Charakterisierung der luminalen Kompartimentierung von Peroxisomen und ihrer Rolle bei der Entstehung peroxisomaler Subpopulation

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat)

des
Fachbereichs Biologie
der
Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von
Nils Bäcker
aus Biedenkopf

Marburg an der Lahn, Juni 2025

Die Untersuchungen zur vorliegenden Arbeit wurden von April 2021 bis Mai 2025 in den Arbeitsgruppen von Prof. Dr. Michael Bölker und Dr. Johannes Freitag am Fachbereich Biologie der Philipps-Universität Marburg durchgeführt.

vom Fachbereich Biologie der Philipps-Universität Marburg als Dissertation angenommen am:

Erstgutachter: Dr. Johannes Freitag
Zweitgutachter: Prof. Dr. Michael Bölker

Tag der mündlichen Prüfung:

Teile dieser Arbeit werden/wurden in den folgenden Artikeln veröffentlicht:

Bäcker, N., Ast, J.; Martorana, D., Renicke, C., Berger, J., Mais, CN., Christ, M., Stehlik, T., Heimerl, T., Wernet, V., Taxis, C., Pané-Farré, J., Bölker, M., Klatt, J., Sandrock, B., Schink, KO., Bange, G., and Freitag, J. (2025). **Peroxisomal core structures segregate diverse metabolic pathways**. *Nat Commun* **16**, 1802 (2025). https://doi.org/10.1038/s41467-025-57053-9

Weitere Veröffentlichungen:

Zheng, L., Hartmann, S., Bittner, E., **Bäcker, N.**, Christ, M., Li, W., ... Freitag, J. (in preparation). Trans-aconitic acid as an appetizer for Ustilago maydis upon infection of maize.

Ast, J., **Bäcker, N.**, Bittner, E**.**, Martorana, D., Ahmad, H., Bölker, M., und Freitag, J. (2022). Two Pex5 Proteins with Different Cargo Specificity Are Critical for Peroxisome Function in Ustilago maydis. *Frontiers in cell und developmental biology*, *10*, 858084.

Erklärung

Ich versichere, dass ich meine Dissertation mit dem Titel „Charakterisierung der luminalen Kompartimentierung von Peroxisomen und ihrer Rolle bei der Entstehung peroxisomaler Subpopulation“ selbstständig ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfsmittel bedient habe.
Diese Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

Marburg, den 05.06.2025

Nils Bäcker

Zusammenfassung

Peroxisomen sind hochkonservierte eukaryotische Organellen mit wesentlichen Funktionen beim oxidativen Abbau von Fettsäuren und der Entgiftung von Wasserstoffperoxid. Darüber hinaus haben Peroxisomen diverse andere metabolische Funktionen, die auch hochspezifisch für eine Gruppe von Organismen sein können, z.B. werden Sekundärmetaboliten wie Penicillin in den Peroxisomen mancher Pilze hergestellt. Es ist weitgehend unerforscht, wie in den Peroxisomen diverse sehr unterschiedlich Stoffwechselwege miteinander koexistieren können. Es handelt sich ultrastrukturell um simple von einer einfachen Membran umschlossenen Vesikel. Schon lange weiß man aber, dass manche Enzyme in stabilen Kernstrukturen vorliegen, die resistent gegenüber Detergenzien sind. Zum Beispiel liegt die Urat-Oxidase, für den oxidativen Abbau von Harnsäure verantwortlich, in den Peroxisomen mancher Säugetiere als kristalliner Kern im Lumen der Organellen vor. In dem Brandpilz *Ustilago maydis* war bei der Analyse der Biosynthese von extrazellulären Glykolipiden aufgefallen, dass die zwei peroxisomalen Acyltransferasen Mac1 und Mac3 nicht gleichmäßig über alle Peroxisomen verteilt sind, sondern nur in einer Subpopulation vorliegen. Die genauere Charakterisierung dieses Phänomens war das Ziel dieser Arbeit. Es zeigte sich, dass nach Induktion der Peroxisomen-Proliferation durch Zugabe einer langkettigen Fettsäure (Ölsäure) die ungleichmäßige Lokalisation zunahm. Es können sich demnach unter veränderten Wachstumsbedingungen unterschiedliche Populationen von Peroxisomen bilden. Mit Hilfe von hochauflösender Mikroskopie konnte gezeigt werden, dass Mac1 und Mac3 an der Peripherie der Peroxisomen lokalisieren und stabile Subdomänen bilden, die nicht über das gesamte Lumen verteilt sind. Weitere Analysen führten zur Identifizierung eines kurzen Peptidmotiv mit der Aminosäuresequenz TIIV in Mac3, welches für die Akkumulation von Mac3 in peroxisomalen Subdomänen sowohl notwendig als auch ausreichend ist. Bei den Subdomänen handelte es sich vergleichbar mit der Urat-Oxidase aus Säugern um gegenüber Detergens resistenten Strukturen. Weitere Experimente zeigten, dass auch die Urat-Oxidase (Uox1) aus *U. maydis* ebenfalls in den Kernstrukturen vorliegt in denen auch die Mac Enzyme zu finden sind. Bei der Bildung dieser Strukturen handelt es demnach um ein vermutlich konserviertes Phänomen.

Ferner konnte gezeigt werden, dass die Bildung der Kernstrukturen der metabolischen Kompartimentierung der Peroxisomen dient. Varianten von Mac3 und Uox1, die nicht mehr in den Kernstrukturen lokalisieren können, behindern Wachstum und Metabolismus, wenn die Zellen nur über Ölsäure als Kohlenstoffquelle verfügen. Bisher untersuchte Enzyme die für die β-Oxidation von Fettsäuren verantwortlich sind, akkumulieren nicht in den Kernen. Daraus

ergab sich die folgende Hypothese: Das peroxisomale Lumen ist unterteilt in eine β-Oxidation-Zone und weitere Zonen. In den weiteren Zonen (Kernen) sind Enzyme für speziellere biochemische Aufgaben der Peroxisomen lokalisiert. Tatsächlich, konnte eine Reihe von weiteren peroxisomalen Enzymen in *U. maydis* identifiziert werden, die in Subdomänen lokalisiert sind und auch eher spezielle Funktionen erfüllen. Dazu zählen die D-Aminosäure-Oxidase (Dao1) und ein Enzym mit einer potentiellen Rolle für den Abbau von Xenobiotika. Die in *U. maydis* erarbeiteten Regeln sind vermutlich auch in Säugerzellen gültig. Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die metabolische Vielfältigkeit der Peroxisomen durch die Bildung von Kernstrukturen ermöglicht wird.

Summary

Peroxisomes are highly conserved eukaryotic organelles with essential functions in the oxidative degradation of fatty acids and the detoxification of hydrogen peroxide. Peroxisomes fulfill various other metabolic functions that can be highly specific to a group of organisms; for example, secondary metabolites such as penicillin are produced in the peroxisomes of certain fungi. It is largely unexplored how diverse and very different metabolic pathways can coexist within peroxisomes. They appear as ultrastructurally simple vesicles enclosed by a single membrane. However, it has long been known that some peroxisomal enzymes exist in stable core structures that are even resistant to treatment with detergent. For instance, urate oxidase, which is involved in the oxidative degradation of uric acid, is present as a crystalline core in the lumen of mammalian peroxisomes.

In the smut fungus *Ustilago maydis*, studies on the biosynthesis of extracellular glycolipids revealed that the two peroxisomal acyltransferases, Mac1 and Mac3, are not evenly distributed across all peroxisomes but are found only in a subpopulation. The precise characterization of this phenomenon was the aim of my thesis. After induction of peroxisome proliferation by the addition of a long-chain fatty acid (oleic acid), the irregular localization pattern increased. Using high-resolution microscopy, we could show that Mac1 and Mac3 localize at the periphery of the peroxisomes and form stable subdomains. Further analysis led to the identification of a short peptide motif with the amino acid sequence TIIV in Mac3. Presence of this sequence is necessary and sufficient for the accumulation of Mac3 in peroxisomal subdomains and subpopulations. Purification of organelles demonstrate that these subdomains are detergent-resistant structures similar to urate oxidase from mammals. Interestingly, Urate oxidase (Uox1) from *U. maydis* is also present in detergent-resistant condensates. Hence, the formation of these structures appears to be a conserved phenomenon. Furthermore, we found that the formation of core structures enables metabolic compartmentalization of peroxisomes. Variants of Mac3 and Uox1 that can no longer localize in cores affect cell growth and metabolism when the cells rely solely on oleic acid as a carbon source. Moreover, several enzymes responsible for β-oxidation of fatty acids do not accumulate in cores. This led to the following working model: the peroxisomal lumen is divided into a β-oxidation compartment and other regions. In the other regions (cores), enzymes for more specialized biochemical tasks of the peroxisomes are localized. Indeed, a number of other peroxisomal enzymes in *U. maydis* that are localized in subdomains fulfill more specialized functions. These include D-amino acid oxidase (Dao1) and an enzyme with a potential role in the degradation of xenobiotics. Further investigations

indicated that the rules developed in *U. maydis* are also applicable to mammalian cells. In summary, the research underlying my thesis shows that the metabolic diversity of peroxisomes is supported by the formation of stable core structures.

