stämmen flächige weiße Kolonien und bei der Kreuzung mit den übrigen drei Stämmen entstanden Kolonien mit Myzel-Flecken. In der Kreuzung mit FB2 wurden überwiegend glatte Kolonien gebildet, welche jedoch auch in einigen Fällen weiße Bereiche enthielten. Die Wiederholung des Kreuzungsexperimentes von einigen Teststämmen mit den vier Referenzstämmen ließ erneut keine eindeutige Genotypisierung in Bezug auf die Paarungstyploci zu und die Ausbildung der verschiedenen Kreuzungsverhaltensmuster innerhalb einzelner Kolonien implizierte eine Instabilität in den Paarungstyploci. Um auszuschließen, dass der beobachtete Phänotyp durch Mischkulturen von Stämmen verschiedener Paarungsgenotypen hervorgerufen wurde, erfolgte die Durchführung von Vereinzelausstrichen auf Vollmedium (CM-Glukose). Dabei generierte Einzelkolonien wurden angeimpft und über Nacht inkubiert. Anschließend erfolgte ein weiterer Vereinzelausstrich auf Aktivkohlemedium, um die Fähigkeit des filamentösen Wachstums von auf Einzelzellen basierenden Kolonien ohne Kreuzungspartner zu analysieren (Abb. 75D). Aus einer Einzelkolonie entstanden dabei innerhalb dieser geringen Zeitspanne unterschiedliche morphologische Phänotypen. So konnten glatte Kolonien ohne Filamentbildung beobachtet werden, glatte Kolonien mit weißen Bereichen und auch vollständig weiße, myzelbedeckte Kolonien. Die in Abb. 75D dargestellten Einzelkolonien gehen auf UKS456 zurück, welcher wie in Abb. 75C dargestellt (#2) vor der erneuten Inkubation auf Aktivkohlemedium myzelbedeckte Kolonien gebildet hatte. Die in Abb. 75D beobachtete phänotypische Variation legt nahe, dass in diesem Stamm Änderungen in den Paarungstypgenen erfolgt waren.

Ergebnisse



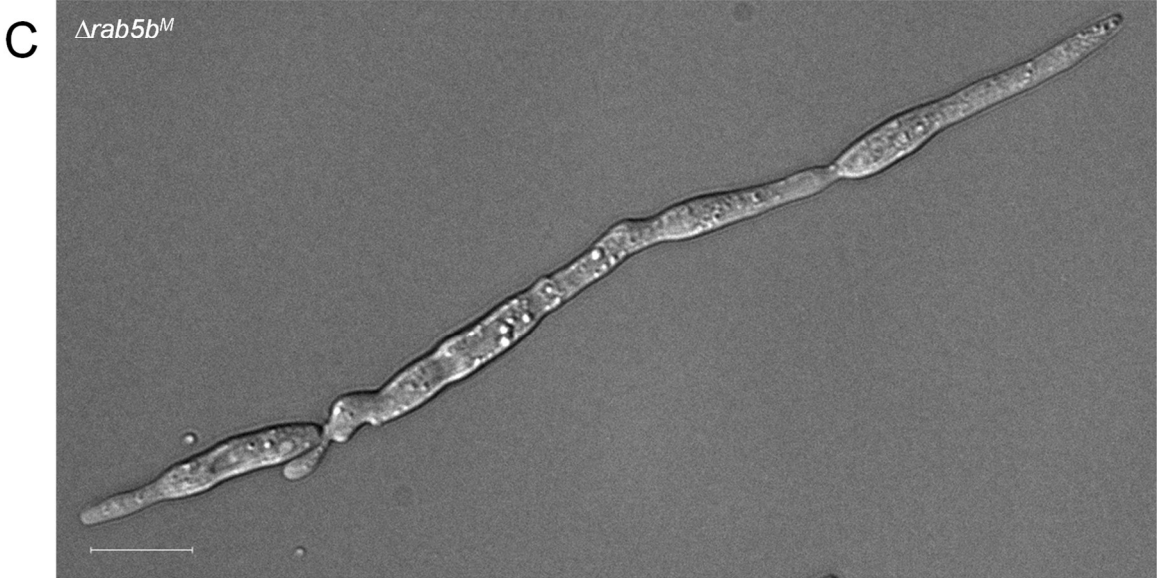
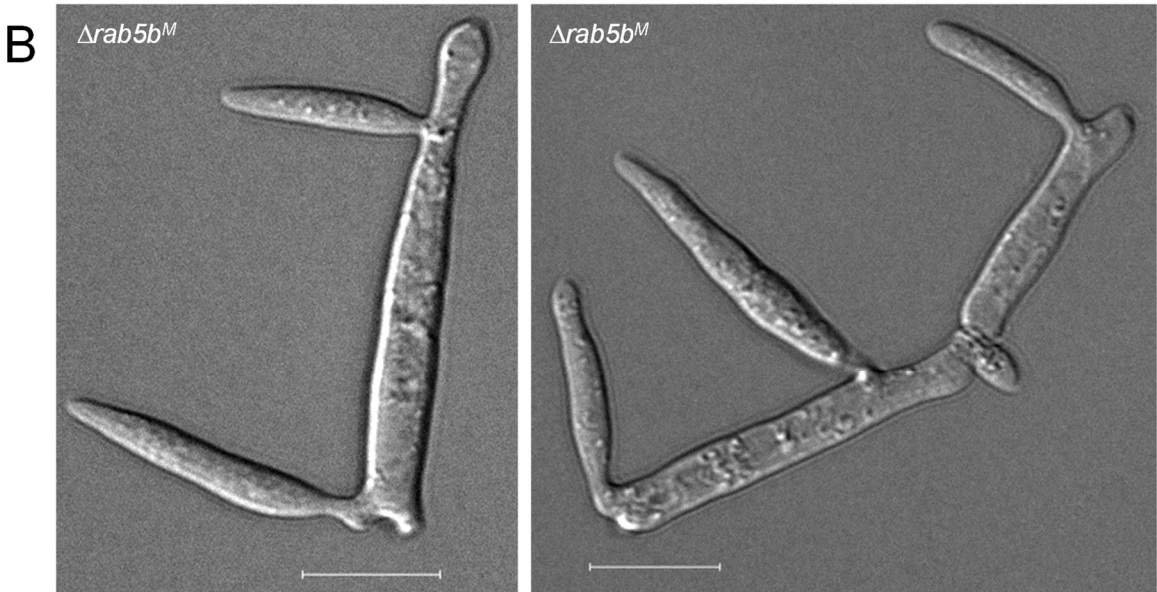
**Abb. 75: Stämme ohne Rab5b zeigen nach der meiotischen Teilung Instabilität**

**A)** Kreuzung von kompatiblen Stämmen mit *rab5b*-Deletion und Infektion sieben Tage alter Maispflanzen. Als Wildtypkontrolle wurde dieses Experiment mit den kompatiblen Stämmen FB1 und FB2 durchgeführt. Ernte der Sporen, Auskeimung und Bestimmung der Verteilung der Paarungsgenotypen durch Rückkreuzung mit den Referenzstämmen FB1 (*a1b1*), FB2 (*a2b2*), FB6A (*a2b1*) und FB6B (*a1b2*) mit anschließender Analyse auf Aktivkohlemedium. Es wurden in der Wildtypinfektion 174 und für die *rab5b*-Deletionsstämmen 111 entstandene Meioseprodukte analysiert. Bei der Infektion der kompatiblen Wildtypstämmen wurde die erwartete gleichmäßige Verteilung der möglichen Genotypen beobachtet und ein geringer Anteil an diploiden und partiell homo- und partiell heterozygot diploiden Stämmen. Bei den *rab5b<sup>M</sup>*-Deletionsstämmen konnte lediglich bei 7 % der entstandenen Sporidien der Paarungsgenotyp *a1b1* bestimmt werden, während die übrigen 93 % eine unregelmäßige Kolonienmorphologie zeigten. **B)** Bei einer Kreuzung von Stämmen, die kompatible Paarungstypgene exprimieren, entsteht durch die Aktivkohlestimulation eine Fusion und filamentöses Wachstum, welches sich durch weiße, myzelhaltige Kolonien zeigt. Bei einer Inkompatibilität werden glatte Kolonien auf dem Aktivkohlemedium produziert (Banuett und Herskowitz, 1988, Laity *et al.*, 1995). Durch die Deletion von *rab5b<sup>M</sup>* entstand zusätzlich eine unregelmäßige Kolonienmorphologie mit glatten Kolonien, welche anteilig weiße, myzelbedeckte Regionen enthielten. Die Analyse der Kolonien erfolgte durch Binokular 4. **C)** Von fünf ausgewählten instabilen  $\Delta rab5b^M$ -Stämmen waren alle in der Lage ohne Kreuzungspartner weiße, myzelhaltige Kolonien zu bilden (unten). Die vier Referenzstämmen bildeten einzeln aufgetragen glatte Kolonien (oben). In der wiederholten Kreuzung (Mitte) zwischen den Stämmen bildeten alle fünf Teststämmen gemeinsam mit FB1 und FB6B weiße Kolonien mit unterschiedlich starker Myzelausprägung. In der Kreuzung mit FB6A bildeten zwei von fünf Stämmen flächige weiße Kolonien, die Kreuzung mit den übrigen drei Stämmen resultierte in Kolonien mit filamentösen Bereichen. Bei der Kreuzung mit FB2 wurden überwiegend glatte Kolonien hervorgerufen, welche jedoch auch in einigen Fällen myzelbedeckte Bereiche enthielten. **D)** Einzelkolonien (Vollmedium ohne Aktivkohle) wurden über Nacht inkubiert und im Anschluss erneut auf Aktivkohlemedium vereinzelt. Auf Grundlage einer Einzelkolonie entstanden dabei unterschiedliche morphologische Phänotypen: Glatte Kolonien ohne Filamentbildung (oben), kahle Kolonien mit weißen, filamentösen Bereichen (Mitte) und vollständige Myzelbildung (unten). Analyse durch Binokular 4.

3.5.2. Sporidien aus einer Meiose von  $\Delta rab5b$ -Stämmen sind in der Zellteilung beeinträchtigt

Die  $\Delta rab5b^M$ -Stämme wurden morphologisch analysiert. Da aufgrund der Rückkreuzungsexperimente (vgl. Abb. 75) die Annahme bestand, dass die Stämme nicht, wie nach der Meiose üblich, einen korrekten haploiden Chromosomensatz enthielten, wurde als Vergleich der diploide Wildtyp FBD11 (*a1b1a2b2*) hinzugezogen. Der diploide Wildtyp zeigte im Phasenkontrastkanal (Mikroskop 1) die gewohnten zigarrenförmigen Sporidien von *U. maydis* und die Abknospung neuer Tochterzellen an einem Zellpol (Abb. 76). Im Vergleich dazu wurden bei  $\Delta rab5b^M$ -Stämmen Abknospungen an beiden Zellpolen und in der Zellmitte und ein Zytokinesedefekt beobachtet, wodurch die gebildeten Tochterzellen nicht von der Mutterzelle abgetrennt wurden, sondern zusammenhängende Ketten bildeten. Außerdem konnten filamentöse Wachstumsvorgänge in Flüssigkultur ohne externen Stimulus festgestellt werden.

Ergebnisse





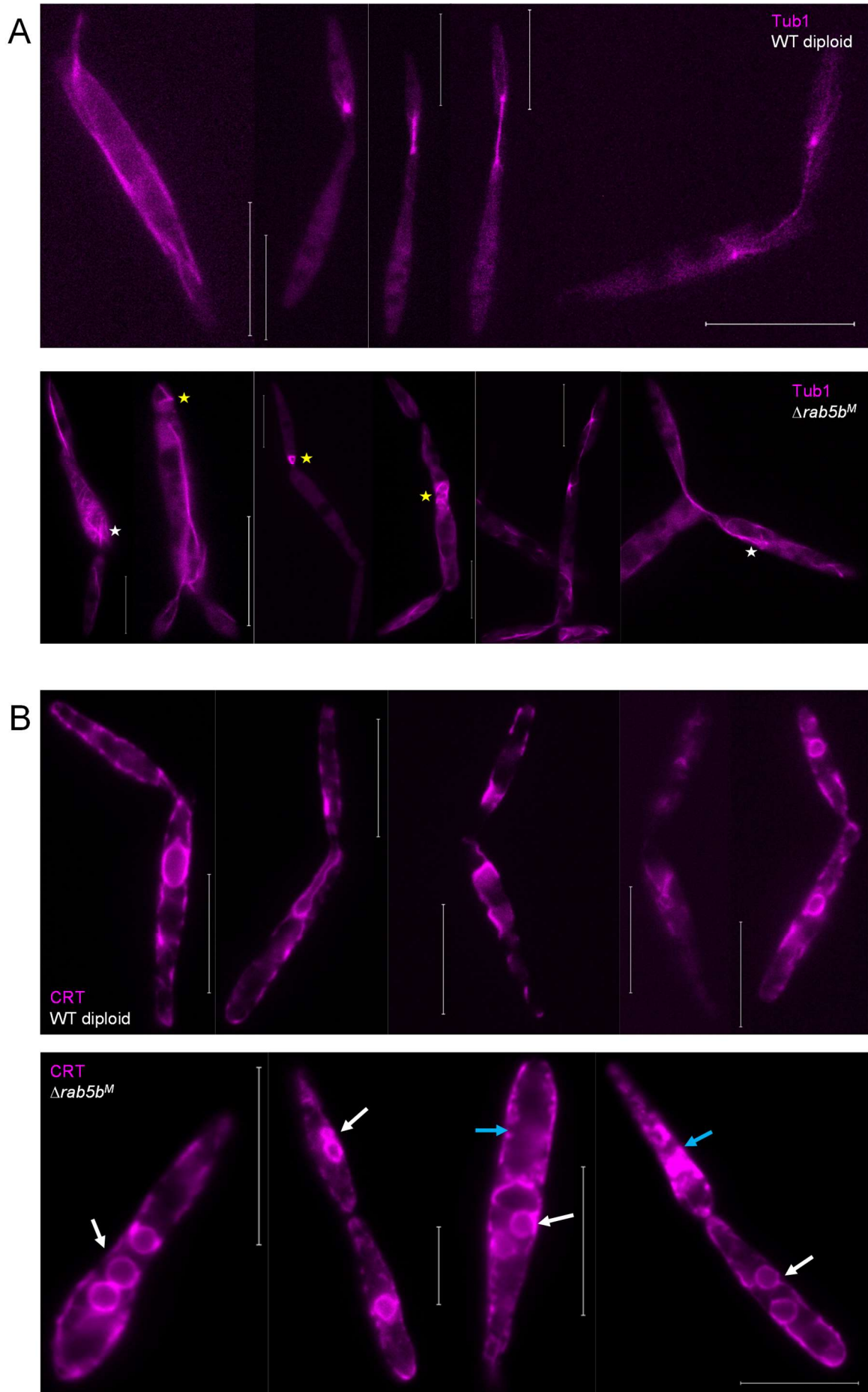
**Abb. 76: Die  $\Delta rab5b^M$ -Stämme zeigen Zytokinesedefekte und filamentöses Wachstum in Flüssigkultur**

**A)** Der diploide Wildtyp FBD11 zeigte regulär geformte Sporidien und Abknospung von Tochterzellen an einem Zellpol mit anschließender Separierung. **B)** Aus der Meiose mit  $\Delta rab5b^M$ -Stämmen generierte Sporidien initiierten Zellteilungsvorgänge an beiden Zellpolen und in der Zellmitte. Die Sporidien konnten die Zytokinese nicht vollständig durchführen und bildeten zusammenhängende Sporidiengruppen. **C)**  $\Delta rab5b^M$ -Stämme zeigten selbststimulierte filamentöse Wachstumsprozesse in Flüssigkultur. Analysen im DIC-Kanal mit Mikroskop 1. Maßstab: 10  $\mu$ m.

Aufgrund der beobachteten phänotypischen Ausprägung und dem Zytokinesedefekt wurden die Teilungsvorgänge in den instabilen  $\Delta rab5b^M$ -Stämmen weiterführend analysiert. Die mitotische Teilung wurde über Transformation integrierte Tub1-markierte Mikrotubuli und CRT-markiertes ER beobachtet (Abb. 77). Als Vergleich wurden erneut diploide Stämme hinzugezogen. Tub1-markierte Mikrotubuli zeigten im diploiden Wildtyp (UKS550:  $a1b1a2b2$ ,  $P_{otef}:mCherry:tub1$ ) in Interphasezellen 2-3 Mikrotubulibündel (vgl. Steinberg *et al.*, 2001). Die Mikrotubuli kondensierten in der Prophase in einem Punkt in der Tochterzelle, aus dem die Spindel im Übergang von der Metaphase zur Anaphase elongierte. In der Telophase wurden anschließend die astralen Mikrotubulibündel ausgebildet. In den  $\Delta rab5b^M$ -Stämmen (UKS549:  $\Delta rab5b^M$ ,  $\Delta rab5b^M$ ,  $P_{otef}:mCherry:tub1$ ) lagen die Mikrotubuli bereits in Interphasezellen ungeordnet vor. Es waren verkürzte Stränge und Quervernetzungen zwischen den Mikrotubulibündeln zu erkennen. Die Mikrotubuli waren darin beeinträchtigt in einem Punkt zu kondensieren und nahmen stattdessen verschiedene gekrümmte Formen an. Es wurde zum Beispiel die Bildung von spiralförmigen oder dreieckigen Formen beobachtet. Die Spindelelongation führte in einigen Fällen dazu, dass eine Aufteilung auf mehr als zwei angrenzende Zellen erfolgte oder manche Zellen nach der Zellteilung keine markierten Mikrotubuli mehr enthielten. Im Vergleich dazu wurde ebenfalls die Verteilung der Zellkerne in den  $\Delta rab5b^M$ -Stämmen (UKS595:  $\Delta rab5b^M$ ,  $\Delta rab5b^M$ ,  $P_{otef}:CRT:mKate2$ ), visualisiert durch das ER, beobachtet und der Mitose bei einem diploiden Wildtyp (UKS584:  $a1b1a2b2$ ,  $P_{otef}:CRT:mKate2$ ) gegenübergestellt. Der diploide Wildtyp zeigte eine reguläre mitotische Teilung, bei dem das ER in einer einzelnen ringförmigen Struktur in der Zellmitte und entlang der Zellmembran vorlag. Die ringförmige ER-Struktur wird gemeinsam mit dem Zellkern Richtung Sprosshals transportiert, elongiert und bleibt schließlich in der Mutterzelle zurück bei Auflösung der Zellkernhülle (vgl. Straube *et al.*, 2005). Im Übergang zwischen Anaphase und Telophase rekonstituieren sich die beiden Zellkernhüllen in Mutter- und Tochterzelle aus dem ER und zeigen erneut eine ringförmige Struktur in

## Ergebnisse

der Zellmitte (vgl. Straube *et al.*, 2005). In den  $\Delta rab5b^M$ -Stämmen konnten Unregelmäßigkeiten in diesem Vorgang beobachtet werden, was zur Folge hatte, dass in einigen Zellen eine bis drei ringförmige ER-Strukturen beobachtet werden konnten, während andere Zellen keine enthielten.



## Ergebnisse

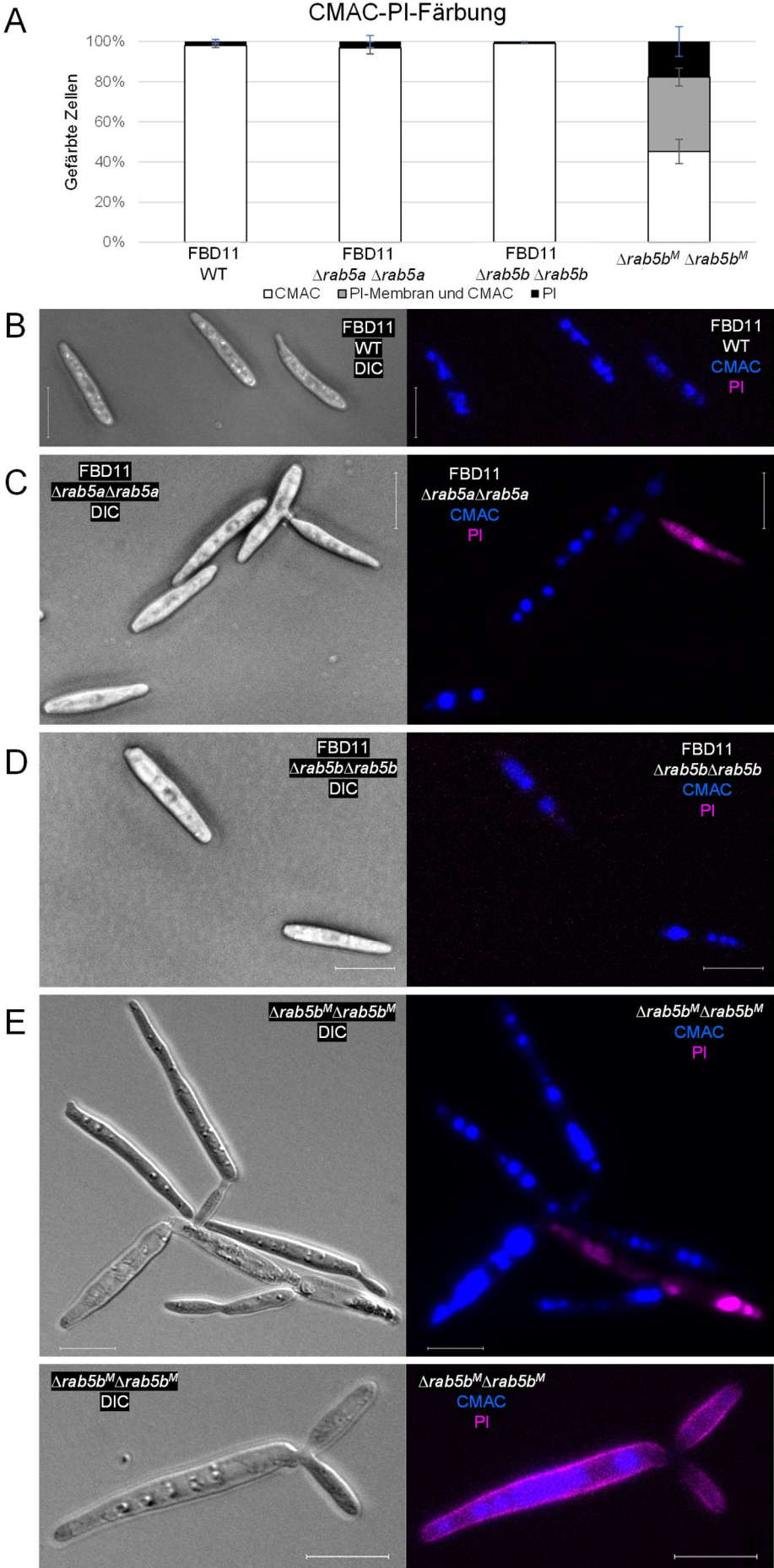
### **Abb. 77: $\Delta rab5b^M$ -Stämme haben Schwierigkeiten bei der mitotischen Teilung**

**A)** Ein diploider Wildtyp (oben) enthielt in Interphasezellen 2-3 Tub1-markierte Mikrotubulibündel (vgl. Steinberg *et al.*, 2001), welche in der Prophase in einem Punkt in der Tochterzelle kondensierten. Im Übergang von der Metaphase zur Anaphase elongierte die Spindel, um in der Telophase die astralen Mikrotubulibündel auszubilden. In den  $\Delta rab5b^M$ -Stämmen (unten) lagen die Mikrotubuli bereits in Interphasezellen ungeordnet mit Quervernetzungen vor (weißer Stern). Die Mikrotubuli zeigten Probleme in einem Punkt zu kondensieren und nahmen stattdessen verschiedene gekrümmte Formen ein (gelbe Sterne). Die Spindelelongation führte dazu, dass eine Verteilung auf mehr als zwei angrenzende Zellen erfolgte oder Zellen nach der Zellteilung keine markierten Mikrotubuli mehr enthielten. **B)** Der diploide Wildtyp (oben) enthielt CRT-markiertes ER, welches in einer einzelnen ringförmigen Struktur in der Zellmitte und entlang der Zellmembran angeordnet war. Die ringförmige ER-Struktur wurde Richtung Sprosshals transportiert, elongierte und blieb anschließend in der Mutterzelle zurück. Im Übergang zwischen Anaphase und Telophase rekonstituierten sich je eine ringförmige Struktur in Mutter- und Tochterzelle aus dem ER. In den  $\Delta rab5b^M$ -Stämmen konnten Unregelmäßigkeiten in diesem Vorgang beobachtet werden, was zur Folge hatte, dass in einigen Zellen ein bis drei ringförmige ER-Strukturen (weiße Pfeile) beobachtet werden konnten, während andere Zellen keine enthielten (gelbe Pfeile). Darstellung von verschiedenen Zellen, analysiert durch Mikroskop 1. Maßstab: 10  $\mu\text{m}$ .

Um unterscheiden zu können, ob Stämme mit mehr als einem Chromosomensatz generell auf die Verfügbarkeit von Rab5b angewiesen sind oder ob die beobachteten Effekte eine Folge des Fehlens von Rab5b bei der Meiose sind, wurden diploide Stämme mit Deletionen von *rab5b* in beiden Allelen generiert (UKS572: FBD11  $\Delta rab5b$ ,  $\Delta rab5b$ ) und mit den instabilen  $\Delta rab5b^M$ -Stämmen verglichen. Analog dazu wurden diploide Stämme mit Deletionen von *rab5a* in beiden Allelen (UKS560: FBD11  $\Delta rab5a$ ,  $\Delta rab5a$ ) analysiert. Die diploiden FBD11-Stämme mit Deletionen in beiden Allelen von *rab5a* oder *rab5b* wurden wie für haploide Stämme üblich (vgl. Material und Methoden Kapitel 5.2.5) transformiert und in Southern Blot Analysen Transformanten, welche nur das Bandenmuster des Deletionskonstruktes und nicht das des jeweiligen ORF zeigten, ausgewählt. Basierend auf den Beobachtungen der Beeinträchtigungen bei der Mitose (vgl. Abb. 77) und der Vermutung, dass ein Teil der Zellen entweder ohne Mikrotubulizytoskelett, ohne Zellkern oder mit mehreren Zellkernen aus der Teilung hervorging, wurde die Überlebensrate der Zellen quantifiziert. Dazu wurden die Kulturen mit 7-Amino-4-Chlormethylcumarin (CMAC) und Propidiumiodid (PI) angefärbt. Der Farbstoff CMAC kann Zellmembranen passieren und enthält eine Chloromethylgruppe, welche in der Lage ist mit Thiolgruppen zu reagieren, wie sie in Glutathion S-Transferase-vermittelten Reaktionen vorkommen (Thermo Fisher Scientific 2014). Glutathion-Konjugate stellen membranundurchlässige Reaktionsprodukte dar und werden unter ATP-Verbrauch in die Vakuolen transportiert (Doenecke *et al.*, 2005). Da der Farbstoff erst durch die beschriebene Stoffwechselreaktion visualisierbar gemacht wird, werden dadurch nur lebende Zellen angefärbt, die in der Lage sind, das Substrat aktiv umzusetzen

(Thermo Fisher Scientific 2014). PI dagegen interkaliert mit der DNA. Da es jedoch nicht in der Lage ist frei durch die Membran zu diffundieren, färbt es spezifisch tote Zellen an, deren Zellmembran permeabel wird (zusammengefasst in (Crowley *et al.*, 2016). Für die Analyse wurden je drei unabhängige Kulturen oder drei unabhängige Transformanten des diploiden Wildtyps (FBD11), der *rab5a*- und *rab5b*-Deletionsstämme (UKS561/UKS562/UKS563: FBD11  $\Delta rab5a$ ,  $\Delta rab5a$ ; UKS572: FBD11  $\Delta rab5b$ ,  $\Delta rab5b$ ) und der  $\Delta rab5b^M$ -Stämme aus dem Meiose Experiment (UKS435/UKS436/UKS437:  $\Delta rab5b^M$ ,  $\Delta rab5b^M$ ) eingesetzt. Es wurden von jeder Kultur ca. 100 Zellen ausgewertet (Abb. 78). Sowohl in diploiden Wildtypstämmen als auch in den durch Transformation erzeugten diploiden *rab5a*- und *rab5b*-Deletionsstämmen wurde lediglich ein geringer Anteil an toten Zellen detektiert. In den  $\Delta rab5b^M$ -Stämmen wurden etwa 20 % tote Zellen, 50 % lebende Zellen und 30 % Zellen mit CMAC-Färbung und einer PI-gefärbten Membran beobachtet. Ob die Zellen mit gleichzeitiger CMAC- und PI-Färbung zu einer Zellteilung fähig sind bedarf weiterer Untersuchungen. Sowohl bei den *rab5a*-Deletionsstämmen, als auch bei den  $\Delta rab5b^M$ -Stämmen wurden aufgrund des Zytokinesedefekts in einigen Fällen tote Zellen in einer Kette von lebenden Zellen beobachtet. Da die Auswertung im Hinblick auf koloniebildende Einheiten erfolgte, wurden diese Zelleinheiten als lebend gewertet.

Ergebnisse



**Abb. 78: In  $\Delta rab5b^M$ -Stämmen kommt es vermehrt zu Zelltod**

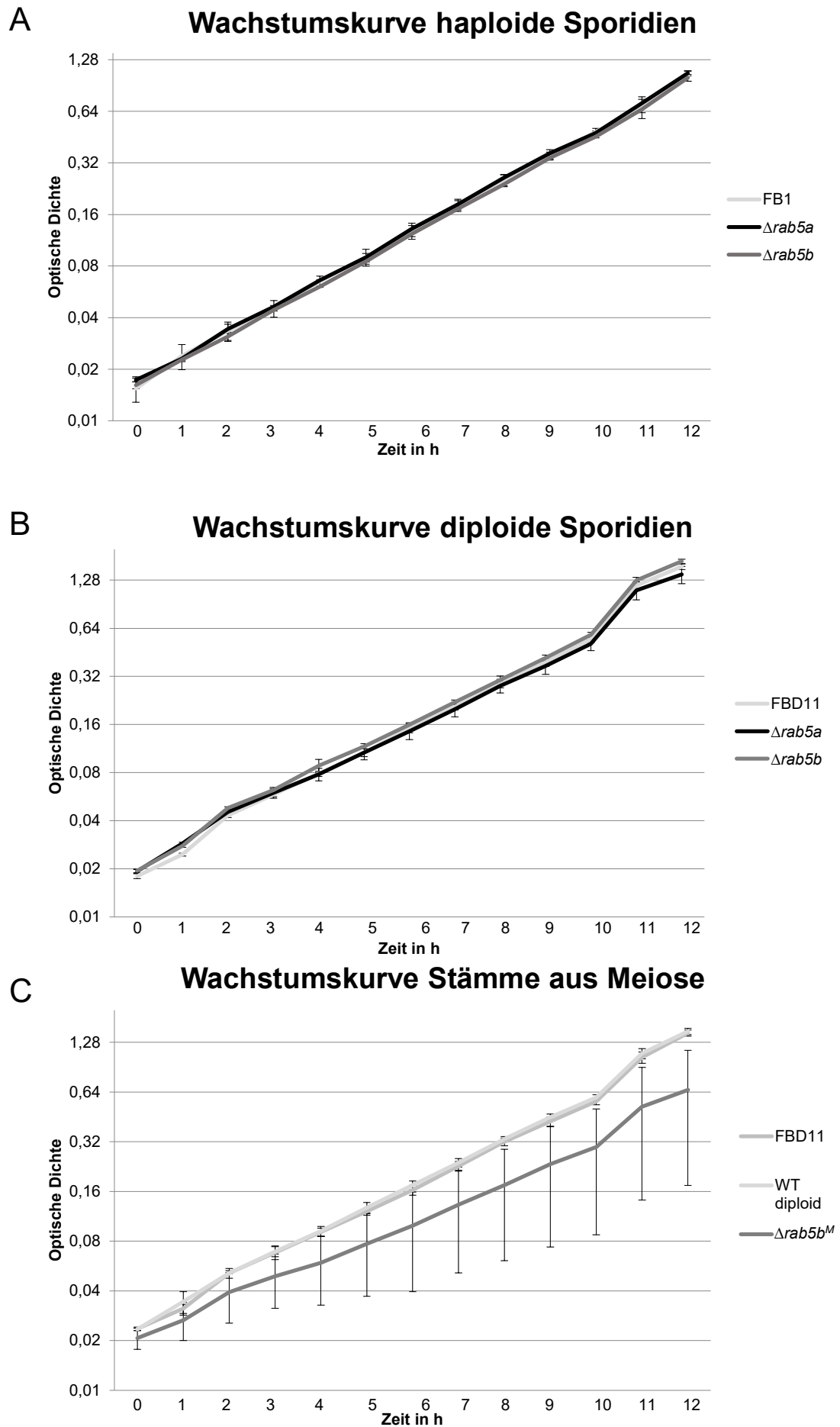
**A)** Aus je drei unabhängigen Kulturen oder drei unabhängigen Transformanten eines diploiden Wildtyps, diploiden *rab5a*- und *rab5b*-Deletionsstämmen und den  $\Delta rab5b^M$ -Stämmen aus dem Meioseexperiment wurden ca. 100 Zellen ausgewertet. Sowohl in diploiden Wildtypstämmen als auch in den durch Transformation erzeugten Deletionsstämmen von *rab5a* und *rab5b* wurde lediglich ein geringer Anteil an toten, PI-gefärbten Zellen festgestellt. In den  $\Delta rab5b^M$ -Stämmen wurden ca. 20 % tote Zellen (PI-Färbung), 50 % lebende Zellen (CMAC-Färbung) und 30 % Zellen mit CMAC-Färbung und einer PI-gefärbten Membran beobachtet. **B)** Die Sporidien des diploiden Wildtyps zeigten im DIC-Kanal (links) eine normale Morphologie und überwiegend Färbung durch CMAC (rechts). **C)** In diploiden *rab5a*-Deletionsstämmen wurden im DIC-Kanal (links) Zellen mit Zytokinesedefekt beobachtet, welche teilweise innerhalb einer Zellkette PI-gefärbte Zellen (rechts) enthielten. Da die Auswertung im Hinblick auf koloniebildende Einheiten erfolgte, wurden diese Zelleinheiten als lebend gewertet. **D)** Diploide *rab5b*-Deletionsstämme waren morphologisch (DIC-Kanal, links) und im Anteil an lebenden, CMAC-gefärbten Zellen (rechts) nicht vom Wildtyp zu unterscheiden. **E)** In den aus der Meiose hervorgegangenen  $\Delta rab5b^M$ -Stämmen wurde ein Zytokinesedefekt (DIC-Kanal, links) und ein hoher Anteil an toten (PI-Färbung, rechts oben), PI-gefärbten Zellen innerhalb von Zellketten lebender Zellen (CMAC-Färbung, rechts oben) oder CMAC-gefärbten Zellen mit PI-gefärbter Membran (rechts unten) beobachtet. Analyse der Zellen durch Mikroskop 1. Maßstab: 10  $\mu$ m.

Ergänzend zu der Färbung der lebenden und toten Zellen wurde auch die Auswirkung auf die Wachstumsrate der Zellen analysiert. Dazu wurde zunächst überprüft ob bereits die Zellteilung von haploiden Deletionsstämmen beeinträchtigt war. Besonders im Hinblick auf den Zytokinesedefekt von  $\Delta rab5a$ -Stämmen wäre auch bei haploiden Sporidien eine verlangsamte Teilungsdauer möglich. Es wurden jeweils drei unabhängige Kulturen des FB1 Wildtyps und drei unabhängige Transformanten von  $\Delta rab5a$ - (UKS88/UKS89/UKS90: FB1  $\Delta rab5a$ ) und  $\Delta rab5b$ -Stämmen (UKS352/UKS353/UKS354: FB1  $\Delta rab5b$ ) aus in Vollmedium exponentiell wachsenden Kulturen auf die gleiche Start-OD<sub>600</sub> verdünnt und über 12 h stündlich in technischen Duplikaten gemessen. Es konnte keine Beeinträchtigung des Wachstums von haploiden Sporidien durch die Deletion von *rab5a* oder *rab5b* festgestellt werden (Abb. 79A). Aufgrund der Annahme, dass die  $\Delta rab5b^M$ -Stämme nicht als haploide Sporidien aus der meiotischen Teilung hervorgingen, wurde der Einfluss von  $\Delta rab5a$  oder *rab5b*-Deletionen in beiden Allelen auf die Teilung von diploiden Stämmen analysiert. Dazu wurden jeweils drei unabhängige Kulturen des diploiden FBD11 Wildtyps, diploider  $\Delta rab5b$ -Stämmen (UKS572: FBD11  $\Delta rab5b$ ) und drei unabhängiger Transformanten von diploiden  $\Delta rab5a$ -Stämmen (UKS560/UKS561/UKS562: FBD11  $\Delta rab5a$ ) in Vollmedium exponentiell wachsend auf die gleiche OD<sub>600</sub> verdünnt und stündlich über 12 h in technischen Duplikaten gemessen. Es konnte weder durch die Deletion von *rab5a* noch durch die von *rab5b* eine Änderung in der Verdopplungszeit beobachtet werden (Abb. 79B). Es erfolgte ebenfalls ein Vergleich von drei unabhängigen Kulturen des FBD11 Wildtyps, drei unabhängigen Stämmen, welche anhand der Rückkreuzungen nach der Meiose der Wildtypsporen als diploid

## Ergebnisse

bestimmt wurden und drei unabhängigen  $\Delta rab5^M$ -Stämmen. Es wurden erneut in Vollmedium exponentiell wachsende Kulturen auf die gleiche  $OD_{600}$  verdünnt und stündlich über 12 h in technischen Duplikaten gemessen. FBD11 und die diploiden Wildtypen aus der Meiose zeigten eine vergleichbare Wachstumsrate (Abb. 79C). Die  $\Delta rab5b^M$ -Stämme waren dagegen in der Teilung beeinträchtigt und erreichten in der gleichen Zeitspanne eine geringere  $OD_{600}$ .





## Ergebnisse

### **Abb. 79: Die $\Delta rab5b^M$ -Stämme haben eine elongierte Verdopplungszeit**

Für sämtliche dargestellte Experimente wurden von je drei unabhängigen Kulturen oder drei unabhängigen Transformanten in Vollmedium exponentiell wachsende Kulturen auf die gleiche  $OD_{600}$  verdünnt und stündlich über 12 h in technischen Duplikaten gemessen. Dargestellt wurden jeweils der Mittelwert und die Standardabweichung von allen sechs Messwerten je Zeitpunkt je Genotyp. **A)** Die Deletionen von *rab5a* oder *rab5b* hatten keine Auswirkung auf die Verdopplungszeit von haploiden Sporidien. **B)** Durch die Deletionen von *rab5a* oder *rab5b* entstand keine Beeinträchtigung der Wachstumsrate von diploiden Sporidien. **C)** FBD11 und die aus der Meiose entstandenen diploiden Wildtypen zeigten eine vergleichbare Wachstumsrate. Die  $\Delta rab5b^M$ -Stämme zeigten dagegen ein reduziertes Teilungsverhalten und erreichten in der gleichen Zeitspanne eine geringere  $OD_{600}$ . Da die drei unabhängigen  $\Delta rab5b^M$ -Stämme verschieden stark in ihrem Wachstum beeinträchtigt waren, führten die gebildeten Mittelwerte zu der dargestellten, hohen Standardabweichung.

### 3.5.3. Die Defekte von $\Delta rab5b^M$ -Stämmen nach der Meiose beruhen auf genomischer Instabilität

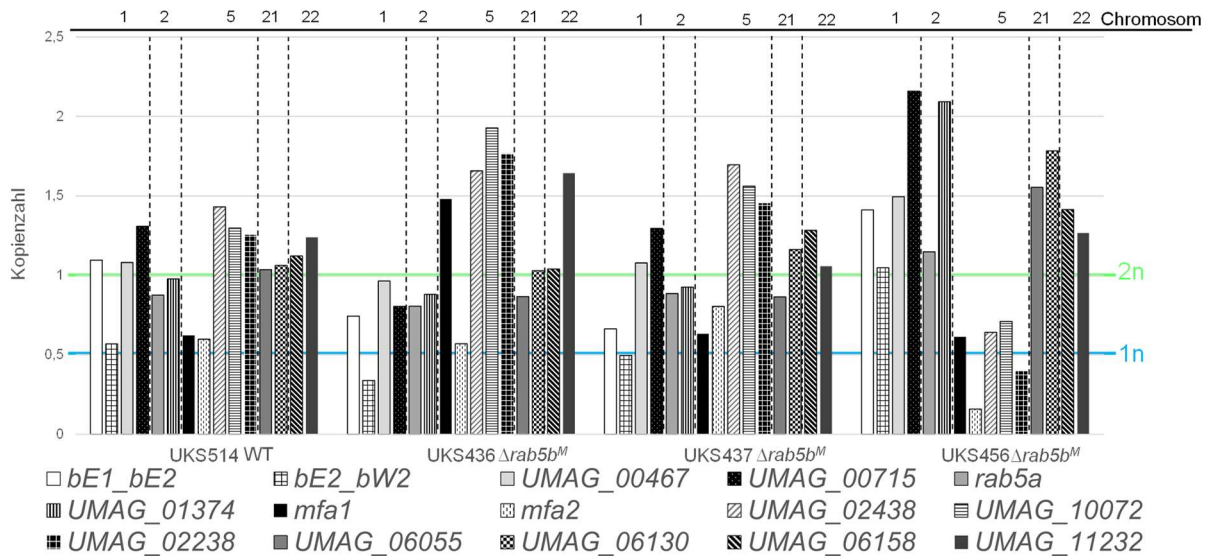
Basierend auf den beobachteten Unregelmäßigkeiten der Kolonienmorphologie auf Aktivkohleplatten wurde eine Veränderung der Paarungstyploci vermutet, welche innerhalb einer kurzen Zeitspanne auftrat (vgl. Abb. 75). Um dies zu überprüfen wurde die genomische DNA verschiedener  $\Delta rab5b^M$ -Stämme isoliert (UKS436, UKS437 und UKS456) und mittels RT-PCR die Kopienzahl der Paarungstypgene ermittelt. Es wurden drei Stämme aus der Meiose der Wildtypsporen mitgeführt, welche sich in Rückkreuzungsexperimenten als *a1a2b1b2* herausgestellt hatten und keinen morphologisch auffälligen Phänotyp zeigten. In Abb. 80 ist als repräsentatives Beispiel UKS514 (*a1b1a2b2*) angeführt. Die Normalisierung der CT-Werte erfolgte durch die haploiden Wildtypstämme FB1 und FB2. Dabei zeigten sich starke Variationen des DNA-Gehalts in den CT-Werten einzelner Stämme (vgl. Appendix Tabelle 13). Um tatsächliche Abweichungen in der Kopienzahl einzelner Gene, die nicht durch eine allgemein geringere Templatmenge des Stammes zu erklären sind, zu untersuchen, erfolgte eine Normalisierung der Ausgangs-CT-Werte in Bezug auf alle untersuchten Gene und alle untersuchten Stämme. Es wurde ein Mittelwert der CT-Werte von allen untersuchten Genen in allen untersuchten Stämmen gebildet und durch den Mittelwert aller untersuchten Gene eines jeden Stammes dividiert. Der dadurch generierte Faktor pro Stamm wurde auf alle Gene dieses Stammes angewendet. Im Anschluss erfolgte die Normalisierung der reaktionsunabhängig ausgeglichenen CT-Werte durch die haploiden Wildtypstämme FB1 und FB2 und die Darstellung der normalisierten Gen-Kopienzahlen als binärer Logarithmus.

Es wurden die Paarungstypgene *mfa1* und *mfa2* des *a*-Locus untersucht, sowie *bE1\_bE2* und *bE2\_bW2* des *b*-Locus. Während die Primerpaare für *mfa1*, *mfa2*,

*bE2\_bW2* dabei spezifisch für das *a1*, das *a2* oder das *b2*-Allel sind, binden die Primer für *bE1\_bE2* im konstanten Bereich des *bE*-Gens und können damit sowohl das *b1*-, als auch das *b2*-Allel amplifizieren. Somit sollte bei einer regulären Verteilung der Paarungstypgene in einem diploiden Stamm *bE1\_bE2* immer in der doppelten Kopienzahl wie *mfa1*, *mfa2* und *bE2\_bW2* gemessen werden. Diese Erwartung wurde im diploiden Wildtyp erfüllt. Durch den Einsatz einer festen Templatmenge für alle Reaktionen wurden die Kopienzahlen der diploiden Stämme im Vergleich mit den haploiden Stämmen angepasst. Ein einfacher Chromosomensatz (1n) zeigt sich dadurch mit einem Wert von 0,5, während eine diploide Kopienzahl (2n) durch den Wert 1 dargestellt wird (Abb. 80). Bei den  $\Delta rab5b^M$ -Stämmen konnten dagegen Abweichungen in der Zusammensetzung der Paarungstypgene beobachtet werden. In UKS436 war *mfa1* in dreifacher Kopienzahl wie *mfa2* zu finden. In UKS437 dagegen wurde von *bE1\_bE2* eine vergleichbare Kopienzahl wie von *bE2\_bW2* bestimmt, was dafür spricht, dass der *b1*-Locus in diesem Stamm nicht vertreten ist. In UKS456 wurde ebenfalls eine erhöhte Kopienzahl von *bE2\_bW2* gemessen, in Vergleich mit *bE1\_bE2*. Gleichzeitig war die Kopienzahl von *mfa2* deutlich geringer als die von *mfa1*. Diese Abweichungen im Genotyp *a1a2b1b2* unterstützen die beobachteten Unregelmäßigkeiten in der Kolonienmorphologie der  $\Delta rab5b^M$ -Stämme (vgl. Abb. 75). Wie durch die unterschiedlichen morphologischen Phänotypen, welche innerhalb kurzer Zeit aus einer Einzelkolonie entstanden sind (vgl. Abb. 75D), vermutet, kommt es in den  $\Delta rab5b^M$ -Stämmen zu Änderungen der Paarungstypgene. Um zu untersuchen, ob spezifisch die Paarungstyploci betroffen sind oder die  $\Delta rab5b^M$ -Stämme im Allgemeinen ein instabiles Genom aufweisen, wurden zusätzliche Gene untersucht. Es wurden weitere Gene auf den Chromosomen der Paarungstypgene ausgewählt, um zu analysieren, ob die Stämme bei der Teilung vollständige Chromosomen verlieren oder Bereiche auf Chromosomen betroffen sind. Neben *bE1\_bE2* und *bE2\_bW2* auf Chromosom 1 wurden *UMAG\_00467* und *UMAG\_00715* ausgewählt. Ergänzend zu *mfa1* und *mfa2* auf Chromosom 5 wurden *UMAG\_02238*, *UMAG\_02438* und *UMAG\_10072* analysiert. Neben den beiden großen Chromosomen 1 und 5 wurde ebenfalls Chromosom 2 mit *rab5a* und *UMAG\_01374* untersucht. Durch die kleinen Chromosomen 21 und 22 wurde beobachtet, ob Defekte abhängig von der Größe des Chromosoms sind. Dafür wurden auf Chromosom 21 die Gene *UMAG\_06055* und *UMAG\_06130* und auf Chromosom 22 die Gene *UMAG\_06158* und *UMAG\_11232* bestimmt. Im diploiden Wildtyp waren

## Ergebnisse

mit Ausnahme der bereits beschriebenen Paarungstypgene alle untersuchten Gene in zweifacher Kopienzahl vorhanden. In UKS436 waren mit Ausnahme von *mfa2* sämtliche Gene auf Chromosom 5 in einer erhöhten Kopienzahl vorhanden. In Kombination mit der Erhöhung von *mfa1* deutet dies auf ein zusätzliches Chromosom 5 hin. Auf Chromosom 22 war eines der beiden untersuchten Gene in der für  $2n$  üblichen doppelten Kopienzahl im Genom zu finden, während das andere eine erhöhte Kopienzahl aufwies. Diese Beobachtung spricht eher für eine Anreicherung von Chromosomenbereichen. Die Chromosomen 1, 2 und 21 zeigten die reguläre 2-fache Kopienzahl. Bei UKS437 wurden Abweichungen von Genen lokalisiert auf Chromosom 5 festgestellt. Während *mfa2* auf Chromosom 5 eine leichte Erhöhung auf 0,75 zeigte, waren *UMAG\_02238*, *UMAG\_02438* und *UMAG\_10072* auf etwa 1,75-fache Kopienzahl erhöht. Auf Chromosom 1 konnte neben der bereits beschriebenen Angleichung der Kopienzahlen von *bE1\_bE2* und *bE2\_bW2*, keine Abweichung der anderen beiden untersuchten Gene beobachtet werden. Wäre jedoch der *b*-Locus homozygot mit dem *b2*-Allel vertreten, müssten die Werte eine ähnliche Kopienzahl wie die übrigen Gene auf Chromosom 1 zeigen. Stattdessen liegt der *b*-Locus in einfacher Kopienzahl vor, während *UMAG\_00467* und *UMAG\_00715* in doppelter Kopienzahl vorhanden sind. Hier kann folglich von einem Verlust bestimmter Regionen auf einem der Chromosomen 1 ausgegangen werden. Die auf den Chromosomen 2, 21 und 22 untersuchten Gene zeigen die Kopienzahl für einen gewöhnlichen diploiden Chromosomensatz. Bei UKS456 waren alle auf Chromosom 5 lokalisierten, untersuchten Gene in der Kopienzahl reduziert, während die Gene auf den Chromosomen 1 und 21 eine deutliche Erhöhung der Kopienzahl verzeichneten. Dies spricht für einen Verlust von einer Kopie des Chromosoms 5, während das Chromosom 1 im Verhältnis zu den anderen Genen vierfach und Chromosom 21 dreifach vorlag. Von den Genen auf Chromosom 2 lag dagegen eines der untersuchten Gene in doppelter Kopienzahl des anderen vor, was ebenfalls für partielle Verluste von Chromosomen spricht. Die hier gezeigten Analysen weisen darauf hin, dass in den  $\Delta rab5b^M$ -Stämmen im Vergleich mit dem Wildtyp ein verändertes Verhältnis der untersuchten Chromosomen vorliegt. Dies zeigt sich in Verlusten oder Anreicherungen von vollständigen Chromosomen aber auch in Veränderungen von Chromosomenbereichen. Ein Bezug zur Größe der Chromosomen konnte nicht beobachtet werden.



**Abb. 80: Die instabilen  $\Delta rab5b^M$ -Stämme zeigen Verluste von Chromosomen und Chromosomenbereichen**

Normalisierung der CT-Werte durch Bildung eines Mittelwertes der CT-Werte von allen untersuchten Genen in allen untersuchten Stämmen und Division durch den Mittelwert aller untersuchten Gene eines jeden Stammes. Der dadurch generierte Faktor pro Stamm wurde auf alle Gene dieses Stammes angewendet. Im Anschluss erfolgte die Normalisierung durch die haploiden Wildtypstämme FB1 und FB2 und die Darstellung der Gen-Kopienzahl als  $\log_2$ . Durch den Einsatz einer festen Templatemenge für alle Reaktionen wurden die Kopienzahlen der diploiden Stämme im Vergleich mit den haploiden Stämmen angepasst. Ein einfacher Chromosomensatz (1n, blaue Linie) zeigt sich dadurch mit einem Wert von 0,5, während eine diploide Kopienzahl (2n, hellgrüne Linie) durch den Wert 1 dargestellt wird. Es wurden die Paarungstypgene *mfa1* und *mfa2* des *a*-Locus bestimmt, sowie *bE1\_bE2* und *bE2\_bW2* des *b*-Locus. Während die Primerpaare für *mfa1*, *mfa2*, *bE2\_bW2* dabei spezifisch für das *a1*, das *a2* oder das *b2*-Allel sind, binden die Primer für *bE1\_bE2* im konstanten Bereich des *bE*-Gens und können damit sowohl *bE1*, als auch *bE2* amplifizieren. Somit sollte bei einer regulären Verteilung der Paarungstypgene in einem diploiden Stamm *bE1\_bE2* in der doppelten Kopienzahl wie *mfa1*, *mfa2* und *bE2\_bW2* gemessen werden. Neben *bE1\_bE2* und *bE2\_bW2* auf Chromosom 1 wurden *UMAG\_00467* und *UMAG\_00715* ausgewählt. Ergänzend zu *mfa1* und *mfa2* auf Chromosom 5 wurden *UMAG\_02238*, *UMAG\_02438* und *UMAG\_10072* analysiert. Neben den beiden großen Chromosomen 1 und 5 wurde ebenfalls Chromosom 2 mit *rab5a* und *UMAG\_01374* untersucht. Auf dem kleinen Chromosom 21 wurden die Gene *UMAG\_06055* und *UMAG\_06130* und auf Chromosom 22 die Gene *UMAG\_06158* und *UMAG\_11232* bestimmt. Im diploiden Wildtyp UKS514 (*a1b1a2b2*) waren mit Ausnahme der Paarungstypgene, welche in einfacher Kopie vorliegen, alle untersuchten Gene in zweifacher Kopienzahl vorhanden. Bei den  $\Delta rab5b^M$ -Stämmen ergaben sich Abweichungen in der genomischen Zusammensetzung. In UKS436 waren mit Ausnahme von *mfa2* sämtliche Gene auf Chromosom 5, auch *mfa1*, in einer höheren Kopienzahl vorhanden. Auf Chromosom 22 war *UMAG\_06158* in der für 2n üblichen doppelten Kopienzahl im Genom zu finden, während *UMAG\_10072* eine höhere Kopienzahl aufwies. Die Chromosomen 1, 2 und 21 zeigten die reguläre 2n Kopienzahl. Bei UKS437 wurde auf Chromosom 1 eine Angleichung der Kopienzahlen von *bE1\_bE2* und *bE2\_bW2*, jedoch keine Abweichung der anderen beiden untersuchten Gene von 2n beobachtet werden. Gleichzeitig wurden Abweichungen von Genen auf Chromosom 5 festgestellt. Während *mfa2* auf Chromosom 5 eine leichte Erhöhung auf 0,75 zeigte, waren *UMAG\_02238*, *UMAG\_02438* und *UMAG\_10072* auf etwa 1,75-fache Kopienzahl erhöht. Die auf den Chromosomen 2, 21 und 22 untersuchten Gene zeigen die Kopienzahl für einen gewöhnlichen diploiden Chromosomensatz. In UKS456 wurde eine erhöhte Kopienzahl von *bE2\_bW2* auf Chromosom 1 gemessen, in Vergleich mit *bE1\_bE2* und eine Erhöhung der Kopienzahl der übrigen Gene auf den Chromosomen 1. Von den Genen auf Chromosom 2 lag dagegen *UMAG\_01374* in doppelter Kopienzahl verglichen zu *rab5a* vor. Alle auf Chromosom 5 untersuchten Gene waren in der Kopienzahl reduziert und die Kopienzahl von *mfa2* war geringer als die von *mfa1*. Gene auf Chromosom 21 wurden ebenfalls in einer erhöhten Kopienzahl gemessen.

## Ergebnisse

Da kein Muster im beobachteten Genverlust zu erkennen war, wurden mit zwei ausgewählten Stämmen Zeitreihen erstellt, um zu analysieren, ob die Zusammensetzung an Genen in einem Stamm über bestimmte Zeitdauern beständig bleibt oder sich bereits in kurzen Zeiträumen Differenzen ergeben. Änderungen in geringen Zeiträumen wurden basierend auf den morphologischen Abweichungen von Einzelkolonien vermutet (vgl. Abb. 75D). Dazu wurden die bereits analysierten Ausgangsstämme UKS436 und UKS456 (vgl. Abb. 80) zum Ausgangszeitpunkt (t1), nach weiteren 24 h Inkubation (t2) und Einzelkolonien aus Zeitpunkt t2 (t3) verglichen. Um die beobachteten morphologischen Variationen in Zusammenhang mit genomischen Veränderungen zu bringen wurden für den Zeitpunkt t3 Kolonien mit unterschiedlichen morphologischen Phänotypen ausgewählt. Aus UKS436 wurden dabei eine glatte (t3 (1)) und eine filamentöse Kolonie (t3 (2)) in die Analysen miteinbezogen. Für UKS456 wurden eine glatte Kolonie (t3 (1)), eine vollständig myzelbedeckte Kolonie (t3 (2)) und eine glatte Kolonie mit filamentösen Bereichen (t3 (3)) untersucht. Die analysierten Gene wurden in einer Zeitreihe dargestellt (Abb. 81).

Bei UKS436 konnte neben den bereits zu t1 beobachteten Abweichungen von einem diploiden Wildtyp (vgl. Abb. 80) zu t2 eine Reduktion von *UMAG\_11232* auf das 2n-Level festgestellt werden. In t1 war *UMAG\_11232* in erhöhter Kopienzahl vorhanden gewesen. Hier wird die Möglichkeit deutlich, dass Zellen einen zuvor angereicherten Chromosomenbereich wieder durch den ursprünglichen ersetzen. In t3(1), welcher sich durch eine glatte Kolonienbildung auszeichnet hatte, wurde eine Erhöhung der Kopienzahl von *bE1\_bE2* beobachtet, während *bE2\_bW2* nicht mehr vorhanden war. Gleichzeitig wurde eine Erhöhung der Kopienzahl von *UMAG\_00715* auf 4-fache Anzahl beobachtet, während *UMAG\_00467* nur noch in 0,75-facher Kopienmenge detektiert wurde. Gleichzeitig war *mfa2* angereichert. Die übrigen untersuchten Gene auf Chromosom 5, *UMAG\_02238*, *UMAG\_02438* und *UMAG\_10072* waren ebenfalls in ihrer Kopienzahl gegenüber den anderen Genen zu diesem Zeitpunkt, vermehrt vorhanden. Auch die analysierten Gene auf den Chromosomen 21 und 22 lagen in erhöhter Kopienzahl vor. Die DNA aus der glatten Kolonie zeigte im allgemeinen starke Veränderungen des Verhältnisses ihrer genomischen Zusammensetzung im Vergleich mit den Verhältnissen der Gene im Ausgangsstamm. Besonders jedoch das Fehlen des *b2*-Locus, ergänzte die

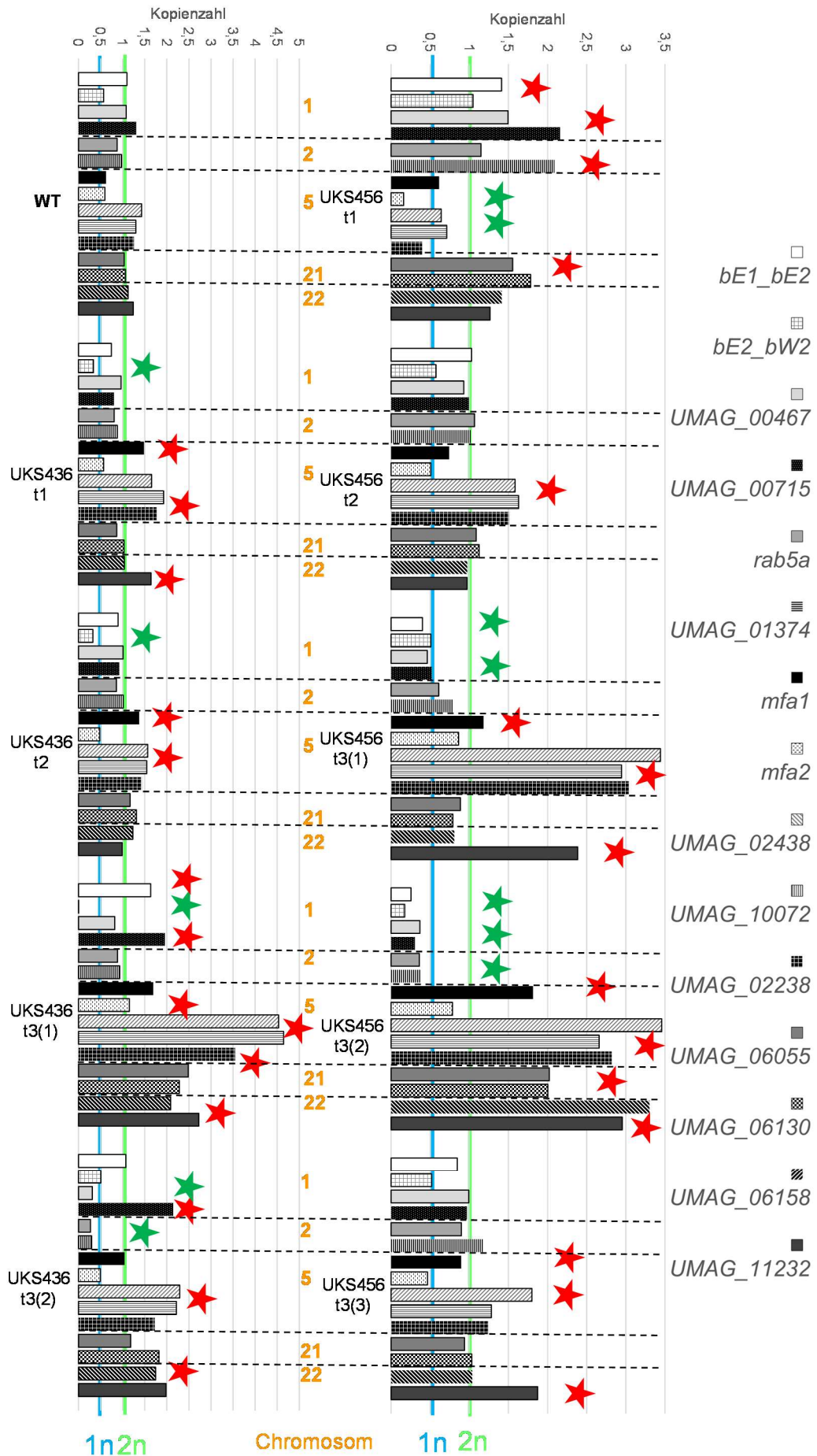
Beobachtungen eines ausbleibenden filamentösen Wachstums dieser Kolonie auf morphologischer Ebene. Im Gegensatz dazu war bei der filamentösen Kolonie (UKS436 t3 (2)) *bE1\_bE2* in doppelter Kopienzahl zu *bE2\_bW2* vorhanden, was für ein ausgeglichenes Verhältnis von *b1*- und *b2*-Locus spricht. *Mfa1* war zwar in doppelter Kopienzahl im Vergleich mit *mfa2* vorhanden, jedoch entsprach die Kopienzahl von *mfa2* etwa der von *bE2\_bW2*. Anhand der Kolonienmorphologie scheint die erhöhte Kopienzahl von *mfa1* die Ausbildung von Filamenten jedoch nicht zu beeinträchtigen, solange die übrigen Paarungstypgene ausreichend vorhanden sind. In UKS436 t3 (2) wurde ergänzend eine Reduktion der Kopienzahl von *UMAG\_00467* beobachtet, in Kombination mit einer deutlichen Erhöhung von *UMAG\_00715* auf Chromosom 1. Beide untersuchten Gene auf Chromosom 2 lagen in einer reduzierten Kopienzahl vor. Neben den Genen des *a*-Locus waren die übrigen untersuchten Gene auf Chromosom 5, *UMAG\_02238*, *UMAG\_02438* und *UMAG\_10072* in ihrer Kopienzahl gegenüber den anderen Genen dieses Stammes, vermehrt vorhanden. Auch die analysierten Gene auf den Chromosomen 21 und 22 lagen in erhöhter Kopienzahl vor.

In UKS456-Derivaten konnte neben den zu t1 beobachteten Abweichungen von einem diploiden Wildtyp (vgl. Abb. 80) zu t2 eine Rückgewinnung der mit einem diploiden Wildtyp vergleichbaren Verhältnisse aller untersuchten Gene auf den Chromosomen 1 und 2 und den Paarungstypgenen auf Chromosom 5 festgestellt werden (Abb. 81). Die übrigen untersuchten Gene auf Chromosom 5, *UMAG\_02238*, *UMAG\_02438* und *UMAG\_10072*, zeigten entgegen der zu t1 beobachteten Reduktion in der Kopienzahl zu t2 eine Anreicherung und waren von den untersuchten Genen in diesem Stamm diejenigen mit der höchsten Kopienzahl. Die Gene auf den Chromosomen 21 und 22, welche zu t1 in erhöhter Kopienzahl vorlagen, hatten sich zu t2 auf ein 2n-Niveau reduziert. In der glatten Kolonie von UKS456 (t3 (1)) wurde eine reduzierte Kopienzahl aller auf Chromosom 1 lokalisierten Gene ermittelt. Gleichzeitig waren auch Gene auf Chromosom 2 in ihrer Kopienzahl reduziert. Stattdessen konnte eine erhöhte Kopienzahl von *mfa1* und *mfa2* auf Chromosom 5 festgestellt werden, welche mit einer gleichzeitigen Erhöhung der Kopienzahl der anderen auf Chromosom 5 untersuchten Gene einherging. Während die Gene auf Chromosom 21 in einer leicht reduzierten Kopienzahl vorlagen, war von den untersuchten Genen auf Chromosom 22 eines in der Kopienzahl reduziert, während das andere erhöht war. Die vergleichbare Kopienzahl von *bE1\_bE2* und *bE2\_bW2* spricht für ein Fehlen des *b1*-Allels, was das

## Ergebnisse

Ausbleiben von Myzelbildung erklären würde. In der filamentösen Kolonie von UKS456 (t3 (2)) wurde, im Vergleich mit den übrigen untersuchten Genen in diesem Stamm, eine reduzierte Kopienzahl von allen untersuchten Genen auf Chromosom 1 beobachtet. Eine deutliche Erhöhung in der Kopienzahl wurde für *mfa1* nachgewiesen, während *mfa2* in leicht erhöhter Kopienzahl vorlag. Die anderen Gene auf Chromosom 5 waren ebenfalls in erhöhter Kopienzahl nachzuweisen, was dafür spricht, dass das Chromosom mit dem *a1*-Locus mehrfach vorhanden war. Auch die untersuchten Gene auf den Chromosomen 21 und 22 konnten in erhöhter Kopienzahl detektiert werden. Obwohl die *b*-Gene in reduzierter Kopienzahl vorlagen, schien dies im Hinblick auf die Morphologie der Kolonie für ein filamentöses Wachstum jedoch auszureichen. In der Kolonie von UKS456, welche eine glatte Morphologie mit filamentösen Bereichen ausprägte (t3 (3)), waren die untersuchten Gene auf Chromosom 1, 2 und 21 in einem ähnlichen Verhältnis der Kopienzahl zueinander, wie es auch im diploiden Wildtyp beobachtet worden war, vorhanden. Von den auf Chromosom 5 lokalisierten Genen konnte eine erhöhte Kopienzahl von *mfa1* und *UMAG\_02438* festgestellt werden, während *mfa2*, *UMAG\_10072* und *UMAG\_02238* keine Veränderungen der Kopienzahl zeigten. Von den Genen auf Chromosom 22 war eines in doppelter Kopienzahl zum anderen vorhanden. Die erhöhte *mfa1*-Kopienzahl deutet auf eine Duplikation des Chromosoms mit dem *a1*-Allels und auf eine Homozygotie des *a1*-Locus in einigen Zellen der Kultur hin, wodurch nur noch die Zellen mit dem heterozygoten *a*-Locus filamentös wachsen würden und die Kolonienmorphologie unregelmäßig wird.





## Ergebnisse

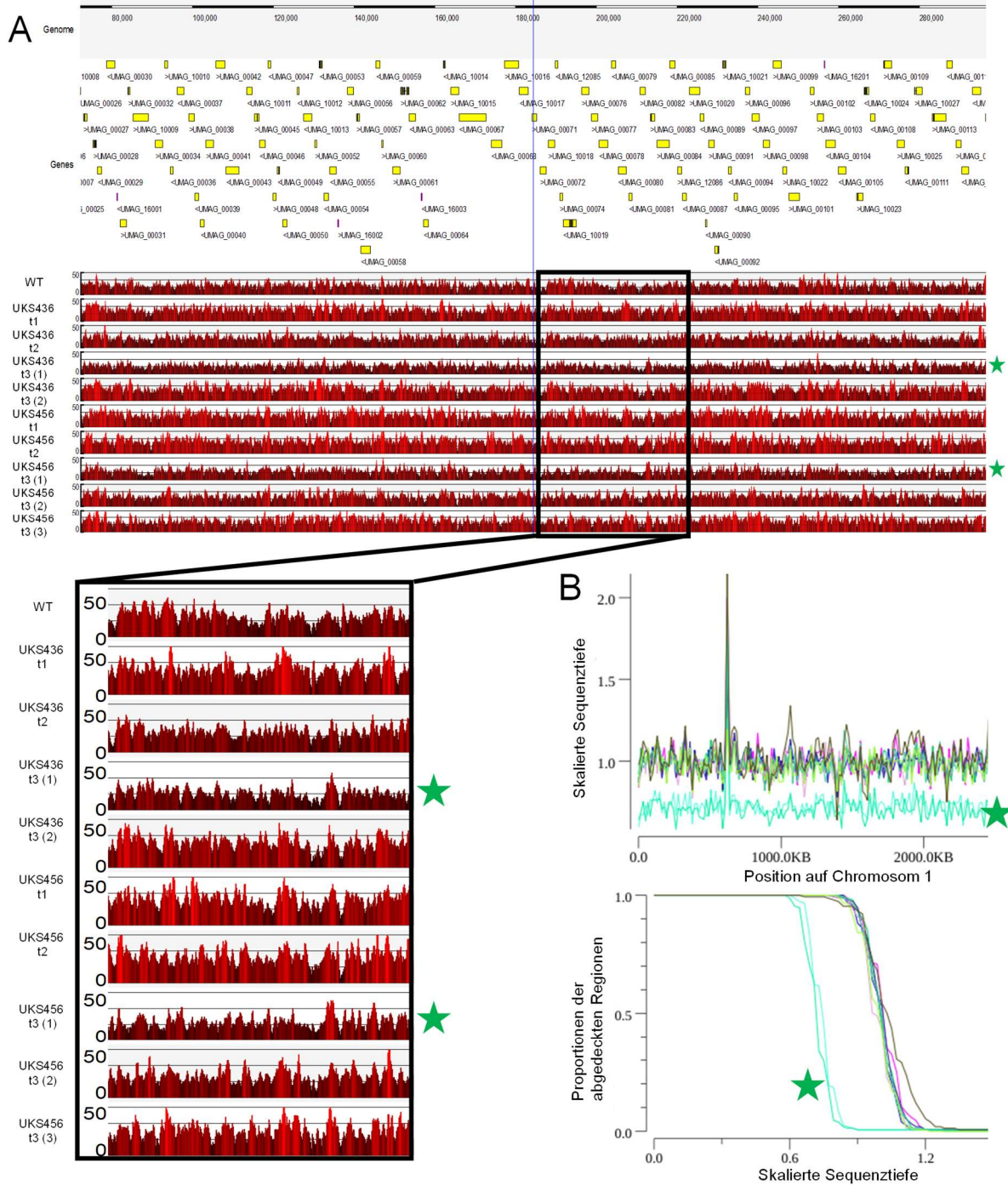
### **Abb. 81: Instabile $\Delta rab5b^M$ -Stämme verlieren Chromosomen und Chromosomenbereiche in kurzen Zeitspannen**

Die Normalisierung der CT-Werte erfolgte durch Berechnung eines Mittelwertes der CT-Werte von allen untersuchten Genen in allen untersuchten Stämmen und Division durch den Mittelwert aller untersuchten Gene eines jeden Stammes. Der dadurch generierte Faktor pro Stamm wurde auf alle Gene dieses Stammes angewendet. Im Anschluss erfolgte die Normalisierung durch die haploiden Wildtypstämme FB1 und FB2 und die Darstellung der Genkopienzahl als  $\log_2$ . Ein einfacher Chromosomensatz (1n, blaue Linie) zeigt sich mit einem Wert von 0,5, während eine diploide Kopienzahl (2n, hellgrüne Linie) durch den Wert 1 dargestellt wird. Es wurden die Paarungstypgene *mfa1* und *mfa2* des *a*-Locus bestimmt, sowie *bE1\_bE2* und *bE2\_bW2* des *b*-Locus. Während die Primerpaare für *mfa1*, *mfa2*, *bE2\_bW2* spezifisch für das *a1*, das *a2* oder das *b2*-Allel sind, binden die Primer für *bE1\_bE2* im konstanten Bereich des *bE*-Gens und können damit sowohl *bE1*, als auch *bE2* amplifizieren. Somit sollte bei einer regulären Verteilung der Paarungstypgene in einem diploiden Stamm *bE1\_bE2* in der doppelten Kopienzahl wie *mfa1*, *mfa2* und *bE2\_bW2* gemessen werden. Neben *bE1\_bE2* und *bE2\_bW2* auf Chromosom 1 wurden *UMAG\_00467* und *UMAG\_00715* ausgewählt. Ergänzend zu *mfa1* und *mfa2* auf Chromosom 5 wurden *UMAG\_02238*, *UMAG\_02438* und *UMAG\_10072* analysiert. Neben den beiden großen Chromosomen 1 und 5 wurde ebenfalls Chromosom 2 mit *rab5a* und *UMAG\_01374* untersucht. Auf dem kleinen Chromosom 21 wurden die Gene *UMAG\_06055* und *UMAG\_06130* und auf Chromosom 22 die Gene *UMAG\_06158* und *UMAG\_11232* analysiert. Im diploiden Wildtyp UKS514 (*a1b1a2b2*) waren mit Ausnahme der Paarungstypgene, welche in einfacher Kopie vorliegen, alle untersuchten Gene in zweifacher Kopienzahl vorhanden. Bei den  $\Delta rab5b^M$ -Stämmen wurde eine Zeitreihe auf Basis der bereits analysierten Ausgangsstämme UKS436 und UKS456 zum Ausgangszeitpunkt (t1), nach weiteren 24 h Inkubation (t2) und von morphologisch verschiedenen Einzelkolonien aus Zeitpunkt t2 (t3) verglichen. In UKS436 (t1, links) waren mit Ausnahme von *mfa2* sämtliche Gene auf Chromosom 5, auch *mfa1*, in einer höheren Kopienzahl (roter Stern) vorhanden. Auf Chromosom 22 war *UMAG\_06158* in der für 2n üblichen doppelten Kopienzahl im Genom zu finden, während *UMAG\_10072* eine höhere Kopienzahl aufwies. Zu t2 wurde eine Reduktion (grüner Stern) von *UMAG\_11232* auf das 2n-Level festgestellt. In t3(1) wurde eine Erhöhung der Kopienzahl von *bE1\_bE2* beobachtet, während *bE2\_bW2* nicht mehr vorhanden war. Gleichzeitig gab es eine Erhöhung der Kopienzahl von *UMAG\_00715* auf die 4-fache Anzahl, während *UMAG\_00467* nur noch in 0,75-facher Kopienmenge detektiert wurde. *Mfa2*, *UMAG\_02238*, *UMAG\_02438* und *UMAG\_10072* waren in ihrer Kopienzahl gegenüber den anderen Genen zu diesem Zeitpunkt, vermehrt vorhanden. In UKS436 t3 (2) wurde eine Reduktion der Kopienzahl von *UMAG\_00467* beobachtet, in Kombination mit einer deutlichen Erhöhung von *UMAG\_00715* auf Chromosom 1. Neben den Genen des *a*-Locus waren die übrigen untersuchten Gene auf Chromosom 5, *UMAG\_02238*, *UMAG\_02438* und *UMAG\_10072* in ihrer Kopienzahl gegenüber den anderen Genen dieses Stammes, vermehrt vorhanden. In UKS456 (t1, rechts) wurde, im Vergleich mit *bE1\_bE2*, eine erhöhte Kopienzahl von *bE2\_bW2* und eine Erhöhung der Kopienzahl der übrigen Gene auf Chromosom 1 gemessen. Alle auf Chromosom 5 lokalisierten, untersuchten Gene waren in der Kopienzahl reduziert und die Kopienzahl von *mfa2* war geringer als die von *mfa1*. In t2 zeigten *UMAG\_02238*, *UMAG\_02438* und *UMAG\_10072* eine Anreicherung. In UKS456 (t3 (1)) wurde eine reduzierte Kopienzahl aller auf Chromosom 1 und 2 lokalisierten Gene ermittelt. Stattdessen konnte eine erhöhte Kopienzahl von Genen auf Chromosom 5 beobachtet werden. In UKS456 (t3 (2)) wurde eine reduzierte Kopienzahl von allen untersuchten Genen auf Chromosom 1 beobachtet. Gene auf den Chromosomen 5, 21 und 22 waren in erhöhter Kopienzahl nachzuweisen. Bei UKS456 (t3 (3)) wurde von den auf Chromosom 5 lokalisierten Genen eine erhöhte Kopienzahl von *mfa1* und *UMAG\_02438* festgestellt, während die übrigen keine Veränderungen der Kopienzahl zeigten. Von den Genen auf Chromosom 22 war eines in doppelter Kopienzahl zu dem anderen vorhanden.

Aufgrund der beobachteten Genreduktionen in Kombination mit den Variationen der Kolonienmorphologie wurde zunächst vermutet, dass Chromosomen vollständig verloren gehen. Die unterschiedliche Beeinflussung von Genen auf demselben Chromosom zeigt jedoch, dass dies nicht die einzige Auswirkung sein kann. Stattdessen kann ebenfalls eine Beeinflussung einzelner Gene oder Chromosomenbereiche vermutet werden. Die Beobachtung der morphologischen Veränderungen des Wachstumsverhaltens auf Aktivkohle konnte mit Variationen in der Zusammensetzung der Paarungstypgene korreliert werden. Jedoch konnte auch die Beeinflussung von anderen Genen auf anderen Chromosomen beobachtet werden, welche auch unabhängig von der Chromosomengröße aufzutreten schienen. Darauf basierend wurde die Theorie erstellt, dass die  $\Delta rab5b^M$ -Stämme genomisch instabil sind, dadurch Chromosomen und Chromosomenbereiche bei der Zellteilung verlieren, was letztendlich zu Aneuploidie führt. Um eine genomweite Aussage treffen zu können, wurde das Genom von einer Auswahl an  $\Delta rab5b^M$ -Stämmen sequenziert. Als Vergleich wurde der diploide Wildtyp UKS514 (*a1b1a2b2*) mitgeführt. Außerdem erfolgte ein Vergleich des  $\Delta rab5b^M$ -Stammes UKS436 zum Ausgangszeitpunkt (t1), nach 24 h Inkubation (t2) und aus t2 generierten, sich morphologisch unterscheidenden Einzelkolonien (t3 (1) und t3 (2)). Ergänzend wurde der  $\Delta rab5b^M$ -Stamm UKS456 zum Ausgangszeitpunkt (t1), nach 24 h Inkubation (t2) und aus t2 generierten, sich morphologisch unterscheidenden Einzelkolonien (t3 (1), t3 (2) und t3 (3)) analysiert. Nach der Sequenzierung der ausgewählten Stämme (G2L, Georg-August-Universität Göttingen) erfolgte die Alignierung der *reads* auf das Genom von *U. maydis* und ein Vergleich von SNPs (*single nucleotide polymorphism*). Ein Vergleich der  $\Delta rab5b^M$ -Stämme mit dem diploiden Wildtypstamm bestätigte die Vermutung, dass die  $\Delta rab5b^M$ -Mutanten vollständige Chromosomen verlieren (Abb. 82), ein zusätzliches Chromosom enthalten (Abb. 83) oder Bereiche von Chromosomen deletiert oder vervielfältigt sind (Abb. 84). Im Folgenden wird für jedes der aufgeführten Szenarien ein Beispiel angeführt. Durch einen Ausschnitt von Chromosom 1 dargestellt, konnte gezeigt werden, dass von den neun untersuchten  $\Delta rab5b^M$ -Stämmen im Genom von zwei Mutanten (UKS436 t3 (1) und UKS456 t3 (1)) Gene von Chromosom 1 nur in der halben Kopienzahl, verglichen mit den übrigen Stämmen, enthalten waren (Abb. 82). Diese beiden Mutanten hatten folglich eines der Chromosomen 1 verloren, während andere Chromosomen weiterhin zweifach vorlagen (vgl. Abb. 83). Im Gegensatz dazu konnte für eine (UKS456 t3 (2)) der neun

## Ergebnisse

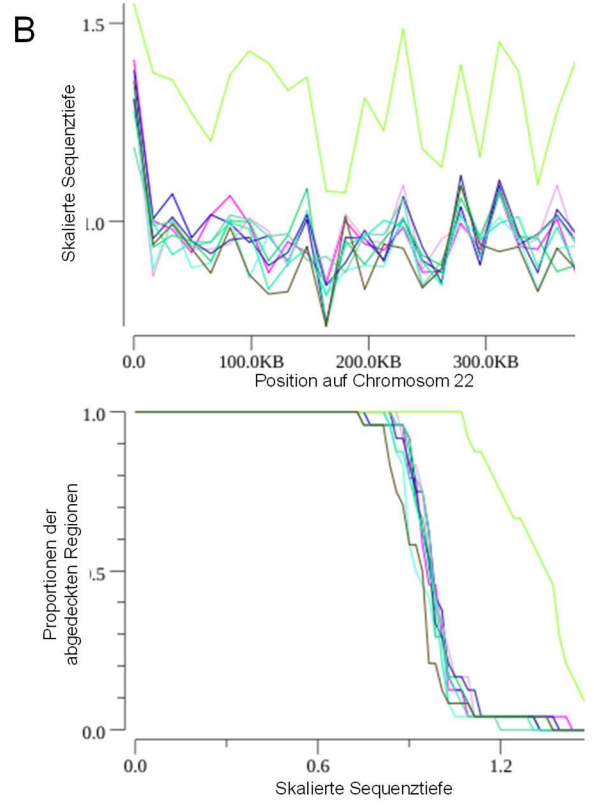
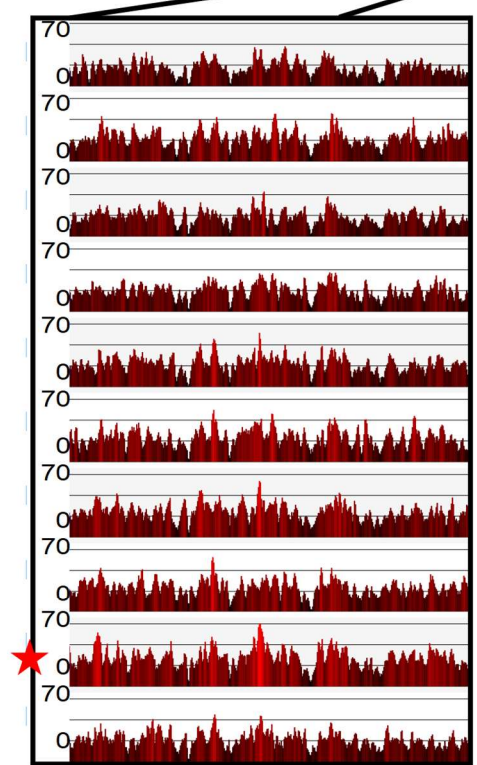
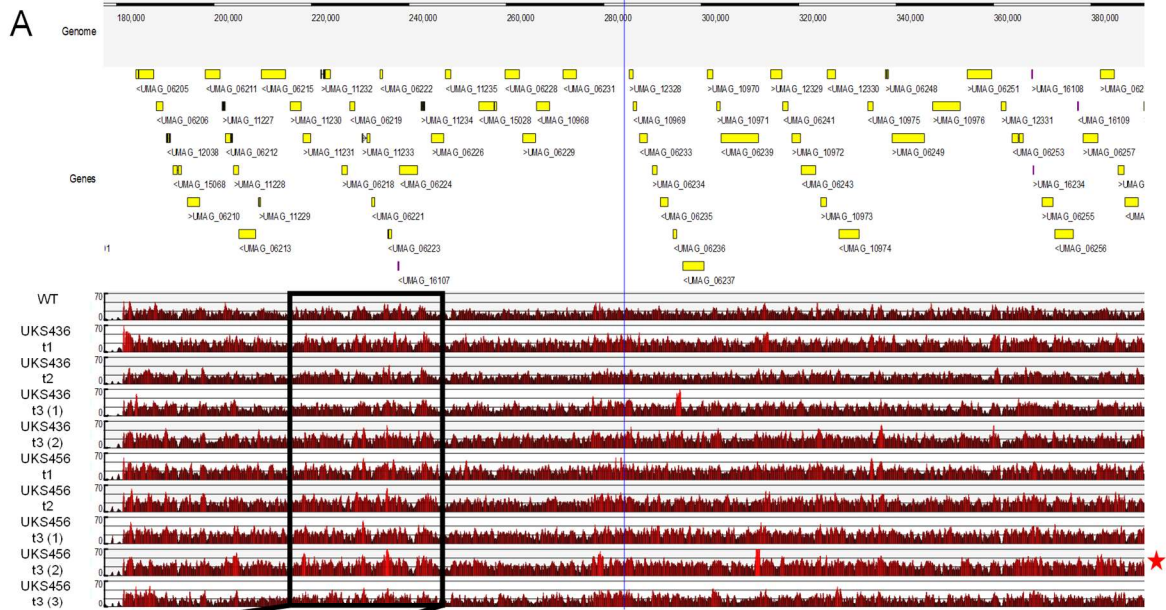
untersuchten  $\Delta rab5b^M$ -Mutanten ein zusätzliches Chromosom 22 identifiziert werden (Abb. 83). Während die übrigen Stämme Chromosom 22 zweifach enthielten, lag es in UKS456 t3 (2) dreimal vor. Dies bestätigte die Vermutung von genomischer Instabilität von  $\Delta rab5b^M$ -Stämmen und zeigte, dass diese Instabilität in Aneuploidie resultiert. Neben den Veränderungen bezüglich der Chromosomenzahl konnten auch Deletionen von Chromosomenbereichen oder Vervielfältigungen von Regionen beobachtet werden (Abb. 84). Am Beispiel von Chromosom 5 wurde gezeigt, dass in der Population der  $\Delta rab5b^M$ -Mutante UKS456 t3 (3) Zellen mit Chromosomen vorkamen, in denen mehreren Bereichen fehlten, während andere angereichert waren. Da gezeigt werden konnte, dass die  $\Delta rab5b^M$ -Stämme innerhalb von kurzen Zeitspannen Chromosomen oder Bereiche von Chromosomen verloren (vgl. Abb. 81), werden Deletionen von Chromosomenbereichen erst mit fortschreitenden Zellteilungen weiter vervielfältigt und sind nicht direkt in der gesamten Zellkultur nachzuweisen. Eine Reduktion der Kopienzahl von Chromosomenbereichen im Vergleich mit dem zugehörigen Chromosom spricht jedoch für eine Deletion in diesem Bereich in einem Anteil der Zellpopulation. Ähnliches gilt für angereicherte Bereiche, bei denen Vervielfältigungen von oder Insertionen in Chromosomenregionen zugrunde liegen.



## Ergebnisse

### **Abb. 82: Die $\Delta rab5b^M$ -Mutanten verlieren vollständige Chromosomen**

Das Genom von einer Auswahl an  $\Delta rab5b^M$ -Stämmen und dem diploiden Wildtyp UKS514 (*a1b1a2b2*) wurde sequenziert. Es erfolgte ein Vergleich des  $\Delta rab5b^M$ -Stammes UKS436 zum Ausgangszeitpunkt (t1), nach 24 h Inkubation (t2) und aus t2 generierten, sich morphologisch unterscheidenden Einzelkolonien (t3 (1) und t3 (2)). Zusätzlich wurde der  $\Delta rab5b^M$ -Stamm UKS456 zum Ausgangszeitpunkt (t1), nach 24 h Inkubation (t2) und aus t2 generierten, sich morphologisch unterscheidenden Einzelkolonien (t3 (1), t3 (2) und t3 (3)) untersucht. Nach der Sequenzierung der ausgewählten Stämme erfolgte die Alignierung der *reads* auf das Genom von *U. maydis* und ein Vergleich von SNPs. Die  $\Delta rab5b^M$ -Stämme verlieren, wie hier an Chromosom 1 gezeigt, vollständige Chromosomen. **A)** Dargestellt für einen Ausschnitt von Chromosom 1 wurde gezeigt, dass von den neun untersuchten  $\Delta rab5b^M$ -Stämmen, verglichen mit den übrigen Stämmen, im Genom von UKS436 t3 (1) und UKS456 t3 (1) (grüne Sterne) Gene von Chromosom 1 nur in der halben Kopienzahl enthalten waren. **B)** Durch eine Gegenüberstellung der Sequenztiefe und der Chromosomenposition (oben) wurde gezeigt, dass die  $\Delta rab5b^M$ -Mutanten UKS436 t3 (1) und UKS456 t3 (1) (türkisfarbene Linien, markiert mit grünen Sternen), im Vergleich mit den übrigen Stämmen, auf der vollständigen Chromosomenlänge die Hälfte des DNA-Gehaltes enthalten. Dadurch konnte nachgewiesen werden, dass diese beiden Stämme Chromosom 1 nur noch einmal enthalten. Der *peak* veranschaulicht das Zentromer des Chromosoms. Die Darstellung der Sequenztiefe in Gegenüberstellung mit den Proportionen der abgedeckten chromosomalen Regionen (unten) zeigt in einer exakteren Auftrennung der Kopienzahlen ebenfalls, dass die  $\Delta rab5b^M$ -Stämme UKS436 t3 (1) und UKS456 t3 (1) nur noch eine Kopie von Chromosom 1 enthalten.

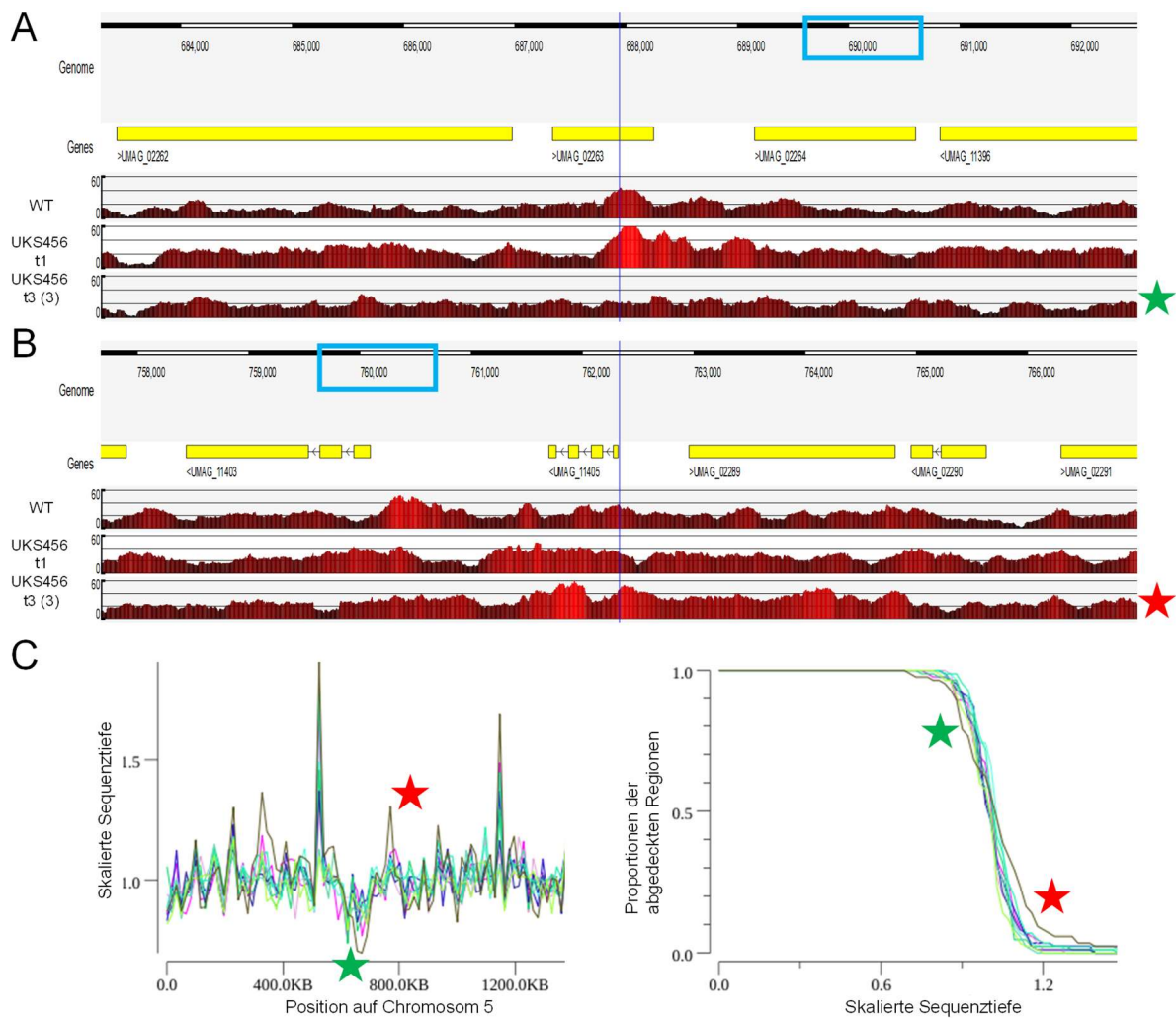


## Ergebnisse

### **Abb. 83: Die $\Delta rab5b^M$ -Mutanten enthalten zusätzliche, vollständige Chromosomen**

Das Genom von einer Auswahl an  $\Delta rab5b^M$ -Stämmen und dem diploiden Wildtyp UKS514 (*a1b1a2b2*) wurde sequenziert. Es erfolgte ein Vergleich des  $\Delta rab5b^M$ -Stammes UKS436 zum Ausgangszeitpunkt (t1), nach 24 h Inkubation (t2) und aus t2 generierten, sich morphologisch unterscheidenden Einzelkolonien (t3 (1) und t3 (2)). Zusätzlich wurde der  $\Delta rab5b^M$ -Stamm UKS456 zum Ausgangszeitpunkt (t1), nach 24 h Inkubation (t2) und aus t2 generierten, sich morphologisch unterscheidenden Einzelkolonien (t3 (1), t3 (2) und t3 (3)) untersucht. Nach der Sequenzierung der ausgewählten Stämme erfolgte die Alignierung der *reads* auf das Genom von *U. maydis* und ein Vergleich von SNPs. Die  $\Delta rab5b^M$ -Stämme enthalten, wie hier an Chromosom 22 gezeigt, zusätzliche Chromosomen. **A)** Dargestellt für einen Ausschnitt von Chromosom 22 wird gezeigt, dass von den neun untersuchten  $\Delta rab5b^M$ -Stämmen im Genom von UKS456 t3 (2) (roter Stern) ein zusätzliches Chromosom nachgewiesen wurde. Während die übrigen Stämme Chromosom 22 zweifach enthielten, lag es in UKS456 t3 (2) dreimal vor. **B)** Durch eine Gegenüberstellung der Sequenztiefe und der Chromosomenposition (oben) wurde gezeigt, dass die  $\Delta rab5b^M$ -Mutante UKS456 t3 (2) (grüne Linie, markiert mit rotem Stern) auf der vollständigen Chromosomenlänge etwa 50 % Zunahme des DNA-Gehaltes, im Vergleich mit den übrigen Stämmen, enthalten. Dadurch konnte nachgewiesen werden, dass dieser Stamm Chromosom 22 dreimal enthielt. Der *peak* veranschaulicht das Zentromer des Chromosoms. Die Darstellung der Sequenztiefe in Gegenüberstellung mit den Proportionen der abgedeckten chromosomalen Regionen (unten) zeigt in einer exakteren Auftrennung der Kopienzahlen ebenfalls, dass der  $\Delta rab5b^M$ -Stamm UKS456 t3 (2) eine zusätzliche Kopie von Chromosom 22 enthielt.





**Abb. 84: In den  $\Delta rab5b^M$ -Mutanten werden Bereiche von Chromosomen deletiert oder vervielfältigt**

Das Genom von einer Auswahl an  $\Delta rab5b^M$ -Stämmen und dem diploiden Wildtyp UKS514 (*a1b1a2b2*) wurde sequenziert. Es erfolgte ein Vergleich des  $\Delta rab5b^M$ -Stammes UKS436 zum Ausgangszeitpunkt (t1), nach 24 h Inkubation (t2) und aus t2 generierten, sich morphologisch unterscheidenden Einzelkolonien (t3 (1) und t3 (2)). Zusätzlich wurde der  $\Delta rab5b^M$ -Stamm UKS456 zum Ausgangszeitpunkt (t1), nach 24 h Inkubation (t2) und aus t2 generierten, sich morphologisch unterscheidenden Einzelkolonien (t3 (1), t3 (2) und t3 (3)) untersucht. Nach der Sequenzierung der ausgewählten Stämme erfolgte die Alignment der *reads* auf das Genom von *U. maydis* und ein Vergleich von SNPs. Die  $\Delta rab5b^M$ -Stämme enthalten, wie hier an Chromosom 5 gezeigt, Bereiche mit Deletionen oder Anreicherungen. **A)** Dargestellt für einen Ausschnitt von Chromosom 5 bei etwa 690 kb (blauer Kasten) wurde gezeigt, dass dieser Chromosomenbereich bei UKS456 t3 (3) (grüner Stern) in reduzierter Kopienzahl im Vergleich mit dem Ausgangsstamm UKS456 t1 und dem diploiden Wildtyp vorlag. **B)** Dargestellt für einen Ausschnitt von Chromosom 5 bei etwa 760 kb (blauer Kasten) wurde gezeigt, dass dieser Chromosomenbereich bei UKS456 t3 (3) (roter Stern) in erhöhter Kopienzahl im Vergleich mit dem Ausgangsstamm UKS456 t1 und dem diploiden Wildtyp vorlag. **C)** Durch eine Gegenüberstellung der Sequenztiefe und der Chromosomenposition (oben) wurde gezeigt, dass UKS456 t3 (3) (braune Linie) bei etwa 690 kb den geringsten DNA-Gehalt von allen untersuchten  $\Delta rab5b^M$ -Stämmen enthielt (grüner Stern). Bei etwa 760 kb enthielt UKS456 t3 (3) dagegen einen erhöhten DNA-Gehalt (roter Stern). Der *peak* veranschaulicht das Zentromer des Chromosoms. Die Darstellung der Sequenztiefe in Gegenüberstellung mit den Proportionen der abgedeckten chromosomalen Regionen (unten) zeigt in einer exakteren Auftrennung der Kopienzahlen ebenfalls, dass der  $\Delta rab5b^M$ -Stamm UKS456 t3 (3) bereichsweise Abweichungen in Richtung geringere Kopienzahl (grüner Stern) und in Richtung Vervielfältigung (roter Stern) enthielt.

## **4. Diskussion**

Die Analogie vieler auf endosomalen Transportprozessen basierenden Vorgängen zwischen filamentösen Pilzen wie *U. maydis* und höheren eukaryotischen Organismen wie den Säugetieren zeugen von deren Relevanz (Geli und Riezman, 1998). Dabei spielen Prozesse wie die Endozytose und auf Endosomen basierende Langstreckentransporte in filamentösen Pilzen eine wichtige Rolle für die Zellenderweiterung an der Filamentspitze, den Signalaustausch mit der Wirtspflanze oder die zielgerichtete Verteilung von RNA in der Zelle. Diese konnte beispielsweise auch in den Neuronen von Säugetieren beobachtet werden (Gerdes und Katsanis, 2005, Becht *et al.*, 2006, Steinberg und Perez-Martin, 2008, Steinberg, 2014, Yoon *et al.*, 2016). Umso bedeutender ist es, die Mechanismen zu verstehen, die diesen Vorgängen zugrunde liegen. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Populationen der frühen und späten Endosomen in *U. maydis* charakterisiert und das regulatorische Zusammenspiel zwischen den für die jeweilige Endosomenpopulation spezifischen Rab-GTPasen untersucht. Neben der grundlegenden Charakterisierung des Rab-GTPasen-basierten endosomalen Transportes wurde besonderes Augenmerk auf Nma1 gelegt, welches als Interaktionspartner des Spleißosom-assoziierten Num1 identifiziert wurde (Kellner, 2009) und Einfluss auf die Population der frühen Endosomen hat (Schneider, 2016). Anhaltspunkte auf den zugrunde liegenden Mechanismus gab dabei die Interaktion zwischen Nma1 und der CORVET-Komponente Vps3 (Pinter, 2015). Die durchgeführten Analysen zur Lokalisierung von Nma1 mit verschiedenen Komponenten der Endosomen und des CORVET-Komplexes wurden mit den Phänotypen von Deletionsmutanten der beteiligten Proteine kombiniert und bieten neue Einblicke in die komplexe Regulation der endosomalen Transportvorgänge. Dadurch wurde aufgeklärt, inwieweit durch Nma1 die Population der frühen Endosomen stabilisiert wird, um in der Zelle eine ausreichende Anzahl an Transportvesikeln sicher zu stellen. Es erfolgt eine Feinabstimmung zwischen den verschiedenen Populationen der frühen Endosomen und dem Reifungsprozess zu den späten Endosomen unter Inklusion des Rab5-Effektors CORVET-Komplex. Der Einfluss von Nma1 auf die frühen Endosomen beschränkte sich jedoch nicht nur auf das filamentöse Wachstum. Nachdem für Nma1 eine Colokalisierung mit dem

Spindelpolkörper in der offenen Mitose von *U. maydis* und eine ähnliche Lokalisierung der Rab5a-Endosomen über die Mitosestadien beobachtet wurde (Obhof, 2017), erfolgte eine Analyse der Funktion der Rab-GTPasen im Zusammenhang mit Nma1 während der mitotischen Teilung. Die offene Mitose von *U. maydis* und die Cyclin-gesteuerte Zellzyklusregulation weist starke Ähnlichkeiten zu der Mitose von höheren Eukaryoten auf (Furuno *et al.*, 1999, Garcia-Muse *et al.*, 2004, Steinberg und Perez-Martin, 2008). Nachdem für Säugetiere bereits Funktionen der frühen Endosomen, unter anderem durch die Anlieferung von Faktoren für die Anheftung der Kinetochore an die Chromosomen während der Mitose aber auch für die Zytokinese beschrieben wurden (Daeden und Gonzalez-Gaitan, 2018, Lanzetti, 2012), konnte eine Beteiligung von Nma1 bei der Rekrutierung von frühen Endosomen an die Mitosespindel und eine stabilisierende Funktion der frühen Endosomen auf die Spindelelongation in *U. maydis* beobachtet werden. Der Einfluss von Nma1 auf die frühen Endosomen in Sporidien während Zellteilungsabläufen und bei filamentösen Wachstumsprozessen wird nachfolgend diskutiert.

#### 4.1. Charakterisierung der frühen und späten Endosomen in *U. maydis*

Um die Regulation der endosomalen Transportvorgänge verstehen zu können und Einflussnahmen von untersuchten Proteinen korrekt einordnen zu können, erfolgte zunächst eine grundlegende Charakterisierung der in *U. maydis* ablaufenden Prozesse. Bisher bekannte Analysen beschränkten sich auf den Einfluss von Gendeletionen auf den Ablauf von endosomalen Transporten im Generellen, die Transportmechanismen durch Motorproteine oder den spezialisierten Transport von RNA durch Endosomen. Dabei wurden die aus Hefe und Säugetierzellen bekannten Markerproteine Rab5a und Rab7 für die Visualisierung von frühen oder späten Endosomen verwendet. Alternativ erfolgten Zuordnungen zu diesen Endosomenpopulationen durch internalisierte Färbemittel wie FM4-64 (Wedlich-Söldner *et al.*, 2000, Fuchs *et al.*, 2006, Higuchi *et al.*, 2014). In dieser Arbeit erfolgte erstmalig für *U. maydis* die Analyse der neben Rab5a bioinformatisch identifizierten Rab5-GTPasen Rab5b und Rab5c, deren gegenseitige Einflussnahme und die Auswirkungen auf den Reifeprozesses von frühen zu späten Endosomen.

### 4.1.1. Eine starke Expression der Rab-GTPasen stimuliert die Fusion der Endosomen

Bevor die Analysen der Populationen der frühen und späten Endosomen erfolgten, wurde die Funktionalität der verwendeten Markerproteine sichergestellt. In sämtlichen Vorarbeiten wurden die Markerproteine in externen genetischen Loci unter der Expression von starken, konstitutiv aktiven Promotoren wie  $P_{otef}$  oder  $P_{tef}$  verwendet (Spellig *et al.*, 1996, Fuchs *et al.*, 2006, Higuchi *et al.*, 2014, Schneider, 2016, Obhof, 2017). Die Expression erfolgte dabei jeweils in einem externen Locus, wobei das Protein zusätzlich nativ exprimiert wurde, was in einer Überexpression resultiert. In dieser Arbeit wurde die Fusion der als Marker verwendeten Rab5a- und Rab7-GTPasen im nativen Locus unter der Expression ihres eigenen Promotors der Expression von  $P_{tef}$  gegenübergestellt. Für die Rab5a-positiven, frühen Endosomen konnte durch die  $P_{tef}$ -vermittelte Überexpression im Vergleich mit der Expression unter dem nativen Promotor eine signifikante Reduktion der Anzahl bestimmt werden, gekoppelt mit einer als nicht signifikant eingestuften Größenzunahme bei der Expression unter  $P_{tef}$  (Abb. 14). Ähnliches wurde auch für die Rab7-positiven, späten Endosomen beobachtet. Durch die  $P_{tef}$ -vermittelte Expression reduzierte sich die Anzahl der Rab7-markierten Vesikel signifikant bei gleichzeitiger signifikanter Größenzunahme der Vesikel. Eine Reduktion der Anzahl an Vesikeln ist entweder auf eine verminderte Produktion der Organellen zurückzuführen oder auf eine verstärkte Fusionsrate. In Kombination mit der beobachteten Größenzunahme ist jedoch eine erhöhte Fusionsrate wahrscheinlicher. Für Säugetierzellen wurden bereits ähnliche Beobachtungen beschrieben. Durch eine Überexpression von Rab5a kam es zu einer gesteigerten Vesikelgröße. Diese wurde zurückgeführt auf die durch das stärkere Expressionslevel erhöhte Verfügbarkeit von aktiven Rab5a-Molekülen in den Membranen der frühen Endosomen. Dadurch steigt die Chance auf eine Interaktion zwischen Donor- und Akzeptormembran und somit wird die Fusionsrate stimuliert (Bucci *et al.*, 1992). Auch der Vergleich von generierten Kymographen zwischen Stämmen mit der Expression durch  $P_{tef}$  und Stämmen mit der Expression durch den nativen Promotor unterstützt diese Theorie. In Stämmen mit Überexpression von Rab5a wurde, im Gegensatz zur Expression durch den nativen Promotor alleine, eine Zunahme an statischen Signalen und eine gleichzeitige Reduktion von motilen Signalen beobachtet. Diese statischen Signale zeichneten sich gleichzeitig durch ihre große Fläche aus und erinnerten von ihrem Bewegungsmuster eher an späte

Endosomen. Frühe Endosomen reifen im Laufe des Endozytose-Stoffwechselweges über diverse Fusionsereignisse hinweg zu späten Endosomen (Mellman, 1996, Abenza *et al.*, 2010). Es wurde jedoch bereits für Säugetierzellen eine überlappende Lokalisierung von Rab5a und Rab7 anstelle einer vollständigen Entfernung von Rab5a im Reifeprozess beschrieben (Shearer und Petersen, 2019). Durch die erhöhte Fusionsrate der starken Expression kann daher eine verstärkte Lokalisierung von Rab5a-Molekülen auf frisch gereiften späten Endosomen vermutet werden.

#### 4.1.2. *U. maydis* hat deutlich separierte Populationen an frühen und späten Endosomen

Anhand von Colokalisierungsstudien wurde unter Zuhilfenahme der Markerverteilung der beiden prominenten Marker für frühe und späte Endosomen, Rab5a und Rab7, das Verhältnis der Endosomenpopulationen untersucht. Aufgrund der phänotypischen Veränderungen bei der Überexpression der Rab-GTPasen (vgl. Kapitel 4.1.1) wurden alle Analysen mit Stämmen durchgeführt, bei denen die markierten Proteine unter dem nativen Promotor exprimiert wurden. Dabei wurde beobachtet, dass Rab5a und Rab7 überwiegend in voneinander separierten Lokalisierungen vorlagen (Abb. 15). Rab5a war auf sich bidirektional, mit häufigen Richtungsänderungen fortbewegenden Vesikeln geringer Größe zu finden. Die Steigung der Bewegungsgerade zeigte außerdem das Zurücklegen größerer Distanzen in kurzen Zeitintervallen und implizierte damit eine hohe Transportgeschwindigkeit. Rab7 war hauptsächlich auf größeren, statischen Vesikeln lokalisiert, welche sich höchstens über kurze Strecken während einer langen Zeitspanne fortbewegten, wodurch sich eine langsame Geschwindigkeit abzeichnet. Auf einigen wenigen statischen Rab7-positiven Endosomen wurde gleichzeitig auch die Lokalisierung von Rab5a detektiert. Diese Resultate sprechen für die prinzipiell vorherrschende Aufgabentrennung und damit auch für die Separierung der charaktervermittelnden Rab-Proteine der frühen und späten Endosomen, wie sie für humane Zelllinien beschrieben wurde (Rink *et al.*, 2005). Eine anteilige Colokalisierung unterstützt jedoch auch das Reifemodell, bei dem die frühen Endosomen durch Reifungsprozesse und sukzessiven Markeraustausch in späte Endosomen transformiert werden (Casanova und Winckler, 2017, Liu *et al.*, 2017). Im Rahmen von Untersuchungen der Reifungsprozesse wurden auch in filamentösen Pilzen wie *A. nidulans*

## Diskussion

(Abenza *et al.*, 2012) oder in Säugetierzellkulturen (Shearer und Petersen, 2019) teilweise überlappende Lokalisationen der Marker für frühe und späte Endosomen gefunden. Basierend auf den Beobachtungen kann auch für *U. maydis* davon ausgegangen werden, dass während der Reifung die späten Endosomen aus frühen Endosomen hervorgehen und durch die Aktivierung von Rab7 eine Konvertierung der Endosomenmembran stattfindet, welche im Anschluss zu einer Entfernung der Rab5a-Moleküle führt. Dabei scheint diese Umwandlung jedoch nicht schrittweise zu erfolgen, sondern die Endosomenstadien gehen fließend ineinander über. Das erklärt die verbleibenden Rab5a-Moleküle auf statischen Rab7-positiven, späten Endosomen.

### 4.1.3. Bioinformatische Analysen implizieren die Präsenz von drei Rab5-GTPasen Genen im Genom von *U. maydis*

Im Verlauf von bioinformatischen Analysen durch den BLAST-Algorithmus (NCBI) und der Suche nach konservierten Domänen (NCBI) konnte neben den bereits zugeordneten Rab5-GTPasen Rab5a (UMAG\_10615) und Rab5b (UMAG\_02485) (Fuchs *et al.*, 2006), eine putative dritte Rab5-GTPase identifiziert werden. Analog zu der Nomenklatur für das Humangenom (Bucci *et al.*, 1995) wurde UMAG\_11007 als Rab5c bezeichnet. Bei BLAST-Analysen erfolgte die Zuordnung von Rab5a zu Vps21, Rab5b zu Ypt52 und Rab5c zu Ypt53 aus *S. cerevisiae* mit jeweils höchster Identität (Abb. 16). Im Vergleich mit dem Humangenom zeigt das Rab5b aus *U. maydis* die höchste Ähnlichkeit zu allen drei humanen Rab5-GTPasen. Diese Zuordnung bestätigte sich auch visuell in einer durchgeführten Stammbaumanalyse. Die drei Rab5-Isoformen aus *H. sapiens* zeigen untereinander bereits starke Ähnlichkeiten bei Sequenzidentitäten zwischen 80-90 % (Bucci *et al.*, 1995). Das Rab5c aus *U. maydis* wurde in der Stammbaumanalyse einer separaten Abzweigung zugeordnet und zeigte damit ein entfernteres Verwandtschaftsverhältnis. Im Vergleich der drei Rab5-GTPasen aus *U. maydis* waren sich Rab5a und Rab5b ähnlicher zueinander als Rab5c zu den beiden anderen Proteinen. Die Zuordnung von Rab5c zu den Rab5-GTPasen erfolgte hauptsächlich anhand der Identifizierung einer Rab-spezifischen Domäne (NCBI), welche mit Rab5 und der Regulation der frühen Endosomen assoziiert war. Diese Domäne deckte jedoch nur einen geringen Teil der Proteinsequenz ab. Anhand der Sequenz und den durchgeführten bioinformatischen

Analysen kann damit nicht eindeutig ausgesagt werden, ob UMAG\_11007 tatsächlich eine mit Rab5a und Rab5b vergleichbare Rab5-GTPase-Funktion erfüllt. Nach den Erkenntnissen evolutionsbiologischer Studien enthalten basale Gruppen von Pilzen lediglich Rab5a und Rab5b. In einer unabhängigen Genomduplikation bei *S. cerevisiae* wurde das Rab5a-Homolog Vps21 dupliziert und liegt als Ypt53 zusätzlich vor. Abgesehen von dieser Genomduplikation wurde Rab5c im Verlauf der Evolution erst mit der Komplexitätszunahme bei der Entstehung der Vertebraten nachgewiesen (Klöpffer *et al.*, 2012). Die Funktion von Rab5c und damit die Zuordnung als zusätzliche Rab5-GTPase in *U. maydis* wird daher in den folgenden Kapiteln mit Einbezug der Lokalisierung und den Phänotypen einer Deletion von *rab5c* weiterführend diskutiert.

#### 4.1.4. Im Vergleich der Rab5-GTPasen hat Rab5a für Funktionen bei der Zellmorphologie, der Polarität und Pathogenität in *U. maydis* die größte Relevanz

Um die Aufgabenverteilung der drei bioinformatisch identifizierten putativen Rab5-GTPasen in *U. maydis* bewerten zu können, wurden zunächst die Auswirkungen der einzelnen Deletionen auf die Zellmorphologie untersucht (Abb. 17). Dabei konnten unterschiedlich schwerwiegende Defekte durch die Deletionen beobachtet werden. Sowohl die Sporidien als auch induzierte Filamente von *rab5b*- oder *rab5c*-Deletionsstämmen glichen den Wildtypzellen. Die Sporidien lagen voneinander getrennt vor, zeigten im Übergang zur mitotischen Teilung die Ausbildung von abknospenden Tochterzellen, welche sich vergrößerten und sich im Anschluss an die Zytokinese von der Mutterzelle separierten. Filamentös wachsende Zellen bildeten aus der Initialzelle an einem Zellpol eine lange, gerade Zellstruktur aus, welche an der Spitze elongierte und nach hinten leere Kompartimente abtrennte. Im Gegensatz dazu wurde durch die Deletion von *rab5a* die Abschnürung der Zellen nach der Zytokinese behindert, wodurch sich zusammenhängende Ansammlungen an Sporidien bildeten. Auch das filamentöse Wachstum war beeinträchtigt. Wie bereits in Vorarbeiten und in der Literatur beschrieben, wuchsen  $\Delta rab5a$ -Filamente bipolar aus und zeigten eine verdickte Zellmorphologie (Bielska *et al.*, 2014b, Schneider, 2016). Für die Rab5-Isoformen wurden in der Literatur teilweise redundante Funktionen beschrieben (Klöpffer *et al.*, 2012). Die Analyse der Rab5-Isoformen aus Säugetierzellen zeigte neben den 80-90 % Sequenzidentität, dass die Proteine stark konservierte

## Diskussion

Effektorbindedomänen enthielten, was eine Interaktion mit ähnlichen Effektorproteinen wahrscheinlich macht (Bucci *et al.*, 1995). Auch in *S. cerevisiae* wurden unterschiedlich schwerwiegende Effekte der Deletionen in Bezug auf Defekte der Pheromondegradierung und das Akkumulieren von Transportintermediaten beobachtet, wobei die Deletion von *vps21* die stärksten Auswirkungen hervorrief (Singer-Krüger *et al.*, 1994). Um die funktionelle Redundanz der Rab5-Proteine in *U. maydis* beurteilen zu können wurden Doppelmutanten generiert. Stämme mit dem Genotyp  $\Delta rab5b \Delta rab5c$  zeigten keinen Defekt, die Doppeldeletion  $\Delta rab5a$  und  $\Delta rab5c$  führte zu den morphologischen Defiziten wie die Deletion von *rab5a*. Die gleichzeitige Deletion von *rab5a* und *rab5b* konnte nicht erzeugt werden. Auch die Erzeugung einer Doppeldeletion durch Kreuzung von Stämmen mit einzelnen Deletionen war nicht möglich, was zeigt, dass die Doppeldeletion einen letalen Phänotyp hat. Entsprechend ist Rab5c nicht in der Lage, das Fehlen von Rab5a und Rab5b zu kompensieren. Generell ist wenig über die Funktion von Rab5c-Proteinen bekannt. Erste Erkenntnisse beschrieben in Säugetieren eine Beteiligung bei der Aufnahme und Verteilung von Wachstumsfaktoren (Chen *et al.*, 2014) oder Adhäsionsrezeptoren (Barbera *et al.*, 2019). Dabei wurde jedoch auch beobachtet, dass Rab5c nur bedingt mit den anderen Rab5-GTPasen gemeinsam agiert und stattdessen unabhängige Funktionen erfüllt (Barbera *et al.*, 2019). Anhand der geringeren Ähnlichkeit von Rab5c zu Rab5a und Rab5b in *U. maydis* und der in Stammbaumanalysen zugeordneten verwandtschaftlichen Distanz liegt nahe, dass Rab5c eine von den beiden anderen GTPasen unabhängige Funktion erfüllt. In  $\Delta rab5a$ -Stämmen wurden zwar schwerwiegende morphologische Defekte beobachtet, die essenzielle Funktion von Rab5a kann jedoch durch Rab5b oder durch ein Zusammenspiel von Rab5b und Rab5c kompensiert werden. Die morphologischen Defekte zeigen jedoch auch, dass die Funktion von Rab5a nicht vollständig kompensiert werden kann. Eine ähnliche Verteilung der Relevanz der Rab5-Proteine wurde auch in Hefezellen beobachtet. Dort hatte die Deletion aller drei Rab5-Isoformen den gleichen Effekt wie die alleinige Deletion von *vps21*. Da für *S. cerevisiae* die Endozytose nicht überlebensnotwendig ist, konnten neben den einzelnen Deletionsstämmen auch Mutanten mit Deletionen aller drei Rab5-Isoformen generiert werden (Singer-Krüger *et al.*, 1994). In Eukaryoten wie *C. elegans* oder *D. melanogaster* sind vollständige Funktionsverluste von Rab5 dagegen letal (Grant und Hirsh, 1999, Wucherpennig *et al.*, 2003, Audhya *et al.*, 2007, Sann *et al.*, 2012).



Da Störungen der Endozytose auch Einschränkungen auf die Pathogenität von *U. maydis* haben, wurde diese Komponente für die phänotypische Analyse von Rab5a und Rab5b miteinbezogen (Lehmler *et al.*, 1997, Fuchs *et al.*, 2006, Valinluck *et al.*, 2014, Bielska *et al.*, 2014b). Sowohl für Rab5b als auch für Rab5a konnte eine Reduktion der Virulenz beobachtet werden; die stärkere Reduktion der Pathogenität bei *rab5a*-Deletionsstämmen verglichen zu *rab5b*-Deletionen ist konsistent mit den beobachteten morphologischen Auswirkungen durch die Deletionen.

Interessanterweise führte die Deletion von *rab5a* bei der Infektion mit zwei kompatiblen haploiden Stämmen zu einem kompletten Verlust der Tumorbildung, während die Infektion mit dem solopathogenen Stamm SG200 $\Delta$ *rab5a* 10 % Pflanzen mit Tumoren hervorbrachte. Nur wenige Pflanzen zeigten Anthocyanbildung. Da die Kreuzung von kompatiblen haploiden Wildtyp-Stämmen generell zu stärkerer Tumorbildung führt (SG200 (75 % Tumore), Kreuzung FB1 und FB2 (85 % Tumore)) ist es wahrscheinlich, dass die Stämme mit *rab5a*-Deletion bereits im Signalaustausch, um den kompatiblen Partner zu identifizieren, in der Ausbildung der Konjugationshyphen, um die Fusion zu initialisieren oder in der Zellfusion beeinträchtigt sind (Snetselaar und Mims, 1992). Tatsächlich konnte durch Assays auf Aktivkohlemedien gezeigt werden, dass  $\Delta$ *rab5a*-Stämme bereits bei der Zellfusion gestört sind: die Kreuzung von kompatiblen Wildtypzellen führt zur Induktion von Filamenten, die sich nach der Fusion bilden, während die  $\Delta$ *rab5a*-Stämme nur vereinzelt filamentöse Strukturen aufwiesen.

Die Kreuzung von einem  $\Delta$ *rab5a*-Stamm mit einem kompatiblen Wildtyp-Stamm bildete hingegen ein mit dem Wildtyp vergleichbares Myzel. Da alleine die Ausbildung von Konjugationshyphen nicht für eine Myzelbildung auf Aktivkohlemedium genügt (Banuett und Herskowitz, 1989), kann eine Fusion der Zellen vermutet werden. Ähnliches wurde für Yup1-Mutanten gezeigt: Eine Yup1<sup>ts</sup>-Mutante zeigt bei restriktiven Bedingungen in einer Kreuzung mit einem Wildtypstamm eine mit dem Wildtyp vergleichbare Myzelbildung, während die Kreuzung zwischen kompatiblen Mutantenstämmen nicht zur Myzelbildung führt (Fuchs *et al.*, 2006). Für eine Myo5<sup>ts</sup>-Mutante, ein Myosin-Motorprotein, in *U. maydis* wurde bei restriktiver Temperatur ein ähnlicher Effekt beschrieben. In einem Konfrontationsassay mit einem Wildtypstamm und einer Mutante war die Pheromonekretion durch die Mutante weiterhin möglich, wodurch der Wildtyp zur Ausbildung von Konjugationshyphen

## Diskussion

stimuliert wurde. Bei der Konfrontation zweier kompatibler Mutantenstämme konnte in diesem Fall gleichermaßen wie bei  $\Delta rab5a$ -Kreuzung auf Aktivkohleplatten keine Filamentbildung induziert werden (Weber *et al.*, 2003). Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass für eine erfolgreiche Zellfusion der korrekt funktionierende Fusionsmechanismus in einem der Kreuzungspartner ausreichend ist. Der Wildtyp-Kreuzungspartner kann in diesem Szenario die Verschmelzung mit der Mutante einleiten und durch das entstehende Dikaryon (zusammengefasst in Feldbrügge *et al.*, 2004) in allen weiteren Stadien die Deletion kompensieren.

Als weiterer Grund für die extrem reduzierte Pathogenität von kompatiblen  $\Delta rab5a$  Stämmen gegenüber den solpathogenen SG200-Mutanten können die Polaritätsdefekte bei der Induktion von Konjugationshyphen angesehen werden. Die Induktion mit synthetischem Pheromon führt bei Wildtyp-Stämmen zur Induktion von filamentösen Konjugationshyphen, die in der Kreuzungsreaktion auf den kompatiblen Partner gerichtet zuwachsen. Auch  $\Delta rab5a$ -Stämme zeigen die Induktion von Konjugationshyphen, allerdings bilden die Sporidien an beiden Zellpolen mehrere Hyphen aus oder zeigen Hyphenbildung aus der Zellmitte heraus. Diese Polaritätsstörung war bereits im AB31-Stammhintergrund beobachtet worden und zeigte damit, dass es keinen Unterschied in *a*- oder *b*-induzierten Filamenten gab, sondern das filamentöse Wachstum im Allgemeinen beeinträchtigt war. Um den Vergleich mit der Myo5<sup>ts</sup>-Mutante erneut aufzugreifen, wurde bei dieser Mutante im Vergleich mit dem Wildtyp durch die Stimulation mit synthetischem  $\alpha 1$ -Pheromon eine deutlich verringerte Hypheninduktion beschrieben (Weber *et al.*, 2003). Bei vergleichbaren Untersuchungen zu Mutanten mit Defekten in der Endozytose wurden bei Yup1<sup>ts</sup>-Mutanten unter restriktiven Bedingungen keine Konjugationshyphen induziert trotz der Stimulation über synthetisches  $\alpha 2$ -Pheromon. Die ausbleibende Bildung von Konjugationshyphen wurde in Verbindung gebracht mit der Colokalisierung von Yup1 und dem Pheromonrezeptor Pra1 in Wildtypstämmen. Pra1 wurde trotz des Fehlens von Yup1 zwar in die Zellen aufgenommen, akkumulierte jedoch in immobilen punktuellen Strukturen nahe der Plasmamembran und wurde nicht weiter durch die Zelle Richtung Vakuole für die notwendigen Recyclingprozesse transportiert. Eine starke konstitutive Expression von *pra1* in FB1 und *pra2* in FB2 konnten den pheromonrezeptorabhängigen Phänotyp der Yup1<sup>ts</sup>-Mutanten unter restriktiven Bedingungen kompensieren und die Sporidien bildeten im Vergleich mit dem Wildtyp verkürzte Konjugationshyphen aus. Die kompatiblen Stämme waren

dennoch nicht in der Lage zu fusionieren. An dieser Stelle wurde die Theorie aufgestellt, dass die Endozytose sowohl für die Pheromonsignalweiterleitung als auch für die Zellfusion ausschlaggebend ist (Fuchs *et al.*, 2006). Diese Befunde unterscheiden sich dahingehend von denen der  $\Delta rab5a$ -Stämme, da im FB2-Hintergrund durch Stimulation mit synthetischem a1-Pheromon weiterhin die Ausbildung von Konjugationshyphen induziert werden konnte. In weiterführenden Analysen dieser Arbeit wurde beobachtet, dass Yup1 in  $\Delta rab5a$ -Zellen zwar eine stark reduzierte, jedoch für diesen Prozess vermutlich ausreichende Motilität zeigt und somit die Yup1-abhängige Signalweiterleitung der Pheromonsignale für die Ausbildung der Konjugationshyphen zur Genüge ablaufen könnte. Möglicherweise ist der Transport des Pheromonrezeptors eine Funktion, die spezifisch von der Population Yup1-positiver Endosomen, unabhängig von Rab5a erfüllt werden kann.

Auch die Analyse der Zellfusion von Zellen in Flüssigmedium mit Aktivkohle bestätigt die Fusionsdefekte von  $\Delta rab5a$ -Mutanten. Bei kompatiblen Wildtypstämmen konnten Zell-Zell-Erkennung, Fusionsereignisse und beginnendes filamentöses Wachstum der fusionierten Zellen beobachtet werden. Stämme mit  $rab5a$ -Deletion waren zwar ebenfalls in der Lage den kompatiblen Stamm zu detektieren und aufeinander zuzuwachsen, allerdings konnten keine gemeinsame Fusionsereignisse gefunden werden. Die Ausbildung der Konjugationshyphen erfolgte ebenfalls nicht polaritätsgerichtet und an einer möglichen gemeinsamen Wuchssachse orientiert, sondern war durch die Wahl der geringsten Strecke sterisch gehindert. Für weiterführende Analysen könnten Stämme mit zwei verschiedenen fluoreszenten Markerproteinen verwendet werden, bei denen sich eine erfolgreiche Fusion durch eine Signaldurchmischung zeigen würde. Um den während der Pflanzeninfektion vorherrschenden Nährstoffmangel und die Pflanzensignale (zusammengefasst in Ryder und Talbot, 2015) miteinzubeziehen, könnten diese Fusionsanalysen auf der Blattoberfläche durchgeführt werden. Dadurch kann neben der Aussage, ob eine Fusion der  $rab5a$ -Deletionsstämmen generell möglich ist auch untersucht werden, ob in einigen Fällen eine Appressorienbildung, die Penetration der Pflanze und die Kolonisierung des Pflanzengewebes erfolgt. Unter Betrachtung der sehr stark reduzierten Pathogenität bei  $\Delta rab5a$ -Stämmen, welche aufgrund der Infektion trotz allem eine Kreuzung der Stämme bestätigt, der stark reduzierten Myzelbildung auf Aktivkohleplatten und den eingeschränkten Fusionsversuchen in Flüssigmedium ist es wahrscheinlich, dass die Stämme durch den Polaritätsdefekt Schwierigkeiten haben,

## Diskussion

gerichtet aufeinander zuzuwachsen. Im Falle eines zufälligen Aufeinandertreffens können sie jedoch in wenigen Fällen korrekt fusionieren. Dies würde den geringen vorhandenen Anteil an Pflanzen mit Anthocyaninduktion bei der Pflanzeninfektion erklären. Anthocyaninduktion wurde als spezifische Reaktion auf die Infektion mit *U. maydis* beschrieben. *U. maydis* sekretiert das Tin2 Effektorprotein, welches den Pflanzenbiosyntheseweg von Lignin und Anthocyan in Richtung Anthocyanbildung manipuliert, um eine Verstärkung des zu infizierenden Pflanzengewebes durch Lignin zu verhindern (Tanaka *et al.*, 2014).

### 4.1.5. Rab5a und Rab5b sind mit einer gemeinsamen Population an frühen Endosomen assoziiert

Nachdem die Lokalisierung von Rab5a in *U. maydis* bisher nur mit Fusionskonstrukten erfolgte, welche unter stark konstitutiven Promotoren exprimiert wurden (Fuchs *et al.*, 2006, Higuchi *et al.*, 2014), in dieser Arbeit jedoch artifizielle Effekte einer solchen Expression gezeigt wurden, erfolgte eine wiederholte Lokalisierungsstudie der Rab5a-GTPase unter der Expression des eigenen Promotors. Diese wurde mit den Lokalisierungen von Rab5b und Rab5c verglichen. Für Rab5a und Rab5b konnte durch eine Colokalisierung mit Tub1-markierten Mikrotubuli gezeigt werden, dass beide Rab5-GTPasen auf punktuellen Strukturen mit gleichmäßiger Verteilung in der Zelle lokalisieren (Abb. 20). Trotz der Überexpression unter dem *nar1*-Promotor wurde von Rab5c lediglich ein schwaches Signal detektiert, welches überwiegend zytoplasmatisch auftrat und vereinzelte Lokalisierungen in punktuellen Strukturen im Bereich der Zellspitze zeigte. Versuche, die Motilität von Rab5c zu beurteilen stellten sich durch das schwache Signal, welches einen schnellen Intensitätsverlust zeigte, als schwierig heraus. Es konnten Ansätze von Transportvorgängen beobachtet werden, für eine konkrete Aussage, ob Rab5c tatsächlich auf frühen Endosomen lokalisiert und mit diesen transportiert wird, sind jedoch weitere Versuche nötig. Für Rab5a konnte ein bidirektionales Transportmuster beobachtet werden, welches Bewegungen über längere Distanzen in kurzen Zeitabschnitten mit häufigen Richtungswechseln darstellte. Dieser Langstreckentransport mit hoher Geschwindigkeit und häufigen Richtungswechseln stellt die typische Motilität der frühen Endosomen dar, wie sie auch in *U. maydis* schon vielfach beschrieben wurde (z. B. Bielska *et al.*, 2014a, Bielska *et al.*, 2014b, Pohlmann *et al.*, 2015). Die dabei durch Überexpression

visualisierten Rab5a-Proteine zeigten eine Lokalisierung, welche der Lokalisierung bei Expression unter dem nativen Promotor entspricht. Rab5b demonstrierte ein mit Rab5a vergleichbares Bewegungsmuster und Colokalisierungsanalysen zeigten, dass beide Proteine überwiegend gemeinsam transportiert wurden (Abb. 21). Von beiden Proteinen, jedoch hauptsächlich von Rab5a, wurden auch einzelne Signale detektiert, was für Populationen an frühen Endosomen bei Langstreckentransportprozessen mit unterschiedlicher Besetzung mit Rab5a und/oder Rab5b spricht. Beispiele für das Vorkommen solcher Sub-Populationen an frühen Endosomen sind aus Säugetierzellen bekannt. Dort wurden Populationen mit verschiedenen Zusammensetzungen an Rab5-Effektoren beschrieben. Diese können entweder positiv für APPL1 (*adaptor protein, phosphotyrosine interacting with pH domain and leucine zipper 1*), EEA1 (*early endosome antigen 1*) oder beide Rab5-Effektoren sein (Miaczynska *et al.*, 2004). Auch für den filamentösen Pilz *A. nidulans* wurde eine weitestgehende Colokalisierung von den beiden Rab5-Homologen RabA und RabB beobachtet, in wenigen Fällen jedoch auch Vesikel, die ausschließlich positiv für RabA waren (Abenza *et al.*, 2010).

#### 4.1.6. Der Transport von Rab5b ist überwiegend abhängig von Rab5a

Ergänzend zu den Studien der Zellmorphologie in den verschiedenen *rab5*-Deletionsstämmen wurde die gegenseitige Beeinflussung der Rab5-GTPasen während des filamentösen Wachstums untersucht (Abb. 22). Die Deletion von *rab5b* hatte keinen Einfluss auf die Lokalisierung oder Motilität von Rab5a. Diese Beobachtung passt zu der durch die Deletion von *rab5b* unveränderten Morphologie der Zellen. Hingegen erfolgte durch die Deletion von *rab5a* eine drastische Reduktion der Rab5b-Motilität. In den polaritätsgestörten Filamenten waren größere statische Ansammlungen des Rab5b-Signals zu beobachten. Nach visuellem Eindruck erschien das Rab5b-Signal in  $\Delta$ *rab5a*-Stämmen verstärkt zu sein gegenüber dem Wildtyp, die Beurteilung wurde jedoch durch die morphologisch abnormale Zellform der *rab5a*-Deletionsstämme und die Akkumulation von statischen Rab5b-Signalen erschwert. Basierend auf den Beeinträchtigungen der Rab5b-Motilität und den zellbiologischen Defekten durch die *rab5a*-Deletion kann davon ausgegangen werden, dass Rab5a die GTPase mit der prädominanten Aktivität für die Funktion der frühen

## Diskussion

Endosomen ist und auch größtenteils für die Motilität von Rab5b verantwortlich ist. Rab5b kann einen Teil der Funktionen erfüllen, so dass die  $\Delta rab5a$ -Zellen dennoch lebensfähig sind, ist jedoch kein vollwertiger Ersatz für Rab5a. Ergänzend dazu verhinderte die Deletion von *rab5c* nicht die Lokalisierung und den gemeinsamen Transport von Rab5a und Rab5b (Abb. 23). Eine Analyse der Colokalisierung zeigte jedoch, dass in Wildtypstämmen etwa 50 % Signalüberlagerung von Rab5a und Rab5b herrschte. Dabei bezieht sich die Signalüberlagerung nicht auf einzelne Vesikel, sondern berechnet ausgehend von der kompletten Signalfläche die anteilige Überlagerung der Signale. Durch die Deletion von *rab5c* konnte eine Verschiebung dieser Anteile von Rab5a und Rab5b beobachtet werden, die sich in einer Reduktion der Colokalisierung von Rab5a mit den Rab5b-Signalen äußerte. Dadurch lag Rab5a häufiger einzeln vor. Rab5b zeigte dagegen eine größere Überlappung mit Rab5a und war dementsprechend seltener einzeln vorzufinden. Diese Verschiebung der Markerzusammensetzung auf den frühen Endosomen hatte jedoch keine Auswirkungen auf die Zellmorphologie von Sporidien oder Filamenten oder die Transportprozesse der frühen Endosomen. Basierend auf den Deletionsphänotypen ist davon auszugehen, dass Rab5a auch ohne die gemeinsame Lokalisierung mit Rab5b korrekt funktioniert. Dies zeigte sich ebenfalls in der unbeeinträchtigten Rab5a-Lokalisierung und des -Transportes in  $\Delta rab5b$ -Stämmen und in Stämmen mit einer Doppeldeletion von *rab5b* und *rab5c* (Abb. 24).

### 4.1.7. Die konstitutive Inaktivierung von Rab5a unterbindet sämtliche endosomale Transportvorgänge

Um die endosomale Reifung über die Regulation der Rab5-GTPasen in *U. maydis* besser zu verstehen, wurde eine konstitutiv GDP-gebundene Rab5a-Mutante generiert (vgl. Stenmark *et al.*, 1994, Klein, 2019). Die Zellmorphologie der Rab5a-GDP-Mutante ähnelte den  $\Delta rab5a$ -Stämmen durch bipolar oder verzweigt wachsende Filamente. Diese inaktive Form von Rab5a lokalisierte ausschließlich im Zytoplasma und war auch nicht bei Transportprozessen involviert (Abb. 27). Rab7-positive, späte Endosomen waren in der inaktiven Mutante von Rab5a ebenfalls ausschließlich statisch und lokalisierten in Akkumulationen an den Zellpolen oder in der Initialzelle. Die im Wildtyp zu beobachtende Kurzstreckenmotilität der späten Endosomen war durch die konstitutive Inaktivierung von Rab5a unterbunden. Da das Modell zur

Endosomenreifung postuliert, dass die aktive Form von Rab5a durch Interaktion mit dem Rab7-GEF Vps39 die Aktivierung von Rab7 initiiert (Seals *et al.*, 2000, Wurmser *et al.*, 2000), wäre davon auszugehen, dass ohne eine aktive Form von Rab5a keine Aktivierung von Rab7 erfolgen kann. In Hefe und Säugetierzellen konnte jedoch gezeigt werden, dass die Reifung von frühen zu späten Endosomen ebenfalls durch die Involvierung des Mon1-Ccz1-Komplexes mit einer GEF-Funktion für Rab7 abläuft. Die Rekrutierung des Komplexes an die Endosomen ist abhängig vom PI3P-Gehalt der Membran (Lawrence *et al.*, 2014, van den Boomen *et al.*, 2020). Der PI(3)P-Gehalt wird durch die Rab5-abhängige Rekrutierung von Vps34, einer Phosphoinositid-3-Kinase, gesteigert (Schu *et al.*, 1993, Volinia *et al.*, 1995). Eine Möglichkeit für die trotz inaktiver Form von Rab5a dennoch ablaufende Aktivierung der Endosomenmembranen durch eine Steigerung des PI(3)P-Gehaltes wäre auch hier eine Funktionsübernahme durch Rab5b. Erste Anhaltspunkte dafür, dass auch Rab5b in der Lage ist den PI(3)P-Status einer Membran zu beeinflussen, wurden in Säugetierzellkulturen gefunden. Dabei konnte bei der Untersuchung von EEA1 beobachtet werden, dass dieses nur durch die GTP-gebundene Form von Rab5 an die Membran der frühen Endosomen rekrutiert wird (Galperin und Sorkin, 2003). EEA1 ist notwendig für die homotypische Fusion früher Endosomen und wird in seiner Aktivität von der PI(3)K reguliert. Damit ist die Bindung von EEA1 abhängig von dem Aktivitätsstatus von Rab5 und dem PI3P-Gehalt der Membran (Simonsen *et al.*, 1998). Es konnte jedoch eine Interaktion von EEA1 sowohl mit Rab5a-GTP, als auch mit Rab5b-GTP gezeigt werden. Der tatsächliche Aktivitätsstatus der beiden Rab5-GTPasen war abhängig von der jeweiligen Hydrolyserate, welche gewebespezifisch differentiell durch zytosolische Faktoren reguliert wird. Die intrinsischen GTP-Hydrolyseraten aller drei Rab5-Isoformen waren *in vitro* ähnlich, werden jedoch gewebespezifisch durch Cofaktoren beeinflusst (Callaghan *et al.*, 1999). Ergänzend konnte beobachtet werden, dass Inpp5e durch eine Interaktion mit Rab20 Rab5 aktiviert und damit für einen Anstieg des PI(3)P-Gehalts in der Membran sorgt. Die konstitutive Aktivierung von Rab5b war in der Lage den Phänotyp einer Inpp5e-Missfunktion zu kompensieren und für die Akkumulierung von PI(3)P in der Membran zu sorgen (Segawa *et al.*, 2014). Dadurch kann vermutet werden, dass Rab5b abhängig von Cofaktoren in der Lage ist ebenfalls die Membran der frühen Endosomen zu aktivieren und damit auch eine Reifung zu späten Endosomen zu ermöglichen. Allerdings zeigte das t-SNARE Yup1 in der

## Diskussion

konstitutiv inaktiven Rab5a-Mutante das vollständige Ausbleiben der Motilität (Abb. 31), während in den *rab5a*-Deletionsstämmen (Abb. 30) noch Yup1-Bewegungsmuster beobachtet werden konnten. Ein ähnlicher Effekt wurde auch für Rab7 beobachtet. Während in der *rab5a*-Deletion die Rab7-Endosomen sogar leicht gesteigerte Bewegungsmuster zeigten, waren in der Rab5a-GDP-Mutante alle Transportvorgänge unterbunden. Demzufolge ist davon auszugehen, dass Rab5a im Wildtyp die Hauptkoordination der Transporte übernimmt. Basierend auf der Analyse der Aufgabenverteilung von Rab5a und Rab5b in *U. maydis* kann eine geringfügige Funktionsübernahme durch Rab5b bei einer *rab5a*-Deletion, während endosomaler Langstreckentransporte vermutet werden. Anhand der Beeinflussung verschiedener Endosomenpopulationen durch die Inaktivierung von Rab5a wäre ein denkbarer Mechanismus, dass Rab5a die Funktion oder die Aktivierung von Rab5b direkt oder indirekt reprimiert. Im Falle der Abwesenheit von Rab5a, wie es bei der Deletion der Fall ist, entfällt die Repression von Rab5b und dieses kann in einer Art Notfallmodus die lebensnotwendigen Funktionen partiell übernehmen, sodass die  $\Delta rab5a$ -Stämme zwar massive Defekte aufweisen, jedoch trotzdem überleben können. Durch die konstitutiv inaktive Form von Rab5a kann dieses zwar seine Funktionen nicht erfüllen, blockiert jedoch durch die Präsenz die Aktivierung von Rab5b, wodurch die endosomalen Transportprozesse stillgelegt sind. In welchem Ausmaß Rab5b in der inaktiven Mutante von Rab5a dennoch Funktionen erfüllen kann, bedarf weiterführender Untersuchungen. Da der gleichzeitige Funktionsverlust von Rab5a und Rab5b in *U. maydis* letal ist, kann davon ausgegangen werden, dass auch in der Konstellation mit Rab5a-GDP vitale Funktionen erhalten bleiben. Jedoch könnte sich in der Rab5a-GDP-Mutante die Möglichkeit bieten zu analysieren, welche Funktionen Rab5b in der Anwesenheit von Rab5a übernimmt, ohne durch die Deletion ein eventuell vorhandenes Notfallprogramm auszulösen.



#### 4.1.8. Konstitutiv aktives Rab5a verdrängt Rab5b von transportierten Endosomen

Ergänzend zu den Studien der konstitutiv inaktiven Mutante von Rab5a erfolgte auch die Untersuchung, wie sich die konstitutive Aktivierung von Rab5a (vgl. Stenmark *et al.*, 1994, Klein, 2019) auf die Zellen und auf die Rab5b-GTPase auswirkt. Dabei ergaben sich keine detektierbaren morphologischen Veränderungen oder in endosomalen Transportvorgängen. Rab5a-GTP-Proteine zeigten eine Lokalisierung auf vesikulären Strukturen und bewegten sich bidirektional durch die Zelle. Im Gegensatz dazu äußerte sich jedoch eine Beeinträchtigung von Rab5b durch die konstitutive Aktivierung von Rab5a (Abb. 28). Rab5b war zwar vergleichbar mit dem Wildtyp auf punktuellen Strukturen in der Hyphe verteilt, diese Strukturen zeigten jedoch nur eine geringe Colokalisierung mit Rab5a-GTP und das Ausbleiben von endosomalen Transportvorgängen, während im Wildtyp ein gemeinsamer bidirektionaler Transport von Rab5a und Rab5b erfolgte. In der Mutante erfolgte die Colokalisierung von Rab5a-GTP und Rab5b lediglich in statischen Signalen. Entsprechend dem negativ regulierenden Einfluss von Rab5a auf die Rab5b-Aktivität (Abb. 22), scheint die konstitutive Aktivierung von Rab5a zu einer Verdrängung der Rab5b-Proteine von den motilen, frühen Endosomen zu führen. Ein möglicher Mechanismus anhand der gezeigten Ergebnisse wäre, dass die aktive Form von Rab5a mit dem GEF für Rab5b interagiert und so die Aktivierung von Rab5b reduziert. Liegt Rab5a dagegen ausschließlich in der aktiven Form vor, könnte die Reprimierung durch eine Übersättigung an aktiven Rab5a-Molekülen vollständig erfolgen, sodass Rab5b nicht mehr in die Membran der frühen Endosomen integriert wird. Eine Reprimierung einer Rab5-Isoform durch einen anderen Mechanismus ist auch in *S. cerevisiae* beschrieben. Das F-Box Protein Roy1 interagiert hierbei spezifisch mit der nukleotidfreien oder GDP-gebundenen Form von Ypt52, reduziert damit die Aktivierungsrate und blockiert die Funktion. Es konnte gezeigt werden, dass durch die Deletion von *roy1* in einem *vps21*-Deletionsstamm die Aktivierung von Ypt52 in der Lage ist den  $\Delta vps21$ -Phänotyp weitestgehend zu kompensieren (Liu *et al.*, 2011). Über BLAST-Analysen konnte kein homologes Protein zu Roy1 in *U. maydis* gefunden werden, weshalb ein bislang unbekannter Mechanismus für die Regulation der Rab5b-Aktivität denkbar ist. Die Notwendigkeit für einen solchen Mechanismus könnte dadurch gegeben sein, dass die Präsenz von aktiven Rab5-Molekülen in den Membranen der frühen Endosomen streng limitiert sein muss. Eine erhöhte

## Diskussion

Verfügbarkeit von aktivem Rab5a, entweder durch eine konstitutiv aktive Mutante oder durch ein erhöhtes Expressionslevel sorgte in Säugetierzellkulturen für die effektivere Interaktion zwischen Donor- und Akzeptormembranen und damit für eine Fusionsstimulation (Stenmark *et al.*, 1994, Messenger *et al.*, 2015). Auch in *U. maydis* war durch die konstitutive Aktivierung von Rab5a die Anzahl der frühen Endosomen, in Kombination mit einer Größenzunahme, reduziert, wodurch eine erhöhte Fusionsrate vermutet werden kann (vgl. Appendix Abb. 94).

Da Rab5b jedoch nach wie vor in punktuellen Strukturen lokalisierte, bestand ebenfalls die Möglichkeit, dass Rab5b in seiner inaktiven Form durch den GEF in die Membran integriert wird (Ullrich *et al.*, 1994, Mizuno-Yamasaki *et al.*, 2012a). Entsprechend wären zwei Szenarien denkbar: Das konstitutiv aktive Rab5a blockiert die GEF-Funktion für Rab5b, sodass die Entfernung des gebundenen GDP nicht stattfinden kann, oder die GEF-Funktion wird erfüllt und Rab5b liegt zwar in GTP-gebundener Form vor, kann jedoch durch eine Reprimierung des GAP durch Rab5a-GTP die Hydrolyse nicht durchführen. Neben einer Blockierung des Rab5b-GAP durch Rab5a-GTP wäre es aufgrund der ähnlichen Struktur der Proteine (vgl. Bucci *et al.*, 1995) ebenfalls möglich, dass beide Proteine mit einem gemeinsamen GAP interagieren. Dieser wäre durch die gesteigerte Menge an Rab5a-GTP-Proteinen in den Membranen jedoch saturiert, Rab5b bleibt in der Membran der Endosomen gefangen und wird mit der Reifung der Membrankompartimente an die späten Endosomen weitergegeben. Die beobachteten statischen Muster in den Kymographen erinnerten stark an die Rab7-Signale der späten Endosomen. Um diese Theorie zu untersuchen sind jedoch weitere Analysen notwendig. Ein denkbarer Ansatz wäre die Colokalisierung von Rab5b und Rab7 in einem Rab5a-GTP-Hintergrund. Über den Phänotyp der Deletion von *rab5b* in der Rab5a-GTP-Mutante wurde ein weiterer Zusammenhang zwischen den beiden Rab5-Proteinen festgestellt. Sporidien dieser Stämme zeigten Defizite bei der Zytokinese und bildeten aneinanderhängende Ketten von Zellen. Gleichzeitig wurde eine ungleichmäßige Verteilung der Rab5a-GTP-positiven Endosomen auf die einzelnen Zellen beobachtet. Die Zellkernverteilung war jedoch nicht beeinträchtigt. Da der Zytokinesedefekt erst durch die Kombination der Deletion von *rab5b* und der konstitutiven Aktivierung von Rab5a ausgelöst wurde, wäre zu vermuten, dass auch die inaktiven Formen der GTPasen für den Abschluss des Zellzyklus relevante Funktionen erfüllen. Eine mögliche Hypothese wäre, dass über die inaktiven Stadien

während der Zellteilung eine gleichmäßige Endosomenverteilung auf Mutter- und Tochterzelle erzielt werden kann, da diese im Zytoplasma vorliegen (Pylypenko *et al.*, 2006) und nicht mit Zellorganellen oder Strukturen des Zytoskeletts assoziiert sind. Es wird vermutet, dass im Zytoplasma gelöste Proteine in stochastisch gleichmäßiger passiver Art zwischen Mutter- und Tochterzelle verteilt werden (zusammengefasst in Rabouille und Jokitalo, 2003). Eine Möglichkeit diesen Mechanismus aufzuklären bestünde in den zellbiologischen Analysen von einer Rab5b-GDP-Mutante in Kombination mit Rab5a-GTP, um erste Hinweise zu erhalten, wie sich die inaktive Form von Rab5b verhält, wenn von Rab5a keine inaktive Form vorliegt. Außerdem müsste eine Kombination aus Rab5a-GTP und Rab5b-GTP zu einem vergleichbaren Phänotyp führen wie für Rab5a-GTP in Kombination mit  $\Delta rab5b$  beobachtet, wenn die Ursache das Fehlen der inaktiven Rab5-Form wäre.

#### 4.1.9. Die endosomale Partition von t-SNARE Yup1 ist mit Rab5a und Rab5b assoziiert

Um einen möglichst großen Anteil der Populationen der frühen Endosomen in *U. maydis* abzudecken, wurden die Beobachtungen von Rab5a und Rab5b mit dem t-SNARE Yup1 verglichen und ergänzt. Aus der Literatur war für Yup1 bekannt, dass es partiell auf den Rab5a-positiven frühen Endosomen und den Vakuolen lokalisiert (Wedlich-Söldner *et al.*, 2000, Fuchs *et al.*, 2006). Die hier gezeigten Untersuchungen der Endosomenpopulationen in *U. maydis* (Abb. 29) weisen darauf hin, dass frühe Endosomen mit Rab5a-, Rab5b- und Yup1-Markierung einzeln und in verschiedenen Markerzusammensetzungen vorkommen. Die Einflüsse der Deletionen der Rab5-GTPasen auf die Yup1-positiven Endosomen wurden vergleichend analysiert. Die Deletion von *rab5a* löste Ansammlungen an Yup1-Endosomen an den Zellpolen aus (vgl. Bielska *et al.*, 2014b). Im Gegensatz zu den Beschreibungen in der Literatur wurden jedoch auch zusätzliche Lokalisationen an großen runden Strukturen in der Initialzelle und den Filamentausläufern beobachtet. Außerdem erfolgte keine vollständige Inhibierung des Yup1-Transportes, sondern lediglich eine Reduktion der Motilität. Die verbleibende Motilität fand überwiegend in den Filamentstrukturen statt. Durch Colokalisierung mit dem Plusendmarker der Mikrotubuli, Peb1 (Straube *et al.*, 2003), konnte gezeigt werden, dass die verbleibende Yup1-Bewegung teilweise durch De-/Assemblierungsprozesse der Mikrotubuli stattfand, jedoch auch durch davon unabhängige, für frühe Endosomen charakteristische Motilität. Ein Vergleich der unabhängig von Rab5a ablaufenden, geringfügigen Bewegungsabläufe

## Diskussion

der frühen Endosomen zeigte, dass diese sowohl für Yup1 als auch für Rab5b beobachtet werden konnten aber auf separaten Endosomen stattfanden (Abb. 30). Die Deletion von *rab5b* beeinträchtigte Yup1 nicht. Ebenfalls konnte keine zusätzliche Reduktion der Yup1-Motilität durch die Deletion von *rab5c* in einem  $\Delta$ *rab5a*-Stamm beobachtet werden. Im Zusammenhang mit den beobachteten regulatorischen Effekten der beiden Rab5-GTPasen Rab5a und Rab5b war die Frage relevant, ob die Lokalisierung von Yup1 abhängig vom Nukleotidstatus der Rab5-GTPasen ist oder einen unabhängigen Marker darstellt. Die konstitutive Aktivierung von Rab5a beeinträchtigt Yup1 nicht, die konstitutive Inaktivierung führte dagegen zu einer völligen Stilllegung endosomaler Transportvorgänge (Abb. 31). Da im *rab5a*-Deletionshintergrund auch getrennte Motilität von Rab5b und Yup1 beobachtet werden konnte (Abb. 30), ist davon auszugehen, dass Yup1 nicht abhängig von Rab5b transportiert wird. In Anwesenheit von Rab5a beeinflusst dieses jedoch sämtliche endosomale Transportvorgänge. Die konstitutive Inaktivierung von Rab5a reprimiert dabei die Motilität von Yup1-positiven Endosomen (Abb. 31). Denkbar wäre eine feinabgestimmte Regulation in Abhängigkeit von der Rab5a-Präsenz, um endosomale Transportvorgänge zu steuern. Diese Regulation kann auch von der GDP-gebundenen Form erfüllt werden, wobei die inaktive Form zwar keine Funktionen im endosomalen Langstreckentransport ausübt, die Proteinabundanz jedoch die Komplementation durch andere endosomale Faktoren, wie Rab5b, verhindert. Erst eine vollständige Deletion von *rab5a* führt zu einem Notfallprogramm, bei dem Rab5b durch eine partielle Funktionsübernahme die Vitalfunktionen sicherstellt.

### 4.1.10. Regulation der Rab5-GTPasen in *U. maydis*

Unter Einbezug dieser Erkenntnisse kann davon ausgegangen werden, dass es verschiedene Populationen an frühen Endosomen in *U. maydis* gibt, welche entweder Rab5a-, Rab5b- oder Yup1-positiv sind oder eine Kombination dieser Marker enthalten. Ob Rab5c ebenfalls auf den frühen Endosomen lokalisiert bedarf weiterer Untersuchungen. Basierend auf den schwachen Effekten der *rab5c*-Deletion in den bisherigen Untersuchungen ist jedoch von einer untergeordneten Funktion auszugehen. Eine Deletion von *rab5a* hat im Vergleich mit den anderen Rab5-GTPasen die schwerwiegendsten Effekte. Dennoch ist Rab5b in der Lage in

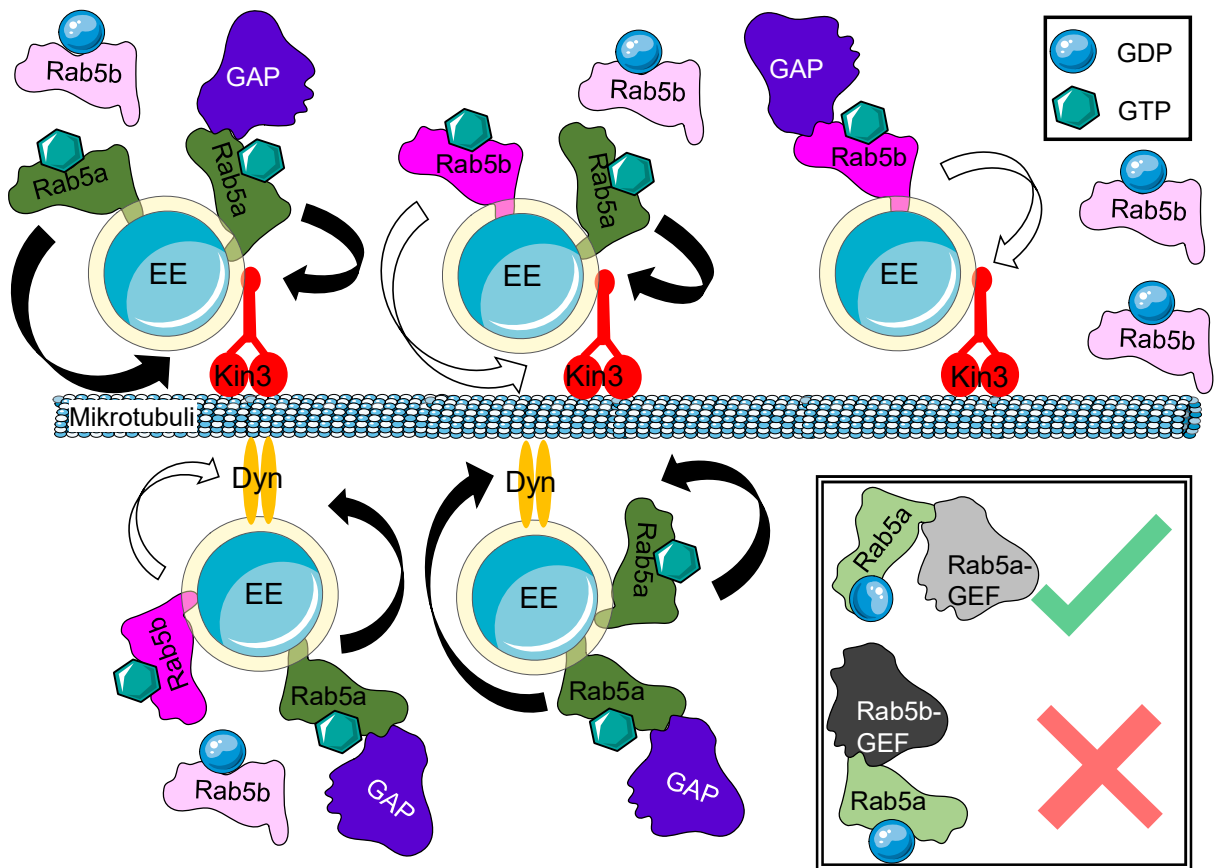
einer Art Notfallprogramm die Vitalfunktionen der Zelle bei einem Fehlen von Rab5a aufrechtzuerhalten. Im Normalzustand scheint Rab5b unterrepräsentiert zu sein, was auf eine Reprimierung des Proteins oder eine Verschiebung des GTPase-Zyklus in Richtung inaktive Form zurückzuführen sein könnte. Der Ausfall der endosomalen Motilität von Rab5b, Rab7 und Yup1 in der Rab5a-GDP-Mutante und die Inhibierung der Rab5b-Motilität in der Rab5a-GTP-Mutante sprechen für eine Beteiligung von Rab5a in der Rab5b-Regulation. Die starke Reduzierung der Yup1- und Rab5b-Transportprozesse in  $\Delta rab5a$ -Stämmen impliziert jedoch, dass ein Großteil der endosomalen Motilität auf die Interaktion von Rab5a und Effektoren mit Funktion in der Transportmaschinerie zurückzuführen ist (Nielsen *et al.*, 1999).

Ein Modell der regulatorischen Abstimmung von Rab5a und Rab5b ist in Abb. 85 veranschaulicht. Anhand der Western Blot-Signalintensität von detektierten Rab5a- und Rab5b-Proteinen (vgl. Abb. 26) wird vermutet, dass Rab5a und Rab5b in einer ähnlichen Abundanz vorliegen. Anhand der Gesamtproteinmenge im Western Blot sind sowohl die aktive als auch die inaktive Form stabil an Gfp gebunden, sodass nicht zwischen den Formen unterschieden werden kann. Dies wurde für die konstitutiv aktive und inaktive Mutante von Rab5a gezeigt (vgl. Appendix Abb. 93). Bei fluoreszenzmikroskopischen Analysen wurden jedoch deutliche Unterschiede in der Signalintensität von Rab5a und Rab5b auf den Endosomen beobachtet (vgl. Abb. 21), weshalb vermutet wird, dass Rab5a überwiegend GTP-gebunden in der Endosomenmembran integriert ist, während Rab5b hauptsächlich inaktiv im Zytoplasma zu finden ist.

Beide Rab5-GTPasen können die Transportmaschinerie der frühen Endosomen stimulieren, wobei Rab5a einen stärkeren Einfluss zu haben scheint. Die Motorproteine für den Transport der frühen Endosomen sind vereinfacht in Anlehnung an (Steinberg, 2007) mit Kinesin-3 und Dynein dargestellt. Die Aktivierung von Rab5a erfolgt vermutlich durch einen bisher nicht identifizierten Rab5a-GEF, der für die Lokalisierung von Rab5a in der Endosomenmembran sorgt und das gebundene GDP für die aktivierende GTP-Bindung entfernt. Gleichzeitig ist davon auszugehen, dass die inaktive Rab5a-Form die Aktivierung von Rab5b reprimiert durch eine direkte oder indirekte Blockade des Rab5b-GEF. Ist das Rab5a-Protein deletiert, entfällt diese Reprimierung und Rab5b kann verstärkt aktiviert werden. Ebenfalls kann davon ausgegangen werden, dass Rab5a und Rab5b durch einen gemeinsamen GAP in ihrer

## Diskussion

GTP-Hydrolyse unterstützt werden. Aufgrund der niedrigen intrinsischen Hydrolyserate werden Rab-GTPasen durch einen GAP aktiviert (Walworth *et al.*, 1992). Die Möglichkeit eines gemeinsamen GAP wird durch die Ähnlichkeit der Rab5-Proteine zueinander realistisch (vgl. Bucci *et al.*, 1995). Aufgrund der im Vergleich mit Rab5b größeren Proteinabundanz von Rab5a an den Endosomenmembranen beansprucht Rab5a auch den Hauptanteil des GAP. Dies wird unterstützt durch die Beeinflussung von Rab5b in einer konstitutiv aktiven Rab5a-Mutante. Die Lokalisierungsanalysen der beiden Rab5-GTPasen unterstützen die Theorie von verschiedenen Endosomenpopulationen, die entweder Rab5a und Rab5b in der Membran integriert haben oder nur eine der beiden GTPasen. Vermutlich liegen jedoch mehr Endosomen vor, die ausschließlich Rab5a gebunden haben, als solche mit Rab5b allein.



### Abb. 85: Regulatorisches Zusammenspiel von Rab5a und Rab5b an den frühen Endosomen

Die Lokalisierungsanalysen der beiden Rab5-GTPasen unterstützen die Theorie von verschiedenen Populationen früher Endosomen (EE: *early endosome*), die entweder Rab5a (grün) und Rab5b (magenta) in der Membran integriert haben oder nur eine der beiden GTPasen. Vermutlich liegen jedoch mehr Endosomen vor, die ausschließlich Rab5a gebunden haben, als solche mit Rab5b allein. Rab5a und Rab5b liegen in einer ähnlichen Abundanz vor, Rab5a ist jedoch überwiegend GTP-gebunden (dunkel) in der Endosomenmembran integriert, während der Hauptanteil an Rab5b-Proteinen inaktiv (hell) im Zytoplasma zu finden ist. Beide Rab5-GTPasen können die Transportmaschinerie der frühen Endosomen stimulieren (Pfeile: schwarze Pfeile = starker Einfluss, weiße Pfeile = schwacher Einfluss), wobei Rab5a einen stärkeren Einfluss zu haben scheint. Die Motorproteine für den Transport der frühen Endosomen sind vereinfacht in Anlehnung an (Steinberg, 2007) mit Kinesin-3 (Kin3, rot) und Dynein (Dyn, orange) dargestellt. **Doppelter Kasten:** Die Umwandlung von Rab5a in die aktive Form erfolgt durch einen bisher unbekanntes Rab5a-GEF (grau). Gleichzeitig inhibiert die inaktive Rab5a-Form die Aktivierung von Rab5b durch eine Blockade des Rab5b-GEF (schwarz). Fehlt das Rab5a-Protein durch eine Gendeletion entfällt diese Inhibition und Rab5b kann verstärkt aktiviert werden. Ebenfalls kann davon ausgegangen werden, dass Rab5a und Rab5b durch einen gemeinsamen GAP (blau) in ihrer GTP-Hydrolyse unterstützt werden. Aufgrund der im Vergleich mit Rab5b größeren Proteinabundanz von Rab5a an den Endosomenmembranen beansprucht Rab5a auch den Hauptanteil des GAP.

### 4.2. Funktionsmechanismus des CORVET-Komplexes in *U. maydis*

Aufbauend auf der grundlegenden Charakterisierung der in *U. maydis* ablaufenden endosomalen Transportprozesse wurde der CORVET-Komplex in *U. maydis* charakterisiert, der durch die Überbrückung von Membrankompartimenten der frühen Endosomen wichtige Aufgaben für die Spezifität der ablaufenden Fusionen übernimmt (zusammengefasst in Ungermann und Kümmel, 2019). Bislang fokussierten sich die Untersuchungen des CORVET-Komplexes in erster Linie auf *S. cerevisiae*, einem unizellulären Pilz, bei dem Langstreckentransport keine Rolle spielt oder auf hochkomplexe Säugetierorganismen (Solinger und Spang, 2013). Erste Analysen zu der Funktionsweise in filamentösen Pilzen erfolgten in *A. nidulans* (Abenza *et al.*, 2010, Abenza *et al.*, 2012, Lopez-Berges *et al.*, 2017). Dennoch ist die Zusammensetzung und die Funktion des CORVET-Komplexes in filamentösen Pilzen nur in Ansätzen bekannt und speziell in *U. maydis* völlig unerforscht. In dieser Arbeit erfolgte erstmalig für *U. maydis* die Analyse der Zusammensetzung des CORVET-Komplexes, die Funktion der spezifischen Untereinheiten Vps3 und Vps8 und das Zusammenspiel mit den Populationen der frühen Endosomen, welche nachfolgend diskutiert werden.

#### 4.2.1. Der CORVET-Komplex besteht in *U. maydis* aus den evolutionär konservierten Komponenten

Basierend auf den aus der Literatur bekannten Studien über die Komplexkomposition, wurde die Zusammensetzung des Komplexes in *U. maydis* analysiert. In *S. cerevisiae* und *H. sapiens*, den in diesem Themengebiet ausgiebig untersuchten Organismen, besteht der Kern des CORVET-Komplexes aus den vier Untereinheiten Vps11, Vps16, Vps18 und Vps33. Dieser Kern bildet gleichzeitig die Basis des HOPS-Komplexes. Beide Komplexe unterscheiden sich durch zwei zusätzliche Untereinheiten und vermitteln dadurch die Spezifität für die frühen Endosomen (CORVET) oder die späten Endosomen (HOPS). Für den CORVET-Komplex vermitteln Vps3 und Vps8 die Spezifität, für den HOPS-Komplex Vps39 und Vps41 (Bankaitis *et al.*, 1986, Plemel *et al.*, 2011, van der Kant *et al.*, 2015, Ungermann und Kümmel, 2019) (vgl. Abb. 6). Um gezielt den CORVET-Komplex analysieren zu können, wurden deshalb die CORVET-spezifischen Untereinheiten Vps3 und Vps8 ausgewählt. In einer Co-IP und anschließender MS-Analyse mit Vps3 und Vps8 als Köderproteine,



konnten in *U. maydis* die konservierten Komplexbestandteile identifiziert werden (Abb. 32). Anhand von bekannten Resultaten aus der Literatur, die beschrieben, dass Vps3 und Vps8 erst durch die Interaktion mit Rab5a mit den frühen Endosomen verbunden sind (Peplowska *et al.*, 2007, Pawelec *et al.*, 2010), wurde angenommen, dass im  $\Delta rab5a$ -Hintergrund alle Komponenten des Komplexes zytoplasmatisch vorliegen müssten. Allerdings wurden in einer Co-IP/MS mit Vps3 oder Vps8 als Köderproteinen keine Unterschiede zwischen den komplexierten Komponenten im Wildtyp- und  $\Delta rab5a$ -Hintergrund detektiert. In beiden Konditionen waren die sechs konservierten Komponenten Vps3, Vps8, Vps11, Vps16, Vps18, Vps33 und zusätzlich Nma1 Bestandteil des Komplexes. Dieses Resultat lässt sich erklären, wenn der Komplex bereits vollständig im Zytoplasma zusammengelagert wird, bevor die spezifischen Untereinheiten Vps3 und Vps8 die Bindung an die frühen Endosomen vermitteln. Eine weitere Möglichkeit wäre, dass in Abwesenheit von Rab5a Vps3 und/oder Vps8 mit Rab5b auf den frühen Endosomen interagieren und erst bei erfolgreicher Interaktion die übrigen Bestandteile rekrutieren. Dies wird gestützt durch eine Colokalisierung und eine gemeinsame Motilität mit Rab5b im Wildtyphintergrund, sowohl für Vps3 als auch für Vps8. Im  $\Delta rab5a$ -Hintergrund konnte eine gemeinsame Motilität von Vps3 und Vps8 beobachtet werden, was impliziert, dass der CORVET-Komplex auch mit anderen Bestandteilen der frühen Endosomen, wie Rab5b, interagieren kann. Colokalisierungsstudien von Rab5b und Vps3 im  $\Delta rab5a$ -Hintergrund bestätigten gemeinsame Bewegungsmuster, welche unabhängig von Rab5a erfolgten. Eine ergänzende Untersuchung der Lokalisierung und Motilität von Vps8 und Rab5b in einem *rab5a*-Deletionsstamm würde diese Vermutung bestätigen.

Um zu untersuchen, ob Vps3 ausschlaggebend für die Assemblierung des Komplexes ist, wurde die Komplexzusammensetzung auch im  $\Delta vps3$ -Hintergrund analysiert. Dazu wurde Vps8 als Köderprotein für die Co-IP/MS verwendet. Vps11, Vps16, Vps18, Vps33 und Vps39 wurden als Interaktionspartner von Vps8 im  $\Delta vps3$ -Hintergrund identifiziert. Nma1 wurde ohne Vps3 nicht gemeinsam mit dem CORVET-Komplex angereichert. Dies spricht für eine spezifische Interaktion, da bei einer unspezifischen Proteinbindung davon auszugehen ist, dass diese Interaktion in allen Proben mit dem gleichen Köderprotein oder mit den gleichen Beads nachweisbar ist. Interessanterweise wurde anstelle von Vps3 im Komplex Vps39 identifizierte, einer Komponente des verwandten HOPS-Komplexes (Bankaitis *et al.*, 1986,

Plemel *et al.*, 2011). In Hefezellen wurden neben den CORVET- und HOPS-Komplexen auch sogenannte Intermediatskomplexe beschrieben. Dabei konnten die Varianten i-HOPS (*intermediate towards HOPS*) mit Vps8 und Vps39 und i-CORVET (*intermediate towards CORVET*) mit Vps3 und Vps41 identifiziert werden. Den Analysen in *S. cerevisiae* zufolge kommen die Intermediatskomplexe nur transient in den Zellen vor, aber übernehmen dennoch Funktionen im Transport von Endosomen zu Vakuolen (i-HOPS) oder bei der Rückgewinnung von Material aus den späten Endosomen (i-CORVET) (Peplowska *et al.*, 2007). In Säugetierzellen erfolgte eine Beurteilung der Bindungsaffinität zwischen der Kernkomponente Vps11 und den spezifischen Untereinheiten Vps3 und Vps39. Dabei wurde eine vergleichbare Affinität von Vps11 für Vps3 und Vps39 gemessen (van der Kant *et al.*, 2015). Demzufolge ist in  $\Delta vps3$ -Zellen in *U. maydis* davon auszugehen, dass durch die Abwesenheit von Vps3 die freigewordene Bindestelle am CORVET-Komplex durch Vps39 eingenommen wird und der entstehende Komplex die sogenannte i-HOPS-Zwischenform darstellt. Die Auswirkungen der Bildung dieser Zwischenform werden in den folgenden Kapiteln bei der Beurteilung des morphologischen Phänotyps der *vps3*-Deletion und den Beeinträchtigungen der frühen Endosomen im Deletionshintergrund weiterführend diskutiert.

### 4.2.2 Der CORVET-Komplex in *U. maydis* enthält essenzielle Komponenten

Um die Funktionsweise des CORVET-Komplexes in *U. maydis* einordnen zu können, wurden die Effekte von Deletionen verschiedener Untereinheiten analysiert. Die Deletion von *vps3* wurde bereits in Vorarbeiten untersucht und führte zu Zytokinesedefekten der Sporidien, vergrößerten und in der Anzahl reduzierten Vakuolen und Polaritätsdefekten bei filamentösen Wachstumsprozessen (Schneider, 2016, Obhof, 2017). Die Auswirkungen auf die Größe und die Anzahl der Vakuolen wurde auch in Hefe beschrieben und war auf Defekte bei der Proteinsortierung zurückzuführen (Banta *et al.*, 1988, Raymond *et al.*, 1992). Ergänzend zu den in Vorarbeiten durchgeführten Analysen zu morphologischen Defekten wurden auch Beeinträchtigungen der frühen Endosomen untersucht. Die *vps3*-Deletion bewirkte, dass Rab5a-positive Endosomen eine reduzierte Motilität zeigten in Kombination mit einer Zunahme an statischen Signalen (Abb. 33). Dennoch konnte auch in den Deletionsstämmen zwar eine im Vergleich mit dem Wildtyp reduzierte, aber dennoch typische bidirektionale Motilität der frühen Endosomen beobachtet werden. Rab5b-positive Endosomen waren durch die *vps3*-Deletion

umfassender beeinträchtigt, als es für Rab5a der Fall war. Es wurde eine deutliche Zunahme an statischen Signalen detektiert und die Motilität war im Vergleich mit dem Wildtyp massiv reduziert. Es wurden nur noch vereinzelte Bewegungsmuster beobachtet, welche oft eher über kurze Strecken abliefen.

*Vps8* wurde als essenzielles Gen in *U. maydis* identifiziert. In *S. cerevisiae* wurde beobachtet, dass im *vps3*-Deletionshintergrund oder bei einer Deletion der Kernkomponenten des CORVET- und HOPS-Komplexes *Vps8* mit den Membranen der frühen Endosomen assoziiert war (Pawelec *et al.*, 2010). Die Lokalisierung von *Vps3* an die Membranen der frühen Endosomen war dagegen im  $\Delta$ *vps8*-Hintergrund reduziert (Peplowska *et al.*, 2007). Da Beobachtungen zufolge *Vps3* und *Vps8* ausschließlich im Kontext des CORVET-Komplexes interagieren (Markgraf *et al.*, 2009) und die korrekte Lokalisierung des Komplexes durch die spezifischen Untereinheiten vermittelt wird (Ostrowicz *et al.*, 2010, Plemel *et al.*, 2011), könnte in *U. maydis* *Vps8* für die initiale Membranbindung des CORVET-Komplexes zuständig sein. Die CORVET-Zusammenlagerung wurde in Hefe wie folgt beschrieben: Eine initiale Menge an *Vps21* wird durch den GEF *Vps9* zur Verfügung gestellt, wodurch *Vps8* an die Membran rekrutiert wird. Dort lagert sich der Komplex zusammen und durch die spezifische Untereinheit *Vps3* werden zusätzliche *Vps21*-Moleküle aktiviert (Markgraf *et al.*, 2009). *Vps3* und *Vps8* interagieren kooperativ mit *Vps21* und *Vps3* kann durch eine Präferenz für GDP-gebundenes *Vps21* die zusätzliche Aktivierung der Rab5-GTPase stimulieren (Peplowska *et al.*, 2007, Pawelec *et al.*, 2010). Des Weiteren haben Studien in höheren Eukaryoten gezeigt, dass Funktionsverluste des CORVET-Komplexes, zu denen auch eine fehlerhafte Membranbindung gehören könnte, letal sind. Da *S. cerevisiae* nicht auf die Endozytose für die Aufrechterhaltung ihrer Vitalfunktionen angewiesen ist, kann diese auch ohne die Verbindungskomplexe überleben (Solinger und Spang, 2013). Dementsprechend impliziert eine essenzielle Funktion von *Vps8* in *U. maydis*, während *vps3* deletiert werden kann, dass *Vps8* eine relevante Funktion für die Funktionalität des Komplexes ausübt. Auch für Humanzellen konnte gezeigt werden, dass die Lokalisierung von *Vps3* abhängig von *Vps8* ist (Perini *et al.*, 2014), was ebenfalls die Hypothese stützt, dass *Vps8* die Rekrutierung des CORVET-Komplexes an die Membranen der frühen Endosomen vermittelt. Untersuchungen der *Vps8*-Lokalisierung in  $\Delta$ *vps3*-Zellen in *U. maydis* zeigten, dass sich *Vps8* auch unabhängig von *Vps3* gemeinsam mit Rab5a-positiven Endosomen

## Diskussion

bewegen kann (Abb. 39/Abb. 40). Folglich ist von einer Vps3-unabhängigen Assoziation von Vps8 an die Endosomenmembranen auszugehen. Wie sich durch die Co-IP und anschließenden MS-Analysen gezeigt hat, wurde anstelle von Vps3 im *vps3*-Deletionshintergrund die HOPS-Untereinheit Vps39 in den CORVET-Komplex eingebaut und es entstand so eine Zwischenform beider Komplexe. Zellbiologische Untersuchungen zeigten, dass Vps8 in einem  $\Delta vps3$ -Hintergrund eine reduzierte Motilität und eine Lokalisierung sowohl auf bidirektional motilen als auch auf statischen Strukturen zeigte. Ein Grund dafür könnte die Präferenz von Vps8 als Bestandteil des Intermediatskomplexes für Rab5 auf den frühen Endosomen sein, während Vps39 im Vergleich mit publizierten Studien aus Hefe (Plemel *et al.*, 2011, Ostrowicz *et al.*, 2010) vermutlich eine Präferenz für Rab7 auf den späten Endosomen zeigt. Da somit nicht nur die Bindeaffinität von Vps8 für die Rab5-Proteine auf den frühen Endosomen, sondern auch die von Vps39 für Rab7 auf den späten Endosomen über die Lokalisierung des durch Vps8 visualisierten Intermediatkomplexes im  $\Delta vps3$ -Hintergrund entscheidet, ist es wahrscheinlich, dass Vps8-Signale nicht ausschließlich an den frühen Endosomen, sondern auch an den späten Endosomen und Vakuolen zu finden sind. Dies würde die Zunahme an statischen Signalen durch die *vps3*-Deletion erklären.

Ob die Membranbindung durch Initiierung über Vps8 den einzigen Mechanismus in *U. maydis* darstellt, um den CORVET-Komplex an die Endosomenmembranen zu rekrutieren, oder ob Vps3 gleichermaßen befähigt ist diesen Schritt durchzuführen, bedarf weiterführender Untersuchungen. Durch die essenzielle Funktion von Vps8 war es nicht möglich die Auswirkungen einer *vps8*-Deletion auf die Lokalisierung von Vps3 zu analysieren. Eine weitere Erklärung für die essenzielle Funktion von Vps8 wäre eine zusätzliche Beteiligung an bisher unbekanntem Prozessen, bei denen das Protein eine überlebensnotwendige Rolle spielt. Eine Möglichkeit wäre eine temperatursensitive Mutante von Vps8 zu generieren und die Auswirkungen der restriktiven Temperatur auf die Vps3-Lokalisierung, -Motilität, die allgemeinen zellmorphologischen Effekte des Funktionsverlustes und die Beeinträchtigung der frühen Endosomen zu untersuchen. Eine andere Option wäre *vps8* unter einem induzierbaren Promotor zu exprimieren, die Transformanten unter induzierten Bedingungen anzuziehen und für die zellbiologischen Analysen zu reprimierenden Bedingungen zu wechseln. Im Gegensatz zu einer temperatursensitiven Mutante hat die Expression unter einem induzierbaren Promotor den Nachteil, dass die Expressionsstärke sorgfältig gewählt

werden muss. Für eine Überexpression von Vps8 wurde in *S. cerevisiae* beschrieben, dass sie das regulatorische Gleichgewicht zwischen dem CORVET- und dem HOPS-Komplex durch die erhöhte Verfügbarkeit stört und zu einer vermehrten Bildung des CORVET-Komplexes führt (Peplowska *et al.*, 2007). Die daraus resultierende Unterrepräsentation des HOPS-Komplexes ist in *U. maydis* bisher nicht untersucht worden und könnte unerwünschte Nebeneffekte hervorrufen, welche die Ergebnisse verfälschen.

Neben *vps8* konnte auch *vps11* als essenzielles Gen in *U. maydis* identifiziert werden. Studien aus *S. cerevisiae* beschrieben, dass Vps11 als zentrales Gerüst für die Assemblierung beider Komplexe fungiert und die Deletion von *vps11* zu einer Disassemblierung der Komplexe führt (Rieder und Emr, 1997, Plemel *et al.*, 2011). Wie bereits diskutiert, sind Funktionsverluste der Endozytose, zu denen auch Fehlfunktionen der Verbindungskomplexe gehören, in höheren Eukaryoten letal (Solinger und Spang, 2013). Daher ist zu vermuten, dass nicht nur Vps11, sondern auch die übrigen drei Kernkomponenten der Verbindungskomplexe in *U. maydis* essenziell sind.

#### 4.2.3. Vps9 ist in *U. maydis* an der Membranintegration von Rab5b beteiligt

Neben der Funktion von Vps3 als Komponente des CORVET-Komplexes waren aus der Literatur auch Präferenzen für eine Bindung der inaktiven Form des Rab5-Homologs Vps21 bekannt. Durch die dadurch erfolgende Rekrutierung an die Endosomenmembran wurde eine GEF-ähnliche Funktion beschrieben (Peplowska *et al.*, 2007). GEFs sind notwendig für eine korrekte Lokalisierung des zugehörigen Rab-Proteins, indem sie durch Entfernung des gebundenen GDP eine Umwandlung in die aktive Form und die Integration in die Membran bewirken (Ullrich *et al.*, 1994, Blumer *et al.*, 2013). Ein Funktionsverlust des GEF sollte eine Akkumulation der inaktiven Rab-GTPase im Zytoplasma auslösen. Die Deletion von *vps3* bewirkte in *U. maydis* zwar eine Reduktion, jedoch keine Inhibierung der Motilität und Rekrutierung von Rab5a an Endosomen. Stattdessen konnte ein weitaus schwerwiegenderer Effekt auf die Lokalisierung von Rab5b beobachtet werden. In  $\Delta vps3$ -Stämmen akkumulierte Rab5b überwiegend auf statischen Signalen und zeigte nur noch geringfügige Motilität. Dennoch war keine überwiegende zytoplasmatische

## Diskussion

Lokalisierung zu beobachten, wie sie bei Fehlen des GEF zu erwarten wäre. Die Studien in Hefezellen zu der Präferenz von Vps3 für die inaktive Form von Vps21 basierten jedoch auf der Bindekapazität der aufgereinigten Proteine und gaben keine Rückschlüsse auf die Lokalisierung. Die Lokalisierung von Vps21 in  $\Delta vps3$ -Zellen zeigte zytoplasmatische Signale und punktuelle Akkumulationen (Peplowska *et al.*, 2007). Um auszuschließen, dass die GEF-Funktion für Rab5a oder Rab5b in Kooperation zweier Proteine ausgeführt wird, welche sich bei Funktionsverlust eines der Proteine gegenseitig kompensieren können, erfolgten bioinformatische Analysen, um putative GEFs in *U. maydis* zu identifizieren. Dabei wurde nur ein putatives Homolog zu dem GEF Vps9 aus Hefe gefunden (UMAG\_10209). Für die anderen beiden GEFs für Rab5 aus Hefe, Muk1 und Vrl1 (Bean *et al.*, 2015, Li *et al.*, 2019), konnten keine homologen Proteine zugeordnet werden. In einer *vps9*-Deletion konnte dennoch eine bidirektionale Motilität von Rab5a und eine Lokalisierung auf vesikulären Strukturen beobachtet werden (Abb. 34/Abb. 35). Die Deletion von *vps3* und *vps9* verhinderte nicht die Rekrutierung von Rab5a an die Membran der frühen Endosomen und das bidirektionale Bewegungsmuster, wodurch ausgeschlossen werden kann, dass Vps3 die GEF-Funktion von Vps9 kompensiert. Für Vps9 konnte in bioinformatischen Domänenanalysen (NCBI) eindeutig eine Vps9-Domäne bestimmt werden (E-Wert  $3,73 \cdot 10^{-39}$ ) und das Protein wies nicht nur Ähnlichkeiten zu Vps9 aus *S. cerevisiae* (37,9 % Identität, E-Wert  $1 \cdot 10^{-52}$ ) sondern auch zu Rabex-5 (33,92 % Identität, E-Wert  $8 \cdot 10^{-40}$ ), GAPex-5 (34,53 % Identität, E-Wert  $7 \cdot 10^{-30}$ ), Rin1 (30,3 % Identität, E-Wert  $2 \cdot 10^{-9}$ ), Rin2 (29,4 % Identität, E-Wert  $3 \cdot 10^{-10}$ ) und Rin3 (26,61 % Identität, E-Wert  $3 \cdot 10^{-9}$ ), bekannten Rab5-GEF Proteinen aus *H. sapiens* (zusammengefasst in Su *et al.*, 2007) auf, was eine Funktion als GEF nahelegt. Tatsächlich konnte gezeigt werden, dass die Deletion von *vps9* sowohl die Lokalisierung als auch die Motilität von Rab5b signifikant ändert, was nahelegt, dass Vps9 als GEF für Rab5b agiert und für dessen Rekrutierung an die Endosomenmembranen notwendig ist. Da auch die *vps3*-Deletion einen deutlichen Effekt auf die Motilität von Rab5b zeigt, wäre auch eine Kooperation von Vps3 und Vps9 bei der Aktivierung und Membranintegration von Rab5b denkbar. Ob Vps9 jedoch den Nukleotidaustausch bei Rab5b induziert, bedarf weiterführender, biochemischer Untersuchungen. Die dafür gängige Methode ist die zeitabhängige Messung der Freisetzung von radioaktiv markiertem [ $^3\text{H}$ ]GDP aus der zugehörigen

Rab-GTPase im vergleichenden Aspekt zwischen GST alleine und GST-aufgereinigtem GEF (Hunker *et al.*, 2006). Ebenfalls ergänzender Untersuchungen bedarf die Suche nach dem GEF für Rab5a in *U. maydis*. GEF-Proteine für Rab5-GTPasen enthalten eine sogenannte Vps9-Domäne (Li *et al.*, 2019). Bioinformatischen Analysen (Superfamily 1.75) zufolge konnten neben Vps9 zwei weitere Proteine mit einer Vps9-Domäne in *U. maydis* identifiziert werden, deren Einflüsse auf die Aktivierung der Rab5a-GTPase in Folgearbeiten überprüft werden könnten: UMAG\_05916 (E-Wert  $5,89 \cdot 10^{-42}$ ) und UMAG\_03906 (E-Wert  $1,7 \cdot 10^{-22}$ ). UMAG\_05916 wurde als Hal3 bereits ausführlicher untersucht und als Phosphopantothentat-Cystein-Decarboxylase charakterisiert (Zhang *et al.*, 2019). Die Autoren konnten nach aktuellem Stand keine tatsächliche Funktion als GEF beschreiben, äußerten jedoch die Vermutung, dass UMAG\_10209 diese aufgrund der stärkeren Ähnlichkeit mit höherer Wahrscheinlichkeit erfüllen würde. Hal3 hat im Vergleich mit Orthologen aus anderen Organismen das Potenzial eine Doppelfunktion (*moonlighting protein*) als Phosphopantothentat-Cystein-Decarboxylase und möglicherweise als GEF zu erfüllen. Dies bedarf jedoch weiterführender Untersuchungen (Zhang *et al.*, 2019). Für UMAG\_03906 liegen bisher noch keine Analysen vor. Für alle weiteren ähnlichen Proteine, die bei BLAST-Analysen (NCBI) mit den humanen Rab5 GEF Proteinen (Rabex-5, GAPex-5, ALS2, Rin1, Rin2 und Rin3) im Proteom von *U. maydis* identifiziert wurden, (UMAG\_11909, UMAG\_01643, UMAG\_00986, UMAG\_03906, UMAG\_00949, UMAG\_10463, UMAG\_04365 und UMAG\_10294) konnten in einer Suche nach konservierten Domänen (NCBI) keine Vps9-Domäne charakterisiert werden. Demzufolge wäre zu vermuten, dass entweder, entgegen der Erwartung von (Zhang *et al.*, 2019), Hal3 eine zusätzliche Funktion als GEF für Rab5a erfüllt, UMAG\_03906 die Aktivierung von Rab5a tätigt oder in *U. maydis* ein spezifischer Mechanismus für den GTPase-Zyklus von Rab5a vorliegt.

### 4.2.4. CORVET-spezifische Untereinheiten lokalisieren auf den frühen Endosomen

Ergänzend zu den Untersuchungen über die Komposition und den Auswirkungen von Funktionsverlusten wurde auch die Rekrutierung des CORVET-Komplexes an die Membranen der frühen Endosomen analysiert. Dabei wurde eine partielle gemeinsame Lokalisierung von Vps3 und Vps8 auf größeren Vesikelstrukturen und separate Lokalisierungen auf kleineren Vesikeln beobachtet (Abb. 36). Die Colokalisierung auf ausschließlich größeren Strukturen spricht für eine an dieser Stelle erfolgreich vermittelte Membranfusion durch den CORVET-Komplex. Hauptsächlich wurden einzelne Vps3-Signale beobachtet und nur selten einzelne Vps8-Signale. Ein Grund für dieses Schema könnten die schwachen Fluoreszenzsignale der CORVET-Untereinheiten sein und die verschiedene Empfindlichkeit von roten (Vps8) und grünen (Vps3) Signalen. Beobachtungen, dass das rote Fluoreszenzsignal von mCherry einen schnelleren Intensitätsverlust verzeichnet als GFP, wurden auch in Säugetierzelllinien beschrieben (Gandasi *et al.*, 2015). Allerdings könnte die Lokalisierung auch die Theorie unterstützen, dass Vps8 durch die Membranbindung die Funktionalität des Komplexes auslöst (Markgraf *et al.*, 2009). Vps3 könnte mit der beschriebenen Präferenz für die inaktive Rab5-Form (Peplowska *et al.*, 2007) die Aktivierung in Endosomen vermitteln, was die häufig separate Lokalisierung von Vps3 in *U. maydis* erklären würde. Im Anschluss könnte Vps3 für die Verbindungsfunktion des CORVET-Komplexes zur Verfügung stehen, um die Fusion einzuleiten. Versuche eine der Kernkomponenten des CORVET- und HOPS-Komplexes, Vps11, durch Fusion mit einem Fluoreszenzprotein zu markieren, um im Vergleich mit den CORVET-spezifischen Untereinheiten Vps3 und Vps8 die Verteilung des CORVET- und HOPS-Komplexes und die Umwandlung der Komplexe ineinander durch Austausch der spezifischen Untereinheiten zu analysieren, waren nicht erfolgreich. Da Vps11 als essenzielles Protein in *U. maydis* identifiziert wurde, könnte eine auf sterischer Hinderung durch die Fusion basierende Fehlfunktion von Vps11 dazu führen, dass Transformanten, welche die Markierung erfolgreich integriert haben, nicht überleben. In *S. cerevisiae* wurde beschrieben, dass Vps11 als zentrales Grundgerüst für die Komplexassemblierung wirkt und eine *vps11*-Deletion die vollständige Disassemblierung der CORVET- und HOPS-Komplexe hervorruft (Rieder und Emr, 1997, Plemel *et al.*, 2011). In höheren Eukaryoten, bei denen Funktionsverluste der Endozytose und damit wahrscheinlich auch die



Disassemblierung der Verbindungskomplexe letal sind (Solinger und Spang, 2013), könnte eine Proteinfusion der Kernkomponenten ebenfalls dazu führen, dass die Komplexe in ihrer Assemblierung gehindert sind.