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
Amp	Ampicillin
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaar
Cbx	Carboxin
C-terminal	carboxyterminal
CoA	Coenzym A
C	eng. *carbon*
Δ	Deletion
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
dYT	eng. *double yeast tryptone*
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
et al.	lat. *et alii*
Gent	Geneticin (G418)
GFP	eng. *green fluorescent protein*
H_2O bid.	zweifach destilliertes Wasser
Hyg	Hygromycin
ip	eng. *iron-sulphur protein*
kb	Kilobasenpaar(e)
kDa	Kilodalton
mCherry	eng. *monomeric cherry*
min	Minuten
MTS	eng. *mitochondrial targeting signal*
R	Resistenz
N-terminal	aminoterminal
OD_{600}	optische Dichte bei 600 nm
ORF	eng. *open reading frame*
p.a.	lat. *pro analysi*
PCR	eng. *polymerase chain reaction*
PM	Plasmamembran
PMP	eng. *peroxisomal membrane protein*
PTS	eng. *peroxisomal targeting signal*
Upm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
s	Sekunden
SC	eng. *Synthetic Complete*

SDS	eng. *sodium dodecyl sulfate*
SIM	eng. *structured illumination microscopy*
Tab.	Tabelle
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
TMD	Transmembrandomäne
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
U	eng. *Unit*
UV	Ultraviolett
WT	Wildtyp
YNB	eng. *yeast nitrogen base*

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung I
Abkürzungsverzeichnis V
Inhaltsverzeichnis VII
1 Einleitung 1
1.1 *Ustilago maydis* als Modellorganismus 1
1.1.1 Der Lebenszyklus *Ustilago maydis* 2
1.2 Peroxisomen 4
1.2 Funktion und Aufbau 4
1.2.2 Import peroxisomaler Matrixproteine 8
1.3 Subpopulationen und Subdomänen in Peroxisomen und anderen Zellorganellen 11
1.3.1 Die Acyltransferase Mac1 und Mac3 aus *U. maydis* lokalisieren ungleichmäßig innerhalb der Peroxisomen 14
1.4 Zielsetzung 15
2 Ergebnisse 16
2.1 Peroxisomale Subpopulationen treten unabhängig von dem verwendeten fluoreszierenden Protein und unter natürlichen Bedingungen auf 16
2.1.2 Die Acyltransferase Mac1 und Mac3 lokalisieren in peroxisomalen Subdomänen innerhalb des peroxisomalen Lumen 18
2.2 Ein kurzes Aminosäuremotiv innerhalb des C-terminus der Acyltransferase Mac3 ist notwendig und ausreichend für die Bildung peroxisomaler Subdomänen 20
2.2.1 Die Bildung peroxisomaler Subpopulationen verläuft unabhängig vom Importweg in die Peroxisomen 21
2.2.2 Die Funktionalität des TIIV Motivs ist nicht auf Peroxisomen beschränkt 22
2.2.3 Die Identität der ersten und der letzten Aminosäure im TIIV Motiv ist für die Bildung der Subpopulationen entscheidend 24
2.2.4 Das TIIV Motiv fördert die Bildung von Aggregaten *in vitro* 25
2.2.5 Mac1 und Mac3 befinden sich in detergenszresistenten Strukturen, die auch das Enzym Urat-Oxidase enthalten 26
2.2.6 Die beiden Acyltransferasen Mac3 und Mac1 lokalisieren unabhängig voneinander in peroxisomale Kernstrukturen 29
2.2.7 Peroxisomale Subpopulationen enstehen nicht durch selektiven Import 29
2.2.8 Die peroxisomale Protease Lon hat keinen Einfluss auf die Bildung peroxisomaler Subdomänen 32
2.2.9 Die Rolle von Autophagie bei der Bildung peroxisomaler Subdomänen 33
2.3 Peroxisomale Kernstrukturen dienen der metabolischen Kompartimentierung 35
2.3.1 Die Bildung peroxisomaler Kernstrukturen ist für die Bildung von Glykolipiden nicht relevant zu sein. 35

2.3.2 Unterschiedliche Acyl-CoA Oxidasen lokalisieren nicht in den peroxisomalen Kernstrukturen 36

2.3.3 Die Expression von Mac3-V_{570}R beeinträchtigt das Wachstum auf Ölsäure 37

2.3.4 Die Expression von Mac3-V_{570}R verringert den Sauerstoffverbrauch in Ölsäure Medium 37

2.3.5 Die Urat-Oxidase Uox1 enthält ein TRIV Motiv, dass wie in TIIV in Mac3 notwendig für die Akkumulation in Kernstrukturen ist 38

2.3.6 Die Bildung peroxisomaler Kernstrukturen ermöglicht effizientes Wachstum auf Ölsäure auch in Gegenwart von Uox1 39

2.3.7 Fehlerhafte Lokalisation peroxisomaler Matrixproteine führt zu einem überfüllten peroxisomalen Lumen und eingeschränkter β-Oxidation 41

2.4 Peroxisomale Proteine mit vielfältiger Funktion sind in Kernstrukturen angereichert. 42

2.5 Prinzipien der Bildung peroxisomaler Kernstrukturen erscheinen evolutionär konserviert 44

2.5.1 Woroninkörper als Extremfall peroxisomaler Subpopulationen 46

3 Diskussion 47

3.1 Das kurze Aminosäuremotiv TIIV ist hinreichend für die Bildung peroxisomaler Subdomänen 47

3.2 Biologische Bedeutung peroxisomaler Subdomänen und Subpopulationen 48

3.2.1 Bedeutung von peroxisomalen Kernstrukturen für einen effizienten Stoffwechsel 48

3.2.2 Degradation peroxisomaler Subdomänen 53

3.3 Ausblick 55

4 Material und Methoden 57

4.1 Mikroorganismen, Materialien und Chemikalien 57

4.1.1 Verwendete Mikroorganismen 57

4.1.2 Vektoren 59

4.1.3 Oligonukleotide (Primer) 62

4.1.4 Labormaterialien und Geräte 65

4.1.5 Kits 65

4.1.6 Chemikalien 65

4.1.7 Enzyme 65

4.1.8 Puffer, Lösungen und Nährmedien 66

4.1.9 Antibiotika 66

4.2 Kultivierung von Mikroorganismen 66

4.2.1 Kultivierung von *E. coli* 66

4.2.2 Kultivierung von *U. maydis* 67

4.2.3 Wachstumstests auf Festmedium 68

4.3 Molekularbiologische Methoden 68

4.3.1 Herstellung und Transformation chemisch kompetenter *E. coli*-Zellen 68
4.3.2 Transformation von *U. maydis* 69
4.3.3 Restriktionsenzymatische Spaltung von DNA 70
4.3.4 Gibson Assembly 71
4.3.5 Bestimmung der DNA-Konzentration 71
4.3.6 DNA-Sequenzierungen 72
4.3.7 Auftrennung von DNA-Fragmenten mittels Agarose-Gelelektrophorese 72
4.3.8 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) 73
4.3.9 Exzision von Agarose-Gel-Fragmenten 74
4.4 Biochemische Methoden 74
4.4.1 Präparation von Proteinen 74
4.4.2 Auftrennung von Proteinen mittels Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese 75
4.4.3 Transfer und Nachweis von Proteinen auf Membranen (Western Blot) 76
4.4.4 Subzelluläre Fraktionierung 77
4.4.5 Aggregationsassays 78
4.4.6 Heterologe Proteinexpression in *E. coli* und Proteinaufreinigung 78
4.4.7 Aktivitätsassays 79
4.4.8 Sauerstoffverbrauchsmessungen 79
4.5 Mikroskopie 80
4.5.1 Epifluoreszenzmikroskopie 80
4.5.2 Structured Illumination Mikroskopie 81
4.5.3 Transmission Elektronen Mikroskopie 81
4.6 Statistische Auswertung 82
6 Anhang 98

1 Einleitung

1.1 *Ustilago maydis* als Modellorganismus

Ustilago maydis ist ein phytopathogener Basidiomycet aus der Gruppe der Brandpilze, der als Modellorganismus zur Erforschung der biotrophen Interaktion mit seiner Wirtspflanze *Zea mays* etabliert ist (Lanver *et al*., 2017). Außerdem wird *U. maydis* bereits seit längerer Zeit als Modell benutzt, um grundlegende molekularbiologische Fragestellungen zu untersuchen. *U. maydis* eignet sich gut für derartige Studien aufgrund seiner Zugänglichkeit für genetische und revers-genetische Manipulationen, seiner kurzen Verdopplungszeit von etwa zwei Stunden und der vollständigen Entschlüsselung seines Genoms (Kämper *et al*, 2006a; Schuster *et al*, 2016; Terfrüchte *et al*, 2014).