Für Vps3 konnten mit den frühen Endosomen gemeinsame Lokalisierungen und Bewegungsmuster nachgewiesen werden (Abb. 37). Dabei lokalisierte ein großer Anteil an Rab5a-Endosomen jedoch ohne Vps3 und nur in wenigen Fällen enthielten Vesikel ausschließlich Vps3 ohne die gleichzeitige Anwesenheit von Rab5a. Im Vergleich dazu wurden auch gemeinsame Lokalisierungen und Motilität von Vps3 und Rab5b beobachtet, wobei beide Proteine auch getrennt voneinander auf Vesikeln lokalisierten. Für *S. cerevisiae* wurde beschrieben, dass der CORVET-Komplex zwar eine Präferenz für Vps21 zeigt (Peplowska *et al.*, 2007), die Deletion des Rab5a-Homologs *vps21* jedoch nur zu einem partiellen Verlust der endosomalen Lokalisierung von Vps3 und Vps8 führt und erst die zusätzliche Deletion von *ypt52* eine Misslokalisierung des CORVET-Komplexes bewirkt. Dies bedeutet, dass der CORVET-Komplex in Hefe sowohl Vps21 als auch Ypt52 für die Lokalisierung an den Endosomenmembranen nutzen kann (Cabrera *et al.*, 2013). Auch Untersuchungen der Struktur der humanen Rab5-GTPasen betonen besonders die konservierten Effektorbindedomänen von Rab5A und Rab5B, was eine Interaktion mit einem ähnlichen Set an Proteinen nahelegt (Bucci *et al.*, 1995). Der Vergleich von Rab5b und Vps3 in einem  $\Delta rab5a$ -Hintergrund bestätigte eine von Rab5a unabhängige gemeinsame Lokalisierung und Motilität der CORVET-spezifischen Untereinheit mit Rab5b-positiven Endosomen. In Co-IP-Experimenten mit Rab5a (Wildtypform, GTP- und GDP-Mutante) und Rab5b (Wildtypform) konnte jedoch für keines der Proteine eine Interaktion mit Vps3 nachgewiesen werden. Beschreibungen aus *S. cerevisiae* zufolge wird die Interaktion zwischen den CORVET-spezifischen Untereinheiten und den Rab5-GTPasen als schwache Interaktion kategorisiert und war *in vivo* nicht nachweisbar. Sämtliche publizierten Interaktionen basieren auf aufgereinigten und angereicherten Proteinextrakten (Pawelec *et al.*, 2010, Plemel *et al.*, 2011).

Vps8 und Rab5a sind in *U. maydis* überwiegend colokalisiert und zeigen gemeinsame Motilität (Abb. 38). Von beiden Proteinen liegen nur wenige Vesikel mit einzelnen Signalen vor, was ebenfalls die Theorie unterstützt, dass Vps8 die Membranrekrutierung des CORVET-Komplex in *U. maydis* initiiert. Bei der

## Diskussion

Lokalisierung und Motilität von Vps8 und Rab5b konnten Abweichungen zu den üblichen Lokalisierungen beider Proteine festgestellt werden. Vps8 und Rab5b lokalisierten weitestgehend gemeinsam, zeigten jedoch nur eine geringfügige Motilität und überwiegend Akkumulation auf statischen Strukturen. Die für beide Proteine verwendeten Fusionskonstrukte wurden zur Expression unter dem eigenen Promotor *in locus* integriert und hatten sich bei der Verwendung in mehreren anderen Stämmen als funktionell gezeigt. Der beobachtete Effekt trat bei drei unabhängigen Transformanten auf, wobei die Zellen keinerlei morphologische Störungen zeigten. Da Vps8 ein essenzielles Protein ist, kann davon ausgegangen werden, dass eine Fehlfunktion durch die Fusion in zellbiologischen Analysen deutlich geworden wäre oder die Stämme direkt nach erfolgreicher Transformation nicht in der Lage gewesen wären zu wachsen. Ein Funktionsverlust von Rab5b kann nicht eindeutig ausgeschlossen werden, da die Deletion von *rab5b* keine bekannten morphologischen Auswirkungen hat. Jedoch zeigte Vps8 in einem *rab5b*-Deletionshintergrund eine mit dem Wildtyp vergleichbare Motilität. Ob die Kombination der beiden fluoreszenzmarkierten Proteine eine Auswirkung auf die Fusionsrate der frühen Endosomen hat oder eine verfrühte Reifung zu späten Endosomen hervorruft bedarf weiterer Untersuchungen.

### 4.2.5. Die Colokalisierung und Motilität der CORVET-spezifischen Untereinheiten Vps3 und Vps8 wird durch Deletionen von Rab5-GTPasen beeinflusst

Vps3 und Vps8 (Abb. 41) colokalisieren im Wildtyphintergrund partiell und zeigen eine gemeinsame Motilität, was sich mit der Beobachtung deckt, dass beide Proteine auf größeren vesikulären Strukturen gemeinsam lokalisieren, während sie auf kleineren Strukturen separat vorliegen. Die Deletion von *rab5a* beeinträchtigt die Motilität beider Proteine massiv, während die Colokalisierung beider Signale zunahm. Obwohl die Motilität der beiden CORVET-Untereinheiten durch die Deletionen von *rab5b* oder *rab5c* nicht beeinträchtigt war, wurde auch hier eine geringfügige Zunahme der Colokalisierung festgestellt. Die erhöhte Colokalisierung in den *rab5*-Deletionen könnte auf die Tatsache zurückzuführen sein, dass sich aufgrund der beeinträchtigten endosomalen Bewegungsmuster, welche sich auch bei Beobachtungen von Rab5b- oder Yup1-Motilität durch die *rab5a*-Deletion zeigten, die Endosomen auf einer geringeren Fläche sammeln. Die allgemeine Tendenz einer Zunahme an

248

Colokalisierung durch Deletion einer der Rab5-GTPasen spricht ebenfalls für die Vermutung, dass die spezifitätsvermittelnden Untereinheiten des CORVET-Komplexes auch in *U. maydis* mehr als eine Rab5-GTPase für die Lokalisierung an die frühen Endosomen nutzen können. Diese Beobachtung wurde auch für Hefe beschrieben (Cabrera *et al.*, 2013). Fehlt eine der Rab5-GTPasen, reduziert sich die Anzahl an möglichen Interaktoren in den Endosomenmembranen, wodurch die überlappende Lokalisierung von Vps3 und Vps8 zunehmen könnte. Aufgrund der beschriebenen Präferenz des CORVET-Komplexes für das Rab5a-Homolog Vps21 in *S. cerevisiae* (Peplowska *et al.*, 2007), wäre auch der stärkere Effekt in der *rab5a*-Deletion zu erklären. Wenn der CORVET-Komplex in *U. maydis* in der Wildtypsituation die Lokalisierung über Rab5a bevorzugt, welches anhand der vergleichenden Lokalisierung der Rab5-GTPasen auch das prominenteste der Rab5-Proteine zu sein scheint, wird durch die Deletion von *rab5a* die Verschiebung der Colokalisierung der CORVET-Untereinheiten durch Verteilung auf Rab5b und möglicherweise Rab5c am deutlichsten. Dass die Vps3-Untereinheit im Fall einer *rab5a*-Deletion gemeinsam mit Rab5b transportiert werden kann, wurde bereits bestätigt (Abb. 42). Für die Vps8-Untereinheit steht diese Untersuchung noch aus und würde die Theorie über den Bindemechanismus des CORVET-Komplexes in *U. maydis* ergänzen.

#### 4.2.6. Die konstitutiv aktive Rab5a-Mutante rekrutiert Vps3 nicht an die frühen Endosomen

Die Lokalisierung des CORVET-Komplexes erfolgt laut Literatur über die GTP-gebundene Form des Rab5-Homologs Vps21, welche nach ihrer erfolgreichen Aktivierung und Integration in die Endosomenmembran mit Effektoren wie dem CORVET-Komplex interagieren kann. Für Vps3 wurde in *S. cerevisiae* beschrieben, dass über eine Präferenz für die GDP-gebundene Form von Vps21 eine GEF-ähnliche Funktion ausgeübt werden kann. Vps8 dagegen interagiert mit Vps21-GTP und unterstützt die Bindung von Vps3 an die Endosomenmembranen. In einer *vps8*-Deletion ist die Bindung von Vps3 an Vps21-GTP reduziert (Peplowska *et al.*, 2007). Der beschriebene Phänotyp kann darauf zurückzuführen sein, dass Vps3 die inaktive Form von Vps21 präferiert oder darauf, dass Vps8 die Membranrekrutierung des CORVET-Komplexes initiiert. In einer konstitutiv aktiven Mutante von Rab5a kann

## Diskussion

das gebundene GTP nicht hydrolysiert werden und die inaktive Form von Rab5a fehlt (vgl. Stenmark *et al.*, 1994). Demzufolge würden sich in einer aktiven Rab5a-Mutante Bindepräferenzen der beiden spezifischen CORVET-Untereinheiten Vps3 und Vps8 zeigen. Tatsächlich konnte in der konstitutiv aktiven Rab5a-Mutante eine Beeinflussung von Vps3 beobachtet werden (Abb. 43). Vps3 war nicht mehr mit den sich bidirektional bewegendenden Rab5a-Endosomen assoziiert, sondern lokalisierte auf einer geringen Anzahl statischer vesikulärer Strukturen. Die im Vergleich mit dem Wildtyp abweichende Lokalisierung von Vps3 hatte jedoch keinerlei Auswirkungen auf die Morphologie der Zellen. Im Gegensatz zu Vps3 lokalisierte Vps8, wie bereits im Wildtyp beobachtet, gemeinsam mit Rab5a-GTP auf bidirektional transportierten Endosomen. Die Lokalisierung und die ausbleibende Motilität von Vps3 durch das Fehlen der inaktiven Rab5a-Form spricht für eine Bindung an die inaktive Form. Da in der Literatur jedoch von einer Präferenz für die inaktive Form gesprochen wurde (Peplowska *et al.*, 2007), war nicht zu erwarten, dass die Bindung an die inaktive Form ausschlaggebend für die Lokalisierung von Vps3 ist. Hierbei ist zu unterscheiden, dass manche Publikationen eine überwiegende Bindung von Vps3 an Vps21-GTP beschreiben und nur ein geringer Anteil Vps3 an die GDP-Form bindet (Plemel *et al.*, 2011, Epp und Ungermann, 2013), während andere im Wildtyphintergrund eine Interaktion mit der nukleotidfreien, der GDP- und der GTP-Form von Vps21 beobachten (Peplowska *et al.*, 2007). In Zell-Lysaten aus dem  $\Delta vps8$ -Hintergrund, in denen der CORVET-Komplex als nicht mehr funktionell eingestuft wurde, interagierte Vps3 präferenziell mit der inaktiven oder nukleotidfreien Form von Vps21. Es wurde vermutet, dass im Wildtyphintergrund verschiedene Populationen an Vps3-Proteinen vorliegen. Vps3, welches im CORVET-Komplex gebunden ist, interagiert mit Vps21-GTP, während einzelne Vps3-Proteine an die inaktive Form binden (Peplowska *et al.*, 2007). Da in *U. maydis* gezeigt werden konnte, dass Vps3 auch mit Rab5b gemeinsam auf bidirektional motilen Endosomen lokalisieren kann, wenn *rab5a* deletiert wurde, stellt sich die Frage, ob Vps3 in der aktiven Rab5a-Mutante mangels einer inaktiven Rab5a-Form ausschließlich mit Rab5b interagiert, welches durch die konstitutive Aktivierung von Rab5a ebenfalls beeinträchtigt war. Sowohl Rab5b als auch Vps3 zeigten in der aktiven Mutante eine Lokalisierung an vesikuläre Strukturen, welche jedoch keine Motilität ausübten. Da Vps8 jedoch weiterhin gemeinsam mit den Rab5a-GTP-positiven Endosomen lokalisiert und gemeinsame Bewegungsmuster beobachtet wurden, bleibt offen, wie

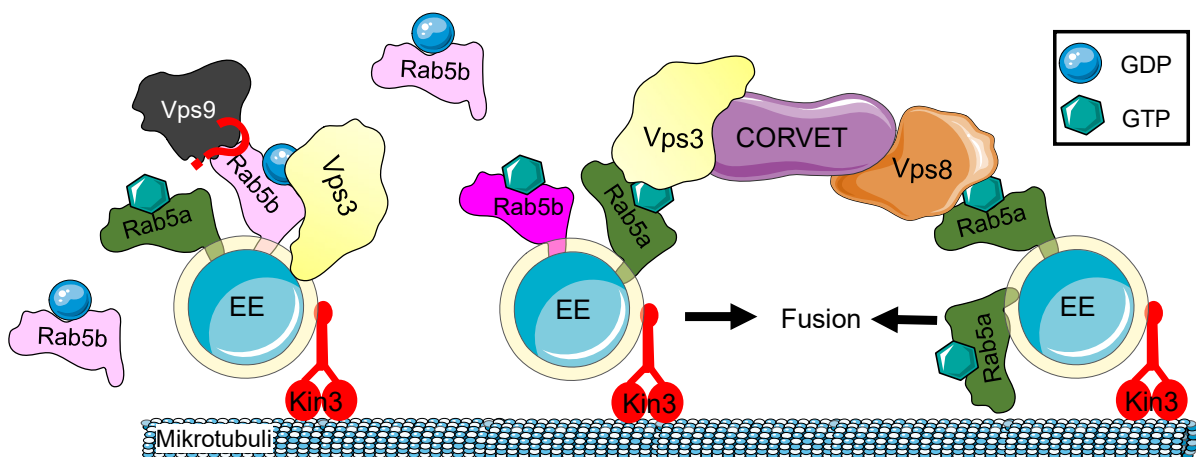
der CORVET-Komplex in der Mutante zusammengesetzt ist und warum Vps3 durch die konstitutive Aktivierung von Rab5a nicht gemeinsam mit dem Komplex auf den frühen Endosomen transportiert wird. Eine mögliche Erklärung wäre die Bindung von Vps39 anstelle von Vps3, wie es bereits in Co-IP/MS-Analysen der *vps3*-Deletion beobachtet wurde (vgl. Abb. 32). Ob die konstitutive Aktivierung von Rab5a die Interaktion von Vps3 mit dem CORVET-Komplex beeinträchtigt bedarf einer Analyse der Komplexzusammensetzung über Co-IP-Experimente im Rab5a-GTP-Hintergrund. Möglicherweise führt die konstitutive Aktivierung von Rab5a dazu, dass die Aktivierung von Rab5b unterdrückt wird und Vps3 zwar mit den inaktiven Rab5b-Proteinen interagiert, jedoch nicht in der Lage ist die Aktivierung zu bewirken, da dieser Prozess durch die erhöhte Anzahl an aktiven Rab5a-Proteinen inhibiert wird.

#### 4.2.7. CORVET-Komplex-vermittelte Fusion der frühen Endosomen in *U. maydis*

Der CORVET-Komplex besteht in *U. maydis* aus den konservierten Kernkomponenten Vps11, Vps16, Vps18 und Vps33 sowie den spezifischen Untereinheiten Vps3 und Vps8. Die spezifischen Untereinheiten sorgen durch Interaktion mit den Rab5-GTPasen für die Lokalisierung des Verbindungskomplexes an den frühen Endosomen, wo der Komplex die Fusion der endosomalen Kompartimente initiiert (Abb. 86). Die essenzielle Funktion von Vps8 und das seltene Vorkommen von einzelnen Vps8-Lokalisierungen auf den Endosomen sprechen für eine Funktion von Vps8 bei der Membranrekrutierung des Komplexes. Vps8 liegt nahezu ausschließlich gemeinsam mit Rab5a auf den Endosomen vor, was für eine Interaktion mit der aktiven Form der GTPase spricht. Auch im Vergleich mit der Vps3-Lokalisierung liegt Vps8 meist gemeinsam mit Vps3 auf den Endosomen vor, während einige Endosomen ausschließlich Vps3-markiert sind. Dies deutet ebenfalls darauf hin, dass Vps8 über die aktive Rab5a-Form an die Endosomen bindet, den CORVET-Komplex funktionsfähig macht, durch die Vps3-Bindung an einem benachbarten Endosom die Überbrückung gewährleistet und die Fusion der beiden Endosomen auslöst. Durch *rab5a*-Deletionsstämme konnte gezeigt werden, dass Vps3 auch gemeinsam mit Rab5b auf frühen Endosomen fortbewegt werden kann. Dies spricht für die Möglichkeit, dass die CORVET-spezifischen Untereinheiten neben Rab5a auch Rab5b binden können, um ihre Funktion zu erfüllen. Durch eine konstitutive Aktivierung von

## Diskussion

Rab5a lokalisierte Vps3 nicht mehr auf den motilen Rab5a-positiven Endosomen. Daher kann vermutet werden, dass Vps3 die inaktive Form der GTPasen bevorzugt oder durch eine partielle Funktion bei der Aktivierung von Rab5b, welches in der Rab5a-GTP-Mutante gleichermaßen beeinträchtigt ist (vgl. Abb. 28), an Rab5b bindet. Eine ebenfalls partielle Beteiligung bei der Aktivierung von Rab5b und der Integration in die Membranen der frühen Endosomen konnte durch den GEF Vps9 beobachtet werden. Dabei ist eine kooperative Aktivierung von Rab5b durch Vps9 und Vps3 denkbar.



### Abb. 86: Rekrutierung des CORVET-Komplexes an die frühen Endosomen und Fusionsvermittlung

Der CORVET-Komplex setzt sich in *U. maydis* aus den Kernkomponenten (lila) Vps11, Vps16, Vps18 und Vps33 sowie den spezifischen Untereinheiten Vps3 (gelb) und Vps8 (orange) zusammen. Die spezifischen Untereinheiten sorgen durch Interaktion mit Rab5a (grün) oder Rab5b (magenta) für die Lokalisierung des Verbindungskomplexes an den frühen Endosomen. Die spezifische Untereinheit Vps8 interagiert mit der aktiven Form der GTPase (dunkelgrün/dunkelmagenta). Vps8 bindet über die aktive Rab5a-Form an die Endosomen, rekrutiert den Kernkomplex, überbrückt durch die Vps3-Bindung an einem benachbarten Endosom die Membranen und löst die Fusion der beiden Endosomen aus. Die CORVET-spezifischen Untereinheiten können neben Rab5a auch Rab5b binden. Vps3 präferiert die inaktive Form der GTPasen und unterstützt die Aktivierung für die anstehende Fusion. Die Aktivierung von Rab5b und die Integration in die Membranen der frühen Endosomen erfolgt kooperativ durch die GEF-Funktion von Vps9 und Vps3. Zur Vereinfachung ist lediglich der Kin3-vermittelte Transport der Endosomen in Richtung der Plusenden der Mikrotubuli dargestellt. Ein ähnliches Szenario ist auch während des Dynein-vermittelten Transportes in Richtung Minusenden denkbar.

### 4.3. Charakterisierung des Nma1-Proteins in *U. maydis*

Bei einer vorausgegangenen Hefe-Zwei-Hybrid Untersuchung mit dem Spleißosom-Komplex-Protein Num1, das Funktionen bei vesikulären Transportprozessen und Spleißvorgängen erfüllt, wurde Nma1 als potenzieller Interaktionspartner identifiziert (Kellner, 2009, Kellner *et al.*, 2014). Nachdem in ersten Analysen eine bidirektionale Motilität mit den Rab5a-markierten frühen Endosomen entlang der Mikrotubuli beobachtet wurde, konnte eine direkte Interaktion mit der CORVET-spezifischen Untereinheit Vps3 nachgewiesen werden (Pinter, 2012, Pinter, 2015, Schneider, 2016, Obhof, 2017). Erste Hinweise auf eine CORVET-assoziierte Funktion von Nma1 ergeben sich durch Reduktion von Rab5a-positiven Endosomen in *nma1*-Deletionsstämmen (Schneider, 2016). Basierend auf den Ergebnissen zur Regulation der frühen Endosomen (Kapitel 3.1) durch den CORVET-Komplex (Kapitel 3.2) wurde der Einfluss von Nma1 auf diese Komponenten der vesikelbasierten Transportprozesse analysiert. Dazu wurde die Interaktion von Nma1 mit dem CORVET-Komplex charakterisiert, in zellbiologischen Untersuchungen ermittelt, wie sich ein Fehlen von Nma1 auf die Rab5-GTPasen der frühen Endosomen, die späten Endosomen und die CORVET-spezifischen Untereinheiten auswirkt und mit welchen Populationen der frühen Endosomen Nma1 in der Zelle transportiert wird. Welchen regulatorischen Einfluss Nma1 auf die frühen Endosomen in *U. maydis* nimmt und worauf diese Funktion basiert, wird nachfolgend diskutiert.

#### 4.3.1. Die Interaktion von Nma1 mit dem CORVET-Komplex ist unabhängig von Rab5a

Die Interaktion von Nma1 mit dem CORVET-Komplex (Pinter, 2015), mit Vps3 als direktem Interaktionspartner (Obhof, 2017) wurde bereits beschrieben. Durch Co-IP/MS-Experimenten mit Vps3 oder Vps8 als Köderprotein konnte nun gezeigt werden, dass Nma1 gemeinsam mit den übrigen Komponenten des CORVET-Komplexes präzipitiert (Kapitel 3.1.2), und dass diese Interaktion unabhängig von Rab5a abläuft. Eine Co-IP/MS mit Nma1 als Köderprotein zeigte ebenfalls, dass die Interaktion von Nma1 mit den CORVET-Komponenten unabhängig von Rab5a ist. In der Literatur wird davon ausgegangen, dass der CORVET-Komplex

nur durch die Bindung der beiden spezifischen Untereinheiten an das Rab5a-Homolog Vps21 mit den frühen Endosomen in *S. cerevisiae* verbunden ist (Peplowska *et al.*, 2007, Pawelec *et al.*, 2010). Dementsprechend müsste der CORVET-Komplex im *rab5a*-Deletionshintergrund zytoplasmatisch vorliegen und Nma1 bereits mit dem zytoplasmatischen Komplex interagieren. Das Fehlen von Vps16 und Vps33 (Abb. 44) in den Nma1-Co-IPs kann durch den Aufbau des CORVET-Komplexes erklärt werden, beide liegen exponiert an der Seite des Komplexes (Bröcker *et al.*, 2012) und könnten bei der Aufreinigung mit höherer Wahrscheinlichkeit verloren gehen. Möglicherweise genügt die Bindung von Vps8 an Vps18, sodass dieses unabhängig von Vps16 und Vps33 mit dem Komplex detektiert wird. Im Vergleich mit den Co-IP/MS-Experimenten, in denen Vps3 oder Vps8 als Köderprotein verwendet wurde, war auch bei diesen Konditionen zu beobachten, dass Vps16 und Vps33 stets die geringsten Peptidzählungen im Vergleich mit dem übrigen Komplex aufwiesen (Abb. 32).

### 4.3.2. Nma1 hat keinen Einfluss auf die Zusammensetzung des CORVET-Komplexes

Um den Mechanismus der Interaktion von Nma1 mit dem CORVET-Komplex und die Funktion der Interaktion zu analysieren, wurde die Komposition des Komplexes in An- und Abwesenheit von Nma1 untersucht. Der CORVET-Komplex ist von *S. cerevisiae* bis zu den komplexen Säugetierorganismen hoch konserviert (Perini *et al.*, 2014, van der Kant *et al.*, 2015), homologe Proteine zu Nma1 konnten jedoch in bioinformatischen Analysen außerhalb der *Ustilaginales* nicht identifiziert werden (Pinter, 2012). Erste Hinweise auf die Funktion von Nma1 zeigten sich in Vorarbeiten durch die Auswirkung auf die Abundanz von Rab5a-positiven frühen Endosomen in  $\Delta nma1$ -Mutanten (Schneider, 2016). Denkbar wäre, dass Nma1 die Zusammensetzung des CORVET-Komplexes beeinflusst, z.B. über eine Förderung der Bildung von Subkomplexen oder durch die Maskierung von Bindestellen zur Prävention einer vollständigen Assemblierung. Vps3 und Vps8 lokalisieren an den entgegengesetzten Enden des Komplexes (Bröcker *et al.*, 2012) und es wäre möglich, dass Nma1 die gemeinsame Lokalisierung der beiden Untereinheiten im Komplex und dadurch die Reifung von Endosomen beeinflusst. Allerdings konnten weder in direkten Co-IP-Experimenten (Vps3 als Köder, Detektion von Vps8) noch in



Co-IP/MS-Analysen ein signifikanter Unterschied in Bezug auf die Vps3/Vps8-Interaktion in Abhängigkeit von Nma1 gefunden werden (Abb. 45).

#### 4.3.3. Nma1 interagiert nur in Anwesenheit von Vps3 mit dem CORVET-Komplex

Entgegen der Ergebnisse aus vorangegangenen Co-IP/MS-Experimenten, bei denen Vps8 nicht als Komplexpartner von Nma1 identifiziert wurde (Pinter, 2015), konnte nun gezeigt werden, dass Vps8 ebenfalls durch Nma1 mit dem Komplex präzipitiert werden kann (vgl. Abb. 44). In Co-IP/MS-Analysen mit Vps8 als Köderprotein wurde Nma1 ebenfalls als Bestandteil des Komplexes nachgewiesen (vgl. Abb. 32). Allerdings führte die Deletion von *vps3* dazu, dass in Co-IP-Experimenten Vps8 nicht mehr gemeinsam mit Nma1 aufgereinigt werden kann (Abb. 46). Auch dieses Resultat konnte in weiteren unabhängigen Co-IPs mit anschließenden MS-Analysen unter Verwendung von Vps8 als Köderprotein bestätigt werden (Kapitel 3.3.1). Im  $\Delta vps3$ -Hintergrund wurde, anstelle von Vps3, die HOPS-spezifische Untereinheit Vps39 (Abb. 32) (Cabrera *et al.*, 2013) als Bestandteil des CORVET-Komplexes identifiziert. Dementsprechend ist davon auszugehen, dass Nma1 spezifisch mit Vps3 interagiert um Einfluss auf den CORVET-Komplex zu nehmen, dagegen nicht an das Äquivalent aus dem HOPS-Komplex binden kann. Der Zweck dieser spezifischen Interaktion wird im nachfolgenden Kapitel bei der Analyse des  $\Delta nma1$ -Phänotyps diskutiert.

#### 4.3.4. Nma1 beeinflusst die Population der frühen Endosomen

Da der CORVET-Komplex über seine spezifischen Untereinheiten Vps3 und Vps8 an die Membranen der frühen Endosomen lokalisiert und darüber auch die Funktionalität des Komplexes vermittelt wird (Plemel *et al.*, 2011, Ungermann und Kümmel, 2019), war eine Wirkung von Nma1 bei diesem Prozess denkbar. Nma1 interagiert über Vps3 direkt mit dem CORVET-Komplex (Abb. 46). In Vorarbeiten konnte bereits eine Reduktion der Anzahl an  $P_{ref}$ -Rab5a-markierten frühen Endosomen durch die *nma1*-Deletion gezeigt werden, was auf eine Steuerung der Endosomenfusion durch Nma1 hindeutet (Schneider, 2016). Diese Ergebnisse konnten mit Stämmen mit der Expression von *rab5a* unter seinem eigenen Promotor, um Überexpressionsartefakte

## Diskussion

auszuschließen (vgl. Abb. 14), verifiziert werden (Abb. 47). Zusätzlich wurde der Effekt einer starken Überexpression von Nma1 untersucht. Sowohl durch die Deletion von *nma1* als auch durch die Überexpression ergab sich eine signifikante Reduktion der Anzahl an frühen, Rab5a-positiven Endosomen (Abb. 47). Gleichzeitig wurde für den  $\Delta nma1$ -Hintergrund eine nicht signifikante und für die Überexpression eine signifikante Größenzunahme der durchschnittlichen Vesikelgröße bestimmt. Dies spricht dafür, dass die Endosomenzahl durch eine gesteigerte Fusionsrate und nicht durch andere mögliche Szenarien, wie beispielsweise einer Beeinflussung der Rab5a-Expression, verringert wurde. Ein vergleichbarer Effekt war auch für die verstärkte Expression von *rab5a* im Vergleich mit dem Wildtyp beobachtet worden (vgl. Abb. 14). Nma1 übte keinen Einfluss auf das Expressionslevel der Rab5-GTPasen oder das Proteinlevel von Rab5a und Rab5b aus (siehe Appendix Abb. 98). Die Auswirkung der Überexpression von Nma1 zeigt dagegen nicht wie erwartet einen gegensätzlichen Effekt verglichen zur Deletion. Statt zu einer erhöhten Anzahl an Vesikeln zu führen, zeigte die Überexpression von Nma1 ähnliche Tendenzen wie die Deletion, die Anzahl der Endosomen zu reduzieren. Eine Analyse der Nma1-Lokalisierung und -Motilität (siehe Appendix Abb. 98) bei Expression unter  $P_{hxt1}$  zeigte, dass die Lokalisierung von Nma1 zwar weiterhin entlang der Mikrotubuli erfolgte, Nma1 jedoch keine Motilität mehr zeigte. Dies impliziert, dass durch die starke Expression Nma1 nicht mehr auf den frühen Endosomen lokalisiert ist, dadurch nicht mehr mit Vps3 interagieren kann und somit der Phänotyp eher in Richtung des Deletionsphänotyps geht. Die Motilität der Rab5a-positiven Endosomen war durch die Überexpression von Nma1 nicht beeinträchtigt (siehe Appendix Abb. 98). Ein Grund für die geringere Auswirkung im Vergleich mit der Deletion von *nma1* könnte das zusätzlich vorhandene native Gen sein. Warum die starke Expression die Funktionalität beeinträchtigt, ist jedoch unklar. Anhand der auch für den Wildtyphintergrund typischen Lokalisierung entlang der Mikrotubuli, ist es wahrscheinlich, dass ein korrektes Protein gebildet wird. In Vorarbeiten wurden bereits Stämme mit einer verstärkten Expression von *nma1* durch Verwendung des  $P_{otef}$  untersucht, wobei keine Änderung der Motilität von Nma1 beobachtet werden konnte (Obhof, 2017). Die Experimente wurden allerdings in Arabinose-haltigem Medium durchgeführt, welches einen reprimierenden Effekt auf  $P_{otef}$  (Fortenbacher, 2019) hat, weshalb davon auszugehen ist, dass das Expressionslevel von Nma1 im Vergleich zur  $P_{hxt1}$ -abhängigen Expression geringer ist. Ein möglicher Grund für den beobachteten negativen Effekt durch die Überexpression

von Nma1 könnte stöchiometrisches Ungleichgewicht sein. Dies ist besonders schwerwiegend, wenn ein Protein Bestandteil eines Komplexes ist, da durch eine Überexpression abnormale Komplexbildungen gefördert werden. Ebenfalls können Reaktionsgleichgewichte gestört werden, wenn ein Interaktionspartner durch künstlich verstärktes Vorkommen ein gemeinsam genutztes Substrat allein beansprucht (zusammengefasst in Moriya, 2015). Im Fall von Nma1 wäre dann vermutlich die Interaktion mit Vps3 gestört. In *S. cerevisiae* wurde die Beeinflussung des verwandten HOPS-Komplexes durch das Vps33-interagierende Protein Ivy1 (*interacting with vps33 and ypt7*) beobachtet. Eine Überexpression von *ivy1* führte hierbei zu einem *vps33*-Deletionsphänotyp, weshalb vermutet wurde, dass die erhöhte Präsenz von Ivy1 eine verstärkte Interaktion mit Vps33 auslöst, welche dazu führt, dass Vps33 nicht mehr für die Komplexassemblierung zur Verfügung steht (Lazar *et al.*, 2002). Da die *U. maydis*-Zellen durch die Überexpression von *nma1* jedoch keinen *vps3*-Deletionsphänotyp zeigen und die Interaktion von Nma1 mit Vps3 im Zusammenhang mit dem CORVET-Komplex stattfindet, kann vermutet werden, dass in diesem Fall die Assemblierung von Vps3 mit dem CORVET-Komplex unbeeinträchtigt ist.

Der für Rab5a bereits beobachtete Effekt der *nma1*-Deletion äußerte sich auch bei Endosomen, die Rrm4, ein RNA-Bindeprotein, enthalten (Becht *et al.*, 2006), durch eine allgemeine Reduktion, der motilen Endosomen (Abb. 47). Da Rrm4 sowohl mit Rab5a als auch mit dem t-SNARE Yup1 colokalisiert (Becht *et al.*, 2006, Higuchi *et al.*, 2014), könnte die beobachtete Reduktion der Endosomenmenge durch die *nma1*-Deletion dennoch auf eine spezifische Beeinflussung von Rab5a zurückzuführen sein, während andere Populationen der Endosomen unbeeinträchtigt sein könnten. Zunächst wurde ermittelt, ob der beobachtete Effekt durch eine stimulierte Fusionsrate oder durch einen beschleunigten Reifungsprozess ausgelöst wurde. Sollte ein beschleunigter Reifungsprozess der Grund sein, müssten die späten Endosomen unbeeinträchtigt oder in vermehrter Anzahl vorliegen. Wenn die *nma1*-Deletion dagegen die Fusionsrate der frühen Endosomen beeinflusst, würde sich die geringere Anzahl auch in den aus Reifung der frühen Endosomen entstehenden späten Endosomen (zusammengefasst in Mellman, 1996) fortsetzen. Die Quantifizierung der Rab7-positiven späten Endosomen (Abb. 48) zeigte eine signifikante Reduktion der Anzahl mit gleichzeitiger Größenzunahme durch die Deletion von *nma1* im Vergleich mit dem Wildtyp. Dies spricht dafür, dass der Verlust

## Diskussion

von *Nma1* dazu führt, dass die frühen Endosomen mit einer höheren Frequenz fusionieren, was die Anzahl der frühen Endosomen reduziert und in der Folge auch die Anzahl der späten Endosomen beeinträchtigt. Die Deletion von *nma1* löst eine gesteigerte Markerdurchmischung der Marker der frühen (Rab5a) und späten (Rab7) Endosomen im  $\Delta nma1$ -Hintergrund aus. Die geringfügige Colokalisierung von Rab5a und Rab7 im Wildtyp spricht für prinzipiell separierte Endosomenpopulationen, wobei die späten Endosomen durch Reifung im Zusammenhang mit Austausch der spezifischen Rab-GTPasen aus den frühen Endosomen entstehen (Rink *et al.*, 2005). Es kommt zu einer minimalen Colokalisierung beider Rab-Proteine auf den späten Endosomen, da nicht alle Rab5a-Proteine restlos aus der Membran entfernt werden, bevor Rab7 integriert wird (vgl. Abb. 15) (Shearer und Petersen, 2019). Die Deletion von *nma1* bewirkte jedoch eine Zunahme dieser Colokalisierung in Kombination mit einer geringfügigen gemeinsamen Motilität, welche sich sowohl visuell als auch bei einer Quantifizierung der Signalüberschneidung bestätigte (Abb. 48). Die gesteigerte Colokalisierung von Rab5a und Rab7 könnte mit der erhöhten Fusionsrate zusammenhängen, da die Regulation der endosomalen Transportprozesse, zu denen einerseits die Fusion der frühen Endosomen, andererseits die Reifung zu späten Endosomen und dem damit zusammenhängenden Weitertransport in Richtung Vakuole gehören (zusammengefasst in Mellman, 1996), möglicherweise einem störungsempfindlichen Ablauf zugrunde liegen. Der gemeinsame Transport von Rab5a und Rab7 könnte ein Anzeichen dafür sein, dass Rab7-Proteine an die Membran rekrutiert werden, bevor die frühen Endosomen ihre Verteilungsfunktion erfüllt haben und die Fracht am Zielort angekommen ist. Dadurch kann Rab5a noch nicht aus der Membran entfernt werden, interagiert weiterhin mit den Motorproteinen und beeinflusst den Transport dieses endosomalen Kompartiments.

Im  $\Delta nma1$ -Hintergrund lag Rab5a häufiger separiert von Rab5b vor, während Rab5b überwiegend gemeinsam mit Rab5a lokalisierte (Abb. 49). Diese Beobachtung ist vermutlich auf die allgemeine Reduktion der Anzahl an frühen Endosomen zurückzuführen. Da Rab5b im Vergleich mit Rab5a unterrepräsentiert ist (vgl. Abb. 21) und durch Rab5a negativ beeinflusst zu werden scheint (vgl. Abb. 28), ist zu vermuten, dass durch die reduzierte Anzahl an verfügbaren Vesikeln Rab5a auch an Endosomen bindet, die sonst von Rab5b alleine besetzt würden. Dadurch nimmt der Anteil an separat vorliegendem Rab5b ab. Gleichzeitig ist davon auszugehen, dass die Aktivierung von Rab5a nicht von *Nma1* abhängig ist und damit im  $\Delta nma1$ -Hintergrund

eine mit dem Wildtyp vergleichbare Menge an aktivem Protein zur Verfügung steht. Durch die begrenzte Verfügbarkeit von Membranmaterial ist zu erwarten, dass Rab5a ungehindert in die Membran integriert wird und Rab5b dementsprechend negativ beeinflusst wird. Durch die putative Funktion von Vps3 bei der Rekrutierung und Aktivierung von Rab5b (vgl. Abb. 33) wäre auch denkbar, dass Nma1 diesen Prozess reguliert oder unterstützt. Demnach könnte die Menge an aktivem Rab5b-Protein oder auch die Zusammensetzung an aktivem Rab5a und Rab5b in den Membranen durch die *nma1*-Deletion verändert sein.

Im Vergleich der Lokalisierung beider CORVET-spezifischer Untereinheiten, Vps3 und Vps8, im Wildtyp- und im  $\Delta nma1$ -Hintergrund wurde eine geringere Colokalisierung in der Abwesenheit von Nma1 beobachtet (Abb. 50). Es ist möglich, dass sich die Vps3- und Vps8-Signale nur überlagern, wenn die Fusion der Membran erfolgreich abgelaufen ist oder wenn die Membranen der beiden zu fusionierenden Endosomen in unmittelbarer Nähe sind. Während der Überbrückungsprozess der Membranen durch den CORVET-Komplex noch im Gange ist, lokalisieren Vps3 und Vps8 vermutlich auf benachbarten Endosomen und sind durch den Kernkomplex verbunden. Basierend auf den Beobachtungen der reduzierten Endosomenanzahl ohne Nma1 wäre zu vermuten, dass Nma1 normalerweise die Fusion der Endosomen reguliert oder verzögert. Dementsprechend wäre bei der Analyse von Vps3 und Vps8 eine erhöhte Colokalisierung zu erwarten, wenn durch die Deletion von *nma1* die Fusionsrate erhöht ist. Es besteht jedoch auch die Möglichkeit, dass die Membranüberbrückung des CORVET-Komplexes in Abwesenheit von Nma1 deutlich effizienter erfolgt und damit der CORVET-Komplex bedeutend schneller wieder von der Membran entfernt wird. Dies wäre vorstellbar bei einer Funktion von Nma1 als eine Art Schutzkappe. Der CORVET-Komplex kann über Vps8 an aktives Rab5 auf den frühen Endosomen binden (vgl. Perini *et al.*, 2014), während auf der anderen Seite des Komplexes Vps3 mit Nma1 lokalisiert ist. Die Rab5-Bindung von Vps3 könnte durch die Anwesenheit von Nma1 blockiert oder reguliert werden. Denkbare Szenarien wären eine vollständige Unterbindung der Interaktion mit Rab5 bei Anwesenheit von Nma1, die Regulation einer bestimmten Anzahl an möglichen Fusionen, im Hinblick auf eine Sicherstellung des endosomenbasierten Langstreckentransports oder eine Zeit- oder Cofaktoren-gesteuerte Regulation der Fusion. Bei einer vollständigen Blockade der Interaktion zwischen Vps3 und Rab5 müsste gewährleistet sein, dass dennoch ein Anteil an CORVET-Komplexen ohne Nma1 vorliegt, um auch die Funktion

## Diskussion

der Frachtsortierung erfüllen zu können (Solinger und Spang, 2013). Für einen Mechanismus einer gesteuerten Fusionsregulation gibt es Beispiele aus anderen Organismen. In *S. cerevisiae* wurde beschrieben, dass der Ypt1-Effektor Uso1 die Fusion der sekretorischen Vesikel mit der Plasmamembran durch Interaktion mit dem SNARE Sed5 blockiert. Diese Regulation ist abhängig von der Konformation des Uso1-Proteins. Je nachdem in welcher Konformation das Protein vorliegt entstehen Berührungspunkte zwischen den Membranen und sie können fusionieren oder der Abstand ist so groß, dass keine Fusion eingeleitet wird (Yuan *et al.*, 2017). Ein Homolog zu Uso1 wurde auch in Säugetierzellen identifiziert, wo p115 ebenfalls Membranfusionen beeinflusst (Diao *et al.*, 2008). Im Hinblick auf die potenzielle Funktion von Vps3 bei der Aktivierung und Membranrekrutierung von Rab5b (vgl. Abb. 33) und der Tatsache, dass Vps3 bei einer Colokalisierung mit Vps8 auch ohne Vps8 an den Membranen der Endosomen identifiziert werden konnte (vgl. Abb. 36), sind weitere Analysen notwendig, um zuzuordnen, welche Funktion von Vps3 durch Nma1 hauptsächlich beeinflusst wird. Auch eine Intervention bei der Vps3-abhängigen Rekrutierung und Aktivierung von Rab5b könnte die Fusionsrate der frühen Endosomen beeinflussen. Um einen genaueren Einblick zu erhalten, sollte ein Fokus auf die Proteindomäne gelegt werden, über welche die Interaktion zwischen Nma1 und Vps3 abläuft. Für Vps3 in Hefe wurde beschrieben, dass die N-terminale Domäne essenziell für die Interaktion mit Vps21 und damit auch für die Funktion bei endosomalen Transportprozessen ist (Epp und Ungermann, 2013). Würde Nma1 die Interaktion von Vps3 mit Rab5a oder Rab5b beeinflussen, wäre eine Maskierung dieser Rab5-Interaktionsdomäne durch Nma1 ein möglicher Mechanismus. Um dieser Theorie nachzugehen, könnte in Folgearbeiten die Interaktion von Nma1 mit einem N-terminal verkürzten Vps3-Protein untersucht werden.

Um diese Theorie zu unterstützen, wurde die gemeinsame Lokalisierung von Rab5a mit den beiden spezifischen CORVET-Untereinheiten Vps3 und Vps8 untersucht. Im Wildtyphintergrund lokalisierten Vps3 und Rab5a vereinzelt gemeinsam, jedoch auch häufig auf separaten Endosomen. Die Deletion von *nma1* förderte die getrennte Lokalisierung von Vps3 und Rab5a (Abb. 52). Dieses Ergebnis würde zu einer beschleunigten Fusion in Abwesenheit von Nma1 und einer dementsprechend geringeren Lokalisierungsdauer des CORVET-Komplexes auf den frühen Endosomen passen. Im Hinblick auf eine mögliche Maskierung der Rab5-Bindedomäne durch Nma1 wäre im *nma1*-Deletionshintergrund eher eine erhöhte Colokalisierung

zwischen Vps3 und Rab5a zu erwarten. Würde sich der Einfluss von Nma1 jedoch auf die Interaktion zwischen Vps3 und Rab5b beschränken, möglicherweise durch die putative GEF-Funktion von Vps3 für Rab5b, könnte durch die Deletion von *nma1* die Zusammensetzung von Rab5a und Rab5b auf den Membranen verändert werden.

Bei der Colokalisierung von Rab5a und Vps8 konnte kein deutlicher Unterschied durch die Deletion von *nma1* im Vergleich mit dem Wildtyphintergrund festgestellt werden (Abb. 53). In Kombination mit der Erkenntnis, dass Vps8 auch unabhängig von Vps3 an die Rab5a-positiven Endosomen rekrutiert wird (vgl. Abb. 40) und demnach vermutlich die CORVET-Untereinheit ist, die für die Bindung des Komplexes an die Membran verantwortlich ist, deutet auch dieses Resultat darauf hin, dass Vps8 die Bindung des CORVET-Komplexes an die Endosomen initiiert. Demnach würde Vps8 nach Assemblierung des CORVET-Komplexes die Bindung an Rab5a-Endosomen vermitteln und Vps3 überbrückt im Anschluss die Membranen durch Bindung an Rab5 auf einem benachbarten Vesikel. In Anwesenheit von Nma1 bindet dieses an Vps3 und kann möglicherweise durch ein Maskieren der Interaktionsdomäne verhindern, dass Vps3 an eine Rab5-GTPase binden kann. So wird die Fusion der frühen Endosomen in Abhängigkeit von Nma1 reguliert. Durch die Abwesenheit von Nma1 fehlt diese Reprimierung und Vps3 kann durch direkte Bindung an ein weiteres frühes Endosom die Fusion einleiten. Im Anschluss an die erfolgreiche Fusion wird der CORVET-Komplex möglicherweise unmittelbar aus der Membran entfernt, wodurch sich die veränderte Colokalisierung von Vps3 und Vps8 im Wildtyp- und im  $\Delta nma1$ -Hintergrund erklären lässt. Ein weiterer denkbarer Ansatz wäre eine stabilisierende Funktion von Nma1 auf den CORVET-Komplex, sodass sich der Komplex in Abwesenheit von Nma1 mit einer geringeren Effizienz assemblieren kann. Aufgrund des starken morphologischen Phänotyps einer *vps3*-Deletion (vgl. Schneider, 2016), wäre bei einer deutlichen Beeinträchtigung des Komplexaufbaus jedoch ein schwerwiegenderer Phänotyp zu vermuten. So ist davon auszugehen, dass der Komplex sich auch in Abwesenheit von Nma1 vollständig assemblieren kann, jedoch möglicherweise mit einer geringeren Effizienz. Ein weiteres Indiz für eine möglicherweise stabilisierende Funktion von Nma1 für den Aufbau des CORVET-Komplexes liefert der beeinflusste Langstreckentransport von Vps8-Proteinen im  $\Delta nma1$ -Hintergrund. Dabei konnte beobachtet werden, dass sich Vps8-positive Endosomen häufig in der Spitze der Filamente oder am Septum ansammeln (Abb. 51). Ein solches Phänomen konnte für Vps3-Signale nicht

## Diskussion

beobachtet werden. Da das Septum bzw. die Filamentspitze die beiden Zellenden darstellen, halten sich Vesikel an diesen beiden Punkten in der Zelle vermutlich länger auf als in der Zellmitte. Um sich von einem der Zellenden in entgegengesetzter Richtung zu bewegen, ist es nötig das Motorprotein zu wechseln, da die verschiedenen Transportrichtungen durch spezielle Motorproteine realisiert werden (zusammengefasst in Steinberg, 2007). Da die Zusammenlagerung des CORVET-Komplexes möglicherweise durch Nma1 gefördert oder stabilisiert wird und Vps8 als erstes Protein des Komplexes an die frühen Endosomen bindet (vgl. Abb. 40) erklären dies, warum sich überwiegend Vps8-positive Endosomen, jedoch nicht Vps3-positive Endosomen an diesen Punkten ansammeln. Beispielsweise wurde eine Beeinflussung der Verteilung von Untereinheiten des HOPS-Komplexes im endosomalen Stoffwechselweg durch Clathrin-interagierende Proteine in Vertebraten gezeigt. Clathrin ist eines der Hüllproteine von endozytotischen Vesikeln. Durch die Interaktion mit Clathrin konnte so eine Einflussnahme auf die CORVET- und HOPS-Komplexe gezeigt werden, wodurch die Umwandlung der beiden Komplexe ineinander reguliert wurde (Zlatic *et al.*, 2011). Ebenfalls denkbar ist eine Verschiebung des Interaktionsgleichgewichts zwischen Vps3 und den beiden Rab5-GTPasen Rab5a und Rab5b, da gezeigt wurde, dass Vps3 im  $\Delta rab5a$ -Hintergrund auch eine gemeinsame Motilität mit Rab5b-positiven Endosomen ausübt (vgl. Abb. 42). Durch die Colokalisierung von Rab5a und Rab5b im *nma1*-Deletionshintergrund wurde jedoch gezeigt, dass Rab5b in dieser Kondition vermehrt gemeinsam mit Rab5a vorzufinden ist, weshalb diese Hypothese als unwahrscheinlich eingestuft wurde.

Die Colokalisierung von Rab5b und dem t-SNARE Yup1 (Wedlich-Söldner *et al.*, 2000) war durch die Deletion von *nma1* nicht beeinträchtigt (Abb. 54). Allerdings ändert sich die Colokalisierung von Rab5b und Vps8 (Abb. 54): Im Wildtyphintergrund lokalisierten Vps8 und Rab5b zu großen Teilen auf statischen vesikulären Strukturen und nur in geringem Maße auf motilen Strukturen geringer Größe. Durch die Deletion von *nma1* nahm diese Lokalisierung auf kleinen motilen Vesikeln zu. Dies könnte bedeuten, dass Rab5b durch die Deletion von *nma1* nur indirekt beeinflusst wird, indem die gemeinsame Lokalisierung mit Rab5a verändert ist. Demnach ist ein denkbarer Ansatz, dass Vps8 durch eine Beeinträchtigung von Rab5a im  $\Delta nma1$ -Hintergrund möglicherweise vermehrt mit Rab5b interagiert. Ebenfalls möglich wäre eine Regulation der Aktivierung von Rab5b. Da durch den Einfluss der *vps3*-Deletion auf die Lokalisierung und Motilität von Rab5b gezeigt werden konnte, dass Rab5b unter



Beteiligung von Vps3 aktiviert und in die Membran integriert wird (vgl. Abb. 33), kann diese Interaktion durch eine fehlende inhibierende Nma1-Bindung an Vps3 möglicherweise effizienter erfolgen. Dies hätte zur Folge, dass eine erhöhte Anzahl an aktiven Rab5b-Proteinen in der Membran vorliegt, welche wiederum mit Effektoren wie der Transportmaschinerie oder dem CORVET-Komplex interagieren können (vgl. Plemel *et al.*, 2011, Zhang *et al.*, 2010, Bielska *et al.*, 2014a). Ein weiterer Effekt der verstärkten Aktivierung von Rab5b in die Membranen könnte, aufgrund der erhöhten Präsenz von aktiven Rab5-GTPasen, eine stimulierte Fusionsrate der Endosomen sein, wie sie bereits für Überexpressionen von Rab5-GTPasen beobachtet werden konnte (Stenmark *et al.*, 1994). Um diese Theorie zu unterstützen, sollte auch die Lokalisierung von Vps3 und Rab5b in einem  $\Delta nma1$ -Hintergrund untersucht werden.

#### 4.3.5. Nma1 lokalisiert in Abhängigkeit von Vps3 auf frühen Endosomen

Nma1 lokalisiert entlang fibrillärer Strukturen, welche in Vorarbeiten als Filamente des Mikrotubulizytoskeletts identifiziert werden konnten (Pinter, 2012). Entlang dieser Nma1-markierten Mikrotubuli wurden Vesikel transportiert, die positiv für Nma1 und Rab5a waren, jedoch auch eine große Anzahl Rab5a-positiver Endosomen ohne gleichzeitige Nma1-Lokalisierung (Abb. 55). Die beobachtete Nma1-Motilität erfolgte stets gemeinsam mit Rab5a-positiven Endosomen, während Rab5a-Endosomen auch ohne Nma1 motil waren. Die Deletion des Nma1-Interaktionspartners *vps3*, wofür bereits in proteinbiochemischen Analysen gezeigt werden konnte, dass dadurch die Assoziierung von Nma1 mit dem CORVET-Komplex verloren geht (vgl. Abb. 46), führte dazu, dass Nma1 nicht mehr auf den endosomalen Strukturen lokalisierte und nicht weiter gemeinsam mit diesen transportiert wurde. Die Lokalisierung von Nma1 im  $\Delta vps3$ -Hintergrund war auf die Mikrotubuli beschränkt. Rab5a-positive Endosomen waren im *vps3*-Deletionshintergrund reduziert motil. Nma1 ist ebenfalls gemeinsam mit Rab5b-positiven Endosomen motil (Abb. 56). Durch die Deletion von *rab5a* erfolgte eine schwerwiegende Beeinträchtigung der Motilität beider Proteine. Dennoch konnte auch eine geringfügige, Rab5a-unabhängige, gemeinsame Motilität von Nma1 und Rab5b beobachtet werden. Da bereits gezeigt werden konnte, dass Vps3 im *rab5a*-Deletionshintergrund auch mit Rab5b-positiven Endosomen transportiert werden kann, ist davon auszugehen, dass sich Nma1 auch in diesem Hintergrund

## Diskussion

durch die Interaktion mit Vps3 auf den Rab5b-positiven Endosomen befindet (vgl. Abb. 42). Eine Colokalisierung von Nma1 und Rab5b in statischen Signalen erfolgte nicht. Rab5b-positive Endosomen akkumulierten überwiegend an den Zellpolen, während Nma1 unbeeinträchtigt mit den Mikrotubuli assoziiert war. Die Motilität von Nma1 konnte eindeutig den frühen Endosomen zugeordnet werden und erfolgte weder im Wildtyphintergrund noch im  $\Delta rab5a$ -Hintergrund gemeinsam mit den Rab7-positiven späten Endosomen (Abb. 59).

Entlang der Nma1-markierten Mikrotubuli wurden Vesikel transportiert, die positiv für Nma1 und Vps3 waren, jedoch auch zusätzliche, die ausschließlich Vps3-markiert waren (Abb. 57). Im Falle einer Nma1-Motilität erfolgte diese stets gemeinsam mit Vps3-positiven Endosomen. Das Vorkommen von Vps3-positiven Endosomen, ohne gleichzeitige Lokalisierung von Nma1 spricht dafür, dass nicht alle Vps3-Proteine durch Nma1 beeinflusst werden. Die gemeinsame Motilität von Nma1 und Vps3 ist abhängig von Rab5a, einem der Interaktionspartner des CORVET-Komplexes für die Membranassoziiierung (Plemel *et al.*, 2011). Vps3 und Nma1 lokalisierten, verglichen mit dem Wildtyp, in einer reduzierten Menge auf kleinen punktuellen Strukturen, welche geringfügig motil waren. Ein Teil dieser Motilität erinnerte jedoch weniger an die von den frühen Endosomen bekannten Langstreckenbewegungen mit hoher Geschwindigkeit, sondern es wurden geringe Distanzen über längere Zeiträume zurückgelegt. Durch die Assoziierung von Nma1 mit dem Mikrotubulizytoskelett könnte diese geringfügige Motilität auch auf De-/Assemblierungsprozesse der Mikrotubulifilamente zurückzuführen sein. Eine Markierung der Mikrotubuliplusenden durch Peb1 im  $\Delta rab5a$ -Hintergrund verdeutlichte ein vergleichbares Bewegungsmuster (vgl. Abb. 30). Ein anderer Teil dieser verbleibenden Motilität im  $\Delta rab5a$ -Hintergrund könnte jedoch auf endosomalen Transportvorgängen basieren. Für Vps3 konnte bereits eine gemeinsame Motilität mit Rab5b im  $rab5a$ -Deletionshintergrund gezeigt werden (vgl. Abb. 42). Insgesamt ist die Motilität durch die Deletion von  $rab5a$  jedoch stark beeinträchtigt.

Um den CORVET-Komplex in seiner Gesamtheit in die Analyse miteinzubeziehen wurde ergänzend die neben Vps3 CORVET-spezifische Untereinheit Vps8 anhand einer gemeinsamen Lokalisierung und Motilität mit Nma1 beobachtet (Abb. 58). Zusätzlich zu den Nma1-markierten Mikrotubulifilamenten wurden vesikuläre Strukturen mit einer gemeinsamen Lokalisierung von Nma1 und Vps8 und mit jeweils

separaten Lokalisierungen identifiziert. Die Motilität beider Proteine erfolgte jedoch gemeinsam. Statische Nma1-Signale waren mit den Mikrotubuli assoziiert, Vps8-markierte Endosomen ohne Nma1-Lokalisierung waren ebenfalls statisch. Auch dies könnte ein Hinweis auf einen möglichen stabilisierenden Einfluss von Nma1 auf den CORVET-Komplex sein. Die Deletion des direkten Nma1-Interaktionspartners *vps3*, wofür bereits in proteinbiochemischen Analysen gezeigt werden konnte, dass dadurch die Assoziierung von Nma1 mit dem CORVET-Komplex verloren geht (vgl. Abb. 46), führte zu überwiegend statischen Signalen beider Proteine. Vps8 akkumulierte in großen runden Strukturen, welche an Vakuolen erinnerten, während Nma1 weiterhin mit den Mikrotubuli assoziiert war. Die Nma1-Motilität wurde durch die Deletion von *vps3* unterbunden, wie es bereits in Vorarbeiten gezeigt werden konnte (Schneider, 2016). Die Motilität von Vps8 war deutlich reduziert, es konnten geringe Bewegungsmuster detektiert werden, welche jedoch ohne Nma1 stattfanden. Für Vps8 konnte bereits eine gemeinsame Motilität mit Rab5a, unabhängig von Vps3 gezeigt werden (vgl. Abb. 40).

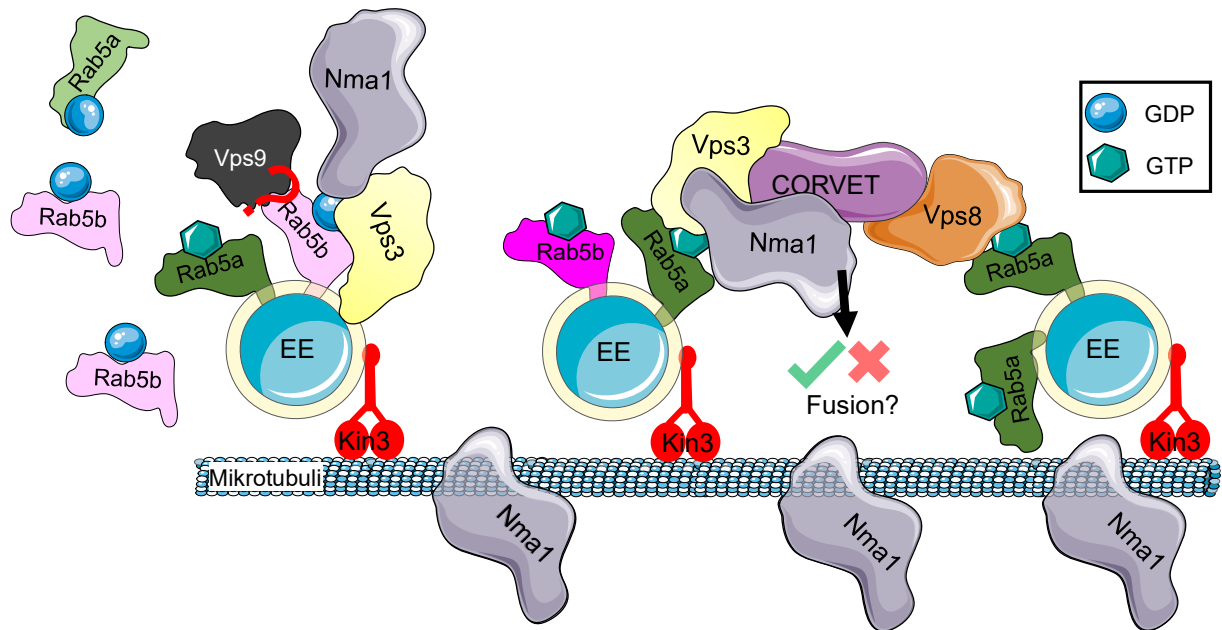
#### 4.3.6. Nma1 stabilisiert den CORVET-Komplex in *U. maydis* und reguliert die Fusion der frühen Endosomen

In *U. maydis* konnte eine Interaktion zwischen Nma1 und dem CORVET-Komplex, spezifisch jedoch mit der Vps3-Untereinheit, gezeigt werden. Der CORVET-Komplex bindet von Vps8 ausgehend an eine aktive Rab5-GTPase in der Membran der frühen Endosomen. Auf der von Vps8 ausgehend betrachtet gegenüberliegenden Seite des Komplexes lokalisiert Vps3 gemeinsam mit Nma1. Denkbar ist eine Wirkung von Nma1 als eine Art Schutzkappe, welche die Rab5-Bindung von Vps3 reguliert (siehe Abb. 87). Durch eine Bindung von Nma1 an Vps3 kann beispielsweise mittels eines Maskierens der Interaktionsdomäne reguliert werden, dass Vps3 an eine Rab5-GTPase binden kann. In einem *nma1*-Deletionshintergrund fehlt diese Kontrolle und Vps3 kann durch direkte Bindung an ein weiteres frühes Endosom die Fusion einleiten. Dadurch kommt es zu der gesteigerten Fusionsrate der frühen Endosomen im  $\Delta nma1$ -Hintergrund. Eine ausreichende Verfügbarkeit an frühen Endosomen ist im Hinblick auf die enorme Relevanz des Langstreckentransportes über Endosomen in *U. maydis* von Bedeutung. Im Anschluss an die erfolgreiche Fusion wird der CORVET-Komplex möglicherweise unmittelbar aus der Membran entfernt, wodurch

## Diskussion

sich die veränderte Colokalisierung von Vps3 und Vps8 im Wildtyp- und im  $\Delta nma1$ -Hintergrund erklären lässt. Ergänzend ist eine stabilisierende Funktion von Nma1 für den Aufbau des CORVET-Komplexes denkbar. Im  $\Delta nma1$ -Hintergrund zeigen Vps8-positive Endosomen eine Beeinträchtigung in ihren Bewegungsmustern, Vps3-positive Endosomen sind dagegen unbeeinträchtigt. Da die Zusammenlagerung des CORVET-Komplexes möglicherweise durch Nma1 gefördert oder stabilisiert wird und Vps8 als erstes Protein des Komplexes an die frühen Endosomen bindet (vgl. Abb. 40), könnte damit auch erklärt werden, warum vorwiegend Vps8-positive Endosomen betroffen sind. Diese ausschließlich Vps8-positiven Endosomen scheitern möglicherweise an der Rekrutierung des CORVET-Komplexes, während Endosomen mit einem erfolgreich assemblierten Komplex ein normales Bewegungsmuster zeigen. Auch eine Beteiligung von Nma1 bei der Vps3-abhängigen Rekrutierung und Aktivierung von Rab5b könnte die Fusionsrate der frühen Endosomen beeinflussen. Über die potenzielle GEF-Funktion von Vps3 für Rab5b könnte durch die Deletion von *nma1* die Zusammensetzung von Rab5a und Rab5b auf den Membranen verändert sein.

Insgesamt konnte gezeigt werden, dass die Motilität von Nma1 spezifisch mit den frühen Endosomen erfolgt. Diese Motilität ist abhängig von dem direkten Nma1-Interaktionspartner Vps3. Da Vps3 sowohl über Rab5a als auch über Rab5b an die frühen Endosomen binden kann, ist eine Motilität von Nma1 ebenfalls mit beiden Populationen der frühen Endosomen möglich. Über Vps3 erfolgt auch eine gemeinsame Motilität von Nma1 mit Vps8 und damit wahrscheinlich mit dem gesamten CORVET-Komplex. Weder die Deletion des Nma1-Interaktionspartners *vps3* (vgl. Abb. 46), noch die Deletion von *rab5a*, der GTPase, die hauptsächlich für die Transportvorgänge der frühen Endosomen verantwortlich ist (vgl. Abb. 22, Abb. 30), beeinträchtigten die Assoziierung von Nma1 mit dem Mikrotubulizytoskelett, was für eine zusätzliche Funktion von Nma1 im Zusammenhang mit den Mikrotubuli spricht.



**Abb. 87: Nma1 reguliert die CORVET-abhängige Fusion der frühen Endosomen**

Nma1 (grau) interagiert mit dem CORVET-Komplex (lila) über die Vps3-Untereinheit (gelb). Der CORVET-Komplex bindet von Vps8 (orange) ausgehend an eine aktive Rab5-GTPase (dunkelgrün/dunkelmagenta) in der Membran der frühen Endosomen, während auf der gegenüberliegenden Seite des Komplexes Vps3 gemeinsam mit Nma1 bindet. Durch die Bindung von Nma1 an Vps3 kann die Bindung von Vps3 an eine Rab5-GTPase und damit die Fusion der frühen Endosomen reguliert werden. Ergänzend ist eine stabilisierende Funktion von Nma1 für den Aufbau des CORVET-Komplexes möglich. Auch eine Beteiligung von Nma1 bei der Vps3-abhängigen Rekrutierung und Aktivierung von Rab5b (magenta) könnte die Fusionsrate der frühen Endosomen beeinflussen. Die Motilität von Nma1 erfolgt spezifisch mit den frühen Endosomen. Diese Motilität ist abhängig von dem direkten Nma1-Interaktionspartner Vps3, welcher sowohl über Rab5a (grün) als auch über Rab5b an die frühen Endosomen binden kann. Über Vps3 erfolgt auch eine gemeinsame Motilität von Nma1 mit Vps8 und damit wahrscheinlich mit dem gesamten CORVET-Komplex. Die Assoziierung von Nma1 mit dem Mikrotubulizytoskelett ist unabhängig von der Motilität mit den frühen Endosomen.

### 4.4. Die frühen Endosomen unterstützen die mitotische Teilung in *U. maydis*

Deletionen von Komponenten der endozytotischen Transportmaschinerie beeinträchtigen lediglich die Motilität von Nma1 mit den frühen Endosomen, nicht aber die Assoziierung mit den Mikrotubulifilamenten (Kapitel 3.3.5). Aufgrund der Colokalisierung von Nma1 mit den Tub1-markierten Mikrotubulifilamenten und dem Tub2-markierten Spindelpolkörper (Pinter, 2012, Pinter, 2015, Obhof, 2017) wurde eine zusätzliche Funktion von Nma1 im Kontext der mitotischen Teilung vermutet. Interessanterweise lokalisierte auch Rab5a in vergleichbaren Mitosestadien mit Nma1 (Obhof, 2017), was eine Funktion der frühen Endosomen bei den Teilungsprozessen vermuten lässt. Die Funktion von Nma1 und den frühen Endosomen bei der Mitose in *U. maydis* wird nachfolgend diskutiert.

#### 4.4.1. Die frühen Endosomen und der CORVET-Komplex lokalisieren in *U. maydis* an der Mitosespindel

Sowohl die direkt mit Nma1 interagierende CORVET-Untereinheit Vps3 (vgl. Abb. 46), als auch die CORVET-spezifische Untereinheit Vps8 lokalisierten beim Eintritt der Zellen in die Prophase der Mitose gemeinsam mit Nma1 am Mikrotubulizytoskelett (Abb. 60). Während der gesamten Metaphase blieben Vps3 und Vps8 mit einem der Spindelpole assoziiert und lokalisierten mit fortschreitender Spindelelongation in der Anaphase mit beiden Spindelpolen. Bei der Ausbildung der astralen Mikrotubuli in der Telophase waren die CORVET-Untereinheiten weiterhin an den Polen der Spindel lokalisiert, jedoch nicht mit den astralen Mikrotubuli selbst. Daher ist davon auszugehen, dass nicht nur Vps3 durch die direkte Interaktion mit Nma1 an der Spindel lokalisiert. Durch die gleichzeitige Lokalisierung von Vps8 ist eine Präsenz des vollständigen CORVET-Komplexes an den Spindelpolen wahrscheinlich. Da bereits eine Colokalisierung von Nma1 und Rab5a während dieser Stadien nachgewiesen werden konnte (Obhof, 2017), ist es wahrscheinlich, dass die frühen Endosomen mit Nma1 und dem CORVET-Komplex an der mitotischen Spindel lokalisieren. Im Übergang zwischen Interphase und Prophase kondensierten Rab5a-positive frühe Endosomen gemeinsam mit dem Mikrotubulizytoskelett in der Tochterzelle (Abb. 61). Während der Spindelelongation in der Anaphase, nachdem einer der Spindelpole den Sprosshals in Richtung Mutterzelle passiert hatte, wurden die frühen Endosomen

erneut an die Spindelpole rekrutiert. Dabei waren die Rab5a-Signale überwiegend statisch mit den Spindelpolen verbunden und nur vereinzelt erfolgten endosomale Transportprozesse entlang der Spindelmikrotubuli. Während der Ausbildung der astralen Mikrotubuli in der Telophase war Rab5a ebenfalls mit den Spindelpolkörpern verbunden. Parallel erfolgte jedoch eine Wiederaufnahme der endosomalen Transportvorgänge entlang der astralen Mikrotubuli. Dadurch wären separate Funktionen bei Zellteilungsprozessen und vesikulären Transportvorgängen, denkbar. Auch für Säugetierzellen wurde eine Lokalisierung von Rab5A-Vesikeln von der späten G2-Phase bis in die Prophase an den duplizierten Zentrosomen beobachtet (Serio *et al.*, 2011, Lanzetti, 2012). Zentrosomen sind das funktionelle Äquivalent zu den Spindelpolkörpern in Pilzen (zusammengefasst in Kilmartin, 2014). Rab5A verbleibt an den Zentrosomen, bis die Kernhülle in der Prometaphase aufgelöst wird. Während der Metaphase ist Rab5A nicht mehr mit den Spindelpolen assoziiert, sondern wandert entlang der Spindel, wobei eine Verteilung der endozytotischen Fracht auf die beiden entstehenden Zellen postuliert wird. In der späten Telophase wurden Rab5A-Vesikel erneut an den Zentrosomen beobachtet (Lanzetti, 2012). Wie in *Drosophila melanogaster* gezeigt, bleiben die Rab5-Signale während diesen Phasen mit den Endosomenmembranen assoziiert (Capalbo *et al.*, 2011). Auch in *U. maydis* konnte eine Motilität von Rab5a-positiven Vesikeln entlang der Mitosespindel beobachtet werden. Hauptsächlich waren Rab5a-Signale jedoch während der Mitose mit den Spindelpolkörpern assoziiert oder lagen statisch im Zytoplasma vor. Ein Vergleich des zeitlich Ablaufs der Assoziation von Rab5a mit den Spindelpolen (vgl. Abb. 61/ Abb. 74) und der Mitosestadien (Straube *et al.*, 2005), legt nahe, dass Rab5a bei der Spindelelongation erneut mit den Spindelpolen assoziiert ist, kurz bevor die Zellkernhülle um die beiden Spindelpole gebildet wird. Für eine weitere Bestätigung müsste allerdings weiterführend zu dieser Arbeit die gemeinsame Lokalisierung von Rab5a und einem Marker für die Zellkernhülle erfolgen.

Für die Wiederausbildung der Zellkernhülle wurden in Humanzellen Beteiligungen des ESCRT-III-Komplexes (*endosomal sorting complexes required for transport*) beschrieben. Dabei werden der ESCRT-III-Komplex und die regulatorische ATPase Vps4 spezifisch durch CHMP4 (*charged multivesicular body protein*) an die Stellen rekrutiert, an denen sich die Kernhülle um die Mitosespindel bildet und eine Disassemblierung der Spindel erfolgen muss. ESCRT-III, Vps4 und die ATPase Spastin kooperieren dabei, um die Zellkernhülle ohne DNA-Verluste zu versiegeln und

## Diskussion

gleichzeitig die Mitosespindel zu disassemblieren (Vietri *et al.*, 2015). In Säugetierzellen wurde eine durch Rab5 und dem Exozyst vermittelte Lokalisierung von ESCRT-III beobachtet (zusammengefasst in Kumar *et al.*, 2019). Eine Lokalisierung von Rab5a in *U. maydis* während der Etablierung der beiden neuen Zellkernhüllen aus dem ER würde eine Beteiligung von Rab5a bei diesem Prozess unterstützen.

Obwohl Rab5a, der CORVET-Komplex und Nma1 während der Mitose in *U. maydis* spezifisch an den Spindelpolen lokalisieren, zeigte Rab5b (Abb. 62) trotz der aus Langstreckentransportprozessen bekannten Lokalisierung mit Rab5a auf Endosomen (vgl. Abb. 21), keine Colokalisierung während der Mitose. Erst bei der Ausbildung der astralen Mikrotubuli konnte Rab5b an den Spindelpolkörpern detektiert werden. In der Literatur konnte keine differenzielle Untersuchung für die verschiedenen Rab5-Isoformen gefunden werden. Publikationen aus Säugetierzellen beschrieben ausschließlich die Rab5A-Isoform (Lanzetti *et al.*, 2007, Serio *et al.*, 2011, Lanzetti, 2012, Pupo *et al.*, 2018) oder spezifizierten nicht zwischen den verschiedenen Rab5-Varianten (Capalbo *et al.*, 2011, Kumar *et al.*, 2019). Aus diesem Grund kann nur vermutet werden, dass eine Aufgabentrennung der Rab5-GTPasen während der Mitose auch in anderen Organismen erfolgt. Hinweise könnten jedoch differenzierte Verteilungen anderer Marker von frühen Endosomen in Säugetierzellen sein. Es konnte beobachtet werden, dass während der Mitose APPL1-positive Endosomen an der Spindel und im Zytoplasma lokalisieren, während EEA1-positive Endosomen keine Assoziierung mit der Spindel zeigen (Pupo *et al.*, 2018). APPL1 und EEA1 sind bekannte Rab5-Effektorproteine in Säugetierzellen, welche verschiedene Populationen an frühen Endosomen markieren (Miaczynska *et al.*, 2004).

In *U. maydis* konnte anstelle einer Beteiligung von Rab5b während der mitotischen Teilung ein aktiver Transport von Rab5b-positiven Endosomen an den Sprosshals zwischen Mutter- und Tochterzelle nach Abschluss der Mitose beobachtet werden. Rab5b akkumulierte an der Zytoplasmabrücke zwischen den sich teilenden Zellen und markierte die beiden Zellpole, nachdem sich das Mikrotubulizytoskelett auf die beiden Zellen separiert hatte. Rab5a lokalisierte gleichzeitig mit Rab5b an der Zytoplasmabrücke. Dieses Lokalisierungsmuster spricht für zunächst separate Funktionen der beiden Rab5-GTPasen während der mitotischen Teilung oder einer Hauptfunktion von Rab5a, während Rab5b überwiegend inaktiv im Zytoplasma lokalisiert zu sein scheint. Während der Zytokinese werden Endosomen mit beiden



Rab5-Proteinen, welche möglicherweise einer für die Zytokinese spezialisierten Population an frühen Endosomen entstammen, an die Zytoplasmabrücke transportiert. Der anstehende Transport an die Zytoplasmabrücke könnte auch der Grund sein, warum Rab5b in der Telophase an die Spindelpolkkörper rekrutiert wird. Während der Zytokinese erfolgt eine Einschnürung der zytoplasmatischen Teilungsfurche durch einen kontraktiven Aktin-Myosin-Ring (Murthy und Wadsworth, 2005), wobei die Tochterzellen physikalisch separiert werden (zusammengefasst in (Gibieza und Prekeris, 2018, Kumar *et al.*, 2019). In Humanzelllinien wurde beobachtet, dass sich endosomale Strukturen während der Mitose zunächst um die Zentrosomen ansammeln, um die Kapazität an Membranmaterialien sicherzustellen, einen Verlust an die Plasmamembran zu verhindern und anschließend mit fortschreitender Zytokinese an der Teilungsfurche akkumulieren (Takatsu *et al.*, 2013). In Säugetierzellen wurde eine essenzielle Lokalisierung des Exozyst-Komplexes am Flemming-Körper (*midbody*) für die Zytokinese beschrieben (Gromley *et al.*, 2005). Der Exozyst-Komplex realisiert dabei in *D. melanogaster* oder *Schizosaccharomyces pombe* die nötige Zulieferung an Membranmaterialien für die anstehende Zytokinese (Giansanti *et al.*, 2015, Wang *et al.*, 2016). In *S. pombe* wurde dabei eine Kooperation mit einem weiteren Membranüberbrückungskomplex, dem TRAPP-II beschrieben. Durch die beiden Komplexe kann die Überbrückung mehrerer Klassen an sekretorischen Vesikeln oder Komponenten der Endo- und Exozytose zum Zweck der Membrananlieferung erfolgen (Wang *et al.*, 2016). Auch Rab5 wurde als Interaktionspartner des Exozyst-Komplexes identifiziert und lokalisiert ebenfalls an der Zytoplasmabrücke für den finalen Abschnürungsschritt (Kumar *et al.*, 2019). Bei der Einschnürung der Teilungsfurche erfolgt eine Internalisierung von Vesikeln, die gezielt zum Flemming-Körper transportiert werden. Wenn die clathrin-vermittelte Endozytose unterbunden ist, wird die Zytokinese inhibiert (Gerald *et al.*, 2001, Schweitzer *et al.*, 2005). Während der Mitose ist die Endozytose streng reguliert. Clathrin-vermittelte Membraneinstülpungen wurden während der Mitose im Zebrafisch deutlich reduziert gebildet (Aguet *et al.*, 2016). In Humanzellen konnte sogar eine aktive Regulation der Fusionsrate der frühen Endosomen beobachtet werden. Dabei inhibiert Plk1 während der Mitose die Fusion von EEA1-positiven frühen Endosomen durch eine Phosphorylierung der Zytoskelettkomponente Vimentin (Ikawa *et al.*, 2014). Erst in späten Teilungsphasen wird in Säugetierzellen die Endozytose

## Diskussion

wiederaufgenommen, nachdem sie zwischen Anaphase und Zytokinese nur zeitlich und örtlich reguliert abgelaufen ist (Schweitzer *et al.*, 2005).

Die Lokalisierung von Rab5a- und Rab5b-positiven Endosomen an der Zytoplasmabrücke in *U. maydis* (Abb. 63) deutet darauf hin, dass auch hier eine maximale Effizienz durch Rekrutierung sämtlicher membranumhüllter Vesikel notwendig ist, um genügend Material für die bevorstehende Teilung anzuliefern. Gleichzeitig darf jedoch bei pilzlichen Organismen die Rolle der Zellwandneubildung für die Zellteilung nicht außer Acht gelassen werden. In *U. maydis* ist für die vollständige Separierung der Zellen das Einbringen von zwei Septen in der Teilungszone notwendig (Weinzierl *et al.*, 2002). Diese beiden Septen sorgen für die Abgrenzung einer Fragmentierungszone, in welcher die endgültige Separierung der Zellen durch Lyse der verbindenden Zellwände erfolgen kann (O'Donnell und McLaughlin, 1984). Für die Bildung des Sekundärseptums in *U. maydis* ist ein regulatorisches Zusammenspiel der GTPase Cdc42, dem GEF dieser GTPase (Don1) und der Kinase Don3 notwendig (Weinzierl *et al.*, 2002, Mahlert *et al.*, 2006). Don3 ist dabei zuständig für die Verteilung der Septinfilamente und die Bildung des kontraktilen Aktin-Myosin-Rings (Böhmer *et al.*, 2009). Der Transport der Septine erfolgt durch frühe Endosomen (Zander *et al.*, 2016), wodurch im Stadium der bevorstehenden Zytokinese eine Lokalisierung an der Zytoplasmabrücke, sowohl am Pol der Mutterzelle als auch an dem der Tochterzelle erfolgt (Alvarez-Tabares und Perez-Martin, 2010). Die dabei gezeigte Lokalisierung der Septine ist vergleichbar mit den Beobachtungen für die Rab5-GTPasen (vgl. Abb. 63). Durch Don3 wird in *U. maydis* auch die Aktivität der Chitinase Cts1 und deren Sekretion in die Zytoplasmabrücke für die Zytokinese realisiert, wodurch die Separierung der Zellen erfolgen kann (Sandrock *et al.*, 2006, Aschenbroich *et al.*, 2019). Basierend auf diesen Erkenntnissen und den Lokalisierungen von Rab5a und Rab5b (vgl. Abb. 63) kann vermutet werden, dass die Rab5-GTPasen am Transport, der für den Teilungsprozess notwendigen Komponenten an die Zytoplasmabrücke, beteiligt sind. Unter Einbezug der morphologischen Phänotypen der Sporidien mit Deletionen in *rab5a* oder *rab5b* ist es wahrscheinlicher, dass Rab5a-Endosomen für den Transport der Septine verantwortlich sind. Die Deletion von *rab5a* (vgl. Abb. 17) führt wie die Deletion von *don3* (Weinzierl *et al.*, 2002) zu einem Zytokinesedefekt. Dagegen können sich Zellen mit  $\Delta$ *rab5b*-Hintergrund ungehindert teilen (vgl. Abb. 17).

Ein weiterer Zusammenhang zwischen Rab5a und Rab5b während der Zytokinese, neben der Colokalisierung an der Zytoplasmabrücke, konnte in der konstitutiv aktiven Rab5a-Mutante beobachtet werden (Abb. 71). Durch die konstitutive Aktivierung von Rab5a wird Rab5b von der Zytoplasmabrücke verdrängt. Es konnten zwar im Rab5a-GTP-Hintergrund Transportvorgänge von Rab5b-positiven Endosomen in Richtung des Sprosshalses beobachtet werden, jedoch nicht die Akkumulation von Rab5b-Signalen in der Teilungszone. Rab5a-GTP zeigte dagegen eine unbeeinträchtigte Akkumulation an der Zytoplasmabrücke. Die Präsenz von Rab5a-GTP-positiven Endosomen scheint für die Funktionen zur Separierung der Zellen ausreichend zu sein, da die Sporidien mit Rab5a-GTP-Hintergrund keinen Zytokinesedefekt zeigen. Eine Beeinträchtigung von Rab5b durch die konstitutive Aktivierung von Rab5a zeigte sich auch in filamentösen Wachstumsprozessen (vgl. Abb. 28). Im Gegensatz zu den mitotischen Teilungsvorgängen waren die Rab5b-positiven Endosomen im Rab5a-GTP-Hintergrund in Filamenten jedoch statisch. Dies spricht für verschiedene Funktionen der Rab5-GTPasen in der Mitose und während des filamentösen Wachstums, welche auch verschiedenen Regulationsmechanismen unterliegen könnten. Die zellzyklusabhängige Rekrutierung von Rab5b an die Membranen der frühen Endosomen für die Zytokinese könnte durch einen Mechanismus erfolgen, der nicht durch Rab5a beeinflusst wird. In Säugetierzellen konnte eine zellzykluspezifische Regulation von Rab5-GTPasen gezeigt werden. Dabei kontrolliert die zellzykluspezifische Phosphatase Cdc14 RN-tre, einen GAP für Rab5a, womit die Rab5a-Aktivität auf die Mitosephase angepasst werden kann (Lanzetti *et al.*, 2007). Da das Rab5b aus *U. maydis* eine größere Ähnlichkeit zu den humanen Rab5-GTPasen zeigt als Rab5a, ist es denkbar, dass ein zellzykluspezifischer Regulationsmechanismus auch für Rab5b in *U. maydis* vorliegt. Unterstützt wird diese Vermutung durch die aktiven Transportvorgänge von Rab5b-positiven Endosomen in den Vorbereitungsschritten für die Zytokinese im Rab5a-GTP-Hintergrund. Sobald das filamentöse Wachstum induziert wurde (vgl. Material und Methoden 5.2.8), befinden sich die Zellen in einem durch den b-Transkriptionsfaktor initiierten G2-Zellzyklusarrest (Brachmann *et al.*, 2001, Heimel *et al.*, 2010, Flor-Parra *et al.*, 2006), wodurch eine zellzyklusabhängige Regulation von Rab5b nicht mehr möglich ist. Während filamentösen Wachstumsprozessen konnte zwar eine Lokalisierung von Rab5b auf punktuellen Strukturen, jedoch keine Motilität identifiziert werden (vgl. Abb. 28). Eine Regulation der Rab5b-Aktivität durch Rab5a

## Diskussion

wurde in Kapitel 4.1.6 bereits diskutiert. Ergänzend zu der Beeinflussung der Rab5b-Lokalisierung an der Zytoplasmabrücke für die Zytokinese durch die konstitutiv aktive Rab5a-Mutante konnte ein kombinatorischer Effekt der Rab5a-GTP-Mutante mit einer *rab5b*-Deletion beobachtet werden (vgl. Abb. 28). Weder die Rab5a-GTP-Mutante allein, noch Stämme mit  $\Delta rab5b$ -Hintergrund zeigten einen Zytokinesedefekt (vgl. Abb. 17/Abb. 71). Eine Kombination beider Mutationen dagegen resultierte in Zytokinesedefekten (vgl. Abb. 28). Wie bereits in Kapitel 4.1.8 diskutiert, sind weitere Analysen notwendig, um eine Funktion der inaktiven Rab5-GTPasen während der Zellteilung zu bestätigen. Um zu untersuchen, ob die essenzielle Funktion der Rab5-GTPasen in *U. maydis* auf die Funktion bei den endosomalen Transportprozessen während des filamentösen Wachstums oder auf die Beteiligung während der Mitose zurückzuführen ist, kann ein reprimierbares Protein verwendet werden. Da gezeigt werden konnte, dass Stämme mit der gleichzeitigen Deletion von *rab5a* und *rab5b* nicht überlebensfähig sind (vgl. Kapitel 3.1.3), könnte in einem  $\Delta rab5b$ -Hintergrund *rab5a* unter einem induzierbaren Promotorsystem eingebracht werden oder eine temperatursensitive Variante des Proteins generiert werden. Sollte die essenzielle Funktion von Rab5a und Rab5b bei der mitotischen Teilung oder der Zytokinese liegen, müssten Sporidien, denen durch reprimierende Bedingungen eines induzierbaren Promotors oder der restriktiven Temperatur einer temperatursensitiven Mutante beide Rab5-GTPasen fehlen, in einer bestimmten Zellzyklusphase arretieren. Durch die Verwendung von Markern für das Mikrotubulizytoskelett, den Spindelpolkkörper, die Zellkernhülle oder das ER könnte diese Phase bestimmt werden. Dass eine essenzielle Funktion der Rab5-GTPasen erst bei filamentösen Wachstumsprozessen zum Tragen kommt, erscheint unrealistisch, da zu erwarten wäre, dass diese Zellen dann nach der Transformation in der Lage wären zu überleben und erst bei der Stimulation des filamentösen Wachstums Probleme zeigen. Denkbar ist somit eine überlebensnotwendige Funktion bei der mitotischen Teilung, eine essenzielle Funktion der Endozytose bereits vor der filamentösen Phase oder eine Kombination aus beidem.

#### 4.4.2. Die Rab5a-positiven Endosomen werden unter Beteiligung von Nma1 an die Spindel rekrutiert

In Vorarbeiten konnte keine Funktion der Nma1-Lokalisierung an der Mitosespindel identifiziert werden. Die Deletion von *nma1* beeinflusste weder das Mikrotubulizytoskelett noch die Mitosespindel, das Abstreifen der Zellkernhülle oder die Zellkernverteilung (Obhof, 2017). Durch die *nma1*-Deletion waren jedoch weniger Rab5a-positive Endosomen an dem kondensierenden Mikrotubulizytoskelett während der Prophase zu beobachten (Abb. 64). Durch die *nma1*-Deletion war Rab5a nicht mehr mit der Mitosespindel assoziiert. Die fehlende Rekrutierung von Rab5a an die Mitosespindel hatte, verglichen zum Wildtyp, eine verfrühte Ausbildung von kurzen astralen Mikrotubuli zur Folge. Erst bei der Wiederaufnahme der endosomalen Transportvorgänge während der Ausbildung der langen astralen Mikrotubuli in der Telophase war Rab5a im  $\Delta nma1$ -Hintergrund mit der Spindel assoziiert. Während jedoch im Wildtyphintergrund auch eine Lokalisierung von Rab5a an den MTOCs der astralen Mikrotubuli beobachtet werden konnte, zeigte sich im  $\Delta nma1$ -Hintergrund endosomale Motilität lediglich entlang der astralen Mikrotubuli. Demnach war durch die Deletion von *nma1* spezifisch die Rekrutierung von Rab5a an die Spindelpolkörper beeinträchtigt und nicht die endosomalen Transportvorgänge im Allgemeinen. Dies ergänzte sich auch mit dem Befund, dass die Deletion von *nma1* keinen Einfluss auf die Motilität von Rab5a während filamentöser Wachstumsprozesse hat (vgl. Abb. 49). Interessanterweise konnte bei Nma1 eine SMC-Domäne (*structural maintenance of chromosomes*) identifiziert werden (E-Wert  $5,84 \cdot 10^{-22}$ ) (konservierte Domänensuche, NCBI). Bekannte Proteine, die eine SMC-Domäne enthalten sind beispielsweise Condensin und Cohesin, welche für die Chromosomenkondensierung bzw. die Kohäsion der Schwesterchromatiden während der Zellteilung zuständig sind. Dabei bilden Proteine mit SMC-Domänen Homo- oder Heterodimere und gehen Komplexe mit anderen Proteinen ein (zusammengefasst in Jessberger, 2003). Ein Zusammenhang zwischen Rab5A und SMC-haltigen Proteinen ist aus Humanzellen bekannt. Dabei wurde beschrieben, dass die Rab5A-Endosomen für die Lokalisierung von CENP-F (*centromere protein*) an den Kinetochoren zuständig sind (Serio *et al.*, 2011). CENP-F ist notwendig für die korrekte Bindung der Spindel-Mikrotubuli an die Kinetochore, das Anordnen der Chromosomen an der Metaphaseplatte und um den spindelassoziierten Mitosekontrollpunkt zu erfüllen

## Diskussion

(Liao *et al.*, 1995, Holt *et al.*, 2005). Auch CENP-F enthält eine SMC-Domäne (NCBI, konservierte Domänensuche). Durch die Repression aller drei Rab5-Isoformen in Zellkulturen mit humanen Zelllinien konnte eine fehlerhafte Ansammlung der Chromosomen in der Metaphaseplatte beobachtet werden, zurückzuführen auf eine verringerte Spannung zwischen den Schwesterkinetochoren und einer reduzierten Stabilität der Kinetochor-Mikrotubuli aufgrund der fehlenden Lokalisierung von CENP-F an den Kinetochoren (Serio *et al.*, 2011). Im Gegensatz zu den Beobachtungen aus *U. maydis* scheint Rab5A jedoch im Säugetiersystem für den Transport des SMC-Domänen-Proteins an die Spindel notwendig zu sein, während in *U. maydis* das SMC-Domänen-Protein Nma1 in die Rekrutierung der Rab5a-positiven Endosomen an die Spindel involviert ist und selbst dauerhaft mit den Mikrotubuli assoziiert ist. Da SMC-Proteine als Dimere agieren, ist ein denkbarer Mechanismus, dass durch die Rab5a-Endosomen ein weiteres SMC-Protein an die Nma1-assoziierte Spindel transportiert wird und damit die Funktion erfüllt werden kann. Bioinformatische Untersuchungen (NCBI und UniProtKB) nach weiteren Proteinen mit SMC-Domäne in *U. maydis* konnten sechs putative SMC-Domänen-Proteine identifizieren, welche Ähnlichkeiten mit den konservierten SMC1-SMC6-Proteinen zeigen (SMC1: UMAG\_12218, SMC2: UMAG\_05835, SMC3: UMAG\_04389, SMC4: UMAG\_12209, SMC5: UMAG\_11074, SMC6: UMAG\_00739) (vgl. Jessberger, 2003). Ob eines dieser putativen SMC-Proteine mit Nma1 interagiert und über die Rab5a-positiven Endosomen an die Mitosespindel transportiert wird bedarf weiterer Untersuchungen. Bei Co-IP- und anschließenden MS-Analysen mit Nma1 als Köderprotein konnte keines dieser Proteine als Interaktionspartner identifiziert werden (vgl. Abb. 44 und Pinter, 2015). Die Analysen im Rahmen dieser Arbeit wurden jedoch in filamentös wachsenden Kulturen durchgeführt, in welchen keine Notwendigkeit für eine zellzyklusspezifische Interaktion besteht. Analysen aus (Pinter, 2015) wurden mit exponentiell wachsenden Kulturen vollzogen, aufgrund einer fehlenden Synchronität der Zellzyklusstadien kann jedoch davon ausgegangen werden, dass eine Interaktion, welche lediglich spezifisch während der Spindel elongation stattfindet, dabei nicht identifiziert werden kann. Anhand einer Kategorisierung von exponentiell wachsenden *U. maydis*-Kulturen, basierend auf der Morphologie des Mikrotubulizytoskeletts, befinden sich lediglich 20 % der Zellen in der Mitose (Banuett und Herskowitz, 2002). Experimentelle Ansätze, die Zellkulturen über den b-induzierten Zellzyklusarrest (Brachmann *et al.*, 2001, Flor-Parra *et al.*, 2006, Heimel *et al.*, 2010) zu

synchronisieren, führten nicht zum gewünschten Ergebnis (Daten nicht gezeigt). Um zellzyklusspezifische Interaktionen zu identifizieren sind daher weitere Versuchsansätze nötig.

#### 4.4.3. Die stadienspezifische Rekrutierung von Rab5a-Endosomen an die Mitosespindel beruht auf der Interaktion mit Vps3

Bei der Kondensierung der Nma1-markierten Mikrotubuli in der Prophase war Rab5a unabhängig von Vps3 mit den Mikrotubuli assoziiert. Während Rab5a jedoch im Wildtyphintergrund während der Metaphase und der beginnenden Spindelelongation in der Anaphase nicht mit der Mitosespindel lokalisierte, war Rab5a im  $\Delta vps3$ -Hintergrund durchgängig mit der Spindel assoziiert. Möglicherweise hat die Abwesenheit von Rab5a während dieser Phasen eine regulatorische Funktion, denn im  $\Delta vps3$ -Hintergrund begann die Spindel noch in der Tochterzelle mit der Ausbildung von astralen Mikrotubuli. Die Ausbildung der astralen Mikrotubuli erfolgt für gewöhnlich erst nach der Passage des Sprosshalses und der Verteilung der Spindelpole auf Mutter- und Tochterzelle. Im  $\Delta vps3$ -Hintergrund elongierte die Spindel weitestgehend in der Tochterzelle und wanderte erst zu einem späteren Zeitpunkt in die Mutterzelle ein. Trotz der unstimmgigen Zeitabläufe während der Spindelelongation durch die Deletion von *vps3* entstand keine fehlerhafte Zellkernverteilung. Die Sporidien mit  $\Delta vps3$ -Hintergrund zeigten jedoch den bereits in Vorarbeiten beschriebenen Zytokinesedefekt (vgl. Schneider, 2016). Die beobachteten Auswirkungen der *vps3*-Deletion auf die Mitosespindel und die kontinuierliche Lokalisierung von Rab5a an der Spindel könnten im Zusammenhang einer regulatorischen Funktion stehen. Eine zeitliche und mitosephasenabhängige Steuerung der Zellteilungsabläufe erfolgt über verschiedene Zellzykluskontrollpunkte und die regulatorische Wirkung von zellzyklusspezifischen Proteinen (zusammengefasst in Lemmens und Lindqvist, 2019). Ein denkbarer Mechanismus wäre ein Transport von zellzyklusregulierenden Proteinen durch Rab5a-positive Endosomen zur Überwindung des Spindelkontrollpunktes, welcher die korrekte Anheftung der Spindelmikrotubuli an den Kinetochoren überprüft (vgl. Serio *et al.*, 2011). Ebenfalls denkbar wäre eine Funktion bei der Entfernung von Proteinen, um den Spindelkontrollpunkt zu überwinden. Beispielsweise akkumulieren in Humanzellen die Kontrollproteine Mad und Bub an nicht angehefteten Kinetochoren, um zu verhindern, dass die Chromosomenverteilung

## Diskussion

eingeleitet wird bevor alle Chromosomen korrekt angeordnet vorliegen. Nach Entfernung von Mad und Bub wird der APC/C (*anaphase promoting complex*) aktiviert und initiiert die Trennung der Schwesterchromatiden (zusammengefasst in Petsalaki *et al.*, 2018). Rab5a könnte für die Entfernung der Kontrollpunktproteine zuständig sein, so dass die folgende Mitosephase eingeleitet wird. Im Anschluss erfolgt während der frühen Anaphase im Wildtyphintergrund die Elongation der Spindel ohne Rab5a-Beteiligung, um die Ausbildung von ersten astralen Mikrotubuli durch eine erneute Rekrutierung der Rab5a-Endosomen an die Spindel zeitlich zu steuern. Durch eine dauerhafte Assoziation der Rab5a-positiven Endosomen an die Mitosespindel werden Faktoren für die Ausbildung der astralen Mikrotubuli verfrüht freigesetzt, wodurch es zu der beobachteten Ausbildung von astralen Mikrotubuli bereits in der Tochterzelle kommen könnte. Beispiele für eine zellzyklusgesteuerte Regulation im Zusammenhang mit einer GTPase und der Ausbildung von astralen Mikrotubuli sind aus *S. cerevisiae* bekannt. Dabei wird die Nukleation von astralen Mikrotubuli durch Spindelkontrollpunkte überwacht. Damit die Mitose abgeschlossen werden kann, muss die GTPase Tem1p (*termination of m phase*) durch das spindelpolkörperassoziierte Protein Nud1p rekrutiert werden, um durch die Aktivierung von Cdc15 (*cell division cycle*) dieses von den Spindelpolkörpern zu entfernen und die Ausbildung der astralen Mikrotubuli zu ermöglichen (Gruneberg *et al.*, 2000).

### 4.4.4. Die fehlende Rekrutierung von Rab5a-Endosomen an die Spindel in Abwesenheit von Nma1 wird durch Rab5b-Endosomen ausgeglichen

Im  $\Delta nma1$ -Hintergrund wurde eine Misslokalisierung von Rab5a-positiven Endosomen während der mitotischen Teilung beobachtet (vgl. Abb. 64). Dennoch hatte die ausbleibende Rekrutierung von Rab5a-positiven Endosomen an die Spindelpole keine Auswirkung auf die Mitosespindel oder die Zytokinese. Bei Analysen der Rab5-GTPasen in *U. maydis* während filamentöser Wachstumsvorgänge wurde eine partielle Funktionsübernahme von Rab5b im  $\Delta rab5a$ -Hintergrund beobachtet (vgl. Kapitel 3.1.5). Im Wildtyphintergrund war Rab5b nicht in aktiver Form an der Kondensierung des Mikrotubuli-Zytoskeletts, der Spindelbildung oder der Spindelelongation beteiligt. Eine Rekrutierung von Rab5b-positiven Endosomen an die Mitosespindel erfolgte im Wildtyphintergrund erst bei der Ausbildung von astralen Mikrotubuli in der Telophase. In Abwesenheit von Nma1 und damit resultierender



Abwesenheit von Rab5a an der Spindel, wurden Rab5b-Signale bei der Kondensierung des Mikrotubulizytoskeletts in der Prophase beobachtet (Abb. 66). Außerdem erfolgte eine Rekrutierung von Rab5b-positiven Endosomen an die Spindelpole bereits in frühen Phasen der Spindelelongation in der Anaphase. Rab5b war im  $\Delta nma1$ -Hintergrund mit dem Spindelpol in der Mutterzelle assoziiert, nachdem dieser den Sprosshals passiert hatte. Im späteren Verlauf der Spindelelongation wurden Rab5b-Signale an beiden Spindelpolen beobachtet. Der zeitliche Ablauf der Rekrutierung von Rab5b-positiven Endosomen an die Spindelpole im  $\Delta nma1$ -Hintergrund entspricht etwa dem Muster, mit dem Rab5a im Wildtyphintergrund mit den Spindelpolen assoziiert ist. Dadurch kann von einer Funktionsübernahme der Rab5b-positiven Endosomen an der Spindel bei mangelnder Rekrutierung der Rab5a-Endosomen ausgegangen werden. Da Rab5b-Endosomen im Wildtyphintergrund nicht aktiv mit der Spindel assoziiert sind, deutet dies darauf hin, dass die Nma1-involvierte Rekrutierung spezifisch mit Rab5a-positiven Endosomen abläuft. Im Falle der Abwesenheit von Nma1 könnte möglicherweise ein anderes Protein mit SMC-Domäne dessen Funktion übernehmen, welches jedoch statt für Rab5a eine Spezifität für Rab5b zeigt. Ebenfalls interessant wäre zu untersuchen, ob die Komponenten des CORVET-Komplexes, welche im Wildtyphintergrund mit den Spindelpolen und Nma1 lokalisieren (vgl. Abb. 60), in der *nma1*-Deletion vergleichbar mit Rab5a in der Spindelassoziiierung beeinträchtigt sind (vgl. Abb. 64). Obwohl Rab5b während filamentöser Wachstumsprozesse auch unabhängig von Rab5a mit den CORVET-Untereinheiten auf Endosomen lokalisiert (vgl. Abb. 42), ist im Wildtyphintergrund nur Rab5a, jedoch nicht Rab5b mit den Spindelpolen, und damit mit dem CORVET-Komplex, assoziiert (vgl. Abb. 61/Abb. 62). Möglicherweise wird diese Spezifität über Nma1 vermittelt. Die Lokalisierung von CORVET-Untereinheiten und Rab5b im  $\Delta nma1$ - und  $\Delta rab5a$ -Hintergrund, während der mitotischen Teilung, könnte zum Verständnis dieses Mechanismus beitragen.

#### 4.4.5. Rab5a-Endosomen stabilisieren die Mitosespindel

Die Funktion von Rab5a-positiven Endosomen an der Mitosespindel zeugt durch Etablierung eines Notfallmechanismus für den Funktionserhalt bei fehlender Rekrutierung der Rab5a-positiven Endosomen im  $\Delta nma1$ -Hintergrund durch Rab5b für

## Diskussion

dessen Relevanz (vgl. Abb. 66). Bei der Spindelelongation im  $\Delta rab5a$ -Hintergrund traten bereits vor der Passage des Sprosshalses erste astrale Mikrotubuli auf (Abb. 67 + Abb. 68). Weil die Ausbildung der ersten astralen Mikrotubuli bereits erfolgte, solange sich die Spindel noch vollständig in der Tochterzelle befand, war die Spindel bei Ausbildung der ersten astralen Mikrotubuli im  $rab5a$ -Deletionshintergrund kürzer als im Wildtyphintergrund. Durch die  $rab5a$ -Deletion migrierten die Spindeln erst mit zunehmender Länge durch den Sprosshals. Nachdem die Spindel im  $\Delta rab5a$ -Hintergrund den Sprosshals durchquert hatte, waren Pendelbewegungen des Spindelpols und wellenförmige Krümmungen in der Mitte der Spindel sichtbar. Insgesamt war die Dauer der Spindelelongation durch die beobachteten Stabilitätsprobleme im  $\Delta rab5a$ -Hintergrund verlängert. In der Literatur wird im Zusammenhang mit der Spindel, vergleichbar mit der Zellkernhülle, von einer Spindelhülle gesprochen. Dieses Membransystem wird durch die endozytotische Maschinerie aufgebaut, umgibt die Spindel und sorgt einerseits für die Anreicherung wichtiger Proteine an der Spindel, bietet gleichzeitig jedoch auch mechanische Unterstützung. Durch diese mechanische Unterstützung wird die Spindelstruktur stabilisiert und in der Orientierung unterstützt (zusammengefasst in Capalbo, 2015). In *D. melanogaster*-Zellen wurde beobachtet, dass durch die Deletion von  $rab5$  zwar die Anheftung der Kinetochormikrotubuli an die Chromosomen beeinträchtigt wird, die Zellen dennoch den Anaphasekontrollpunkt überwinden und mit der Mitose fortfahren konnten. Durch die Schwierigkeiten bei der Chromosomenanheftung war die Mitose jedoch verzögert (Capalbo *et al.*, 2011). Auch in *U. maydis* konnte in  $\Delta rab5a$ -Zellen das Vollenden der Mitose beobachtet werden, jedoch eine insgesamt verlängerte Dauer nachgewiesen werden, was einerseits auf die Stabilitätsprobleme der Mitosespindel, andererseits jedoch auch auf eine verzögerte Erfüllung der Spindelkontrollpunkte rückzuführen sein kann.

Nach den Beobachtungen, dass Rab5b das Fehlen von Rab5a an der Spindel durch die  $nma1$ -Deletion kompensieren kann (vgl. Abb. 66), war im  $rab5a$ -Deletionshintergrund die Spindelelongation dennoch beeinträchtigt. Da die Doppeldeletion von  $rab5a$  und  $rab5b$  letal ist (vgl. Kapitel 3.1.3), war zu erwarten, dass die überlebensnotwendigen Funktionen bei Abwesenheit von Rab5a von Rab5b kompensiert werden können. Während im Wildtyphintergrund keinerlei Assoziierung von Rab5b mit dem kondensierenden Mikrotubulizytoskelett in der Prophase identifiziert werden konnte, war Rab5b in Abwesenheit von Rab5a dauerhaft mit den

Enden der kondensierenden Mikrotubuli lokalisiert (Abb. 69). Auch im Laufe der Metaphase, während der im Wildtyphintergrund weder Rab5a noch Rab5b an der Spindel lokalisiert sind, blieb Rab5b im  $\Delta rab5a$ -Hintergrund mit den Mikrotubuli assoziiert und begleitete die Spindel kontinuierlich. In initialen Spindel elongationsphasen zeigte die Spindel im  $\Delta rab5a$ -Hintergrund Orientierungsschwierigkeiten und änderte mehrmals die Richtung, bevor sie sich parallel zur Zellwand anordnete und die Elongation fortsetzte. Auch während dieser initialen Elongationsphase sind im Wildtyphintergrund keine frühen Endosomen mit der Spindel assoziiert. Wie bereits in Kapitel 4.4.3 diskutiert, könnte die zyklusphasenabhängige Rekrutierung von frühen Endosomen an die Spindel eine regulatorische Funktion erfüllen und beispielsweise Einfluss auf die Mitosekontrollpunkte haben. Erneut konnte im  $\Delta rab5a$ -Hintergrund die Ausbildung von ersten astralen Mikrotubuli bereits vor dem Passieren des Sprosshalses beobachtet werden. Während sich der Spindelpol im Sprosshals befand, wurden die astralen Mikrotubuli verlängert und die Spindel verteilte sich nach Passage des Sprosshalses auf zwei angrenzende Zellen. Durch den Zytokinesedefekt der *rab5a*-Deletion (vgl. Abb. 17) konnten sich die Sporidien nach der Zellteilung nicht voneinander separieren. Die Ausdehnung der Spindel auf insgesamt drei Zellen zeigt auch eine fehlerhafte Abtrennung des Zytoplasmas der Tochterzellen. Für die vollständige Separierung von *U. maydis*-Zellen ist das Einbringen von zwei Septen am Sprosshals notwendig (Weinzierl *et al.*, 2002). Durch diese beiden Septen kann die endgültige Separierung der Zellen durch Lyse der verbindenden Zellwände erfolgen (O'Donnell und McLaughlin, 1984). Die beobachtete Verteilung der Mitosespindel in  $\Delta rab5a$ -Zellen impliziert jedoch, dass die Zellen bereits Schwierigkeiten haben das Primärseptum auszubilden (vgl. Abb. 69). Da das Primärseptum von der Mutterzelle ausgehend gebildet wird (Weinzierl *et al.*, 2002), könnten durch die Verbindung mehrerer Zellen möglicherweise Identitätsprobleme entstehen, so dass keine eindeutige Mutterzelle die Abtrennung einleitet. Ausgehend von der Beobachtung, dass die Zellen mit Zytokinesedefekt jedoch keine flächendeckenden Zellketten bilden, sondern Ansammlungen mehrerer aneinanderhängender Zellen, ist davon auszugehen, dass die Zellen in reduziertem Maße dennoch in der Lage sind Septen auszubilden und sich abzutrennen. Das Färbemittel Calcofluor White reagiert spezifisch mit Chitin, wodurch die Zellwand und Septen visualisiert werden können (Roncero und Duran, 1985). Unter Zuhilfenahme von Calcofluor White kann in

## Diskussion

folgenden Arbeiten quantifiziert werden, zu welchen Anteilen die Zellen mit  $\Delta rab5a$ -Hintergrund kein Septum, nur das Primärseptum oder Primär- und Sekundärseptum ausbilden können. In Kapitel 4.4.1 wurde die Rolle der frühen Endosomen für den Transport von wichtigen Proteinen für die Zytokinese bereits diskutiert.

Neben Rab5a-positiven Endosomen wurden in Vorarbeiten auch Yup1-positive Endosomen an der Mitosespindel beobachtet (Obhof, 2017). In Wildtyp-Zellen war Yup1 während der gesamten Spindelelongation an den Spindelpolen lokalisiert und zeigt endosomale Motilität entlang der astralen Mikrotubuli, sobald diese in der Telophase ausgebildet wurden. Durch sämtliche Mitosephasen hinweg waren zusätzliche punktuelle Lokalisierungen von Yup1 im Zytoplasma zu beobachten (Obhof, 2017). Im  $\Delta rab5a$ -Hintergrund konnte zu keinem Zeitpunkt der mitotischen Teilung eine Assoziation von Yup1 mit der Mitosespindel identifiziert werden (Abb. 70). Daher ist davon auszugehen, dass Yup1 lediglich durch die gemeinsame Lokalisierung mit Rab5a auf frühen Endosomen über die Rekrutierung von Rab5a an der Spindel vorkommt und keine spezifische Mitosefunktion erfüllt. Wie bereits durch die Koloalysierung von Rab5a, Rab5b und Yup1 analysiert (vgl. Abb. 21/ Abb. 29) liegen in *U. maydis* verschiedene Populationen an frühen Endosomen vor, die eine unterschiedliche Zusammensetzung der Endosomenmarker enthalten und möglicherweise verschiedene Funktionen erfüllen können. Im  $\Delta rab5a$ -Hintergrund konnten ebenfalls während sämtlicher Mitosephasen Yup1-Signale auf statischen ringförmigen Strukturen im Zytoplasma beobachtet werden (Abb. 70). Die Lokalisierung von Yup1 wurde anteilig auf den frühen Endosomen, jedoch auch anteilig an den Vakuolen beschrieben (Wedlich-Söldner *et al.*, 2000). Durch die Deletion von *rab5a* könnte die Lokalisierung auf den frühen Endosomen beeinträchtigt werden, so dass sich die Yup1-Proteine überwiegend an den Vakuolenmembranen sammeln. Hinweise auf die Beeinträchtigung von Yup1 durch die Deletion von *rab5a*, während filamentöser Wachstumsprozesse, konnten bereits beobachtet werden. Dabei sammelten sich Yup1-positive Endosomen an den Zellpolen und zeigten eine reduzierte Motilität (vgl. Abb. 30 und Bielska *et al.*, 2014b).

#### 4.4.6. Die Deletion von *rab5b* hat keinen Einfluss auf die mitotische Teilung

Die bereits diskutierten Zusammenhänge zwischen Rab5a und Rab5b sprechen für eine regulatorische Abstimmung zwischen den Funktionen der beiden GTPasen während Zellteilungsvorgängen. Gemeinsame Lokalisierungen von Rab5a und Rab5b während der Ausbildung der astralen Mikrotubuli an der Mitosespindel (vgl. Abb. 61/ Abb. 62) oder an der Zytoplasmabrücke zur Einleitung der Zytokinese (vgl. Abb. 63) deuten auf eine gemeinsame Funktion bei diesen Prozessen hin. Gleichzeitig konnte auch ein Einfluss von Rab5a auf Rab5b beobachtet werden. Eine konstitutive Aktivierung von Rab5a verdrängte Rab5b von der Zytokinesebrücke (vgl. Abb. 71), während ein Fehlen von Rab5a ein Notfallprogramm bei Rab5b auslöste, wodurch dieses entweder dauerhaft ( $\Delta rab5a$ ) oder zu den für Rab5a üblichen Phasen ( $\Delta nma1$ ) mit der Spindel assoziiert war (vgl. Abb. 66/ Abb. 69). Die Deletion von *rab5b* beeinträchtigte dagegen die Lokalisierung von Rab5a während der Mitose nicht (Abb. 72). Dies spiegelte die gegenseitige Einflussnahme der beiden Rab5-GTPasen während filamentöser Wachstumsprozesse wider. Auch im Filament hatte die Deletion von *rab5b* keinen Einfluss auf Rab5a, während die Deletion von *rab5a* Rab5b massiv beeinträchtigte (vgl. Abb. 22). Ergänzend konnte auch kein Einfluss von Rab5b auf die Assoziation von Nma1 mit der Mitosespindel, die Elongation der Spindel, das Abstreifen der Zellkernhülle oder die Rekonstitution der Zellkernhülle aus dem ER (Abb. 73/ Abb. 74) beobachtet werden.

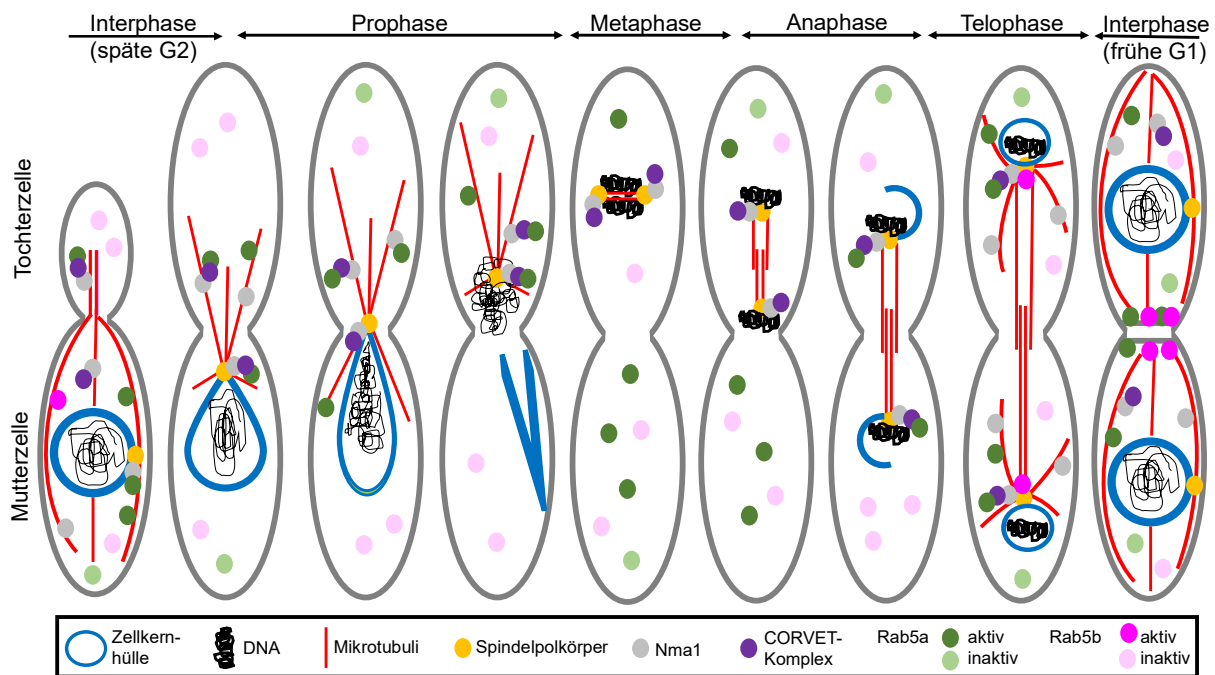
Für SMC-Proteinkomplexe ist beispielsweise bekannt, dass für die grundsätzlich ähnlichen aber doch spezifisch unterschiedlichen Prozesse der Mitose und Meiose oft nah verwandte Proteine zum Einsatz kommen. Mit der Verwendung von verschiedenen Proteinen für Mitose und Meiose wird jedoch die Spezifität des Prozesses gewährleistet. Dadurch kann die Bildung von meiosespezifischen Chromosomenstrukturen wie dem synaptonemalen Komplex ermöglicht werden, um eine Rekombination der DNA durchzuführen. Da für die Rekombination der DNA die Chromosomenstruktur auf eine andere Weise zugänglich sein muss als für eine mitotische Separierung der Schwesterchromatiden, besteht beispielsweise der Cohesin-Komplex in der Mitose oder der Meiose aus verschiedenen, jedoch strukturell ähnlichen Proteinen (zusammengefasst in Jessberger, 2003). Aufgrund der beobachteten funktionellen Interaktion zwischen Rab5a und dem SMC-Domänen Protein Nma1 während der mitotischen Teilung (vgl. Abb. 64), wäre eine denkbare

## Diskussion

meiosespezifische Variation, dass Rab5b stattdessen Funktionen bei der Meiose übernimmt. Die Funktion von Rab5b während der Meiose wird im folgenden Kapitel 4.5 diskutiert.

### 4.4.7. Nma1 und die frühen Endosomen unterstützen die Mitosespindel

Während im Übergang von der Interphase in die Prophase das Mikrotubulizytoskelett kondensiert, um den Spindelpolkörper gemeinsam mit den Chromosomen in die Tochterzelle zu transportieren und die Zellkernhülle abzustreifen, sind Nma1, der CORVET-Komplex und Rab5a mit den Mikrotubuli assoziiert (Abb. 88). Nma1 sorgt über den CORVET-Komplex für eine gesteuerte Rekrutierung von Rab5a. In der Metaphase kommt es zur Separierung der Chromosomen und einer Verdopplung des Spindelpolkörpers. Dieser ist weiterhin mit Nma1 und dem CORVET-Komplex lokalisiert, während Rab5a auf statischen punktuellen Strukturen im Zytoplasma detektierbar ist. Die frühe Spindelelongation in der Anaphase transportiert und separiert die Spindelpolkörper und die DNA auf die beiden Zellen. Nma1 und der CORVET-Komplex bleiben auch während der Spindelelongation mit den Spindelpolkörper assoziiert. Die Abwesenheit von Rab5a während dieses Prozesses scheint eine regulatorische Funktion zu erfüllen, welche sich auf die Zellzykluskontrollpunkte ausüben könnte. Während in der späten Anaphase im Übergang zur Telophase die Zellkernhüllen um die beiden separierten Chromosomensätze rekonstituiert werden, ist neben Nma1 und dem CORVET-Komplex erneut Rab5a an den Spindelpolkörpern lokalisiert. Denkbar ist hier eine Funktion von Rab5a-Endosomen bei der Versiegelung der Zellkernhüllen und der Disassemblierung der Mitosespindel. Nma1 ist an dieser Stelle involviert bei der Rekrutierung von Rab5a-positiven Endosomen an den Spindelpolkörper. Mit Ausbildung der astralen Mikrotubuli in der Telophase erfolgt eine Wiederaufnahme endosomaler Transportprozesse entlang dieser Mikrotubuli. In der Telophase ist neben Rab5a auch Rab5b an den Spindelpolen lokalisiert. Diese Lokalisierung von Rab5a und Rab5b könnte der Ausgangspunkt für den Transport an die Zytoplasmabrücke für die Zytokinese darstellen. Rab5a und Rab5b markieren dort die Pole der Zellen und liefern notwendige Proteine für die Septierung und damit für die Abtrennung der Zellen.



**Abb. 88: Die Mitose wird durch Nma1 und die frühen Endosomen unterstützt**

Im Übergang von der Interphase (späte G2) in die Prophase kondensiert das Mikrotubulizytoskelett (rot), transportiert den Spindelpolkörper (orange) und die genomische DNA in Form der Chromosomen (schwarz) in die Tochterzelle und streift die Zellkernhülle (blau) ab. Währenddessen sind Nma1 (grau), der CORVET-Komplex (lila) und Rab5a (grün) mit den Mikrotubuli assoziiert. Nma1 ist über die Bindung an den CORVET-Komplex in die Rekrutierung von Rab5a involviert. In der Metaphase werden die kondensierten Chromosomen separiert und der Spindelpolkörper verdoppelt. Dieser lokalisiert weiterhin mit Nma1 und dem CORVET-Komplex, während sich Rab5a auf statischen punktuellen Strukturen im Zytoplasma befindet. Während der frühen Spindelelongation in der Anaphase werden Spindelpolkörper und die DNA auf die beiden Zellen verteilt und sind weiterhin mit Nma1 und dem CORVET-Komplex verbunden. In der späten Anaphase erfolgt die Neubildung der Zellkernhüllen um die beiden separierten Chromosomensätze, an welchen neben Nma1 und dem CORVET-Komplex erneut Rab5a mit den Spindelpolkörpern lokalisiert. Nma1 rekrutiert die Rab5a-positiven Endosomen an den Spindelpolkörper. Mit Ausbildung der astralen Mikrotubuli in der Telophase können endosomale Transportprozesse entlang der astralen Mikrotubuli wiederaufgenommen werden. In der Telophase ist neben Rab5a auch Rab5b (magenta) an den Spindelpolen lokalisiert. Rab5a und Rab5b lokalisieren für die Zytokinese an der Zytoplasmabrücke zwischen den Zellpolen von Mutter- und Tochterzelle. Abb. modifiziert nach (Straube *et al.*, 2005).

### 4.5. Rab5b ist für die genomische Stabilität während der Meiose in *U. maydis* notwendig

Die Colokalisierung von Rab5a und Rab5b an der Zytoplasmabrücke während der Zytokinese nach der Mitose (vgl. Abb. 63) legt eine Funktion der Rab5-GTPasen bei Zellteilungsvorgängen nahe. Für Rab5a konnte gleichzeitig eine Lokalisierung an den Polen der Mitosespindel beobachtet werden (vgl. Abb. 61). Ein Funktionsverlust von Rab5a beeinträchtigte die Separierung der Zellen nach der Zytokinese und die Stabilität der Mitosespindel (vgl. Abb. 68). Die Deletion von *rab5b* hatte dagegen keinen Effekt auf die mitotische Teilung oder die Zytokinese (vgl. Abb. 74). Eine Auswirkung auf meiotische Teilungen konnte nur für Rab5b analysiert werden, da für die Bildung von diploiden Sporen, die bei Auskeimung dann die Meiose durchlaufen, eine Pflanzeninfektion notwendig ist (Christensen, 1963, Steinberg und Perez-Martin, 2008) und die Virulenz der *rab5a*-Mutanten so reduziert ist, dass keine Sporen gebildet werden (vgl. Abb. 19).

#### 4.5.1. Rab5b ist für die korrekte genetische Aufspaltung der Meioseprodukte notwendig

Nach der Meiose der entstandenen Sporen aus der Infektion mit Wildtypstämmen wurde die erwartete gleichmäßige Verteilung der möglichen Paarungstypgenkombinationen in den entstehenden Sporidien gefunden (Abb. 75). Die Sporidien, die durch die Meiose einer Kreuzung von  $\Delta rab5b$ -Stämmen hervorgegangen waren ( $\Delta rab5b^M$ -Stämme) konnten ohne Kreuzungspartner Filamente ausbilden, vergleichbar zum diploiden Wildtyp FBD11, der die *a*- und *b*-Kreuzungstyp-Gene in jeweils unterschiedlichen Allelen trägt (Banuett und Herskowitz, 1989). In Kreuzungen mit haploiden Stämmen zeigten die  $\Delta rab5b^M$ -Stämme eine unregelmäßige Kolonienmorphologie, bei der Bereiche der Kolonie mit Myzel bedeckt waren, während andere Bereiche derselben Kolonie kein Myzel ausbildeten. Diploide Stämme, die in einem der Paarungstypgene homozygot vorliegen, können nur mit Referenzstämmen, die zu diesem Paarungstypgen kompatibel sind, Filamente bilden. Das andere, heterozygot vorliegende Paarungstypgen, kann dagegen unabhängig von dem dazugehörigen Allel des Kreuzungspartners zum filamentösen Wachstum beitragen



(Banuett und Herskowitz, 1989). Die entstandene ungleichmäßige Kolonienmorphologie bei den durchgeführten Rückkreuzungsexperimenten lässt darauf schließen, dass die Sporidien (a) diploid sind und (b) die Kombination der Kreuzungstyp-Allele offensichtlich instabil ist. Innerhalb einer Kultur kommen verschiedene Kombinationen an hetero- und homozygoten Paarungstypallelen in Stämmen mit diploiden Chromosomensätzen vor.

Die  $\Delta rab5b^M$ -Stämme, deren Kreuzungsverhalten auf den *a1b1* Genotyp rückschließen ließ, müssen nicht zwangsläufig haploid sein, sondern könnten ebenfalls homozygot in beiden Paarungstypgenloci und damit diploid (*a1a1b1b1*) sein. Stämme mit einem solchen Genotyp zeigen das gleiche Kreuzungsverhalten bei Rückkreuzungen mit Referenzstämmen, wie ein haploider Stamm mit *a1b1* (Banuett und Herskowitz, 1989). Eine Entstehung der unregelmäßigen Kolonienmorphologie durch Mischkulturen von Stämmen verschiedener Genotypen wurde durch Vereinzelausstriche ausgeschlossen. Innerhalb dieser kurzen Inkubationszeit wurden auf Grundlage von Kulturen aus einzelnen Zellen Variationen in der Morphologie beobachtet. Dies bestätigte, dass der ungleichmäßige Kolonienphänotyp der  $\Delta rab5b^M$ -Meioseprodukte auf eine Instabilität in den Paarungstypgenen zurückzuführen ist. Ob speziell die Paarungstypgene beeinträchtigt sind oder generelle Probleme bei der Zellteilung vorliegen, wird nachfolgend diskutiert.

#### 4.5.2. Die Meioseprodukte von $\Delta rab5b$ -Stämmen sind in der Zellteilung beeinträchtigt

Die instabilen  $\Delta rab5b^M$ -Stämme zeigten einen Zytokinesedefekt in Flüssigkultur, bei welchem keine Abtrennung der Tochterzellen erfolgte (Abb. 76). Dieser Zytokinesedefekt unterschied sich jedoch morphologisch von dem durch die Deletion von *rab5a* verursachten Zytokinesedefekt (vgl. Abb. 17). Statt wie in  $\Delta rab5a$  beobachteten Zellketten, wurde in  $\Delta rab5b^M$ -Stämmen die Ausbildung von mehreren Knospen an derselben Mutterzelle beobachtet. Gleichzeitig konnte die Initiation von filamentösen Wachstumsprozessen ohne externen Stimulus in Flüssigkultur beobachtet werden. Der diploide Wildtyp FBD11 zeigte dagegen das für *U. maydis* übliche Teilungsverhalten mit einer unipolaren Abknospung und anschließender Separierung von Mutter- und Tochterzelle (zusammengefasst in Christensen, 1963).

## Diskussion

Während die Mitose in einem diploiden Wildtyp, wie für die haploiden Sporidien bekannt, mit einer Kondensierung des Mikrotubulizytoskeletts und einer anschließenden Elongation der Mitosespindel bis zur Ausbildung der astralen Mikrotubuli in Mutter- und Tochterzelle, ablief, zeigten sich in den instabilen  $\Delta rab5b^M$ -Stämmen bereits in der Interphase quervernetzte und verkürzte Mikrotubuli und Beeinträchtigungen bei der Mitosespindel (Abb. 77). Nach Abschluss der Teilung enthielten einige Zellen kein fluoreszenzmarkiertes Mikrotubulizytoskelett mehr. Dies kann entweder auf ein tatsächliches Fehlen des Mikrotubulizytoskeletts zurückzuführen sein, oder darauf, dass diese Zelle bei der Verteilung der Chromosomen das Allel ohne die integrierte Fluoreszenzmarkierung erhalten hat. Eine Verteilung der Mitosespindel auf mehrere Zellen wurde auch bei der Mitose von  $\Delta rab5a$ -Zellen beobachtet (vgl. Abb. 69). Die Mitosespindel im haploiden  $\Delta rab5b$ -Hintergrund bei Stämmen, welche durch ein Transformationsereignis statt durch eine Meiose entstanden, war unbeeinträchtigt (vgl. Abb. 73). Daraus lässt sich schließen, dass die morphologischen Änderungen durch Rab5b-abhängige Prozesse während der Meiose, die unter anderem dazu führen, dass diploide (statt haploider) Meioseprodukte entstehen.

Aus der Literatur sind im Allgemeinen Tendenzen bekannt, dass haploide Genome stabiler sind als diploide. Dies zeigt sich beispielsweise in der Anfälligkeit gegenüber Replikationsstress, welcher aufgrund des Ploidiegrad-spezifischen Reparatursystems lediglich in diploiden Stämmen von *S. cerevisiae* zu genomischer Instabilität und einer Reduktion der Viabilität führt (Li und Tye, 2011). Insbesondere die Fehlverteilung eines einzelnen Chromosoms löst Replikationsstress an den Telomeren aus und führt zu genomischer Instabilität (zusammengefasst in Passerini und Storchova, 2016). Damit erscheint es wahrscheinlich, dass die *rab5b*-Deletion zu chromosomalen Fehlverteilungen während der Meiose führt, und dass in Folge der aneuploide Status der Zellen die Ursache für die mitotische Instabilität ist. Auch der hohe Anteil an toten Zellen in den Kulturen der  $\Delta rab5b^M$ -Stämme spricht für eine genomische Instabilität, da eine ungleichmäßige Verteilung der Chromosomen bei der Mitose letal sein kann (Abb. 78). Durch den hohen Anteil an letalen Ereignissen bei der Teilung erklärt sich ebenfalls die reduzierte Wachstumsrate der  $\Delta rab5b^M$ -Kulturen (Abb. 79). Interessanterweise wurde ein Teil der  $\Delta rab5b^M$ -Zellen sowohl durch den Lebendfarbstoff (CMAC) als auch durch den für tote Zellen spezifischen Farbstoff (PI) gefärbt, was auf zusätzliche Membranveränderungen hinweisen könnte (Abb. 78)

(Kirchhoff und Cypionka, 2017, Rosenberg *et al.*, 2019, Hur *et al.*, 2018, Davey und Hexley, 2011, Yang *et al.*, 2015, Yang *et al.*, 2019).

#### 4.5.3. Die Instabilität von $\Delta rab5b$ -Meioseprodukten ist auf den Verlust von chromosomalen Abschnitten zurückzuführen

Die beobachtete Instabilität in der Koloniemorphologie von  $\Delta rab5b$ -Meioseprodukten (vgl. Abb. 74), die Schwierigkeiten bei Zellteilungsprozessen (vgl. Abb. 76), die erhöhte Anzahl an toten Zellen (vgl. Abb. 77) und die daraus resultierende reduzierte Wachstumsrate (vgl. Abb. 78) implizieren Fehlverteilungen von Chromosomen bei der mitotischen Teilung. Tatsächlich konnte durch RT-PCR eine Reduktion der Kopiezahl von Genen verifiziert werden, welche sich auf den großen Chromosomen 1, 2 oder 5 befinden (Abb. 80). Dabei ist zu berücksichtigen, dass jeweils Zellkulturen für die Analyse verwendet wurden; eine Abnahme zeigt, dass ein Teil der Zellen der Kultur die entsprechenden genomischen Bereiche verloren haben. Zu den untersuchten Genen gehören auch die Paarungstyploci, welche für die, auf filamentösen Wachstumsprozessen basierende Koloniemorphologie auf Aktivkohle, verantwortlich sind (vgl. Abb. 75). Gleichzeitig konnte auch ein Verlust von Genen, welche auf den kleinen Chromosomen 21 und 22 lokalisiert sind, identifiziert werden (Abb. 80). In einer Zeitreihe (Abb. 81) konnte gezeigt werden, dass Chromosomenbereiche innerhalb kurzer Zeitspannen verloren gehen. Dabei wurden jedoch sowohl Verluste von Genen als auch Anreicherungen beobachtet. Dieses Schema war in einigen untersuchten Fällen konsistent für alle untersuchten Gene eines Chromosoms, sodass sämtliche Gene eine vergleichbare Mengenzu- oder -abnahme verzeichneten. Dies würde für den Verlust von vollständigen Chromosomen sprechen. In einigen Fällen ergaben sich jedoch auch gegensätzliche Tendenzen, bei denen manche Bereiche des Chromosoms angereichert zu sein schienen, während andere eine Reduktion zeigten. Dies spricht für den Verlust von Chromosomenbereichen. Um das gesamte Genom abzudecken und Aussagen über Fehlverteilungen von vollständigen Chromosomen oder Verlusten von Chromosomenstücken treffen zu können, erfolgte eine Sequenzierung der genomischen DNA (Abb. 81/Abb. 82/Abb. 83). Dabei konnte bestätigt werden, dass die  $\Delta rab5b^M$ -Stämme vollständige Chromosomen verlieren und anschließend nur noch in einfacher Ausführung vorliegen haben. Auch wurden Chromosomen in dreifacher Kopiezahl beobachtet. Diese Abweichungen zu einem

## Diskussion

diploiden Chromosomensatz, in Kombination mit den übrigen Chromosomen, welche in  $2n$  vorliegen, zeigt die Aneuploidität der  $\Delta rab5b^M$ -Stämme. Neben den Verlusten von vollständigen Chromosomen konnten auch Deletionen einzelner Chromosomenbereiche bestätigt werden.

Für *S. cerevisiae*-Zellen wurde beschrieben, dass Zellen, die ein einzelnes Chromosom verloren haben, zunehmend aneuploid werden (Heasley *et al.*, 2020). Kommt es in *S. cerevisiae* oder *Schizosaccharomyces pombe* zu einem aneuploiden Chromosomensatz, so erfolgen zahlreiche Rekombinationsereignisse. Dabei können einzelne Chromosomen in zusätzlicher Kopienzahl entstehen. Es erfolgen auch Verluste von Chromosomen mit anschließender Duplikation, wodurch eine Heterozygotie in Bezug auf dieses Chromosom verloren geht (Ajima *et al.*, 2002, Sheltzer *et al.*, 2011). Vergleichbare Resultate wurden auch in den  $\Delta rab5b^M$ -Stämmen in *U. maydis* beobachtet. Ergänzend wurden auch in *S. cerevisiae* und *S. pombe* als Folge von Aneuploidie ektopische Rekombinationen zwischen Chromosomen beschrieben, wodurch es zu Verlusten von Chromosomenbereichen kommt (Ajima *et al.*, 2002, Sheltzer *et al.*, 2011), wie es auch in den instabilen  $\Delta rab5b^M$ -Stämmen in *U. maydis* vorkam. Infolgedessen ist es denkbar, dass die entstandenen chimären Chromosomen in folgenden Zellteilungen mit geringerer Effizienz ihrem homologen Partnerchromosom zugeordnet werden können, was in weiteren Chromosomenverlusten resultiert.

Bei genomweiten Untersuchungen, um Gene zu identifizieren deren Verlust zu genomischer Instabilität führt, wurden in *S. cerevisiae* hauptsächlich Gene mit Funktionen bei DNA-Replikation und -Reparatur, Chromatinstruktur, Zellzykluskontrolle, stressinduzierte Gene oder Bestandteile von SMC-Komplexen identifiziert (Alabrudzinska *et al.*, 2011). Nachdem in *U. maydis* eine mitosespezifische Interaktion von Rab5a mit dem SMC-Domänen-Protein Nma1 gezeigt werden konnte (vgl. Abb. 64) und die SMC-Komplexe bekanntermaßen mitose- bzw. meiosespezifisch zusammengesetzt sind (zusammengefasst in Jessberger, 2003), kann eine Funktion von Rab5b anstelle von Rab5a mit einem anderen SMC-Protein während der Meiose spekuliert werden. Andere Analysen von Genen, deren Verlust in *S. cerevisiae* zur genomischen Instabilität führt, konnten auch Gene mit Funktionen in Proteinqualitätskontrollen, DNA-Metabolismus oder Transportprozessen identifizieren. Dabei konnte beschrieben werden, dass oftmals bereits einzelne genetische

Vorkommnisse bei Genen für besagte Proteingruppen eine genomischen Instabilität auslösen (Coelho *et al.*, 2019). Bei dieser genomweiten Studie konnten zwar nicht explizit die Rab5-GTPasen identifiziert werden, sondern hauptsächlich Proteine mit Funktionen in sekretorischen Stoffwechselwegen (Coelho *et al.*, 2019), jedoch verdeutlicht dies die Relevanz des vesikelbasierten Transportes. Die Endozytose nimmt in *S. cerevisiae* im Vergleich zu *U. maydis* eine untergeordnetere Rolle ein und auch Mutanten ohne alle drei Rab5-Isoformen sind vital (Singer-Krüger *et al.*, 1994). Auch der Phänotyp von  $\Delta ypt52$ -Mutanten, dem Homolog zu Rab5b ist unauffällig (Singer-Krüger *et al.*, 1994). Dagegen ist die Doppeldeletion von *rab5a* und *rab5b* in *U. maydis* letal, womit dennoch eine stabilisierende Funktion der Rab5-GTPasen vermutet werden kann.

Da der Effekt der *rab5b*-Deletion auf die genomische Stabilität jedoch ausschließlich in Zellen auftrat, nachdem diese die Meiose durchlaufen hatten und nicht in haploiden oder diploiden Zellen, die aus Transformationsereignissen entstanden waren (vgl. Abb. 78), ist von einer meiosespezifischen Funktion auszugehen. Durch den Funktionsverlust von Rab5b während der Meiose könnten erste Schwierigkeiten bei der Chromosomenverteilung eingetreten sein, die zu einer zunehmenden Instabilität des Genoms geführt haben und letztendlich in Aneuploidie resultierten. Um eine putative meiosespezifische Funktion von Rab5b einschätzen zu können, ist es relevant auf die Unterschiede zwischen der mitotischen und der meiotischen Zellteilung einzugehen. Während es bei der Mitose zu einer Separierung der Schwesterchromatiden kommt, ist die Meiose eine Reduktionsteilung, bei der in der Meiose I die homologen Chromosomen verteilt werden und in der Meiose II die Schwesterchromatiden. Während der Meiose I kommt es zur Rekombination des genetischen Materials. Dabei entstehen physikalische Verbindungen zwischen den homologen Chromosomen, sogenannte Chiasmata. Jedes Chiasma basiert auf einer Überkreuzung (*cross over*) der DNA-Stränge nach induzierten DNA-Doppelstrangbrüchen. Für die Auflösung der Chiasmata und die Reparatur der Doppelstrangbrüche müssen die homologen Bereiche gepaart werden. Fehler bei der Verarbeitung von Chiasmata bewirken eine falsche Segregation der Chromosomen und resultieren in Aneuploidie (zusammengefasst in Wang *et al.*, 2017).

Der überwiegende Teil von Verteilungsdefekten entsteht in der Meiose I (zusammengefasst in Wang *et al.*, 2017). Ein häufiger Fehler ist entweder die

## Diskussion

mangelnde Ausbildung von DNA-Überkreuzungen oder die Entstehung von Überkreuzungen in unmittelbarer Nähe zu den Zentromeren (zusammengefasst in Hall *et al.*, 2006). Zusätzlich gibt es auch Unterschiede bei der Orientierung der Chromosomen für die anstehende Separierung bei Meiose I, Meiose II und Mitose. In der Meiose I sind die Schwesterchromatiden in Richtung desselben Pols orientiert (monoorientiert), wodurch die Kinetochore in unmittelbarer Nachbarschaft lokalisiert sind, statt Rücken an Rücken, wie es bei der Meiose II oder der Mitose der Fall ist (biorientiert) (zusammengefasst in Touati und Wassmann, 2016). Bereits bei diesem Prozess wäre denkbar, dass bei einer fehlerhaften Anheftung der Kinetochore beide Chromosomensätze in die gleiche Zelle verpackt werden, statt sie auf beide Tochterzellen zu verteilen. Um die korrekte Orientierung in der Meiose I zu realisieren, sind oft mehrere Runden an Mikrotubulianheftungs- und -entfernungsprozesse notwendig. Für die Separierung der durch Chiasmata verbundenen homologen Chromosomen in Meiose I und das Verhindern der Separierung der Chromatiden, muss dennoch der Cohesin-Komplex, welcher die Chromosomen verbindet, aufgelöst werden. Die Entfernung der Cohesine muss so zielgerichtet erfolgen, dass die Verbindung der Schwesterchromatiden an den Zentromeren bestehen bleibt. Kommt es bei diesem Prozess zu Fehlern, werden bereits in der Meiose I die Schwesterchromatiden separiert, welche sich dann in der anschließenden Meiose II nicht mehr korrekt an den Spindelapparat anheften können und zufällig verteilt werden. Um das Cohesin phasenabhängig zu steuern, sind die Proteine, welche das Zentrosom zusammenhalten durch eine fehlende Phosphorylierung in der Meiose I vor einem Abbau geschützt. Für die Separierung in der Meiose II muss diese Phosphorylierung dann erfolgen, um die Cohesine für Abbauprozesse zugänglich zu machen (zusammengefasst in Touati und Wassmann, 2016). Auch bei einer fehlerhaften Regulation der Chromosomenseparierung durch die Auflösung der Cohesine könnte es dazu kommen, dass der diploide Chromosomensatz nicht auf beide Tochterzellen verteilt wird, sondern vollständig bleibt und die Reduktionsteilung fehlschlägt. Es wird vermutet, dass einzelne Chromosomen dennoch zufällig korrekt separiert werden, wodurch das Meioseprodukt einen aneuploiden Chromosomensatz enthält, welcher mit fortschreitenden Teilungen das Genom instabilisiert. Die instabilen  $\Delta rab5b^M$ -Stämme in *U. maydis* enthalten ein aneuploides Genom, in dem es einerseits zu Fehlverteilungen von vollständigen Chromosomen, jedoch auch zu Verlusten von Chromosomenbereichen kommt (vgl. Abb. 83/Abb. 84/Abb. 85). Denkbar für die

Verluste von Chromosomenbereichen wären Probleme bei der Auflösung von Chiasmata bei Rekombinationsereignissen. Eine Separierung der Chromosomen, bevor die physikalische Verbindung zwischen den Chromosomenbereichen aufgelöst ist, resultiert in Chromosomenbrüchen, Deletionen von Chromosomenbereichen und dem Verlust von Chromosomenarmen (zusammengefasst in Wang *et al.*, 2017).

Eine Beteiligung von endozytotischen Vesikeln bei der meiotischen Teilung wurde inzwischen in mehreren Organismen beschrieben. In *S. cerevisiae* ist das endosomenlokalisierte Ypt35 für die Rekrutierung von Vps13 an die Endosomen und Vakuolen zuständig. Vps13 ist wiederum dafür zuständig den meiosespezifischen Adapter Spo71 zu binden, um die Prosporenmembran zu erweitern und nach Abschluss der Meiose zu verschließen (Park *et al.*, 2013, Bean *et al.*, 2018). Für *Caenorhabditis elegans* wurde ein direkter Zusammenhang der Chromosomenstabilität mit Transportprozessen gezeigt. Ein Funktionsverlust der schweren Kette des keimbahnspezifischen Myosin-Motorproteins Atz-1 reduziert die Expression des meiotischen Cohesins REC-8, stört damit die Organisation und Aggregation der Chromosomen, die DNA-Replikation und führt zu embryonaler Letalität (Dawson *et al.*, 2017). In *Xenopus laevis* wird die Reifung der Oozyten durch membranständige Progesteronrezeptoren gesteuert. Oozyten sind in der Prophase von Meiose I arretiert und müssen zum Erlangen der Fruchtbarkeit reifen. Progesteron ist dabei zuständig für die Auflösung der Zellkernhülle, die Kondensierung der Chromosomen und einen Zellzyklusarrest in der Metaphase von Meiose II. Die progesteronvermittelte Reifung läuft dabei durch Membranrezeptoren im Zusammenspiel mit dem auf frühen Endosomen lokalisierten Rab5-Effektorprotein APPL1 ab. Dabei löst APPL1 die endosomenbasierte Internalisierung der Progesteronmembranrezeptoren aus und aktiviert die Kinase Akt2 um die Reifung zu initiieren (Miaczynska *et al.*, 2004, Nader *et al.*, 2020). Ein weiterer Zusammenhang zwischen der endosomenbasierten Internalisierung von Membranrezeptoren und der Meioseregulation in *X. laevis* konnte für den  $\text{Ca}^{2+}$  Sensor STIM1 und dessen Plasmamembrankanal Orai1 beobachtet werden. Durch die Internalisierung von Orai1 und der damit erfolgenden Entfernung von der Plasmamembran wird die Interaktion von STIM1 während der Meiose inhibiert um den Einstrom des  $\text{Ca}^{2+}$ -Signalmoleküls während der Metaphase zu inaktivieren (Yu *et al.*, 2009). Erste Zusammenhänge von Rab5B mit genomischer Instabilität im menschlichen Organismus konnten bei Patientinnen mit polyzystischem Ovarialsyndrom beobachtet werden. Dabei wurden

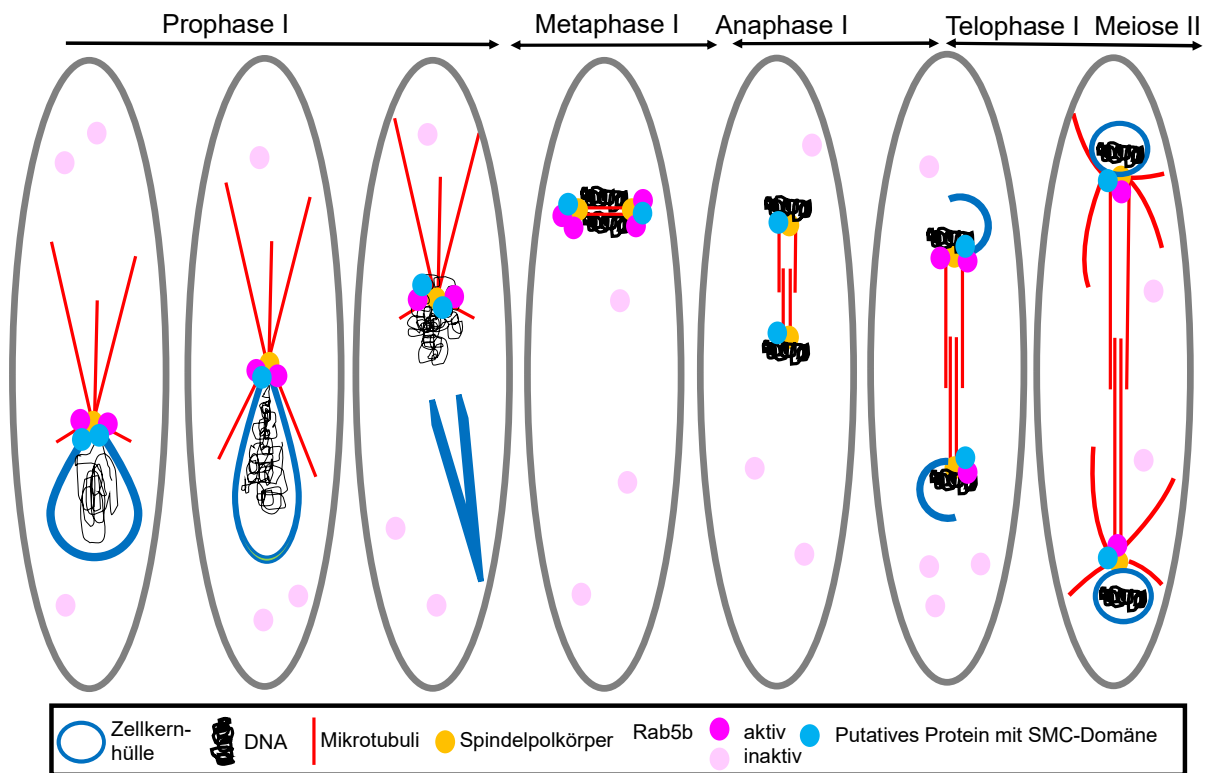
## Diskussion

Einzelnukleotidpolymorphismen der 3'-UTR (*untranslated region*) von Rab5B mit der Erkrankung korreliert. Die Zusammenhänge wurden dabei auf Bindestellen von miRNA (*microRNA*) zurückgeführt (Yu *et al.*, 2019). In Säugetierzellen konnte dagegen eine Lokalisierung des Rab5A-Proteins an der Meiosespindel während der Ana- und Telophase in Oozyten beobachtet werden. Der Funktionsverlust von Rab5A behinderte dabei die Meiose und resultierte in aneuploiden Zellen. Dabei ist Rab5A für eine korrekte Spindellänge und die Anheftung der Chromosomen an den Kinetochoren zuständig. Gleichzeitig wurden Defekte bei der Auflösung der Zellkernhülle beobachtet. Die Rab5A-vermittelte Funktion während der Meiose besteht in der Lokalisierung von CENP-F an die Kinetochore (Ma *et al.*, 2014). CENP-F, auch Mitosin genannt, lokalisiert zunächst in der M-Phase an der Zellkernhülle, um die Zentrosomen korrekt zu positionieren. Im Anschluss ist eine Lokalisierung an den Kinetochoren notwendig, um die Spindelmikrotubuli korrekt anzuheften (zusammengefasst in Berto *et al.*, 2018). CENP-F bindet in Humanzellen außerdem die Kinasedomäne von BUB1, welches relevant ist für die Anheftung der Endosomen und für die Regulation des zugehörigen Zellzykluskontrollpunktes (Ciossani *et al.*, 2018). CENP-F enthält ebenfalls eine SMC-Domäne (konservierte Domänensuche, NCBI). In *U. maydis* konnte durch bioinformatische Analysen kein homologes Protein zu CENP-F identifiziert werden (BLAST, NCBI). Ein Zusammenhang zwischen CENP-F und Rab5-Proteinen wurde in Humanzellen auch während der mitotischen Teilung identifiziert (Serio *et al.*, 2011). Durch die Repression aller drei Rab5-Isoformen in Zellkulturen mit humanen Zelllinien konnte während der Mitose eine fehlerhafte Ansammlung der Chromosomen in der Metaphaseplatte beobachtet werden, welche auf eine verringerte Spannung zwischen den Schwesterkinetochoren und einer reduzierten Stabilität der Kinetochor-Mikrotubuli aufgrund der fehlenden Lokalisierung von CENP-F an den Kinetochoren zurückzuführen ist (Serio *et al.*, 2011). In *U. maydis* wurde eine Interaktion zwischen Rab5a und dem SMC-Domänen-Protein Nma1 für die Rekrutierung von Rab5a-positiven Endosomen an die Spindel beobachtet (vgl. Abb. 64). Eine ähnliche Funktion von Rab5a während der Meiose in *U. maydis* ist nicht auszuschließen. Da Stämme mit einer *rab5a*-Deletion jedoch bei einer Pflanzeninfektion nicht dazu in der Lage sind, Tumore zu induzieren (vgl. Abb. 19), sind weitere Versuchsansätze nötig, um die Rolle von Rab5a bei der Meiose zu analysieren. Aufgrund der beobachteten genomischen Instabilität von Zellen, welche ohne die Funktion von Rab5b die Meiose durchlaufen haben, kann jedoch vermutet



werden, dass Rab5b anstelle oder gemeinsam mit Rab5a eine Funktion bei der meiotischen Teilung erfüllt. Die Aneuploidie der  $\Delta rab5b$ -Meioseprodukte, spricht für eine fehlerhafte Chromosomenverteilung bei der Meiose, welche im Anschluss mit jeder weiteren Teilung zu einer fortgeschritteneren genomischen Instabilität führt. Während die  $\Delta rab5b$ -Stämme die Meiose durchliefen, war Rab5a vorhanden. Dies spricht für eine relevante, meiosespezifische Funktion von Rab5b, welche durch Rab5a nicht kompensiert werden kann. Denkbar wäre eine spezifische Interaktion mit einem SMC-Domänen-Protein oder Rab5b-Endosomen, welche eine spezifische Fracht enthalten. Die Verwendung von meiose- bzw. mitosespezifischen SMC-Domänen-Proteinen ist beispielsweise für die Cohesin-Komplexe bekannt (zusammengefasst in Jessberger, 2003). Die Analyse eines Funktionsverlustes von Nma1, welches während der Mitose an der Rekrutierung von Rab5a an die Spindel involviert ist (vgl. Abb. 64), ergab eine mit dem Wildtyp vergleichbare Aufspaltung der Meioseprodukte (siehe Appendix Abb. 97). Dieses Resultat spricht für eine untergeordnete Funktion von Rab5a während der Meiose oder für einen abweichenden Rekrutierungsmechanismus.

Ein mögliches Modell ist in Abb. 89 dargestellt. In Bezug auf die Beobachtungen der Rab5A-Funktion in der Meiose von Säugetierzellen (Ma *et al.*, 2014), kann vermutet werden, dass diese Funktion in *U. maydis* stattdessen von Rab5b erfüllt wird. Das Rab5b-Protein aus *U. maydis* zeigt von den Rab5-GTPasen die größte Ähnlichkeit mit den humanen Rab5-GTPasen (vgl. Abb. 16). Um die Funktion von Rab5b während der Meiose von *U. maydis* aufzuklären und zu untersuchen, warum Rab5a diese Funktion nicht erfüllen kann, sind weitere Versuchsansätze notwendig. Zunächst sollten durch Lokalisierungsstudien von Rab5a und Rab5b mit für die Zellteilung spezifischen Markerproteinen, wie der Tub1-markierten Spindel, der Nup192-markierten Zellkernhülle oder dem Tub2-markierten Spindelpolkörper, während der meiotischen Teilung, Anhaltspunkte für eine putative Funktion gewonnen werden. Durch die Verwendung von Markerproteinen für die Zellkernhülle kann eine mit den Säugetierzellen vergleichbare Funktion bei der Auflösung der Zellkernhülle (Ma *et al.*, 2014) untersucht werden. Eine Lokalisierung an den Spindelpolen, möglicherweise gemeinsam mit einem SMC-Domänen-Protein, würde dagegen eine Funktion bei der Anheftung der Chromosomen unterstützen, wie sie auch in Säugetierzellen beobachtet wurde (Ma *et al.*, 2014) und die Verteilungsdefekte von Chromosomen in  $\Delta rab5b^M$ -Stämme in *U. maydis* erklären.



**Abb. 89: Rab5b erfüllt Funktionen bei der Separierung von Chromosomen während der Meiose**  
 Anhand der beobachteten Defekte von *U. maydis*-Zellen, welche ohne Rab5b die Meiose durchlaufen waren und den Beobachtungen aus Säugetierzellen, wird eine Lokalisierung von Rab5b (magenta) in *U. maydis* an der Zellkernhülle bei der Auflösung in der Prophase I vermutet (vgl. Ma *et al.*, 2014). Im weiteren Verlauf der ersten meiotischen Teilung wäre eine denkbare Hypothese, dass Rab5b aus *U. maydis* an der Meiospindel während der Ana- und Telophase lokalisiert. Rab5A aus Säugetierzellen, zu dem die Rab5b-GTPase aus *U. maydis* am ähnlichsten ist, unterstützt an dieser Stelle eine korrekte Spindellänge und die Anheftung der Chromosomen an den Kinetochoren (vgl. Ma *et al.*, 2014). In Säugetierzellen wird die Rab5a-vermittelte Funktion während der Meiose durch die Lokalisierung des SMC-Domänen-Proteins CENP-F an die Kinetochore erfüllt (Ma *et al.*, 2014). CENP-F lokalisiert zunächst in der Metaphase an der Zellkernhülle, um die Zentrosomen korrekt zu positionieren. Im Anschluss ist eine Lokalisierung an den Kinetochoren notwendig, um die Spindelmikrotubuli korrekt anzuheften (zusammengefasst in Berto *et al.*, 2018). Die Aneuploidie der  $\Delta rab5b$ -Meioseprodukte, spricht für eine fehlerhafte Chromosomenverteilung bei der Meiose, welche im Anschluss mit jeder weiteren Teilung zu einer fortgeschritteneren genomischen Instabilität führt. Denkbar wäre eine spezifische Interaktion mit einem SMC-Domänen-Protein (hellblau).

## 5. Material und Methoden

Die aufgeführten Beschreibungen und Aufstellungen basieren, wenn nicht anders gekennzeichnet, auf Arbeiten aus der Laborsammlung der AG Kämper.

### 5.1. Material und Bezugsquellen

#### 5.1.1. *Escherichia coli*-Stamm

Für Standardklonierungen wurde der Stamm TOP10 (Invitrogen) verwendet, bei dem es sich um ein Derivat des *E. coli*-Stammes DH10B mit folgenden genetischen Markern handelt: *F-mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80lacZΔM15 ΔlacX74 nupG recA1 araD139 Δ(ara-leu)7697 galE15 galK16 rpsL(StrR) endA1 λ-*. Die Nomenklatur der *E. coli*-Stämme richtet sich nach (Demerec *et al.*, 1966).

Für die Vervielfältigung von *ccdB*-Gen tragenden Plasmiden wurde der Stamm DB3.1™ (Invitrogen) verwendet. Es handelt sich um folgenden Genotyp: *F- gyrA462 endA1 Δ(sr1-recA) mcrB mrr hsdS20(rB-, mB-) supE44 ara-14 galK2 lacY1 proA2 rpsL20(SmR) xyl-5 λ- leu mtl*.

#### 5.1.2. *Ustilago maydis*-Stämme

**Tabelle 1: Ausgangsstämme**

Stamm	Genotyp	Resistenz	Referenz
<b>2475</b>	<i>a2, P<sub>nar1</sub>:bW2, P<sub>nar1</sub>:bE1, ble<sup>R</sup>, ip<sup>R</sup>[p<sub>otef</sub>:yup1:gfp]ip<sup>S</sup></i>	Phleo <sup>R</sup> , Cbx <sup>R</sup>	(Lenz <i>et al.</i> , 2006)
<b>AB31</b>	<i>a2, P<sub>crg1</sub>:bW2, P<sub>crg1</sub>:bE1, ble<sup>R</sup></i>	Phleo <sup>R</sup>	(Brachmann <i>et al.</i> , 2001)
<b>CL13</b>	<i>a1, bW2, bE1</i>	-	(Bölker <i>et al.</i> , 1995b)
<b>FB1</b>	<i>a1, b1</i>	-	(Banuett und Herskowitz, 1989)
<b>FB2</b>	<i>a2, b2</i>	-	(Banuett und Herskowitz, 1989)

## Material und Methoden

<b>FBD11</b>	<i>a1, a2, b1, b2</i>	-	(Banuett und Herskowitz, 1989)
<b>SG200</b>	<i>a1:mfa2, bE1, ble<sup>R</sup>, bW2</i>	Phleo <sup>R</sup>	(Bölker <i>et al.</i> , 1995a)
<b>UAß1/UAß3</b>	<i>a2, P<sub>nar1</sub>:bW2, P<sub>nar1</sub>:bE1, ble<sup>R</sup>, ip<sup>R</sup>[P<sub>otef</sub>:yup1:gfp]ip<sup>S</sup>, Δnma1::hyg<sup>R</sup></i>	Phleo <sup>R</sup> , Cbx <sup>R</sup> , Hyg <sup>R</sup>	(Bisson 2009)
<b>UAß7</b>	<i>a1:mfa2, bE1, ble<sup>R</sup>, bW2, Δnma1::hyg<sup>R</sup></i>	Phleo <sup>R</sup> , Hyg <sup>R</sup>	(Bisson 2009)
<b>UKS16/UKS17</b>	<i>a2, P<sub>crg1</sub>:bW2, P<sub>crg1</sub>:bE1, ble<sup>R</sup>, ip<sup>R</sup>[P<sub>tef</sub>:mCherry:rab5a]ip<sup>S</sup></i>	Phleo <sup>R</sup> , Cbx <sup>R</sup>	(Schneider, 2016)
<b>UKS18/UKS19/UKS20</b>	<i>a2, P<sub>crg1</sub>:bW2, P<sub>crg1</sub>:bE1, ble<sup>R</sup>, ip<sup>R</sup>[P<sub>tef</sub>:mCherry:rab7]ip<sup>S</sup></i>	Phleo <sup>R</sup> , Cbx <sup>R</sup>	(Schneider, 2016)
<b>UKS47</b>	<i>a2, P<sub>crg1</sub>:bW2, P<sub>crg1</sub>:bE1, ble<sup>R</sup>, Δrab5a::nat<sup>R</sup></i>	Phleo <sup>R</sup> , Nat <sup>R</sup>	(Schneider, 2016)
<b>UKS70</b>	<i>a2, P<sub>crg1</sub>:bW2, P<sub>crg1</sub>:bE1, ble<sup>R</sup>, ip<sup>R</sup>[P<sub>otef</sub>:mCherry:rab11]ip<sup>S</sup>, Δnma1::hyg<sup>R</sup></i>		(Schneider, 2016)
<b>UNP1</b>	<i>a2, P<sub>crg1</sub>:bW2, P<sub>crg1</sub>:bE1, ble<sup>R</sup>, nma1:3xgfp:hyg<sup>R</sup></i>	Phleo <sup>R</sup> , Hyg <sup>R</sup>	(Pinter, 2012)
<b>UNP2</b>	<i>a2, P<sub>crg1</sub>:bW2, P<sub>crg1</sub>:bE1, ble<sup>R</sup>, nma1:3xgfp:hyg<sup>R</sup>, ip<sup>R</sup>[P<sub>otef</sub>:mCherry:tub1]ip<sup>S</sup></i>	Phleo <sup>R</sup> , Hyg <sup>R</sup> , Cbx <sup>R</sup>	(Pinter, 2012)
<b>UTO135</b>	<i>a2, P<sub>crg1</sub>:bW2, P<sub>crg1</sub>:bE1, ble<sup>R</sup> Δnma1::hyg<sup>R</sup></i>	Phleo <sup>R</sup> , Hyg <sup>R</sup>	(Obhof, 2017)

**Tabelle 2: In dieser Arbeit hergestellte Stämme**

<b>Stamm</b>	<b>Genotyp</b>	<b>Resistenz</b>	<b>Ausgangsstamm</b>
<b>UKS83/UKS84/UKS85</b>	<i>a2, P<sub>crg1</sub>:bW2, P<sub>crg1</sub>:bE1, ble<sup>R</sup>, ip<sup>R</sup>[P<sub>otef</sub>:mCherry:rab11]ip<sup>S</sup>, Δnma1::hyg<sup>R</sup></i>	Phleo <sup>R</sup> , Cbx <sup>R</sup> , Hyg <sup>R</sup>	UKS70
<b>UKS88/UKS89/UKS90</b>	<i>a1, b1, Δrab5a::nat<sup>R</sup></i>	Nat <sup>R</sup>	FB1
<b>UKS91/UKS92/UKS93</b>	<i>a2, P<sub>crg1</sub>:bW2, P<sub>crg1</sub>:bE1, ble<sup>R</sup>, gfp:rab5a:hyg<sup>R</sup></i>	Phleo <sup>R</sup> , Hyg <sup>R</sup>	AB31
<b>UKS94/UKS95/UKS96</b>	<i>a2, P<sub>crg1</sub>:bW2, P<sub>crg1</sub>:bE1, ble<sup>R</sup>, ip<sup>R</sup>[P<sub>tef</sub>:mCherry:rab7]ip<sup>S</sup>, Δvps9::nat<sup>R</sup></i>	Phleo <sup>R</sup> , Cbx <sup>R</sup> , Nat <sup>R</sup>	UKS18

<b>UKS97/UKS98/UKS99</b>	<i>a1:mfa2 bE1, ble<sup>R</sup>, bW2</i> <i>Δrab5a::nat<sup>R</sup></i>	Phleo <sup>R</sup> , Nat <sup>R</sup>	SG200
<b>UKS100/UKS101/UKS102</b>	<i>a2, P<sub>crG1</sub>:bW2, P<sub>crG1</sub>:bE1, ble<sup>R</sup>,</i> <i>ip<sup>R</sup>[P<sub>tef</sub>:mCherry:rab7]ip<sup>S</sup>,</i> <i>Δvps3::nat<sup>R</sup></i>	Phleo <sup>R</sup> , Cbx <sup>R</sup> , Nat <sup>R</sup>	UKS18
<b>UKS103/UKS104/UKS105</b>	<i>a2, P<sub>nar1</sub>:bW2, P<sub>nar1</sub>:bE1, ble<sup>R</sup>,</i> <i>ip<sup>R</sup>[P<sub>otef</sub>:yup1:gfp]ip<sup>S</sup>,</i> <i>Δrab5a::nat<sup>R</sup></i>	Phleo <sup>R</sup> , Cbx <sup>R</sup> , Nat <sup>R</sup>	2475
<b>UKS106/UKS107/UKS108</b>	<i>a2, P<sub>nar1</sub>:bW2, P<sub>nar1</sub>:bE1, ble<sup>R</sup>,</i> <i>ip<sup>R</sup>[P<sub>otef</sub>:yup1:gfp]ip<sup>S</sup>,</i> <i>Δrab5b::gent<sup>R</sup></i>	Phleo <sup>R</sup> , Cbx <sup>R</sup> , Gent <sup>R</sup>	2475
<b>UKS109/UKS110/UKS111</b>	<i>a2, P<sub>crG1</sub>:bW2, P<sub>crG1</sub>:bE1, ble<sup>R</sup>,</i> <i>ip<sup>R</sup>[P<sub>tef</sub>:mCherry:rab7]ip<sup>S</sup>,</i> <i>gfp:rab5a:hyg<sup>R</sup></i>	Phleo <sup>R</sup> , Cbx <sup>R</sup> , Hyg <sup>R</sup>	UKS18
<b>UKS112/UKS113/UKS114</b>	<i>a2, P<sub>crG1</sub>:bW2, P<sub>crG1</sub>:bE1, ble<sup>R</sup>,</i> <i>ip<sup>R</sup>[P<sub>tef</sub>:mCherry:rab5a]ip<sup>S</sup>,</i> <i>Δrab5b::gent<sup>R</sup></i>	Phleo <sup>R</sup> , Cbx <sup>R</sup> , Gent <sup>R</sup>	UKS16
<b>UKS115</b>	<i>a2, P<sub>crG1</sub>:bW2, P<sub>crG1</sub>:bE1, ble<sup>R</sup>,</i> <i>Δrab5a::nat<sup>R</sup>, gfp:rab5b:hyg<sup>R</sup></i>	Phleo <sup>R</sup> , Nat <sup>R</sup> , Hyg <sup>R</sup>	UKS47
<b>UKS116/UKS117/UKS118</b>	<i>a2, P<sub>crG1</sub>:bW2, P<sub>crG1</sub>:bE1, ble<sup>R</sup>,</i> <i>Δnma1::nat<sup>R</sup></i>	Phleo <sup>R</sup> , Nat <sup>R</sup>	AB31
<b>UKS119/UKS120/UKS121</b>	<i>a2, P<sub>crG1</sub>:bW2, P<sub>crG1</sub>:bE1, ble<sup>R</sup>,</i> <i>gfp:rab5b:hyg<sup>R</sup>, Δnma1::nat<sup>R</sup></i>	Phleo <sup>R</sup> , Hyg <sup>R</sup> , Nat <sup>R</sup>	URS1
<b>UKS122</b>	<i>a2, P<sub>crG1</sub>:bW2, P<sub>crG1</sub>:bE1, ble<sup>R</sup>,</i> <i>ip<sup>R</sup>[P<sub>tef</sub>:mCherry:rab5a]ip<sup>S</sup>,</i> <i>gfp:rab5b:hyg<sup>R</sup>, Δnma1::nat<sup>R</sup></i>	Phleo <sup>R</sup> , Cbx <sup>R</sup> , Hyg <sup>R</sup> , Nat <sup>R</sup>	URS2
<b>UKS123/UKS124/UKS125</b>	<i>a2, P<sub>crG1</sub>:bW2, P<sub>crG1</sub>:bE1, ble<sup>R</sup>,</i> <i>vps3:gfp:hyg<sup>R</sup></i>	Phleo <sup>R</sup> , Hyg <sup>R</sup>	AB31
<b>UKS129/UKS130/UKS131</b>	<i>a2, P<sub>crG1</sub>:bW2, P<sub>crG1</sub>:bE1, ble<sup>R</sup>,</i> <i>nma1:3xgfp:hyg<sup>R</sup>, Δrab5a::nat<sup>R</sup></i>	Phleo <sup>R</sup> , Hyg <sup>R</sup> , Nat <sup>R</sup>	UNP1
<b>UKS132/UKS133/UKS134</b>	<i>a2, P<sub>crG1</sub>:bW2, P<sub>crG1</sub>:bE1, ble<sup>R</sup>,</i> <i>gfp:rab5a:hyg<sup>R</sup>, tub2-rfp:nat<sup>R</sup></i>	Phleo <sup>R</sup> , Hyg <sup>R</sup> , Nat <sup>R</sup>	UKS91
<b>UKS135/UKS136/UKS137</b>	<i>a2, P<sub>crG1</sub>:bW2, P<sub>crG1</sub>:bE1, ble<sup>R</sup>,</i> <i>gfp:rab5a:hyg<sup>R</sup>,</i> <i>ip<sup>R</sup>[P<sub>otef</sub>:mCherry:tub1]ip<sup>S</sup></i>	Phleo <sup>R</sup> , Hyg <sup>R</sup> , Cbx <sup>R</sup>	UKS91
<b>UKS138/UKS139/UKS140</b>	<i>a2, P<sub>crG1</sub>:bW2, P<sub>crG1</sub>:bE1, ble<sup>R</sup>,</i> <i>gfp:rab5a:hyg<sup>R</sup>, Δnma1::nat<sup>R</sup></i>	Phleo <sup>R</sup> , Hyg <sup>R</sup> , Nat <sup>R</sup>	UKS91

Material und Methoden

<b>UKS141/UKS142/UKS143</b>	<i>a2, P<sub>crG1</sub>:bW2, P<sub>crG1</sub>:bE1, ble<sup>R</sup>, gfp:rab5a:hyg<sup>R</sup>, Δvps9::nat<sup>R</sup></i>	Phleo <sup>R</sup> , Hyg <sup>R</sup> , Nat <sup>R</sup>	UKS91
<b>UKS144</b>	<i>a1a2, b1b2, Δvps8::gent<sup>R</sup></i>	Gent <sup>R</sup>	FBD11
<b>UKS151/UKS152/UKS153</b>	<i>a2, P<sub>crG1</sub>:bW2, P<sub>crG1</sub>:bE1, ble<sup>R</sup>, ip<sup>R</sup>[P<sub>tef</sub>:mCherry:rab7]ip<sup>S</sup>, Δrab5a::nat<sup>R</sup></i>	Phleo <sup>R</sup> , Cbx <sup>R</sup> , Nat <sup>R</sup>	UKS18
<b>UKS154/UKS155/UKS156</b>	<i>a1a2, b1b2, Δvps11::nat<sup>R</sup></i>	Nat <sup>R</sup>	FBD11
<b>UKS157/UKS158/UKS159</b>	<i>a2, P<sub>crG1</sub>:bW2, P<sub>crG1</sub>:bE1, ble<sup>R</sup>, ip<sup>R</sup>[P<sub>tef</sub>:mCherry:rab7]ip<sup>S</sup>, gfp:rab5a:hyg<sup>R</sup>, Δnma1::nat<sup>R</sup></i>	Phleo <sup>R</sup> , Cbx <sup>R</sup> , Hyg <sup>R</sup> , Nat <sup>R</sup>	UKS109
<b>UKS160/UKS161/UKS162</b>	<i>a2, P<sub>crG1</sub>:bW2, P<sub>crG1</sub>:bE1, ble<sup>R</sup>, vps3:gfp:hyg<sup>R</sup>, Δnma1::nat<sup>R</sup></i>	Phleo <sup>R</sup> , Hyg <sup>R</sup> , Nat <sup>R</sup>	UKS123
<b>UKS163/UKS164/UKS165</b>	<i>a2, P<sub>crG1</sub>:bW2, P<sub>crG1</sub>:bE1, ble<sup>R</sup>, vps3:3xHA:gent<sup>R</sup></i>	Phleo <sup>R</sup> , Gent <sup>R</sup>	AB31
<b>UKS166/UKS167/UKS168</b>	<i>a2, P<sub>crG1</sub>:bW2, P<sub>crG1</sub>:bE1, ble<sup>R</sup>, Δnma1::hyg<sup>R</sup>, vps3:3xHA:gent<sup>R</sup></i>	Phleo <sup>R</sup> , Hyg <sup>R</sup> , Gent <sup>R</sup>	UTO135
<b>UKS173/UKS174/UKS175</b>	<i>a2, P<sub>crG1</sub>:bW2, P<sub>crG1</sub>:bE1, ble<sup>R</sup>, gfp:rab5a:hyg<sup>R</sup>, Δnma1::nat<sup>R</sup>, ip<sup>R</sup>[P<sub>otef</sub>:mCherry:tub1]ip<sup>S</sup></i>	Phleo <sup>R</sup> , Hyg <sup>R</sup> , Nat <sup>R</sup> , Cbx <sup>R</sup>	UKS138
<b>UKS176/UKS177/UKS178</b>	<i>a2, P<sub>crG1</sub>:bW2, P<sub>crG1</sub>:bE1, ble<sup>R</sup>, gfp:rab5a:hyg<sup>R</sup>, nma1:3xmCherry:nat<sup>R</sup></i>	Phleo <sup>R</sup> , Hyg <sup>R</sup> , Nat <sup>R</sup>	UKS91
<b>UKS179/UKS180/UKS181</b>	<i>a2, P<sub>crG1</sub>:bW2, P<sub>crG1</sub>:bE1, ble<sup>R</sup>, vps8:3xMyc:hyg<sup>R</sup></i>	Phleo <sup>R</sup> , Hyg <sup>R</sup>	AB31
<b>UKS182/UKS183/UKS184</b>	<i>a2, P<sub>crG1</sub>:bW2, P<sub>crG1</sub>:bE1, ble<sup>R</sup>, Δnma1::nat<sup>R</sup>, vps8:3xMyc:hyg<sup>R</sup></i>	Phleo <sup>R</sup> , Nat <sup>R</sup> , Hyg <sup>R</sup>	UKS116
<b>UKS185/UKS186/UKS187</b>	<i>a2, P<sub>crG1</sub>:bW2, P<sub>crG1</sub>:bE1, ble<sup>R</sup>, vps8:3xMyc:hyg<sup>R</sup>, vps3:3xHA:gent<sup>R</sup></i>	Phleo <sup>R</sup> , Hyg <sup>R</sup> , Gent <sup>R</sup>	UKS179
<b>UKS188/UKS189/UKS190</b>	<i>a2, P<sub>crG1</sub>:bW2, P<sub>crG1</sub>:bE1, ble<sup>R</sup>, Δnma1::nat<sup>R</sup>, vps8:3xMyc:hyg<sup>R</sup>, vps3:3xHA:gent<sup>R</sup></i>	Phleo <sup>R</sup> , Nat <sup>R</sup> , Hyg <sup>R</sup> , Gent <sup>R</sup>	UKS182
<b>UKS191/UKS192/UKS193</b>	<i>a2, P<sub>crG1</sub>:bW2, P<sub>crG1</sub>:bE1, ble<sup>R</sup>, gfp:rab5a:hyg<sup>R</sup>, Δkin3::nat<sup>R</sup></i>	Phleo <sup>R</sup> , Hyg <sup>R</sup> , Nat <sup>R</sup>	UKS91

<b>UKS194/UKS195/UKS196</b>	<i>a2, P<sub>crG1</sub>:bW2, P<sub>crG1</sub>:bE1, ble<sup>R</sup>, Δrab5a::nat<sup>R</sup>, vps3:gfp:hyg<sup>R</sup></i>	Phleo <sup>R</sup> , Nat <sup>R</sup> , Hyg <sup>R</sup>	UKS47
<b>UKS198/UKS199/UKS200</b>	<i>a1, b1, Δnma1::hyg<sup>R</sup></i>	Hyg <sup>R</sup>	FB1
<b>UKS201/UKS202/UKS203</b>	<i>a2, b2, Δnma1::nat<sup>R</sup></i>	Nat <sup>R</sup>	FB2
<b>UKS204/UKS205</b>	<i>a2, P<sub>crG1</sub>:bW2, P<sub>crG1</sub>:bE1, ble<sup>R</sup>, ip<sup>R</sup>[P<sub>tef</sub>:mCherry:rab5a]ip<sup>S</sup>, gfp:rab5b:hyg<sup>R</sup>, Δnma1::nat<sup>R</sup></i>	Phleo <sup>R</sup> , Cbx <sup>R</sup> , Hyg <sup>R</sup> , Nat <sup>R</sup> ,	URS2
<b>UKS206/UKS207/UKS208</b>	<i>a2, P<sub>crG1</sub>:bW2, P<sub>crG1</sub>:bE1, ble<sup>R</sup>, Δrab5a::hyg<sup>R</sup></i>	Phleo <sup>R</sup> , Hyg <sup>R</sup>	AB31
<b>UKS209/UKS210/UKS211/ UKS212</b>	<i>a2, P<sub>crG1</sub>:bW2, P<sub>crG1</sub>:bE1, ble<sup>R</sup>, nma1:3xgfp:hyg<sup>R</sup>, Δrab5a::nat<sup>R</sup>, ip<sup>R</sup>[P<sub>tef</sub>:mCherry:rab7]ip<sup>S</sup></i>	Phleo <sup>R</sup> , Hyg <sup>R</sup> , Nat <sup>R</sup> , Cbx <sup>R</sup>	UKS129
<b>UKS213/UKS268/UKS269</b>	<i>a2, P<sub>crG1</sub>:bW2, P<sub>crG1</sub>:bE1, ble<sup>R</sup>, Δrab5a::nat<sup>R</sup>, ip<sup>R</sup>[P<sub>tef</sub>:yup1:gfp]ip<sup>S</sup></i>	Phleo <sup>R</sup> , Nat <sup>R</sup> , Cbx <sup>R</sup>	UKS47
<b>UKS214/UKS246/UKS247/ UKS215</b>	<i>a2, P<sub>crG1</sub>:bW2, P<sub>crG1</sub>:bE1, ble<sup>R</sup>, Δnma1::nat<sup>R</sup>, ip<sup>R</sup>[P<sub>tef</sub>:yup1:gfp]ip<sup>S</sup></i>	Phleo <sup>R</sup> , Nat <sup>R</sup> , Cbx <sup>R</sup>	UKS116
<b>UKS216/UKS217</b>	<i>a2, P<sub>crG1</sub>:bW2, P<sub>crG1</sub>:bE1, ble<sup>R</sup>, gfp:rab5a:hyg<sup>R</sup>, Δvps3::nat<sup>R</sup></i>	Phleo <sup>R</sup> , Hyg <sup>R</sup> , Nat <sup>R</sup>	UKS91
<b>UKS218/UKS219/UKS220</b>	<i>a2, P<sub>crG1</sub>:bW2, P<sub>crG1</sub>:bE1, ble<sup>R</sup>, vps8:3xmCherry:nat<sup>R</sup></i>	Phleo <sup>R</sup> , Nat <sup>R</sup>	AB31
<b>UKS221/UKS222/UKS223</b>	<i>a2, P<sub>crG1</sub>:bW2, P<sub>crG1</sub>:bE1, ble<sup>R</sup>, Δnma1::hyg<sup>R</sup>, vps8:3xmCherry:nat<sup>R</sup></i>	Phleo <sup>R</sup> , Hyg <sup>R</sup> , Nat <sup>R</sup>	UTO135
<b>UKS224/UKS225/UKS226</b>	<i>a2, P<sub>crG1</sub>:bW2, P<sub>crG1</sub>:bE1, ble<sup>R</sup>, gfp:rab5a_Q90Lmutated:hyg<sup>R</sup>, ip<sup>R</sup>[P<sub>hxt1</sub>:2xfyve:mCherry]ip<sup>S</sup>, Δrab5b::gent<sup>R</sup></i>	Phleo <sup>R</sup> , Hyg <sup>R</sup> , Cbx <sup>R</sup> , Gent <sup>R</sup>	UJKI27
<b>UKS227/UKS228/UKS229</b>	<i>a2, P<sub>crG1</sub>:bW2, P<sub>crG1</sub>:bE1, ble<sup>R</sup>, gfp:rab5a_Q90Lmutated:hyg<sup>R</sup>, vps3:3xHA:gent<sup>R</sup></i>	Phleo <sup>R</sup> , Hyg <sup>R</sup> , Gent <sup>R</sup>	UJKI8
<b>UKS230/UKS231/UKS232</b>	<i>a2, P<sub>crG1</sub>:bW2, P<sub>crG1</sub>:bE1, ble<sup>R</sup>, gfp:rab5a:hyg<sup>R</sup>, vps3:3xHA:gent<sup>R</sup></i>	Phleo <sup>R</sup> , Hyg <sup>R</sup> , Gent <sup>R</sup>	UKS91
<b>UKS233/UKS234/UKS235</b>	<i>a2, P<sub>crG1</sub>:bW2, P<sub>crG1</sub>:bE1, ble<sup>R</sup>, gfp:rab5a:hyg<sup>R</sup>, vps8:3xmCherry:nat<sup>R</sup></i>	Phleo <sup>R</sup> , Hyg <sup>R</sup> , Nat <sup>R</sup>	UKS91

## Material und Methoden

<b>UKS236/UKS237/UKS238</b>	<i>a2, P<sub>crG1</sub>:bW2, P<sub>crG1</sub>:bE1, ble<sup>R</sup>, vps3:gfp:hyg<sup>R</sup>, vps8:3xmCherry:nat<sup>R</sup></i>	Phleo <sup>R</sup> , Hyg <sup>R</sup> , Nat <sup>R</sup>	UKS123
<b>UKS239/UKS240/UKS241</b>	<i>a2, P<sub>crG1</sub>:bW2, P<sub>crG1</sub>:bE1, ble<sup>R</sup>, gfp:rab5b:hyg<sup>R</sup>, vps3:3xHA:gent<sup>R</sup></i>	Phleo <sup>R</sup> , Hyg <sup>R</sup> , Gent <sup>R</sup>	URS1
<b>UKS242/UKS243</b>	<i>a2, P<sub>crG1</sub>:bW2, P<sub>crG1</sub>:bE1, ble<sup>R</sup>, gfp:rab5a_S45Nmutated:hyg<sup>R</sup>, vps3:3xHA:gent<sup>R</sup></i>	Phleo <sup>R</sup> , Hyg <sup>R</sup> , Gent <sup>R</sup>	UJKI5
<b>UKS244/UKS245</b>	<i>a2, P<sub>crG1</sub>:bW2, P<sub>crG1</sub>:bE1, ble<sup>R</sup>, ip<sup>R</sup>[P<sub>terf</sub>:yup1:gfp]ip<sup>S</sup></i>	Phleo <sup>R</sup> , Cbx <sup>R</sup>	AB31
<b>UKS248/UKS249/UKS250</b>	<i>a2, P<sub>crG1</sub>:bW2, P<sub>crG1</sub>:bE1, ble<sup>R</sup>, gfp:rab5a_Q90Lmutated:hyg<sup>R</sup>, nma1:3xmCherry:nat<sup>R</sup>, Δrab5b::gent<sup>R</sup></i>	Phleo <sup>R</sup> , Hyg <sup>R</sup> , Nat <sup>R</sup> , Gent <sup>R</sup>	UJKI21
<b>UKS251/UKS252/UKS253/ UKS254</b>	<i>a2, P<sub>crG1</sub>:bW2, P<sub>crG1</sub>:bE1, ble<sup>R</sup>, gfp:rab5b:hyg<sup>R</sup>, Δnma1::nat<sup>R</sup>, ip<sup>R</sup>[P<sub>terf</sub>:yup1:mCherry]ip<sup>S</sup></i>	Phleo <sup>R</sup> , Hyg <sup>R</sup> , Nat <sup>R</sup> , Cbx <sup>R</sup>	UKS119
<b>UKS255/UKS256/UKS257</b>	<i>a2, P<sub>crG1</sub>:bW2, P<sub>crG1</sub>:bE1, ble<sup>R</sup>, vps3:gfp:hyg<sup>R</sup>, Δvps9::nat<sup>R</sup></i>	Phleo <sup>R</sup> , Hyg <sup>R</sup> , Nat <sup>R</sup>	UKS123
<b>UKS258/UKS259/UKS260<sup>5)</sup></b>	<i>a2, P<sub>crG1</sub>:bW2, P<sub>crG1</sub>:bE1, ble<sup>R</sup>, gfp:rab5a:hyg<sup>R</sup>, mCherry:rab7:nat<sup>R</sup></i>	Phleo <sup>R</sup> , Hyg <sup>R</sup> , Nat <sup>R</sup>	UKS91
<b>UKS261/UKS262</b>	<i>a2, P<sub>crG1</sub>:bW2, P<sub>crG1</sub>:bE1, ble<sup>R</sup>, Δrab5a::nat<sup>R</sup>, vps3:3xHA:gent<sup>R</sup></i>	Phleo <sup>R</sup> , Nat <sup>R</sup> , Gent <sup>R</sup>	UKS47
<b>UKS263/UKS264/UKS265</b>	<i>a1 bE1, bW2, Δnma1::nat<sup>R</sup></i>	Nat <sup>R</sup>	CL13
<b>UKS266</b>	<i>a2, P<sub>crG1</sub>:bW2, P<sub>crG1</sub>:bE1, ble<sup>R</sup>, gfp:rab5b:hyg<sup>R</sup>, nma1:3xmCherry:nat<sup>R</sup></i>	Phleo <sup>R</sup> , Hyg <sup>R</sup> , Nat <sup>R</sup>	URS1
<b>UKS267</b>	<i>a2, P<sub>crG1</sub>:bW2, P<sub>crG1</sub>:bE1, ble<sup>R</sup>, vps3:gfp:hyg<sup>R</sup>, nma1:3xmCherry:nat<sup>R</sup></i>	Phleo <sup>R</sup> , Hyg <sup>R</sup> , Nat <sup>R</sup>	UKS123
<b>UKS270/UKS271/UKS272</b>	<i>a2, P<sub>crG1</sub>:bW2, P<sub>crG1</sub>:bE1, ble<sup>R</sup>, nma1:3xgfp:hyg<sup>R</sup>, mCherry:rab5b:gent<sup>R</sup></i>	Phleo <sup>R</sup> , Hyg <sup>R</sup> , Gent <sup>R</sup>	UNP1
<b>UKS273/UKS274/UKS275</b>	<i>a2, P<sub>crG1</sub>:bW2, P<sub>crG1</sub>:bE1, ble<sup>R</sup>, gfp:rab5a:hyg<sup>R</sup>, mCherry:rab5b:gent<sup>R</sup></i>	Phleo <sup>R</sup> , Hyg <sup>R</sup> , Gent <sup>R</sup>	UKS91
<b>UKS276/UKS277/UKS278</b>	<i>a2, P<sub>crG1</sub>:bW2, P<sub>crG1</sub>:bE1, ble<sup>R</sup>, nma1:3xgfp:hyg<sup>R</sup>, mCherry:rab7:nat<sup>R</sup></i>	Phleo <sup>R</sup> , Hyg <sup>R</sup> , Nat <sup>R</sup>	UNP1



<b>UKS279/UKS280/UKS281</b>	<i>a2, P<sub>crg1</sub>:bW2, P<sub>crg1</sub>:bE1, ble<sup>R</sup>, gfp:rab5a_S45Nmutated:hyg<sup>R</sup>, mCherry:rab7:nat<sup>R</sup></i>	Phleo <sup>R</sup> , Hyg <sup>R</sup> , Nat <sup>R</sup>	UJKI5
<b>UKS282/UKS283/UKS284</b>	<i>a2, P<sub>crg1</sub>:bW2, P<sub>crg1</sub>:bE1, ble<sup>R</sup>, ip<sup>R</sup>[P<sub>tef</sub>:yup1:gfp]ip<sup>S</sup>, Δrab5b::gent<sup>R</sup></i>	Phleo <sup>R</sup> , Cbx <sup>R</sup> , Gent <sup>R</sup>	UKS244
<b>UKS285/UKS286/UKS287</b>	<i>a2, P<sub>crg1</sub>:bW2, P<sub>crg1</sub>:bE1, ble<sup>R</sup>, Δvps3::nat<sup>R</sup></i>	Phleo <sup>R</sup> , Nat <sup>R</sup>	AB31
<b>UKS288/UKS289/UKS290</b>	<i>a2, P<sub>crg1</sub>:bW2, P<sub>crg1</sub>:bE1, ble<sup>R</sup>, nma1:3xgfp:hyg<sup>R</sup>, vps8:3xmCherry:nat<sup>R</sup></i>	Phleo <sup>R</sup> , Hyg <sup>R</sup> , Nat <sup>R</sup>	UNP1
<b>UKS291/UKS292/UKS293</b>	<i>a2, P<sub>crg1</sub>:bW2, P<sub>crg1</sub>:bE1, ble<sup>R</sup>, gfp:rab5b:hyg<sup>R</sup>, Δvps3::nat<sup>R</sup></i>	Phleo <sup>R</sup> , Hyg <sup>R</sup> , Nat <sup>R</sup>	URS1
<b>UKS294/UKS295/UKS296</b>	<i>a2, P<sub>crg1</sub>:bW2, P<sub>crg1</sub>:bE1, ble<sup>R</sup>, gfp:rab5b:hyg<sup>R</sup>, nma1:3xmCherry:nat<sup>R</sup>, Δrab5a::gent<sup>R</sup></i>	Phleo <sup>R</sup> , Hyg <sup>R</sup> , Nat <sup>R</sup> , Gent <sup>R</sup>	UKS266
<b>UKS297/UKS298/UKS299</b>	<i>a2, P<sub>crg1</sub>:bW2, P<sub>crg1</sub>:bE1, ble<sup>R</sup>, vps3:gfp:hyg<sup>R</sup>, nma1:3xmCherry:nat<sup>R</sup>, Δrab5a::gent<sup>R</sup></i>	Phleo <sup>R</sup> , Hyg <sup>R</sup> , Nat <sup>R</sup> , Gent <sup>R</sup>	UKS267
<b>UKS300/UKS301/UKS302</b>	<i>a2, P<sub>crg1</sub>:bW2, P<sub>crg1</sub>:bE1, ble<sup>R</sup>, nma1:3xgfp:hyg<sup>R</sup>, mCherry:rab7:nat<sup>R</sup>, Δrab5a::gent<sup>R</sup></i>	Phleo <sup>R</sup> , Hyg <sup>R</sup> , Nat <sup>R</sup> , Gent <sup>R</sup>	UKS276
<b>UKS303/UKS304/UKS305</b>	<i>a1:mfa2 bE1, ble<sup>R</sup>, bW2 Δnma1::nat<sup>R</sup></i>	Phleo <sup>R</sup> , Nat <sup>R</sup>	SG200
<b>UKS306/UKS307/UKS308</b>	<i>a2, P<sub>crg1</sub>:bW2, P<sub>crg1</sub>:bE1, ble<sup>R</sup>, gfp:rab5a_Q90Lmutated:hyg<sup>R</sup>, Δrab5b::gent<sup>R</sup></i>	Phleo <sup>R</sup> , Hyg <sup>R</sup> , Gent <sup>R</sup>	UJKI8
<b>UKS309/UKS310/UKS311</b>	<i>a2, P<sub>crg1</sub>:bW2, P<sub>crg1</sub>:bE1, ble<sup>R</sup>, gfp:rab5b:hyg<sup>R</sup>, Δvps9::nat<sup>R</sup></i>	Phleo <sup>R</sup> , Hyg <sup>R</sup> , Nat <sup>R</sup>	URS1
<b>UKS312/UKS313/UKS314</b>	<i>a2, P<sub>crg1</sub>:bW2, P<sub>crg1</sub>:bE1, ble<sup>R</sup>, ip<sup>R</sup>[P<sub>tef</sub>:yup1:gfp]ip<sup>S</sup>, Δkin3::nat<sup>R</sup></i>	Phleo <sup>R</sup> , Cbx <sup>R</sup> , Nat <sup>R</sup>	UKS244
<b>UKS315/UKS316/UKS317</b>	<i>a2, P<sub>crg1</sub>:bW2, P<sub>crg1</sub>:bE1, ble<sup>R</sup>, gfp:rab5b:hyg<sup>R</sup>, Δkin3::nat<sup>R</sup></i>	Phleo <sup>R</sup> , Hyg <sup>R</sup> , Nat <sup>R</sup>	URS1
<b>UKS318/UKS319/UKS320</b>	<i>a2, P<sub>crg1</sub>:bW2, P<sub>crg1</sub>:bE1, ble<sup>R</sup>, gfp:rab5b:hyg<sup>R</sup>, vps3:3xHA:gent<sup>R</sup>, Δrab5a::nat<sup>R</sup></i>	Phleo <sup>R</sup> , Hyg <sup>R</sup> , Gent <sup>R</sup> , Nat <sup>R</sup>	UKS239