Mit Hilfe von *U. maydis* als Modellorganismus konnten zahlreiche bedeutende wissenschaftliche Erkenntnisse gewonnen werden. Beispielsweise gelang es, ein tieferes Verständnis der DNA-Rekombination und DNA-Reparatur zu erlangen (Holliday, 2004). Viele mechanistische Einsichten zu diesen Themen wurden mithilfe von *U. maydis* generiert, z. B. die erstmalige Identifizierung eines Homologes des bakteriellen Rekombinationsproteins RecA in Eukaryoten (Holloman *et al*, 2008). Im Gegensatz zu vielen Ascomyceten codiert das Genom von *U. maydis* ein Homolog von Breast-Cancer2 (BRCA2), dass die Interaktion von RAD51 mit einzelsträngiger DNA koordiniert und eine wichtige Rolle bei der Entstehung von Brustkrebs spielt (Holloman, 2011).

Auch für die Erforschung zellbiologischer Phänomene wird *U. maydis* verwendet. Beispiele hierfür sind der Langstreckentransport entlang von Mikrotubuli, das polare Wachstum und die offene Mitose. Die sind alles Prozesse, die in höheren Eukaryoten z. B. in Säugern vergleichbar mit *U. maydis* ablaufen, während sie in Ascomyceten teilweise sogar fehlen (Steinberg & Perez-Martin, 2008; König *et al*, 2009; Pohlmann *et al*, 2015). *U. maydis* dient ferner als Chassis für biotechnologische Ansätze (Bölker *et al*, 2008; Feldbrügge *et al*, 2013; Geiser *et al*, 2016).

Darüber hinaus stammen wesentliche Erkenntnisse zum Verständnis von nicht kanonischer Proteinbiosynthese aus Arbeiten in *U. maydis* (Freitag *et al*, 2012; Stiebler *et al*, 2014; Kremp *et al*, 2020). Es konnte gezeigt werden, dass sowohl die nicht kanonische Translationsinitiation als auch das Überlesen von Stopcodons häufig zur Bildung von Proteinvarianten führt, die eine unterschiedliche Lokalisation im Vergleich zu ihren kanonischen Isoformen aufweisen. Beispielsweise werden von einigen glykolytischen Enzymen zytosolische und peroxisomale Isoformen gebildet. Der Import in die Peroxisomen wird erreicht, indem Stopcodons gezielt

überlesen werden und somit ein zusätzliches peroxisomales „Targeting Signal“ (PTS) generiert wird (Freitag *et al*, 2012).

1.1.1 Der Lebenszyklus *Ustilago maydis*

Ustilago maydis, ein biotropher Basidiomycet, ist der Erreger des Maisbeulenbrands, einer Krankheit, die zur Bildung von tumorähnlichen Wucherungen an Maispflanzen führt. Diese Tumore sind durch die Reifung von schwarz gefärbten Teliosporen gekennzeichnet, die im infizierten Pflanzengewebe gebildet werden (Christensen, 1963). Das Aussehen der Teliosporen auf den Pflanzenteilen ähnelt Verbrennungen, und nach diesem visuellen Merkmal wurden sowohl der Erreger als auch die Krankheit benannt, abgeleitet von dem lateinischen Wort ustilare, was „verbrennen“ bedeutet. Nach der Keimung durchlaufen die Teliosporen eine Meiose, die zur Bildung von haploiden Zellen führt, die als Sporidien bezeichnet werden. Diese Zellen wachsen zunächst saprophytisch und teilen sich hefeartig, während sie sich von vorhandenem organischem Material ernähren (Abb. 1).

Damit der Pilz in die pathogene Phase übergehen kann, ist die Verschmelzung zweier kompatibler Sporidien erforderlich, die jeweils einen anderen Paarungstyp besitzen. *U. maydis* besitzt zwei Paarungstyp-Loki, die als a-Lokus und b-Lokus bezeichnet werden (Banuett & Herskowitz, 1989; Holliday, 1961). Der a-Lokus ist ein biallelischer Lokus, der für ein Pheromon-Rezeptor-System kodiert, das in den ersten Phasen der Paarung eine entscheidende Rolle spielt. Das Pheromonsystem ermöglicht es den haploiden Zellen, im Zellzyklus zu verharren und zueinander zu wachsen. Dies wird durch den Pheromongradienten begünstigt und führt dazu, dass die Zellen an ihren Spitzen fusionieren (Bölker *et al*, 1992). Diese Verschmelzung ist für den Pilz unerlässlich, um seine Entwicklung bis zum pathogenen Zustand fortzusetzen.

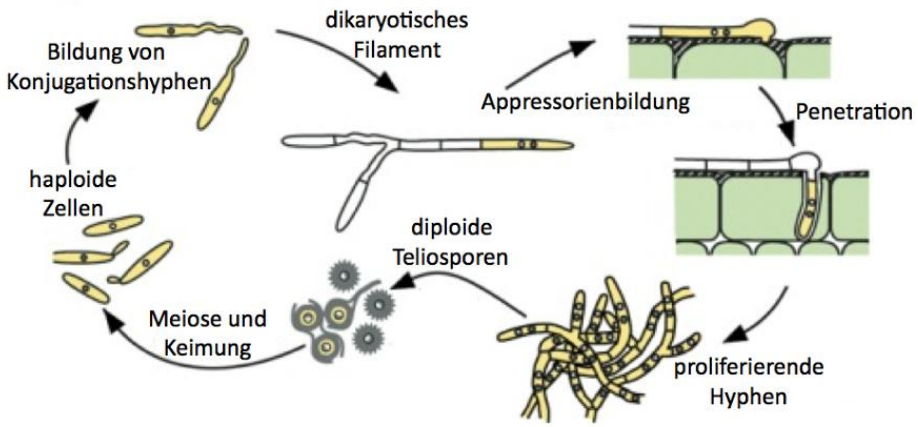


Abbildung 1: Der Lebenszyklus von *Ustilago maydis.* In der schematischen Darstellung sind Illustrationen der verschieden Phasen während der Entwicklung von *U. maydis* zu sehen (verändert nach Jörg Kämper *et al*., 2006).

Nach der Fusion wird die anschließende Entwicklung des Pilzes weitgehend durch den b-Lokus reguliert, der multiallelisch ist. Der b-Lokus kodiert für zwei Homöodomänen-Transkriptionsfaktoren, bE und bW, die bei Fusion unterschiedlicher Paarungstypen Heterodimere bilden. Diese Heterodimere sind für die Bildung dikaryotischer Filamente erforderlich, was einen kritischen Schritt in der pathogenen Entwicklung darstellt (Kämper *et al*, 1995). Dieses dikaryotische Filament wächst und bildet regelmäßige Septen, die dazu dienen, den Spitzenbereich von den leeren Segmenten des Filaments zu trennen. Diese Septen sind wichtig für das effektive Eindringen in die Wirtspflanze (Banuett & Herskowitz, 1994; Freitag *et al*, 2011)

An diesem Punkt der Entwicklung wird der Zellzyklus in der G2-Phase angehalten (Snetselaar & Mims, 1992). Auf der Pflanzenoberfläche kann der Pilz die hydrophobe Beschaffenheit der Blattoberfläche wahrnehmen und bildet daraufhin ein Appressorium an der Spitze des dikaryotischen Filaments aus. Das Appressorium fungiert als Infektionsstruktur, die es dem Pilz ermöglicht, die äußere Schicht der Pflanze zu durchdringen (Lanver *et al*., 2010; Mendoza-Mendoza *et al*., 2009; Snetselaar & Mims, 1992; Abb. 1).

Nach erfolgreichem Eindringen in den Wirt wird der Zellzyklusarrest aufgehoben und der Pilz beginnt sich innerhalb der Pflanze zu vermehren. Dies geschieht durch mitotische Teilungen in den dikaryotischen Hyphen. Während dieser Phase der Proliferation bildet der Pilz Zellstrukturen, die als Schnallen bezeichnet werden und die für die richtige Verteilung der Zellkerne innerhalb der Hyphen notwendig sind. Die Bildung dieser Schnallen wird durch das vom b-Lokus kodierte Protein Clp1 reguliert, das auch für die Wiederaufnahme des Zellzyklus wichtig ist (Scherer *et al*., 2006). Clp1 reguliert den b-Lokus negativ, wodurch die

Wiederaufnahme der Mitose vermittelt und das anschließende Wachstum ermöglicht wird (Heimel *et al*., 2010).