Material und Methoden

<b>UKS321/UKS322/UKS323</b>	<i>a2, P<sub>crg1</sub>:bW2, P<sub>crg1</sub>:bE1, ble<sup>R</sup>, gfp:rab5a_Q90Lmutated:hyg<sup>R</sup>, mCherry:rab5b:gent<sup>R</sup></i>	Phleo <sup>R</sup> , Hyg <sup>R</sup> , Gent <sup>R</sup>	UJKI8
<b>UKS324/UKS325/UKS326</b>	<i>a2, P<sub>crg1</sub>:bW2, P<sub>crg1</sub>:bE1, ble<sup>R</sup>, vps8:3xmCherry:nat<sup>R</sup>, Δrab5a::hyg<sup>R</sup></i>	Phleo <sup>R</sup> , Nat <sup>R</sup> , Hyg <sup>R</sup>	UKS218
<b>UKS327/UKS328/UKS329</b>	<i>a2, P<sub>crg1</sub>:bW2, P<sub>crg1</sub>:bE1, ble<sup>R</sup>, gfp:rab5a_Q90Lmutated:hyg<sup>R</sup>, vps8:3xmCherry:nat<sup>R</sup></i>	Phleo <sup>R</sup> , Hyg <sup>R</sup> , Nat <sup>R</sup>	UJKI8
<b>UKS330/UKS331/UKS332</b>	<i>a2, P<sub>crg1</sub>:bW2, P<sub>crg1</sub>:bE1, ble<sup>R</sup>, Δnma1::hyg<sup>R</sup>, mCherry:rab7:nat<sup>R</sup></i>	Phleo <sup>R</sup> , Hyg <sup>R</sup> , Nat <sup>R</sup>	UTO135
<b>UKS333/UKS334/UKS335</b>	<i>a2, P<sub>crg1</sub>:bW2, P<sub>crg1</sub>:bE1, ble<sup>R</sup>, Δrab5a::hyg<sup>R</sup>, mCherry:rab7:nat<sup>R</sup></i>	Phleo <sup>R</sup> , Hyg <sup>R</sup> , Nat <sup>R</sup>	UKS206
<b>UKS336/UKS337/UKS338</b>	<i>a2, P<sub>crg1</sub>:bW2, P<sub>crg1</sub>:bE1, ble<sup>R</sup>, rrm4:mKate2:nat<sup>R</sup></i>	Phleo <sup>R</sup> , Nat <sup>R</sup>	AB31
<b>UKS339/UKS340/UKS351</b>	<i>a2, P<sub>crg1</sub>:bW2, P<sub>crg1</sub>:bE1, ble<sup>R</sup>, Δnma1::hyg<sup>R</sup>, rrm4:mKate2:nat<sup>R</sup></i>	Phleo <sup>R</sup> , Hyg <sup>R</sup> , Nat <sup>R</sup>	UTO135
<b>UKS342/UKS343/UKS344</b>	<i>a2, P<sub>crg1</sub>:bW2, P<sub>crg1</sub>:bE1, ble<sup>R</sup>, gfp:rab5a:hyg<sup>R</sup>, vps3:mKate2:nat<sup>R</sup></i>	Phleo <sup>R</sup> , Hyg <sup>R</sup> , Nat <sup>R</sup>	UKS91
<b>UKS345/UKS346/UKS347</b>	<i>a2, P<sub>crg1</sub>:bW2, P<sub>crg1</sub>:bE1, ble<sup>R</sup>, gfp:rab5a_Q90Lmutated:hyg<sup>R</sup>, vps3:mKate2:nat<sup>R</sup></i>	Phleo <sup>R</sup> , Hyg <sup>R</sup> , Nat <sup>R</sup>	UJKI8
<b>UKS348/UKS349/UKS350</b>	<i>a2, P<sub>crg1</sub>:bW2, P<sub>crg1</sub>:bE1, ble<sup>R</sup>, gfp:rab5b:hyg<sup>R</sup>, tub2:rfp:nat<sup>R</sup></i>	Phleo <sup>R</sup> , Hyg <sup>R</sup> , Nat <sup>R</sup>	URS1
<b>UKS352/UKS353/UKS354</b>	<i>a1, b1, Δrab5b::gent<sup>R</sup></i>	Gent <sup>R</sup>	FB1
<b>UKS355/UKS356/UKS357</b>	<i>a2, P<sub>crg1</sub>:bW2, P<sub>crg1</sub>:bE1, ble<sup>R</sup>, gfp:rab5a:hyg<sup>R</sup>, Δrab5b::gent<sup>R</sup></i>	Phleo <sup>R</sup> , Hyg <sup>R</sup> , Gent <sup>R</sup>	UKS91
<b>UKS358/UKS408/UKS409</b>	<i>a2, P<sub>crg1</sub>:bW2, P<sub>crg1</sub>:bE1, ble<sup>R</sup>, vps3:gfp:hyg<sup>R</sup>, vps8:3xmCherry:nat<sup>R</sup>, Δrab5a::gent<sup>R</sup></i>	Phleo <sup>R</sup> , Hyg <sup>R</sup> , Nat <sup>R</sup> , Gent <sup>R</sup>	UKS236
<b>UKS359/UKS360/UKS361</b>	<i>a2, P<sub>crg1</sub>:bW2, P<sub>crg1</sub>:bE1, ble<sup>R</sup>, vps3:gfp:hyg<sup>R</sup>, Δrab5b::gent<sup>R</sup></i>	Phleo <sup>R</sup> , Hyg <sup>R</sup> , Gent <sup>R</sup>	UKS123
<b>UKS362/UKS363/UKS364</b>	<i>a2, P<sub>crg1</sub>:bW2, P<sub>crg1</sub>:bE1, ble<sup>R</sup>, vps3:gfp:hyg<sup>R</sup>, vps8:3xmCherry:nat<sup>R</sup>, Δrab5b::gent<sup>R</sup></i>	Phleo <sup>R</sup> , Hyg <sup>R</sup> , Nat <sup>R</sup> , Gent <sup>R</sup>	UKS236

<b>UKS365/UKS366/UKS367</b>	<i>a2, P<sub>crG1</sub>:bW2, P<sub>crG1</sub>:bE1, ble<sup>R</sup>, gfp:rab5a:hyg<sup>R</sup>, mCherry:rab5b:gent<sup>R</sup>, Δnma1::nat<sup>R</sup></i>	Phleo <sup>R</sup> , Hyg <sup>R</sup> , Gent <sup>R</sup> , Nat <sup>R</sup>	UKS273
<b>UKS368/UKS412/UKS413</b>	<i>a2, P<sub>crG1</sub>:bW2, P<sub>crG1</sub>:bE1, ble<sup>R</sup>, gfp:rab5a:hyg<sup>R</sup>, vps3:mKate2:nat<sup>R</sup>, Δnma1::gent<sup>R</sup></i>	Phleo <sup>R</sup> , Hyg <sup>R</sup> , Nat <sup>R</sup> , Gent <sup>R</sup>	UKS342
<b>UKS369/UKS370/UKS371</b>	<i>a2, P<sub>crG1</sub>:bW2, P<sub>crG1</sub>:bE1, ble<sup>R</sup>, gfp:rab5a:hyg<sup>R</sup>, vps8:3xmCherry:nat<sup>R</sup>, Δnma1::gent<sup>R</sup></i>	Phleo <sup>R</sup> , Hyg <sup>R</sup> , Nat <sup>R</sup> , Gent <sup>R</sup>	UKS233
<b>UKS372/UKS373/UKS374</b>	<i>a2, P<sub>crG1</sub>:bW2, P<sub>crG1</sub>:bE1, ble<sup>R</sup>, gfp:rab5a:hyg<sup>R</sup>, mCherry:rab7:nat<sup>R</sup>, Δnma1::gent<sup>R</sup></i>	Phleo <sup>R</sup> , Hyg <sup>R</sup> , Nat <sup>R</sup> , Gent <sup>R</sup>	UKS258
<b>UKS375/UKS410/UKS411</b>	<i>a2, P<sub>crG1</sub>:bW2, P<sub>crG1</sub>:bE1, ble<sup>R</sup>, vps3:gfp:hyg<sup>R</sup>, vps8:3xmCherry:nat<sup>R</sup>, Δnma1::gent<sup>R</sup></i>	Phleo <sup>R</sup> , Hyg <sup>R</sup> , Nat <sup>R</sup> , Gent <sup>R</sup>	UKS236
<b>UKS376/UKS377/UKS378</b>	<i>a2, P<sub>crG1</sub>:bW2, P<sub>crG1</sub>:bE1, ble<sup>R</sup>, gfp:rab5a:hyg<sup>R</sup>, mCherry:rab5b:gent<sup>R</sup>, Δrab5c::nat<sup>R</sup></i>	Phleo <sup>R</sup> , Hyg <sup>R</sup> , Gent <sup>R</sup> , Nat <sup>R</sup>	UKS273
<b>UKS379/UKS380/UKS417</b>	<i>a2, P<sub>crG1</sub>:bW2, P<sub>crG1</sub>:bE1, ble<sup>R</sup>, nma1:3xgfp:hyg<sup>R</sup>, vps8:3xmCherry:nat<sup>R</sup>, Δvps3::gent<sup>R</sup></i>	Phleo <sup>R</sup> , Hyg <sup>R</sup> , Nat <sup>R</sup> , Gent <sup>R</sup>	UKS288
<b>UKS381/UKS382/UKS383</b>	<i>a2, P<sub>crG1</sub>:bW2, P<sub>crG1</sub>:bE1, ble<sup>R</sup>, gfp:rab5a:hyg<sup>R</sup>, nma1:3xmCherry:nat<sup>R</sup>, Δvps3::gent<sup>R</sup></i>	Phleo <sup>R</sup> , Hyg <sup>R</sup> , Nat <sup>R</sup> , Gent <sup>R</sup>	UKS176
<b>UKS384/UKS385/UKS386</b>	<i>a2, P<sub>crG1</sub>:bW2, P<sub>crG1</sub>:bE1, ble<sup>R</sup>, vps3:gfp:hyg<sup>R</sup>, nma1:3xmCherry:nat<sup>R</sup>, Δrab5c::gent<sup>R</sup></i>	Phleo <sup>R</sup> , Hyg <sup>R</sup> , Nat <sup>R</sup> , Gent <sup>R</sup>	UKS267
<b>UKS387/UKS388/UKS389</b>	<i>a2, P<sub>crG1</sub>:bW2, P<sub>crG1</sub>:bE1, ble<sup>R</sup>, gfp:rab5b:hyg<sup>R</sup>, ip<sup>R</sup>[P<sub>tef</sub>:yup1:mCherry]ip<sup>S</sup>, Δrab5a::nat<sup>R</sup></i>	Phleo <sup>R</sup> , Hyg <sup>R</sup> , Cbx <sup>R</sup> , Nat <sup>R</sup>	UEB4
<b>UKS390/UKS391/UKS392</b>	<i>a2, P<sub>crG1</sub>:bW2, P<sub>crG1</sub>:bE1, ble<sup>R</sup>, vps3:gfp:hyg<sup>R</sup>, vps8:3xmCherry:nat<sup>R</sup>, Δrab5c::gent<sup>R</sup></i>	Phleo <sup>R</sup> , Hyg <sup>R</sup> , Nat <sup>R</sup> , Gent <sup>R</sup>	UKS236
<b>UKS393/UKS394/UKS395</b>	<i>a2, P<sub>crG1</sub>:bW2, P<sub>crG1</sub>:bE1, ble<sup>R</sup>, Δrab5c::nat<sup>R</sup></i>	Phleo <sup>R</sup> , Nat <sup>R</sup>	AB31

## Material und Methoden

<b>UKS396</b>	<i>a2, P<sub>crG1</sub>:bW2, P<sub>crG1</sub>:bE1, ble<sup>R</sup>, Δrab5a::nat<sup>R</sup>, ip<sup>R</sup>[P<sub>tef</sub>:yup1:gfp]ip<sup>S</sup>, Δrab5c::gent<sup>R</sup></i>	Phleo <sup>R</sup> , Nat <sup>R</sup> , Cbx <sup>R</sup> , Gent <sup>R</sup>	UKS213
<b>UKS397/UKS398/UKS399</b>	<i>a2, P<sub>crG1</sub>:bW2, P<sub>crG1</sub>:bE1, ble<sup>R</sup>, vps8:3xmCherry:nat<sup>R</sup>, tub3:gfp:hyg<sup>R</sup></i>	Phleo <sup>R</sup> , Nat <sup>R</sup> , Hyg <sup>R</sup>	UKS218
<b>UKS400/UKS401/UKS402</b>	<i>a2, P<sub>crG1</sub>:bW2, P<sub>crG1</sub>:bE1, ble<sup>R</sup>, mCherry:rab5b:gent<sup>R</sup></i>	Phleo <sup>R</sup> , Gent <sup>R</sup>	AB31
<b>UKS403/UKS404</b>	<i>a2, P<sub>crG1</sub>:bW2, P<sub>crG1</sub>:bE1, ble<sup>R</sup>, gfp:rab5b:hyg<sup>R</sup>, tub3:mKate2:gent<sup>R</sup></i>	Phleo <sup>R</sup> , Hyg <sup>R</sup> , Gent <sup>R</sup>	URS1
<b>UKS405/UKS406/UKS407</b>	<i>a2, P<sub>crG1</sub>:bW2, P<sub>crG1</sub>:bE1, ble<sup>R</sup>, gfp:rab5a:hyg<sup>R</sup>, tub3:mKate2:gent<sup>R</sup></i>	Phleo <sup>R</sup> , Hyg <sup>R</sup> , Gent <sup>R</sup>	UKS91
<b>UKS414/UKS415/UKS416</b>	<i>a2, P<sub>crG1</sub>:bW2, P<sub>crG1</sub>:bE1, ble<sup>R</sup>, vps3:gfp:hyg<sup>R</sup>, mCherry:rab5b:gent<sup>R</sup></i>	Phleo <sup>R</sup> , Hyg <sup>R</sup> , Gent <sup>R</sup>	UKS123
<b>UKS418/UKS419/UKS420</b>	<i>a2, P<sub>crG1</sub>:bW2, P<sub>crG1</sub>:bE1, ble<sup>R</sup>, gfp:rab5a:hyg<sup>R</sup>, vps8:3xmCherry:nat<sup>R</sup>, Δvps3::gent<sup>R</sup></i>	Phleo <sup>R</sup> , Hyg <sup>R</sup> , Nat <sup>R</sup> , Gent <sup>R</sup>	UKS233
<b>UKS421/UKS422/UKS423</b>	<i>a2, P<sub>crG1</sub>:bW2, P<sub>crG1</sub>:bE1, ble<sup>R</sup>, vps8:3xmCherry:nat<sup>R</sup>, Δvps3::gent<sup>R</sup></i>	Phleo <sup>R</sup> , Nat <sup>R</sup> , Gent <sup>R</sup>	UKS218
<b>UKS424/UKS425</b>	<i>a2, P<sub>crG1</sub>:bW2, P<sub>crG1</sub>:bE1, ble<sup>R</sup>, gfp:rab5a:hyg<sup>R</sup>, Δrab5b::gent<sup>R</sup>, Δrab5c::nat<sup>R</sup></i>	Phleo <sup>R</sup> , Hyg <sup>R</sup> , Gent <sup>R</sup> , Nat <sup>R</sup>	UKS355
<b>UKS426/UKS427</b>	<i>a2, P<sub>crG1</sub>:bW2, P<sub>crG1</sub>:bE1, ble<sup>R</sup>, Δrab5a::nat<sup>R</sup>, ip<sup>R</sup>[P<sub>tef</sub>:yup1:gfp]ip<sup>S</sup>, Δrab5c::gent<sup>R</sup></i>	Phleo <sup>R</sup> , Nat <sup>R</sup> , Cbx <sup>R</sup> , Gent <sup>R</sup>	UKS213
<b>UKS428/UKS429/UKS430</b>	<i>a2, P<sub>crG1</sub>:bW2, P<sub>crG1</sub>:bE1, ble<sup>R</sup>, vps8:3xmCherry:nat<sup>R</sup>, tub3:gfp:hyg<sup>R</sup>, Δnma1::gent<sup>R</sup></i>	Phleo <sup>R</sup> , Nat <sup>R</sup> , Hyg <sup>R</sup> , Gent <sup>R</sup>	UKS397
<b>UKS431/UKS546/UKS547</b>	<i>a2, P<sub>crG1</sub>:bW2, P<sub>crG1</sub>:bE1, ble<sup>R</sup>, gfp:rab5b:hyg<sup>R</sup>, vps8:3xmCherry:nat<sup>R</sup></i>	Phleo <sup>R</sup> , Hyg <sup>R</sup> , Nat <sup>R</sup>	URS1
<b>UKS432/UKS433/UKS434</b>	<i>a2, P<sub>crG1</sub>:bW2, P<sub>crG1</sub>:bE1, ble<sup>R</sup>, vps8:3xmCherry:nat<sup>R</sup>, tub3:gfp:hyg<sup>R</sup>, Δrab5a::gent<sup>R</sup></i>	Phleo <sup>R</sup> , Nat <sup>R</sup> , Hyg <sup>R</sup> , Gent <sup>R</sup>	UKS397

<b>UKS435-UKS478</b>	<i>a1, a2, b1, b2, Δrab5b::gent<sup>R</sup>, Δrab5b::gent<sup>R</sup></i>	Gent <sup>R</sup>	Sporenkolonien aus Kreuzung UKS352XURS6
<b>UKS479</b>	<i>a2, P<sub>crg1</sub>:bW2, P<sub>crg1</sub>:bE1, ble<sup>R</sup>, gfp:rab5a:hyg<sup>R</sup>, Δvps9::nat<sup>R</sup>, Δvps3::gent<sup>R</sup></i>	Phleo <sup>R</sup> , Hyg <sup>R</sup> , Nat <sup>R</sup> , Gent <sup>R</sup>	UKS141
<b>UKS480/UKS481/UKS482</b>	<i>a2, P<sub>crg1</sub>:bW2, P<sub>crg1</sub>:bE1, ble<sup>R</sup>, gfp:rab5b:hyg<sup>R</sup>, ip<sup>R</sup>[P<sub>otef</sub>:mCherry:tub1]ip<sup>S</sup></i>	Phleo <sup>R</sup> , Hyg <sup>R</sup> , Cbx <sup>R</sup>	URS1
<b>UKS483/UKS484/UKS485</b>	<i>a2, P<sub>crg1</sub>:bW2, P<sub>crg1</sub>:bE1, ble<sup>R</sup>, vps8:3xMyc:hyg<sup>R</sup>, Δvps3::nat<sup>R</sup></i>	Phleo <sup>R</sup> , Hyg <sup>R</sup> , Nat <sup>R</sup>	UKS179
<b>UKS486/UKS487/UKS488</b>	<i>a2, P<sub>crg1</sub>:bW2, P<sub>crg1</sub>:bE1, ble<sup>R</sup>, vps3:3xHA:gent<sup>R</sup>, Δrab5a::nat<sup>R</sup></i>	Phleo <sup>R</sup> , Gent <sup>R</sup> , Nat <sup>R</sup>	UKS163
<b>UKS489/UKS490/UKS491</b>	<i>a2, P<sub>crg1</sub>:bW2, P<sub>crg1</sub>:bE1, ble<sup>R</sup>, vps8:3xMyc:hyg<sup>R</sup>, Δrab5a::nat<sup>R</sup></i>	Phleo <sup>R</sup> , Hyg <sup>R</sup> , Nat <sup>R</sup>	UKS179
<b>UKS492/UKS493</b>	<i>a2, P<sub>crg1</sub>:bW2, P<sub>crg1</sub>:bE1, ble<sup>R</sup>, vps8:3xmCherry:nat<sup>R</sup>, ip<sup>R</sup>[P<sub>nar1</sub>:gfp:rab5c]ip<sup>S</sup></i>	Phleo <sup>R</sup> , Nat <sup>R</sup> , Cbx <sup>R</sup>	UKS218
<b>UKS494/UKS495/UKS496</b>	<i>a2, P<sub>crg1</sub>:bW2, P<sub>crg1</sub>:bE1, ble<sup>R</sup>, Δrab5b::gent<sup>R</sup>, nma1:3xmCherry:nat<sup>R</sup></i>	Phleo <sup>R</sup> , Gent <sup>R</sup> , Nat <sup>R</sup>	URS3
<b>UKS497/UKS541/UKS542/ UKS543/UKS544/UKS545</b>	<i>a2, P<sub>crg1</sub>:bW2, P<sub>crg1</sub>:bE1, ble<sup>R</sup>, gfp:rab5a:hyg<sup>R</sup>, ip<sup>R</sup>[P<sub>hxt1</sub>:nma1:mCherry]ip<sup>S</sup></i>	Phleo <sup>R</sup> , Hyg <sup>R</sup> , Cbx <sup>R</sup>	UKS91
<b>UKS498/UKS499</b>	<i>a2, P<sub>crg1</sub>:bW2, P<sub>crg1</sub>:bE1, ble<sup>R</sup>, Δrab5b::gent<sup>R</sup>, ip<sup>R</sup>[P<sub>otef</sub>:mCherry:tub1]ip<sup>S</sup></i>	Phleo <sup>R</sup> , Gent <sup>R</sup> , Cbx <sup>R</sup>	URS3
<b>UKS500/UKS501/UKS502</b>	<i>a2, P<sub>crg1</sub>:bW2, P<sub>crg1</sub>:bE1, ble<sup>R</sup>, nma1:3xmCherry:nat<sup>R</sup></i>	Phleo <sup>R</sup> , Nat <sup>R</sup>	AB31
<b>UKS503/UKS504/UKS505</b>	<i>a2, P<sub>crg1</sub>:bW2, P<sub>crg1</sub>:bE1, ble<sup>R</sup>, vps8:3xMyc:hyg<sup>R</sup>, nma1:3xHA:gent<sup>R</sup></i>	Phleo <sup>R</sup> , Hyg <sup>R</sup> , Gent <sup>R</sup>	UKS179
<b>UKS506/UKS507/UKS508</b>	<i>a2, P<sub>crg1</sub>:bW2, P<sub>crg1</sub>:bE1, ble<sup>R</sup>, gfp:rab5b:hyg<sup>R</sup>, vps8:3xmCherry:nat<sup>R</sup>, Δnma1::gent<sup>R</sup></i>	Phleo <sup>R</sup> , Hyg <sup>R</sup> , Nat <sup>R</sup> , Gent <sup>R</sup>	UKS431
<b>UKS509/UKS510/UKS511</b>	<i>a2, P<sub>crg1</sub>:bW2, P<sub>crg1</sub>:bE1, ble<sup>R</sup>, vps8:3xMyc:hyg<sup>R</sup>, vps3:3xHA:gent<sup>R</sup>, Δrab5a::nat<sup>R</sup></i>	Phleo <sup>R</sup> , Hyg <sup>R</sup> , Gent <sup>R</sup> , Nat <sup>R</sup>	UKS185

Material und Methoden

<b>UKS512/UKS513/UKS514</b>	<i>a1, a2, b1, b2</i>		Sporenkolonien aus Kreuzung FB1XFB2
<b>UKS515/UKS516/UKS517</b>	<i>a1, a2, b1, b2, Δnma1::hyg<sup>R</sup>, Δnma1::nat<sup>R</sup></i>	Hyg <sup>R</sup> , Nat <sup>R</sup>	Sporenkolonien aus Kreuzung UKS198XUKS201
<b>UKS518/UKS519/UKS520</b>	<i>a2, P<sub>crg1</sub>:bW2, P<sub>crg1</sub>:bE1, ble<sup>R</sup>, Δrab5b::gent<sup>R</sup>, nup192:3xgfp:hyg<sup>R</sup></i>	Phleo <sup>R</sup> , Gent <sup>R</sup> , Hyg <sup>R</sup>	URS3
<b>UKS521/UKS522/UKS523</b>	<i>a2, P<sub>crg1</sub>:bW2, P<sub>crg1</sub>:bE1, ble<sup>R</sup>, nma1:3xHA:gent<sup>R</sup></i>	Phleo <sup>R</sup> , Gent <sup>R</sup>	AB31
<b>UKS524/UKS525/UKS526/ UKS527/UKS528</b>	<i>a2, P<sub>crg1</sub>:bW2, P<sub>crg1</sub>:bE1, ble<sup>R</sup>, Δrab5b::gent<sup>R</sup>, ip<sup>R</sup>[P<sub>otef</sub>:CALR:mKate2]ip<sup>S</sup></i>	Phleo <sup>R</sup> , Gent <sup>R</sup> , Cbx <sup>R</sup>	URS3
<b>UKS529/UKS558</b>	<i>a2, P<sub>crg1</sub>:bW2, P<sub>crg1</sub>:bE1, ble<sup>R</sup>, ip<sup>R</sup>[P<sub>otef</sub>:CALR:mKate2]ip<sup>S</sup></i>	Phleo <sup>R</sup> , Cbx <sup>R</sup>	AB31
<b>UKS530/UKS531</b>	<i>a2, P<sub>crg1</sub>:bW2, P<sub>crg1</sub>:bE1, ble<sup>R</sup>, peb1:gfp:nat<sup>R</sup></i>	Phleo <sup>R</sup> , Nat <sup>R</sup>	AB31
<b>UKS532/UKS533/UKS534</b>	<i>a2, P<sub>crg1</sub>:bW2, P<sub>crg1</sub>:bE1, ble<sup>R</sup>, vps8:3xMyc:hyg<sup>R</sup>, nma1:3xHA:gent<sup>R</sup>, Δvps3::nat<sup>R</sup></i>	Phleo <sup>R</sup> , Hyg <sup>R</sup> , Gent <sup>R</sup> , Nat <sup>R</sup>	UKS503
<b>UKS535/UKS536/UKS537</b>	<i>a2, P<sub>crg1</sub>:bW2, P<sub>crg1</sub>:bE1, ble<sup>R</sup>, Δrab5b::gent<sup>R</sup>, ip<sup>R</sup>[P<sub>otef</sub>:mCherry:tub1]ip<sup>S</sup>, nup192:3xgfp:hyg<sup>R</sup></i>	Phleo <sup>R</sup> , Gent <sup>R</sup> , Cbx <sup>R</sup> , Hyg <sup>R</sup>	UKS498
<b>UKS538/UKS539/UKS540</b>	<i>a2, P<sub>crg1</sub>:bW2, P<sub>crg1</sub>:bE1, ble<sup>R</sup>, Δrab5b::gent<sup>R</sup>, nma1:3xmCherry:nat<sup>R</sup>, nup192:3xgfp:hyg<sup>R</sup></i>	Phleo <sup>R</sup> , Gent <sup>R</sup> , Nat <sup>R</sup> , Hyg <sup>R</sup>	UKS494
<b>UKS548</b>	<i>a2, P<sub>crg1</sub>:bW2, P<sub>crg1</sub>:bE1, ble<sup>R</sup>, vps3:gfp:hyg<sup>R</sup>, mCherry:rab5b:gent<sup>R</sup>, Δrab5a::nat<sup>R</sup></i>	Phleo <sup>R</sup> , Hyg <sup>R</sup> , Gent <sup>R</sup> , Nat <sup>R</sup>	UKS414
<b>UKS549</b>	<i>a1, a2, b1, b2, Δrab5b::gent<sup>R</sup>, Δrab5b::gent<sup>R</sup>, ip<sup>R</sup>[P<sub>otef</sub>:mCherry:tub1]ip<sup>S</sup></i>	Gent <sup>R</sup> , Cbx <sup>R</sup>	UKS436
<b>UKS550/UKS551/UKS559</b>	<i>a1, a2, b1, b2, ip<sup>R</sup>[P<sub>otef</sub>:mCherry:tub1]ip<sup>S</sup></i>	Cbx <sup>R</sup>	UKS512
<b>UKS552/UKS553/UKS554</b>	<i>a2, P<sub>crg1</sub>:bW2, P<sub>crg1</sub>:bE1, ble<sup>R</sup>, Δrab5b::gent<sup>R</sup>, nup192:3xgfp:hyg<sup>R</sup>, ip<sup>R</sup>[P<sub>otef</sub>:CALR:mKate2]ip<sup>S</sup></i>	Phleo <sup>R</sup> , Gent <sup>R</sup> , Hyg <sup>R</sup> , Cbx <sup>R</sup>	UKS518
<b>UKS555/UKS556/UKS557</b>	<i>a2, b2, Δrab5a::nat<sup>R</sup></i>	Nat <sup>R</sup>	FB2

<b>UKS560/UKS561/UKS562</b>	<i>a1, a2, b1, b2, Δrab5a::nat<sup>R</sup>, Δrab5a::nat<sup>R</sup></i>	Nat <sup>R</sup>	FBD11
<b>UKS563/UKS564</b>	<i>a1, a2, b1, b2, Δrab5a::nat<sup>R</sup></i>	Nat <sup>R</sup>	FBD11
<b>UKS565</b>	<i>a1, a2, b1, b2, gfp:rab5b::hyg<sup>R</sup>, gfp:rab5b::hyg<sup>R</sup></i>	Hyg <sup>R</sup>	FBD11
<b>UKS566/UKS567/UKS568</b>	<i>a1, a2, b1, b2, gfp:rab5b::hyg<sup>R</sup></i>	Hyg <sup>R</sup>	FBD11
<b>UKS569/UKS570/UKS571</b>	<i>a2, b2, Δrab5a::gent<sup>R</sup></i>	Gent <sup>R</sup>	FB2
<b>UKS572</b>	<i>a1, a2, b1, b2, Δrab5b::gent<sup>R</sup>, Δrab5b::gent<sup>R</sup></i>	Gent <sup>R</sup>	FBD11
<b>UKS573/UKS574/UKS575</b>	<i>a1, a2, b1, b2, Δrab5b::gent<sup>R</sup></i>	Gent <sup>R</sup>	FBD11
<b>UKS576/UKS577</b>	<i>a2, P<sub>crg1</sub>:bW2, P<sub>crg1</sub>:bE1, ble<sup>R</sup>, Δrab5a::hyg<sup>R</sup>, peb1:gfp:nat<sup>R</sup></i>	Phleo <sup>R</sup> , Hyg <sup>R</sup> , Nat <sup>R</sup>	UKS206
<b>UKS578/UKS579/UKS604</b>	<i>a1, a2, b1, b2, gfp:rab5b:hyg<sup>R</sup></i>	Hyg <sup>R</sup>	UKS514
<b>UKS580/UKS581/UKS582/ UKS583</b>	<i>a1, a2, b1, b2, Δrab5b::gent<sup>R</sup>, Δrab5b::gent<sup>R</sup>, ip<sup>R</sup>[P<sub>otef</sub>:CALR:mKate2]ip<sup>S</sup></i>	Gent <sup>R</sup> , Cbx <sup>R</sup>	UKS572
<b>UKS584</b>	<i>a1, a2, b1, b2, ip<sup>R</sup>[P<sub>otef</sub>:CALR:mKate2]ip<sup>S</sup></i>	Cbx <sup>R</sup>	UKS514
<b>UKS585/UKS586/UKS587</b>	<i>a2, P<sub>crg1</sub>:bW2, P<sub>crg1</sub>:bE1, ble<sup>R</sup>, Δrab5a::hyg<sup>R</sup>, peb1:gfp:nat<sup>R</sup>, mCherry:rab5b:gent<sup>R</sup></i>	Phleo <sup>R</sup> , Hyg <sup>R</sup> , Nat <sup>R</sup> , Gent <sup>R</sup>	UKS576
<b>UKS588/UKS589/UKS590</b>	<i>a2, P<sub>crg1</sub>:bW2, P<sub>crg1</sub>:bE1, ble<sup>R</sup>, Δrab5a::hyg<sup>R</sup>, peb1:gfp:nat<sup>R</sup>, vps3:mKate2:gent<sup>R</sup></i>	Phleo <sup>R</sup> , Hyg <sup>R</sup> , Nat <sup>R</sup> , Gent <sup>R</sup>	UKS576
<b>UKS591/UKS592/UKS593</b>	<i>a2, P<sub>crg1</sub>:bW2, P<sub>crg1</sub>:bE1, ble<sup>R</sup>, peb1:gfp:nat<sup>R</sup>, Δrab5a::gent<sup>R</sup></i>	Phleo <sup>R</sup> , Nat <sup>R</sup> , Gent <sup>R</sup>	UKS530
<b>UKS594/UKS595/UKS605/ UKS606/UKS607/UKS608/ UKS609/UKS610</b>	<i>a1, a2, b1, b2, Δrab5b::gent<sup>R</sup>, Δrab5b::gent<sup>R</sup>, ip<sup>R</sup>[P<sub>otef</sub>:CALR:mKate2]ip<sup>S</sup></i>	Gent <sup>R</sup> , Cbx <sup>R</sup>	UKS436
<b>UKS596/UKS597</b>	<i>a1, a2, b1, b2, Δrab5b::gent<sup>R</sup>, Δrab5b::gent<sup>R</sup>, nup192:3xgfp:hyg<sup>R</sup></i>	Gent <sup>R</sup> , Hyg <sup>R</sup>	UKS572
<b>UKS598</b>	<i>a1, a2, b1, b2, nup192:3xgfp:hyg<sup>R</sup></i>	Hyg <sup>R</sup>	UKS514
<b>UKS599</b>	<i>a2, P<sub>crg1</sub>:bW2, P<sub>crg1</sub>:bE1, ble<sup>R</sup>, Δrab5a::hyg<sup>R</sup>, peb1:gfp:nat<sup>R</sup>, ip<sup>R</sup>[P<sub>ter</sub>yup1:mCherry]ip<sup>S</sup></i>	Phleo <sup>R</sup> , Hyg <sup>R</sup> , Nat <sup>R</sup> , Cbx <sup>R</sup>	UKS576

Material und Methoden

<b>UKS600/UKS601/UKS602</b>	<i>a1, a2, b1, b2, Δrab5b::gent<sup>R</sup>, Δrab5b::gent<sup>R</sup>, ip<sup>R</sup>[P<sub>otef</sub>:mCherry:tub1]ip<sup>S</sup></i>	Gent <sup>R</sup> , Cbx <sup>R</sup>	UKS435
<b>UKS603</b>	<i>a1, a2, b1, b2, Δrab5a::nat<sup>R</sup>, Δrab5a::nat<sup>R</sup>, ip<sup>R</sup>[P<sub>otef</sub>:mCherry:tub1]ip<sup>S</sup></i>	Nat <sup>R</sup> , Cbx <sup>R</sup>	UKS560
<b>UKS611/UKS612/UKS613</b>	<i>a1, a2, b1, b2, Δrab5b::gent<sup>R</sup>, Δrab5b::gent<sup>R</sup>, ip<sup>R</sup>[P<sub>otef</sub>:CALR:mKate2]ip<sup>S</sup></i>	Gent <sup>R</sup> , Cbx <sup>R</sup>	UKS435
<b>UKS614/UKS615</b>	<i>a2, P<sub>crG1</sub>:bW2, P<sub>crG1</sub>:bE1, ble<sup>R</sup>, gfp:rab5b:hyg<sup>R</sup>, Δnma1::nat<sup>R</sup>, ip<sup>R</sup>[P<sub>otef</sub>:mCherry:tub1]ip<sup>S</sup></i>	Phleo <sup>R</sup> , Hyg <sup>R</sup> , Nat <sup>R</sup> , Cbx <sup>R</sup>	UKS119
<b>UKS616/UKS617</b>	<i>a2, P<sub>crG1</sub>:bW2, P<sub>crG1</sub>:bE1, ble<sup>R</sup>, gfp:rab5a:hyg<sup>R</sup>, Δrab5b::gent<sup>R</sup>, ip<sup>R</sup>[P<sub>otef</sub>:mCherry:tub1]ip<sup>S</sup></i>	Phleo <sup>R</sup> , Hyg <sup>R</sup> , Gent <sup>R</sup> , Cbx <sup>R</sup>	UKS355
<b>UEB4<sup>1)</sup></b>	<i>a2 P<sub>crG1</sub>:bW2, bE1 gfp:rab5b:hyg<sup>R</sup>, ip<sup>R</sup>[P<sub>tef</sub>:yup1:mCherry]ip<sup>S</sup></i>	Phleo <sup>R</sup> , Hyg <sup>R</sup> , Cbx <sup>R</sup>	URS1
<b>UEB7<sup>1)</sup></b>	<i>a2 P<sub>crG1</sub>:bW2, bE1 vps3:gfp:hyg<sup>R</sup>, mCherry:rab5b:gent<sup>R</sup></i>	Phleo <sup>R</sup> , Hyg <sup>R</sup> , Gent <sup>R</sup>	UKS123
<b>UGB15<sup>2)</sup></b>	<i>a2 P<sub>crG1</sub>:bW2, bE1 gfp:rab5a:hyg<sup>R</sup>, ip<sup>R</sup>[P<sub>tef</sub>:yup1:mCherry]ip<sup>S</sup></i>	Phleo <sup>R</sup> , Hyg <sup>R</sup> , Cbx <sup>R</sup>	UKS91
<b>UGB21<sup>2)</sup></b>	<i>a2 P<sub>crG1</sub>:bW2, bE1 gfp:rab5a_Q90Lmutated:hyg<sup>R</sup>, ip<sup>R</sup>[P<sub>tef</sub>:mCherry:yup1]ip<sup>S</sup></i>	Phleo <sup>R</sup> , Hyg <sup>R</sup> , Cbx <sup>R</sup>	UJKI8
<b>UGB25<sup>2)</sup></b>	<i>a2 P<sub>crG1</sub>:bW2, bE1 gfp:rab5a_S45Nmutated:hyg<sup>R</sup>, ip<sup>R</sup>[P<sub>tef</sub>:yup1:mCherry]ip<sup>S</sup></i>	Phleo <sup>R</sup> , Hyg <sup>R</sup> , Cbx <sup>R</sup>	UJKI5
<b>UJKI5<sup>3)</sup></b>	<i>a2 P<sub>crG1</sub>:bW2, bE1 gfp:rab5a_S45Nmutated:hyg<sup>R</sup></i>	Phleo <sup>R</sup> , Hyg <sup>R</sup>	UKS47
<b>UJKI8<sup>3)</sup></b>	<i>a2 P<sub>crG1</sub>:bW2, bE1 gfp:rab5a_Q90Lmutated:hyg<sup>R</sup></i>	Phleo <sup>R</sup> , Hyg <sup>R</sup>	UKS47
<b>UJKI21<sup>3)</sup></b>	<i>a2 P<sub>crG1</sub>:bW2, bE1 gfp:rab5a_Q90Lmutated:hyg<sup>R</sup>, nma1:3xmCherry:nat<sup>R</sup></i>	Phleo <sup>R</sup> , Hyg <sup>R</sup> , Nat <sup>R</sup>	UJKI8
<b>UJKI27<sup>3)</sup></b>	<i>a2 P<sub>crG1</sub>:bW2, bE1 gfp:rab5a_Q90Lmutated:hyg<sup>R</sup>, ip<sup>R</sup>[P<sub>hxt1</sub>:2xfyve:mCherry]ip<sup>S</sup></i>	Phleo <sup>R</sup> , Hyg <sup>R</sup> , Cbx <sup>R</sup>	UJKI8
<b>URS1<sup>4)</sup></b>	<i>a2 P<sub>crG1</sub>:bW2, bE1, gfp:rab5b:hyg<sup>R</sup></i>	Phleo <sup>R</sup> , Hyg <sup>R</sup>	AB31



<b>URS2<sup>4)</sup></b>	<i>a2 P<sub>crG1</sub>:bW2, bE1</i> <i>ip<sup>R</sup>[P<sub>tef</sub>:mCherry:rab5a]ip<sup>S</sup>,</i> <i>gfp:rab5b:hyg<sup>R</sup></i>	Phleo <sup>R</sup> , Cbx <sup>R</sup> , Hyg <sup>R</sup>	UKS16
<b>URS3<sup>4)</sup></b>	<i>a2 P<sub>crG1</sub>:bW2, bE1, Δrab5b::gent<sup>R</sup></i>	Phleo <sup>R</sup> , Gent <sup>R</sup>	AB31
<b>URS4<sup>4)</sup></b>	<i>a2, P<sub>crG1</sub>:bW2, bE1,</i> <i>nma1:3xgfp:hyg<sup>R</sup>, Δrab5b::gent<sup>R</sup></i>	Phleo <sup>R</sup> , Hyg <sup>R</sup> , Gent <sup>R</sup>	UNP1
<b>URS5<sup>4)</sup></b>	<i>a2 P<sub>crG1</sub>:bW2 bE1,</i> <i>nma1:3xgfp:hyg<sup>R</sup>,</i> <i>ip<sup>R</sup>[P<sub>otef</sub>:mCherry:tub1]ip<sup>S</sup>,</i> <i>Δrab5b::gent<sup>R</sup></i>	Phleo <sup>R</sup> , Hyg <sup>R</sup> , Cbx <sup>R</sup> , Gent <sup>R</sup>	UNP2
<b>URS6<sup>4)</sup></b>	<i>a2, b2, Δrab5b::gent<sup>R</sup></i>	Gent <sup>R</sup>	FB2
<b>URS7<sup>4)</sup></b>	<i>a1:mfa2 bE1, bW2 Δrab5b::gent<sup>R</sup></i>	Phleo <sup>R</sup> , Gent <sup>R</sup>	SG200

1) Eric Bumüller Bachelorarbeit 2) Georg Bachmann Bachelorarbeit 3) Jennifer Klein Masterarbeit  
4) Rabea Suhrborg Bachelorarbeit 5) F3-Praktikum Pia Bloos

*a, b* - Paarungstyp-Loci, E1, E2, W1, W2 - Gene des *b*-Paarungstyp-Locus, Δ - Deletion; P –Promotor, P<sub>crG1</sub> –Arabinose-induzierbarer Promotor(Bottin *et al.*, 1996), :: - homologer Austausch, :- Fusion, Phleo<sup>R</sup> – Phleomycin-Resistenz, Cbx<sup>R</sup> – Carboxin Resistenz, Hyg<sup>R</sup> – Hygromycin-Resistenz, Gent<sup>R</sup> – Geneticin-Resistenz, Nat<sup>R</sup> - Nourseothricin-Resistenz (ip<sup>R</sup>[...]ip<sup>S</sup>)– ektopische Integration im *ip*-Locus.

Die homologen Rekombinationsereignisse wurden für alle in dieser Arbeit hergestellten Stämme mittels Southern Blot Analyse und/oder analytischer PCR verifiziert. Alle *tags* wurden auf Funktionalität überprüft.

### 5.1.3. Chemikalien

Alle in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien waren p.a. Qualität und wurden von den Firmen Ambion, Sigma-Aldrich, Merck, Fluka, Riedel-de-Han, Difco, Serva, BioRad, Amersham, New England Biolabs (NEB), Invitrogen und Carl-Roth bezogen. Für weitere Einzelheiten: siehe (Brachmann, 2001).

### 5.1.4. Verwendete Kits

In dieser Arbeit wurde das Kit JETSORB Gel Extraction Kit (Genomed) zur Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen verwendet. Für die Aufreinigung von DNA-Fragmenten wurde das Kit QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) benutzt. Mit Hilfe des Rotiprep Plasmid Mini-Kits (Carl Roth) wurden Proben für die Sequenzierung vorbereitet. Die Klonierung in TOPO-Vektoren erfolgte unter Verwendung des TOPO TA Cloning Kit pCR2.1 TopoVector von Invitrogen. Gateway-Klonierungen erfolgten durch Einsatz der BP- und LR-Enzymmische von Invitrogen. TURBO DNA-free™ Kit (Invitrogen) wurde angewendet zum Abbau von DNA aus Gesamt-RNA-Präparationen, RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific) für die reverse Transkription von mRNA und das MesaGreen qPCR Mastermix Plus for SYBR Assay with fluorescein Kit (Eurogentec) für qRT-PCR Analysen. Die Aufreinigung von genomischer DNA für Gesamt-DNA-Sequenzierungen erfolgte durch das DNeasy® Plant Mini Kit (Qiagen).

### 5.1.5. Enzyme und Proteine

Polymerasen, Restriktionsenzyme und DNA-modifizierende Enzyme wurden, wenn nicht anderweitig erwähnt oder bereits in einem Kit enthalten, von New England Biolabs (NEB) bezogen. BP Clonase™ II Enzyme Mix und LR Clonase™ II Enzyme Mix wurden von Invitrogen erworben. Taq Polymerase und Phusion Polymerase stammten aus eigenen Laborpräparationen. Die Bezugsquelle von Beads und Antikörper werden unter den jeweiligen Methoden aufgeführt. Als Größenstandard für Proteingele wurde der PAGERuler prestained Proteinmarker (Thermo Fischer) oder der Color Prestained Protein Standard Broad Range (10-250 kDa; NEB) verwendet.

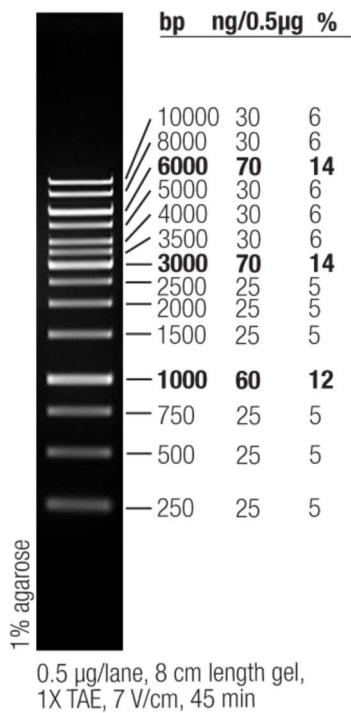
**Tabelle 3: In dieser Arbeit verwendete Enzyme und Proteine**

<b>Name</b>	<b>Hersteller</b>
Alkalische Phosphatase (aus Kälberdarm)	New England Biolabs
Antarktische Phosphatase	New England Biolabs
Anti-Digoxigenin, konjugiert mit alkalischer Phosphatase	Roche
BSA	New England Biolabs
<i>E. coli</i> DNA-Polymerase I (Klenow-Fragment)	New England Biolabs
House Phusion	Eigene Präparation
Lysing Enzyme	Sigma
Lysozym (aus Hühnerei)	Sigma
Pfu Turbo Polymerase	Agilent
Q5-DNA-Polymerase	New England Biolabs
Restriktionsenzyme	New England Biolabs
RNase A	Roche
T4 DNA-Ligase	New England Biolabs
Taq DNA-Polymerase	New England Biolabs

## Material und Methoden

### 5.1.6. Nukleinsäuren

Als DNA-Größenstandard für die Agarose-Gelelektrophorese wurde der in Abb. 90 gezeigte GeneRuler 1 kb (Thermo Scientific) verwendet.



**Abb. 90: DNA Größenstandards**

GeneRuler 1 kb von Thermo Scientific

**Tabelle 4: In dieser Arbeit verwendete Oligonukleotide**

Nummer	Bezeichnung	Nukleotidsequenz (5´-3´)
<b>N-terminale Fusion Rab5a in Locus mit GFP</b>		
<b>29</b>	1f-egfp-o(Vec)_Rab5a	GAAAAGCGTCTGGTCAAACAATGGTGAGCAAGGGCGAGGAG
<b>30</b>	1r-egfp-o(Rab5a)_Rab5a	GTAGCCTGAGCTGACATCTTGTACAGCTCGTCCATGC
<b>31</b>	2f-Rab5a-o(egfp)_Rab5a	GCTGTACAAGATGTCAGCTCAGGCTACCAA
<b>32</b>	2r-Rab5a-o(HygR_C)_Rab5a	GAGTGCGGCCTCAACAGTTGCAGGCCTCC
<b>33</b>	3f-HygR_C-o(Rab5a)_Rab5a	CAACTGTTGAGGCCGCACTCGAGTGGCGGCAGA
<b>34</b>	3r-HygR_C-o(RB_X)_Rab5a	CAGTTCGCGCTGCACAGCTTCGCGGCGCAGCAGCGATT

35	4f-RB_X- o(HygR_C)_Ra b5a	CGAAGCTGTGCAGGCCGGAAGTGCATCTCA
36	4r-RB_X- o(Vec)_Rab5a	GAGCGGCCGCCAGTGTGATGGATGCCGTAGAAGGACTGCTTG
38	LB_rab5a_for	TGCGACTAGGACCAAGGATG
39	Rab5a_LB_rev neu	GCCATATGTTTGACCAGACGCTTTTCGG
<b>N-terminale Fusion Rab5b in Locus mit GFP</b>		
40	1f-egfp- o(Vec)_Rab5b	CGCAGTGCGATTGTAGCGCAATGGTGAGCAAGGGCGAGGAG
41	1r-egfp- o(ORF)_Rab5b	CAGCGGCCATCTTGTACAGCTCGTCCATGC
42	2f-ORF- o(egfp)_Rab5b	GCTGTACAAGATGGCCGCTGCTCCAAGG
43	2r-ORF- o(HygR_C)_Ra b5b	GAGTGCGGCCTCAACAGTTGCAAGCGTCTT
44	3f-HygR_C- o(ORF)_Rab5b	CAACTGTTGAGGCCGCACTCGAGTGGCG
45	3r-HygR_C- o(RB_X)_Rab5 b	CTGAACACATCACAGCTTCGCGGCCGACGAGCAG
46	4f-RB_X- o(HygR_C)_Ra b5b	CGAAGCTGTGATGTGTTTCAGACGAGGTCCG
47	4r-RB_X- o(Vec)_Rab5b	CTCTAGATGCATGCTCGAGCAGCCCACAGCACAGCTCA
48	LB_Rab5b_for	GCTTAGACGCCGACCAGC
49	LB_rab5b_rev	GCCATATGCGCTACAATCGCACTGCGCTC
<b>C-terminale Fusion Yup1 in Locus</b>		
54	Yup1_KI_LB_fo r	ATCTTGCAAAGGACTCCCATC
55	Yup1_KI_RB_r ev	AGCGCTTTCGCAAGGTAG
56	Yup1_KI_LB_fo r_nest	CGGCATACAGCGATACGGAA
57	Yup1_KI_RB_r ev_nest	GTCTGGCGAGCTCAATACCT
58	Yup1_KI_LB_r ev	GTGGCCGCGTTGGCCAACTTTCTTCTATCCCAGCC
59	Yup1_KI_RB_f or	CAGGCCTGAGTGGCCGACAAGACACGAGATATTGGAG
<b>C-terminale Fusion Vps11 in Locus</b>		
60	Vps11_KI_LB_f or	TACGTTACTCGAGCTCTACC
61	Vps11_KI_RB_ rev	CCGATCGAACTCGGTGAGTG
62	Vps11_KI_LB_f or_nest	TTGCTGCAACAACACTCGAC
63	Vps11_KI_RB_ rev_nest	AAGCGGAAGCTGGGGTATC
64	Vps11_KI_LB_r ev	GCGGCCGCGTTGGCCATCTCAACCGCATGAGC
65	Vps11_KI_RB_ for	GCGGCCTGAGTGGCCTCCGAGATGGTTGCCATGC

## Material und Methoden

<b>Deletion Rab5b</b>		
66	Rab5b_KO_LB_for	GGTCAGACGGGAGAAGAGAAGC
68	Rab5b_KO_LB_for_nest	CTTCTCGCGTCTCGAGAAC
69	Rab5b_KO_RB_rev_nest	CACAGCACAGCTCAGCAC
70	Rab5b_KO_LB_rev	GTGGCCATCTAGGCCCGCTACAATCGCACTGCGCTC
72	1f-GenR_Kasseo(Vec)_Rab5b	GCGATTGTAGCGGGCCTAGAGGCCTAGATGGCCACCAT
73	1r-GenR_Kasseo(RB)_Rab5b	AACACATGGCCACTCAGGCCTGGGCCACTCAGGCCTATTAATG
74	2f-RBo(GenR_Kasse)_Rab5b	ATTAATAGGCCTGAGTGGCCCAGGCCTGAGTGGCCATGTGTT
75	2r-RBo(Vec)_Rab5b	CTCTAGATGCATGCTCGAGCTGACCAAGCGGTTTGTATGCAG
<b>C-terminale Fusion Vps3 in Locus</b>		
76	Vps3_KI_LB_for	ATGGAGTGGCGCGAGACTAC
78	Vps3_KI_LB_nest	TACGCCGAGTCCTTCTTTG
79	Vps3_KI_RB_nest	GGGTGACTCGATCCTTATTTTC
80	Vps3_KI_LB_rev	GCGGCCGCGTTGGCCGGTCAAGTCGTAACCACCGTC
82	1f-RBo(Vec)_Vps3	CAAGCTTGGTACCGAGCTCGAGCCCTGCGATTGCGTATTGA
83	1r-RBo(GFP_Hyg_Ka)_Vps3	CTGAGTGGCCGCGGCCTGAGTGGCCCGAT
84	2f-GFP_Hyg_Ka_o(RB)_Vps3	CTCAGGCCGCGGCCACTCAGGCCTATTAATGC
85	2r-GFP_Hyg_Ka_o(Vec)_Vps3	TACGACTTGACCGCCAACGGGCCAACGCGGCCACCAT
<b>C-terminale Fusion Tub3 in Locus</b>		
86	Tub3_KI_LB_rev	ATGGCCGCGTTGGCCTTGTTTCATCAGCATACTGGATGG
87	Tub3_KI_RB_for	TAGGCCTGAGTGGCCTTCCACACGCTCAAAGCCCA
88	Tub3_KI_LB_for	CAAGGATTCCAACCTCGTCCA
89	Tub3_KI_LB_nest	GTGGTACGGGTTCCGGTTTGG
90	Tub3_KI_RB_rev	CTCTCCACCTTTGTTGTCGGCT
91	Tub3_KI_RB_nest	GGCCAAGAACGTTTTTCGAGAGCA
<b>Deletion Vps8</b>		
100	Vps8_RB_nest_rev	GGTGAACCATGAACCGTGAACG
101	Vps8_RB_rev	CCGACATTTACGCGACACG

103	Vps8_RB_for	AAGGCCTGAGTGGCCTTCTTGACATAGTGATTCTTTGCT
121	1f-CherryNat- o(Vec)_Vps8_K luKO	ACACTGGCGGCCGTTACTAGTGTATTAATGCGGCCGCACTC
125	1r- GentR_KO_K- o(LB_KO_Vps8 )	CGTCTTCGGCACCATGGCGTGACAATTGC
126	2f- LB_KO_Vps8- o(GentR_KO_K )	ACGCCATGGTGCCGAAGACGCTGCAGCGGGAAT
127	2r- LB_KO_Vps8- o(Vec)	GATTACGCCAAGCTTGGTACCAAGGAGTGAAGTCATCCGGATG ACCG
<b>C-terminale Fusion Vps8 in Locus</b>		
104	Vps8_KI_LB_fo r	CGCAAGCTGGTGTAGCTGAG
105	Vps8_KI_nes_f or	GATGGTATGCTATCCGCCTACCA
106	Vps8_KI_LB_re v	TAGGCCGCGTTGGCCAGCATGCAAACGCTGCCAG
100	Vps8_RB_nes_ rev	GGTGAACCATGAACCGTGAACG
141	Vps8Myc_RB_f wd	GAGTGGCCTTCTTGACATAGTGATTCTTTG
142	Vps8Myc_RB_r ev	GATGCATGCTCGAGCCCGACATTTACGCGACAC
143	Vps8Myc_Kas_ fwd	GCATGCTGGCCAACGGGCCAACGCGGCCGAGCA
144	Vps8Myc_Kas_ rev	GTGCAAGAAGGCCACTCAGGCCTATTAATGCGGC
<b>N-terminale Fusion Rab5b in Locus mit mCherry</b>		
159	1f-mCherryS- o(Vec)_Rab5b	AGTGCGATTGTAGCGCAATGGTGAGCAAGGGCGAGGAG
160	1r-mCherryS- o(ORF_Rab5b)	AGCGGCCATCTTGTACAGCTCGTCCATGC
161	2f- ORF_Rab5b- o(mCherryS)	CTGTACAAGATGGCCGCTGCTCCAAGG
110	2r-ORF- o(GentR)_Rab 5b	CCGGCAAGCTTCAACAGTTGCAAGCGTCCT
111	3f-GentR- o(ORF)_Rab5b	CAACTGTTGAAGCTTGCCGGCAGATCCG
112	3r-GentR- o(RB)_Rab5b	CTGAACACATGCACTCCTACAGCTTGCAAAT
113	4f-RB- o(GentR)_Rab 5b	GTAGGAGTGCATGTGTTTCAGACGAGGTGAC
114	4r-RB- o(Vec)_Rab5b_ mC:Gent	CTCTAGATGCATGCTCGAGCAGCCCACAGCACAGCTCA
<b>Überexpression Nma1</b>		
132	GW_Nma1_ÜE FW	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTGGTACCATGTCCGA CCCCAGTGACC
133	GW_Nma1_ÜE REV	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTAACGGCGCGCCAG CTGCAGCAGCGCTGGCC

## Material und Methoden

<b>Nma1-Fusion nested</b>		
145	pTO49_fw_nested	CATTCAATCGCTGCAGGCTGAGCTT
146	pTO49_rev_nested	AGACACGGGGCCGTCTATTGACG
<b>C-terminale Fusion Yup1</b>		
147	Yup1_ORF_for_BamHI	TGTGGATCCTATGGCACAACACAGCCAC
148	Yup1_ORF_rev_NcoI	GTGCCATGGTAAACTTTCTTCTATCCCAGCCTTG
<b>N-terminale Fusion Rab7 in Locus mit mCherry</b>		
149	LB_Rab7_for	GTTTGATGTCGTTGCCGTCTGC
150	LB_Rab7_rev	GGTTGTTGAAGTAAGTGGGTCGTG
151	1f-mCherryS-o(Vec)_Rab7	GCAGATATCCATCACACTGGCATGGTGAGCAAGGGCGAGGAG
152	1r-mCherryS-o(ORF_Rab7)	GAGAAGCCATCTTGTACAGCTCGTCCATGC
153	2f-ORF_Rab7-o(mCherryS)	GCTGTACAAGATGGCTTCTCGTAAGAAGGTC
154	2r-ORF_Rab7-o(NatR)	CATCTAGGCCCTAGCAATTGCATCCGCTCTG
155	3f-NatR-o(ORF_Rab7)	GCAATTGCTAGGGCCTAGATGGCCACCAT
156	3r-NatR-o(Rab7_RB)	CGTAATCGTGGCCACTCAGGCCTATTAATG
157	4f-Rab7_RB-o(NatR)	TGAGTGGCCACGATTACGACAGCTTTCCTTC
158	4r-Rab7_RB-o(Vec)	GGCCCTCTAGATGCATGCTGAGAAAGGACTGTCCTGAA
<b>N-terminale Fusion Rab5a in Locus mit diEos</b>		
162	1f-diEos-o(Vec)_Rab5a	GAAAAGCGTCTGGTCAAACAGGCCAACGCGGCCATGGG
163	1r-diEos-o(Rab5a)	GCTGACATGCGGCCGCCTTCGCGACGA
164	2f-Rab5a-o(diEos)	AGGCGGCCGCATGTCAGCTCAGGCTACCAA
<b>N-terminale Fusion Rab7 in Locus mit gfp</b>		
165	1f-gfp-o(Vec)_Rab7	GCAGATATCCATCACACTGGCATGGTGAGCAAGGGCGAGGAG
166	1r-gfp-o(ORF)_Rab7	GAGAAGCCATCTTGTACAGCTCGTCCATGCCGAGA
167	2f-ORF-o(gfp)	GCTGTACAAGATGGCTTCTCGTAAGAAGGTC
<b>N-terminale Fusion Rab5c in Locus mit mCherry</b>		
168	LB_Rab5c_for	CGGACCCTGTCTCGCCACATTC
169	LB_Rab5c_rev	GCTCTGGCCATCTAGGCCGGTGCTGTATACAACCTTGTCGGTC
170	1f-mCherry-o(Vec)_Rab5c	ACAGCACCGGCCTAGACCATGGTGAGCAAGGGCGAGGAG
171	1r-mCherryS_N-o(Rab5c)	GGGGCATCATCATATGACCGCCACCGCCCTTGT
172	2f-Rab5c-o(mCherryS_N)	CGGTCATATGATGATGCCCCAGCATCCTTT
173	2r-Rab5c-o(NatR)	ATCTAGGCCTCAAGCACAGCAAGACCA



174	3f-NatR- o(Rab5c)	CTGTGCTTGAGGCCTAGATGGCCACCAT
175	3r-NatR- o(RB_Rab5c)	CGGGCCGCGCGGCCACTCAGGCCTATTA
176	4f-RB_Rab5c- o(NatR)	AGTGGCCGCGCGGCCCGAATATATGAA
177	4r-RB_Rab5c- o(Vec)	TCTAGATGCATGCTCGAGCCTACCACACTCATCGCCACTCT
178	RB_Rab5c_rev NotI	CGATAGCGGCCGCCTCTCAAGATGAAGACCAGCCGG
<b>Deletion Rab5c</b>		
179	RB_Rab5c_KO for	AGATGGGCCTGAGTGGCCGCGCGGCCCGAATATATGAAATGT
180	RB_Rab5c_KO rev	CTACCACACTCATCGCCACTCTCTC
168	LB_Rab5c_for	CGGACCCTGTCTCGCCACATTC
169	LB_Rab5c_rev	GCTCTGGCCATCTAGGCCGGTGCTGTATACAACCTTGCGCCGTC
181	LB_Rab5c_for_ nest	CGTTTGCAACTTTGCCCATCCC
182	RB_Rab5c_rev nest	TCATCGCCACTCTCTCCACTCTC
<b>N-terminale Fusion Rab5c</b>		
183	Rab5c_ORF_fo r NdeI	AGCGTCATATGATGATGCCCCAGCATCCTTTCC
184	Rab5c_ORF_re v Ascl	TCAGTGGCGCGCCTCAAGCACAGCAAGACCAGCT
185	Pnar_for_HindII	CATGCAAGCTTATGTCCTAACTGCTCGTGTGGTG
186	Pnar_rev_NcoI	AGCACCCATGGGCTCTCGACTAAATGAATCTCTGTTCC
<b>Gatewayplasmid Promotorfusion-gfp</b>		
195	ccdB_GW_Pro motor_for	TCTCTCAAGCTTACAAGTTTGTACAAAAAAGCTGAAC
196	ccdB_GW_Pro motor_rev	ATATTACCATGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTG
197	F2_GW_p123_ for	GGGAAGCTTACAAGTTTGTACAAAAAAGCTG
198	F2_GW_p123_ rev	TCTCCATGGACCACTTTGTACAAGAAAGC
<b>N-terminale Fusion Yup1 mit mCherry<sup>1)</sup></b>		
GB1	Yup1_N- term_fwd_NdeI	GCGCGCCATATGGCACAAACACAGCCACT
GB2	Yup1_N- termrev_AscI	GCAATGGCGCGCCTCAAACCTTTCTTCTATCCCAGCC
<b>Mutagenese Rab5a<sup>2)</sup></b>		
JKI1	Rab5a_S45N_f w	AGCCGCGGTGCGAAAGAACTCTGTAGTG
JKI2	Rab5a_S45N_r ev	AGCCGCGGCGATCCTGCAAGC
JKI3	Q90L_EcoRI_f w	GTCCTGGAATTCGCCCTTTGCGACT
JKI4	Q90L_Xma_rev	TTGCCCCCGGGATGTGGC
<b>ORF-Primer</b>		
<b>ORF-Primer Rab5a</b>		

## Material und Methoden

92	ORF_Rab5a_for	TTCTGCTTGGTGAAGCCGCG
93	ORF_Rab5a_rev	GCAGGTCGATCTTGTGCCGAC
<b>ORF-Primer Vps3</b>		
96	ORF_Vps3_rev_neu	GTTGGACCCGCGCATTITTTCTC
97	ORF_Vps3_for_neu	ACAGCAGCGGCACAATCAGTC
<b>ORF-Primer Vps8</b>		
199	Vps8_ORF_for	CTGAAGCTTTCCTCGATGCACTC
200	Vps8_ORF_rev	GATCGGAAAGTTGCTCGTGACG
<b>ORF-Primer Nma1<sup>3)</sup></b>		
	um00933_ORF_s	CAGTGACCCCAACGAGTCAGCTCT
	um00933_ORF_as	CTTTGGAGTACCGGTAGCACGAGC
<b>ORF-Primer Kin3<sup>3)</sup></b>		
	Kin3_ORF_se	TCCGTTATGCCGATCAGGCCA
	Kin3_ORF_as	GATGGGGCAGTTTCTTGGGCG
<b>ORF Kreuzungstyploci b1/b2</b>		
6)	b_rev	CTATGCCAAGGCTGACGATT
218	bW1_for	TGCTTCCTATGAAGGAGCGC
219	bW2_for	GACCTCTCAGATCAGAGCGATGC
<b>Sequenzierprimer</b>		
<b>Sequenzierprimer Rab5c</b>		
187	Rab5c_ORF_seq1	ACTCTGGCGGAGCCGACG
188	Rab5c_ORF_seq2	CCGTTCGAAGCTGGCTTGAGC
<b>Sequenzierprimer Nma1</b>		
136	Nma1_Seq1	TGCGGGACGACGTGTTCTG
137	Nma1_Seq2	GCTATTAGCGAGAAGGAAGAGCTC
138	Nma1_Seq3	CTTCTGTAGACTCGCAGCACG
<b>Sequenzierung Locus Vps8</b>		
52	Vps8_NNN_fw	TAGCACCATGGCGTCTTCAT
53	Vps8_NNN_rev	GTCAGCGGTGACGATGGCAG
<b>Allgemeine Sequenzierprimer<sup>7)</sup></b>		
	hhn3	AACTCGCTGGTAGTTACCAC
	hhn5	ACTAGATCCGATGATAAGCTG
	Nat4	GAAGTCGACTCTATGGACTGATCTG
	M13_for	GTAAAACGACGGCCAG
	M13_rev	CAGGAAACAGCTATGAC
	pHxt_seq_f	GCCTATCCTTCCCTCTTCAAG
	Nos_rev	CAAGACCGGCAACAGGATTCAATC
	p123GFP_rev	CTGAACTTGTGGCCGTTTACGTCG
	NAT cycT for	ATACTGAAAACCTTGCTTGAGAAGG

	p123_ORF_Pot ef_for	CCAGCGAGACGTTCCAATAAAGGG
	Seq_Gen_fw	GTACGGGTACATCGGATCTG
	mCherry_Seq_f or	ATGGTGAGCAAGGGCGAGGA
	p123_BB_Pro mseq_for	CTGGCTTAACTATGCGGCAT
	mCherry_rev_S eq	AACTGAGGGGACAGGATGTCCC
<b>Realtime-PCR Primer</b>		
<b>189</b>	Rab5b_RT_for	CTTTCCTCACGCAAACCTGTC
<b>190</b>	Rab5b_RT_rev	CAGCGCAGTTGGCATTAC
<b>191</b>	Rab5c_RT_for	TTTCGACGAGTGGCTCAAAC
<b>192</b>	Rab5c_RT_rev	AGCCGATCGCCAAAGAAC
<b>193</b>	Rab5a_RT_for	AGGCGTTATCGAGGTGTTC
<b>194</b>	Rab5a_RT_rev	GTTCTCGCCAAATGCAG
<sup>5)</sup>	Pb2_2_F	AAAGAACCTGTGCTGAGGC
<sup>5)</sup>	Pb2_2_R	TAGAGGCTAAAGGTGGGAGTG
<sup>5)</sup>	rt_mfa2_fw	GTTACTGTTGCCGAGACC
<sup>5)</sup>	rt_mfa2_rev	CTAGGCGATCAAGCAGTA
<b>OMJ110<sup>4)</sup></b>	RT_00715_Hd p2BS_fw	CCAGTGCATTCGTGATTCTC
<b>OMJ111<sup>4)</sup></b>	RT_00715_Hd p2BS_rv	ATGTAGGGACAAGTCGGTAG
<b>220</b>	RT_UMAG_00 467_for	TGCCGGACCTATCTCGTATC
<b>221</b>	RT_UMAG_00 467_rev	TGCCGACTGCTGTGAATC
<b>OMJ112<sup>4)</sup></b>	RT_01374_Hd p2BS_fw	CAAACCGATTCTGGCGTAAC
<b>OMJ113<sup>4)</sup></b>	RT_01374_Hd p2BS_rv	ACCAGTCGTTCACTTCAG
<b>OMJ157<sup>4)</sup></b>	RT_UMAG_06 055_fw	TCGACGGTCCAAGAAGG
<b>OMJ158<sup>4)</sup></b>	RT_UMAG_06 055_rv	CCATGTCGTCGTCAGACTC
<b>OMJ159<sup>4)</sup></b>	RT_UMAG_06 130_fw	ACAAGCTGCATGGTCTACG
<b>OMJ160<sup>4)</sup></b>	RT_UMAG_06 130_rv	GCCTCGGTTCCGGTGAATG
<b>OMJ67<sup>4)</sup></b>	UMAG_06158_ RT_fw	TGGTGGGCGGACACTTTAG

## Material und Methoden

<b>OMJ68<sup>4)</sup></b>	UMAG_06158_ RT_rv	TCCTGCTGCTTCTTATTACCAC
<b>Allgemeine Realtime-PCR-Primer<sup>7)</sup></b>		
	RT_actin_f	CATGTACGCCGGTATCTCG
	RT_actin_r	CTCGGGAGGAGCAACAATC
	RT_bE-F	GCACAACACCTTCCATTGAC
	RT_bE-R	ACTGCTCCCGAATGTACT
	RT_clp1_for	CCAGCGTCTACTCTTGATCC
	RT_clp1_rev	GACGGTCCTCTTGCTCCTTG
	RT_eIF2B_f	ATCCCGAACAGCCCAAAC
	RT_eIF2B_r	ATCGTCAACCGCAACCAC
	RT-Hdp1-F6	CCGAAAGCGTCTGGGATGAG
	RT-Hdp1-R6	TGCGTGCGTACATCGTACGG
	RT_mfa1_f	ATGCTTTTCGATCTTCGCTCAGAC
	RT_mfa1_r	TAGCCGATGGGAGAACCGTTG
	RT_UMAG_10 072_fw	TGCTCGTCTTTGCGTTTGTC
	RT_UMAG_10 072_rv	CAACCTGTTGTCGCGTACC
	02238-RT-R	TCTTCCTGCACTTCCTGAAC
	02238-RT-F	CGCGAGATGCTACTTTAGAC

1) Georg Bachmann Bachelorarbeit 2) Jennifer Klein Masterarbeit 3) (Obhof, 2017) 4) Matteo Jurca 5) (Ulrich, 2020) 6) Lukas Baumann 7) Laborsammlung AG Kämpfer

### 5.1.7. Puffer und Lösungen

**Tabelle 5: In dieser Arbeit verwendete Puffer und Lösungen**

<b>Bezeichnung</b>	<b>Rezept</b>
Ampicillin-Lösung	10 mg/ml Ampicillin in H <sub>2</sub> O <sub>bid.</sub> , sterilfiltriert.
Anti-DIG-Alkalische Phosphatase	1:10000 in DIG 2.
Auftragspuffer für DNA-Gelelektrophorese (nativ, 6x)	50 % (w/v) Sucrose 0.25 % (w/v) Bromphenolblau 0.25 % (w/v) Xylencyanol FF in TE-Puffer (s.u.).
CCMB 80	10 ml 1 M KOAc pH 7,0 11,8 g CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O 4,0 g MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O

	<p>2,0 g MgCl<sub>2</sub>                  100 ml Glycerin                  pH mit 0,1 M HCl auf 6,4 eingestellt, mit H<sub>2</sub>O<sub>bid.</sub>                  auf 1 l aufgefüllt und sterilfiltriert.</p>
CDP-Star Lösung	1:500 in DIG 3.
DENAT-Lösung	<p>1,5 M NaCl                  0,4 M NaOH                  in H<sub>2</sub>O<sub>bid.</sub></p>
DIG 1	<p>0,1 M Maleinsäure                  0,15 M NaCl                  in H<sub>2</sub>O<sub>bid.</sub>, pH 7,5.</p>
DIG 2	5 % (w/v) Milchpulver in DIG 1.
DIG 3	<p>0,1 M Maleinsäure                  0,1 M NaCl                  0,05 M MgCl<sub>2</sub>                  in H<sub>2</sub>O<sub>bid.</sub>, pH 9,5.</p>
DIG-Waschpuffer	0,3 % (v/v) Tween-20 in DIG1
Fastblotpuffer	<p>45 mM Tris                  20 mM HEPES                  20 % (v/v) Methanol                  in H<sub>2</sub>O<sub>bid.</sub></p>
Gibson Assembly® Master Mix	<p>320 µl 5x ISO Puffer                  0.64 µl 10 U/µl T5 Exonuclease                  20 µl 2 U/µl Phusion Polymerase                  160 µl 40 U/µl Taq Ligase                  mit H<sub>2</sub>O<sub>bid.</sub> auf 1,2 ml aufgefüllt und 15 µl Aliquots                  bei -20 °C eingefroren.</p>
Heparin-Lösung	<p>15 mg/ml Heparin                  in H<sub>2</sub>O<sub>bid.</sub>, sterilfiltriert.</p>
IP-Puffer	<p>25 mM Tris-HCl                  150 mM NaCl                  1 mM EDTA                  1 % NP-40                  5 % Glycerin</p>

## Material und Methoden

	mit H <sub>2</sub> O <sub>bid.</sub> angesetzt und pH-Wert auf 7,4 eingestellt.
ISO-Puffer (5x) Gibson Assembly®	1 ml 1 M Tris-HCl pH 7,5 50 µl 2 M MgCl 20 µl 100 mM dGTP 20 µl 100 mM dATP 20 µl 100 mM dTTP 20 µl 100 mM dCTP 100 µl 1 M DTT 0.5 g PEG-8000 100 µl 100 mM NAD mit H <sub>2</sub> O <sub>bid.</sub> auf 2 ml aufgefüllt und 320 µl Aliquots bei -20 °C eingefroren.
Laemmli-Puffer	60 mM Tris-HCl, pH 6,8 2 % (v/v) SDS 10 % (v/v) Glyzerin 5 % (v/v) β-Mercaptoethanol 0,01 % (w/v) Bromphenolblau
Laufpuffer für Protein-Gele	25 mM Tris-HCl, pH 8,8 200 mM Glyzin 0,1 % (w/v) SDS in H <sub>2</sub> O <sub>bid.</sub>
Lysispuffer ( <i>Ustilago</i> -DNA)	1% (w/v) SDS 50 mM Tris-HCl, pH 7,5 50 mM Na <sub>2</sub> -EDTA, pH 8,0 in H <sub>2</sub> O <sub>bid.</sub> 50:50 mit 1xTE-Puffer gemischt.
Lysozym-Lösung	10 mg/ml Lysozym in 1x TE-Puffer (s. u.).
Minilysat III-Lösung	3 M Na-Acetat pH 4,8
Natriumphosphatpuffer	177,99 g/l Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O (1 M) mit 156,01 g/l NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O (1 M) bis pH 7 erreicht.
RENAT-Lösung	1,5 M NaCl 282 mM Tris-Cl 218 mM Tris-Base in H <sub>2</sub> O <sub>bid.</sub>
RNase A-Lösung	50 µg/ml RNase A in 1x TE-Puffer.

Salzsäure (0,25 M)	5 ml 37 % HCl in 1 l H <sub>2</sub> O <sub>bid.</sub>
Sammelgel-Puffer (4x)	55 mM Tris-Base 445 mM Tris-HCl mit H <sub>2</sub> O <sub>bid.</sub> angesetzt und pH-Wert auf 6,8 eingestellt.
SCS	20 mM Natriumcitrat, pH 5,8 1 M Sorbitol in H <sub>2</sub> O <sub>bid.</sub> , sterilfiltriert.
SDS-Sammelgel (5 %)	0,333 ml Acrylamid/Bisacrylamid (30 %) 0,25 ml Sammelgel-Puffer, pH 6,8 1,385 ml H <sub>2</sub> O <sub>bid.</sub> 20 µl 10 % SDS 10 µl 10 % APS (w/v in H <sub>2</sub> O <sub>bid.</sub> ) 2 µl TEMED
SDS-Trenngel (10 %)	1,667 ml Acrylamid/Bisacrylamid (30 %) 1,875 ml Trenngel-Puffer, pH 8,8 1,364 ml H <sub>2</sub> O <sub>bid.</sub> 50 µl 10 % SDS 40 µl 10 % APS (w/v in H <sub>2</sub> O <sub>bid.</sub> ) 4 µl TEMED
Southern-Hybridisierungspuffer	500 mM Natriumphosphatpuffer, pH 7,0 7 % (w/v) SDS in H <sub>2</sub> O <sub>bid.</sub>
SSC (20x)	3.0 M NaCl 0.3 M Natriumcitrat·2H <sub>2</sub> O in H <sub>2</sub> O <sub>bid.</sub> , mit HCl auf pH 7,0 eingestellt.
SSPE + SDS-Puffer	20x SSPE: 175,3 g/l NaCl (3 mM) 27,6 g/l Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O (227 mM) 7,4 g/l Na <sub>2</sub> -EDTA · 2H <sub>2</sub> O (20 mM) mit H <sub>2</sub> O <sub>bid.</sub> Auf 1 l aufgefüllt, mit NaOH auf pH 7,4 eingestellt.
STC	10 mM Tris-HCl, pH 7,5 100 mM CaCl <sub>2</sub> 1 M Sorbitol in H <sub>2</sub> O <sub>bid.</sub>

## Material und Methoden

STC/PEG	15 g STC (s.o.) 10 g PEG 4000
STET	10 mM Tris-HCl, pH 8,0 100 mM NaCl 1 mM Na <sub>2</sub> -EDTA in H <sub>2</sub> O <sub>bid.</sub>
TBE (5x)	500 mM Tris-Borat, pH 7,9 10 mM Na <sub>2</sub> -EDTA in H <sub>2</sub> O <sub>bid.</sub>
TBST-Puffer	20 mM Tris-HCl, pH 7,9 136 mM NaCl 0,05 % (v/v) Tween-20
TE (10x)	100 mM Tris-HCl, pH 7,9 10 mM Na <sub>2</sub> -EDTA in H <sub>2</sub> O <sub>bid.</sub>
Trenngel-Puffer (4x)	1,27 M Tris-Base 0,23 M Tris-HCl mit H <sub>2</sub> O <sub>bid.</sub> angesetzt und pH-Wert auf 8,8 eingestellt.
β-X-Gal-Lösung	2 % β-X-Gal in DMSO lösen.

### 5.1.8. Medien

**Tabelle 6: Medien für *Ustilago maydis***

Bezeichnung	Rezept
Array Minimalmedium (Glukose-Glutamin)	4,38 g 30 Mm L-Glutamin 20 ml 1 % f.c. Glukose 62,5 ml Holliday Salzlösung mit H <sub>2</sub> O <sub>bid.</sub> auf 1 l aufgefüllt und sterilfiltriert.
CM-Aktivkohle (Holliday, 1974, Banuett und Herskowitz, 1989)	6 g NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> 10 g Casaminosäuren 1 g Heringsperma DNA 2 g Hefeextrakt 20 ml Vitamin-Lösung 250 ml Salz-Lösung 10 g Aktivkohle



	<p>20 g Bacto Agar  mit H<sub>2</sub>O<sub>bid.</sub> auf 920 ml aufgefüllt,  mit NaOH auf pH 7,0 eingestellt und autoklaviert.  nach dem Autoklavieren:  80 ml 25 % (w/v) Arabinose-Lösung zugesetzt  (f. c. 2 %).</p>
<p>CM-Festmedium  (Banuett und Herskowitz, 1989, Holliday, 1974)</p>	<p>1,5 g NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>  2,5 g Casaminosäuren  0,5 g Heringssperma DNA  1 g Hefeextrakt  10 ml Vitamin-Lösung (s.u.)  62,5 ml Salz-Lösung (s.u.)  0,5 ml Spurenelement-Lösung (s.u.)  20 g Bacto Agar  mit H<sub>2</sub>O<sub>bid.</sub> auf 980 ml aufgefüllt.  Nach dem Autoklavieren 2 % (v/v) 50 % Glukose  (1 % f. c.) zugefügt und mit NaOH auf pH 7,0  eingestellt.</p>
<p>CM-Flüssigmedium  (Holliday, 1974, Banuett und Herskowitz, 1989)</p>	<p>1,5 g NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>  2,5 g Casaminosäuren  0,5 g Heringssperma DNA  1 g Hefeextrakt  10 ml Vitamin-Lösung (s.u.)  62,5 ml Salz-Lösung (s.u.)  0,5 ml Spurenelement-Lösung (s.u.)  mit H<sub>2</sub>O<sub>bid.</sub> auf 980 ml aufgefüllt.  Nach dem Autoklavieren 2 % (v/v) 50 % Glukose  oder 4 % (v/v) 25 % Arabinose (1 % f. c.) zugefügt  und mit NaOH auf pH 7,0 eingestellt.</p>
<p>Nitrat-Minimalmedium  (Holliday, 1974)</p>	<p>3 g KNO<sub>3</sub>  62,5 ml Salz-Lösung  mit H<sub>2</sub>O<sub>bid.</sub> auf 980 ml aufgefüllt,  mit NaOH auf pH 7,0 eingestellt und autoklaviert.  20 ml 50 % (w/v) Glukose-Lösung zugegeben.</p>
<p>NSY-Glyzerin (Einfriermedium)</p>	<p>8 g Nutrient Broth  1 g Hefeextrakt  5 g Sucrose</p>

## Material und Methoden

	800 ml 87 % Glycerin mit H <sub>2</sub> O <sub>bid.</sub> auf 1 l aufgefüllt und autoklaviert.
Regenerationsagar <sub>light</sub> (Schulz <i>et al.</i> , 1990)	a) Top-Agar: 15 g (w/v) Bacto-Agar 182,2 g (w/v) Sorbitol 10 g (w/v) Hefeextrakt 4 g (w/v) Bacto Pepton 4 g (w/v) Sucrose mit H <sub>2</sub> O <sub>bid.</sub> auf 1 l aufgefüllt und autoklaviert. b) Bottom-Agar wie a), zusätzlich Antibiotikum zugegeben (s.u.).
Salz-Lösung (Holliday, 1974)	8 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 2 g Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 1 g MgSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O <sub>bid</sub> mit H <sub>2</sub> O <sub>bid.</sub> auf 1 l aufgefüllt und sterilfiltriert.
Spurenelement-Lösung (Holliday, 1974)	60 mg H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> 191 mg MnCl <sub>2</sub> 400 mg ZnCl <sub>2</sub> 47 mg NaMoO <sub>4</sub> · 2 H <sub>2</sub> O 140 mg FeCl <sub>3</sub> · 6 H <sub>2</sub> O 557 mg CuSO <sub>4</sub> · 5 H <sub>2</sub> O mit in H <sub>2</sub> O <sub>bid.</sub> auf 1 l aufgefüllt und sterilfiltriert.
Vitamin-Lösung (Holliday, 1974)	100 mg Thiamin 20 mg Calciumpanthothenat 50 mg p-Aminobenzoesäure 20 mg Nikotinsäure 20 mg Cholinchlorid 40 mg myo-Inositol 50 mg Folsäure mit H <sub>2</sub> O <sub>bid.</sub> auf 1 l aufgefüllt und sterilfiltriert.
YEPS <sub>light</sub> -Flüssigmedium (Tsukuda <i>et al.</i> , 1988)	10 g Hefeextrakt 4 g Bacto Pepton 4 g Sucrose mit H <sub>2</sub> O <sub>bid.</sub> auf 1 l aufgefüllt und autoklaviert.

Tabelle 7: Medien für *Escherichia Coli*

Bezeichnung	Rezept
YT-Medium (Sambrook <i>et al.</i> , 1989)	8 g Bacto Trypton 5 g Hefeextrakt 5 g NaCl 15 g Bacto Agar mit H <sub>2</sub> O <sub>bid.</sub> auf 1 l aufgefüllt und autoklaviert.
dYT-Medium (Sambrook <i>et al.</i> , 1989)	16 g Trypton 10 g Hefeextrakt 5 g NaCl mit H <sub>2</sub> O <sub>bid.</sub> auf 1 l aufgefüllt und autoklaviert.
SOB-Medium	20 g Bacto Trypton 5 g Bacto Hefeextrakt 0,58 g NaCl 0,19 g KCl mit H <sub>2</sub> O <sub>bid.</sub> auf 1 l aufgefüllt und sterilfiltriert.

Wenn nicht gesondert vermerkt, wurden alle Medien durch Autoklavieren sterilisiert. Zur Herstellung von Platten aus den angeführten Medien wurde 1,5 % Bacto-Agar zugesetzt. Zur Plasmidselektion wurden nach dem Autoklavieren folgende Antibiotika zugesetzt: 50 µg/ml Nourseothricin, 200 µg/ml Hygromycin, 2 µg/ml Carboxin oder 250 µg/ml Geneticin (*U. maydis*), 40 µg/ml Kanamycin oder 100 µg/ml Ampicillin (*E. coli*).

### 5.1.9. Plasmide

Tabelle 8: In dieser Arbeit verwendete Ausgangsplasmide

Name	Resistenz	Referenz	Herkunft / Anmerkung
p123	Cbx <sup>R</sup> , Amp <sup>R</sup>	(Aichinger <i>et al.</i> , 2003)	Enthält <i>gfp</i> unter Kontrolle des konstitutiv aktiven P <sub>otef</sub> -Promotors für die homologe Integration in den <i>ip</i> -Locus.
p123-GFP-GW1	Cbx <sup>R</sup> , Amp <sup>R</sup>	(M. Vranes, unveröffentlicht)	Destinationsvektor für C-terminale Fusion mit GFP durch GATEWAY®-Klonierung.
p123-mCherry-tub1	Cbx <sup>R</sup> , Amp <sup>R</sup>	(Schink, 2010)	N-terminale Fusion Tub1 mit mCherry im <i>ip</i> -Locus unter P <sub>otef</sub> .

## Material und Methoden

pCR2.1 TOPO	Amp <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup>	Invitrogen	Topoisomerasevermittelte Integration von PCR-Produkten mit A-Überhängen in das Vektorrückgrat.
pCU3(tef)	Cbx <sup>R</sup> , Amp <sup>R</sup>	(Brachmann, 2001)	Enthält den P <sub>tef</sub> vor GFP zur homologen Integration in den <i>ip</i> -Locus.
pDONR <sup>TM</sup> 221	Kan <sup>R</sup>	Invitrogen	Donorvektor für GATEWAY®-Klonierung.
pDS37	Cbx <sup>R</sup> , Amp <sup>R</sup>	(Schuler, 2013)	Destinationsvektor für C-terminale Fusionen mit mCherry unter P <sub>hxt1</sub> zur Integration in den <i>ip</i> -Locus durch GATEWAY®-Klonierung.
pKS4	Nat <sup>R</sup> , Amp <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup>	(Schneider, 2016)	Ersetzt den <i>vps3</i> -Locus über homologe Rekombination durch die Nat-Resistenzkassette aus pUMa262.
pKS6	Cbx <sup>R</sup> , Amp <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup>	(Schneider, 2016)	N-terminale Fusion von mCherry an Rab7 unter P <sub>tef</sub> zur Integration in den <i>ip</i> -Locus.
pKS7	Nat <sup>R</sup> , Amp <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup>	(Schneider, 2016)	Ersetzt den <i>rab5a</i> -Locus über homologe Rekombination durch die Nat-Resistenzkassette aus pUMa262.
pMF5-9g	Gent <sup>R</sup> , Amp <sup>R</sup>	M. Jurca	Enthält das 3xHA-Gen für C-terminale Proteinfusionen kombiniert mit einer Gent-Resistenzkassette als <i>Sfil</i> -Fragment.
pNP10	Hyg <sup>R</sup> , Amp <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup>	(Pinter, 2015)	C-terminale Fusion von 3xHA-Hyg <sup>R</sup> an Nma1 in Locus über homologe Rekombination.
pTO52	Hyg <sup>R</sup> , Amp <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup>	(Obhof, 2017)	Ersetzt den <i>nma1</i> -Locus über homologe Rekombination durch die Hyg-Resistenzkassette.
pTO54	Hyg <sup>R</sup> , Amp <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup>	(Obhof, 2017)	C-terminale Fusion von 3xgfp-Hyg <sup>R</sup> an Nup192 in Locus über homologe Rekombination.
pTO76	Nat <sup>R</sup> , Amp <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup>	(Obhof, 2017)	Ersetzt den <i>nma1</i> -Locus über homologe Rekombination durch die Nat-Resistenzkassette.
pUMa262	Nat <sup>R</sup> , Amp <sup>R</sup>	(Brachmann <i>et al.</i> , 2004)	Enthält Nat-Resistenzkassette als <i>Sfil</i> -Fragment für Gendeletionen.
pUMa317	Hyg <sup>R</sup> , Amp <sup>R</sup>	(Becht <i>et al.</i> , 2006)	Enthält das <i>gfp</i> -Gen für C-terminale Proteinfusionen kombiniert mit einer Hyg-Resistenzkassette als <i>Sfil</i> -Fragment.
pUMa318	Hyg <sup>R</sup> , Amp <sup>R</sup>	(Brachmann <i>et al.</i> , 2004)	Enthält den <i>nar1</i> -Promotor kombiniert mit einer Hyg-Resistenzkassette als <i>Sfil</i> -Fragment.

pUMa796	Hyg <sup>R</sup> , Amp <sup>R</sup>	P. Müller, AG Kahmann MPI Marburg	Enthält das <i>3xMyc</i> -Gen für C-terminale Proteinfusionen kombiniert mit einer Hyg-Resistenzkassette als <i>SfiI</i> -Fragment.
pUMa1057B	Gent <sup>R</sup> , Amp <sup>R</sup>	(Baumann <i>et al.</i> , 2012)	Enthält Gent-Resistenz-Kassette als <i>SfiI</i> -Fragment für Gendeletionen.
pUMa1057X	Nat <sup>R</sup> , Amp <sup>R</sup>	B. Feist	Enthält das <i>3xmCherry</i> -Gen für C-terminale Proteinfusionen kombiniert mit einer Nat-Resistenzkassette als <i>SfiI</i> -Fragment.
pUMa1441 GenR	Gent <sup>R</sup> , Amp <sup>R</sup>	M. Jurca	Enthält Gent <sup>R</sup> -Kassette mit FRT-Rekombinationssequenzen (Bindung der Flp-Rekombinase) zum Recyclern der Resistenz im Genom als <i>SfiI</i> -Fragment für Gendeletionen.
pUMa1462	Nat <sup>R</sup> , Amp <sup>R</sup>	AG Feldbrügge Uni Düsseldorf	C-terminale Fusion von Gfp-Nat <sup>R</sup> an <i>Peb1</i> in Locus über homologe Rekombination.
pUMa1712	Cbx <sup>R</sup> , Amp <sup>R</sup>	(Pohlmann <i>et al.</i> , 2015)	N-terminale Fusion Rab5a mit <i>gfp</i> im <i>ip</i> -Locus unter <i>tef</i> -Promotor.
pUMa1806 <i>tef_Cherry- Rab5a_nosT-cbx</i>	Cbx <sup>R</sup> , Amp <sup>R</sup>	(Pohlmann, 2013)	N-terminale Fusion Rab5a mit mCherry im <i>ip</i> -Locus unter <i>tef</i> -Promotor.
pUMa2985	Nat <sup>R</sup> , Amp <sup>R</sup>	Kira Müntjes, AG Feldbrügge Uni Düsseldorf	C-terminale Fusion von mKate2-Nat <sup>R</sup> an <i>Rrm4</i> in Locus über homologe Rekombination.
pUMa3052	Gent <sup>R</sup> , Amp <sup>R</sup>	Lilli Olgeiser, AG Feldbrügge Uni Düsseldorf	C-terminale Fusion von mKate2-Gent <sup>R</sup> an <i>Rrm4</i> in Locus über homologe Rekombination.
pUMa4428	Cbx <sup>R</sup> , Amp <sup>R</sup>	Kira Müntjes, AG Feldbrügge Uni Düsseldorf	C-terminale Fusion von mKate2 an CALR unter <i>otef</i> -Promotor zur Integration in den <i>ip</i> -Locus um das ER zu visualisieren.