Um eine erfolgreiche biotrophe Interaktion mit seinem Wirt herzustellen, sondert *U. maydis* Effektorproteine ab, die das Immunsystem und den Stoffwechsel der Pflanze beeinflussen. Diese Effektoren sind häufig in Genclustern organisiert, die vermutlich die koordinierte Expression und Sekretion der für die Infektion erforderlichen Proteine erleichtern (Djamei & Kahmann, 2012; Djamei *et al*, 2011; Doehlemann *et al*, 2009). Nach etwa vier Tagen der Infektion unter Gewächshausbedingungen induziert der Pilz in der Pflanze die Tumorbildung, die durch eine erhebliche Vergrößerung der Pflanzenzellen gekennzeichnet ist (Doehlemann *et al*, 2009; Snetselaar & Mims, 1994). Während sich das Pilzmaterial im Tumor anreichert, kommt es zur Karyogamie (Verschmelzung der Zellkerne), die zur Bildung von diploiden Teliosporen führt. Diese diploiden Teliosporen reifen im infizierten Gewebe heran und werden später durch Regen, Wind oder Tiere verbreitet, wodurch sich der Lebenszyklus vervollständigt (Christensen, 1963).

1.2 Peroxisomen

Im Jahr 1954 wurden erstmals von einer Membran begrenzte „Microbodies“ im Nierengewebe von Mäusen beschrieben, die ein eigenes Organell darstellen könnten (Rhodin, 1954). Kurze Zeit später wurden ähnliche Strukturen mit kristallinen Kernen im Gewebe von Rattenlebern beobachtet (Rouiller & Bernhard, 1956). Mit verbesserten Verfahren zur Zellfraktionierung konnten diese „Microbodies“ zu Beginn der sechziger Jahre des letzten Jahrhunderts isoliert und biochemisch charakterisiert werden. Eine wesentliche Gruppe von Enzymen waren H_2O_2-bildende Oxidasen und Katalasen, die H_2O_2 in Wasser und Sauerstoff spalten können. Diesen enzymatischen Aktivitäten verdanken Peroxisomen ihren heutigen Namen (De Duve & Baudhuin, 1966).

1.2 Funktion und Aufbau

Peroxisomen sind nahezu ubiquitär vorkommende Organellen, welche von einer einfachen Membran umgeben sind und eine sphärische Form aufweisen – es handelt sich also um Vesikel. Peroxisomen sind allerdings sehr heterogene Vesikel (Islinger *et al*, 2010). Sowohl die Anzahl als auch Größe der Peroxisomen kann in unterschiedlichen Organismen, Zelltypen und Entwicklungsphasen stark variieren (Lingard *et al*, 2009). Umweltbedingungen beeinflussen sowohl die Morphologie als auch das Proteom der Peroxisomen zu einem bestimmten Zeitpunkt (Islinger *et al*, 2012; Schliebs & Kunau, 2006; Costello *et al*, 2018).

Eine in Pflanzen, Pilzen und Tieren verbreitete Aufgabe der Peroxisomen ist die β-Oxidation von Fettsäuren bei der H_2O_2 entsteht (Poirier *et al*, 2006). Dabei unterscheiden sich Organismen dahingehend, ob nur die langkettigen Fettsäuren oder sämtliche Fettsäuren in Peroxisomen abgebaut werden (Kunau *et al*, 1995). Eine genauere Beschreibung der Fettsäureoxidation findet sich weiter unten mit einem Fokus auf *U. maydis*.

In vielen Organismen sind Peroxisomen mit Enzymen ausgestattet, die am Katabolismus von Stickstoffverbindungen beteiligt sind, zum Beispiel können sie Urat-Oxidasen enthalten. Urat-Oxidasen sind wichtig für die Umwandlung von Urat in Allantoin. Bei dieser Reaktion wird wie bei der β-Oxidation Wasserstoffperoxid synthetisiert (Islinger *et al*, 2010), was ihre Kompartimentierung erklären könnte. Darüber hinaus erfolgt in den Leberzellen von Ratten die Biosynthese von Gallensäuren in den Peroxisomen (Ferdinandusse *et al*, 2009).

Beim Menschen sind Peroxisomen an der Synthese von Etherlipiden wie Plasmalogenen beteiligt (Honsho *et al*, 2017). Diese Lipide sind wichtige Bestandteile der Zellmembran und tragen zur Regulierung ihrer Fluidität und Stabilität bei (Wanders & Waterham, 2006). Die entscheidende Bedeutung der Peroxisomen in der menschlichen Physiologie manifestiert sich in einer Gruppe von Erbkrankheiten, die als Zellweger-Spektrum bezeichnet wird. Verantwortlich sind Defekte von Schlüsselfaktoren der Biogenese der Peroxisomen. Dies führt zum Beispiel zu einem Mangel an Plasmalogenen und zur Anhäufung langkettiger Fettsäuren. Patienten versterben früh und sind maßgeblich beeinträchtigt (Wanders & Waterham, 2006; Wanders, 2014). Peroxisomen sind zudem relevant für das Hörempfinden. In bestimmten Zellen der Cochlea wird durch Schallexposition vermehrt Wasserstoffperoxid produziert, wodurch die Proliferation von Peroxisomen anregt wird. Diese Maßnahme dient dazu, Gewebeschäden durch reaktive Sauerstoffspezies zu verhindern. Mutationen im PJVK-Gen, dessen Produkt Pejvakin die Proliferation der Peroxisomen fördert, sind häufig mit Gehörverlust bei betroffenen Patienten verbunden (Delmaghani *et al*, 2015).

Darüber hinaus regulieren Peroxisomen die angeborene Immunantwort, indem sie neben den Mitochondrien als wichtiger Knotenpunkt für antivirale Signaltransduktion dienen (Dixit *et al*, 2010; Ferreira *et al*, 2019). Die Rolle der Peroxisomen bei der Regulierung der Immunantwort in Folge mikrobieller Infektion wurde auch in anderen Organismen wie *Drosophila melanogaster* beobachtet (Odendall *et al*, 2014; Di Cara *et al*, 2017; Di Cara, 2020).

In Pflanzen haben Peroxisomen eine Reihe von besonderen, dem Lebensstil angepassten Funktionen, die sich auch in den unterschiedlichen Geweben deutlich unterscheiden. Eine

wichtige Aufgabe ist ihre Beteiligung an der Photorespiration: Bei der Photosynthese, vor allem unter Lichtstress in den Blättern entsteht das toxische Nebenprodukt 2-Phosphoglykolat. Durch einen Rückgewinnungsprozess, an dem sowohl Peroxisomen als auch Mitochondrien beteiligt sind, wird dieses Molekül in 3-Phosphoglycerat umgewandelt und wieder in den Calvin-Zyklus eingebracht (Reumann & Weber, 2006; Bauwe *et al*, 2010; Dellero *et al*, 2016; Pan *et al*, 2020). Darüber hinaus enthalten Peroxisomen von Pflanzen als auch in Pilzen Enzyme des Glyoxylat-Zyklus, die die Umwandlung von Acetyl-CoA in C_4-Körper ermöglichen. Dieser Zyklus ist essentiell, wenn Fettsäuren und C_2-Körper als einzige Kohlenstoffquellen verfügbar sind (Kunze *et al*, 2006).

Pilzliche Peroxisomen sind an zahlreichen Prozessen des Primär- und Sekundärstoffwechsels beteiligt (van der Klei & Veenhuis, 2006; Bartoszewska *et al*, 2011; Stehlik *et al*, 2014). Zum Beispiel enthalten Peroxisomen methylotropher Hefen alle wesentlichen Enzyme für den Methanolstoffwechsel (Veenhuis *et al*, 1978; van der Klei & Veenhuis, 2006). Außerdem sind Isoformen glykolytischer Enzyme in den Peroxisomen vieler Pilze vorhanden (Freitag *et al*, 2012). In der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* findet ein Teil der L-Lysin-Biosynthese in den Peroxisomen statt (Breitling *et al*, 2002; Bittner *et al*, 2022). Neben dem Primärstoffwechsel sind Peroxisomen auch an der Synthese verschiedener Sekundärmetaboliten beteiligt (Bartoszewska *et al*, 2011). So findet beispielsweise die Penicillin Biosynthese in *Aspergillus nidulans* und *Penicillium chrysogenum* teilweise in Peroxisomen statt (Müller *et al*, 1992, 1991; Kistler & Broz, 2015). Außerdem sind Peroxisomen entscheidend für die Synthese von einer Gruppe als Bioseifen wirksamen Glykolipide in *U. maydis* – den sogenannten Mannosylerythritol-Lipiden (MELs) (Hewald *et al*, 2006; Freitag *et al*, 2014). Auch für die pathogene Entwicklung spielen Peroxisomen eine entscheidende Rolle. *U. maydis* besitzt alle benötigten Enzyme um die β-Oxidation analog zu Säugetieren in Mitochondrien und Peroxisomen durchzuführen (Camões *et al*, 2015). Dabei unterscheidet sich *U. maydis* von anderen Pilzen und Pflanzen in denen die β-Oxidation ausschließlich in Peroxisomen stattfindet (Kunau *et al*, 1988; Kunau *et al*, 1995). Sowohl die mitochondriale als auch die peroxisomale β-Oxidation katalysieren die Kettenverkürzung von Acyl-CoA-Estern zwischen den Kohlenstoffatomen zwei und drei, wobei als Produkte verkürzte Ketten von Acyl-CoA und Acetyl-CoA oder Propionyl-CoA entstehen, abhängig vom verwendeten Substrat (Kunau *et al*, 1995; Hiltunen & Qin, 2000; Poirier *et al*, 2006). Der erste Schritt der peroxisomalen β-Oxidation wird durch Acyl-CoA-Oxidasen katalysiert, während der zweite und dritte Schritt in *U. maydis* von einem einzigen Enzym, dem multifunktionellen Enzym 2 (Mfe2) katalysiert wird (Camões *et al*., 2015; Klose & Kronstad, 2006; Kretschmer,

et. al, 2012). Es wurden jedoch auch andere mutmaßliche peroxisomale Proteine in *U. maydis* gefunden, die wahrscheinlich enzymatische Reaktionen im Zusammenhang mit der Funktion des multifunktionalen Enzyms 2 ausführen. Dazu zählen putative Enoyl-CoA-Hydratasen, die in Säugetieren den zweiten Schritt der β-Oxidation katalysieren, sowie 3-Hydroxyacyl-CoA-Dehydrogenasen, die den dritten Schritt dieses Stoffwechselwegs übernehmen (Camões *et al*, 2015). Werden essentielle Gene der β-Oxidation in *U. maydis*, wie z. B. das Gen für das multifunktionelle Enzym 2 (Mfe2), deletiert, führt dies zu einer erheblich reduzierten Virulenz des Pilzes (Klose & Kronstad, 2006; Kretschmer, *et. al*, 2012).

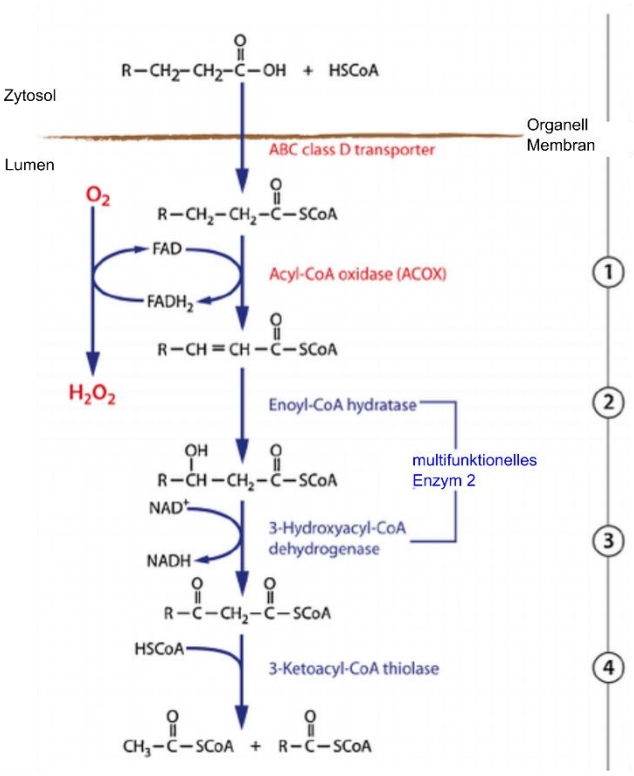


Abbildung 2: Schematische Darstellung der peroxisomalen β-Oxidation (verändert nach Schrader *et al*, 2015)**.** Da langkettige Fettsäuren die Organellenmembranen nicht durch bloße Diffusion passieren können, müssen die Fettsäuren aktiv über die peroxisomale Membran transportiert werden. Vor dem Transport werden die Fettsäuren außerhalb des Organells durch Konjugation an Coenzym A aktiviert. Die aktivierten langkettigen Fettsäuren werden anschließend in die Organellen importiert.
Danach werden die Fettsäuren in den Peroxisomen durch β-Oxidation in vier aufeinanderfolgenden Reaktionen (1-4) abgebaut. In *U. maydis* werden sowohl der zweite als auch der dritte Schritt der β-Oxidation durch das multifunktionelle Enzym 2 katalysiert.

Der evolutionäre Ursprung von Peroxisomen ist nach wie vor umstritten. Die Idee eines endosymbiontischen Vorfahren wird aufgrund des fehlenden Genoms und des Vorhandenseins einer einfachen Membran als unwahrscheinlich angesehen (Gabaldón, 2010; Smith & Aitchison, 2013). Angesichts der Ähnlichkeit zwischen dem Proteinimportsystem von Peroxisomen und dem ERAD-System (endoplasmatisches Retikulum-assoziierter Proteinabbau) des endoplasmatischen Retikulums (ER) ist es denkbar, dass Peroxisomen von

diesem Organell abstammen könnten (Gabaldón *et al*, 2006). Die Rolle der Peroxisomen als metabolische Organellen, die am Fettsäureabbau beteiligt sind, zeigt Ähnlichkeiten mit Mitochondrien, die ebenfalls Fettsäuren abbauen (Speijer, 2017; Bolte *et al*, 2015). Zusätzlich zu ihrer metabolischen Verbindung teilen Peroxisomen und Mitochondrien auch Komponenten der Teilungsmaschinerie. In der Bäckerhefe und menschlichen Zellen rekrutiert der Teilungsfaktor Fis1 die Dynamin-ähnliche GTPase Dnm1/Drp1, die für die Vermehrung von Mitochondrien sowie Peroxisomen notwendig ist (Theos *et al*, 2005; Kuravi *et al*, 2006; Schrader *et al*, 2022). Es ist wahrscheinlich, dass sowohl Mitochondrien als auch das ER zum peroxisomalen Proteom beigetragen haben und auch heute noch eine Rolle bei der Biogenese dieser Organellen spielen (Bittner *et al*, 2022). Tatsächlich können manche Proteine via ER oder via Mitochondrien in die Peroxisomen importiert werden (Hoepfner *et al*, 2005; Stehlik *et al*, 2020; Bittner *et al*, 2024).

1.2.2 Import peroxisomaler Matrixproteine

Das breite Spektrum der von Peroxisomen ausgeführten Funktionen erfordert den Import zahlreicher Proteine in die peroxisomale Matrix (Lazarow & Fujiki, 1985; Yifrach *et al*, 2022). Nach der Translation müssen alle peroxisomalen Matrixproteine aus dem Zytosol importiert werden. Der Mechanismus für den Import peroxisomaler Matrixproteine unterscheidet sich dabei deutlich von anderen bekannten Importsystemen. Proteine, die für Mitochondrien, das endoplasmatische Retikulum und Chloroplasten bestimmt sind liegen als ungefaltete Monomere vor (Busch *et al*, 2023; Rochaix, 2022). Im Gegensatz dazu können peroxisomale Proteine in vollständig gefalteter, oligomerisierter Form oder in Kombination mit gebundenen Cofaktoren importiert werden (Pedrosa *et al*, 2018; Walter & Erdmann, 2019). In dieser Hinsicht ähnelt der peroxisomale Import eher dem Import in den Nukleus.

Damit ein Protein präzise in einem bestimmten Zellkompartiment lokalisiert, benötigt es in der Regel eine spezifische Zielsteuerungssequenz innerhalb seiner Aminosäuresequenz (Blobel & Sabatini, 1971). Es gibt verschiedene Importsignale für lösliche peroxisomale Matrixproteine, wobei die die Mehrheit charakteristische Sequenzmotive an ihrem C-Terminus aufweist. Dieses C-terminale Signal wurde als Peroxisomales Targeting Signal 1 (PTS1) bezeichnet. Die prototypische Sequenz ist das kurze Tripeptid Serin-Lysin-Leucin (SKL) ganz am Ende eines Proteins, welches für die effiziente Translokation in die Peroxisomen ausreicht (Subramani, 1998; Brocard & Hartig, 2006; Nötzel *et al*, 2016). In späteren Studien konnten Variationen dieser Sequenz identifiziert werden, was zur Festlegung einer ersten Konsensus-Sequenz (S/A/C)-(K/R/H)-(L/M) führte (Subramani, 1998; Brocard & Hartig, 2006). Das C-terminale

Tripeptid interagiert mit dem peroxisomalen Importrezeptor Pex5 (Gatto *et al*, 2000). Die Effizienz des PTS1 Imports wird zusätzlich von den letzten zehn bis zwölf Aminosäuren des Proteins beeinflusst (Brocard & Hartig, 2006; Nötzel *et al*, 2016). In anderen Fällen hängt der Import peroxisomaler Matrixproteine von einer anderen Signalsequenz (PTS2) ab. Dieses N-terminale Signal hat die Konsensussequenz (R/K)-(L/V/I)-X5-(H/Q)-(L/A) (Lazarow, 2006). In verschiedenen Organismen, wie *Caenorhabditis elegans* und bestimmten Algen, fehlt der PTS2-Importweg vollständig (Gonzalez *et al*, 2011; Motley *et al*, 2000). In Pflanzen wird jedoch etwa ein Drittel der peroxisomalen Proteine über den PTS2-abhängigen Importweg in Peroxisomen transportiert (Reumann, 2004).