**Tabelle 9: In dieser Arbeit hergestellte Plasmide**

Plasmid	Resistenz	Beschreibung	Klonierung
pKS12	Hyg <sup>R</sup> , Amp <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup>	C-terminale Fusion von GFP an Yup1 in Locus.	PCR-Amplifizierung LB (Template gDNA; Primer 54 und 58) und RB (Template gDNA; Primer 55 und 59). Topoisomerasevermittelte Integration von LB und RB mit A-Überhängen in das Vektorrückgrat von pCR2.1 TOPO. Restriktion LB und RB mit <i>SfiI</i> und <i>NotI</i> zum Öffnen des LB-Vektors und zur Generierung kompatibler Überhänge an der RB. Restriktion pUMa317 mit <i>SfiI</i> zur Generierung kompatibler Überhänge an der <i>gfp</i> -Hyg <sup>R</sup> -Kassette und anschließende Ligation der drei Fragmente.
pKS13 <sup>4)</sup>	Hyg <sup>R</sup> , Amp <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup> ,	C-terminale Fusion von GFP an Vps11 in Locus.	PCR-Amplifizierung LB (Template gDNA; Primer 60 und 64) und RB (Template gDNA; Primer 65 und 61). Topoisomerasevermittelte Integration von LB und RB mit A-Überhängen in das Vektorrückgrat von pCR2.1 TOPO. Restriktion LB und RB mit <i>SfiI</i> und <i>NotI</i> zum Öffnen des LB-Vektors und zur Generierung kompatibler Überhänge an der RB. Restriktion pUMa317 mit <i>SfiI</i> zur Generierung kompatibler Überhänge an der <i>gfp</i> -Hyg <sup>R</sup> -Kassette und anschließende Ligation der drei Fragmente.
pKS14	Hyg <sup>R</sup> , Amp <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup>	N-terminale Fusion von GFP an Rab5a in Locus.	PCR-Amplifizierung LB (Template gDNA; Primer 38 und 39) und topoisomerasevermittelte Integration mit A-Überhängen in das Vektorrückgrat von pCR2.1 TOPO. Restriktion mit <i>NdeI</i> und <i>EcoRV</i> zum Öffnen des LB-Vektors. PCR-Amplifizierung <i>gfp</i> (Template pUMa317; Primer 29 und 30), ORF <i>rab5a</i> (Template gDNA; Primer 31 und 32), Hyg <sup>R</sup> (Template pUMa317; Primer 33 und 34) und RB (Template gDNA; Primer 35 und 36). Gibson Assembly® der generierten Fragmente.

pKS15	Hyg <sup>R</sup> , Amp <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup>	N-terminale Fusion von GFP an Rab5b in Locus.	PCR-Amplifizierung LB (Template gDNA; Primer 48 und 49) und topoisomerasevermittelte Integration mit A-Überhängen in das Vektorrückgrat von pCR2.1 TOPO. Restriktion mit <i>NdeI</i> und <i>NotI</i> zum Öffnen des LB-Vektors. PCR-Amplifizierung <i>gfp</i> (Template pUMa317; Primer 40 und 41), ORF <i>rab5b</i> (Template gDNA; Primer 42 und 43), Hyg <sup>R</sup> (Template pUMa317; Primer 44 und 45) und RB (Template gDNA; Primer 46 und 47). Gibson Assembly® der generierten Fragmente.
pKS16	Gent <sup>R</sup> , Amp <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup>	Ersetzt den <i>rab5b</i> -Locus über homologe Rekombination durch die Gent-Resistenzkassette aus pUMa1057B.	PCR-Amplifizierung LB (Template gDNA; Primer 66 und 70) und topoisomerasevermittelte Integration mit A-Überhängen in das Vektorrückgrat von pCR2.1 TOPO. Restriktion mit <i>SfiI</i> und <i>NotI</i> zum Öffnen des LB-Vektors. PCR-Amplifizierung Gent <sup>R</sup> (Template pUMa1057B; Primer 72 und 73) und RB (Template gDNA; Primer 74 und 75). Gibson Assembly® der generierten Fragmente.
pKS17	Hyg <sup>R</sup> , Amp <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup>	C-terminale Fusion von GFP an Vps3 in Locus.	PCR-Amplifizierung LB (Template gDNA; Primer 76 und 80) und topoisomerasevermittelte Integration mit A-Überhängen in das Vektorrückgrat von pCR2.1 TOPO. Restriktion mit <i>SfiI</i> und <i>BamHI</i> zum Öffnen des LB-Vektors. PCR-Amplifizierung <i>gfp-Hyg<sup>R</sup></i> (Template pUMa317; Primer 84 und 85) und RB (Template gDNA; Primer 82 und 83). Gibson Assembly® der generierten Fragmente.
pKS18	Gent <sup>R</sup> , Amp <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup>	Ersetzt den <i>vps8</i> -Locus über homologe Rekombination durch die Gent-Resistenzkassette aus pUMa1057B.	PCR-Amplifizierung RB (Template gDNA; Primer 101 und 103) und topoisomerasevermittelte Integration mit A-Überhängen in das Vektorrückgrat von pCR2.1 TOPO. Restriktion mit <i>KpnI</i> und <i>BamHI</i> zum Öffnen des RB-Vektors. PCR-Amplifizierung Gent <sup>R</sup> (Template pUMa1057B; Primer 121 und 125) und LB (Template gDNA; Primer 126 und 127). Gibson Assembly® der generierten Fragmente.

## Material und Methoden

pKS20	Gent <sup>R</sup> , Amp <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup>	Ersetzt den <i>rab5a</i> -Locus über homologe Rekombination durch die Gent-Resistenzkassette aus pUMa1057B.	Restriktion pKS7 mit <i>Sfi</i> I zum Austausch der darin enthaltenen Nat <sup>R</sup> -Kassette durch eine Gent <sup>R</sup> -Kassette aus dem ebenfalls mit <i>Sfi</i> I restringierten pUMa1057B und anschließende Ligation der Fragmente.
pKS21 <sup>5)</sup>	Cbx <sup>R</sup> , Amp <sup>R</sup>	C-terminale Fusion von mCherry an Nma1 im <i>ip</i> -Locus unter <i>P<sub>hxt1</sub></i> .	PCR-Amplifizierung ORF <i>nma1</i> (Template gDNA; Primer 132 und 133) und GATEWAY®-BP-Reaktion in pDONR221. GATEWAY®-LR-Reaktion in pDS37. Das entstandene Plasmid enthält einen <i>frameshift</i> , welcher zu einem frühzeitigen Stopcodon zwischen mCherry und Nma1 führt.
pKS22	Hyg <sup>R</sup> , Amp <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup>	Ersetzt den <i>rab5a</i> -Locus über homologe Rekombination durch die Hyg-Resistenzkassette aus pTO52.	Restriktion pKS7 mit <i>Sfi</i> I zum Austausch der darin enthaltenen Nat <sup>R</sup> -Kassette durch eine Hyg <sup>R</sup> -Kassette aus dem ebenfalls mit <i>Sfi</i> I restringierten pTO52 und anschließende Ligation der Fragmente.
pKS23	Gent <sup>R</sup> , Amp <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup>	C-terminale Fusion von 3xHA an Vps3 in Locus.	Restriktion pKS17 mit <i>Sfi</i> I zum Austausch der darin enthaltenen <i>gfp</i> -Hyg <sup>R</sup> -Kassette durch eine 3xHA-Gent <sup>R</sup> -Kassette aus dem ebenfalls mit <i>Sfi</i> I restringierten pMF5-9g und anschließende Ligation der Fragmente.
pKS24	Nat <sup>R</sup> , Amp <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup>	C-terminale Fusion von 3xmCherry an Nma1 in Locus.	Restriktion pNP10 mit <i>Sfi</i> I zum Austausch der darin enthaltenen 3xHA-Hyg <sup>R</sup> -Kassette durch eine 3xmCherry-Nat <sup>R</sup> -Kassette aus dem ebenfalls mit <i>Sfi</i> I restringierten pUMa1057X und anschließende Ligation der Fragmente.



pKS25	Hyg <sup>R</sup> , Amp <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup>	C-terminale Fusion von 3xMyc an Vps8 in Locus.	PCR-Amplifizierung LB (Template gDNA; Primer 104 und 106) und topoisomerasevermittelte Integration mit A-Überhängen in das Vektorrückgrat von pCR2.1 TOPO. Restriktion mit <i>Sfi</i> I und <i>Not</i> I zum Öffnen des LB-Vektors. PCR-Amplifizierung 3xMyc-Hyg <sup>R</sup> (Template pUMa796; Primer 143 und 144) und RB (Template gDNA; Primer 141 und 142). Gibson Assembly® der generierten Fragmente.
pKS26	Cbx <sup>R</sup> , Amp <sup>R</sup>	Destinationsvektor für Promotorreporter-konstrukte mit GFP durch GATEWAY®-Klonierung.	PCR-Amplifizierung <i>ccdB</i> -Kassette (Template p123-GFP-GW1; Primer 197 und 198) und Restriktion des PCR-Amplifikats mit <i>Nco</i> I und <i>Hind</i> III zum Generieren kompatibler Überhänge. Durch eine interne <i>Nco</i> I-Erkennungsstelle entstehen zwei Fragmente. Restriktion p123 mit <i>Nco</i> I und <i>Hind</i> III zum Austausch des darin enthaltenen Promotors durch das restringierte PCR-Fragment mit <i>Nco</i> I und <i>Hind</i> III Überhängen. Der entstandene Vektor wurde erneut mit <i>Nco</i> I restringiert, dephosphoryliert und mit dem restringierten PCR-Fragment mit <i>Nco</i> I Überhängen ligiert.
pKS27	Kan <sup>R</sup>	Entryvektor mit P <sub>tef</sub> in pDONR221-Rückgrat für LR-Reaktion der GATEWAY®-Klonierung.	PCR-Amplifizierung P <sub>tef</sub> (Template pCU3(tef); Primer 134 und 135) zum Anbringen der <i>attB</i> -Erkennungsstellen für die GATEWAY®-Klonierung. BP-Reaktion mit PCR-Produkt und pDONR221.
pKS28	Cbx <sup>R</sup> , Amp <sup>R</sup>	Expressionsvektor P <sub>tef</sub> mit GFP.	GATEWAY® LR-Reaktion mit pKS26 und pKS27
pKS29	Nat <sup>R</sup> , Amp <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup>	C-terminale Fusion von 3xmCherry an Vps8 in Locus.	Restriktion pKS25 mit <i>Sfi</i> I zum Austausch der darin enthaltenen 3xMyc-Hyg <sup>R</sup> -Kassette durch eine 3xmCherry-Nat <sup>R</sup> -Kassette aus dem ebenfalls mit <i>Sfi</i> I restringierten pUMa1057X und anschließende Ligation der Fragmente.

## Material und Methoden

pKS30	Cbx <sup>R</sup> , Amp <sup>R</sup>	C-terminale Fusion von GFP an Yup1 im <i>ip</i> -Locus unter P <sub>tef</sub> .	PCR-Amplifizierung ORF <i>yup1</i> (Template gDNA; Primer 147 und 148). Restriktion PCR-Produkt mit <i>Bam</i> HI und <i>Nco</i> I. Durch eine interne <i>Nco</i> I-Erkennungsstelle entstehen zwei Fragmente. Restriktion p123 mit <i>Hind</i> III und <i>Not</i> I zur Generierung eines Vektorrückgrats mit kompatiblen Überhängen. Restriktion p123 mit <i>Nco</i> I und <i>Not</i> I zur Generierung eines <i>gfp</i> -Fragmentes mit kompatiblen Überhängen. Restriktion pUMa1806 mit <i>Bam</i> HI und <i>Hind</i> III zur Generierung eines P <sub>tef</sub> -Fragmentes mit kompatiblen Überhängen. Ligation von p123-Rückgrat, P <sub>tef</sub> , <i>gfp</i> und dem <i>yup1</i> -Fragment mit <i>Bam</i> HI und <i>Nco</i> I-Überhängen. Linearisierung des entstandenen Vektors mit <i>Nco</i> I und anschließende Dephosphorylierung. Ligation des geöffneten Vektors und des <i>yup1</i> -Fragmentes mit <i>Nco</i> I-Überhängen.
pKS31	Cbx <sup>R</sup> , Amp <sup>R</sup>	C-terminale Fusion von 3xmCherry an Yup1 im <i>ip</i> -Locus unter P <sub>tef</sub> .	PCR-Amplifizierung ORF <i>yup1</i> (Template gDNA; Primer 147 und 148). Restriktion PCR-Produkt mit <i>Bam</i> HI und <i>Nco</i> I. Durch eine interne <i>Nco</i> I-Erkennungsstelle entstehen zwei Fragmente. Restriktion p123 mit <i>Hind</i> III und <i>Not</i> I zur Generierung eines Vektorrückgrats mit kompatiblen Überhängen. Restriktion pUMa1057X mit <i>Nco</i> I und <i>Not</i> I zur Generierung eines <i>3xmCherry</i> -Fragmentes mit kompatiblen Überhängen. Restriktion pUMa1806 mit <i>Bam</i> HI und <i>Hind</i> III zur Generierung eines P <sub>tef</sub> -Fragmentes mit kompatiblen Überhängen. Ligation von p123-Rückgrat, P <sub>tef</sub> , <i>3xmCherry</i> und dem <i>yup1</i> -Fragment mit <i>Bam</i> HI und <i>Nco</i> I-Überhängen. Linearisierung des entstandenen Vektors mit <i>Nco</i> I und anschließende Dephosphorylierung. Ligation des geöffneten Vektors und des <i>yup1</i> -Fragmentes mit <i>Nco</i> I-Überhängen.

pKS32	Gent <sup>R</sup> , Amp <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup>	Ersetzt den <i>vps3</i> -Locus über homologe Rekombination durch die Gent-Resistenzkassette aus pUMa1057B.	Restriktion pKS4 mit <i>Sfi</i> I zum Austausch der darin enthaltenen Nat <sup>R</sup> -Kassette durch eine Gent <sup>R</sup> -Kassette aus dem ebenfalls mit <i>Sfi</i> I restringierten pUMa1057B und anschließende Ligation der Fragmente.
pKS33	Nat <sup>R</sup> , Amp <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup>	N-terminale Fusion von mCherry an Rab7 in Locus.	PCR-Amplifizierung LB (Template gDNA; Primer 149 und 150) und topoisomerasevermittelte Integration mit A-Überhängen in das Vektorrückgrat von pCR2.1 TOPO. Restriktion mit <i>Not</i> I und <i>Xho</i> I zum Öffnen des LB-Vektors. PCR-Amplifizierung <i>mCherry</i> (Template pUMa1806; Primer 151 und 152), ORF <i>rab7</i> (Template gDNA; Primer 153 und 154), Nat <sup>R</sup> (Template pUMa262; Primer 155 und 156) und RB (Template gDNA; Primer 157 und 158). Gibson Assembly® der generierten Fragmente.
pKS34	Gent <sup>R</sup> , Amp <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup>	N-terminale Fusion von mCherry an Rab5b in Locus.	PCR-Amplifizierung LB (Template gDNA; Primer 48 und 49) und topoisomerasevermittelte Integration mit A-Überhängen in das Vektorrückgrat von pCR2.1 TOPO. Restriktion mit <i>Nde</i> I und <i>Not</i> I zum Öffnen des LB-Vektors. PCR-Amplifizierung <i>mCherry</i> (Template pUMa1806; Primer 159 und 160), ORF <i>rab5b</i> (Template gDNA; Primer 161 und 110), Gent <sup>R</sup> (Template pUMa1057B; Primer 111 und 112) und RB (Template gDNA; Primer 113 und 114). Gibson Assembly® der generierten Fragmente.
pKS35	Nat <sup>R</sup> , Amp <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup>	C-terminale Fusion von mKate2 an Vps3 in Locus.	Restriktion pKS17 mit <i>Sfi</i> I zum Austausch der darin enthaltenen <i>gfp</i> -Hyg <sup>R</sup> -Kassette durch eine <i>mKate2</i> -Nat <sup>R</sup> -Kassette aus dem ebenfalls mit <i>Sfi</i> I restringierten pUMa2985 und anschließende Ligation der Fragmente.

## Material und Methoden

pKS36	Gent <sup>R</sup> , Amp <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup>	C-terminale Fusion von mKate2 an Vps3 in Locus.	Restriktion pKS17 mit <i>SfiI</i> zum Austausch der darin enthaltenen <i>gfp</i> -Hyg <sup>R</sup> -Kassette durch eine <i>mKate2</i> -Gent <sup>R</sup> -Kassette aus dem ebenfalls mit <i>SfiI</i> restringierten pUMa3052 und anschließende Ligation der Fragmente.
pKS37 <sup>1)</sup>	Gent <sup>R</sup> , Amp <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup>	Ersetzt den <i>nma1</i> -Locus über homologe Rekombination durch die Gent-Resistenzkassette aus pUMa1057B.	Restriktion pTO52 mit <i>SfiI</i> zum Austausch der darin enthaltenen Hyg <sup>R</sup> -Kassette durch eine Gent <sup>R</sup> -Kassette aus dem ebenfalls mit <i>SfiI</i> restringierten pUMa1057B und anschließende Ligation der Fragmente.
pKS38 <sup>1)</sup>	Gent <sup>R</sup> , Amp <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup>	Ersetzt den <i>nma1</i> -Locus über homologe Rekombination durch die Gent-Resistenzkassette mit FRT-Rekombinationssequenzen aus pUMa1441.	Restriktion pTO52 mit <i>SfiI</i> zum Austausch der darin enthaltenen Hyg <sup>R</sup> -Kassette durch eine Gent <sup>R</sup> -Kassette mit FRT-Rekombinationssequenzen aus dem ebenfalls mit <i>SfiI</i> restringierten pUMa1441 GenR und anschließende Ligation der Fragmente.
pKS39	Nat <sup>R</sup> , Amp <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup>	Ersetzt den <i>rab5c</i> -Locus über homologe Rekombination durch die Nat-Resistenzkassette aus pUMa262.	PCR-Amplifizierung LB (Template gDNA; Primer 168 und 169) und RB (Template gDNA; Primer 179 und 180). Restriktion LB und RB mit <i>SfiI</i> zur Generierung kompatibler Überhänge. Restriktion pUMa262 mit <i>SfiI</i> zur Generierung kompatibler Überhänge an der Nat <sup>R</sup> -Kassette und anschließende Ligation der drei Fragmente. Aufreinigung des Ligationsergebnisses aus einem Agarosegel und topoisomerasevermittelte Integration mit A-Überhängen in das Vektorrückgrat von pCR2.1 TOPO.

pKS40	Gent <sup>R</sup> , Amp <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup>	Ersetzt den <i>rab5c</i> -Locus über homologe Rekombination durch die Gent-Resistenzkassette aus pUMa1057B.	PCR-Amplifizierung LB (Template gDNA; Primer 168 und 169) und RB (Template gDNA; Primer 179 und 180). Restriktion LB und RB mit <i>Sfi</i> I zur Generierung kompatibler Überhänge. Restriktion pUMa1057B mit <i>Sfi</i> I zur Generierung kompatibler Überhänge an der Gent <sup>R</sup> -Kassette und anschließende Ligation der drei Fragmente. Aufreinigung des Ligationsproduktes aus einem Agarosegel und topoisomerasevermittelte Integration mit A-Überhängen in das Vektorrückgrat von pCR2.1 TOPO.
pKS41	Nat <sup>R</sup> , Amp <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup>	N-terminale Fusion von GFP an Rab7 in Locus.	PCR-Amplifizierung LB (Template gDNA; Primer 149 und 150) und topoisomerasevermittelte Integration mit A-Überhängen in das Vektorrückgrat von pCR2.1 TOPO. Restriktion mit <i>Not</i> I und <i>Xho</i> I zum Öffnen des LB-Vektors. PCR-Amplifizierung <i>gfp</i> (Template pUMa317; Primer 165 und 166), ORF <i>rab7</i> (Template gDNA; Primer 167 und 154), Nat <sup>R</sup> (Template pUMa262; Primer 155 und 156) und RB (Template gDNA; Primer 157 und 158). Gibson Assembly® der generierten Fragmente.
PKS42	Hyg <sup>R</sup> , Amp <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup>	C-terminale Fusion von GFP an Tub3 in Locus.	PCR-Amplifizierung LB (Template gDNA; Primer 86 und 88) und RB (Template gDNA; Primer 87 und 90). Restriktion LB und RB mit <i>Sfi</i> I zur Generierung kompatibler Überhänge. Restriktion pUMa317 mit <i>Sfi</i> I zur Generierung kompatibler Überhänge an der <i>gfp</i> -Hyg <sup>R</sup> -Kassette und anschließende Ligation der drei Fragmente. Aufreinigung des Ligationsproduktes aus einem Agarosegel und topoisomerasevermittelte Integration mit A-Überhängen in das Vektorrückgrat von pCR2.1 TOPO.

## Material und Methoden

pKS43	Gent <sup>R</sup> , Amp <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup>	C-terminale Fusion von mKate2 an Tub3 in Locus.	PCR-Amplifizierung LB (Template gDNA; Primer 86 und 88) und RB (Template gDNA; Primer 87 und 90). Restriktion LB und RB mit <i>SfiI</i> zur Generierung kompatibler Überhänge. Restriktion pUMa3052 mit <i>SfiI</i> zur Generierung kompatibler Überhänge an der <i>mKate2</i> -Gent <sup>R</sup> -Kassette und anschließende Ligation der drei Fragmente. Aufreinigung des Ligationsproduktes aus einem Agarosegel und topoisomerasevermittelte Integration mit A-Überhängen in das Vektorrückgrat von pCR2.1 TOPO.
pKS44	Cbx <sup>R</sup> , Amp <sup>R</sup>	N-terminale Fusion GFP an Rab5c im <i>ip</i> -Locus unter $P_{nar1}$ .	PCR-Amplifizierung ORF (Template gDNA; Primer 183 und 184) und $P_{nar1}$ (Template pUMa318; Primer 185 und 186). Generierung kompatibler Überhänge durch Restriktion der PCR-Produkte ORF mit <i>Ascl</i> und <i>NdeI</i> , $P_{nar1}$ mit <i>HindIII</i> und <i>NcoI</i> und des Vektors pUMa1712 mit <i>NcoI</i> und <i>NdeI</i> zur Generierung eines <i>gfp</i> -Fragmentes. Restriktion von pUMa1712 mit <i>HindIII</i> und <i>Ascl</i> zur Öffnung des Vektorrückgrats und anschließende Ligation der Fragmente.
pKS45	Cbx <sup>R</sup> , Amp <sup>R</sup>	C-terminale Fusion mCherry an Nma1 im <i>ip</i> -Locus unter $P_{hxt1}$ .	Restriktion von pKS21 mit <i>Ascl</i> und anschließende Entfernung der DNA-Überhänge durch die Mung-Bean Nuklease. Religation des geöffneten Vektors behebt den in pKS21 vorliegenden <i>frameshift</i> .
pKS46	Gent <sup>R</sup> , Amp <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup>	C-terminale Fusion von 3xHA an Nma1 in Locus.	Restriktion pKS24 mit <i>SfiI</i> zum Austausch der darin enthaltenen <i>3xmCherry</i> -Nat <sup>R</sup> -Kassette durch eine <i>3xHA</i> -Gent <sup>R</sup> -Kassette aus dem ebenfalls mit <i>SfiI</i> restringierten pMF5-9g und anschließende Ligation der Fragmente.

pKS47	Nat <sup>R</sup> , Amp <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup>	Ersetzt den <i>rab5b</i> -Locus über homologe Rekombination durch die Nat-Resistenzkassette aus pUMa262.	Restriktion pKS16 mit <i>SfiI</i> zum Austausch der darin enthaltenen Gent <sup>R</sup> -Kassette durch eine Nat <sup>R</sup> -Kassette aus dem ebenfalls mit <i>SfiI</i> restringierten pUMa262 und anschließende Ligation der Fragmente.
pGB1 <sup>2)</sup>	Cbx <sup>R</sup> , Amp <sup>R</sup>	N-terminale Fusion Yup1 mit mCherry im <i>ip</i> -Locus unter <i>P<sub>tef</sub></i> .	PCR-Amplifizierung ORF <i>yup1</i> (Template gDNA; Primer GB1 und GB2). Restriktion PCR-Produkt mit <i>NdeI</i> und <i>AscI</i> . Restriktion pUMa1806 mit <i>NdeI</i> und <i>AscI</i> zur Generierung eines Plasmid-Rückgrats mit kompatiblen Überhängen. Durch eine interne <i>NdeI</i> Restriktionsstelle entstehen zwei Fragmente. Ligation von pUMa1806-Rückgrat mit <i>NdeI</i> und <i>AscI</i> -Überhängen mit dem restringierten PCR-Produkt. Linearisierung des entstandenen Vektors mit <i>NdeI</i> und anschließende Dephosphorylierung. Ligation des geöffneten Vektors und des Vektor-Fragmentes mit <i>NdeI</i> -Überhängen.
pJKI3 <sup>3)</sup>	Hyg <sup>R</sup> , Amp <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup>	N-terminale Fusion von GFP an die konstitutiv inaktive Mutante von Rab5a in Locus.	Mutagenese-PCR (Template pKS14; Primer JKI1 und JKI2) und topoisomerasevermittelte Integration mit A-Überhängen in das Vektorrückgrat von pCR2.1 TOPO. Restriktion des PCR-Inserts mit <i>SacII</i> zur Generierung kompatibler Überhänge, sowie Restriktion pKS14 mit <i>SacII</i> als Vektorrückgrat. Ligation der beiden Fragmente.
pJKI4 <sup>3)</sup>	Hyg <sup>R</sup> , Amp <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup>	N-terminale Fusion von GFP an die konstitutiv aktive Mutante von Rab5a in Locus.	Mutagenese-PCR (Template pKS14; Primer JKI3 und JKI4) und topoisomerasevermittelte Integration mit A-Überhängen in das Vektorrückgrat von pCR2.1 TOPO. Restriktion des PCR-Inserts mit <i>EcoRI</i> und <i>XmaI</i> zur Generierung kompatibler Überhänge, sowie Restriktion pKS14 mit <i>EcoRI</i> und <i>XmaI</i> als Vektorrückgrat. Ligation der beiden Fragmente.

## Material und Methoden

pJKI5 <sup>3)</sup>	Cbx <sup>R</sup> , Amp <sup>R</sup>	C-terminale Fusion 2xFYVE mit mCherry im <i>ip</i> -Locus unter <i>P<sub>hxt1</sub></i> .	Die 2xFYVE-Domäne wurde für <i>U. maydis</i> dicodonoptimiert synthetisiert (Thermo Fisher) mit <i>KpnI</i> und <i>Ascl</i> -Restriktionserkennungsstellen zur Integration in den ebenfalls mit <i>KpnI</i> und <i>Ascl</i> restringierten pKS21. Der dabei entstandene <i>frameshift</i> zwischen der Domäne und mCherry wurde durch eine erneute Restriktion mit <i>Ascl</i> , dem anschließenden Entfernen der Überhänge durch die Mung-Bean Nuklease und der Religation des Vektors, behoben.
---------------------	--	---	---

1) Matteo Jurca 2) Georg Bachmann Bachelorarbeit 3) Jennifer Klein Masterarbeit 4) Praktikum Ann-Sophie Pabst 5) F3-Praktikum Julia Dennig

### 5.1.10. Sonstige Materialien

Filterpapier 3 MM (Whatman), Glasperlen 150-212 microns (Sigma), Nylonmembran Hybond N+ für den Transfer von DNA (Roth), Roti®-PVDF-Membran (Roth) für den Transfer von Proteinen (Western Blot), Petrischalen (Greiner), 1,5 ml- und 2 ml-Reaktionsgefäße (Greiner), 0,2 ml-PCR-Reaktionsgefäße (Biozym), 96-Well PCR-Platten (Biorad) für qRT-PCR, 15 ml- und 50 ml-PPN-Röhrchen (Greiner), 1,5 ml-Polystyrol-Küvetten (Greiner), Sterilfilter 0,20 µm (Roth), 1 ml-Einmalspritzen (Dispomed), Einmal-Injektionskanülen (B. Braun), 10 µl, 200 µl und 1000 µl Pipettenspitzen (Greiner), 10 µl, 200 µl und 1000 µl Filterspitzen (Biozym). Erstellung von Schaubildern erfolgte unter Verwendung von Medical Art PowerPoint Image Bank (Servier).



## 5.2. Mikrobiologische und genetische Methoden

### 5.2.1. Kultivierung von *Escherichia coli*

Standardmäßig wurden *E. coli*-Kulturen als Schüttelkulturen bei 180 rpm oder auf Festmedien bei 37 °C unter aeroben Bedingungen kultiviert. Übernachtskulturen wurden entweder aus Glycerinkulturen, welche bei -80 °C eingelagert waren, oder von bewachsenen YT-Ampicillin Platten, die maximal einen Monat bei 4 °C gelagert waren, in Flüssigmedium angeimpft.

### 5.2.2. Kultivierung von *Ustilago maydis*

Die Kultivierung von *U. maydis*-Stämmen wurde standardmäßig als Schüttelkulturen bei 180 rpm oder auf Festmedien unter aeroben Bedingungen bei 28 °C durchgeführt. Übernachtskulturen wurden entweder aus Glycerinkulturen, die bei -80 °C eingelagert waren, oder von bewachsenen CM-Platten, die höchstens einen Monat bei 4 °C gelagert waren, angeimpft.

### 5.2.3. Bestimmung der Zelldichte in Flüssigkulturen

Die photometrische Bestimmung der Zelldichte in Flüssigkulturen wurde in einem Jenway 7300 Spectro-Photometer bei einer Wellenlänge von 600 nm durchgeführt. Dabei entspricht  $OD_{600} = 1$  im Verhältnis zum Referenzwert des jeweiligen Kulturmediums, je nach verwendetem Stamm und Wachstumsmedium, etwa  $1-5 \times 10^7$  Zellen/ml Kultur. Um eine lineare Abhängigkeit und eine ausreichende Messgenauigkeit sicherzustellen, wurden die Kulturen für die Messung der  $OD_{600}$  durch entsprechende Verdünnung auf einen Wert unterhalb von 0,5 verdünnt.

### 5.2.4. Transformation von *E. coli*-Stämmen

Modifiziert nach (Cohen *et al.*, 1972).

Um *E. coli*-Zellen kompetent für die Aufnahme von DNA zu machen wurden diese mit  $CaCl_2$  chemisch behandelt. Dazu wurden Zellen von einer frisch ausgestrichenen

## Material und Methoden

Platte in 4 ml SOB-Medium ohne Magnesium überführt und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die Kultur wurde in 200 ml frisches Medium überführt (SOB plus f. c. 10 mM MgCl<sub>2</sub>) und bei 37 °C und 180 rpm bis zum Erreichen einer OD<sub>600</sub> von 0,6 inkubiert, was einer Zelldichte von 5x10<sup>7</sup> Zellen/ml entspricht. Die Kultur wurde auf 50 ml Reaktionsgefäße aufgeteilt und die Zellen wurden nach einer zehnmütigen Inkubation auf Eis für 15 min bei 3.000 rpm und 4 °C abzentrifugiert. Das Pellet wurde durch Vortexen in 16,7 ml CCMB 80 aufgenommen. Nach einer Inkubation von 20 min auf Eis wurde der Überstand durch Zentrifugation (10 min, 3.000 rpm und 4 °C) abgetrennt und entfernt. Nach Resuspendierung des Pellets in 4,17 ml CCMB 80 wurden Aliquots von je 50 µl erzeugt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Anschließend kann eine Lagerung bei -80 °C erfolgen.

Um diese Zellen zu transformieren, wurden sie zunächst langsam auf Eis aufgetaut. Nach Zugabe der Plasmid-DNA mit einem DNA-Gehalt von maximal 1 ng erfolgte eine 15-minütige Inkubation auf Eis. Ein Hitzeschock für 45 s bei 42 °C sorgte für die Aufnahme der DNA. Nach Zugabe von 200 µl dYT-Medium wurden die Zellen bei 37 °C und 1.400 rpm 30-60 Minuten geschüttelt. Dies sorgte für die Expression der auf dem Plasmid vorhandenen Gene, wozu auch die Resistenzgene gegen ein nachfolgend verwendetes Antibiotikum gehören. Diese Resistenz wird als Selektionsmarker verwendet, indem der Ansatz auf YT-Platten mit dem entsprechenden Antibiotikum ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert wurde. Diese Methode erzielte eine Transformationseffizienz von etwa 10<sup>7</sup> Transformanden pro µg eingesetzter DNA.

### 5.2.5. Protoplastierung und Transformation von *U. maydis*-Stämmen

Nach (Gillissen *et al.*, 1992, Schulz *et al.*, 1990).

Von einer Kolonie auf Festmedium wurde eine YEPS<sub>light</sub>-Flüssigkultur mit einem Volumen von 15-20 ml in einem Schikanekolben angesetzt und über Nacht bei 28 °C und 200 rpm inkubiert. Diese Vorkultur wurde anschließend in 50 ml frischem YEPS<sub>light</sub>-Medium so weit verdünnt, dass eine OD<sub>600</sub> von 0,2 erreicht wurde und bei 28 °C und 200 rpm etwa 4-6 Stunden, bis zu einer Zelldichte von maximal 5 x 10<sup>7</sup> Zellen/ml (OD<sub>600</sub> = 0,6-1), geschüttelt. Nach Erreichen des optimalen Zelltiters wurden die Zellen durch Zentrifugation (3.500 rpm, 6 min, RT, Heraeus Biofuge

stratos) in 50 ml Greiner-Röhrchen pelletiert, einmal mit 20 ml SCS-Puffer gewaschen und in 5 ml SCS-Puffer resuspendiert. Anschließend wurden 4 ml Lysing Enzyme (Sigma L1412 in SCS-Puffer sterilfiltriert) zugegeben. Die in diesem Puffer bei Raumtemperatur erfolgende Protoplastierung konnte mikroskopisch beobachtet werden, da die ursprünglich zigarrenförmigen Zellen nach der Lyse der Zellwand abrundeten und eine kugelige Gestalt annahmen. Nach vollständiger Protoplastierung (Dauer 8-12 min) wurden die Ansätze mit 30 ml SCS-Puffer versehen und vorsichtig durchmischt. Anschließend wurden die Protoplasten für 8 min bei 2.300 rpm (RT) zentrifugiert. Um sämtliche Rückstände vollständig zu entfernen, wurde das Pellet zweimal mit 10 ml SCS-Puffer gewaschen. Um die Zellen schonend in den nächsten Puffer zu überführen wurde das Pellet in einer Mischung aus 5 ml SCS-Puffer und 5 ml STC-Puffer resuspendiert und erneut zentrifugiert. Anschließend wurde es mit 10 ml kaltem STC-Puffer gewaschen. Das Pellet wurde danach in einem Volumen von 0,5 ml eiskaltem STC-Puffer aufgenommen und zu je 50  $\mu$ l aliquotiert. Die Protoplasten können bei -80 °C über mehrere Monate hinweg aufbewahrt werden.

Zur integrativen Transformation wurde ein solches Aliquot an Protoplasten mit 3-5  $\mu$ g linearisierter DNA (in bis zu 10  $\mu$ l Gesamtvolumen) und 1  $\mu$ l Heparin-Lösung (15 mg/l in H<sub>2</sub>O<sub>bid</sub>) für 15 min auf Eis inkubiert. Die Regenerationsagarplatten wurden durch Überschichten von 10 ml selektionsmarkerhaltigem Bottom-Agar mit 10 ml Top-Agar hergestellt. Nach Zugabe von 0,25 ml STC/PEG folgte eine weitere Inkubation für 15 min auf Eis. Anschließend wurde der gesamte Transformationsansatz auf der Regenerationsagarplatte ausgestrichen. Nach drei bis sieben Tagen Inkubation bei 28 °C wurden die gewachsenen Kolonien mit sterilen Zahnstochern auf selektionsmarkerhaltigen CM-Platten vereinzelt.

#### 5.2.6. Induktion von *U. maydis*-Stämmen für Protein- oder RNA-Extraktion

Um filamentöses Wachstum induzieren zu können wurden Stämme verwendet, bei denen die *b*-Gene unter Kontrolle des durch Arabinose induzierbaren P<sub>cr<sub>g</sub>1</sub>-Promotors (AB31) oder des durch Nitrat induzierbaren P<sub>nar</sub>-Promotors (AB33) standen. Die zu induzierenden Stämme wurden von einer Kolonie auf Festmedium in Flüssigkultur mit reprimierenden Bedingungen (CM-Glukose (f.c. 1 %) bei P<sub>cr<sub>g</sub>1</sub> mit Glukose als einziger Kohlenstoffquelle, Ammonium-MM bei P<sub>nar</sub> mit Ammonium als einziger

## Material und Methoden

Stickstoffquelle) angeimpft und bei 28 °C und 200 rpm in Schikanekolben inkubiert. Die Hauptkultur wurde ebenfalls unter reprimierenden Medienbedingungen so eingestellt, dass die Kulturen für die Induktion eine OD<sub>600</sub> von 0,2-0,3 in 150 ml Medium für Protein-Extraktion, in 10 ml Medium für RNA-Extraktion, erreichten. Die Zellen wurden daraufhin abzentrifugiert (Heraeus Biofuge stratos 3.500 rpm, 6 Min, RT), der Überstand verworfen und die Zellen in gleichem Volumen Induktionsmedium (CM-Arabinose (f.c. 1 %) bei P<sub>crp1</sub> mit Arabinose als einziger Kohlenstoffquelle, Nitrat-MM bei P<sub>nar1</sub> mit Nitrat als einziger Stickstoffquelle) gewaschen. Nach einem erneuten Zentrifugationsschritt erfolgte die Resuspendierung der Zellen im Induktionsmedium und eine Inkubation für 7 h bei 28 °C und 200 rpm in Schikanekolben. Für die Probenentnahme zur Isolierung von Proteinen erfolgte eine erneute Bestimmung der OD<sub>600</sub>, um die Proben normalisieren zu können. Anschließend wurden die Zellen abzentrifugiert (Heraeus Biofuge stratos 3.500 rpm, 6 Min, RT), der Überstand verworfen und die Zellen in gleichem Volumen mit 1xTBS gewaschen. Nach einem erneuten Zentrifugationsschritt wurde der Überstand entfernt und die Zellpellets in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Pellets können auf diese Weise einige Zeit bei -80 °C gelagert werden. Für die Probenentnahme zur Isolierung von RNA wurden die Zellen abzentrifugiert (Heraeus Biofuge stratos 3.500 rpm, 6 Min, RT), der Überstand verworfen und die Zellpellets in flüssigem Stickstoff eingefroren.

### 5.2.7. Zellbiologische Untersuchung von *U. maydis*-Stämmen

Die zellbiologische Untersuchung von *U. maydis*-Zellen erfolgte mit den in Tabelle 10 aufgelisteten Mikroskopen und Binokularen.

**Tabelle 10: In dieser Arbeit verwendete Mikroskope und Binokulare**

Mikroskop/Binokular	Hersteller	Bezeichnung
1	ZEISS	Axio Imager.Z1, Nomarski-Prisma, CCD-Kamera (AxioCam MRm)  Filamente: 63x Ölimmersionsoobjektiv mit 1,4 numerischer Apertur

		Sporidien: 100x Ölimmersionsobjektiv EC-Plan-NEOFLUAR mit 1,3 numerischer Apertur
2	ZEISS	LSM 900 mit Airyscan 2, Axio Observer.Z1/7  Plan-Apochromat 63x Ölimmersionsobjektiv mit 1,4 numerischer Apertur DIC M27
3	ZEISS	LSM 800 mit Airyscan, Axio Observer.Z1/7  Plan-Apochromat 63x Ölimmersionsobjektiv mit 1,4 numerischer Apertur DIC M27
4	ZEISS	Axio Zoom.V16, PlanNeoFluar Z 1.0x Objektiv, Axiocam 702
5	Leica	M420, DFC 500, KL 1500 electronic

Auf die Objektträger wurde ein Kissen aus 100 µl 2 % Agarose in H<sub>2</sub>O aufgetragen und durch Auflegen eines weiteren Objektträgers für die Entstehung einer planen Oberfläche und somit einer einheitlichen Fokusebene gesorgt. Darauf wurden 3 µl der zu untersuchenden Kultur gegeben und mit einem Deckglas bedeckt. Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen erfolgten in den GFP- (Anregung: 488 nm, Emission: 509 nm), RFP- (Anregung: 545-590 nm, Emission: 572-612 nm) oder DAPI-Kanälen (Anregung: 353 nm, Emission: 465 nm) mit 100 ms Belichtungszeit.

#### 5.2.8. Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung von *U. maydis*-Stämmen an inversen Mikroskopen

Für die Verwendung von inversen Mikroskopen wurden die Zellen in 4 %-low gelling Agarose (Sigma Agarose Typ VII: Low Gelling Temperature) eingegossen. Die Agarose wurde bei 72 °C 20 min verflüssigt, anschließend abgekühlt und bei 55 °C verwendet. Es wurden jeweils 200 µl der Kultur und der Agarose gemischt und daraus 200 µl in eine Mikroskopiekammer mit Glasboden (ibidi GmbH µ-Slide 8 Well Glass Bottom) überführt.

Für die Untersuchung von Zellen an einem Konfokalmikroskop mit *Airyscan*-Technologie (Zeiss LSM 900 mit *Airyscan* 2) wurden Zellen wie beschrieben

## Material und Methoden

in einer Übernachtskultur angezogen und filamentöses Wachstum induziert. Die Aufnahmen wurden mit Hilfe eines inversen AxioObserver 7, Celldiscoverer 7 Mikroskops mit einem Plan-Apochromat 63x/1.40 Öl Ph3 M27 Objektiv (Zeiss, Jena), einem Zeiss Multi Laser Modul mit einem 488 Dioden Laser und einem 561 nm Dioden (SHG) Laser erstellt.

Mit dem Programm ZEN 2012 blue edition von ZEISS wurden die Bilder nachbearbeitet (Bildausschnitt, Kontrastverstärkung, Maßstabsskalierung) und für die weitere Verwendung in das JPEG-Format konvertiert. Die Erstellung von Kymographen, Graphen zur Veranschaulichung von Signalüberlagerungen, sowie die Messung der Geschwindigkeiten von Partikeln erfolgte unter Verwendung des Programmes Fiji ImageJ (Schneider *et al.*, 2012, Schindelin *et al.*, 2012, Schindelin *et al.*, 2015).

Für die Untersuchung von Sporidien wurde eine Vorkultur in CM-Medium mit 1 % Glukose über Nacht bei 28 °C im Schüttelinkubator angezogen. Die Hauptkultur wurde auf eine  $OD_{600} = 0,25$  eingestellt und weitere 1,5-2 Stunden bei 28 °C inkubiert. Für die Mikroskopie war es wichtig, dass sich die Sporidien in der exponentiellen Wachstumsphase befanden und eine Zelldichte von etwa  $2,5 \times 10^6$  Zellen/ml aufweisen. Um Filamente mikroskopieren zu können wurden Stämme verwendet, bei denen die *b*-Gene unter Kontrolle des durch Arabinose induzierbaren  $P_{crg1}$ -Promotors (AB31) oder des durch Nitrat induzierbaren  $P_{nar1}$ -Promotors (AB33) standen. Die Vorkultur wurde in CM-Medium mit 1 % Glukose angeimpft und bei 28 °C unter Schütteln über Nacht inkubiert. Die  $OD_{600}$  der Hauptkultur wurde am darauffolgenden Tag so eingestellt, dass sie bei Filamentinduktion zwischen 0,5 und 0,6 lag. Die Filamentinduktion erfolgte durch einen Medienwechsel von CM-Glukose (1 %) zu CM-Arabinose (1 %) bei AB31, oder von Ammonium- nach Nitrat-Minimalmedium bei AB33. Vor Induktion wurde das Zellpellet mit dem Induktionsmedium einmal gewaschen. Die Betrachtung der Filamente erfolgte nach 15-18 h filamentösem Wachstum wie oben beschrieben.

### 5.2.9. CMAC

Um die Vakuolen der Zellen visualisieren zu können erfolgte eine Färbung mit CellTracker™ Blue CMAC (7-Amino-4-Chlormethylcumarin). Der Farbstoff ist in der Lage frei in die Zellen zu diffundieren und wird dort in membranundurchlässige

Reaktionsprodukte umgewandelt. CMAC enthält eine Chloromethylgruppe, welche in der Lage ist mit Thiol-Gruppen zu reagieren, wie sie in Glutathion S-Transferase-vermittelten Reaktionen vorkommen (Thermo Fisher Scientific 2014). Glutathion-Konjugate werden unter ATP-Verbrauch in die Vakuolen transportiert (Doenecke *et al.*, 2005), wodurch CMAC in der Lage ist die Vakuolen anzufärben. Dazu wurden 1 ml einer Flüssigkultur in einem 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß abzentrifugiert (Thermo Scientific Heraeus Pico21, 5 min, 3.500 rpm). Das Pellet wurde in 1 ml Medium mit 10 µM CMAC resuspendiert und 30 min bei RT unter Schütteln im Dunkeln inkubiert (Eppendorf-Thermomixer, 550 rpm). Anschließend wurden die Zellen erneut abzentrifugiert, das Pellet mit frischem Medium gewaschen und in 1 ml Medium aufgenommen. Die Mikroskopie erfolgte im CFP- oder DAPI-Kanal.

### 5.2.10. Propidiumiodid-Färbung

Für die Visualisierung von toten Zellen wurde eine Färbung mit Propidiumiodid durchgeführt. Zu 1 ml Zellen mit  $OD_{600}=0,6-1,0$  wurden in einem 2 ml Reaktionsgefäß 1 µl Propidiumiodidlösung (1 mg/ml, Vybrant® Apoptosis Assay Kit #2, Invitrogen) hinzugegeben und bei RT im Dunkeln 15 min unter Schütteln inkubiert (Eppendorf-Thermomixer, 550 rpm). Anschließend wurden die Zellen pelletiert (Thermo Scientific Heraeus Pico21, 5 min, 3.500 rpm) und in gleicher Menge ddH<sub>2</sub>O aufgenommen. Da Propidiumiodid nicht membrangängig ist, kann es nur in abgestorbene Zellen, deren Membran durchlässig ist, eindringen und interkaliert dort in die DNA. Die Analyse der Zellen erfolgt im RFP-Kanal des Fluoreszenzmikroskops.

### 5.2.11. Fixierung von Zellen

Die Anzucht der Zellen für Fixierungen erfolgte wie bereits beschrieben. Zu 10 ml Kultur in CM-Glukose (f.c. 1 %) oder induzierten filamentösen Kulturen in CM-Arabinose (f.c. 1 %) wurde 37 %-Formaldehyd (f.c. 1 %) unter Rühren tropfenweise hinzugegeben und 10 min bei RT unter Rühren inkubiert. Die Reaktion wurde mit 2 M Glycin (f.c. 125 mM) gestoppt und erneut 10 min bei RT unter Rühren inkubiert. 1 ml der Kulturen wurde entnommen, abzentrifugiert (Thermo Scientific

## Material und Methoden

Heraeus Pico21, 5 min, 3.500 rpm), mit 1xPBS gewaschen, in 1xPBS aufgenommen und bei 4 °C gelagert.

### 5.2.12. DAPI-Färbung

Zur Färbung von Zellkernen wurde das DAPI Vectashield Mounting Medium der Firma Vector Laboratories verwendet. 10 µl von einer fixierten Kultur wurden mit 1 µl DAPI-Medium gemischt, nach wenigen Minuten wurden 3 µl der gefärbten Zellen auf einem Objektträger mikroskopisch analysiert.

### 5.2.13. Erstellung von Kymographen

Zur Erstellung der Kymographen wurden bei 100 ms Belichtungszeit pro Bild 60 s Videos aufgenommen (Einstellungen in ZEN: Dauer 1 min, „use camera streaming“). Vor der Analyse der Videos wurde mit Hilfe von Fiji ImageJ (Schneider *et al.*, 2012, Schindelin *et al.*, 2012, Schindelin *et al.*, 2015) eine sogenannte Bleichkorrektur (*bleaching correction*) durchgeführt (Einstellung: *Histogram matching*) und in diesen Dateien eine Linie (*segmented line*) entlang der sichtbaren Bewegungen gelegt. Das Plugin *KymographBuilder* errechnet daraus einen Kymographen, der die Partikelbewegung anhand des zurückgelegten Weges (µm) in einer bestimmten Zeit (sek) abbildet. Zur Skalierung mussten für das Bild spezifische Werte eingegeben werden: 1 µm entspricht mit den gewählten Parametern 9,7674 Pixel. Für die Zeitangabe musste ein Quotient gebildet werden aus der Gesamtzahl der Bilder pro Sekunde (Beispiel: 600 Bilder/60 sek = 10). Diese Werte müssen im Reiter „set scale“ eingegeben werden:

Distanz:

Zeit:

Distance in pixels: 9,7674

Distance in pixels: 10

Known distance: 1,00

Known distance: 1,00

Pixel aspect ratio: 1,0

Pixel aspect ratio: 1,0

Unit: micron

Unit: sek



Zur Bestimmung der Geschwindigkeit einzelner Partikel ist die Berechnung der Steigung der Endosomen-Bewegungslinie notwendig. Indem man eine Linie über die zu messende Linie im Kymographen legt und diese vermisst (Funktion *measure*), erhält man bei Aktivierung einer speziellen Funktion (*Analyze – set measurements – Haken setzen bei bonding rectangle*) die Werte *width* und *height*. Diese müssen in Excel übertragen und in folgende Formel eingesetzt werden:  $width / ((60/600) \cdot 9,7674 \cdot height)$  (abhängig von der Anzahl der aufgenommenen Bilder). Die Berechnung der Geschwindigkeit mit dieser Formel ergibt ein Ergebnis in der Einheit  $\mu\text{m/s}$ .

#### 5.2.14. Quantifizierung von Vesikeln

Die Quantifizierung von Vesikeln erfolgte mit Hilfe von Fiji ImageJ (Schneider *et al.*, 2012, Schindelin *et al.*, 2012, Schindelin *et al.*, 2015) für fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen mit 100 ms Belichtungszeit. Die Aufnahmen wurden in 8-bit konvertiert (*image – type – 8-bit*). Um den Hintergrund zu entfernen wurde zunächst der Median-Filter mit einem Radius von 1 Pixel angewendet (*process – filters – median*) und im Anschluss der Hintergrund subtrahiert (*process – subtract background*, mit den Werten *rolling=5 pixels, sliding paraboloid*). Um die Objektgrenzen gegenüber dem Hintergrund schärfer abzugrenzen erfolgte eine Kantenverstärkung (*image – adjust – auto local threshold* mit den Parametern *Bernsen, radius=15, parameter 1=0, parameter 2=0, white objects on black background*). Im Anschluss erfolgte die Zählung der Vesikel (*analyze – analyze particles* mit den Parametern *size 0-Infinity, circularity 0.00-1.00, show: nothing, display results, summarize*). Es erfolgt eine Bestimmung der Vesikelanzahl und der durchschnittlichen Vesikelgröße.

#### 5.2.15. Analyse von Colokalisierung

Die Analyse von Signalüberlappungen erfolgte mit Hilfe von Fiji ImageJ (Schneider *et al.*, 2012, Schindelin *et al.*, 2012, Schindelin *et al.*, 2015) für fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen mit 100 ms Belichtungszeit. Die Aufnahmen wurden in 8-bit konvertiert (*image – type – 8-bit*). Um den Hintergrund zu entfernen wurde zunächst der Median-Filter mit einem Radius von 1 Pixel angewendet (*process – filters – median*) und im Anschluss der Hintergrund subtrahiert (*process – subtract*

## Material und Methoden

*background*, mit den Werten *rolling=5 pixels*, *sliding paraboloid*). Um die Objektgrenzen gegenüber dem Hintergrund schärfer abzugrenzen erfolgte eine Kantenverstärkung (*image – adjust – auto local threshold* mit den Parametern *Bernsen*, *radius=15*, *parameter 1=0*, *parameter 2=0*, *white objects on black background*). Im Anschluss erfolgte die Bestimmung der Signalüberlappung durch das *JACoP plugin* mit Auswahl der M1&M2 Koeffizienten.

### 5.2.16. Pflanzeninfektionsstudien

Um die Auswirkungen von Deletionen auf die Pathogenität zu testen wurden Infektionsstudien durchgeführt. Dazu wurden Early Golden Bantam Maispflanzen sieben Tage nach Aussaat durch Injektion einer *U. maydis*-Lösung infiziert. Nach Animpfen einer Übernachtskultur in jeweils 20 ml YEPS<sub>light</sub>-Medium (28 °C, 180 rpm) wurde am darauffolgenden Morgen die OD<sub>600</sub> gemessen und in frischem Medium auf OD<sub>600</sub> = 0,25 verdünnt. Die Kulturen wurden für zusätzliche 4 h bei 28 °C und 200 rpm inkubiert. Das Medium wurde abzentrifugiert (6 min, 3500 rpm, Heraeus Biofuge stratos) und das Zellpellet mit H<sub>2</sub>O gewaschen. Anschließend wurde eine OD<sub>600</sub> = 3 mit H<sub>2</sub>O eingestellt. Solopathogene Stämme konnten direkt injiziert werden, zu kreuzende Stämme wurden vor der Injektion im Verhältnis 1:1 gemischt. Der röhrenförmige Aufbau eines Mais-Sprosses vereinfacht die Injektion der Kulturen. Dazu wurde die Kultur mit Hilfe von Injektionskanülen im unteren Bereich des Sprosses in den Hohlraum injiziert. Bereits nach wenigen Tagen konnten erste Anzeichen der Infektion in Form von Chlorosen beobachtet werden. Die Auswertung der Symptome erfolgte nach sieben Tagen Infektionszeit.

### 5.2.17. Sporenanalyse

Die Infektion von Maispflanzen zur Sporenanalyse erfolgte, wie für Pflanzeninfektionen beschrieben. Infizierte Pflanzen wurden drei Wochen inkubiert und anschließend die sporenhaltenden Tumore geerntet. Zerkleinerte Tumore wurden in saugfähigem Material zwei Wochen bei 37 °C getrocknet, mit einem Pistill zerrieben und in 1,5 ml H<sub>2</sub>O resuspendiert. Die Sporensuspension wurde durch eine membrangestopfte Pasteurpipette (Membran Schleicher&Schuell 595 Rundfilter 90 mm Durchmesser)

filtriert. Es folgte eine Zentrifugation bei 7000 rpm für 5 min (Thermo Scientific Heraeus Pico21) und das Resuspendieren des Pellets in 200 µl 100 mM CuSO<sub>4</sub>. Nach einer 15-minütigen Inkubation wurden die Sporen erneut zentrifugiert, mit H<sub>2</sub>O gewaschen und mit einem Verdünnungsausstrich auf CM-Glukose-Platten mit 100 mg/l Ampicillin und 100 mg/l Tetracyclin aufgebracht. Die Platten wurden zum Auskeimen für 4 Tage bei 28 °C inkubiert. Ausgekeimte Sporen müssen vor der Analyse erneut vereinzelt werden, da aus jeder Spore vier haploide Sporidien entstehen. Abhängig von den verwendeten Stämmen erfolgt nun eine Analyse auf meiotische Aufteilung durch Rückkreuzung mit kompatiblen Kreuzungspartnern oder durch Test auf Verteilung von Selektionsmarkern. Auf diese Weise können ebenfalls Untersuchungen durchgeführt werden, um zu zeigen, dass ein Gen in *U. maydis* essenziell ist. Dazu wird das Gen in einem der Allele des diploiden Stamms FBD11 deletiert. Die Meiose während dem Auskeimen der Spore führt zu zwei haploiden Sporidien, deren Zellkern die Deletion des Gens, mit dem damit eingebrachten Selektionsmarker, enthält und zwei haploiden Sporidien mit unverändertem Genom. Falls das untersuchte Gen jedoch essenziell ist, können die haploiden Sporidien mit Deletion und Selektionsmarker nicht überleben. Daher verfügen in diesem Fall alle vereinzelt Kolonien über die Kopie des Gens und können somit nicht auf der Platte mit Selektionsdruck wachsen. Ist das Gen nicht essenziell, tragen 50 % der vereinzelt Kolonien den Selektionsmarker und können somit auf der Platte mit Selektionsdruck wachsen.

#### 5.2.18. Untersuchung des filamentösen Wachstums auf Aktivkohle

*U. maydis*-Stämme wurden von CM-Glukose-Platten in 10 ml CM-Glukose (f.c. 1 %) Flüssigmedium angeimpft und über Nacht bei 28 °C und 180 rpm inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurde die Hauptkultur so eingestellt, dass die Zellen nach 4 h Wachstum in einer OD<sub>600</sub> von 0,8 vorlagen. Die OD<sub>600</sub> wurde nach Ablauf der 4 h überprüft, 1 ml der Kulturen entnommen und 6 Min bei 3500 rpm pelletiert (Heraeus Biofuge stratos). Die Zellen wurden ausgehend von der gemessenen OD<sub>600</sub> in der Menge H<sub>2</sub>O aufgenommen, dass eine OD<sub>600</sub> von 1 erreicht wurde. Es wurden 3,5 µl der Kulturen auf Glukosehaltige CM-Aktivkohle-Platten getropft und nach zwei Tagen ausgewertet.

### 5.2.19. Kreuzung von *U. maydis* in Flüssigkultur

Kompatible *U. maydis*-Stämme wurden von CM-Glukose-Platten in 10 ml CM-Glukose (f.c. 1 %) Flüssigmedium angeimpft und über Nacht bei 28 °C und 180 rpm inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurde die Hauptkultur so eingestellt, dass die Zellen nach 4 h Wachstum in einer OD<sub>600</sub> von 0,8 vorlagen. Je 500 µl von beiden Stämmen wurden in 15 ml Röhren (Greiner) gemischt und mit 1 ml CM-Glukose (+ 2 % Aktivkohle) versetzt. Die Zellen wurden auf einem Drehrad bei 28 °C inkubiert und nach 6 h, sowie nach einer Inkubation über Nacht, mikroskopisch analysiert.

### 5.2.20. Pheromonstimulation in Flüssigkultur

Für die Induktion von Konjugationshyphen mit synthetischem Pheromon wurden die Zellen von CM-Glukose-Platten in 10 ml CM-Glukose (f.c. 1 %) Flüssigmedium angeimpft und über Nacht bei 28 °C und 180 rpm inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurde die Hauptkultur so eingestellt, dass die Zellen nach 4 h Wachstum in einer OD<sub>600</sub> von 0,3 vorlagen. Jeweils 3 ml Kultur wurden in einem 15 ml Röhren (Greiner) mit 2,5 µg/ml synthetischem Pheromon (in DMSO) gemischt. Die Zellen wurden auf einem Drehrad bei 28 °C inkubiert und nach 6 h, sowie nach einer Inkubation über Nacht, mikroskopisch analysiert.

## 5.3. Molekularbiologische Standardmethoden

### 5.3.1. Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Der Gehalt an Nukleinsäuren in einer wässrigen Lösung wurde photometrisch bestimmt. Bei einer Wellenlänge von 260 nm und einer Schichtdicke von 1 cm entspricht ein Absorptionswert von 1 einer Konzentration von etwa 50 µg/ml doppelsträngiger DNA und 33 µg/ml einzelsträngiger DNA. Der Quotient aus den optischen Dichten bei den Wellenlängen 260 nm und 280 nm dient als Maß für die Reinheit der enthaltenen Nukleinsäuren. Liegt dieser Wert bei etwa 1,8, hat die DNA einen hohen Reinheitsgrad. Ein signifikant höherer Wert lässt sich durch

Verunreinigungen durch Salze oder Zucker erklären, ein deutlich niedrigerer Wert durch Proteinrückstände.

Sämtliche durchgeführte Messungen erfolgten durch ein NanoDrop ND-2000 (Thermo Fisher Scientific).

### 5.3.2. Isolierung von Nukleinsäuren

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

Nach (Sambrook *et al.*, 1989).

Durch „kochende Lyse“ wurde die Isolation von Plasmid-DNA aus einer 1,5 ml Übernachtskultur von *E. coli* durchgeführt. Die Kulturen wurden eine Minute bei 13.000 rpm (RT, Heraeus Biofuge pico) abzentrifugiert. Nach Entfernen des Überstands wurde das Pellet in 300 µl STET-Puffer resuspendiert und nach Zugabe von 30 µl Lysozym-Lösung (10 mg/ml in 1xTE) etwa 10 min in einem Eppendorf-Heizblock bei 1.400 rpm und 37 °C inkubiert, um das Pellet zu lösen. Anschließend folgte eine Inkubation bei 95 °C für eine Minute. Die folgende Zentrifugation (13.000 rpm, 15 min) verklumpte die lysierten Zelltrümmer und die denaturierte genomische DNA, so dass diese anschließend mit einem sterilen Zahnstocher aus der wässrigen Lösung entfernt werden konnten. Die darin gelöste Plasmid-DNA wurde mit 30 µl Minilysat(III)-Lösung und 500 µl Isopropanol während einer 15-minütigen Zentrifugation (13.00 rpm, RT, Heraeus Biofuge pico) ausgefällt. Das Pellet wurde mit 1 ml 70 %-igem Ethanol gewaschen. Anschließend erfolgte eine Aufnahme in 100 µl TE-Puffer mit 50 µg/ml RNase A bei 50 °C im Thermomixer (Eppendorf).

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

Nach (Hoffman und Winston, 1987).

Um genomische DNA aus einer 2,5 ml Übernachtskultur in YEPS<sub>light</sub>-Medium zu isolieren, wurden zunächst etwa 2 ml der Kultur in einem Reaktionsgefäß mit etwa 300 µg Glasperlen pelletiert (1 min, 13.000 rpm, RT, Heraeus Biofuge pico) und der Überstand abgesaugt. Das Zellpellet wurde in 500 µl Lysis-Puffer aufgenommen und unter Verwendung eines Vibrax-Schüttlers für 15 min bei 1400 rpm erfolgte der Zellaufschluss. Es folgte eine Inkubation für 15 min bei 65 °C und 550 rpm in einem Eppendorf-Thermomixer und anschließend für 5 min auf Eis. Nach der Zugabe von

## Material und Methoden

100 µl 8 M Kaliumacetat wurden die Proben invertiert oder gevortext, um Proteine auszusalzen. Diese wurden gemeinsam mit den Zelltrümmern durch Zentrifugation (15 min, 13.000 rpm, RT, Heraeus Biofuge pico) von der wässrigen Phase getrennt. Aus dem Überstand wurden 500 µl in ein frisches 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und die darin gelöste genomische DNA durch Zugabe von 300 µl Isopropanol gefällt. Nach Pelletierung der genomischen DNA (15 min, 13.000 rpm, RT, Heraeus Biofuge pico) wurde diese mit 500 µl 70 %-igem Ethanol gewaschen. Anschließend erfolgte eine Resuspendierung bei 50 °C und 850 rpm (Eppendorf-Thermomixer) in 50 µl TE-Puffer mit 50 µg/ml RNase A. Durch Auftragung von 2 µl der DNA auf ein 0,8 %-iges TBE-Agarosegel erfolgte eine Qualitätskontrolle.

### **Aufreinigung genomischer DNA mit Phenol/Chloroform**

Die isolierte genomische DNA wurde in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß auf 100 µl mit H<sub>2</sub>O aufgefüllt und mit gleicher Menge Phenol/Chloroform (1:1 mischen, wässrige Phase verwenden) gemischt. Nach 20 min Zentrifugation (13.000 rpm, RT, Heraeus Biofuge pico) kann c. a. 300 µl der wässrigen Phase in ein frisches 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und mit 300 µl Chloroform gewaschen werden um Phenolrückstände zu entfernen. Dieser Waschschrift wird wiederholt und anschließend der überführte Überstand mit 30 µl 3 M NaAC (pH 5,3) und 900 µl -80 °C 100 % EtOH versetzt, durch Vortexen gemischt und für 10 min bei -80 °C inkubiert. Die Proben werden pelletiert (25 min, 13.000 rpm, RT, Heraeus Biofuge pico) und zweimal mit 80 % EtOH gewaschen. Das Pellet wird 2 min bei 65 °C und anschließend 2 min bei RT getrocknet, dabei wird der Deckel des Reaktionsgefäßes offen gelassen. Die gDNA wird bei 50 °C für 20 min in 32 µl H<sub>2</sub>O gelöst und die Nukleinsäurenkonzentration anschließend am NanoDrop ND-2000 (Thermo Fisher Scientific) gemessen. Für eine RT-PCR werden 35 ng genomische DNA als Template eingesetzt. Für eine Sequenzierung der genomischen DNA erfolgte eine zusätzliche Aufreinigung über das DNeasy® Plant Mini Kit (Qiagen).

### **Isolierung von RNA aus *U. maydis* Flüssigkulturen**

Nach dem Protokoll der Trizol Herstellerfirma (Invitrogen).

Zur Präparation von Gesamt-RNA aus *U. maydis* Flüssigkulturen wurde ausschließlich Nuklease-freies Verbrauchsmaterial verwendet. 50 ml Zellkultur wurden, wie in Kapitel 5.2.6 beschrieben, angezogen und pelletiert. Auf das tiefgefrorene Pellet wurden 2 ml Trizol (Invitrogen) pipettiert, dieser Ansatz kurz gevortext und nach Zugabe von ca. 356

300 mg Glasperlen (150-200  $\mu\text{m}$   $\emptyset$ ) wurden die Zellen in einer Kugelmühle (Retsch) bei 30 Hz aufgeschlossen. Die Zellsuspension wurde in frische 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt, um die Glasperlen aus dem Ansatz zu entfernen. Nach 5 min Inkubation bei RT wurden pro Ansatz (1 ml Trizol) 200  $\mu\text{l}$  Chloroform zugesetzt, kurz gevortext und drei Minuten bei RT inkubiert. Nach Zentrifugation (15 min, 13.000 rpm, RT, Heraeus Biofuge pico) wurde die wässrige Phase in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und nach Zugabe von 500  $\mu\text{l}$  Isopropanol für mindestens zehn Minuten bei RT gefällt. Nach erneuter Zentrifugation (15 min, 13.000 rpm, RT, Heraeus Biofuge pico) wurde die pelletierte RNA mit 70 % Ethanol gewaschen und erneut zentrifugiert (5 min, 13.000 rpm, RT, Heraeus Biofuge pico). Der Überstand wurde verworfen und das RNA-Pellet wurde für fünf Minuten bei RT getrocknet, anschließend in 50  $\mu\text{l}$  Nuklease-freiem Wasser (Ambion) aufgenommen und für zehn Minuten bei 55 °C in einem Eppendorf-Heizblock gelöst. Eine Qualitäts- und Quantitätskontrolle erfolgte durch photometrische Messung am NanoDrop ND-2000 (Thermo Fisher Scientific).

### 5.3.3. In-vitro-Modifikationen von DNA

Nach (Sambrook *et al.*, 1989).

#### **Restriktion von DNA**

Um doppelsträngige DNA zu spalten wurden Typ II-Restriktionsendonukleasen unter den vom Hersteller empfohlenen Pufferbedingungen eingesetzt.

Ein analytischer Ansatz enthielt:

- 0,5  $\mu\text{g}$  DNA,
- 0,5 U Restriktionsenzym,
- 1  $\mu\text{l}$  10x Reaktionspuffer,
- in einem 10  $\mu\text{l}$  Reaktionsansatz.

Der Ansatz wurde bei der für das jeweilige Enzym optimalen Temperatur für mindestens eine Stunde inkubiert.

## Material und Methoden

Nach der Restriktion wurde dem Ansatz nativer Auftragspuffer hinzugefügt und die Proben auf einem 0,8 %-igen TBE-Agarosegel analysiert.

### **Dephosphorylierung linearer DNA-Fragmente**

5'-terminale Phosphatgruppen können durch Verwendung von Alkalischer Phosphatase abgespalten werden. Da DNA-Stränge 5'-terminale Phosphatgruppen für Ligationen benötigen, kann durch die Entfernung dieser die Religation von linearisierter Plasmid-DNA verhindert werden.

Ein typischer Reaktionsansatz enthielt:

1 µg Plasmid-DNA

1 U CIP Phosphatase

in CutSmart-Puffer

Der Ansatz wurde 30 min bei 37 °C inkubiert. Zur Inaktivierung des Enzyms wurden die Proben mit dem QIAquick PCR-Purification Kit (Qiagen) aufgereinigt.

### **Auffüllen von 5'-überhängenden DNA-Fragmentenden**

Das Klenow-Fragment der *E. coli* DNA-Polymerase I ist in der Lage, 5'-überhängende DNA-Fragmentenden in Anwesenheit von Desoxyribonukleotiden und Magnesiumionen aufzufüllen und dadurch glatte Enden zu erzeugen. Die Reaktion kann in allen herkömmlichen Restriktionspuffern durchgeführt werden. Durch dieses Vorgehen können nichtkompatible Fragmentenden ligierbar gemacht werden.

Ein typischer Reaktionsansatz enthielt:

1 µg DNA-Fragmente in beliebigem Restriktionspuffer

50 µM dNTPs

1 U Klenow-Fragment der *E. coli* DNA-Polymerase I

Der Ansatz wurde 15 min bei RT inkubiert. Zur Inaktivierung des Enzyms folgte eine Inkubation bei 75 °C für 10 min. Derartig behandelte DNA-Fragmente können direkt in eine Ligationsreaktion eingesetzt werden.

### **Entfernung von 5'- und 3'-überhängenden Fragmentenden**

Die Mungbohnen Nuklease (Mung Bean Nuclease, New England Biolabs) ist in der Lage, 5'- und 3'-überhängende DNA-Fragmentenden zu degradieren und so glatte



Enden zu erzeugen. Die Reaktion kann in den meisten Restriktionspuffern, vorzugsweise jedoch im mitgelieferten Nukleasepuffer, durchgeführt werden. Durch dieses Vorgehen können nichtkompatible Fragmentenden mit 3'-Überhang für eine Ligation vorbereitet werden.

Ein typischer Reaktionsansatz enthielt:

500 ng DNA-Fragmente in Nukleasepuffer

1 U Mung Bean Nuklease

Der Ansatz wurde 30 min bei 30 °C inkubiert. Zur Inaktivierung des Enzyms wurde der Ansatz mit Hilfe eines DNA Aufreinigungskits (QIAquick PCR Purification, Qiagen) aufgereinigt. Derartig behandelte DNA-Fragmente können direkt in eine Ligationsreaktion eingesetzt werden.

### **Ligation von DNA-Fragmenten**

Für die kovalente Verknüpfung von DNA-Fragmenten wurde die T4-DNA-Ligase verwendet. Das zu klonierende Fragment wurde in 4-fachem molaren Überschuss zu der Plasmidrückgrat-DNA zugegeben. Die Plasmid-DNA wurde durch eine Restriktion linearisiert.

Ein Ligationsansatz enthielt folgende Komponenten:

100 ng linearisierter Vektor,

zu klonierendes Fragment in 4-fachem molaren Überschuss,

1 U T4-DNA-Ligase,

2 µl 10x T4-DNA-Ligase-Puffer,

in 20 µl Volumen.

Der Ansatz wurde für mindestens eine Stunde bei RT inkubiert oder über Nacht bei 16 °C.

### 5.3.4. Gelelektrophorese

#### **Nicht-denaturierende Gelelektrophorese**

In einem Agarosegel können Fragmente von Nukleinsäuren in einem elektrischen Feld anhand ihrer Größe aufgetrennt werden. Dies geschieht, indem die DNA, aufgrund der negativen Ladung der Phosphatreste, in Richtung der positiv-geladenen Anode wandert. Durch einen Größenmarker kann die Größe der aufgetrennten Fragmente bestimmt werden. Es wurden 0,8 %-ige Gele verwendet, für welche die entsprechende Menge an Agarose mit 0,5x TBE-Puffer oder 1x TAE-Puffer aufgekocht wurde. Wenn das Gel beim Abkühlen eine Temperatur von etwa 60 °C erreicht hatte, wurde Ethidiumbromid in einer Endkonzentration von 0,5 µg/ml hinzugefügt.

Das flüssige Gel wurde in einen Schlitten mit einem Kamm der passenden Taschenanzahl und -größe gegossen und aushärten gelassen. Die Gelkammer wurde mit 1x TAE- oder 0,5x TBE-Puffer befüllt und das Gel mit den Proben beladen. Die Proben wurden dazu mit nativem Auftragspuffer versetzt, so dass dieser in der Endkonzentration von 1 % vorlag. Die Elektrophorese erfolgte bei konstanter Spannung. Die Detektion wurde mit dem UV-Licht Detektor (254 nm) mit einem E-BOX Videodokumentationssystem (Peqlab) durchgeführt und konnte auf Thermalpapier photographisch festgehalten werden.

#### **Isolierung von Fragmenten aus Agarosegelen**

Mit Hilfe des Jetsorb Kit (Genomed) wurden DNA-Fragmente aus Gelen isoliert und aufgereinigt. Mittels eines UV-Licht-Tischs konnten die Fragmentbanden der richtigen Größe aus dem Agarosegel ausgeschnitten und ihr Gewicht mit Hilfe einer Feinwaage bestimmt werden. Das Prinzip des Kits ist es, die DNA unter Hochsalzbedingungen an eine Matrix zu binden, Verunreinigungen zu entfernen und anschließend die DNA unter Niedrigsalzbedingungen wieder abzulösen. Die Durchführung erfolgte nach Angaben des Herstellers. Die DNA wurde am Ende in 20 µl Elutionspuffer resuspendiert und ihre Konzentration in einem NanoDrop ND-2000 (Thermo Fisher Scientific) Spektralphotometer bestimmt.

### 5.3.5. Transfer und Analyse von DNA auf Membranen

Nach (Southern, 1975).

#### **Transfer von DNA auf eine Nylonmembran**

Die zu untersuchende DNA wurde zuvor mit ein- oder mehreren Enzymen restringiert und mittels eines 0,8 %-igen TBE-Agarosegels nach ihrer Größe aufgetrennt. Anschließend wurde das Gel 20 min in 0,25 M HCl inkubiert, um Purine abzuspalten und jeweils 20 min in DENAT- und RENAT-Lösung gewaschen. Der Transfer der DNA von dem Agarosegel auf eine Nylonmembran geschah durch Kapillar-Blot. Ein Reservoir mit 20x SSC lieferte einen Flüssigkeitsstrom, angetrieben durch einen Stapel saugfähiges Papier. Dazwischen sind das Gel und die Membran positioniert. Der Flüssigkeitsstrom trägt die DNA mit sich, welche auf der Membran hängen bleibt.

Der Aufbau des Blots von oben nach unten:

Gewicht (etwa 400 g)

Glasplatte

Stapel Papiertücher

3 Blätter Whatman 3 MM

Nylonmembran

Agarosegel

Brücke aus Whatman 3 MM zum Pufferreservoir

Glasplatte

Pufferreservoir

Der Blot erfolgte mindestens 2 Stunden oder über Nacht. Anschließend wurde die Membran kurz bei RT getrocknet und die DNA in einem UV Stratalinker 1800 (Stratagene) für eine Minute kovalent an die Membran gebunden.

### Herstellung der DNA-Hybridisierungssonde

Sonden zur Markierung von bestimmten Genabschnitten wurden durch den Einbau von Digoxigenin-11-dUTP (DIG) in die DNA der Sonde erzeugt. Vor der Markierungsreaktion wurde die DNA für die Sonde für 10 min bei 99 °C in einem Thermocycler denaturiert.

Ein Reaktionsansatz bestand dabei aus:

6,6 µl	DNA (0,5-1 µg in H <sub>2</sub> O <sub>bid.</sub> ),
1 µl	10x DIG-Mix,
1 µl	10x Octadeoxyribonukleotide in Markierungspuffer (1 mM dATP, dCTP, dGTP, 0,65 mM dTTP, 0,35 mM DIG-dUTP),
1 µl	BSA (10 µg/µl),
0,4 µl	DNA-Polymerase I Klenow-Fragment.

Nach erfolgreicher Denaturierung lief die Reaktion über Nacht bei 37 °C ab. Die Sonde wurde anschließend mit 15 ml Southern-Hybridisierungspuffer versetzt und vor Einsatz in einem Wasserbad bei 95 °C 10 Minuten lang denaturiert.

### Spezifischer Nachweis von DNA auf der Membran

Um unspezifische Bindungsstellen auf der Membran abzusättigen, erfolgte eine Inkubation mit 40 ml Southern-Hybridisierungspuffer für 30 min bei 65 °C im Hybridisierungsöfen. Im Anschluss an die Zugabe der Sonde erfolgte eine Inkubation bei 65 °C über Nacht. Nach der Hybridisierungsreaktion wurde die Membran für je 15 min in 2x SSPE-, 1x SSPE- und 0,1x SSPE-Lösung bei 65 °C gegeben. Anschließend folgten ein 5-minütiger Waschschrift mit 20 ml DIG-Waschlösung bei RT und eine erneute Blockierungsreaktion mit DIG2 (DIG1 + 5 % Milchpulver) um eine unspezifische Bindung des Anti-DIG-Antikörpers an die Membran zu verhindern. Nach 30 min Inkubation der Membran mit Anti-DIG-Antikörper (1:10.000 in DIG2) und zweifachem Waschen mit DIG-Waschpuffer (20 min) erfolgte eine Inkubation mit DIG3 für 5 min. Anschließend wurde die Membran für 5 min in CDP-Star-Lösung inkubiert. Das Signal der Sonde wurde mit Hilfe eines Chemilumineszenzdetektors (LI-COR

ODYSSEY FC Mod. 2800) detektiert, wobei die Membran einer Expositionszeit von etwa 10 min ausgesetzt war.

### 5.3.8. Gateway®-Klonierung

Die Gateway®-Klonierung erfolgte in zwei Schritten. In der BP-Reaktion wurde ein mit entsprechenden Überhängen versehenes PCR-Produkt durch die BP-Clonase in einen Donorvektor eingefügt. Der Bereich, welcher in den Vektor überführt werden soll, wird von *attachment-sites* (attB1 und attB2) begrenzt. Weitere *attachment-sites* (attP1 und attP2) sind auch im Zielvektor zu finden. Das Enzym BP-Clonase kann diese att-Stellen erkennen und den Bereich zwischen den attP-Stellen mit dem zwischen den attB-Stellen ersetzen. Die anschließende Selektion auf den fertigen *entry clone* erfolgte mit der Kanamycinresistenz, welche durch den Donorvektor vermittelt wurde. Um zu verhindern, dass auch Kolonien wachsen können, welche den leeren Zielvektor ohne das Insert enthalten, befindet sich zwischen den att-Stellen des Donorvektors das Selbstmordgen *ccdB*. Das Genprodukt von *ccdB* wirkt auf die im Labor verwendeten Bakterienstämme toxisch, indem es die Gyrase, welche durch die Entwindung der DNA eine Überspiralisierung vermeidet, hemmt (Bernard und Couturier, 1992). Demzufolge können nur Bakterien mit einem Plasmid wachsen, in welchem das Selbstmordgen durch das gewünschte Insert ausgetauscht wurde. In der LR-Reaktion wird das im Entryvektor zwischen attL-Stellen befindliche Insert durch die LR-Clonase nach gleichem Prinzip anstelle des *ccdB*-Gens zwischen die attR-Stellen eines Destinationsvektors eingefügt. Der daraus entstehende Expressionsvektor enthält nun eine Resistenz gegen Ampicillin, wodurch Bakterien, die nur das Kanamycinresistenz-vermittelnde Ausgangsplasmid enthalten, eliminiert werden können. Ein korrekt rekombinierter Expressionsvektor kodiert ebenfalls nicht mehr das Selbstmordgen.

Ein typischer Reaktionsansatz enthielt:

0,2 µl PCR-Produkt / Entryvektor (75 ng/µl)

0,2 µl Donorvektor / Destinationsvektor (75 ng/µl)

0,4 µl 1xTE-Puffer, pH 8,0

0,2 µl BP- / LR-Clonase-Mix

## Material und Methoden

in einem 1 µl Ansatz.

Die Reaktion wurde 1 h bei RT inkubiert.

Das Abstoppen der Reaktion erfolgte durch Zugabe von 0,1 µl Proteinase K und einer Inkubation bei 37 °C für 10 min. Nach Zugabe von 4 µl 1xTE wurde der Reaktionsansatz in kompetente *E. coli*-Zellen transformiert.

### 5.4. PCR-Techniken

#### 5.4.1. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Nach (Innis *et al.*, 1990).

Die PCR bietet die Möglichkeit, durch Startnukleotidsequenzen (Primer) definierte DNA-Bereiche selektiv zu amplifizieren. Hierfür sind zwei Primer nötig, von denen einer zum 3'-Bereich der gewünschten Sequenz, der andere zum Gegenstrang des 5'-Bereichs komplementär ist. Die Reaktionen wurden in einem BIO-RAD T100™ Thermal Cycler oder in einem MJ Research PTC-100™ durchgeführt.

Als Standard-Protokoll wurde folgender Ansatz verwendet:

30 ng	Matrizen-DNA,
2 U	Phusion-DNA-Polymerase / Q5-DNA-Polymerase,
1 µl	10 mM dNTPs,
0,3 µl	je Primer (100 pmol/µl),
10 µl	5x Phusion-Puffer / 5x Q5-Puffer,

in einem 50 µl Ansatz.

Folgendes Programm wurde für die PCR-Reaktionen verwendet:

Initiale Denaturierung:	98 °C / 30 s
Amplifikation (30 Zyklen):	98 °C / 10 s
	X °C / 15 s
	72 °C / Y s
Finale Elongation:	72 °C / 10 min

Die Temperatur X für die Anlagerung der Primer richtet sich nach der Schmelztemperatur der verwendeten Primer. Die Elongationszeit Y beträgt 20-30 s/kb DNA-Template.

#### 5.4.2. PCR-Generierung von Gen-Deletionskonstrukten für *U. maydis*

Nach (Kämper, 2004).

Durch Verwendung dieser Methode kann gezielt der offene Leserahmen von Genen in *U. maydis* deletiert werden. Der Hintergrund ist dabei, dass der dazwischen befindliche Genabschnitt über homologe Rekombination mit den angrenzenden genomischen Flanken durch eine Resistenzkassette ersetzt werden kann. Zunächst wurde eine PCR-Amplifikation der 3'- und 5'-gelegenen Bereiche des zu deletierenden Gens durchgeführt. Diese Flanken sollten etwa 1 kb lang sein. An den dem ORF zugewandten Enden der Flanken wurden über geeignete PCR-Oligonukleotide *Sfi*I-Schnittstellen eingefügt. Nach Restriktion der Flanken wurde mittels Ligation eine mit *Sfi*I geschnittene Resistenzkassette dazwischen eingefügt. Die Ligationsprodukte wurden auf einem Agarosegel aufgetrennt, das vollständige Produkt ausgeschnitten, aufgereinigt (Jetsorb-Kit) und in einen Topo-Vektor (Invitrogen) kloniert. Es folgte eine weitere PCR mit den Außenprimern oder mit *nested*-Primern um das vollständige Konstrukt für die Deletion zu vervielfältigen. Anschließend konnte mit diesem PCR-Produkt eine Transformation von *U. maydis* erfolgen.

#### **PCR-Amplifikation der Flanken**

Amplifikation der linken Flanke (*left border*, LB) oder der rechten Flanke (*right border*, RB): Ein Außenprimer und ein Innenprimer mit *Sfi*I-Schnittstelle für die Restriktion wurden in eine PCR-Reaktion auf die genomische DNA von *U. maydis* eingesetzt. Die Produkte wurden auf einem Agarosegel überprüft und anschließend mit dem QIAquick PCR Purification Kit aufgereinigt.

Für die PCR wurden die bereits beschriebenen Standardbedingungen gewählt.

Ligation des Gen-Deletionskonstruktes: 200 ng LB, 200 ng RB und 400 ng Resistenzkassette wurden in 25 µl Gesamtvolumen bei RT 2 h mit 2,5 U T4 DNA-Ligase und entsprechendem Ligationspuffer ligiert über ein Agarosegel aufgetrennt, eluiert und anschließend in einen Topo-Vektor (Invitrogen) kloniert. Für die

## Material und Methoden

Transformation wurde das ligierte Konstrukt mittels einer PCR mit den *nested* Primern oder den Außenprimern amplifiziert.

### 5.4.3. PCR-Generierung von Gen-Fusionskonstrukten für *U. maydis*

#### **C-terminale Fusionen**

Für eine *in frame*-Fusion des zu untersuchenden Gens mit einem fluoreszierenden Protein am C-Terminus wurde die LB so gewählt, dass sie die letzten 1000 bp des ORF des zu untersuchenden Gens ohne das Stopcodon enthält. Die RB wurde so gewählt, dass sie die ersten 1000 bp des genomischen Bereichs nach dem ORF des zu fusionierenden Proteins enthält. Dazu wurde ein Außenprimer und ein Innenprimer mit *Sfi*I-Schnittstelle in einer PCR-Reaktion auf die genomische DNA von *U. maydis* eingesetzt. Die Produkte wurden auf einem Agarosegel überprüft und mithilfe des QIAquick PCR Purification Kits aufgereinigt. Für die PCR wurden die bereits beschriebenen Standardbedingungen eingestellt. Die Flanken wurden durch eine topoisomerasevermittelte Integrationsreaktion in TOPO-Vektoren eingebracht und nach Transformation in *E. coli* auf ihre Orientierung überprüft. Für die Ligation wurde eine der Flanken zur Generierung kompatibler Überhänge gänzlich aus dem Vektor ausgeschnitten und der andere Flankenvektor mit den gleichen Restriktionsenzymen lediglich geöffnet, um ein Vektorrückgrat zu erhalten.

Ligation des Gen-Fusionskonstruktes: 50 ng Flanke mit Vektorrückgrat, Flanke ohne Rückgrat und die zu ligierende Kasette mit Fluoreszenz und Resistenz wurden in 4-fachem molaren Überschuss in die Ligation eingesetzt, in 20 µl Gesamtvolumen mit 2,5 U T4 DNA-Ligase und entsprechendem Ligationspuffer versetzt und bei 16 °C über Nacht oder 1-2 h bei RT inkubiert.

Für die Transformation wurde das ligierte Konstrukt mittels einer PCR mit den *nested* Primern oder den Außenprimern amplifiziert.

#### **N-terminale Fusionen**

Für eine *in frame*-Fusion des zu untersuchenden Gens mit einem fluoreszierenden Protein am N-Terminus wurde die LB (Fragment 1) so gewählt, dass sie die letzten 1000 bp stromaufwärts des ORF des zu untersuchenden Gens enthält. Die LB wurde durch eine topoisomerasevermittelte Integrationsreaktion in pCR 2.1 eingebracht und nach Transformation in *E. coli* auf *forward* Orientierung überprüft. Für die



Klonierungsreaktion wurde der Flankenvektor mit Restriktionsenzymen geöffnet, sodass ein Vektorrückgrat erhalten blieb. N-terminale Fusionen wurden durch Gibson Assembly® (siehe 5.4.4) kloniert. Alle weiteren Fragmente wurden mit Gibson-Überhängen amplifiziert. Dabei galt es zu beachten, dass die Sequenz des fluoreszenten Proteins (Fragment 2) ohne Stoppcodon amplifiziert wurde und nach der Reaktion *in frame* mit dem ORF des zu fusionierenden Proteins (Fragment 3) war. Die Resistenzkassette (Fragment 4) und die RB (Fragment 5) wurden ebenfalls amplifiziert. Die RB wurde so gewählt, dass sie die ersten 1000 bp des genomischen Bereichs stromabwärts des ORF des zu fusionierenden Proteins enthält. Als Template für die LB, die RB sowie den ORF des zu fusionierenden Proteins wurde die genomische DNA von *U. maydis* verwendet. Für das Fluoreszenzprotein oder die Resistenzkassette wurden entsprechende Plasmide als Template eingesetzt. Die Produkte wurden auf einem Agarosegel überprüft und mit Hilfe des QIAquick PCR Purification Kits aufgereinigt. Für die PCRs wurden die bereits beschriebenen Standardbedingungen eingestellt.

Für die Transformation wurde das generierte Konstrukt mittels einer PCR mit den *nested* Primern oder den Außenprimern amplifiziert.

### 5.4.4. Gibson Assembly®

Das Gibson Assembly® (Gibson *et al.*, 2009) erlaubt den Zusammenbau von mehreren DNA Fragmenten in einer einzigen Reaktion in einer vorgegebenen Reihenfolge. Hierfür sind Primer notwendig, die ein Fragment amplifizieren und dabei einen Überhang zu dem angrenzenden DNA Fragment erstellen. Die Amplifizierung der gewünschten Fragmente erfolgte zu den bereits beschriebenen Standard-PCR-Bedingungen. Die amplifizierten Fragmente wurden auf einem Agarosegel überprüft. Korrekte Fragmente, welche von einem Plasmid-Template amplifiziert wurden, wurden einer *DpnI*-Restriktion unterzogen, welche das eingesetzte Template unbrauchbar macht, um eine Verschleppung in die Transformation zu verhindern. Alle PCR-Fragmente wurden durch QIA-quick PCR Purification Kits aufgereinigt und die Konzentration mittels NanoDrop ND-2000 (Thermo Fisher Scientific) Spektralphotometer bestimmt. Durch die im Master Mix enthaltene T5-Exonuklease entsteht während der Gibson-Reaktion ein 3'-Überhang, der

## Material und Methoden

kompatible Fragmente als *sticky ends* durch Hybridisierung der homologen Bereiche verbindet. Die enthaltene Phusion DNA-Polymerase füllt anschließend die Lücken zwischen den gebundenen Fragmenten zu einem vollständigen Doppelstrang auf. Als Letztes fügt die *Taq* DNA-Ligase die aufgefüllten Doppelstränge zusammen. Durch das Design der Primerpaare lassen sich Bereiche deletieren, oder zusätzliche Restriktionsschnittstellen einbringen.

Ein typischer Reaktionsansatz enthielt:

5 µl	DNA (Gesamtgehalt aller Fragmentstücke 20-200 ng, 50 ng Vektor und Insert-Fragmente in 3-4fachem molaren Überschuss)
15 µl	Master Mixtur

Der Ansatz wurde für 1 h bei 50 °C inkubiert. Die so behandelte DNA konnte direkt in chemisch kompetente *E. coli* TOP10 Zellen transformiert werden.

### 5.4.5 Real-Time-PCR (qRT-PCR)

#### **DNase I-Behandlung und Reverse Transkription**

Vor der reversen Transkription wurde die isolierte Gesamt-RNA zunächst mit Turbo DNase I (Invitrogen) behandelt, um DNA-Kontaminationen zu eliminieren. Hierbei wurde nach Herstellerangaben vorgegangen (siehe Herstellerprotokoll Turbo DNA-free™ Kit). Die reverse Transkription wurde mit Hilfe des RevertAid First Strand cDNA Synthese Kit (Thermo Scientific) nach Herstellerprotokoll durchgeführt. Für die reverse Transkription von Gesamt-RNA, die aus *U. maydis* Flüssigkulturen wie beschrieben extrahiert wurde, wurden 0,5-1 µg DNase-behandelter RNA eingesetzt und zusammen mit Oligo(dT)<sub>20</sub>-Primern, den entsprechenden Puffern und Enzymgemischen (Details, siehe Herstellerangaben) für die Erststrang-cDNA-Synthese bei 42 °C für 60 min inkubiert.

#### **Real-Time-PCR**

Für Real-Time PCR Analysen wurde das MESA GREEN qPCR Master Mix plus for SYBR Assay +Fluorescein Kit (Eurogentech) verwendet und nach Herstellerangaben durchgeführt. Für die PCR Reaktion wurden 1-2 µl der synthetisierten cDNA eingesetzt. Die Reaktionen erfolgten in einem Bio-Rad-iCycler-System unter der Verwendung des folgenden Programms:

Initiale Denaturierung:	95 °C / 7 min
Amplifikation (45 Zyklen):	95 °C / 30 s
	60 °C / 20 s
	72 °C / 40 s

Im Anschluss hieran wurde die Spezifität der Amplifikation anhand einer Schmelzkurve am BioRad CFX96 -System überprüft. Zur Kalkulation des CT-Wertes (Threshold Cycle), der den Wert bzw. Zyklus beschreibt, bei dem die Fluoreszenz zum ersten Mal signifikant über die Hintergrundfluoreszenz steigt, wurde die BioRad-Software Version 3.0a verwendet. Die Berechnung der relativen Expressionswerte erfolgte mit dem Programm Bio-Rad Gene Expression Macro der Firma BioRad.

#### 5.4.6. Mutagenese-PCR

Um gezielt einzelne Basen in einem ORF zu verändern, wurde eine Mutagenese-PCR durchgeführt. Dabei wird die Mutation in die Primer eingefügt. Die PCR erfolgt nach dem Protokoll Stratagene Quikchange Mutagenesis mit folgendem Ansatz:

10 ng	Template-DNA
5 µl	10xReaktions-Puffer
je 125 ng	Primer <i>forward/reverse</i>
1 µl	10 mM dNTP-Mix
1 µl	Pfu Turbo DNA Polymerase

mit H<sub>2</sub>O auf 50 µl auffüllen.

Der Ansatz wird mit einem Denaturierungsstart durchgeführt und die Polymerase erst im Anschluss zugegeben.

Folgendes Programm wurde für die PCR-Reaktionen verwendet:

Initiale Denaturierung:	95 °C / 30 s
Amplifikation (16 Zyklen):	95 °C / 30 s
	X °C / 1 min

## Material und Methoden

68 °C / Y s

Finale Elongation: 72 °C / 10 min

Die Temperatur X für die Anlagerung der Primer richtet sich nach der Schmelztemperatur der verwendeten Primer. Die Elongationszeit Y beträgt 1 min/kb DNA-Template.

Im Anschluss an die PCR wurde die Template-DNA mit *DpnI* restringiert um sie für weiterführende Applikationen unschädlich zu machen.

### 5.5. Sequenzanalysen und *in silico* Methoden

#### 5.5.1. Sequenzierung von DNA

Um sicherzustellen, dass erzeugte Konstrukte keine Mutationen aufwiesen und somit die Aufrechterhaltung des Leserahmens gewährleistet war, wurde DNA zum Sequenzieren zum Sequencing Service of the Department of Biology Genomics Service Unit (GSU) in München geschickt. Vor der Sequenzierung wurde die DNA durch das Roti-Prep Plasmid MINI Kit (Roth) aufbereitet und die DNA-Konzentration gemessen. Für jede Reaktion wurde ein DNA-Gehalt von 100-300 ng in einem Volumen von 7 µl benötigt. Als Primer für die Sequenzierung wurden 5 pmol eines geeigneten Primers verwendet. Der Reaktionsansatz wurde mit EB-Puffer aufgefüllt. Die Sequenzrohdaten wurden zur Analyse in das Programm Sequencher (Gene Codes Corporation Version 5.3) importiert.

#### 5.5.2. Sequenzierung und Analyse von genomischer DNA

Für die Sequenzierung von genomischer DNA wurden Stämme wie beschrieben angezogen und die DNA extrahiert (Kapitel 5.3.2). Die isolierte genomische DNA wurde durch das DNeasy® Plant Mini Kit (Qiagen) aufgereinigt.

Die Sequenzierung genomischer DNA erfolgte in Kooperation mit dem Göttingen Genomics Laboratory (G2L) der Georg-August-Universität Göttingen mit einem MiSeq™ (Illumina). Die Alignierung der Sequenzdaten erfolgte mit Subread (Liao *et al.*, 2013), Version 1.6.3 *gene ensembl genomes 48 (Ustilago maydis)* mit den

Standardeinstellungen plus „*input\_type*“= „DNA“. Die chromosomale Abdeckung wurde mit „*indexcov*“ aus „*goleft*“ generiert (<https://github.com/brentp/goleft>; vgl. Pedersen *et al.*, 2017). Differentielle SNP-Analysen wurden mit „*snpdiffs*“ (F. Finkernagel, unveröffentlicht) durchgeführt. Dazu wird an jeder Genomposition die Anzahl der *reads* pro Base in zwei Proben bestimmt und mittels eines *log-likelihood* Ansatzes bewertet. Positionen, an denen sich die Haplotypen mit der größten *likelihood* zwischen den Proben unterscheiden und bei denen der (log-)*likelihood-score* für „gleicher Haplotyp“ über einem Schwellenwert liegt, werden als putative SNPs ausgewiesen.

### 5.5.3. Analyse von LC-MS Daten

Die LC-MS Daten Analyse wurde mit MaxQuant (Tyanova *et al.*, 2016) (<https://maxquant.org>) 1.6.0.16 durchgeführt. Zur Analyse wurde die *label-free quantification* Methode angewendet. Die Protein-Sequenzen (FASTA Format) von *U. maydis* stammen von UniProt (Universal Protein Resource) (<http://www.uniprot.org>).

### 5.5.4. Sonstige Sequenz- und Strukturanalysen

Folgende Programme wurden für die Sequenz- und Strukturanalyse von DNA- und Proteinsequenzen oder zur weiteren Verarbeitung von Rohdaten verwendet:

**ApE** – „**A Plasmid Editor**“ zur Erstellung und Bearbeitung von Plasmid- und genomischen Sequenzen, zum Erstellen von Oligonukleotiden und Zeichnen von Plasmidkarten.

**BLAST** (Basic Local Alignment Search Tool) (Altschul *et al.*, 1990) zur Identifizierung ähnlicher Proteine oder DNA-Sequenzen in den öffentlichen Datenbanken.

**CloneManager** (Version 9.0, Sci Ed Central Software) zur Erstellung und Bearbeitung von Plasmid- und genomischen Sequenzen, zum Erstellen von Oligonukleotiden und Zeichnen von Plasmidkarten.

## Material und Methoden

**Dicodon-Optimierungs-Tool** (Finkernagel, pers. Mitteilung) zur Erstellung von Dicodonoptimierten DNA-Sequenzen

**MFOLD** (Zuker und Jacobson, 1998, Waugh *et al.*, 2002, Zuker, 2003) zur Bestimmung von Sekundärstrukturen in qPCR-Amplifikaten und mRNAs.