Das peroxisomale Proteom beinhaltet zudem eine Reihe von Proteinen, die weder ein PTS1 noch ein PTS2 enthalten. Eine Möglichkeit, wie solche Proteine ihren endgültigen Bestimmungsort erreichen können, ist die Wechselwirkung im Zytosol mit anderen Proteinen, die Zielsteuerungssequenzen enthalten, was als „Piggybacking“ bezeichnet wurde (Yang *et al*, 2001; Titorenko *et al*, 2002; Effelsberg *et al*, 2015). In verschiedenen Hefen wird beispielsweise die Nikotinamidase Pnc1 durch eine Interaktion mit der Glycerinphosphat-Dehydrogenase 1 (Gpd1) in die Peroxisomen transportiert, wobei die Importeffizienz von Stressbedingungen beeinflusst wird – es handelt sich also um einen regulierten Vorgang (Anderson *et al*, 2003; Choudhry *et al*, 2016; Effelsberg *et al*, 2015). Andere Proteine ohne PTS binden direkt an die N-terminale Region des Importrezeptors Pex5 (van der Klei & Veenhuis, 2006; Kempiński *et al*, 2020; Ast *et al*, 2022). In der Bäckerhefe hängt der Import der Acyl-CoA-Oxidase (Aox) in die Peroxisomen von ihrer Sekundärstruktur ab, die die Interaktion mit Pex5 beeinflusst (Kempiński *et al*, 2020). Auch in *U. maydis,* gibt es Proteine die weder über ein kanonisches PTS1 oder PTS2 Signal verfügen und unabhängig von den TPR-Domänen von Pex5 in Peroxisomen transportiert werden. Ein Beispiel hierfür wäre das Multifunktionelle Enzym 2 (Mfe2), welches eine Schlüsselrolle bei der β-Oxidation spielt (Ast *et al*, 2022).
Der Importprozess beginnt mit der Erkennung und Bindung eines Zielproteins durch einen Rezeptor im Zytosol (Abb. 3(1)). Proteine mit einem PTS1-Signal werden von dem löslichen Rezeptor Pex5 gebunden, der sie dann zu den Peroxisomen rekrutiert (McCollum & Subramani, 1993; Van Der Leij *et al*, 1993). Pex5 weist in seinem C-terminalen Bereich sieben Tetratripeptid-Wiederholungen auf, die eine spezifische Bindungstasche für das PTS1-Signal der Zielproteine bilden (Gatto *et al*, 2000). PTS2-Proteine hingegen werden vom Rezeptor Pex7 erkannt. In vielen Organismen dient Pex7 als Adapterprotein zwischen dem PTS2-Protein und Pex5 (Otera *et al*, 1998; Woodward & Bartel, 2005; Galland *et al*, 2007; Ast *et al*, 2022). In manchen Pilzen hingegen bindet Pex7 an peroxisomale Membranproteine aus der Pex20-

Familie um den Import zu vermitteln (Purdue *et al*, 1998; Otzen *et al*, 2005). Es wird angenommen, dass der Importmechanismus für PTS2-Proteine durch Pex7 und seine Co-Rezeptoren dem für PTS1-Proteine ähnlich ist (Rucktäschel *et al*, 2011; Kunze, 2020).

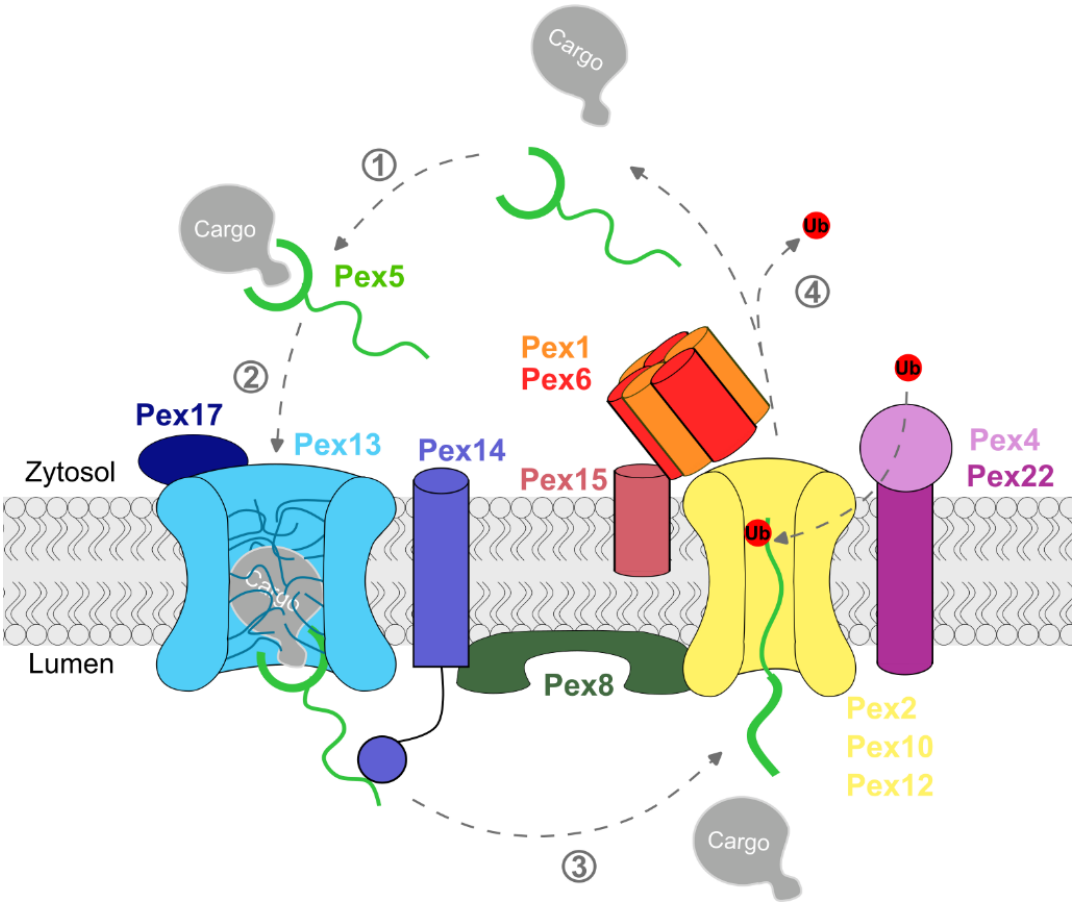


Abbildung 3: Modell des peroxisomalen Matrixproteinimports in *S. cerevisiae* (verändert nach Skowyra & Rapoport, 2022)**.** (1) Im Zytosol wird das PTS1-Signal des Zielproteins vom Rezeptor Pex5 erkannt und gebunden. (2) Der Rezeptor-Cargo-Komplex wird an die peroxisomale Membran rekrutiert, wobei Pex5 den Pex13-Kanal passiert. Während dieses Prozesses interagieren die WxxxF/Y-Motive im N-terminalen Bereich von Pex5 mit den YG-Domänen von Pex13. Pex14 extrahiert Pex5 aus dem Pex13-Kanal und verhindert, dass der Rezeptor-Cargo-Komplex wieder in das Zytosol zurück diffundiert. (3) Pex5 wird durch Pex4 und den RING-Komplex (bestehend aus Pex2, Pex10 und Pex12) mono-ubiquitiniert (Ub) und wird anschließend durch einen ATPase-Komplex, bestehend aus Pex1, Pex6 und Pex15, aus dem Peroxisom entfernt. Die Entfaltung von Pex5 führt wahrscheinlich zur Freisetzung des Cargoproteins in das peroxisomale Lumen. (5) Pex5 wird dann im Zytosol deubiquitiniert.

Sobald das Zielprotein bindet, wird es zur peroxisomalen Membran rekrutiert (Abbildung 3, (2)). An diesem Schritt sind die peroxisomalen Membranproteine Pex13, Pex14 und in *S. cerevisiae* noch Pex17 beteiligt (Erdmann & Blobel, 1996; Gould *et al*, 1996). Ein oligomerer Komplex von Pex13-Molekülen bildet in der peroxisomalen Membran einen Kanal, der einer Kernpore ähnelt. Der zentrale Bereich dieses Kanals ist durch ein dichtes Netzwerk von Tyrosin-Glycin (YG)-Domänen definiert. Pex5 durchquert diesen Kanal, indem es WXXXF/Y-Motive in seiner N-terminalen Region nutzt, um das YG-Netzwerk lokal aufzulösen (Gao *et al*, 2022; Skowyra & Rapoport, 2022). Pex14, ein membrangebundenes Protein, das mit der Pore

assoziiert ist, hilft wahrscheinlich dabei, Pex5 aus dem Pex13-Kanal herauszuziehen und verhindert den vorzeitigen Rücktransport des Rezeptor-Cargo-Komplexes. Dieser Prozess gewährleistet die vollständige Translokation des Zielproteins in die peroxisomale Matrix (Dammai & Subramani, 2001; Skowyra & Rapoport, 2022).

In Hefe assoziiert der Importkomplex über Pex8 mit dem RING-Komplex (Agne *et al*, 2003). Obwohl es Hinweise darauf gibt, dass Pex8 die Freisetzung des importierten Proteins von Pex5 erleichtern könnte (Wang *et al*, 2003), deuten neuere Studien darauf hin, dass die Entfaltung der TPR-Domänen in Pex5 während des Exports wahrscheinlich eher erklärt, wie das PTS1-Protein freigesetzt wird (Skowyra & Rapoport, 2022).

Für den Export muss Pex5 an einem konservierten Cysteinrest in seiner N-terminalen Region mono-ubiquitiniert werden (Williams *et al*, 2007; Fujiki *et al*, 2012; Francisco *et al*, 2024) (Abbildung 3, (3)). Dieser Prozess wird von dem Ubiquitin-konjugierenden Enzym Pex4 in Zusammenarbeit mit dem Really interesting new Gen (RING)-Komplex durchgeführt, der die Ubiquitin-Ligase-Komponenten Pex2, Pex10 und Pex12 umfasst (Platta et al., 2004; Schliebs et al., 2010). Der RING-Komplex bildet einen Kanal mit einer offenen Pore, durch die Pex5 mit seiner N-terminalen Domäne eingeschleust und anschließend von Pex2 ubiquitiniert wird, das sich direkt über der Pore befindet (Feng *et al*, 2022). Im Zytosol wird Pex5 dann durch Ubp15 deubiquitiniert (Debelyy *et al*, 2011) (Abbildung 3, (4)). Nach der Deubiquitinierung ist der Rezeptor für eine weitere Importrunde vorbereitet.

1.3 Subpopulationen und Subdomänen in Peroxisomen und anderen Zellorganellen

Peroxisomen können entweder durch Teilung bestehender Peroxisomen oder durch Neubildung aus dem endoplasmatischen Retikulum (ER) entstehen. Reife Peroxisomen können sich asymmetrisch teilen, was zu Tochterperoxisomen mit potenziell unterschiedlichen Proteomen führt. In Hefe resultiert diese Asymmetrie in einer ungleichen Verteilung von Peroxisomen zwischen Mutter- und Tochterzellen. Insbesondere jüngere Peroxisomen, die das Peroxisomenprotein 2 (Inp2) enthalten, werden bevorzugt zur Tochterzelle transportiert, während ältere Peroxisomen mit dem Peroxisomenprotein 1 (Inp1) eher in der Mutterzelle verbleiben (Kumar *et al*, 2018; Fagarasanu *et al*, 2005, 2006; Kumar *et al*, 2024).

Auch in Leber- und Nierenzellen von Ratten wurden unterschiedliche Populationen von Peroxisomen beobachtet (Mohr & Völkl, 2002). Diese Peroxisomen trennen sich in einem Dichtegradienten und weisen Unterschiede in ihrer Zusammensetzung von Membran- und

Matrixproteinen auf. Eine besondere Art von Peroxisomen, die so genannten „Woronin-Bodies“, entstehen aus spezifischen Subpopulationen der Peroxisomen und werden durch den Import von HEX-Oligomeren induziert (Liu *et al*, 2011; Jedd & Chua, 2000). Diese abgewandelten Organellen haben keine metabolische Funktion, sondern sind verantwortlich für das Verschließen von Septenporen, was einer Wundheilung entspricht.

Innerhalb einzelner Peroxisomen kann es unterschiedliche Subdomänen geben, in denen sich peroxisomale Matrixproteine ansammeln. Dies bedeutet, dass peroxisomale Proteine nicht immer gleichmäßig verteilt sind und verschiedene peroxisomale Proteine eher getrennte Kompartimente bilden als kolokalisieren. So ist beispielsweise das Matrixprotein Sterol Carrier Protein 2 (SCP2) in einem begrenzten Bereich innerhalb der Peroxisomen lokalisiert (Galiani *et al*, 2016; Yifrach *et al*, 2022).

Es ist bekannt, dass Peroxisomen mit verschiedenen zellulären Organellen interagieren, und es ist möglich, dass verschiedene Subpopulationen von Peroxisomen auf die Interaktion mit bestimmten Organellen spezialisiert sind (Shai *et al*, 2016). Zusätzlich zu diesen Interaktionen weisen Peroxisomen eine interne Kompartimentierung auf. Frühe elektronenmikroskopische und biochemische Studien zeigten, dass Enzyme wie die Urat-Oxidase zusammen mit anderen oxidativen Enzymen Schlüsselkomponenten einer elektronendichten, detergenzienresistenten Kernstruktur sind (Baudhuin & De Duve, 1965; Hayashi *et al, 1971*; Volkl *et al*, 1988). Ähnliche proteinhaltige Kernstrukturen, die mit Alkoholoxidasen angereichert sind, wurden in methylotropher Hefe beobachtet (Veenhuis et al., 1978).

Auch andere zelluläre Organellen weisen Subpopulationen und Subdomänen auf. Das endoplasmatische Retikulum (ER) beispielsweise ist in ein glattes und ein raues ER unterteilt, die jeweils eine spezialisierte Zusammensetzung haben. Bei Pflanzen hat sich gezeigt, dass das ER in bis zu 16 verschiedene Domänen unterteilt ist (Staehelin, 2002). COPII-Vesikel, die für den Transport vom ER zum Golgi-Apparat von entscheidender Bedeutung sind, werden selektiv von bestimmten Ausgangsstellen abgeleitet (Budnik & Stephens, 2009). Darüber hinaus sind bestimmte ER-Domänen - wie die, die das Membranprotein Pex30 enthalten - an der De-novo-Biogenese von Peroxisomen und Lipidtröpfchen beteiligt (Joshi et al., 2018).

Es konnte gezeigt werden, dass Mitochondrien in ihrer Form, Größe und Funktion nicht einheitlich sind und dass verschiedene Regionen einer Zelle Mitochondrien mit unterschiedlichen Eigenschaften enthalten können. Mit Hilfe fortschrittlicher bildgebender Verfahren konnte gezeigt werden, dass Mitochondrien eine beträchtliche morphologische

Vielfalt aufweisen, die von kleinen, fragmentierten Strukturen bis hin zu großen, langgestreckten Netzwerken reicht. Es konnte gezeigt werden, dass diese Variabilität mit Unterschieden in der Funktion der Mitochondrien, wie z. B. der Energieproduktion und der Reaktion auf Calcium-vermittelte Signale, zusammenhängt (Collins *et al*, 2002).

Auch in Rattenleberzellen wurden unterschiedliche Populationen von Mitochondrien gefunden. Diese unterschieden sich insbesondere in ihrem Membranpotential, aber auch in ihrem Proteom, dem Redoxzustand und ihrer Atmungsaktivität. Außerdem konnte sowohl die Häufigkeit als auch die Verteilung dieser mitochondrialen Subpopulationen durch unterschiedliche Umweltbedingungen beeinflusst werden (Kuznetsov & Margreiter, 2009). Des Weiteren scheint es bestimmte mitochondriale Subpopulationen zu geben die in Kontakt mit spezifischen Organellen stehen. So gibt es z. B. eine bestimmte Subpopulation von Mitochondrien, die Kontakt zu Lipidtröpfchen herstellen. Diese Mitochondrien weisen im Vergleich zu anderen Mitochondrienpopulationen in der Zelle unterschiedliche Eigenschaften auf, darunter einzigartige Stoffwechselprofile, Proteinzusammensetzungen und Verhaltensweisen. Diese Assoziation spielt eine entscheidende Rolle bei der Unterstützung der Expansion von Lipidtröpfchen, indem sie die Energieerzeugung und den Lipidstoffwechsel erleichtert (Benador *et al*, 2018). In Krebszellen scheinen mitochondriale Subpopulationen bzw. die Veränderung dieser von entscheidender Bedeutung zu sein. Forscher entwickelten einen räumlichen Kartierungsansatz, um zu analysieren, wie die Dynamik der Mitochondrien (z. B. ihre Struktur, Funktion und Verteilung) mit der Tumorprogression und dem Stoffwechsel in Lungenkrebszellen korreliert. Die Studie ergab, dass Veränderungen der Mitochondrienfunktion und -verteilung mit einem veränderten Zellstoffwechsel, der ein Kennzeichen von Krebs ist, verbunden sind. So unterschieden sich die Mitochondrien in Krebszellen in ihrer räumlichen Verteilung und ihrem bioenergetischen Profil von normalen Zellen (Han *et al*, 2023). Kürzlich konnte des Weiteren gezeigt werden, dass Mitochondrien Subpopulationen bilden, um auf unterschiedliche Bedingungen zu reagieren. So existieren zwei unterschiedliche Subpopulationen von Mitochondrien, die sich in ihren Aufgaben und Proteingehalt unterscheiden. Eine der Subpopulationen ist hauptsächlich für die oxidative Phosphorylierung zuständig, während die andere für die Synthese von Prolin und Ornithin verantwortlich ist (Ryu *et al*, 2024).