**SEQUENCHER 5.3** (GENECODES) zur Bearbeitung von Sequenzrohdaten und zum Vergleich von DNA-Sequenzen.

**MABL** (Dereeper *et al.*, 2010, Dereeper *et al.*, 2008, Edgar, 2004, Guindon und Gascuel, 2003, Anisimova und Gascuel, 2006, Chevenet *et al.*, 2006) zur Erstellung von Stammbäumen

Die folgenden Datenbanken wurden zur Identifizierung von orthologen Proteinsequenzen anhand annotierter Funktionen und zur Analyse von DNA- und Protein-Sequenzdaten verwendet.

***U. maydis* Genome:** NCBI, National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/70>

***S. cerevisiae* Genome Database** (SGD): <http://www.yeastgenome.org>

**andere Genomdaten** wurden der Datenbank bei NCBI, National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine, entnommen.

## 5.6. Biochemische Methoden

### 5.6.1. Isolierung von Gesamtprotein

#### **Analytischer Maßstab**

Gesamtprotein aus *U. maydis* wurde aus etwa 150 ml Flüssigkultur bei OD<sub>600</sub> 0,6-0,8 für nicht-induzierte Zellen oder wie für induzierte Zellen beschrieben, durchgeführt. Die Zellen wurden pelletiert (3.500 rpm, 6 min, Heraeus Biofuge stratos), mit 1xTBS gewaschen und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Für die Präparation wurden die Zellen auf Eis aufgetaut und in 1,5 ml IP-Puffer (nach Pierce) mit Proteinase-Inhibitoren aufgenommen. Diese Suspension wurde in die mit flüssigem Stickstoff vorgekühlten metallenen Mahlbecher (25 ml, MM200, Retsch) überführt, in denen sich zwei Mahlkugeln (Ø 10 mm rostfrei, Retsch) befanden. Die Zellen wurden in der Schwingmühle (MM200, Retsch) für 5 min bei einer Frequenz von 30 Hz geöffnet. Der

Zellextrakt wurde in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt und für 30 min bei 22.000 rpm (Heraeus Biofuge stratos) und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde in frische Reaktionsgefäße überführt und bei -20 °C weggefroren oder mit der entsprechenden Menge Lämmli-Puffer versetzt und für die Auftrennung in SDS-haltigen Polyacrylamid-Gelen weiterverwendet. Als Proteinase-Inhibitor wurde in der Regel 1xComplete EDTA-free (Roche) verwendet.

### **Präparativer Maßstab**

Gesamtprotein aus *U. maydis* zur Analyse mittels Western Blot wurde aus etwa 10 ml Flüssigkultur bei OD<sub>600</sub> 0,6-0,8 für nicht-induzierte Zellen oder wie für induzierte Zellen beschrieben, durchgeführt. Die Zellen wurden in 2 ml-Reaktionsgefäßen mit Glaskugeln pelletiert (3.500 rpm, 6 min, Thermo Scientific Heraeus Pico21) und 1:20 in IP-Puffer mit 1xPI aufgenommen. Der Zellaufschluss erfolgte bei 4 °C für 15 min auf einem Vibrax. Die Glaskugeln und Zelltrümmer wurden abzentrifugiert (Heraeus Biofuge stratos 30 min, 4 °C, 25.000 rpm) und das Lysat in frische 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt. Das Lysat kann anschließend bei -20 °C gelagert werden. Vor dem Auftragen auf ein SDS-Gel wurde das Lysat 1:4 in Lämmli-Puffer verdünnt.

### 5.5.2. Aufreinigung von Proteinen und Proteinkomplexen

#### **Immunopräzipitation von Proteinkomplexen aus *U. maydis***

50 µl Pierce™ Anti-HA-gekoppelte magnetische Beads (Thermo Scientific) oder Anti-HA-gekoppelte Agarosebeads (Sigma) wurden dreimal mit 1 ml IP-Puffer mit 1xPI gewaschen. Nach Zugabe von 500 µl Proteinlysate aus Kapitel 5.5.1., erfolgte die Immunopräzipitation (IP) über Nacht bei 4 °C auf einem Drehrad. Je nach Protein wurden die Beads 3-10 Mal mit je 1 ml IP-Puffer mit 1xPI bei 4 °C gewaschen. Für die magnetischen Beads wurde dafür eine DyneMag™-2 Magnet (life technologies) verwendet. Die Agarosebeads wurden nach jedem Waschschrift abzentrifugiert (ELMI Sky Line, 1 min, 7000 rpm), bevor der Überstand entfernt werden konnte. Vor dem letzten Waschschrift wurden die Beads in 500 µl IP-Puffer aufgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Das alte Reaktionsgefäß wurde erneut mit 500 µl IP-Puffer ausgewaschen und mit dem vorherigen Waschschrift vereint. Der gesamte Überstand wurde abgenommen und die Beads in 100 µl TE 1 % SDS aufgenommen und bei 65 °C für 10 min und 950 rpm auf einem Heizblock inkubiert. Der Überstand

## Material und Methoden

wurde abgenommen und der Elutionsschritt wiederholt, hierbei wurden die Eluate vereint. Anschließend konnte das Eluat mittels der Chloroform-Methanol Proteinfällung präzipitiert werden. Als Inputkontrolle wurde jeweils 1/10 der für die IP eingesetzten Proteinmenge aufgetragen.

**Tabelle 11: Verwendete Beads**

Antikörper	Bezeichnung	Beads	Wirt	Bezugsquelle
Anti-HA	A2095-1ML	Agarose	Maus	Sigma
Anti-HA	88837	Magnetisch	Maus	Pierce, Thermo Scientific
Anti-Myc	A7470-1ML	Agarose	Kaninchen	Sigma

### Proteinfällung Chloroform-Methanol

Die Proteinprobe wurde auf 200 µl mit Wasser aufgefüllt, mit 800 µl Methanol versetzt, kurz gevortext, anschließend mit 200 µl Chloroform versetzt und erneut gevortext. Zu der Probe wurden 600 µl Wasser zugegeben, gut gevortext und anschließend abzentrifugiert (13.000 rpm, 3 min). Es entstehen 2 Phasen, von denen die obere verworfen wird. Dabei darf die Interphase, in welcher sich die Proteine befinden, nicht zerstört werden. Erneut wird das Lysat nach Zugabe von 600 µl Methanol gut gevortext und abzentrifugiert (13.000 rpm, 10 min). Das Protein bildet nun ein Pellet. Der Überstand kann abgenommen werden, das restliche Methanol muss abdampfen, bevor das Pellet in 40 µl 1xLämmli-Probenpuffer 3 Minuten bei 85 °C gelöst werden kann.

### 5.6.3. Auftrennung und Nachweis von Proteinen (SDS-PAGE)

Zur Auftrennung von Proteinen wurde die Methode der diskontinuierlichen SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) angewendet (Laemmli, 1970). Als Laufkammer diente eine Mini Protean II Apparatur (BioRad). Die Auftrennung erfolgte bei 20 mA (pro Gel) für 25-30 Minuten, bis die Auftragspufferbande die Trenngel-Schicht erreicht hatte. Die Auftrennung im Trenngel erfolgte standardmäßig bei 40 mA



für 45 Minuten oder bei 30 mA (pro Gel) für 60 Minuten. Standardmäßig wurden Gele mit 10 % Acrylamid hergestellt. Als Größenstandard für die Proteingele wurde der Pageruler prestained Proteinmarker (Thermo Fisher) verwendet. Zur Detektion der Proteinbanden wurden die Gele nach der Auftrennung mittels Coomassie-Färbung gefärbt.

### **Coomassie-Färbung von Proteingelen**

Für die Coomassie Färbung von Proteinen wurde Roti®Blue quick (Roth) verwendet. Hierzu wurde das Gel in eine Färbeschale gegeben und mit Roti®Blue quick Lösung übergossen. Die Färbung erfolgte für 15 min bis über Nacht bei RT. Bei Bedarf kann mit 20 % Ethanol entfärbt werden.

#### 5.6.4. Nachweis von immobilisierten Proteinen (Western-Analyse)

Nach (Towbin *et al.*, 1979).

Der Transfer von Proteinen aus SDS-Polyacrylamid-Gelen auf eine PVDF-Membran (Roti®-PVDF (Roth)) erfolgte mittels Elektro-Blot in einer Semi-Dry Blotting Apparatur für 18 min mit 2 mA pro cm<sup>2</sup> PVDF-Membran (370 mA). Der Blot von der Kathode in Richtung Anode wurde für das Fastblot Puffersystem folgendermaßen aufgebaut:

1 Whatman 3MM (in Fastblotpuffer getränkt)

SDS-Polyacrylamid-Gel

PVDF-Membran (1 min in Methanol aktiviert)

1 Whatman 3MM (in Fastblotpuffer getränkt)

Der spezifische, immunologische Nachweis der immobilisierten Proteine erfolgte mit Hilfe der an einen sekundären Antikörper konjugierten Meerrettich-Peroxidase (HRP). Nach dem Elektro-Blot wurde die PVDF-Membran zunächst für 30 min in 5 % (w/v) Magermilchpulver in TBST-Puffer blockiert, um eine unspezifische Bindung der Antikörper an die Membran zu verhindern. Anschließend wurde die Membran über Nacht mit 3 ml des primären Antikörpers (verdünnt in TBST mit 5 % Milchpulver) bei 4 °C auf einem Taumelrollenmischer inkubiert. Die Membran wurde danach drei Mal

## Material und Methoden

10 Minuten in TBST-Puffer gewaschen und für 1 h mit 3 ml des sekundären Antikörpers (verdünnt in TBST mit 5 % Milchpulver) inkubiert. Es folgten drei Waschschrte für jeweils 10 Minuten in TBST-Puffer und ein Waschschrte in TBS-Puffer.

**Tabelle 12: Bei Western-Analysen verwendete Antikörper**

Antikörper	Wirt	Verdünnung	Bezugsquelle
Primäre Antikörper			
anti HA-Antikörper	Kaninchen	1:3000	Cell Signaling
anti Myc-Antikörper	Kaninchen	1:3000	Cell Signaling
anti GFP-Antikörper	Kaninchen	1:3000	Sigma-Aldrich
anti RFP-Antikörper	Maus	1:3000	Chromotek
anti Actin-Antikörper	Kaninchen	1:3000	Cell Signaling
Sekundäre Antikörper			
anti-Maus IgG, konjugiert mit HRP	Ziege	1:3000	Promega
anti-Kaninchen IgG, konjugiert mit HRP	Ziege	1:3000	Promega

Für die Detektion wurden je 1 ml ECL 1- und ECL 2-Lösung gemischt, gleichmäßig auf der Membran verteilt und für 5 min bei RT inkubiert. Die Membran wurde zur Detektion des Signals mit Hilfe der Chemilumineszenz-Anlage LI-COR ODYSSEY FC Mod. 2800 aufgenommen.

### 5.6.5. Analyse von Proteinen und Proteinkomplexen

#### **In-Gel Trypsinverdau von Proteinen**

Nach (Huynh *et al.*, 2009).

Die zu analysierenden Proben wurden zunächst in die Taschen eines 10 %-igen SDS-Gels geladen und bei 100 V so lange aufgetrennt, bis die Lauffront 1,5-2 cm in das Trenngel eingelaufen ist (vgl. 5.5.3). Dabei wurden die Proben mit mindestens einer Tasche Abstand beladen, um eine Vermischung der Proben zu verhindern. Um die Proteine im Gel zu fixieren wurde das Gel mit Fixierlösung überschichtet und für 1 h bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Fixierlösung verworfen und durch ddH<sub>2</sub>O<sub>bid.</sub> ersetzt. Die Inkubation erfolgte für mindestens 30 min bei RT oder ÜN bei 4 °C. Jede Gelspur mit Probe wurde anschließend in acht Stücke geschnitten, die horizontale Begrenzung bildeten dabei der Lauf-/Trenngelrand bis zur Lauffront, die vertikale Begrenzung jeweils der Rand der anschließenden Taschen (frische Skalpellklinge je Probe). Die Gelstücke einer Probe wurden gemeinsam in ein 1,5 ml Eppendorf Gefäß überführt und mit 200 µl Acetonitril (Roth) überschichtet. Die Inkubation erfolgte für 10 min bei RT. Um die Gelstücke vollständig zu trocknen, wurde der Überstand verworfen und die Stücke in der Speed Vac (Savant SC110) bei hoher Temperatur für 20 min inkubiert. Zur Reduzierung der Proben wurden 300 µl DTT (in 100 mM Ammoniumhydrogencarbonat (Roth)) zugesetzt. Die Inkubation erfolgte für 1 h bei 56 °C. Nach dem Entfernen des Überstandes wurden die Proben mit 300 µl 55 mM Iodoacetamid (in 100 mM Ammoniumhydrogencarbonat (Roth)) bei RT im Dunkeln für 45 min alkyliert. Nach dem Verwerfen des Überstandes wurden 300 µl 100 mM Ammoniumhydrogencarbonat zugesetzt und für 10 min bei RT inkubiert. Der Überstand wurde verworfen. Es wurden 300 µl Acetonitril (Roth) hinzugefügt und erneut für 10 min bei RT inkubiert. Die Waschschrte mit Ammoniumhydrogencarbonat und Acetonitril wurden ein weiteres Mal wiederholt. Anschließend wurden die Gelstücke erneut bei hoher Temperatur in der Speed Vac (Savant SC110) getrocknet (20 min). Nun wurden 150 µl Trypsinlösung (25 µg Trypsin in 80 µl Promega Resuspensionspuffer, 1:20 mit 100 mM Ammoniumhydrogencarbonat verdünnt) zugegeben. Die Inkubation erfolgte für 45 min auf Eis. Die überschüssige Trypsinlösung wurde verworfen. Für die anschließende Inkubation über Nacht bei 37 °C wurden die Gelstücke mit 100 µl 50 mM Ammoniumhydrogencarbonat überschichtet. Die Proben wurden anschließend kurz

## Material und Methoden

bei 13.000 rpm pelletiert und der Überstand (enthält Peptide) je in ein neues 1,5 ml Eppendorf Reaktionsgefäß überführt. Anschließend wurden 120 µl 20 mM Ammoniumhydrogencarbonat auf die Gelstücke gegeben und für 10 min bei RT inkubiert. Der Überstand wurde mit dem vorherigen vereint. Nun wurden 90 µl einer Lösung aus 50 % Acetonitril und 5 % Ameisensäure (Roth) zu den Gelstücken gegeben. Nach einer 20-minütigen Inkubation bei RT wurde erneut kurz bei 13000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde erneut mit den vorherigen vereint. Dieser Extraktionsschritt wurde wiederholt (mindestens 2 Mal), bis die Gelstücke innen weiß wurden. Nachdem alle Überstände vereint waren, konnte die Peptidlösung vollständig eingetrocknet werden. Dies erfolgte in der Speed Vac (Savant SC110) für ca. 5 h (je nach Menge) bei höchster Temperatur. Die gewonnenen Peptidpellets konnten nun verschickt werden. Die anschließenden massenspektroskopischen Analysen wurden mit Kooperationspartnern der Universität Göttingen durchgeführt (siehe unten).

### **Massenspektroskopische Analyse (LC-MS)**

RSLCnano Ultimate 3000 system und Q Exactive HF

Die durch den Trypsin-Verdau entstandenen Peptidpellets wurden zunächst mit der C18 *stage tipping* Methode aufgereinigt (Rappsilber *et al.*, 2003, Rappsilber *et al.*, 2007). Die dadurch entstandene Peptidlösung wurde über einen Vacuum-Konzentrator vollständig getrocknet und in Probenpuffer (2 % Acetonitril, 0.1 % Ameisensäure) für die LC-MS Analyse aufgenommen. Diese wurde mit einer Nanoflow-Flüssigchromatographie, gekoppelt mit einem Nano-Elektrospray Massenspektrometer durchgeführt. Dazu wurden 4 µl Peptidlösung auf eine Acclaim® PepMAP RSLC Säule (75 µm x 50 cm (#164540), C18, 3 µm, 100 Å, Thermo Fisher Scientific) mit 0.07 % Trifluoressigsäure bei einer Durchflussrate von 20 µl/min für 3 min geladen. Die Peptide wurden mittels Reversed-Phase Chromatographie über eine Acclaim® PepMAP RSLC Säule (75 µm x 50 cm (#164540), C18, 3 µm, 100 Å, Thermo Fisher Scientific) mit einem Gradienten von 96 % Lösungsmittel A (0.1 % Ameisensäure) und 4 % Lösungsmittel B (80 % Acetonitril, 0.1 % Ameisensäure) bis 45 % Lösungsmittel B für 82 min und anschließend in 90 % Lösungsmittel B für 12 min und einem Kontrastfluss von 3 min in 90 % Lösungsmittel B aufgetrennt. Die Flussrate des Gradienten betrug dabei 300 nl/min. Zu eluierende Proteine wurden *on-line* durch Nanoelektro-Spray bei 1.5 kV mit einer Nanospray Flex™ Ionenquellen (Thermo Fisher Scientific) ionisiert und stetig in das Massenspektrometer (Q Exactive HF,

Thermo Scientific) überführt. *Full scans* wurden für einen Massenbereich von 300-1,800  $m/z$  mit einem Orbitrap-FT Analyzer bei einer Auflösung von 60,000 und paralleler *data-dependent* top 10 MS2-Fragmentierung (HCD) durchgeführt. Die Auflösung der dd-MS2 *scans* betrug 15,000. Programmierung und Datenerfassung wurde mit der XCalibur 4.0 Software (Thermo Scientific) durchgeführt.

## **6. Literaturverzeichnis**

- Abenza, J.F., Pantazopoulou, A., Rodriguez, J.M., Galindo, A., und Penalva, M.A.** (2009). Long-distance movement of *Aspergillus nidulans* early endosomes on microtubule tracks. *Traffic* **10**, 57-75.
- Abenza, J.F., Galindo, A., Pantazopoulou, A., Gil, C., de los Rios, V., und Penalva, M.A.** (2010). *Aspergillus* RabB Rab5 integrates acquisition of degradative identity with the long distance movement of early endosomes. *Mol Biol Cell* **21**, 2756-2769.
- Abenza, J.F., Galindo, A., Pinar, M., Pantazopoulou, A., de los Rios, V., und Penalva, M.A.** (2012). Endosomal maturation by Rab conversion in *Aspergillus nidulans* is coupled to dynein-mediated basipetal movement. *Mol Biol Cell* **23**, 1889-1901.
- Aguet, F., Upadhyayula, S., Gaudin, R., Chou, Y.Y., Cocucci, E., He, K., Chen, B.C., Mosaliganti, K., Pasham, M., Skillern, W., Legant, W.R., Liu, T.L., Findlay, G., Marino, E., Danuser, G., Megason, S., Betzig, E., und Kirchhausen, T.** (2016). Membrane dynamics of dividing cells imaged by lattice light-sheet microscopy. *Mol Biol Cell* **27**, 3418-3435.
- Aichinger, C., Hansson, K., Eichhorn, H., Lessing, F., Mannhaupt, G., Mewes, W., und Kahmann, R.** (2003). Identification of plant-regulated genes in *Ustilago maydis* by enhancer-trapping mutagenesis. *Mol. Genet. Genomics*. **270**, 303-314.
- Ajima, J., Umezu, K., und Maki, H.** (2002). Elevated incidence of loss of heterozygosity (LOH) in an *sgs1* mutant of *Saccharomyces cerevisiae*: roles of yeast RecQ helicase in suppression of aneuploidy, interchromosomal rearrangement, and the simultaneous incidence of both events during mitotic growth. *Mutation research* **504**, 157-172.
- Akhmanova, A., und Hammer, J.A., 3rd.** (2010). Linking molecular motors to membrane cargo. *Curr Opin Cell Biol* **22**, 479-487.
- Al-Awqati, Q.** (1986). Proton-translocating ATPases. *Annu Rev Cell Biol* **2**, 179-199.
- Alabrudzinska, M., Skoneczny, M., und Skoneczna, A.** (2011). Diploid-Specific Genome Stability Genes of *S. cerevisiae*: Genomic Screen Reveals Haploidization as an Escape from Persisting DNA Rearrangement Stress. *PLoS One* **6**.
- Almeida, F., Rodrigues, M.L., und Coelho, C.** (2019). The Still Underestimated Problem of Fungal Diseases Worldwide. *Front Microbiol* **10**, 214.
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., und Lipman, D.J.** (1990). Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* **215**, 403-410.
- Alvarez-Tabares, I., und Perez-Martin, J.** (2010). Septins from the phytopathogenic fungus *Ustilago maydis* are required for proper morphogenesis but dispensable for virulence. *PLoS One* **5**, e12933.
- Andres, D.A., Seabra, M.C., Brown, M.S., Armstrong, S.A., Smeland, T.E., Cremers, F.P., und Goldstein, J.L.** (1993). cDNA cloning of component A of Rab geranylgeranyl transferase and demonstration of its role as a Rab escort protein. *Cell* **73**, 1091-1099.
- Anisimova, M., und Gascuel, O.** (2006). Approximate likelihood-ratio test for branches: A fast, accurate, and powerful alternative. *Syst Biol* **55**, 539-552.

- Aschenbroich, J., Hussnaetter, K.P., Stoffels, P., Langner, T., Zander, S., Sandrock, B., Bölker, M., Feldbrügge, M., und Schipper, K.** (2019). The germinal centre kinase Don3 is crucial for unconventional secretion of chitinase Cts1 in *Ustilago maydis*. *Biochim Biophys Acta Proteins Proteom* **1867**, 140154.
- Audhya, A., Desai, A., und Oegema, K.** (2007). A role for Rab5 in structuring the endoplasmic reticulum. *J Cell Biol* **178**, 43-56.
- Balderhaar, H.J., und Ungermann, C.** (2013). CORVET and HOPS tethering complexes - coordinators of endosome and lysosome fusion. *J Cell Sci* **126**, 1307-1316.
- Balderhaar, H.J., Lachmann, J., Yavavli, E., Brocker, C., Lurick, A., und Ungermann, C.** (2013). The CORVET complex promotes tethering and fusion of Rab5/Vps21-positive membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**, 3823-3828.
- Bandara, A.Y., Weerasooriya, D.K., Bradley, C.A., Allen, T.W., und Esker, P.D.** (2020). Dissecting the economic impact of soybean diseases in the United States over two decades. *PLoS One* **15**, e0231141.
- Bankaitis, V.A., Johnson, L.M., und Emr, S.D.** (1986). Isolation of yeast mutants defective in protein targeting to the vacuole. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**, 9075-9079.
- Banks, G.R., Shelton, P.A., Kanuga, N., Holden, D.W., und Spanos, A.** (1993). The *Ustilago maydis nar1* gene encoding nitrate reductase activity: sequence and transcriptional regulation. *Gene* **131**, 69-78.
- Banta, L.M., Robinson, J.S., Klionsky, D.J., und Emr, S.D.** (1988). Organelle assembly in yeast: characterization of yeast mutants defective in vacuolar biogenesis and protein sorting. *J Cell Biol* **107**, 1369-1383.
- Banuett, F.** (1995). Genetics of *Ustilago maydis*, a fungal pathogen that induces tumors in maize. *Annu Rev Genet* **29**, 179-208.
- Banuett, F., und Herskowitz, I.** (1988). *Ustilago maydis*, Smut of Maize. In *Genetics of Plant Pathogenic Fungi*, G.S. Sidhu, ed (
- Banuett, F., und Herskowitz, I.** (1989). Different *a* alleles of *Ustilago maydis* are necessary for maintenance of filamentous growth but not for meiosis. *Proc Natl Acad Sci USA* **86**, 5878-5882.
- Banuett, F., und Herskowitz, I.** (1994). Morphological transitions in the life cycle of *Ustilago maydis* and their genetic control by the *a* and *b* loci. *Exp. Mycology* **18**, 247-266.
- Banuett, F., und Herskowitz, I.** (2002). Bud morphogenesis and the actin and microtubule cytoskeletons during budding in the corn smut fungus, *Ustilago maydis*. *Fungal Genet Biol* **37**, 149-170.
- Barbera, S., Nardi, F., Elia, I., Realini, G., Lugano, R., Santucci, A., Tosi, G.M., Dimberg, A., Galvagni, F., und Orlandini, M.** (2019). The small GTPase Rab5c is a key regulator of trafficking of the CD93/Multimerin-2/beta1 integrin complex in endothelial cell adhesion and migration. *Cell Commun Signal* **17**, 55.
- Barbieri, M.A., Hoffenberg, S., Roberts, R., Mukhopadhyay, A., Pomrehn, A., Dickey, B.F., und Stahl, P.D.** (1998). Evidence for a symmetrical requirement for Rab5-GTP in in vitro endosome-endosome fusion. *J Biol Chem* **273**, 25850-25855.

- Baumann, S., Pohlmann, T., Jungbluth, M., Brachmann, A., und Feldbrügge, M.** (2012). Kinesin-3 and dynein mediate microtubule-dependent co-transport of mRNPs and endosomes. *J Cell Sci*.
- Bean, B.D., Davey, M., Snider, J., Jessulat, M., Deineko, V., Tinney, M., Stagljar, I., Babu, M., und Conibear, E.** (2015). Rab5-family guanine nucleotide exchange factors bind retromer and promote its recruitment to endosomes. *Mol Biol Cell* **26**, 1119-1128.
- Bean, B.D.M., Dziurdzik, S.K., Kolehmainen, K.L., Fowler, C.M.S., Kwong, W.K., Grad, L.I., Davey, M., Schluter, C., und Conibear, E.** (2018). Competitive organelle-specific adaptors recruit Vps13 to membrane contact sites. *J Cell Biol* **217**, 3593-3607.
- Becht, P., König, J., und Feldbrügge, M.** (2006). The RNA-binding protein Rrm4 is essential for polarity in *Ustilago maydis* and shuttles along microtubules. *J Cell Sci* **119**, 4964-4973.
- Bednarek, S.Y., Reynolds, T.L., Schroeder, M., Grabowski, R., Hengst, L., Gallwitz, D., und Raikhel, N.V.** (1994). A small GTP-binding protein from *Arabidopsis thaliana* functionally complements the yeast YPT6 null mutant. *Plant physiology* **104**, 591-596.
- Begerow, D., Stoll, M., und Bauer, R.** (2006). A phylogenetic hypothesis of Ustilaginomycotina based on multiple gene analyses and morphological data. *Mycologia* **98**, 906-916.
- Berg, T., Gjoen, T., und Bakke, O.** (1995). Physiological functions of endosomal proteolysis. *Biochem J* **307 ( Pt 2)**, 313-326.
- Bernard, P., und Couturier, M.** (1992). Cell killing by the F plasmid CcdB protein involves poisoning of DNA-topoisomerase II complexes. *J Mol Biol* **226**, 735-745.
- Berto, A., Yu, J., Morchoisne-Bolhy, S., Bertipaglia, C., Vallee, R., Dumont, J., Ochsenbein, F., Guerois, R., und Doye, V.** (2018). Disentangling the molecular determinants for Cenp-F localization to nuclear pores and kinetochores. *EMBO Rep* **19**.
- Bielska, E., Schuster, M., Roger, Y., Berepiki, A., Soanes, D.M., Talbot, N.J., und Steinberg, G.** (2014a). Hook is an adapter that coordinates kinesin-3 and dynein cargo attachment on early endosomes. *J Cell Biol* **204**, 989-1007.
- Bielska, E., Higuchi, Y., Schuster, M., Steinberg, N., Kilaru, S., Talbot, N.J., und Steinberg, G.** (2014b). Long-distance endosome trafficking drives fungal effector production during plant infection. *Nat Commun* **5**, 5097.
- Bigay, J., und Antonny, B.** (2012). Curvature, lipid packing, and electrostatics of membrane organelles: defining cellular territories in determining specificity. *Dev Cell* **23**, 886-895.
- Bitar, D., Lortholary, O., Le Strat, Y., Nicolau, J., Coignard, B., Tattevin, P., Che, D., und Dromer, F.** (2014). Population-based analysis of invasive fungal infections, France, 2001-2010. *Emerg Infect Dis* **20**, 1149-1155.
- Blumer, J., Rey, J., Dehmelt, L., Mazel, T., Wu, Y.W., Bastiaens, P., Goody, R.S., und Itzen, A.** (2013). RabGEFs are a major determinant for specific Rab membrane targeting. *J Cell Biol* **200**, 287-300.



- Böhmer, C., Ripp, C., und Bölker, M.** (2009). The germinal centre kinase Don3 triggers the dynamic rearrangement of higher-order septin structures during cytokinesis in *Ustilago maydis*. *Mol Microbiol* **74**, 1484-1496.
- Bölker, M., Genin, S., Lehmler, C., und Kahmann, R.** (1995a). Genetic regulation of mating, and dimorphism in *Ustilago maydis*. *Can J Bot* **73**, 320-325.
- Bölker, M., Böhnert, H.U., Braun, K.H., Görl, J., und Kahmann, R.** (1995b). Tagging pathogenicity genes in *Ustilago maydis* by restriction enzyme-mediated integration (REMI). *Mol Gen Genet* **248**, 547-552.
- Bottin, A., Kämper, J., und Kahmann, R.** (1996). Isolation of a carbon source-regulated gene from *Ustilago maydis*. *Mol Gen Genet* **253**, 342-352.
- Bowers, K., und Stevens, T.H.** (2005). Protein transport from the late Golgi to the vacuole in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta* **1744**, 438-454.
- Brachmann, A.** (2001). Die frühe Infektionsphase von *Ustilago maydis*: Genregulation durch das bW/bE-Heterodimer. München, Ludwig-Maximilians-Universität. (München: Ludwig-Maximilians-Universität).
- Brachmann, A., Weinzierl, G., Kämper, J., und Kahmann, R.** (2001). Identification of genes in the bW/bE regulatory cascade in *Ustilago maydis*. *Mol Microbiol* **42**, 1047-1063.
- Brachmann, A., König, J., Julius, C., und Feldbrügge, M.** (2004). A reverse genetic approach for generating gene replacement mutants in *Ustilago maydis*. *Mol Genet Genomics* **272**, 216-226.
- Bröcker, C., Kuhlee, A., Gatsogiannis, C., Balderhaar, H.J., Hönscher, C., Engelbrecht-Vandre, S., Ungermann, C., und Raunser, S.** (2012). Molecular architecture of the multisubunit homotypic fusion and vacuole protein sorting (HOPS) tethering complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**, 1991-1996.
- Bucci, C., Bakke, O., und Progida, C.** (2010). Rab7b and receptors trafficking. *Commun Integr Biol* **3**, 401-404.
- Bucci, C., Thomsen, P., Nicoziani, P., McCarthy, J., und van Deurs, B.** (2000). Rab7: a key to lysosome biogenesis. *Mol Biol Cell* **11**, 467-480.
- Bucci, C., Parton, R.G., Mather, I.H., Stunnenberg, H., Simons, K., Hoflack, B., und Zerial, M.** (1992). The small GTPase rab5 functions as a regulatory factor in the early endocytic pathway. *Cell* **70**, 715-728.
- Bucci, C., Lutcke, A., Steele-Mortimer, O., Olkkonen, V.M., Dupree, P., Chiariello, M., Bruni, C.B., Simons, K., und Zerial, M.** (1995). Co-operative regulation of endocytosis by three Rab5 isoforms. *FEBS Lett* **366**, 65-71.
- Buchanan, B.W., Lloyd, M.E., Engle, S.M., und Rubenstein, E.M.** (2016). Cycloheximide Chase Analysis of Protein Degradation in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Vis Exp*.
- Burd, C.G., und Emr, S.D.** (1998). Phosphatidylinositol(3)-phosphate signaling mediated by specific binding to RING FYVE domains. *Mol Cell* **2**, 157-162.
- Burton, J., Roberts, D., Montaldi, M., Novick, P., und De Camilli, P.** (1993). A mammalian guanine-nucleotide-releasing protein enhances function of yeast secretory protein Sec4. *Nature* **361**, 464-467.

- Cabrera, M., und Ungermann, C.** (2013). Guanine nucleotide exchange factors (GEFs) have a critical but not exclusive role in organelle localization of Rab GTPases. *J Biol Chem* **288**, 28704-28712.
- Cabrera, M., Arlt, H., Epp, N., Lachmann, J., Griffith, J., Perz, A., Reggiori, F., und Ungermann, C.** (2013). Functional separation of endosomal fusion factors and the class C core vacuole/endosome tethering (CORVET) complex in endosome biogenesis. *J Biol Chem* **288**, 5166-5175.
- Callaghan, J., Nixon, S., Bucci, C., Toh, B.H., und Stenmark, H.** (1999). Direct interaction of EEA1 with Rab5b. *Eur J Biochem* **265**, 361-366.
- Capalbo, L.** (2015). Commentary: Rab GTPase: A New Mitotic Delivery Service. *Front Cell Dev Biol* **3**, 72.
- Capalbo, L., D'Avino, P.P., Archambault, V., und Glover, D.M.** (2011). Rab5 GTPase controls chromosome alignment through Lamin disassembly and relocation of the NuMA-like protein Mud to the poles during mitosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**, 17343-17348.
- Casanova, J.E., und Winckler, B.** (2017). A new Rab7 effector controls phosphoinositide conversion in endosome maturation. *J Cell Biol* **216**, 2995-2997.
- Chavrier, P., Parton, R.G., Hauri, H.P., Simons, K., und Zerial, M.** (1990). Localization of low molecular weight GTP binding proteins to exocytic and endocytic compartments. *Cell* **62**, 317-329.
- Chavrier, P., Gorvel, J.P., Stelzer, E., Simons, K., Gruenberg, J., und Zerial, M.** (1991). Hypervariable C-terminal domain of rab proteins acts as a targeting signal. *Nature* **353**, 769-772.
- Chen, P.I., Kong, C., Su, X., und Stahl, P.D.** (2009). Rab5 isoforms differentially regulate the trafficking and degradation of epidermal growth factor receptors. *J Biol Chem* **284**, 30328-30338.
- Chen, P.I., Schauer, K., Kong, C., Harding, A.R., Goud, B., und Stahl, P.D.** (2014). Rab5 isoforms orchestrate a "division of labor" in the endocytic network; Rab5C modulates Rac-mediated cell motility. *PLoS One* **9**, e90384.
- Chevenet, F., Brun, C., Banuls, A.L., Jacq, B., und Christen, R.** (2006). TreeDyn: towards dynamic graphics and annotations for analyses of trees. *BMC Bioinformatics* **7**, 439.
- Christensen, J.J.** (1963). Corn smut induced by *Ustilago maydis*. *Amer Phytopathol Soc Monogr* **2**.
- Christoforidis, S., McBride, H.M., Burgoyne, R.D., und Zerial, M.** (1999). The Rab5 effector EEA1 is a core component of endosome docking. *Nature* **397**, 621-625.
- Ciossani, G., Overlack, K., Petrovic, A., Huis In 't Veld, P.J., Koerner, C., Wohlgemuth, S., Maffini, S., und Musacchio, A.** (2018). The kinetochore proteins CENP-E and CENP-F directly and specifically interact with distinct BUB mitotic checkpoint Ser/Thr kinases. *J Biol Chem* **293**, 10084-10101.
- Coelho, M.C., Pinto, R.M., und Murray, A.W.** (2019). Heterozygous mutations cause genetic instability in a yeast model of cancer evolution. *Nature* **566**, 275-+.

- Cohen, S.N., Chang, A.C., und Hsu, L.** (1972). Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. Proc Natl Acad Sci U S A **69**, 2110-2114.
- Corvera, S., D'Arrigo, A., und Stenmark, H.** (1999). Phosphoinositides in membrane traffic. Curr Opin Cell Biol **11**, 460-465.
- Crampin, H., Finley, K., Gerami-Nejad, M., Court, H., Gale, C., Berman, J., und Sudbery, P.** (2005). *Candida albicans* hyphae have a Spitzenkorper that is distinct from the polarisome found in yeast and pseudohyphae. J Cell Sci **118**, 2935-2947.
- Crowley, L.C., Scott, A.P., Marfell, B.J., Boughaba, J.A., Chojnowski, G., und Waterhouse, N.J.** (2016). Measuring Cell Death by Propidium Iodide Uptake and Flow Cytometry. Cold Spring Harb Protoc **2016**.
- Daeden, A., und Gonzalez-Gaitan, M.** (2018). Endosomal Trafficking During Mitosis and Notch-Dependent Asymmetric Division. Prog Mol Subcell Biol **57**, 301-329.
- Danino, D., Moon, K.H., und Hinshaw, J.E.** (2004). Rapid constriction of lipid bilayers by the mechanochemical enzyme dynamin. J Struct Biol **147**, 259-267.
- Davey, H.M., und Hexley, P.** (2011). Red but not dead? Membranes of stressed *Saccharomyces cerevisiae* are permeable to propidium iodide. Environ Microbiol **13**, 163-171.
- Dawson, J.A., Methven-Kelley, C., und Davis, G.M.** (2017). atz-1 Influences meiosis to maintain germline chromosomal stability in *Caenorhabditis elegans*. Cell Biol Int **41**, 1160-1168.
- Deising, H.B., Werner, S., und Wernitz, M.** (2000). The role of fungal appressoria in plant infection. Microbes and infection / Institut Pasteur **2**, 1631-1641.
- Demerec, M., Adelberg, E.A., Clark, A.J., und Hartman, P.E.** (1966). A proposal for a uniform nomenclature in bacterial genetics. Genetics **54**, 61-76.
- Dereeper, A., Audic, S., Claverie, J.M., und Blanc, G.** (2010). BLAST-EXPLORER helps you building datasets for phylogenetic analysis. BMC Evol Biol **10**, 8.
- Dereeper, A., Guignon, V., Blanc, G., Audic, S., Buffet, S., Chevenet, F., Dufayard, J.F., Guindon, S., Lefort, V., Lescot, M., Claverie, J.M., und Gascuel, O.** (2008). Phylogeny.fr: robust phylogenetic analysis for the non-specialist. Nucleic acids research **36**, W465-469.
- Diao, A., Frost, L., Morohashi, Y., und Lowe, M.** (2008). Coordination of golgin tethering and SNARE assembly: GM130 binds syntaxin 5 in a p115-regulated manner. J Biol Chem **283**, 6957-6967.
- Diaz, R., Mayorga, L., und Stahl, P.** (1988). In vitro fusion of endosomes following receptor-mediated endocytosis. J Biol Chem **263**, 6093-6100.
- Dirac-Svejstrup, A.B., Sumizawa, T., und Pfeffer, S.R.** (1997). Identification of a GDI displacement factor that releases endosomal Rab GTPases from Rab-GDI. EMBO J **16**, 465-472.
- Doebley, J.** (1992). Mapping the genes that made maize. Trends in genetics : TIG **8**, 302-307.
- Doehlemann, G., Wahl, R., Horst, R.J., Voll, L.M., Usadel, B., Poree, F., Stitt, M., Pons-Kühnemann, J., Sonnewald, U., Kahmann, R., und Kämper, J.** (2008).

Reprogramming a maize plant: transcriptional and metabolic changes induced by the fungal biotroph *Ustilago maydis*. *Plant J* **56**, 181-195.

**Doenecke, Koolman, Fuchs, und Gerok.** (2005). *Karlsons Biochemie und Pathobiochemie.* (Thieme-Verlag).

**Edgar, R.C.** (2004). MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic acids research* **32**, 1792-1797.

**Edler, E., und Stein, M.** (2019). Recognition and stabilization of geranylgeranylated human Rab5 by the GDP Dissociation Inhibitor (GDI). *Small GTPases* **10**, 227-242.

**Epp, N., und Ungermann, C.** (2013). The N-terminal domains of Vps3 and Vps8 are critical for localization and function of the CORVET tethering complex on endosomes. *PLoS One* **8**, e67307.

**Feldbrügge, M., Kämper, J., Steinberg, G., und Kahmann, R.** (2004). Regulation of mating and pathogenic development in *Ustilago maydis*. *Curr Opin Microbiol* **7**, 666-672.

**Fink, G., Schuchardt, I., Colombelli, J., Stelzer, E., und Steinberg, G.** (2006). Dynein-mediated pulling forces drive rapid mitotic spindle elongation in *Ustilago maydis*. *EMBO J* **25**, 4897-4908.

**Fisher, M.C., Henk, D.A., Briggs, C.J., Brownstein, J.S., Madoff, L.C., McCraw, S.L., und Gurr, S.J.** (2012). Emerging fungal threats to animal, plant and ecosystem health. *Nature* **484**, 186-194.

**Flor-Parra, I., Vranes, M., Kämper, J., und Perez-Martin, J.** (2006). Biz1, a zinc finger protein required for plant invasion by *Ustilago maydis*, regulates the levels of a mitotic cyclin. *Plant Cell* **18**, 2369-2387.

**Forgac, M.** (1992). Structure and properties of the coated vesicle (H<sup>+</sup>)-ATPase. *J Bioenerg Biomembr* **24**, 341-350.

**Fortenbacher, J.** (2019). Charakterisierung des Proteinkomplexes Clp1 mit bE/bW und seine Auswirkungen auf die pathogene Entwicklung in *Ustilago maydis*. In Institut für Angewandte Biowissenschaften, Abteilung Genetik (Karlsruher Institut für Technologie).

**Frei, S.B., Rahl, P.B., Nussbaum, M., Briggs, B.J., Calero, M., Janeczko, S., Regan, A.D., Chen, C.Z., Barral, Y., Whittaker, G.R., und Coins, R.N.** (2006). Bioinformatic and comparative functional insights into localization of Rab proteins reveals the uncharacterized GTPases Ypt10p and Ypt11p. *Mol Cell Biol* **26**, 7299-7317.

**Freitag, J., Lanver, D., Böhmer, C., Schink, K.O., Bölker, M., und Sandrock, B.** (2011). Septation of infectious hyphae is critical for appressoria formation and virulence in the smut fungus *Ustilago maydis*. *PLoS Pathog* **7**, e1002044.

**Fuchs, U., und Steinberg, G.** (2005). Endocytosis in the plant-pathogenic fungus *Ustilago maydis*. *Protoplasma* **226**, 75-80.

**Fuchs, U., Manns, I., und Steinberg, G.** (2005). Microtubules are dispensable for the initial pathogenic development but required for long-distance hyphal growth in the corn smut fungus *Ustilago maydis*. *Mol Biol Cell* **16**, 2746-2758.

- Fuchs, U., Hause, G., Schuchardt, I., und Steinberg, G.** (2006). Endocytosis is essential for pathogenic development in the corn smut fungus *Ustilago maydis*. *Plant Cell* **18**, 2066-2081.
- Furuno, N., den Elzen, N., und Pines, J.** (1999). Human cyclin A is required for mitosis until mid prophase. *J Cell Biol* **147**, 295-306.
- Galperin, E., und Sorkin, A.** (2003). Visualization of Rab5 activity in living cells by FRET microscopy and influence of plasma-membrane-targeted Rab5 on clathrin-dependent endocytosis. *J Cell Sci* **116**, 4799-4810.
- Gandasi, N.R., Vesto, K., Helou, M., Yin, P., Saras, J., und Barg, S.** (2015). Survey of Red Fluorescence Proteins as Markers for Secretory Granule Exocytosis. *PLoS One* **10**, e0127801.
- Garcia-Muse, T., Steinberg, G., und Perez-Martin, J.** (2004). Characterization of B-type cyclins in the smut fungus *Ustilago maydis*: roles in morphogenesis and pathogenicity. *J Cell Sci* **117**, 487-506.
- Garcia-Ranea, J.A., und Valencia, A.** (1998). Distribution and functional diversification of the ras superfamily in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett* **434**, 219-225.
- Geli, M.I., und Riezman, H.** (1998). Endocytic internalization in yeast and animal cells: similar and different. *J Cell Sci* **111 ( Pt 8)**, 1031-1037.
- Genre, A., Chabaud, M., Timmers, T., Bonfante, P., und Barker, D.G.** (2005). Arbuscular mycorrhizal fungi elicit a novel intracellular apparatus in *Medicago truncatula* root epidermal cells before infection. *Plant Cell* **17**, 3489-3499.
- Gerald, N.J., Damer, C.K., O'Halloran, T.J., und De Lozanne, A.** (2001). Cytokinesis failure in clathrin-minus cells is caused by cleavage furrow instability. *Cell Motil Cytoskeleton* **48**, 213-223.
- Gerdes, J.M., und Katsanis, N.** (2005). Microtubule transport defects in neurological and ciliary disease. *Cell Mol Life Sci* **62**, 1556-1570.
- Gerrard, S.R., Bryant, N.J., und Stevens, T.H.** (2000). VPS21 controls entry of endocytosed and biosynthetic proteins into the yeast prevacuolar compartment. *Mol Biol Cell* **11**, 613-626.
- Geuze, H.J., Slot, J.W., Strous, G.J., Lodish, H.F., und Schwartz, A.L.** (1983). Intracellular site of asialoglycoprotein receptor-ligand uncoupling: double-label immunoelectron microscopy during receptor-mediated endocytosis. *Cell* **32**, 277-287.
- Giansanti, M.G., Vanderleest, T.E., Jewett, C.E., Sechi, S., Frappaolo, A., Fabian, L., Robinett, C.C., Brill, J.A., Loerke, D., Fuller, M.T., und Blankenship, J.T.** (2015). Exocyst-Dependent Membrane Addition Is Required for Anaphase Cell Elongation and Cytokinesis in *Drosophila*. *PLoS Genet* **11**, e1005632.
- Gibieza, P., und Prekeris, R.** (2018). Rab GTPases and cell division. *Small GTPases* **9**, 107-115.
- Gibson, D.G., Young, L., Chuang, R.Y., Venter, J.C., Hutchison, C.A., 3rd, und Smith, H.O.** (2009). Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases. *Nat Methods* **6**, 343-345.

- Gillissen, B., Bergemann, J., Sandmann, C., Schröer, B., Bölker, M., und Kahmann, R.** (1992). A two-component regulatory system for self/non-self recognition in *Ustilago maydis*. *Cell* **68**, 647-657.
- Gorvel, J.P., Chavrier, P., Zerial, M., und Gruenberg, J.** (1991). rab5 controls early endosome fusion in vitro. *Cell* **64**, 915-925.
- Grant, B., und Hirsh, D.** (1999). Receptor-mediated endocytosis in the *Caenorhabditis elegans* oocyte. *Mol Biol Cell* **10**, 4311-4326.
- Gromley, A., Yeaman, C., Rosa, J., Redick, S., Chen, C.T., Mirabelle, S., Guha, M., Sillibourne, J., und Doxsey, S.J.** (2005). Centriolin anchoring of exocyst and SNARE complexes at the midbody is required for secretory-vesicle-mediated abscission. *Cell* **123**, 75-87.
- Grosshans, B.L., Ortiz, D., und Novick, P.** (2006). Rabs and their effectors: Achieving specificity in membrane traffic. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 11821-11827.
- Grove, S.N., und Bracker, C.E.** (1970). Protoplasmic organization of hyphal tips among fungi: vesicles and Spitzenkorper. *J Bacteriol* **104**, 989-1009.
- Gruneberg, U., Campbell, K., Simpson, C., Grindlay, J., und Schiebel, E.** (2000). Nud1p links astral microtubule organization and the control of exit from mitosis. *EMBO J* **19**, 6475-6488.
- Guerra, F., und Bucci, C.** (2016). Multiple Roles of the Small GTPase Rab7. *Cells* **5**.
- Guindon, S., und Gascuel, O.** (2003). A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Syst Biol* **52**, 696-704.
- Guo, Z., Johnston, W., Kovtun, O., Mureev, S., Bröcker, C., Ungermann, C., und Alexandrov, K.** (2013). Subunit organisation of in vitro reconstituted HOPS and CORVET multisubunit membrane tethering complexes. *PLoS One* **8**, e81534.
- Haas, A.K., Fuchs, E., Kopajtich, R., und Barr, F.A.** (2005). A GTPase-activating protein controls Rab5 function in endocytic trafficking. *Nat Cell Biol* **7**, 887-893.
- Hall, H., Hunt, P., und Hassold, T.** (2006). Meiosis and sex chromosome aneuploidy: how meiotic errors cause aneuploidy; how aneuploidy causes meiotic errors. *Curr Opin Genet Dev* **16**, 323-329.
- Hassinger, S.** (2015). Das Num1-Protein stabilisiert den Spleißosom-assoziierten NineTeen-Komplex und erfüllt zusätzliche Funktionen in *Ustilago maydis*. In Institut für angewandte Biowissenschaften, Abteilung Genetik (Karlsruher Institut für Technologie).
- Heasley, L.R., Watson, R.A., und Argueso, J.L.** (2020). Punctuated Aneuploidization of the Budding Yeast Genome. *Genetics* **216**, 43-50.
- Heath, I.B.** (1980). Variant mitoses in lower eukaryotes: indicators of the evolution of mitosis. *Int Rev Cytol* **64**, 1-80.
- Heimel, K., Scherer, M., Vranes, M., Wahl, R., Pothiratana, C., Schuler, D., Vincon, V., Finkernagel, F., Flor-Parra, I., und Kämper, J.** (2010). The transcription factor Rbf1 is the master regulator for *b*-mating type controlled pathogenic development in *Ustilago maydis*. *PLoS Pathog* **6**, e1001035.
- Helenius, M., Wall, Hubbard.** (1983). Endosomes. *Cell Press* **8**, 245-250.

- Higuchi, Y., Ashwin, P., Roger, Y., und Steinberg, G.** (2014). Early endosome motility spatially organizes polysome distribution. *J Cell Biol* **204**, 343-357.
- Hoffman, C.S., und Winston, F.** (1987). A ten-minute DNA preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformation of *E. coli*. *Gene* **57**, 267-272.
- Hohmann, T., und Dehghani, F.** (2019). The Cytoskeleton-A Complex Interacting Meshwork. *Cells* **8**.
- Holliday, R.** (1964). Mechanism for Gene Conversion in Fungi. *Genet Res* **5**, 282-&.
- Holliday, R.** (1974). *Ustilago maydis*. In Handbook of Genetics, R.C. King, ed (New York, USA: Plenum Press), pp. 575-595.
- Holt, S.V., Vergnolle, M.A., Hussein, D., Wozniak, M.J., Allan, V.J., und Taylor, S.S.** (2005). Silencing Cenp-F weakens centromeric cohesion, prevents chromosome alignment and activates the spindle checkpoint. *J Cell Sci* **118**, 4889-4900.
- Hunker, C.M., Galvis, A., Kruk, I., Giambini, H., Veisaga, M.L., und Barbieri, M.A.** (2006). Rab5-activating protein 6, a novel endosomal protein with a role in endocytosis. *Biochem Biophys Res Commun* **340**, 967-975.
- Hur, J.Y., Kim, H.J., Lee, J.S., Choi, C.M., Lee, J.C., Jung, M.K., Pack, C.G., und Lee, K.Y.** (2018). Extracellular vesicle-derived DNA for performing EGFR genotyping of NSCLC patients. *Mol Cancer* **17**, 15.
- Hutagalung, A.H., und Novick, P.J.** (2011). Role of Rab GTPases in membrane traffic and cell physiology. *Physiol Rev* **91**, 119-149.
- Huynh, M.L., Russell, P., und Walsh, B.** (2009). Tryptic digestion of in-gel proteins for mass spectrometry analysis. *Methods Mol Biol* **519**, 507-513.
- Ikawa, K., Satou, A., Fukuhara, M., Matsumura, S., Sugiyama, N., Goto, H., Fukuda, M., Inagaki, M., Ishihama, Y., und Toyoshima, F.** (2014). Inhibition of endocytic vesicle fusion by Plk1-mediated phosphorylation of vimentin during mitosis. *Cell Cycle* **13**, 126-137.
- Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J., und White, T.J.** (1990). PCR Protocols: a guide to methods and applications. (San Diego, USA: Academic Press).
- Inoue, S., und Sato, H.** (1967). Cell motility by labile association of molecules. The nature of mitotic spindle fibers and their role in chromosome movement. *J Gen Physiol* **50**, Suppl:259-292.
- Itzen, A., und Goody, R.S.** (2011). GTPases involved in vesicular trafficking: structures and mechanisms. *Semin Cell Dev Biol* **22**, 48-56.
- Jessberger, R.** (2003). SMC proteins at the crossroads of diverse chromosomal processes. *IUBMB Life* **55**, 643-652.
- Job, D., Valiron, O., und Oakley, B.** (2003). Microtubule nucleation. *Curr Opin Cell Biol* **15**, 111-117.
- Kabcenell, A.K., Goud, B., Northup, J.K., und Novick, P.J.** (1990). Binding and hydrolysis of guanine nucleotides by Sec4p, a yeast protein involved in the regulation of vesicular traffic. *J Biol Chem* **265**, 9366-9372.

- Kalthoff, C., Alves, J., Urbanke, C., Knorr, R., und Ungewickell, E.J.** (2002). Unusual structural organization of the endocytic proteins AP180 and epsin 1. *J Biol Chem* **277**, 8209-8216.
- Kämper, J.** (2004). A PCR-based system for highly efficient generation of gene replacement mutants in *Ustilago maydis*. *Mol Genet Genomics* **271**, 103-110.
- Kämper, J., Kahmann, R., Bölker, M., Ma, L.J., Brefort, T., Saville, B.J., Banuett, F., Kronstad, J.W., Gold, S.E., Müller, O., Perlin, M.H., Wösten, H.A., de Vries, R., Ruiz-Herrera, J., Reynaga-Pena, C.G., Snetselaar, K., McCann, M., Perez-Martin, J., Feldbrügge, M., Basse, C.W., Steinberg, G., Ibeas, J.I., Holloman, W., Guzman, P., Farman, M., Stajich, J.E., Sentandreu, R., Gonzalez-Prieto, J.M., Kennell, J.C., Molina, L., Schirawski, J., Mendoza-Mendoza, A., Greilinger, D., Münch, K., Rössel, N., Scherer, M., Vranes, M., Ladendorf, O., Vincon, V., Fuchs, U., Sandrock, B., Meng, S., Ho, E.C., Cahill, M.J., Boyce, K.J., Klose, J., Klosterman, S.J., Deelstra, H.J., Ortiz-Castellanos, L., Li, W., Sanchez-Alonso, P., Schreier, P.H., Häuser-Hahn, I., Vaupel, M., Koopmann, E., Friedrich, G., Voss, H., Schlüter, T., Margolis, J., Platt, D., Swimmer, C., Gnirke, A., Chen, F., Vysotskaia, V., Mannhaupt, G., Güldener, U., Münsterkotter, M., Haase, D., Oesterheld, M., Mewes, H.W., Mauceli, E.W., DeCaprio, D., Wade, C.M., Butler, J., Young, S., Jaffe, D.B., Calvo, S., Nusbaum, C., Galagan, J., und Birren, B.W.** (2006). Insights from the genome of the biotrophic fungal plant pathogen *Ustilago maydis*. *Nature* **444**, 97-101.
- Kellner, N.** (2009). Funktionelle Charakterisierung des Num1 Proteins aus *Ustilago maydis* (Marburg: Philipps Universität).
- Kellner, N., Heimel, K., Obhof, T., Finkernagel, F., und Kämper, J.** (2014). The SPF27 homologue Num1 connects splicing and kinesin 1-dependent cytoplasmic trafficking in *Ustilago maydis*. *PLoS Genet* **10**, e1004046.
- Kerfeld, C.A., und Scott, K.M.** (2011). Using BLAST to teach "E-value-tionary" concepts. *PLoS Biol* **9**, e1001014.
- Kilmartin, J.V.** (2014). Lessons from yeast: the spindle pole body and the centrosome. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **369**.
- Kim, K., Galletta, B.J., Schmidt, K.O., Chang, F.S., Blumer, K.J., und Cooper, J.A.** (2006). Actin-based motility during endocytosis in budding yeast. *Mol Biol Cell* **17**, 1354-1363.
- Kirchhoff, C., und Cypionka, H.** (2017). Propidium ion enters viable cells with high membrane potential during live-dead staining. *J Microbiol Methods* **142**, 79-82.
- Klein, J.** (2019). Funktion der GTPase Rab5a innerhalb des endolysosomalen Signalweges in *Ustilago maydis*. In Institut für angewandte Biowissenschaften, Abteilung Genetik (Karlsruher Institut für Technologie).
- Klöpffer, T.H., Kienle, N., Fasshauer, D., und Munro, S.** (2012). Untangling the evolution of Rab G proteins: implications of a comprehensive genomic analysis. *BMC Biol* **10**, 71.
- König, J., Baumann, S., Koepke, J., Pohlmann, T., Zarnack, K., und Feldbrügge, M.** (2009). The fungal RNA-binding protein Rrm4 mediates long-distance transport of *ubi1* and *rho3* mRNAs. *EMBO J* **28**, 1855-1866.
- Kornfeld, S., und Mellman, I.** (1989). The biogenesis of lysosomes. *Annu Rev Cell Biol* **5**, 483-525.



- Kouranti, I., Sachse, M., Arouche, N., Goud, B., und Echard, A.** (2006). Rab35 regulates an endocytic recycling pathway essential for the terminal steps of cytokinesis. *Curr Biol* **16**, 1719-1725.
- Kulakowski, G., Bousquet, H., Manneville, J.B., Bassereau, P., Goud, B., und Oesterlin, L.K.** (2018). Lipid packing defects and membrane charge control RAB GTPase recruitment. *Traffic* **19**, 536-545.
- Kumar, H., Pushpa, K., Kumari, A., Verma, K., Pergu, R., und Mylavarapu, S.V.S.** (2019). The exocyst complex and Rab5 are required for abscission by localizing ESCRT III subunits to the cytokinetic bridge. *J Cell Sci* **132**.
- Laemmli, U.K.** (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Laity, C., Giasson, L., Campbell, R., und Kronstad, J.** (1995). Heterozygosity at the *b* mating-type locus attenuates fusion in *Ustilago maydis*. *Curr Genet* **27**, 451-459.
- Lanver, D., Mendoza-Mendoza, A., Brachmann, A., und Kahmann, R.** (2010). Sho1 and Msb2-related proteins regulate appressorium development in the smut fungus *Ustilago maydis*. *Plant Cell* **22**, 2085-2101.
- Lanzetti, L.** (2012). A novel function of Rab5 in mitosis. *Small GTPases* **3**, 168-172.
- Lanzetti, L., Margaria, V., Melander, F., Virgili, L., Lee, M.H., Bartek, J., und Jensen, S.** (2007). Regulation of the Rab5 GTPase-activating protein RN-tre by the dual specificity phosphatase Cdc14A in human cells. *J Biol Chem* **282**, 15258-15270.
- Lawrence, G., Brown, C.C., Flood, B.A., Karunakaran, S., Cabrera, M., Nordmann, M., Ungermann, C., und Fratti, R.A.** (2014). Dynamic association of the PI3P-interacting Mon1-Ccz1 GEF with vacuoles is controlled through its phosphorylation by the type 1 casein kinase Yck3. *Mol Biol Cell* **25**, 1608-1619.
- Lazar, T., Scheglmann, D., und Gallwitz, D.** (2002). A novel phospholipid-binding protein from the yeast *Saccharomyces cerevisiae* with dual binding specificities for the transport GTPase Ypt7p and the Sec1-related Vps33p. *Eur J Cell Biol* **81**, 635-646.
- Lehmler, C., Steinberg, G., Snetselaar, K., Schliwa, M., Kahmann, R., und Bölker, M.** (1997). Identification of a motor protein required for filamentous growth in *Ustilago maydis*. *EMBO J* **16**, 3464-3473.
- Lemmens, B., und Lindqvist, A.** (2019). DNA replication and mitotic entry: A brake model for cell cycle progression. *J Cell Biol* **218**, 3892-3902.
- Lenz, J.H., Schuchardt, I., Straube, A., und Steinberg, G.** (2006). A dynein loading zone for retrograde endosome motility at microtubule plus-ends. *EMBO J* **25**, 2275-2286.
- Li, W., Wu, Z., und Liang, Y.** (2019). Vrl1 relies on its VPS9-domain to play a role in autophagy in *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell Biol Int* **43**, 875-889.
- Li, X.C., und Tye, B.K.** (2011). Ploidy dictates repair pathway choice under DNA replication stress. *Genetics* **187**, 1031-1040.
- Liao, H., Winkfein, R.J., Mack, G., Rattner, J.B., und Yen, T.J.** (1995). CENP-F is a protein of the nuclear matrix that assembles onto kinetochores at late G2 and is rapidly degraded after mitosis. *J Cell Biol* **130**, 507-518.
- Liao, Y., Smyth, G.K., und Shi, W.** (2013). The Subread aligner: fast, accurate and scalable read mapping by seed-and-vote. *Nucleic acids research* **41**, e108.

- Linnane, E., Davey, P., Zhang, P., Puri, S., Edbrooke, M., Chiarparin, E., Revenko, A.S., Macleod, A.R., Norman, J.C., und Ross, S.J.** (2019). Differential uptake, kinetics and mechanisms of intracellular trafficking of next-generation antisense oligonucleotides across human cancer cell lines. *Nucleic acids research* **47**, 4375-4392.
- Liu, J., Kaksonen, M., Drubin, D.G., und Oster, G.** (2006). Endocytic vesicle scission by lipid phase boundary forces. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 10277-10282.
- Liu, K., Xing, R., Jian, Y., Gao, Z., Ma, X., Sun, X., Li, Y., Xu, M., Wang, X., Jing, Y., Guo, W., und Yang, C.** (2017). WDR91 is a Rab7 effector required for neuronal development. *J Cell Biol* **216**, 3307-3321.
- Liu, Y., Nakatsukasa, K., Kotera, M., Kanada, A., Nishimura, T., Kishi, T., Mimura, S., und Kamura, T.** (2011). Non-SCF-type F-box protein Roy1/Ymr258c interacts with a Rab5-like GTPase Ypt52 and inhibits Ypt52 function. *Mol Biol Cell* **22**, 1575-1584.
- Lopez-Berges, M.S., Arst, H.N., Pinar, M., und Penalva, M.A.** (2017). Genetic studies on the physiological role of CORVET in *Aspergillus nidulans*. *FEMS Microbiol Lett* **364**.
- Luzio, J.P., Bright, N.A., und Pryor, P.R.** (2007). The role of calcium and other ions in sorting and delivery in the late endocytic pathway. *Biochem Soc Trans* **35**, 1088-1091.
- Ma, R., Hou, X., Zhang, L., Sun, S.C., Schedl, T., Moley, K., und Wang, Q.** (2014). Rab5a is required for spindle length control and kinetochore-microtubule attachment during meiosis in oocytes. *FASEB J* **28**, 4026-4035.
- Mahlert, M., Leveleki, L., Hlubek, A., Sandrock, B., und Bölker, M.** (2006). Rac1 and Cdc42 regulate hyphal growth and cytokinesis in the dimorphic fungus *Ustilago maydis*. *Mol Microbiol* **59**, 567-578.
- Markgraf, D.F., Ahnert, F., Arlt, H., Mari, M., Peplowska, K., Epp, N., Griffith, J., Reggiori, F., und Ungermann, C.** (2009). The CORVET subunit Vps8 cooperates with the Rab5 homolog Vps21 to induce clustering of late endosomal compartments. *Mol Biol Cell* **20**, 5276-5289.
- Martinez-Espinoza, A.D., Garcia-Pedrajas, M.D., und Gold, S.E.** (2002). The Ustilaginales as plant pests and model systems. *Fungal Genet Biol* **35**, 1-20.
- Matei, A., und Doehlemann, G.** (2016). Cell biology of corn smut disease-*Ustilago maydis* as a model for biotrophic interactions. *Curr Opin Microbiol* **34**, 60-66.
- Mellman, I.** (1996). Endocytosis and molecular sorting. *Annu Rev Cell Dev Biol* **12**, 575-625.
- Mellman, I., Fuchs, R., und Helenius, A.** (1986). Acidification of the endocytic and exocytic pathways. *Annu Rev Biochem* **55**, 663-700.
- Mendoza-Mendoza, A., Berndt, P., Djamei, A., Weise, C., Linne, U., Marahiel, M., Vranes, M., Kämper, J., und Kahmann, R.** (2009). Physical-chemical plant-derived signals induce differentiation in *Ustilago maydis*. *Mol Microbiol* **71**, 895-911.
- Messenger, S.W., Thomas, D.D., Cooley, M.M., Jones, E.K., Falkowski, M.A., August, B.K., Fernandez, L.A., Gorelick, F.S., und Groblewski, G.E.** (2015). Early to Late Endosome Trafficking Controls Secretion and Zymogen Activation in Rodent and Human Pancreatic Acinar Cells. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol* **1**, 695-709.

- Miaczynska, M., Christoforidis, S., Giner, A., Shevchenko, A., Uttenweiler-Joseph, S., Habermann, B., Wilm, M., Parton, R.G., und Zerial, M.** (2004). APPL proteins link Rab5 to nuclear signal transduction via an endosomal compartment. *Cell* **116**, 445-456.
- Michalak, M., Corbett, E.F., Mesaeli, N., Nakamura, K., und Opas, M.** (1999). Calreticulin: one protein, one gene, many functions. *Biochem J* **344 Pt 2**, 281-292.
- Mitchison, T., und Kirschner, M.** (1984). Dynamic instability of microtubule growth. *Nature* **312**, 237-242.
- Mizuno-Yamasaki, E., Rivera-Molina, F., und Novick, P.** (2012a). GTPase networks in membrane traffic. *Annu Rev Biochem* **81**, 637-659.
- Mizuno-Yamasaki, E., Rivera-Molina, F., und Novick, P.** (2012b). GTPase Networks in Membrane Traffic. *Annual Review of Biochemistry*, Vol 81 **81**, 637-659.
- Modica, G., Skorobogata, O., Sauvageau, E., Vissa, A., Yip, C.M., Kim, P.K., Wurtele, H., und Lefrancois, S.** (2017). Rab7 palmitoylation is required for efficient endosome-to-TGN trafficking. *J Cell Sci* **130**, 2579-2590.
- Moriya, H.** (2015). Quantitative nature of overexpression experiments. *Mol Biol Cell* **26**, 3932-3939.
- Mottola, G.** (2014). The complexity of Rab5 to Rab7 transition guarantees specificity of pathogen subversion mechanisms. *Front Cell Infect Microbiol* **4**, 180.
- Munzberg, E., und Stein, M.** (2019). Structure and Dynamics of Mono- vs. Doubly Lipidated Rab5 in Membranes. *Int J Mol Sci* **20**.
- Murphy, R.F., Powers, S., und Cantor, C.R.** (1984). Endosome pH measured in single cells by dual fluorescence flow cytometry: rapid acidification of insulin to pH 6. *J Cell Biol* **98**, 1757-1762.
- Murthy, K., und Wadsworth, P.** (2005). Myosin-II-dependent localization and dynamics of F-actin during cytokinesis. *Curr Biol* **15**, 724-731.
- Nader, N., Dib, M., Hodeify, R., Courjaret, R., Elmi, A., Hammad, A.S., Dey, R., Huang, X.Y., und Machaca, K.** (2020). Membrane progesterone receptor induces meiosis in *Xenopus* oocytes through endocytosis into signaling endosomes and interaction with APPL1 and Akt2. *PLoS Biol* **18**, e3000901.
- Nagano, M., Toshima, J.Y., Siekhaus, D.E., und Toshima, J.** (2019). Rab5-mediated endosome formation is regulated at the trans-Golgi network. *Commun Biol* **2**, 419.
- Nakatsukasa, K., Kanada, A., Matsuzaki, M., Byrne, S.D., Okumura, F., und Kamura, T.** (2014). The nutrient stress-induced small GTPase Rab5 contributes to the activation of vesicle trafficking and vacuolar activity. *J Biol Chem* **289**, 20970-20978.
- Nickerson, D.P., Brett, C.L., und Merz, A.J.** (2009). Vps-C complexes: gatekeepers of endolysosomal traffic. *Curr Opin Cell Biol* **21**, 543-551.
- Nielsen, E., Severin, F., Backer, J.M., Hyman, A.A., und Zerial, M.** (1999). Rab5 regulates motility of early endosomes on microtubules. *Nat Cell Biol* **1**, 376-382.
- O'Donell, K.L., und McLaughlin, D.J.** (1984). Postmeiotic mitosis, basidiospore development, and septation in *Ustilago maydis*. *Mycologia* **76**, 486-502.

- Oakley, C.E., und Oakley, B.R.** (1989). Identification of gamma-tubulin, a new member of the tubulin superfamily encoded by mipA gene of *Aspergillus nidulans*. *Nature* **338**, 662-664.
- Obhof, T.** (2017). Charakterisierung der zytoplasmatischen Funktion von Num1 und Nma1 in *Ustilago maydis*. In Institut für angewandte Biowissenschaften, Abteilung Genetik (Karlsruher Institut für Technologie).
- Oerke, E.-C.** (2006). Crop losses to pests. *The Journal of Agricultural Science* **144**, 31-43.
- Olgeiser, L., Haag, C., Boerner, S., Ule, J., Busch, A., Koepke, J., König, J., Feldbrügge, M., und Zarnack, K.** (2019). The key protein of endosomal mRNP transport Rrm4 binds translational landmark sites of cargo mRNAs. *EMBO Rep* **20**.
- Ortiz, D., Medkova, M., Walch-Solimena, C., und Novick, P.** (2002). Ypt32 recruits the Sec4p guanine nucleotide exchange factor, Sec2p, to secretory vesicles; evidence for a Rab cascade in yeast. *J Cell Biol* **157**, 1005-1015.
- Ostrowicz, C.W., Brocker, C., Ahnert, F., Nordmann, M., Lachmann, J., Peplowska, K., Perz, A., Auffarth, K., Engelbrecht-Vandre, S., und Ungermann, C.** (2010). Defined subunit arrangement and rab interactions are required for functionality of the HOPS tethering complex. *Traffic* **11**, 1334-1346.
- Park, J.S., Okumura, Y., Tachikawa, H., und Neiman, A.M.** (2013). SPO71 encodes a developmental stage-specific partner for Vps13 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot Cell* **12**, 1530-1537.
- Passerini, V., und Storchova, Z.** (2016). Too much to handle - how gaining chromosomes destabilizes the genome. *Cell Cycle* **15**, 2867-2874.
- Pawelec, A., Arsic, J., und Kolling, R.** (2010). Mapping of Vps21 and HOPS binding sites in Vps8 and effect of binding site mutants on endocytic trafficking. *Eukaryot Cell* **9**, 602-610.
- Pedersen, B.S., Collins, R.L., Talkowski, M.E., und Quinlan, A.R.** (2017). Indexcov: fast coverage quality control for whole-genome sequencing. *Gigascience* **6**, 1-6.
- Penalva, M.A.** (2010). Endocytosis in filamentous fungi: Cinderella gets her reward. *Curr Opin Microbiol* **13**, 684-692.
- Penalva, M.A., Galindo, A., Abenza, J.F., Pinar, M., Calcagno-Pizarelli, A.M., Arst, H.N., und Pantazopoulou, A.** (2012). Searching for gold beyond mitosis: Mining intracellular membrane traffic in *Aspergillus nidulans*. *Cell Logist* **2**, 2-14.
- Peplowska, K., Markgraf, D.F., Ostrowicz, C.W., Bange, G., und Ungermann, C.** (2007). The CORVET tethering complex interacts with the yeast Rab5 homolog Vps21 and is involved in endo-lysosomal biogenesis. *Dev Cell* **12**, 739-750.
- Pereira-Leal, J.B.** (2008). The Ypt/Rab family and the evolution of trafficking in fungi. *Traffic* **9**, 27-38.
- Pereira-Leal, J.B., und Seabra, M.C.** (2001). Evolution of the Rab family of small GTP-binding proteins. *J Mol Biol* **313**, 889-901.
- Perini, E.D., Schaefer, R., Stoter, M., Kalaidzidis, Y., und Zerial, M.** (2014). Mammalian CORVET is required for fusion and conversion of distinct early endosome subpopulations. *Traffic* **15**, 1366-1389.

- Petsalaki, E., Dandoulaki, M., und Zachos, G.** (2018). The ESC RT protein Chmp4c regulates mitotic spindle checkpoint signaling. *J Cell Biol* **217**, 861-876.
- Pfeffer, S., und Aivazian, D.** (2004). Targeting Rab GTPases to distinct membrane compartments. *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**, 886-896.
- Picco, A., Kukulski, W., Manenschijn, H.E., Specht, T., Briggs, J.A.G., und Kaksonen, M.** (2018). The contributions of the actin machinery to endocytic membrane bending and vesicle formation. *Mol Biol Cell* **29**, 1346-1358.
- Pinter, N.** (2012). Funktionelle Charakterisierung des Num1 Interaktionspartners Nma1 in *Ustilago maydis*. In Institut für Angewandte Biowissenschaften, Abteilung Genetik (Karlsruhe: KIT).
- Pinter, N.** (2015). Identifizierung von Interaktionspartnern des Mikrotubuli-assoziierten Proteins Nma1. In IAB Genetik (Karlsruhe: KIT).
- Plemel, R.L., Lobingier, B.T., Brett, C.L., Angers, C.G., Nickerson, D.P., Paulsel, A., Sprague, D., und Merz, A.J.** (2011). Subunit organization and Rab interactions of Vps-C protein complexes that control endolysosomal membrane traffic. *Mol Biol Cell* **22**, 1353-1363.
- Pohlmann, T.** (2013). Die Rolle von PAM2-Proteinen während des endosomalen mRNA-Transports in *Ustilago maydis*. In Institut für Mikrobiologie (Düsseldorf: Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf).
- Pohlmann, T., Baumann, S., Haag, C., Albrecht, M., und Feldbrügge, M.** (2015). A FYVE zinc finger domain protein specifically links mRNA transport to endosome trafficking. *Elife* **4**.
- Poteryaev, D., Datta, S., Ackema, K., Zerial, M., und Spang, A.** (2010). Identification of the switch in early-to-late endosome transition. *Cell* **141**, 497-508.
- Progida, C., Cogli, L., Piro, F., De Luca, A., Bakke, O., und Bucci, C.** (2010). Rab7b controls trafficking from endosomes to the TGN. *J Cell Sci* **123**, 1480-1491.
- Pupo, E., Avanzato, D., Scianna, M., Oldani, A., Serini, G., und Lanzetti, L.** (2018). Kinesin-2 Controls the Motility of RAB5 Endosomes and Their Association with the Spindle in Mitosis. *Int J Mol Sci* **19**.
- Pylypenko, O., Rak, A., Durek, T., Kushnir, S., Dursina, B.E., Thomae, N.H., Constantinescu, A.T., Brunsveld, L., Watzke, A., Waldmann, H., Goody, R.S., und Alexandrov, K.** (2006). Structure of doubly prenylated Ypt1:GDI complex and the mechanism of GDI-mediated Rab recycling. *EMBO J* **25**, 13-23.
- Rabouille, C., und Jokitalo, E.** (2003). Golgi apparatus partitioning during cell division. *Mol Membr Biol* **20**, 117-127.
- Rak, A., Pylypenko, O., Durek, T., Watzke, A., Kushnir, S., Brunsveld, L., Waldmann, H., Goody, R.S., und Alexandrov, K.** (2003). Structure of Rab GDP-dissociation inhibitor in complex with prenylated YPT1 GTPase. *Science* **302**, 646-650.
- Rana, M., Lachmann, J., und Ungermann, C.** (2015). Identification of a Rab GTPase-activating protein cascade that controls recycling of the Rab5 GTPase Vps21 from the vacuole. *Mol Biol Cell* **26**, 2535-2549.
- Rappsilber, J., Ishihama, Y., und Mann, M.** (2003). Stop and go extraction tips for matrix-assisted laser desorption/ionization, nanoelectrospray, and LC/MS sample pretreatment in proteomics. *Anal Chem* **75**, 663-670.

- Rappsilber, J., Mann, M., und Ishihama, Y.** (2007). Protocol for micro-purification, enrichment, pre-fractionation and storage of peptides for proteomics using StageTips. *Nat Protoc* **2**, 1896-1906.
- Raymond, C.K., Howald-Stevenson, I., Vater, C.A., und Stevens, T.H.** (1992). Morphological classification of the yeast vacuolar protein sorting mutants: evidence for a prevacuolar compartment in class E vps mutants. *Mol Biol Cell* **3**, 1389-1402.
- Raymond, C.K., Ohara, P.J., Eichinger, G., Rothman, J.H., und Stevens, T.H.** (1990). Molecular Analysis of the Yeast Vps3 Gene and the Role of Its Product in Vacuolar Protein Sorting and Vacuolar Segregation during the Cell-Cycle. *J Cell Biol* **111**, 877-892.
- Read, K.** (2003). Does endocytosis occur in fungal hyphae? *Fungal Genet Biol* **39**, 199-203.
- Rieder, S.E., und Emr, S.D.** (1997). A novel RING finger protein complex essential for a late step in protein transport to the yeast vacuole. *Mol Biol Cell* **8**, 2307-2327.
- Rink, J., Ghigo, E., Kalaidzidis, Y., und Zerial, M.** (2005). Rab conversion as a mechanism of progression from early to late endosomes. *Cell* **122**, 735-749.
- Roncero, C., und Duran, A.** (1985). Effect of Calcofluor white and Congo red on fungal cell wall morphogenesis: in vivo activation of chitin polymerization. *J Bacteriol* **163**, 1180-1185.
- Rosenberg, M., Azevedo, N.F., und Ivask, A.** (2019). Propidium iodide staining underestimates viability of adherent bacterial cells. *Sci Rep* **9**, 6483.
- Rothman, J.H., und Stevens, T.H.** (1986). Protein Sorting in Yeast - Mutants Defective in Vacuole Biogenesis Mislocalize Vacuolar Proteins into the Late Secretory Pathway. *Cell* **47**, 1041-1051.
- Ryder, L.S., und Talbot, N.J.** (2015). Regulation of appressorium development in pathogenic fungi. *Curr Opin Plant Biol* **26**, 8-13.
- Sambrook, J., Frisch, E.F., und Maniatis, T.** (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. (Cold Spring Harbour, New York: Cold Spring Harbour Laboratory Press).
- Sandrock, B., Böhmer, C., und Bölker, M.** (2006). Dual function of the germinal centre kinase Don3 during mitosis and cytokinesis in *Ustilago maydis*. *Mol Microbiol* **62**, 655-666.
- Sann, S.B., Crane, M.M., Lu, H., und Jin, Y.** (2012). Rabx-5 regulates RAB-5 early endosomal compartments and synaptic vesicles in *C. elegans*. *PLoS One* **7**, e37930.
- Sasaki, T., Kikuchi, A., Araki, S., Hata, Y., Isomura, M., Kuroda, S., und Takai, Y.** (1990). Purification and characterization from bovine brain cytosol of a protein that inhibits the dissociation of GDP from and the subsequent binding of GTP to smg p25A, a ras p21-like GTP-binding protein. *J Biol Chem* **265**, 2333-2337.
- Sawin, K.E., Lourenco, P.C., und Snaith, H.A.** (2004). Microtubule nucleation at non-spindle pole body microtubule-organizing centers requires fission yeast centrosomin-related protein mod20p. *Current biology : CB* **14**, 763-775.
- Sazer, S., Lynch, M., und Needleman, D.** (2014). Deciphering the Evolutionary History of Open and Closed Mitosis. *Curr Biol* **24**, R1099-R1103.

- Schalk, I., Zeng, K., Wu, S.K., Stura, E.A., Matteson, J., Huang, M., Tandon, A., Wilson, I.A., und Balch, W.E.** (1996). Structure and mutational analysis of Rab GDP-dissociation inhibitor. *Nature* **381**, 42-48.
- Schindelin, J., Rueden, C.T., Hiner, M.C., und Eliceiri, K.W.** (2015). The ImageJ ecosystem: An open platform for biomedical image analysis. *Mol Reprod Dev* **82**, 518-529.
- Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Preibisch, S., Rueden, C., Saalfeld, S., Schmid, B., Tinevez, J.Y., White, D.J., Hartenstein, V., Eliceiri, K., Tomancak, P., und Cardona, A.** (2012). Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods* **9**, 676-682.
- Schink, K.** (2010). Funktionelle Analyse von Rho-spezifischen Guaninnukleotidaustauschfaktoren in *Ustilago maydis* (Marburg: Philipps Universität).
- Schmidt, O., Weyer, Y., Fink, M.J., Muller, M., Weys, S., Bindreither, M., und Teis, D.** (2017). Regulation of Rab5 isoforms by transcriptional and post-transcriptional mechanisms in yeast. *FEBS Lett* **591**, 2803-2815.
- Schneider, C.A., Rasband, W.S., und Eliceiri, K.W.** (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods* **9**, 671-675.
- Schneider, K.** (2016). Funktion von Nma1 bei vesikulären Transportprozessen. In Institut für angewandte Biowissenschaften, Abteilung Genetik (Karlsruher Institut für Technologie).
- Schu, P.V., Takegawa, K., Fry, M.J., Stack, J.H., Waterfield, M.D., und Emr, S.D.** (1993). Phosphatidylinositol 3-kinase encoded by yeast VPS34 gene essential for protein sorting. *Science* **260**, 88-91.
- Schuchardt, I., Assmann, D., Thines, E., Schuberth, C., und Steinberg, G.** (2005). Myosin-V, Kinesin-1, and Kinesin-3 cooperate in hyphal growth of the fungus *Ustilago maydis*. *Mol Biol Cell* **16**, 5191-5201.
- Schuler, D.** (2013). Charakterisierung der Akquisition von Kohlenhydraten in *Ustilago maydis*. In Institut für angewandte Biowissenschaften, Abteilung Genetik (Karlsruhe Institut für Technologie).
- Schulz, B., Banuett, F., Dahl, M., Schlesinger, R., Schäfer, W., Martin, T., Herskowitz, I., und Kahmann, R.** (1990). The *b* alleles of *U. maydis*, whose combinations program pathogenic development, code for polypeptides containing a homeodomain-related motif. *Cell* **60**, 295-306.
- Schweitzer, J.K., Burke, E.E., Goodson, H.V., und D'Souza-Schorey, C.** (2005). Endocytosis resumes during late mitosis and is required for cytokinesis. *J Biol Chem* **280**, 41628-41635.
- Seals, D.F., Eitzen, G., Margolis, N., Wickner, W.T., und Price, A.** (2000). A Ypt/Rab effector complex containing the Sec1 homolog Vps33p is required for homotypic vacuole fusion. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 9402-9407.
- Segawa, T., Hazeki, K., Nigorikawa, K., Morioka, S., Guo, Y., Takasuga, S., Asanuma, K., und Hazeki, O.** (2014). Inpp5e increases the Rab5 association and phosphatidylinositol 3-phosphate accumulation at the phagosome through an interaction with Rab20. *Biochem J* **464**, 365-375.

- Semerdjieva, S., Shortt, B., Maxwell, E., Singh, S., Fonarev, P., Hansen, J., Schiavo, G., Grant, B.D., und Smythe, E.** (2008). Coordinated regulation of AP2 uncoating from clathrin-coated vesicles by rab5 and hRME-6. *J Cell Biol* **183**, 499-511.
- Serio, G., Margaria, V., Jensen, S., Oldani, A., Bartek, J., Bussolino, F., und Lanzetti, L.** (2011). Small GTPase Rab5 participates in chromosome congression and regulates localization of the centromere-associated protein CENP-F to kinetochores. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**, 17337-17342.
- Shawn M Ferguson , A.R., Summer Paradise, Hongying Shen, Kumi Mesaki, Agnes Ferguson, Olivier Destaing, Genevieve Ko, Junko Takasaki, Ottavio Cremona, Eileen O' Toole, Pietro De Camilli.** (2009). Coordinated Actions of Actin and BAR Proteins Upstream of Dynamin at Endocytic Clathrin-Coated Pits. *Dev Cell* **17**, 811-822.
- Shearer, L.J., und Petersen, N.O.** (2019). Distribution and Co-localization of endosome markers in cells. *Heliyon* **5**, e02375.
- Sheltzer, J.M., Blank, H.M., Pfau, S.J., Tange, Y., George, B.M., Humpton, T.J., Brito, I.L., Hiraoka, Y., Niwa, O., und Amon, A.** (2011). Aneuploidy drives genomic instability in yeast. *Science* **333**, 1026-1030.
- Shi, X., Duan, F., Lin, L., Xu, Q., Xu, T., und Zhang, R.** (2019). WIP-1 and DBN-1 promote scission of endocytic vesicles by bridging actin and Dynamin-1 in the *C. elegans* intestine. *J Cell Sci* **132**.
- Shiel, A.I.** (2014). The microtubule cytoskeleton of the corn smut fungus *Ustilago maydis* (University of Exeter).
- Shuping, D.S.S., und Eloff, J.N.** (2017). The Use of Plants to Protect Plants and Food against Fungal Pathogens: A Review. *Afr J Tradit Complement Altern Med* **14**, 120-127.
- Simonsen, A., Lippe, R., Christoforidis, S., Gaullier, J.M., Brech, A., Callaghan, J., Toh, B.H., Murphy, C., Zerial, M., und Stenmark, H.** (1998). EEA1 links PI(3)K function to Rab5 regulation of endosome fusion. *Nature* **394**, 494-498.
- Singer-Krüger, B., Stenmark, H., Düsterhöft, A., Philippsen, P., Yoo, J.S., Gallwitz, D., und Zerial, M.** (1994). Role of three rab5-like GTPases, Ypt51p, Ypt52p, and Ypt53p, in the endocytic and vacuolar protein sorting pathways of yeast. *J Cell Biol* **125**, 283-298.
- Snetselaar, K.M., und Mims, C.W.** (1992). Sporidial fusion and infection of maize seedlings by the smut fungus *Ustilago maydis*. *Mycologia* **84**, 193-203.
- Snetselaar, K.M., und Mims, C.W.** (1993). Infection of maize stigmas by *Ustilago maydis*: Light and electron microscopy. *Phytopathology* **83**, 843.
- Snetselaar, K.M., Bölker, M., und Kahmann, R.** (1996). *Ustilago maydis* mating hyphae orient their growth toward pheromone sources. *Fungal Genet Biol* **20**, 299-312.
- Solinger, J.A., und Spang, A.** (2013). Tethering complexes in the endocytic pathway: CORVET and HOPS. *FEBS J* **280**, 2743-2757.
- Southern, E.M.** (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* **98**, 503-517.



- Spellig, T., Bottin, A., und Kahmann, R.** (1996). Green fluorescent protein (GFP) as a new vital marker in the phytopathogenic fungus *Ustilago maydis*. *Mol Gen Genet* **252**, 503-509.
- Spellig, T., Bolker, M., Lottspeich, F., Frank, R.W., und Kahmann, R.** (1994). Pheromones trigger filamentous growth in *Ustilago maydis*. *EMBO J* **13**, 1620-1627.
- Steinberg, G.** (2007). Tracks for traffic: microtubules in the plant pathogen *Ustilago maydis*. *The New phytologist* **174**, 721-733.
- Steinberg, G.** (2014). Endocytosis and early endosome motility in filamentous fungi. *Curr Opin Microbiol* **20**, 10-18.
- Steinberg, G., und Perez-Martin, J.** (2008). *Ustilago maydis*, a new fungal model system for cell biology. *Trends Cell Biol* **18**, 61-67.
- Steinberg, G., Wedlich-Söldner, R., Brill, M., und Schulz, I.** (2001). Microtubules in the fungal pathogen *Ustilago maydis* are highly dynamic and determine cell polarity. *J Cell Sci* **114**, 609-622.
- Stenmark, H.** (2009). Rab GTPases as coordinators of vesicle traffic. *Nat Rev Mol Cell Biol* **10**, 513-525.
- Stenmark, H., Vitale, G., Ullrich, O., und Zerial, M.** (1995). Rabaptin-5 is a direct effector of the small GTPase Rab5 in endocytic membrane fusion. *Cell* **83**, 423-432.
- Stenmark, H., Parton, R.G., Steele-Mortimer, O., Lutcke, A., Gruenberg, J., und Zerial, M.** (1994). Inhibition of rab5 GTPase activity stimulates membrane fusion in endocytosis. *EMBO J* **13**, 1287-1296.
- Straube, A., Weber, I., und Steinberg, G.** (2005). A novel mechanism of nuclear envelope break-down in a fungus: nuclear migration strips off the envelope. *EMBO J* **24**, 1674-1685.
- Straube, A., Hause, G., Fink, G., und Steinberg, G.** (2006). Conventional kinesin mediates microtubule-microtubule interactions in vivo. *Mol Biol Cell* **17**, 907-916.
- Straube, A., Brill, M., Oakley, B.R., Horio, T., und Steinberg, G.** (2003). Microtubule organization requires cell cycle-dependent nucleation at dispersed cytoplasmic sites: polar and perinuclear microtubule organizing centers in the plant pathogen *Ustilago maydis*. *Mol Biol Cell* **14**, 642-657.
- Su, X., Kong, C., und Stahl, P.D.** (2007). GAPex-5 mediates ubiquitination, trafficking, and degradation of epidermal growth factor receptor. *J Biol Chem* **282**, 21278-21284.
- Suhrborg, R.** (2017). Funktionelle Analyse der kleinen G-Proteine Rab5a und Rab5b in *Ustilago maydis*. In Institut für angewandte Biowissenschaften, Abteilung Genetik (Karlsruher Institut für Technologie).
- Suzuki, S.W., und Emr, S.D.** (2018). Membrane protein recycling from the vacuole/lysosome membrane. *J Cell Biol* **217**, 1623-1632.
- Szabo, Z., Tonnis, M., Kessler, H., und Feldbrügge, M.** (2002). Structure-function analysis of lipopeptide pheromones from the plant pathogen *Ustilago maydis*. *Mol Genet Genomics* **268**, 362-370.
- Takatsu, H., Katoh, Y., Ueda, T., Waguri, S., Murayama, T., Takahashi, S., Shin, H.W., und Nakayama, K.** (2013). Mitosis-Coupled, Microtubule-Dependent Clustering of Endosomal Vesicles around Centrosomes. *Cell Struct Funct* **38**, 31-41.

- Tanaka, S., Brefort, T., Neidig, N., Djamei, A., Kahnt, J., Vermerris, W., Koenig, S., Feussner, K., Feussner, I., und Kahmann, R.** (2014). A secreted *Ustilago maydis* effector promotes virulence by targeting anthocyanin biosynthesis in maize. *Elife* **3**, e01355.
- Theisen, U., Straube, A., und Steinberg, G.** (2008). Dynamic rearrangement of nucleoporins during fungal "Open" mitosis. *Mol Biol Cell* **19**, 1230-1240.
- Tian, Zhang, und Qin.** (2014). Function of Rab GTPases in Regulating the Development, Protein Secretion and Virulence of Fungi. In *Post-harvest Pathology* (Springer).
- Touati, S.A., und Wassmann, K.** (2016). How oocytes try to get it right: spindle checkpoint control in meiosis. *Chromosoma* **125**, 321-335.
- Touchot, N., Chardin, P., und Tavitian, A.** (1987). Four additional members of the ras gene superfamily isolated by an oligonucleotide strategy: molecular cloning of YPT-related cDNAs from a rat brain library. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**, 8210-8214.
- Towbin, H., Staehelin, T., und Gordon, J.** (1979). Electrophoretic Transfer of Proteins from Polyacrylamide Gels to Nitrocellulose Sheets - Procedure and Some Applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**, 4350-4354.
- Tsukuda, T., Carleton, S., Fotheringham, S., und Holloman, W.K.** (1988). Isolation and characterization of an autonomously replicating sequence from *Ustilago maydis*. *Mol Cell Biol* **8**, 3703-3709.
- Tyanova, S., Temu, T., und Cox, J.** (2016). The MaxQuant computational platform for mass spectrometry-based shotgun proteomics. *Nat Protoc* **11**, 2301-2319.
- Ullrich, O., Horiuchi, H., Bucci, C., und Zerial, M.** (1994). Membrane association of Rab5 mediated by GDP-dissociation inhibitor and accompanied by GDP/GTP exchange. *Nature* **368**, 157-160.
- Ullrich, O., Stenmark, H., Alexandrov, K., Huber, L.A., Kaibuchi, K., Sasaki, T., Takai, Y., und Zerial, M.** (1993). Rab GDP dissociation inhibitor as a general regulator for the membrane association of rab proteins. *J Biol Chem* **268**, 18143-18150.
- Ulrich, J.** (2020). Die kombinatorische Regulation eines Transkriptions-Netzwerkes reguliert die Pflanzeninfektion von *Ustilago maydis*. In *Institut für angewandte Biowissenschaften, Abteilung Genetik (Karlsruher Institut für Technologie)*.
- Ungermann, C., und Kümmel, D.** (2019). Structure of membrane tethers and their role in fusion. *Traffic* **20**, 479-490.
- Valinluck, M., Woraratanadharm, T., Lu, C.Y., Quintanilla, R.H., Jr., und Banuett, F.** (2014). The cell end marker Tea4 regulates morphogenesis and pathogenicity in the basidiomycete fungus *Ustilago maydis*. *Fungal Genet Biol* **66**, 54-68.
- van den Boomen, D.J.H., Sienkiewicz, A., Berlin, I., Jongsma, M.L.M., van Elsland, D.M., Luzio, J.P., Neefjes, J.J.C., und Lehner, P.J.** (2020). A trimeric Rab7 GEF controls NPC1-dependent lysosomal cholesterol export. *Nat Commun* **11**, 5559.
- van der Kant, R., Jonker, C.T., Wijdeven, R.H., Bakker, J., Janssen, L., Klumperman, J., und Neefjes, J.** (2015). Characterization of the Mammalian CORVET and HOPS Complexes and Their Modular Restructuring for Endosome Specificity. *J Biol Chem* **290**, 30280-30290.

- Veith, D., Scherr, N., Efimov, V.P., und Fischer, R.** (2005). Role of the spindle-pole-body protein ApsB and the cortex protein ApsA in microtubule organization and nuclear migration in *Aspergillus nidulans*. *J Cell Sci* **118**, 3705-3716.
- Verweij, P.E., Snelders, E., Kema, G.H., Mellado, E., und Melchers, W.J.** (2009). Azole resistance in *Aspergillus fumigatus*: a side-effect of environmental fungicide use? *Lancet Infect Dis* **9**, 789-795.
- Vietri, M., Schink, K.O., Campsteijn, C., Wegner, C.S., Schultz, S.W., Christ, L., Thoresen, S.B., Brech, A., Raiborg, C., und Stenmark, H.** (2015). Spastin and ESCRT-III coordinate mitotic spindle disassembly and nuclear envelope sealing. *Nature* **522**, 231-235.
- Vivek, B.O., O. Njuguna, J. Imanywoha, J. Bigirwa, B. Diallo, A. Pixley, K.** (2009). Diallel analysis of grain yield and resistance to seven diseases of 12 African maize (*Zea mays* L.) inbred lines. *Euphytica* **172**, 329-340.
- Volinia, S., Dhand, R., Vanhaesebroeck, B., MacDougall, L.K., Stein, R., Zvelebil, M.J., Domin, J., Panaretou, C., und Waterfield, M.D.** (1995). A human phosphatidylinositol 3-kinase complex related to the yeast Vps34p-Vps15p protein sorting system. *EMBO J* **14**, 3339-3348.
- Walworth, N.C., Brennwald, P., Kabcenell, A.K., Garrett, M., und Novick, P.** (1992). Hydrolysis of GTP by Sec4 protein plays an important role in vesicular transport and is stimulated by a GTPase-activating protein in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **12**, 2017-2028.
- Wang, N., Lee, I.J., Rask, G., und Wu, J.Q.** (2016). Roles of the TRAPP-II Complex and the Exocyst in Membrane Deposition during Fission Yeast Cytokinesis. *PLoS Biol* **14**, e1002437.
- Wang, S., Hassold, T., Hunt, P., White, M.A., Zickler, D., Kleckner, N., und Zhang, L.R.** (2017). Inefficient Crossover Maturation Underlies Elevated Aneuploidy in Human Female Meiosis. *Cell* **168**, 977-+.
- Waugh, A., Gendron, P., Altman, R., Brown, J.W., Case, D., Gautheret, D., Harvey, S.C., Leontis, N., Westbrook, J., Westhof, E., Zuker, M., und Major, F.** (2002). RNAML: a standard syntax for exchanging RNA information. *Rna* **8**, 707-717.
- Weber, I., Gruber, C., und Steinberg, G.** (2003). A class-V myosin required for mating, hyphal growth, and pathogenicity in the dimorphic plant pathogen *Ustilago maydis*. *Plant Cell* **15**, 2826-2842.
- Wedlich-Söldner, R., Bölker, M., Kahmann, R., und Steinberg, G.** (2000). A putative endosomal t-SNARE links exo- and endocytosis in the phytopathogenic fungus *Ustilago maydis*. *EMBO J* **19**, 1974-1986.
- Wedlich-Söldner, R., Straube, A., Friedrich, M.W., und Steinberg, G.** (2002). A balance of KIF1A-like kinesin and dynein organizes early endosomes in the fungus *Ustilago maydis*. *EMBO J* **21**, 2946-2957.
- Weigand, A.** (2015). Phylogenetische Analysen: Baum ist nicht gleich Baum. *Laborjournal* **4/2015**, 3.
- Weinzierl, G., Leveleki, L., Hassel, A., Kost, G., Wanner, G., und Bölker, M.** (2002). Regulation of cell separation in the dimorphic fungus *Ustilago maydis*. *Mol Microbiol* **45**, 219-231.

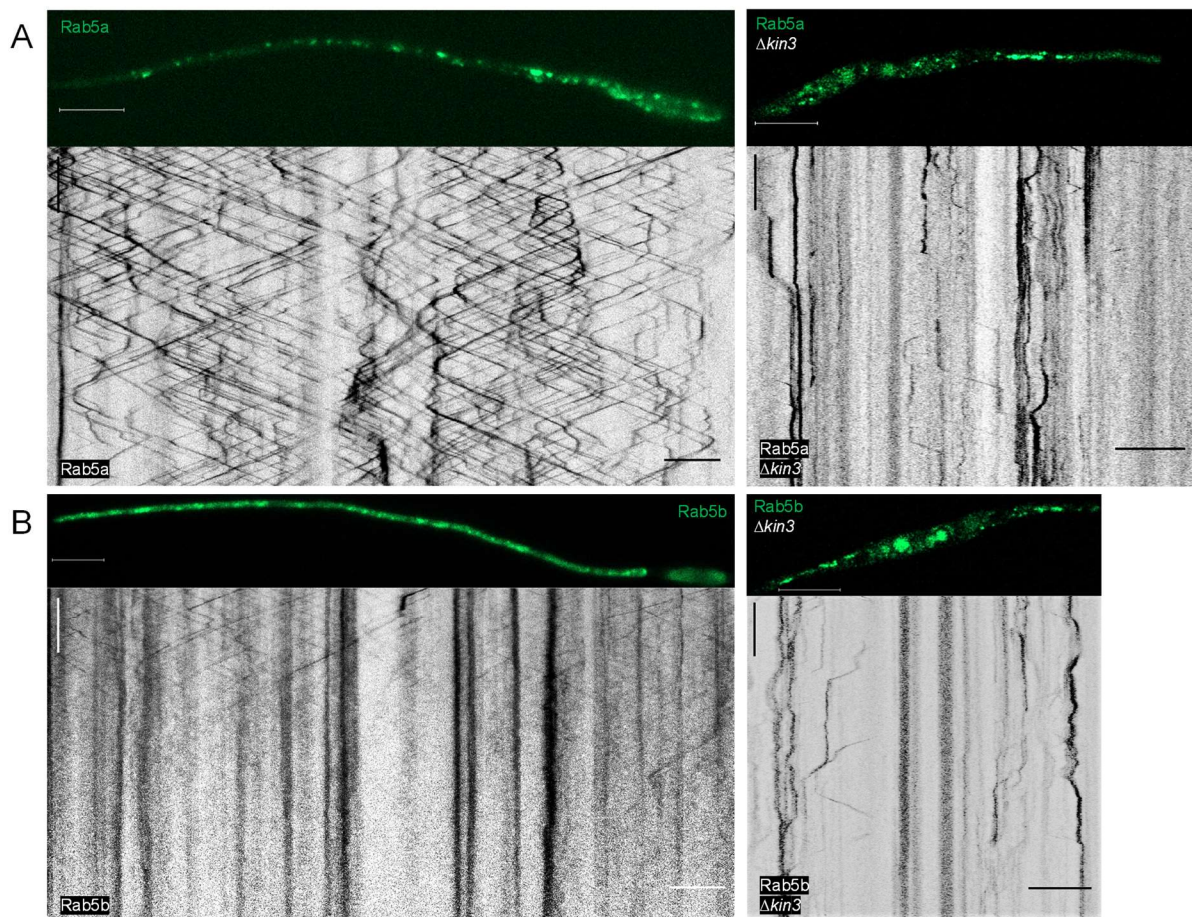
- Wennerberg, K., Rossman, K.L., und Der, C.J.** (2005). The Ras superfamily at a glance. *J Cell Sci* **118**, 843-846.
- Wessels, J.G.H.** (1993). Wall growth, protein excretion and morphogenesis in fungi. *New Phytol* **123**, 397-649.
- Wilson, D.B., und Wilson, M.P.** (1992). Identification and subcellular localization of human rab5b, a new member of the ras-related superfamily of GTPases. *J Clin Invest* **89**, 996-1005.
- Wu, J., und Akhmanova, A.** (2017). Microtubule-Organizing Centers. *Annu Rev Cell Dev Biol* **33**, 51-75.
- Wucherpfennig, T., Wilsch-Brauninger, M., und Gonzalez-Gaitan, M.** (2003). Role of *Drosophila* Rab5 during endosomal trafficking at the synapse and evoked neurotransmitter release. *J Cell Biol* **161**, 609-624.
- Wurmser, A.E., Sato, T.K., und Emr, S.D.** (2000). New component of the vacuolar class C-Vps complex couples nucleotide exchange on the Ypt7 GTPase to SNARE-dependent docking and fusion. *J Cell Biol* **151**, 551-562.
- Yamashiro, D.J., Tycko, B., Fluss, S.R., und Maxfield, F.R.** (1984). Segregation of transferrin to a mildly acidic (pH 6.5) para-Golgi compartment in the recycling pathway. *Cell* **37**, 789-800.
- Yang, M., Chen, T., Han, C., Li, N., Wan, T., und Cao, X.** (2004). Rab7b, a novel lysosome-associated small GTPase, is involved in monocytic differentiation of human acute promyelocytic leukemia cells. *Biochem Biophys Res Commun* **318**, 792-799.
- Yang, Y., Xiang, Y., und Xu, M.** (2015). From red to green: the propidium iodide-permeable membrane of *Shewanella decolorationis* S12 is repairable. *Sci Rep* **5**, 18583.
- Yang, Y., OuYang, Q., Li, L., Shao, X., Che, J., und Tao, N.** (2019). Inhibitory effects of glutaraldehyde on *Geotrichum citri-aurantii* and its possible mechanism. *J Appl Microbiol* **127**, 1148-1156.
- Yoon, Y.J., Wu, B., Buxbaum, A.R., Das, S., Tsai, A., English, B.P., Grimm, J.B., Lavis, L.D., und Singer, R.H.** (2016). Glutamate-induced RNA localization and translation in neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* **113**, E6877-E6886.
- Yu, F., Sun, L., und Machaca, K.** (2009). Orai1 internalization and STIM1 clustering inhibition modulate SOCE inactivation during meiosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 17401-17406.
- Yu, J., Ding, C., Guan, S., und Wang, C.** (2019). Association of single nucleotide polymorphisms in the RAB5B gene 3'UTR region with polycystic ovary syndrome in Chinese Han women. *Biosci Rep* **39**.
- Yuan, H., Davis, S., Ferro-Novick, S., und Novick, P.** (2017). Rewiring a Rab regulatory network reveals a possible inhibitory role for the vesicle tether, Uso1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **114**, E8637-E8645.
- Yuan, W., und Song, C.** (2020). The Emerging Role of Rab5 in Membrane Receptor Trafficking and Signaling Pathways. *Biochem Res Int* **2020**, 4186308.
- Zander, S., Baumann, S., Weidtkamp-Peters, S., und Feldbrügge, M.** (2016). Endosomal assembly and transport of heteromeric septin complexes promote septin cytoskeleton formation. *J Cell Sci* **129**, 2778-2792.

- Zekert, N., Veith, D., und Fischer, R.** (2010). Interaction of the *Aspergillus nidulans* microtubule-organizing center (MTOC) component ApsB with gamma-tubulin and evidence for a role of a subclass of peroxisomes in the formation of septal MTOCs. *Eukaryot Cell* **9**, 795-805.
- Zerial, M., und McBride, H.** (2001). Rab proteins as membrane organizers. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**, 107-117.
- Zhang, C., de la Torre, A., Perez-Martin, J., und Arino, J.** (2019). Protein Phosphatase Ppz1 Is Not Regulated by a Hal3-Like Protein in Plant Pathogen *Ustilago maydis*. *Int J Mol Sci* **20**.
- Zhang, H., und Zhu, A.** (2020). Emerging Invasive Fungal Infections: Clinical Features and Controversies in Diagnosis and Treatment Processes. *Infect Drug Resist* **13**, 607-615.
- Zhang, J., Zhuang, L., Lee, Y., Abenza, J.F., Penalva, M.A., und Xiang, X.** (2010). The microtubule plus-end localization of *Aspergillus* dynein is important for dynein-early-endosome interaction but not for dynein ATPase activation. *J Cell Sci* **123**, 3596-3604.
- Zhen, Y., und Stenmark, H.** (2015). Cellular functions of Rab GTPases at a glance. *J Cell Sci* **128**, 3171-3176.
- Zlatic, S.A., Tornieri, K., L'Hernault, S.W., und Faundez, V.** (2011). Clathrin-dependent mechanisms modulate the subcellular distribution of class C Vps/HOPS tether subunits in polarized and nonpolarized cells. *Mol Biol Cell* **22**, 1699-1715.
- Zuker, M.** (2003). Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic acids research* **31**, 3406-3415.
- Zuker, M., und Jacobson, A.B.** (1998). Using reliability information to annotate RNA secondary structures. *Rna* **4**, 669-679.

## **7. Appendix**

### **7.1. Die Motilität von Rab5a- und Rab5b-positiven Endosomen ist von Kin3 abhängig**

Um die Populationen der frühen Endosomen in *U. maydis* zu charakterisieren, erfolgte auch die Analyse des für den Transport der frühen Endosomen zum Plusende der Mikrotubuli zuständigen Motorproteins Kin3 (Wedlich-Söldner *et al.*, 2002, Lenz *et al.*, 2006). Die Funktion von Kin3 für den Transport der frühen Endosomen wurde unter Verwendung des lipophilen Markers FM4-64 gezeigt. Dabei wurde beschrieben, dass die Endosomen nach einer Deletion von *kin3* am Minusende der Mikrotubuli akkumulieren und keine typischen endosomalen, bidirektionalen Bewegungsmuster mehr zeigen. Verbleibende Motilität wurde auf De-/Assemblierungsprozesse der Mikrotubuli oder auf Transportprozesse zum Minusende der Mikrotubuli zurückgeführt, da diese durch ein separates Motorprotein erfolgen (Wedlich-Söldner *et al.*, 2002, Lenz *et al.*, 2006). Es wurde untersucht, ob sowohl die Population an frühen Endosomen, welche Rab5a-Proteine in die Membran integriert haben, als auch die mit Rab5b, durch Kin3 transportiert wird. Dazu wurde im Wildtyphintergrund (UKS91: AB31 *gfp:rab5a*) und einem  $\Delta kin3$ -Hintergrund die Motilität und Lokalisierung von Rab5a verglichen (UKS191: AB31 *gfp:rab5a*,  $\Delta kin3$ ). Analog wurde mit Rab5b im Wildtyphintergrund (URS1: AB31 *gfp:rab5b*) und im  $\Delta kin3$ -Hintergrund (UKS315: AB31 *gfp:rab5b*,  $\Delta kin3$ ) verfahren. Wie in Abb. 91 gezeigt, führte die Deletion von *kin3* zu Akkumulationen beider Rab5-GTPasen. Gleichzeitig wurde eine deutliche Reduktion der Motilität von Rab5a- und Rab5b-markierten Endosomen beobachtet. Die Signale der Rab5-GTPasen waren im *kin3*-Deletionshintergrund überwiegend statisch und zeigten lediglich eine geringe Anzahl an Bewegungsmustern über Strecken von geringer Distanz (nicht quantifiziert). Die verbleibende Motilität ist vergleichbar mit den Analysen der  $\Delta kin3$ -Mutante von (Wedlich-Söldner *et al.*, 2002) und ist damit vermutlich ebenfalls auf die Mikrotubuli-Dynamik oder Dynein-vermittelte Transportprozesse in Richtung Minusenden der Mikrotubuli zurückzuführen.



**Abb. 91: Kin3 ist in Transportprozesse von Rab5a- und Rab5b-positiven Endosomen involviert**

**A)** Die Motilität und Lokalisierung von Rab5a wurde im Wildtyphintergrund und einem  $\Delta kin3$ -Hintergrund verglichen. Die Deletion von *kin3* bewirkte eine Reduktion der Motilität und eine gleichzeitige Akkumulation der Signale. Die verbleibende Motilität fand lediglich in einer geringen Anzahl an Bewegungsmustern über Strecken von geringer Distanz statt. **B)** Rab5b war im *kin3*-Deletionshintergrund überwiegend statisch mit Ausnahme von einer geringen Anzahl an Bewegungsmustern über kurze Strecken. Die Fluoreszenzaufnahmen und Kymographen der Wildtypstämme mit Rab5a- und Rab5b-Markierung wurden bereits in Abb. 33 als Vergleich herangezogen. Zellbiologische Analyse mit Mikroskop 1. Horizontaler Maßstab: 10  $\mu\text{m}$ , vertikaler Maßstab: 10 sek.

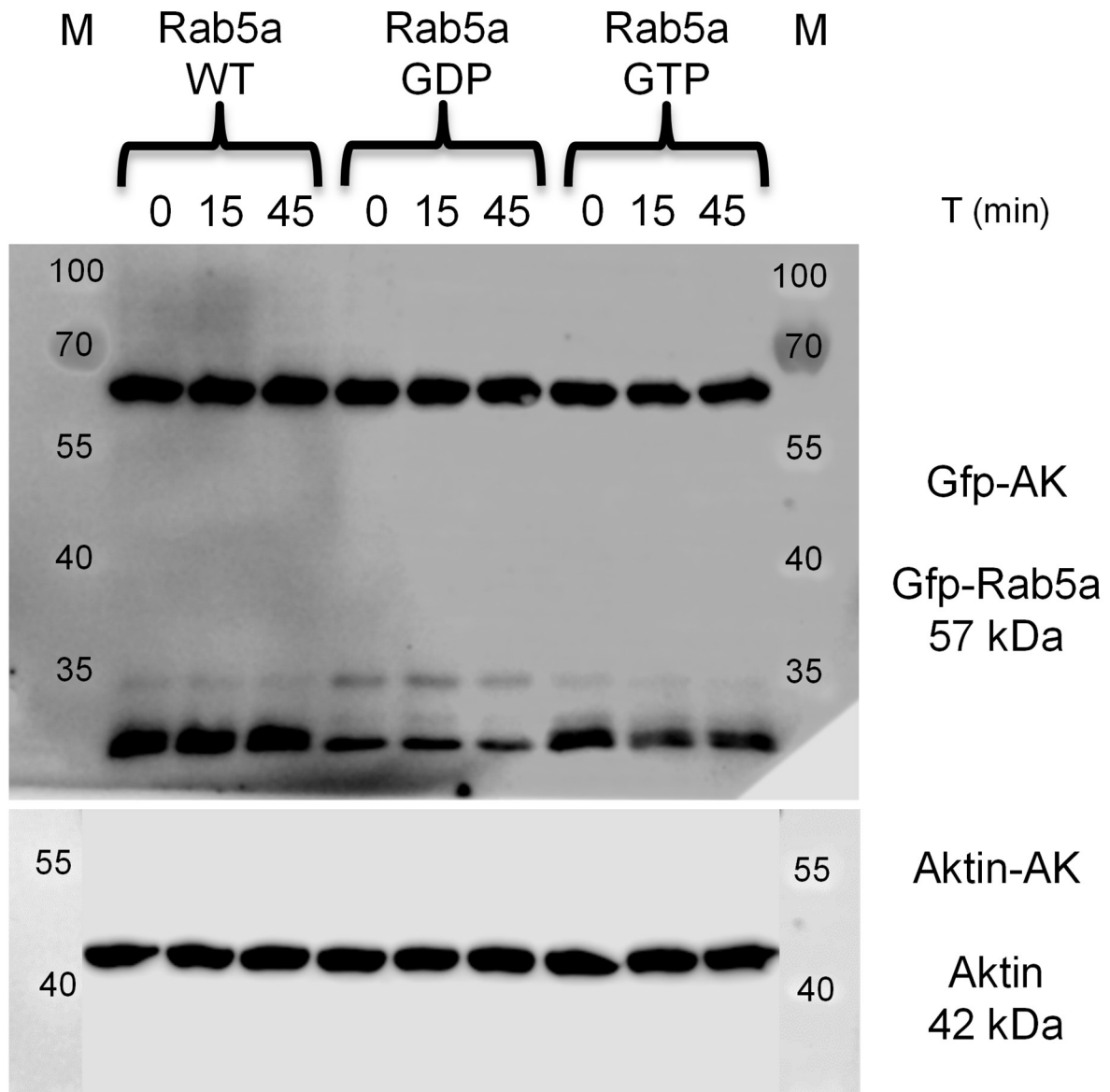
## 7.2. Die konstitutive Inaktivierung oder Aktivierung von Rab5a beeinflussen die Proteinstabilität der GTPase nicht

Die konstitutive Inaktivierung von Rab5a bewirkte eine zytoplasmatische Lokalisierung des Rab5a-Proteins (vgl. Abb. 27). Um auszuschließen, dass das zytoplasmatische Signal nicht auf Instabilität des Proteins durch die eingebrachte Mutation (vgl. Kapitel 3.1.6/3.1.7) zurückzuführen ist, wurden Proteinextrakte von Rab5a-WT (UKS91: AB31 *gfp:rab5a*), der Rab5a-GDP-Mutante (UJKI5: AB31 *gfp:rab5a<sup>S45N</sup>*) und der Rab5a-GTP-Mutante (UJKI8: AB31 *gfp:rab5a<sup>Q90L</sup>*) verglichen. Um die Proteinstabilität beurteilen zu können, wurden die Zellen mit Cycloheximid behandelt.

## Appendix

Durch die Behandlung wird die ribosomale Proteinbiosynthese gehemmt, wodurch über eine Zeitkurve die Proteindegradierung beobachtet werden kann (vgl. Buchanan *et al.*, 2016). Es wurde von jedem Stamm eine Probe aus einer exponentiell wachsenden Sporidien-Kultur zum Startzeitpunkt des Experimentes entnommen ( $T_0$ ) und jeweils eine nach 15 Min ( $T_{15}$ ) und 45 Min ( $T_{45}$ ) Inkubation. Die Analyse der Proben erfolgte über SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Western Blot (Abb. 92). Dabei war sowohl für die Wildtypform von Rab5a als auch für Rab5a-GDP und Rab5a-GTP eine von der Cycloheximidbehandlung unbeeinträchtigte Proteinmenge zu beobachten. Die Proteinabundanz war in den untersuchten Stämmen zu allen gemessenen Zeitpunkten nach visueller Beurteilung des detektierten Signals im Western Blot vergleichbar (nicht quantifiziert).



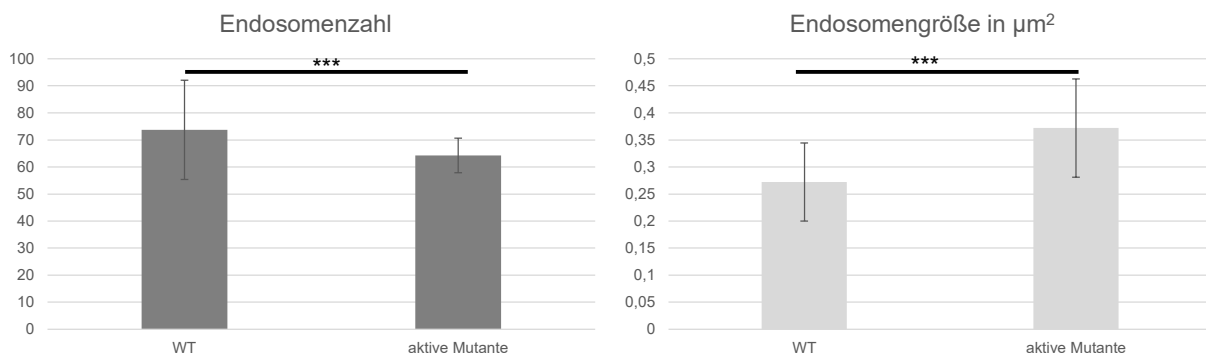


**Abb. 92: Die konstitutiv (in-) aktive Mutante von Rab5a ist nicht in der Proteinstabilität beeinflusst**

Isolation von Proteinextrakten aus Rab5a-WT, der Rab5a-GDP-Mutante (UJKI5: AB31 *gfp:rab5a<sup>S45N</sup>*) und der Rab5a-GTP-Mutante (UJKI8: AB31 *gfp:rab5a<sup>Q90L</sup>*). Behandlung mit Cycloheximid um die ribosomale Proteinbiosynthese zu hemmen und die Proteindegradierung darzustellen (vgl. Buchanan *et al.*, 2016). Entnahme aus exponentiell wachsenden Sporidien-Kulturen zum Startzeitpunkt des Experimentes ( $T_0$ ) und jeweils nach 15 Min ( $T_{15}$ ) und 45 Min ( $T_{45}$ ) Inkubation mit Cycloheximid. Die Analyse der Proben erfolgte über SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Western Blot. Die Proteinmenge war für die Wildtypform von Rab5a als auch für Rab5a-GDP und Rab5a-GTP von der Cycloheximidbehandlung unbeeinträchtigt. Die Proteinabundanz war in den untersuchten Stämmen zu allen gemessenen Zeitpunkten nach visueller Beurteilung des detektierten Signals im Western Blot vergleichbar (nicht quantifiziert).

### 7.3. Die konstitutive Aktivierung von Rab5a stimuliert die Endosomenfusion

Aufbauend auf die Beobachtung, dass eine Überexpression von Rab5a durch die verstärkte Integration der Rab5-GTPase in die Endosomenmembranen die Effizienz von Fusionen erhöht (vgl. Abb. 14), wurde auch der Einfluss der Rab5a-GTP-Mutante analysiert. Da sich bei einer über den GTPase-Zyklus regulierten Rab-GTPase ein Teil der Proteine für gewöhnlich in der inaktiven Form im Zytoplasma befindet (Burton *et al.*, 1993), ist davon auszugehen, dass auch die konstitutive Aktivierung von Rab5a dessen Präsenz in den Membranen erhöht. Es erfolgte die Quantifizierung der Rab5a-WT-positiven (UKS91/UKS92/UKS93: AB31 *gfp:rab5a*) oder Rab5a-GTP-positiven (UKS321: AB31 *gfp:rab5a<sup>Q90L</sup>*, *mCherry:rab5b*; UKS345: AB31 *gfp:rab5a<sup>Q90L</sup>*, *vps3:mKate2*) Endosomen pro Zelle und eine Bestimmung der durchschnittlichen Endosomengröße in  $\mu\text{m}^2$ . Durch die konstitutive Aktivierung von Rab5a konnte im Vergleich mit dem Wildtyphintergrund eine signifikante Verringerung der Anzahl an frühen Endosomen (p-Wert: 0,000884), verbunden mit einer signifikanten Größenzunahme (p-Wert:  $1,56 \cdot 10^{-8}$ , N=50) bestimmt werden (Abb. 93). Dies spiegelt die beobachtete Tendenz der Überexpression wider (vgl. Abb. 14), wobei durch das erhöhte Expressionslevel von *rab5a* eine stärkere Reduktion der Endosomenquantität als in der Rab5a-GTP-Mutante erzielt wurde.



#### **Abb. 93: Die konstitutive Aktivierung von Rab5a stimuliert die Fusion der frühen Endosomen**

Quantifizierung der Rab5a-WT-positiven oder Rab5a-GTP-positiven (aktive Mutante) Endosomen pro Zelle (links) und Bestimmung der durchschnittlichen Endosomengröße in  $\mu\text{m}^2$  (rechts). Die konstitutive Aktivierung von Rab5a bewirkte eine signifikante Verringerung der Anzahl an frühen Endosomen, verbunden mit einer signifikanten Größenzunahme im Vergleich mit dem Wildtyphintergrund. Die Werte für den Wildtyp von Rab5a wurden ebenfalls für den Vergleich in Abb. 47 herangezogen. Signifikanz \* p-Wert<0,05 \*\*p-Wert<0,01 \*\*\*p-Wert<0,001.

#### 7.4. Die in den Datenbanken zur Verfügung stehende Sequenz von Vps8 enthält einen contig-Bruch

Für die zellbiologischen Untersuchungen des Vps8-Proteins wurde die Sequenz aus der NCBI-Datenbank exportiert. Dabei wurde ein Bruch des *contig* in der DNA-Sequenz festgestellt. Aufgrund der Unterbrechung des offenen Leserahmens konnte das Stopcodon des Gens nicht eindeutig zugeordnet werden. Deshalb erfolgte die Sequenzierung der genomischen DNA des *U. maydis* Stammes 521 (Kämper *et al.*, 2006) nach Amplifikation mit Primern stromauf- und stromabwärts der Sequenzunterbrechung. Anhand der erhaltenen Sequenz und dem Abgleich der Sequenzen mit den nah verwandten Pilzen *U. hordei* und *S. reilianum* erfolgte die Ergänzung der genomischen Sequenz und die Identifizierung des offenen Leserahmens von *vps8*. Die vollständige, für sämtliche Vps8-Analysen in dieser Arbeit verwendete Sequenz ist in Abb. 94 dargestellt.

```

ATGGAACACAAAGACTCTGCTGACTTGAATCCTTGGGGTGTGAGCCGTCGTATGCTCAGCGCCTCTCGTCTATCAGGCCGAACAGGATG
CTGACTACCATCAACAGCTGGACGACCTCCTCAATTCGCCCAAAGCATCCCGATTAGCGTTCGCGATGACGCCAGCACCACAAACGGCAC
TTTCTCAACGGTAATCATGTGCACCACCAAGACGACGACAATGACAACGACGACGACTTTGTCTACGATGGTATCGATGCAGCAGCTGCG
CCTTCTGCATGGACGCCGACGATAGCACCGTCTCGAGCGAAATGAGCTCGGATACGTACAGCGCCAAGCTCAAAGACATCCTCGGCAGCG
ATGATGACGACGCCGGTTCGAGACCAACATGCTGATCTCACGATTGAACGGCCTGCTCGCTCCTCGATCACCTCTCCGTCCTCACCGACAAC
TCAGAAGGCACCCGTAATCCTCAAGTTGATGCCGACACAAGTTCCAACACAACACCTCGCCATACAGATCAAGCCCCAGTGACGATAGTTTC
TCCTTCAGATACCCACATCCGCTACCCAACGATGTCAGTCTCGACACCATCTACCTCATCCCAGCGCCACCGAATCCCCTCTCAGC
CGTCATCTTTGCGCATCTTGACGCCAGATCCACTTCTGGCATCGGCTTCTCAGTACGACAGTCTAGCACCATGGCGTCTTTCATCAAC
TCCACAACGCCCATGGCCCTACCCGTCATCTCTCGACTGCGTGCATCCATGGGCCGCGCTACCCGGCTCCTCGTTTCGACTACCCAAACAT
CTTAACGACGTGTCTGGAGCATCTTCAGCCCATCTCCCTGGCACGCCTTCAGTGCCGTCGTCACCACGAAAAGCTCGCTCACCGCTGCCGT
TCGAATTTACCGCAACGGCCTCTCGGCAGCGCTGCCGCTGCCATTTCATCAAGGACGACGATGCAAGTGTTCGCCATCGCAGAGTC
TTCCATTACGACGATCCAGACAAAGTTCTTACTCACTAGTGTAGTGGCTCGATCTTCGGCCAAAACAAGCTCGTCTCGTCTCGTGTCT
TCGTTTCCCTATGGCGGTACATCCAACGGGCCGTTAGTGCCGACAGCACAGAGCGCCACATCGCTCTCAGTGATCTCTGCCTCGTCCCTGT
TGTCCTACTCATCTTAGCACTATCCATCATGATGGTGTTCGCTACCAAGTTTGCATCAAAATAGCGGAGACTTCGACTTCTCTCACAGTCT
CAAAGACAGAGTGTCAAACGAGCGCAACGAATATAGCCGTGACTTTGTCAAGTGGTCAGCATTACGACACATCGTCAACCAATGCAAAGTCTG
AGTCCCGACGCTGCCAATCCTGTACCCACTGTGCTTGTGTGGCCGGCGGTCTCATCGCTGTGCGTACTCGGGTGGTACATCCGATGGTCT
CGGATTTTGGCGAGCACAATAGCTTCTGTGTGGACAGCAGGAGGAAATCATGGCGATCCTGTACCAGCTCTCGCCTTTTCTCTGACCA
TTGCTTCTTGGTGTGCGCCACGCCTCGGGCAACATTTTTCTTACGATCTATCGAGTCCGGGACGTGCCGCTCGTATGATACCCCAAGTA
CCCTTGTCTGTCAAGGCAGGCAAAAAGGAAGGCCATCTATCCGGATCAGCCATCGTGACATTGGCTTCATCGGCCCTCGCCACACTG
CCATCGTACCCGCTGACATTAAGGCCTTGCCTTCTACCATGCCCTCGGCAAAATCCTTGGCGTCAGTCCAATGACACCTCCGTCTACT
TGGCAAGTATCCGCAATACGAGCACGAAGATGAGCTTGGCCTTGGCGACACCAAGAAACGCAACACAATCTTTCAGCTCAGTCCGTTGCCT
CTTGGACCGCGGCCACATTCGGCCGATGAAACAAGCTTCATCGCCATGATTACGCCTACAAAAATGGTGTCTCGTCCGCTTAAGCCTTCTC
CTCGCAGTGGTACCGCAAGGTCAACCGTGCACAGCCGACAGAGAAGCAGGACATAGCTGCACCGGTGAATGAGCAGCCAGTTCAAGAACC
GAGCTGCCTCGCCTGGTATCCAGCCTCAACAGAGACGGATGGCAAGCGCAGGCGACAGACCAATCCGATCCTCGCTTTCGTTTTGGAGCC
ACCTTGCATCTTGTGCGCTTGAAGGTCAAGAGGGTGGATCAGCCACCGGATCCAAGAAACCTCGTTCTACTAATGGTGGCCGAGCCGGAT
CCGGATCCAATGTCTGGGCGAAGAGGTGATCCAGTCAAGTACTGGCGAGAATGGCATCGAAGAGCCTGATCACATTGTGCGCTGCA
ATGGTTACGCCCTGATCTGCTTCTGCTCACCAACTTCAAGCCTTGCCTTCTTACTGTCTGCTGGCAAAGTGACCGAACGATGAGG
GGTGGTAGTGCATCCGCGATTTGGCCAAGACAGTCAAGCAACGCTATTATGATGCTGTTCTGCTCGGCAAGCACTACGATCCACATACAG
AGACACAGGACAATCACACCAACTCAAACGGAACAAATAGAGTCCGTTCTTGGGCCCTTAATCACAGCGTACGCAATTCAAAGGGGCGATG
CTTCTTTTACCGAGTCCGACCTCGTAGTAGTACTTCTCTCTCGGCGAGACCGATTGCTTCTCTACGTTGTCCAAGGCGACTTTTTG
TCTGCCATCGAGCTGGTACTCTCTTCCACCAAGGCAAAATTTGGGTTCCGCTGTCCGCTGCCATCCGATCCCAACGAGCGCACTCTCA
TCGTCGCTGACAAGTTCGCGAGCTCATGTCTGCATCTGCGGAGTATGCTTCTCGCCGGACCGCTCACCGATGCCACGCATGTAACGCC
AGATAACCGGGGCTTGATAGAACCTTGTCTTTCGAGGGTCTCGCTCGCTGTGTGCACGTGCTGTCTCTCACTTGGCAACCTCGACTTT
CTCTTTGACACTTTGTACGACAAGTACGAGGACTATGGTATCGAAGCCATCTTTGTTGGCCAGATGGAGGACTTTATCGTGTGCGGTGAGC
TTGCTCTCTACCCATTCCGCTCGTCCAGAGATTGGTGCCTTCCGTAGAGACAGGCAAGAGTATGCTCAGGCAGAGCGTATCATCTGGCA
TGTGATCCAAAATCGCTCGATTTGGACCAAGCTTTGTCACTGTCTAGACAGGAGGCTTACGACGCTTTGATTTATGTGTTCAATGCT
GCTCTGGAGGATTATGTTTCGCCAATTATTGAGCTGTTGCATCCGTTGAGGCGCGCTATTGGTTCATCGGCGAAGGCATCAGCAGAGCGTTA

```

## Appendix

```
CGGCAATTCATTCAAGCAAGTGACGATCCATATGCCCTCATCCGCGTCACGGAGGCGGCAGATCTGCATCAGCCAGACCCAACCTCAGA
CTGGGAGCTGGAGGAGAAAGATATCGAGGATGCCTACCGAGTCTTTTCGTACCTTTCCGTCCTTCTGACAGGCAACAGATACCCAGTCAA
GAGCCTTTTCAGGAGGACGAACAGGCGAGCAAGGCCAAGAGCTCCATCTATTCTTTGTCTTTCTGGCGGCTGCACGCTGTGGCCTCCAG
GCCCTGGCGGAAAACCTGGTACTCTACGGACTGGACGACGCGCAACCCAGCAATCTTCGGAAGACGGGAAAGACCAAGTTCGACAGCA
CGAACCCGATCTATCCGTATCTTCGATTGCTGCTCGAATTTCGACGCTGAAAGCTTTCCCTCGATGCATCGCCTCGCCTTCGGAAGACGGTTTC
CTGGACGACGAAGACGTGGTAGGGAAGCGCGTCAGCAGGCGAGCTTATTGTTGATGTTTTGCTTGAGCTGAACAATGCGTGCCTCCCGAAA
GACCCGACTTAGCAGGCAACTTGGTGTACGTCGCTCGCAAGATGCGAAATCGCCCAAGATGCCGTTGGCCGCACGCATCTTTGCCACAT
TTTTGTCGCGCGCAATGCGCCCAAGTATCCGCAATTTATCCGCTTTACAGCAGAATGTCGATCTGCTTTTGCCTCGCTCGCTGCCGCCCC
TCTCCAATGAGTAGGGATGCAAAGGAGGATCTGGAGGCGATCGAGTCGACACACAGGACCGAGAATTAGCAGCCGAGTGTCTTCTTTCAC
ACTACAAGCCGCGACTCGACGACGACTGGCTGGACACGTTTCGAGAAAGCCTCATTCCATCGGATCTTGCATCTGTCTTCCGCCAGGAGAA
GAAATGGGATCGGTTGCTGGGATGTACCTTCGACAGCATTTGCAGACAGGCCAGTCTGACCCTGTTGATAGGAACAGCGGAGCTGAAGCC
AACGCCCCAGGTGGTGTATGCCTTTCCCACTTTGAAGAGGTAAGTGTCAACGCGGCGCGCAAAAATACTCCGGAAGGGACGCTGCTTCAGA
CTCGACTGCACGAGCAACTTTCCGATCACATTATCGACCTGCTTGACCTCGATCCGCTCAAGACGACTGGGTTGCTGGACAGATCTTTCC
GGCAAGCATGAGTCGGTGTGCGTCGATTGGAGCAGCTGGATGAAAAGAGGTTATTGCTGTACTTGCCTGCTTTTTCGAGCCGTTACAT
GTCAGCAATGATAGTGCACCTCACGTGCCTTTTCGACAGCCGCTTGACAATGAAGCGGTTTCAACTGGACCGGCATTAGGGCACCAGGCA
CAGCGACGTACATTGTCGATGCAGTTCGAGCCAATCCAGAGCATCTGCCACGCAAAGAGCAAGATGCATATCTTGATCTCTTGTGTCGATA
TGACCCGAAACCGTGGTTCGCAACCTCGATGCCAAGGGTGCCGACTACTTCGACCTTGAGCAGCTTGTGCAGCTGTGTGCAAGTAGGAAG
ACGGCGATCGATGGTAGCAGAGTTCAGTCAACAGCGATGCTGTTCTGTGGGCGCTCGATCGCCTTGACAATCCAACGAAGCCTTCGAAG
AGCTGGACACGGCGTGTGCCAGGACAGCTGATTGCTGGTCTATGTGGCCTCAGCGGACTCGTTCCGTTACCGATGCAGCGGAGACAGTTGC
GGATGAATTGCTAGGGGACGTAAGGAGATGTGTCAACGTCGCTGTGCGGCTGTGTATCGAGCGAGCCAATGCATATGGTGGAGACGAGGAG
ACTGACGAGGAGGACAGTGGTACACGAAAGCGAGGAAAGCGAGCAGCAAGAAAGCGATTGGATACGGACGAAGTGTGGTATCGCCTTTCGAA
GTCTCGTCCGACTGGTTCATGATGTTGCTCATCTCGGTGTCGCCGACAACCATCAGGGTGAACGCTACAACGGGTCTCGCCCTAAGAAGTT
ACTCGATGGCGTTCGTGATATTGTCCAAGACACACTCTCGGACCTCATCTCGTCCACCGCGGCTGAAGCCGTCTCCTTCCCCGACTCTTT
CGCCGACTTACCGGTTCCGACAACGGCAGGACATCTGCAGCCGGCAGTAAGGCGATCAAAGCAGAATCGAAGCTGGTGTAGCTGAGTACT
ACGCCGAGATCCGATCTGTACTGGATGGTATGCTATCCGCTACCACTTACGATCGGAGGTGCTAGCCATCACGAATAAGCTTTTCGATCG
CGATACGTTCCATAGTTTTCCGCGCTTGCACATGCAGCGGAAGCACGGCTGGCGCCTGCAGGGGGCACGAGCACTCGATGCGCCGGGTGT
GACGTAATGTCATCGGACCACGACGAGGTGTTTTCCACCTTCTATCCGTCGCAATTGTACGAAAATGGCACGAACATACTCCCCGGCTCAC
CAGAAGCAGGAAAAGAAGCGGAGACCGAAGATGTGCGAAGGACGGCATTCCAACCTCGCGTAGCACGCTTTTACGCTGTGTGCTGAAAC
ACGTCGACGACGGTGGTGTTCAGCTCGGCTCGATGCTATCGCCTCCGGCATCGCTGTTGACGCCACATCGGCGCCGAGCCAAGTCCGCG
TACGACGAGAAGGCTGCGCCGCTCGCTTACCAGCGTATCGACAAGGGCAAAGGTGTCGTACGGTCCGCTTTCATCTGAATTTTACGCATCA
ACGGCGACCATGCGGTGCTCGGTAAGGGCAAAGCGAATCGTAGACACGCAAGCGAAGGTGGGGAAGGAGAAGTACACGAAGTGGATGGCTA
CTTTGCCAGCGAGTTTACGGATCGTCTTCTGTTGCTACTCAGCGGCCGACTGGACAAAGCAGCGCCGTCATGACGAGGTGCAACAGTGTA
GCAAGTAGTGCTGGTGTTCGCTACGCATCAACGATGCGCTTCCGATGCACAGCAGCACTTGAAGCAACTGAGGAGGATGCAGATGGAA
CGCTGACACAAGAGCACTTTGGACAGGCTGCGAGCGCGGATTACGCGCATTTGAACGACAGCTACGTTGTGCTCGGATGAAATGCAACGCGA
AACGGATGTGGTTCGAGGGCGGGATCGAGGCGGAGAGGATCGTGGTTCAAAGTCAAGGGCGCGTGTACCACCAACGTTGCTGGCAGCGTTG
CATGCTTGA
```

### Abb. 94: Sequenz offener Leserahmen *vps8*

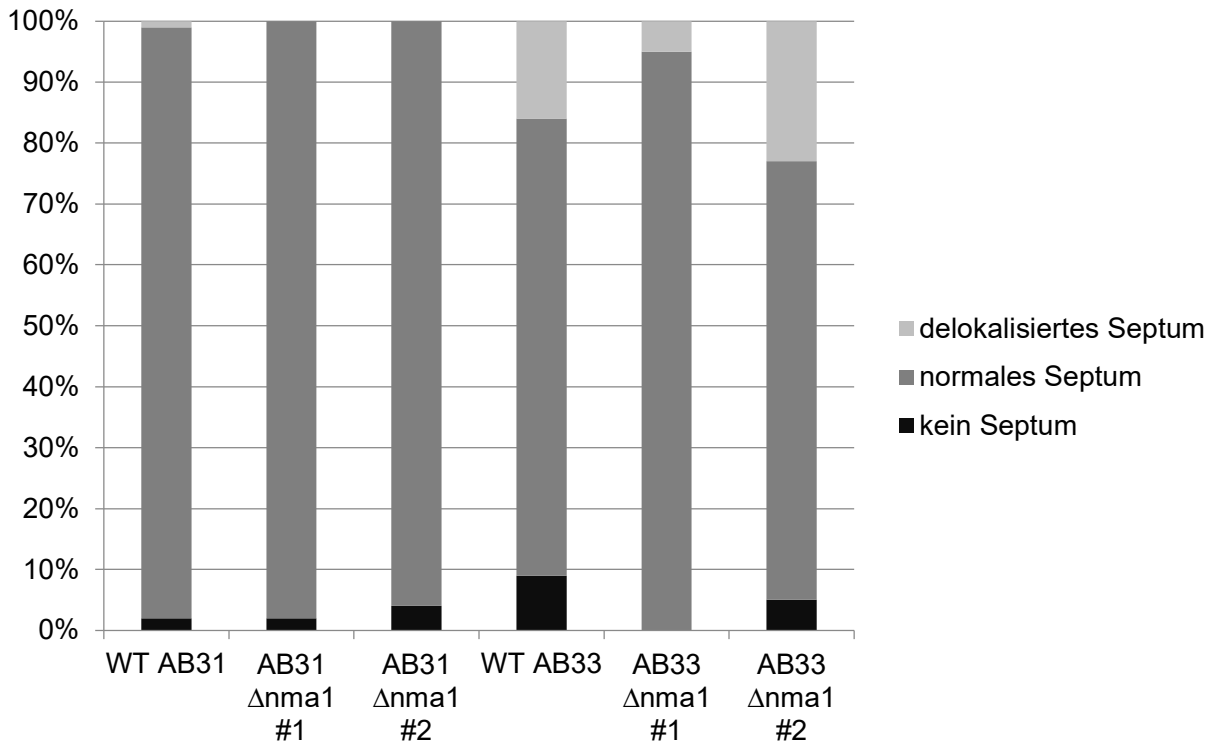
Die Sequenz des offenen Leserahmen von *vps8* aus der NCBI-Datenbank enthielt einen Bruch des *contig* in der DNA-Sequenz. Es erfolgte eine Ergänzung der Sequenz durch die Sequenzierung der genomischen DNA des *U. maydis* Stammes 521 (Kämper *et al.*, 2006) nach Amplifikation mit Primern stromauf- und stromabwärts (Primer 52 und Primer 53; blau hinterlegt) der Sequenzunterbrechung. Der ergänzte Bereich ist gelb hinterlegt.

## 7.5. Die Deletion von *nma1* hat keinen Einfluss auf die Septenbildung in Filamenten

In Vorarbeiten wurde eine fehlerhafte Septierung in Filamenten mit  $\Delta nma1$ -Hintergrund beschrieben (Pinter, 2012). Die Untersuchungen wurden im AB33-Hintergrund durchgeführt. In AB33 können über einen Wechsel der Stickstoffquelle von Ammonium zu Nitrat die unter  $P_{nar1}$  exprimierten *b*-Gene das filamentöse Wachstum induzieren (Banks *et al.*, 1993, Brachmann *et al.*, 2001). Um zu verhindern, dass es zu einer frühzeitigen Induktion des filamentösen Wachstums durch enthaltenes Nitrat im Vollmedium kommt, werden die Stämme mit AB33-Hintergrund in Minimalmedium

kultiviert (Zusammensetzung der Medien siehe Material und Methoden). Durch die Bedingungen des Minimalmediums wurden jedoch auch Effekte auf die Septenbildung unabhängig des genetischen Hintergrundes beobachtet (F. Banuett, pers. Mitteilung). Um einen potenziellen Effekt des verwendeten Mediums zu überprüfen, wurden die Experimente wiederholt und mit Stämmen mit AB31-Hintergrund und Anzucht in Vollmedium verglichen. Dazu wurden jeweils zwei unabhängige Transformanten mit AB33-Hintergrund und *nma1*-Deletion (UAß1/UAß3: AB33 *p<sub>otef</sub>:yup1:gfp*,  $\Delta nma1$ ) mit dem AB33-Wildtyp in Minimalmedium kultiviert und das filamentöse Wachstum induziert. Parallel dazu wurden zwei unabhängige Transformanten mit AB31-Hintergrund und *nma1*-Deletion (UKS34: AB31 *p<sub>otef</sub>:sec4:gfp*,  $\Delta nma1$ /UKS116: AB31  $\Delta nma1$ ) mit dem AB31-Wildtyp in Vollmedium angezogen und induziert. Durch Färbung mit Calcofluor White, welches spezifisch mit Chitin reagiert, können die Zellwand und Septen visualisiert werden (Roncero und Duran, 1985). In *U. maydis* werden nach Filamentinduktion Hyphenzellen ausgebildet. Ab einer gewissen Filamentlänge werden entgegen der Wuchsrichtung im Bereich der Initialzelle leere Kompartimente durch Retraktionssepten abgetrennt, um das Zytoplasma in Wuchsrichtung zu konzentrieren. Reguläre Septenbildung zeichnet sich folglich durch Septen im Bereich der Initialzelle aus. Filamente von geringer Länge haben oft noch kein Septum gebildet. Mit fortschreitender Hyphenlänge werden ständig weitere Septen im hinteren Bereich des Filaments gebildet, um die Extension an der Spitze auszugleichen (vgl. Freitag *et al.*, 2011). Delokalisierte Septen wären im mittleren Bereich der Hyphe oder an der Spitze zu finden. Durch die Quantifizierung von je 100 Filamenten pro untersuchtem Stamm konnte gezeigt werden, dass sowohl der Wildtyp als auch Stämme mit  $\Delta nma1$ -Hintergrund bei Verwendung des AB33-Stammhintergrundes und der damit verbundenen Anzucht in Minimalmedium delokalisierte Septen ausbilden (Abb. 95). Bei Kultivierung von Stämmen mit AB31-Hintergrund in Vollmedium konnte kein Effekt durch die Deletion von *nma1* in Bezug auf fehlerhafte Septierung beobachtet werden. Gleichzeitig führte die Anzucht in Vollmedium nur zu einem vernachlässigbaren Anteil an delokalisierten Septen. Damit ist davon auszugehen, dass der in (Pinter, 2012) beobachtete Effekt der *nma1*-Deletion auf die Verwendung des Minimalmediums zurückzuführen ist.

## Appendix



**Abb. 95: Die Deletion von *nma1* hat keinen Einfluss auf die Bildung von Retraktionssepten für filamentöse Wachstumsprozesse**

Überprüfung eines potenziellen Effektes des verwendeten Mediums (MM/CM) auf die Bildung von Septen (N=100). Dazu wurden zwei unabhängige Transformanten mit AB33-Hintergrund und *nma1*-Deletion mit dem AB33-Wildtyp in Minimalmedium kultiviert und das filamentöse Wachstum induziert. Parallel dazu wurden zwei unabhängige Transformanten mit AB31-Hintergrund und *nma1*-Deletion im Vergleich mit dem AB31-Wildtyp in Vollmedium angezogen und induziert. Durch Färbung mit Calcofluor White, welches spezifisch mit Chitin reagiert, können die Zellwand und Septen visualisiert werden (Roncero und Duran, 1985). Mit zunehmender Filamentlänge werden im Bereich der Initialzelle leere Kompartimente durch Retraktionssepten abgetrennt. Reguläre Septenbildung zeichnet sich folglich durch Septen im Bereich der Initialzelle aus (Kategorie normales Septum, dunkelgrau). Filamente von geringer Länge haben oft noch kein Septum gebildet (Kategorie kein Septum, schwarz) (vgl. Freitag *et al.*, 2011). Delokalisierte Septen wären im mittleren Bereich der Hyphe oder an der Spitze zu finden (Kategorie delokalisiertes Septum, hellgrau). Sowohl der Wildtyp als auch Stämme mit  $\Delta nma1$ -Hintergrund bei Verwendung des AB33-Stammhintergrundes und der damit verbundenen Anzucht in Minimalmedium bildeten delokalisierte Septen aus. Bei Kultivierung von Stämmen mit AB31-Hintergrund in Vollmedium entstanden nahezu keine delokalisierte Septen und damit auch kein Effekt durch die Deletion von *nma1* auf die Septierung.

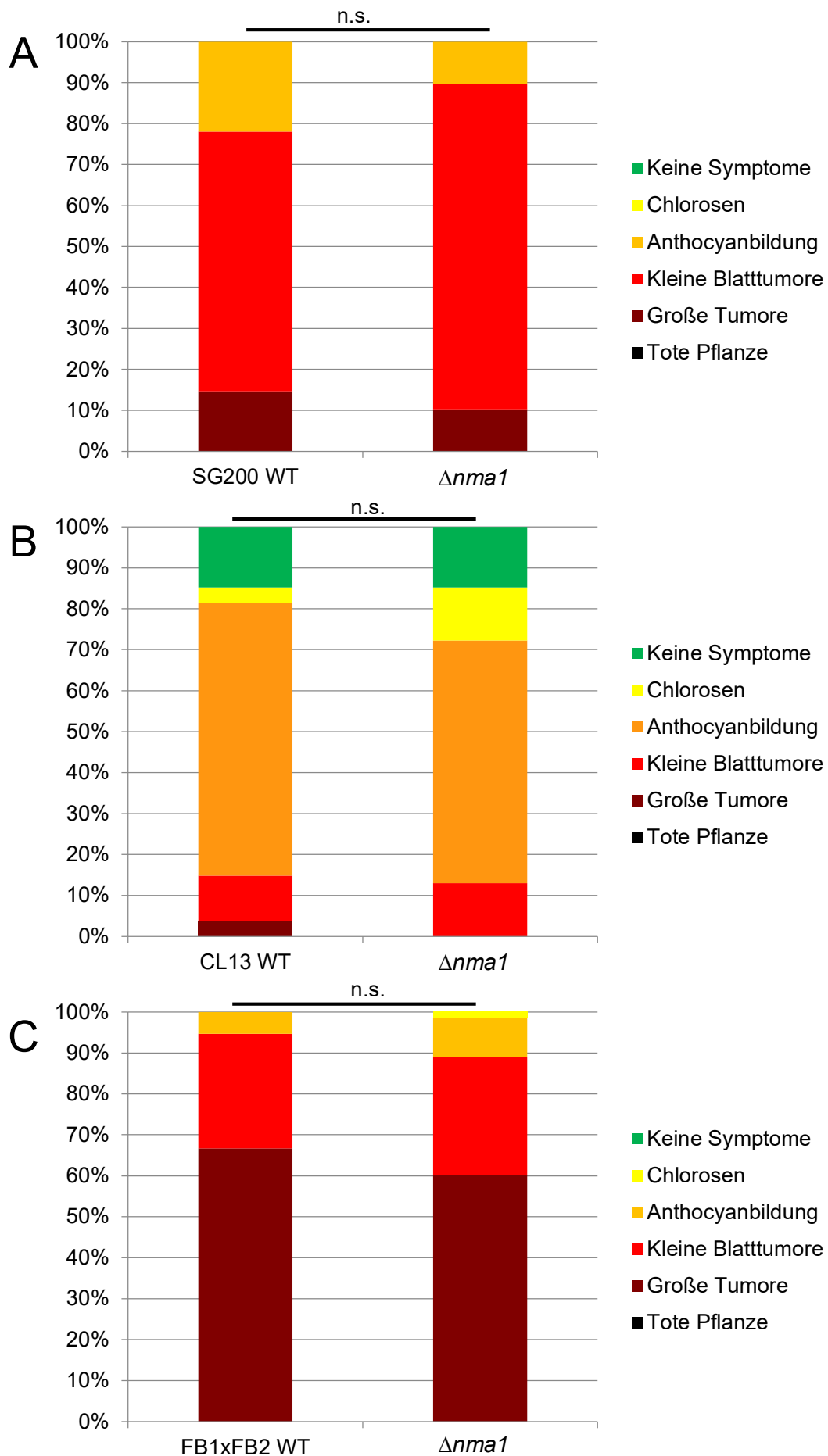
### 7.6. Die Deletion von *nma1* hat keinen Einfluss auf die Pathogenität von *U. maydis*

Auf Grundlage der in Vorarbeiten erzielten Erkenntnisse, bei denen eine reduzierte Pathogenität von *U. maydis* durch die Deletion von *nma1* im solopathogenen SG200-Stammhintergrund (*a1:mfa2, bE1/bW2*) (Bölker *et al.*, 1995a) beobachtet wurde (Pinter, 2012, Schneider, 2016), sollte ein Effekt durch die *nma1*-Deletion auf die Kreuzung von kompatiblen Stämmen und die anschließende Pflanzeninfektion untersucht werden. Maispflanzen der Sorte „Early Golden Bantam“ wurden nach sieben Tagen Wachstum infiziert und die Infektionssymptome nach weiteren sieben Tagen ausgewertet. Die Infektion einer Kreuzung von kompatiblen Wildtypstämmen (FB1xFB2, N=75) wurde mit der *nma1*-Deletion (UKS198: FB1  $\Delta nma1$ ; UKS201: FB2  $\Delta nma1$ , N=73) verglichen (Abb. 96). Dabei konnte kein signifikanter Unterschied in der Pathogenität zwischen dem Wildtyp und dem  $\Delta nma1$ -Hintergrund festgestellt werden (p-Wert 0,725, Mann-Whitney-U-Test). Um zu analysieren, ob der beobachtete Effekt spezifisch für solopathogene Stämme ist, wurde ergänzend der Einfluss der *nma1*-Deletion auf die Infektion des solopathogenen CL13-Stammes (*a1, bW2, bE1*) (Bölker *et al.*, 1995b) untersucht. Es erfolgte ein Vergleich des CL13-Wildtyps (N=54) mit *nma1*-Deletionsstämmen (UKS263 (N=53) /UKS264 (N=54) /UKS265 (N=54): CL13  $\Delta nma1$ ). In Abb. 96 ist eine repräsentative Infektion dargestellt. Von drei unabhängigen Infektionen wurden zwei als nicht signifikant verschieden zum Wildtyp eingestuft (p-Wert 0,319; p-Wert 0,379, Mann-Whitney-U-Test), während bei der dritten Infektion eine minimal reduzierte Pathogenität beobachtet wurde, welche als signifikant bestimmt wurde (p-Wert 0,000182, Mann-Whitney-U-Test). Da diese Studie mit drei unabhängigen Transformanten durchgeführt wurde und die Mehrheit der Infektionen keine signifikante Reduktion der Pathogenität zeigte, in Kombination mit den nur geringfügig reduzierten Symptomen bei einer der drei Infektionen kann von einer irrelevanten Funktion von Nma1 bei der Pflanzeninfektion mit CL13 ausgegangen werden. Das Auftreten der reduzierten Symptome bei einem von drei unabhängigen Transformanten implizieren wahrscheinlicher einen Defekt, welcher durch die Transformation entstanden ist. Um sicherzustellen, dass die in Vorarbeiten beobachtete reduzierte Pathogenität der *nma1*-Deletion im SG200-Hintergrund (Pinter, 2012, Schneider, 2016) nicht ebenfalls auf die Verwendung eines zusätzlich beeinträchtigten Transformanten zurückzuführen ist, wurden neue

## Appendix

*nma1*-Deletionsstämme im SG200-Hintergrund generiert. In der Infektionsstudie wurden der SG200-Wildtyp (N=41) mit *nma1*-Deletionsstämmen verglichen (UKS303 (N=40) /UKS304 (N=40) /UKS305 (N=39): SG200  $\Delta nma1$ ). Wie bereits bei der Studie mit CL13 wurden bei der Infektion mit SG200-Derivaten in zwei der drei unabhängigen Studien keine signifikante Reduktion der Pathogenität beobachtet (p-Wert 0,546; p-Wert 0,529, Mann-Whitney-U-Test), während erneut einer der drei Transformanten minimal reduzierte, jedoch als signifikant eingestufte (p-Wert 0,000765, Mann-Whitney-U-Test), Symptome auslöste (Abb. 96). Die Kombination der Resultate der Infektionen mit CL13- und SG200-Derivaten lassen mutmaßen, dass die Deletion von *nma1* keine Reduktion der Pathogenität bewirkt und beobachtete Effekte auf die Transformation der Stämme zurückzuführen sind. Morphologische Abweichungen der beiden geschädigten Transformanten zu anderen  $\Delta nma1$ -Stämmen konnten nicht festgestellt werden.





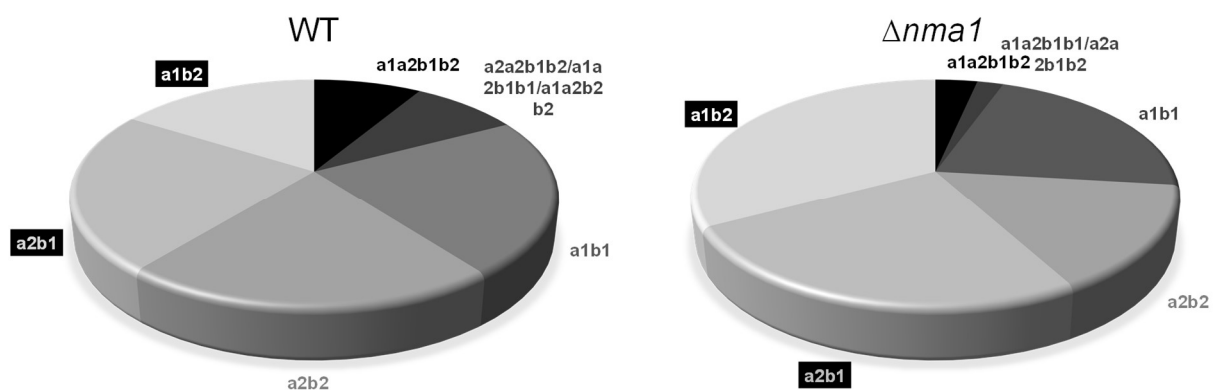
### **Abb. 96: Die Deletion von *nma1* hat keinen Einfluss auf die Pathogenität von *U. maydis***

Maispflanzen der Sorte „Early Golden Bantam“ wurden nach sieben Tagen Wachstum infiziert und die Infektionssymptome nach weiteren sieben Tagen ausgewertet. **A)** In der Infektionsstudie wurde der solopathogene SG200-Wildtyp (*a1:mfa2, bE1/bW2*) mit *nma1*-Deletionsstämmen verglichen. In zwei der drei unabhängigen Studien wurde keine signifikante Reduktion der Pathogenität beobachtet (p-Wert 0,546; p-Wert 0,529), während einer der drei Transformanten eine geringfügig reduzierte, jedoch als signifikant eingestufte (p-Wert 0,000765), Pathogenität zeigte. Darstellung der Infektion eines repräsentativen Transformanten. **B)** Vergleich des CL13-Wildtyps (*a1, bW2, bE1*) mit *nma1*-Deletionsstämmen. Darstellung einer repräsentativen Infektion aus drei unabhängigen Transformanten. Von drei unabhängigen Infektionen wurden zwei als nicht signifikant verschieden zum Wildtyp eingestuft (p-Wert 0,319; p-Wert 0,379), während bei der dritten Infektion eine minimal reduzierte Pathogenität beobachtet wurde, welche als signifikant bestimmt wurde (p-Wert 0,000182). **C)** Die Infektion einer Kreuzung von kompatiblen Wildtypstämmen (FB1xFB2) wurde mit der *nma1*-Deletion verglichen. Dabei konnte kein signifikanter Unterschied in der Pathogenität zwischen dem Wildtyp und dem  $\Delta nma1$ -Hintergrund festgestellt werden. Signifikanz \* p-Wert<0,05 \*\*p-Wert<0,01 \*\*\*p-Wert<0,001.

### 7.7. Die Deletion von *nma1* hat keine Auswirkungen auf die meiotische Aufspaltung

Um eine Funktion von Nma1, während der meiotischen Teilung zu untersuchen, wurde mit  $\Delta nma1$ -Stämmen ein vollständiger Lebenszyklus durchlaufen. Dabei wurden kompatible Stämme, in denen jeweils *nma1* deletiert wurde (UKS198: FB1  $\Delta nma1$  x UKS201: FB2  $\Delta nma1$ ), gekreuzt und sieben Tage alte Maispflanzen infiziert. Parallel dazu wurde eine vergleichbare Infektion mit den Wildtypstämmen FB1 (*a1b1*) und FB2 (*a2b2*) durchgeführt. Drei Wochen nach Infektion wurden Tumore mit melaninhaltigen Sporen geerntet. Während dem Auskeimen der Sporen wird eine meiotische Teilung durchlaufen, um haploide Sporidien zu generieren (Christensen, 1963, Steinberg und Perez-Martin, 2008). Die Zellen der gebildeten Kolonien wurden durch einen Vereinzelungsausstrich separiert und anschließend die Verteilung der Paarungsgenotypen durch Rückkreuzung bestimmt. Neben den beiden Genotypen der Ausgangsstämme *a1b1* und *a2b2* können auch die Kombinationen *a1b2* und *a2b1* entstehen. Die Aufteilung dieser Paarungsgenotypen sollte bei einer unbeeinträchtigt ablaufenden Meiose etwa gleichmäßig sein (Banuett und Herskowitz, 1989). Jedes untersuchte Meioseprodukt wurde zur Bestimmung des Paarungsgenotyps mit den Referenzstämmen FB1 (*a1b1*), FB2 (*a2b2*), FB6A (*a2b1*) und FB6B (*a1b2*) rückgekreuzt. Um kompatible Kreuzungen identifizieren zu können, wurden Platten mit Aktivkohlemedium verwendet. Im Falle einer in den Paarungstyploci kompatiblen Kreuzung fusionieren die Stämme durch die Aktivkohlestimulation und zeigen filamentöses Wachstum. Dies äußert sich durch weiße Myzelbildung auf Aktivkohleplatten. Bei einer genetischen Inkompatibilität werden glatte, dunkle

Kolonien geformt (Banuett und Herskowitz, 1988, Laity *et al.*, 1995). Eine Fusion kommt nur zustande, wenn sich die Stämme sowohl im *a*-Locus, als auch im *b*-Locus unterscheiden (Banuett und Herskowitz, 1994, Banuett, 1995). Durch die Rückkreuzung mit den vier beschriebenen Referenzstämmen kann der Paarungsgenotyp der Teststämmen eindeutig bestimmt werden. In der Wildtypinfektion wurden 32 ausgekeimte Sporen vereinzelt und im Anschluss 174 entstandene Meioseprodukte analysiert. Für die Deletion von *nma1* wurden aus zwei unabhängigen Infektionen je 24 ausgekeimte Sporen vereinzelt und insgesamt 242 aus der Meiose entstandene Sporidienstämme durch Rückkreuzung bestimmt. Wie in Abb. 97 dargestellt, ist die im Wildtyp beobachtete gleichmäßige Aufteilung der Paarungsgenotypen durch die Deletion von *nma1* nicht beeinträchtigt. Es entstand sowohl im Wildtyp als auch im  $\Delta nma1$ -Hintergrund ein geringer Anteil an Stämmen mit *a1a2b1b2*-Genotyp (Myzelbildung mit allen vier Referenzstämmen) oder verschiedene Kombinationen von homozygoten Ausprägungen eines Paarungstyplocus in Kombination mit einer heterozygoten Ausprägung des anderen (Myzelbildung mit zwei der vier Referenzstämmen).

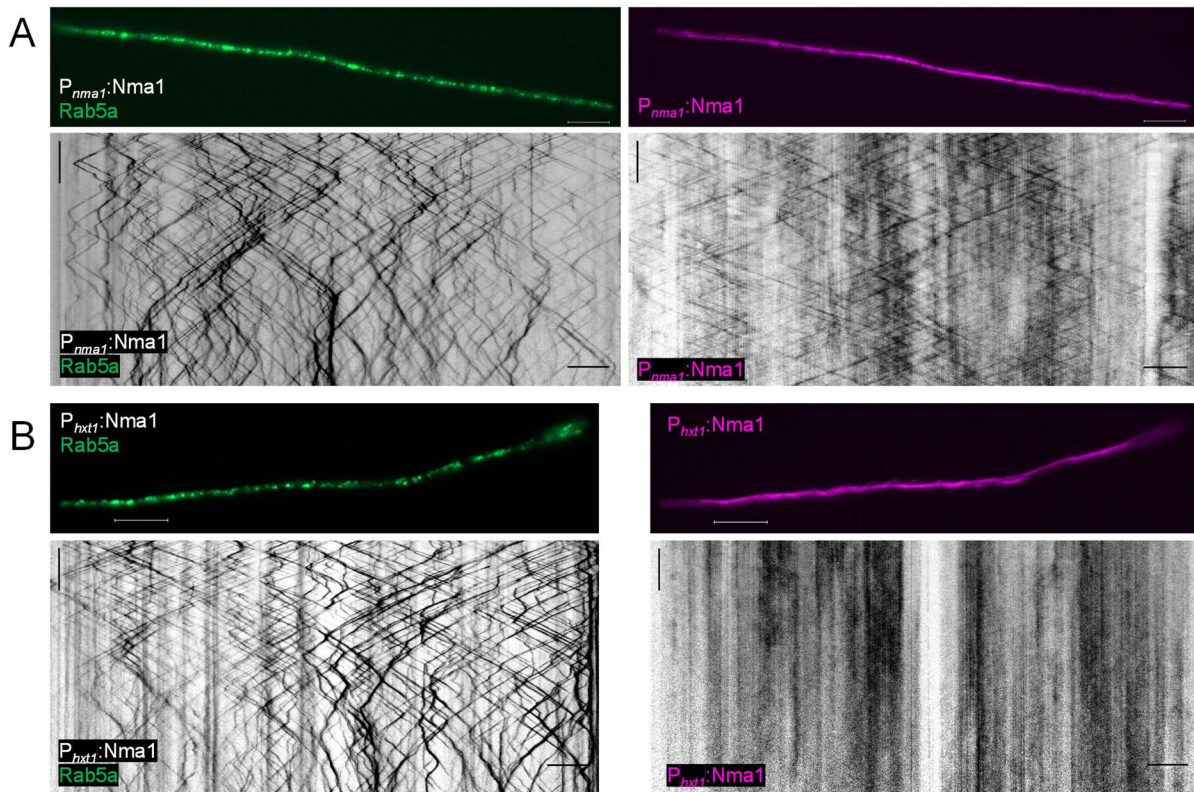


**Abb. 97: Die Deletion von *nma1* hat keinen Einfluss auf die Meiose von *U. maydis***

Kreuzung von kompatiblen Stämmen mit *nma1*-Deletion und Infektion von sieben Tage alten Maispflanzen. Parallel dazu durchgeführte Infektion mit den Wildtypstämmen FB1 (*a1b1*) und FB2 (*a2b2*). Ernte der Sporen drei Wochen nach Infektion, Auskeimung und Bestimmung der Verteilung der Paarungsgenotypen durch Rückkreuzung mit den Referenzstämmen FB1 (*a1b1*), FB2 (*a2b2*), FB6A (*a2b1*) und FB6B (*a1b2*) mit anschließender Analyse der Filamentbildung auf Aktivkohlemedium. In der Wildtypinfektion wurden 174 und für die *nma1*-Deletionsstämmen 242 entstandene Meioseprodukte analysiert. Die im Wildtyp (links) beobachtete gleichmäßige Aufteilung der Paarungsgenotypen wurde durch die Deletion von *nma1* (rechts) nicht beeinträchtigt. Es entstand sowohl im Wildtyp als auch im  $\Delta nma1$ -Hintergrund ein geringer Anteil an Stämmen mit *a1a2b1b2*-Genotyp (kompatibel mit allen vier Referenzstämmen) oder verschiedene Kombinationen von homozygoten Ausprägungen eines Paarungstyplocus in Kombination mit einer heterozygoten Ausprägung des anderen (kompatibel mit zwei der vier Referenzstämmen). Die Daten für den Wildtyp wurden aufgrund einer parallelen Durchführung aller drei Experimente auch für den Vergleich in Abb. 75 herangezogen.

### 7.8. Eine Überexpression von *nma1* beeinträchtigt die Motilität des Nma1-Proteins

Die Einflüsse des Nma1-Proteins auf die Quantität der frühen Endosomen wurde durch Deletionen und Überexpressionen des *nma1*-Gens untersucht (vgl. Abb. 47). Dabei wurde beobachtet, dass die Expression von *nma1* unter dem starken konstitutiven  $P_{hxt1}$  keinen gegensätzlichen Effekt zur Deletion von *nma1* hervorruft, sondern wie bereits im  $\Delta nma1$ -Hintergrund beobachtet, die Quantität der frühen Endosomen reduzierte. Die Transformation des  $P_{hxt1}$ -Konstruktes erfolgte jeweils in Stämme, die zusätzlich das native *nma1*-Gen enthielten. Die korrekte Fusion der *nma1*-Sequenz an den Fluoreszenzmarker wurde durch Sequenzierung und Southern Blot Analyse verifiziert. Dennoch konnten zellbiologische Veränderungen in der Motilität des  $P_{hxt1}$ :Nma1-Proteins (Einfachintegration: UKS541/UKS542/UKS543: AB31 *gfp:rab5a*,  $P_{hxt1}:nma1$ , Mehrfachintegration: UKS497/UKS544/UKS545: AB31 *gfp:rab5a*, ( $P_{hxt1}:nma1$ )-*n*) beobachtet werden (Abb. 98). Während die Lokalisierung entlang der Mikrotubulifilamente unbeeinträchtigt war, konnte im Vergleich mit dem Wildtyphintergrund (UKS176: AB31 *gfp:rab5a*, *nma1:3xmCherry*) ein Erliegen der  $P_{hxt1}$ :Nma1-Motilität beobachtet werden. Die Rab5a-positiven frühen Endosomen, welche üblicherweise für den Transport von Nma1 zuständig sind (vgl. Abb. 57), waren durch die starke Expression von *nma1* in ihrer Motilität unbeeinträchtigt. Da vermutet wird, dass Nma1 während der Lokalisierung auf den frühen Endosomen seine Funktion erfüllt, die Fusion der frühen Endosomen zu steuern (vgl. Kapitel 4.3.4), wäre eine mögliche Erklärung für den Deletionsphänotyp-ähnlichen durch Überexpression erzielten Phänotyp in Bezug auf die Endosomenzahl (vgl. Abb. 47), dass Nma1 durch die vermehrt gebildeten Proteine nicht mehr auf den Endosomen lokalisieren kann.



**Abb. 98: Eine starke Expression von *nma1* behindert die Motilität des Proteins**

**A)** Im Wildtyphintergrund zeigen Rab5a (links) und Nma1 (rechts) bidirektionale Motilität. Nma1 lokalisiert zusätzlich statisch an den Mikrotubulifilamenten. **B)** Durch die Expressierung von *nma1* unter dem starken konstitutiven *P<sub>hxt1</sub>*, zusätzlich zu der nativen Expression kommt die Motilität von Nma1 (rechts) zum Erliegen. Die Motilität von Rab5a ist währenddessen unbeeinträchtigt (links). Nma1 ist weiterhin mit den Mikrotubulifilamenten assoziiert. Zellbiologische Analyse durch Mikroskop 1. Horizontaler Maßstab: 10  $\mu\text{m}$ , vertikaler Maßstab: 10 sek.

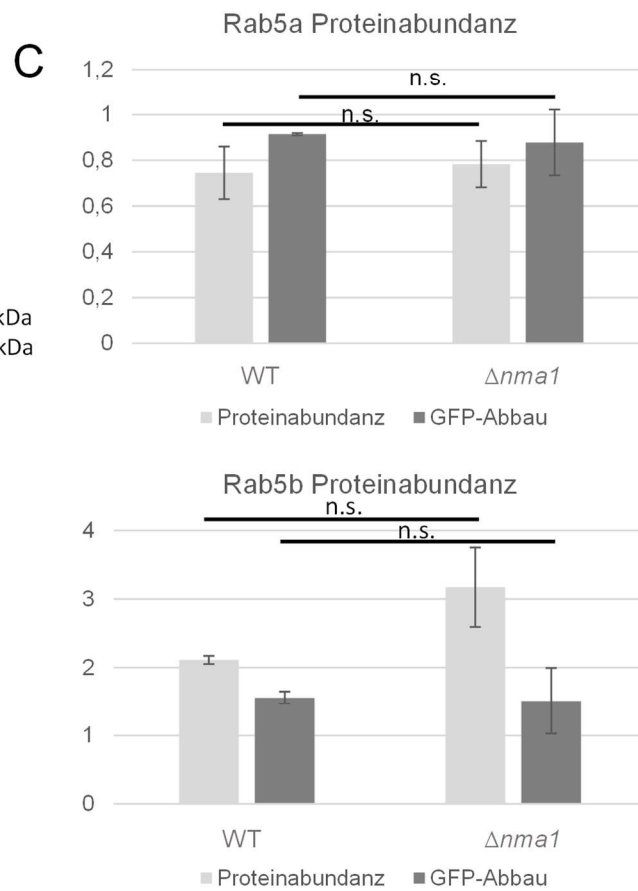
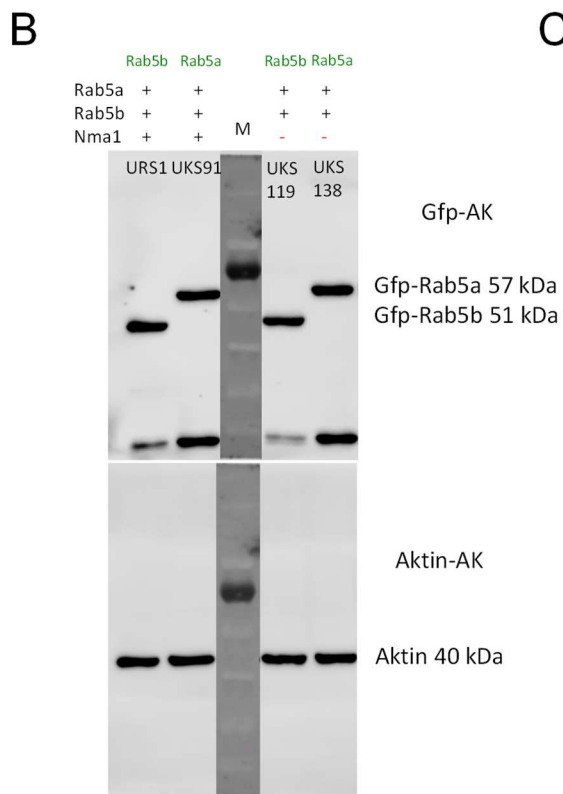
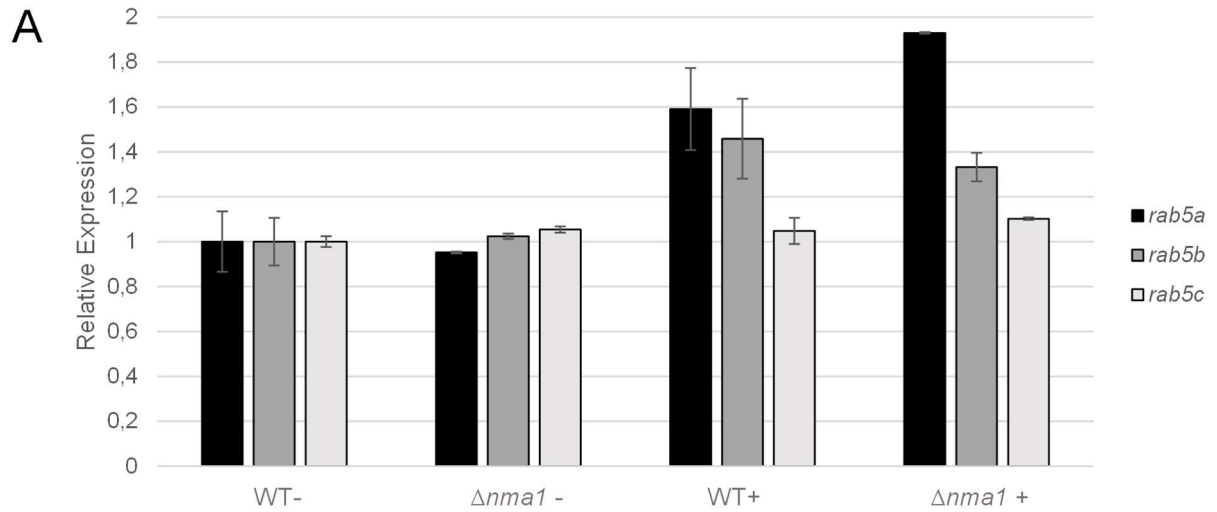
### 7.9. Die Deletion von *nma1* hat keinen Einfluss auf die Expression oder die Proteinabundanz der Rab5-GTPasen

Um auszuschließen, dass die beobachteten Effekte der *nma1*-Deletion auf die Population der frühen Endosomen, welche sich hauptsächlich in Reduktionen der Endosomenzahl manifestierten (vgl. Kapitel 3.3.4), auf eine veränderte Expression oder Proteinmenge zurückzuführen sind, wurden die Expressionslevel von *rab5a*, *rab5b* und *rab5c* im  $\Delta nma1$ -Hintergrund gemessen und die Proteinabundanz bestimmt (Abb. 99). In einer RT-PCR wurde die Expression der verschiedenen *rab5*-Gene im Wildtyphintergrund (AB31) und im  $\Delta nma1$ -Hintergrund (UKS116: AB31  $\Delta nma1$ ) verglichen. Dabei wurden jeweils Sporidien (nicht induziert, -) und Filamente (induziert, +) ausgewertet. Die Induktion der Filamente erfolgte 7 h über den bE/bW-Transkriptionsfaktor, dessen *crg1*-Promotor durch die Zugabe von Arabinose in das Medium angeschaltet wurde. Die Induktion der Stämme wurde durch die

## Appendix

Transkriptmenge von *crg1* in der RT-PCR verifiziert und erfolgte in sämtlichen Stämmen vergleichbar (Daten nicht gezeigt). Es erfolgte eine Normalisierung mit dem Referenzgen *eIF2B* und die Darstellung der relativen Expression, bezogen auf die nicht induzierte Kontrolle (AB31-). Für *rab5a*, *rab5b* und *rab5c* konnte beobachtet werden, dass durch die Filamentinduktion auch die Expression im Vergleich zur nicht induzierten Kontrolle erhöht war. Für keine der untersuchten GTPasen konnte ein verändertes Expressionslevel durch die *nma1*-Deletion bestimmt werden.

Neben der Expression wurde auch die Proteinmenge von Rab5a und Rab5b im Wildtyphintergrund und im  $\Delta nma1$ -Hintergrund bestimmt. In Abb. 95 ist ein repräsentativer von drei durchgeführten Western Blots für die Analyse von jeweils drei unabhängigen Proteinextrakten pro verwendeten Stamm, dargestellt. Neben der visuellen Einschätzung der detektierten Banden auf dem Western Blot erfolgte auch eine Quantifizierung der Signalintensität durch die Software ImageJ. Der Vergleich der Rab5a-Proteinabundanz zeigte keinen signifikanten Unterschied zwischen dem Wildtyphintergrund (UKS91: AB31 *gfp:rab5a*) und der *nma1*-Deletion (UKS138: AB31 *gfp:rab5a*,  $\Delta nma1$ ) (p-Wert 0,69). Dabei wurde durch Verwendung eines GFP-Antikörpers sowohl das GFP-markierte Rab5a detektiert, als auch GFP-Abbauprodukte. Durch die Deletion von *nma1* wurde auch keine Zunahme in der GFP-Abbaubande beobachtet, was auf einen erhöhten Proteinabbau hindeuten könnte. Auch die Proteinmenge von Rab5b war im Wildtyphintergrund (URS1: AB31 *gfp:rab5b*) mit der im  $\Delta nma1$ -Hintergrund (UKS119: AB31 *gfp:rab5b*,  $\Delta nma1$ ) vergleichbar (p-Wert 0,043). Die Deletion von *nma1* hat demzufolge keinen Einfluss auf die Expression oder die Proteinabundanz der Rab5-GTPasen.



### **Abb. 99: Nma1 hat keinen Einfluss auf die Expression oder die Proteinmenge der Rab5-GTPasen**

**A)** RT-PCR zur Bestimmung der Expression der verschiedenen *rab5*-Gene im Wildtyphintergrund (AB31) und im  $\Delta nma1$ -Hintergrund. Für dieses Experiment wurden jeweils Sporidien (nicht induziert, -) und Filamente (induziert, +) analysiert. Die Induktion der Filamente erfolgte 7 h über den bE/bW-Transkriptionsfaktor, dessen *crg1*-Promotor durch die Zugabe von Arabinose in das Medium angeschaltet wurde. Die Induktion der Stämme wurde durch die Transkriptmenge von *crg1* in der RT-PCR verifiziert und war in den verwendeten Stämmen vergleichbar (Daten nicht gezeigt). Die Normalisierung erfolgte mit dem Referenzgen *eIF2B*. Darstellung der relativen Expression, bezogen auf die nicht induzierte Kontrolle (AB31-). Fehlerindikatoren beziehen sich auf technische Duplikate. Die Expression aller untersuchter Rab5-GTPasen war durch die Filamentinduktion im Vergleich zur nicht induzierten Kontrolle erhöht. Weder für *rab5a*, *rab5b* oder *rab5c* konnte ein verändertes Expressionslevel durch die *nma1*-Deletion bestimmt werden. **B)** Bestimmung der Proteinmenge von Rab5a und Rab5b im Wildtyphintergrund und im  $\Delta nma1$ -Hintergrund. Darstellung eines repräsentativen von drei durchgeführten Western Blots für die Analyse von jeweils drei unabhängigen Proteinextrakten pro verwendeten Stamm. Es konnte kein deutlicher Unterschied zwischen den Bandenintensitäten beobachtet werden. **C)** Quantifizierung der Signalintensität durch die Software ImageJ. Ein Vergleich der Rab5a- oder Rab5b-Proteinabundanz zeigte keinen signifikanten Unterschied zwischen dem Wildtyphintergrund und der *nma1*-Deletion. Durch die Deletion von *nma1* wurde auch keine signifikante Zunahme in der GFP-Abbaubande beobachtet, was auf einen erhöhten Proteinabbau hindeuten könnte.

### 7.10. Rohdaten der RT-PCR auf die genomische DNA von $\Delta rab5b^M$ -Stämmen

Basierend auf den beobachteten Unregelmäßigkeiten der Kolonienmorphologie von  $\Delta rab5b^M$ -Stämmen wurde eine Veränderung der Paarungstyploci vermutet, welche innerhalb einer kurzen Zeitspanne auftrat (vgl. Abb. 75). Um dies zu überprüfen wurde die genomische DNA verschiedener  $\Delta rab5b^M$ -Stämme isoliert (UKS436, UKS437 und UKS456) und mittels RT-PCR die Kopienzahl der Paarungstypgene ermittelt. Aus der Meiose der Wildtypsporen wurde UKS514 mitgeführt, welcher sich in Rückkreuzungsexperimenten als *a1a2b1b2* herausgestellt hatte und morphologisch unauffällig war. Für die in Abb. 80, dargestellten Kopienzahlen, machten stark schwankende CT-Werte, welche vermutlich durch Variationen in der Templatmenge entstanden waren, eine Normalisierung notwendig. Um die Ausgangswerte jedoch nachvollziehbar zu machen, sind die CT-Werte in Tabelle 13 dargestellt.



Tabelle 13: CT-Werte der RT-PCR auf die genomische DNA von  $\Delta rab5b^M$ -Stämmen

Stämme/ Gene	FB2 mit <i>mfa1</i> aus FB1	UKS5 14 WT	UKS4 36 t1	UKS4 36 t2	UKS4 36 t3 (1)	UKS4 36 t3 (2)	UKS4 37 t1	UKS4 56 t1	UKS4 56 t2	UKS4 56 t3 (1)	UKS4 56 t3 (2)	UKS4 56 t3 (3)
<i>bE1_bE2</i>	18,826	17,428	18,475	19,755	18,042	17,444	18,707	18,104	19,763	18,206	19,972	17,470
<i>bE2_bW2</i>	17,767	17,345	18,576	20,219	31,299	17,495	18,104	17,492	19,557	16,937	19,484	17,166
UMAG_00467	18,669	17,300	17,957	19,411	18,901	18,991	17,866	17,865	19,755	17,876	19,289	17,111
UMAG_00715	17,691	16,125	17,274	18,525	16,643	15,432	16,661	16,361	18,618	16,837	18,627	16,247
<i>rab5a</i>	18,563	17,492	18,109	19,547	18,686	19,089	18,044	18,146	19,428	17,409	19,222	17,149
UMAG_01374	18,116	16,924	17,556	18,825	18,157	18,550	17,548	16,827	19,032	16,650	18,710	16,374
UMAG_06055	19,345	17,989	18,758	19,885	17,941	17,795	18,831	18,477	20,223	17,618	17,529	17,805
UMAG_06130	18,037	16,736	17,258	18,347	16,761	15,981	17,150	16,983	18,792	16,592	16,290	16,479
UMAG_06158	17,679	16,326	16,900	18,075	16,539	15,704	16,664	16,968	18,641	16,238	15,239	16,142
UMAG_11232	18,186	16,662	16,739	18,939	16,652	16,004	17,429	17,632	19,177	15,252	15,883	15,809
<i>mfa1</i>	18,957	18,329	17,624	19,234	18,120	17,606	18,903	19,451	20,409	16,884	17,311	17,511
<i>mfa2</i>	19,334	18,735	19,343	21,242	19,062	18,988	18,923	21,798	21,397	17,643	18,859	18,746
UMAG_02438	18,723	16,964	17,240	18,790	16,436	16,304	17,273	19,156	18,981	15,246	16,174	16,355
UMAG_10072	18,714	17,090	17,018	18,801	16,391	16,341	17,382	18,996	18,928	15,446	16,537	16,806
UMAG_02238	18,755	17,176	17,181	18,963	16,830	16,725	17,523	19,888	19,096	15,442	16,494	16,884

### 7.11. Digitale Daten

Video- nummer	Zugehörige Abb.	Stamm- bezeichnung	Sporidie / Filament	Beschreibung
1	15	UKS258	F	Colokalisierung der Rab5a-markierten frühen Endosomen (grün) und den Rab7-markierten späten Endosomen (magenta) im Wildtyphintergrund
2	21	UKS273	F	Colokalisierung von Rab5a (grün) und Rab5b (magenta) auf frühen Endosomen im Wildtyphintergrund
3	22	UKS115	F	Lokalisierung und Motilität von Rab5b (grün) im $\Delta rab5a$ -Hintergrund
4	28	UKS321	F	Lokalisierung und Motilität der konstitutiv aktiven Rab5a-Mutante (grün)
5	28	UKS321	F	Lokalisierung und Motilität von Rab5b (magenta) in der konstitutiv aktiven Rab5a-Mutante

## Appendix

6	30	UKS599	F	Colokalisierung und Motilität von Peb1 (grün) und Yup1 (magenta) im $\Delta rab5a$ -Hintergrund
7	29	UGB15	F	Colokalisierung und Motilität von Rab5a (grün) und Yup1 (magenta) im Wildtyphintergrund
8	31	UGB25	F	Colokalisierung und Motilität von Yup1 (magenta) und der konstitutiv inaktiven Rab5a-Mutante (grün)
9	36	UKS236	F	Colokalisierung und Motilität von Vps3 (grün) und Vps8 (magenta) im Wildtyphintergrund
10	40	UKS418	F	Colokalisierung und Motilität von Rab5b (grün) und Vps8 (magenta) im $\Delta vps3$ -Hintergrund
11	41	UKS358	F	Colokalisierung und Motilität von Vps3 (grün) und Vps8 (magenta) im $\Delta rab5a$ -Hintergrund
12	42	UKS548	F	Colokalisierung und Motilität von Vps3 (grün) und Rab5b (magenta) im $\Delta rab5a$ -Hintergrund
13	43	UKS345	F	Colokalisierung und Motilität von Vps3 (magenta) und der konstitutiv aktiven Rab5a-Mutante (grün)
14	47	UKS91	F	Lokalisierung und Motilität von Rab5a (grün) im Wildtyphintergrund
15	47	UKS138	F	Colokalisierung und Motilität von Rab5a (grün) im $\Delta nma1$ -Hintergrund
16	48	UKS372	F	Colokalisierung und Motilität von Rab5a (grün) und Rab7 (magenta) im $\Delta nma1$ -Hintergrund
17	49	UKS365	F	Colokalisierung und Motilität von Rab5a (grün) und Rab5b (magenta) im $\Delta nma1$ -Hintergrund
18	50	UKS375	F	Colokalisierung und Motilität von Vps3 (grün) und Vps8 (magenta) im $\Delta nma1$ -Hintergrund
19	51	UKS221	F	Lokalisierung und Motilität von Vps8 (magenta) im $\Delta nma1$ -Hintergrund
20	55	UKS381	F	Colokalisierung und Motilität von Rab5a (grün) und Nma1 (magenta) im $\Delta vps3$ -Hintergrund
21	57	UKS267	F	Colokalisierung und Motilität von Vps3 (grün) und Nma1 (magenta) im Wildtyphintergrund
22	57	UKS297	F	Colokalisierung und Motilität von Vps3 (grün) und Nma1 (magenta) im $\Delta rab5a$ -Hintergrund

23	60	UKS267	S	Colokalisierung von Vps3 (grün) und Nma1 (magenta) an der Mitosespindel im Wildtyphintergrund
24	61	UKS135	S	Colokalisierung von Rab5a (grün) und Tub1 (magenta) an der Mitosespindel im Wildtyphintergrund
25	61	UKS132	S	Colokalisierung von Rab5a (grün) und Tub2 (magenta) am Spindelpolkörper im Wildtyphintergrund
26	62	UKS480	S	Lokalisierung von Rab5b (grün) und Tub1 (magenta) bei der Mitose im Wildtyphintergrund
27	63	UKS273	S	Colokalisierung von Rab5a (grün) und Rab5b (magenta) an der Zytoplasmabrücke bei der Zytokinese im Wildtyphintergrund
28	64	UKS173	S	Lokalisierung von Rab5a (grün) und Tub1 (magenta) während der Mitose im $\Delta nma1$ -Hintergrund
29	65	UKS381	S	Colokalisierung von Rab5a (grün) und Nma1 (magenta) an der Mitosespindel im $\Delta vps3$ -Hintergrund
30	66	UKS615	S	Colokalisierung von Rab5b (grün) und Tub1 (magenta) an der Mitosespindel im $\Delta nma1$ -Hintergrund
31	68	UTO208	S	Colokalisierung von Nma1 (grün) und Tub1 (magenta) an der Mitosespindel im $\Delta rab5a$ -Hintergrund
32	69	UKS294	S	Colokalisierung von Rab5b (grün) und Nma1 (magenta) an der Mitosespindel im $\Delta rab5a$ -Hintergrund

## Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all den Personen bedanken, ohne die diese Arbeit nicht zustande gekommen wäre.

An erster Stelle gilt mein Dank Prof. Dr. Jörg Kämper. Vielen Dank Jörg, dass ich meine Doktorarbeit in deiner Arbeitsgruppe durchführen konnte und mich dabei in meinem eigenen Zellbio-Thema austoben durfte. Danke für deine Unterstützung und hilfreichen Anmerkungen. Es war eine sehr schöne Zeit, mit einem spannenden und abwechslungsreichen Thema, in dem ich mich frei entfalten und dieses „Telefonbuch“ erstellen konnte. Danke, dass du mir die Teilnahme an mehreren Konferenzen ermöglicht hast und besonders Asilomar war ein Highlight, das unvergessen bleiben wird.

Ein herzlicher Dank geht an dieser Stelle an Prof. Dr. Holger Puchta, der sich freundlicherweise dazu bereit erklärt hat, meine Arbeit als Zweitgutachter zu bewerten.

Vielen Dank an unsere Kooperationspartner der Universität Göttingen für die Unterstützung bei MS-Analysen und Genomsequenzierungen, der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Michael Feldbrügge für die Bereitstellung von Plasmiden und der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Martin Bastmeyer für die Erlaubnis zur Mikroskopnutzung. Ein weiterer Dank geht an Florian Finkernagel für die Unterstützung bei der SNP-Analyse.

Ich möchte mich auch bei den Kolleginnen und Kollegen der AG Requena und der AG Fischer für die schöne gemeinsame Zeit bedanken.

Ein großes Dankeschön an die „alten“ Kämpers: Matteo, Julia, Thes und Jonas. Danke für den hilfreichen Austausch, Rat und Trost und die gute Stimmung im Labor. Danke für geiles Essen (RIP Speck und Käse Labor), Grillen und Feierabendbier. Besonderer Dank ist im Hinblick auf den Umfang dieser Arbeit und euer Durchhalten bei der Korrektur angebracht! Ich kann es nicht oft genug sagen, wie sehr ich eure Hilfe dabei wertschätze. Danke Thes für die geteilte Liebe zu Mitosespindeln und das Laborwissen, welches du während meiner Bachelor- und Masterzeit an mich weitergegeben hast. Danke Matteo für die besondere Expertise bei Datenchaos, der Auswertung des Kreuzungswahnsinns, viele hilfreiche Diskussionen über wichtigere und unwichtigere Themen, In Flames, einer großartigen Zeit in Asilomar und nicht

zuletzt der Verführung zum Kaffee, der mich in der Schreibphase am Leben gehalten hat. Danke Jolle, dass du mich gerade in der Abschlussphase immer motiviert hast, ein offenes Ohr hattest für aufkommende Schwierigkeiten und natürlich Danke für Rugby. Danke auch den „neuen“ Kämpers, Lukas und Julia D. für die enorme Unterstützung in der Abschlussphase im Labor.

Ein riesiger Dank gilt meiner Familie, Motria, Helmut und Philipp für eure uneingeschränkte Unterstützung, tröstende und aufbauende Worte, euer Verständnis und den finanziellen Beistand. Danke, dass ihr an mich geglaubt habt!

Vielen Dank an Kiki für deine langjährige Freundschaft, dass wir es trotz der Entfernung schaffen nie den Kontakt zu verlieren, dass du immer ein offenes Ohr hast und natürlich für das Korrekturlesen. Danke Michelle für jede Menge Spaß, Gossip, gemeinsame Sporteinheiten, unterhaltsame Fahrten an die Uni und deine Korrekturen. Liebe Mona, obwohl wir uns noch nicht so lange kennen, weiß ich die Freundschaft mit dir sehr zu schätzen und bin dankbar für guten Gespräche und deine Ratschläge. Vielen Dank Matze für den letzten Schliff bei meiner Diskussion!

Zuletzt ein großer Dank an André. Deine Unterstützung in unserer Beziehung, während aller Höhen und Tiefen, aber besonders im letzten Jahr bei der Fertigstellung dieser Arbeit, lässt sich kaum in Worte fassen und würde sämtlichen Rahmen hier sprengen. Danke für die Aufmunterung und den Trost, die Essensversorgung, technischen Support und dass du mir bei allen verrückten Ideen den Rücken stärkst.