1.3.1 Die Acyltransferase Mac1 und Mac3 aus *U. maydis* lokalisieren ungleichmäßig innerhalb der Peroxisomen

Während der Untersuchung der subzellulären Lokalisation der Acyltransferasen Mac1 und Mac3 aus *U. maydis* wurde im Vergleich mit dem peroxisomalen Markerprotein mCherry-SKL festgestellt, dass beide Enzyme nicht gleichmäßig in allen Peroxisomen verteilt sind, sondern sich nur in einer Teilpopulation befinden. Zudem akkumulieren beide Enzyme innerhalb fokaler Strukturen einzelner Peroxisomen (Abb. 4a) (Bäcker *et al*, 2025). Diese ungleichmäßige Lokalisation verstärkt sich nach Zugabe von Ölsäure als einziger Kohlenstoffquelle (Abb. 4b).

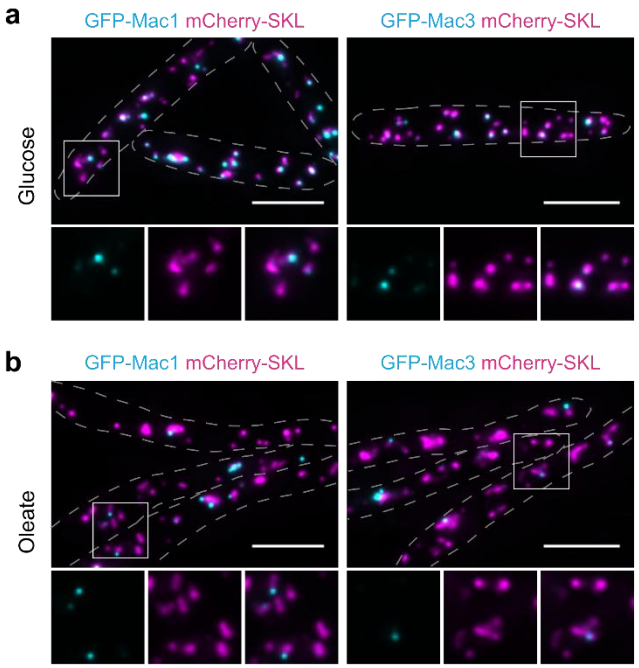


Abbildung 4: Acyltransferasen Mac1 und Mac3 reichern sich in peroxisomalen Subpopulationen und luminalen Subdomänen an. *U. maydis*-Stämme, die N-terminal GFP-markierte Versionen von Mac1 und Mac3 (cyan) und das peroxisomale Markerprotein mCherry-SKL (magenta) exprimieren, wurden mittels Epifluoreszenzmikroskopie untersucht. Repräsentative Bilder von Zellen, die in Glukose **a** oder Oleat **b** gewachsen sind. Die vollständigen Bilder sind als Überlagerungen von zwei Kanälen dargestellt. Für die Ausschnitte sind Einzelkanäle und die übereinander gelegten Kanäle gezeigt. Größenstandard: 5 µm.

1.4 Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit war eine funktionelle, biochemische und zellbiologische Charakterisierung von peroxisomalen Subpopulation und Subdomänen in *U. maydis*. Zunächst sollte untersucht werden wie dieses Phänomen zu Stande kommt. Spielt etwa selektiver Import eine Rolle, oder bilden sich die Subpopulationen nach dem Import? Ferner wollte ich verstehen, wie sich die fokalen Strukturen bilden und dafür rekombinante Proteinvarianten von Mac1 und Mac3 verwenden. Ein weiterer Fokus meiner Arbeit sollte auf einer Untersuchung der Verbreitung dieses Phänomens liegen. Welche anderen *U. maydis* Proteine lokalisieren in peroxisomalen Subdomänen und Subpopulationen und existieren ähnlich Strukturen auch außerhalb von *U. maydis*? Außerdem wollte ich untersuchen, welche physiologische Funktion diese Subdomänen aufweisen.

2 Ergebnisse

2.1 Peroxisomale Subpopulationen treten unabhängig von dem verwendeten fluoreszierenden Protein und unter natürlichen Bedingungen auf

Um auszuschließen, dass die ungleichmäßige Lokalisation von GFP-Mac3 ein Artefakt des verwendeten fluoreszierenden Proteins darstellt, wurden Stämme hergestellt, in denen eine mCherry-Fusion von Mac3 exprimiert werden kann und GFP-SKL als peroxisomaler Marker fungiert – die fluoreszierenden Proteine wurden also vertauscht. Darüber hinaus wurden Kontrollstämme hergestellt, die entweder mCherry-SKL zusammen mit GFP-SKL beziehungsweise mCherry-Mac3 zusammen mit GFP-Mac3 exprimieren (Abb. 5a). Für die fluoreszenzmikroskopische Analyse wurden die Zellen mit Carbonyl Cyanide *m*-Chlorophenyl Hydrazon (CCCP) behandelt, um die Bewegung der Peroxisomen zu minimieren. CCCP unterdrückt die ATP-Bildung in den Mitochondrien und inhibiert somit alle ATP-abhängigen Transportvorgänge innerhalb der Zelle (Inoue *et al*, 2002). Zudem wurden die Zellen vier Stunden vor der Mikroskopie in Medium mit Ölsäure als Kohlenstoffquelle inkubiert. Ölsäure führt in *U. maydis* zu einer Proliferation der Peroxisomen (Camões *et al*, 2015) und Subpopulationen sind leichter zu erkennen (Abb. 5b).

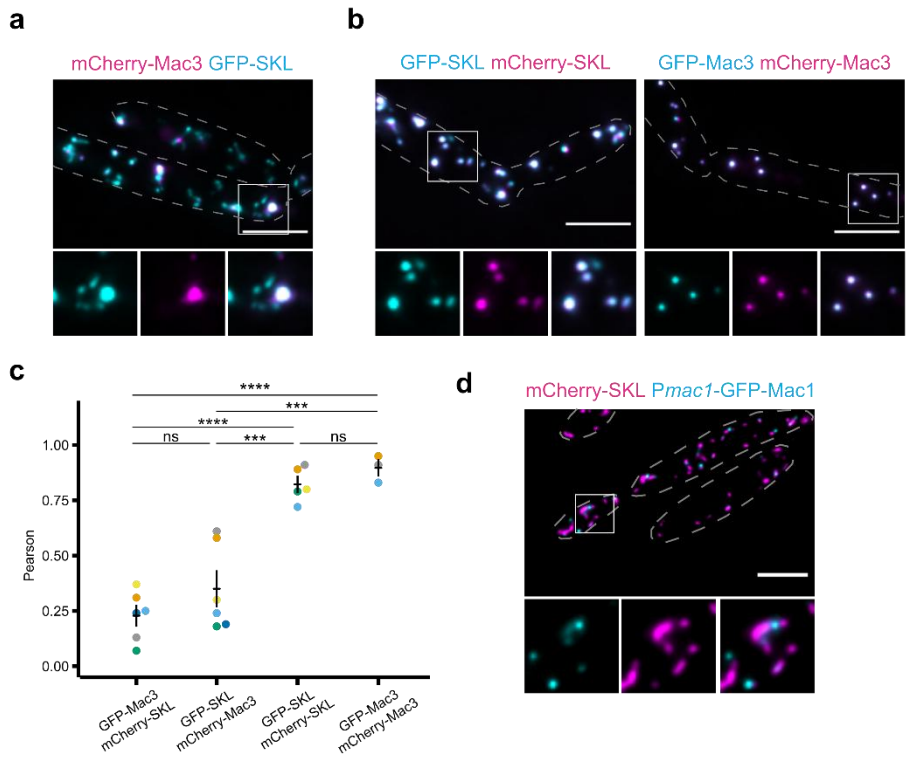


Abbildung 5: Peroxisomale Subpopulationen treten unabhängig vom verwendeten fluoreszierenden Protein und unter natürlichen Bedingungen auf. a Repräsentatives Bild von Zellen, die mCherry-Mac3 (magenta) zusammen mit GFP-SKL (cyan) exprimieren. **b** Repräsentative fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von Zellen die GFP-SKL (cyan) und mCherry-SKl (magenta) oder GFP-Mac3 (cyan) und mCherry-Mac3 (magenta) exprimieren. **c** Die Quantifizierung zeigt den Pearson Korrelationskoeffizient (Pearson) der GFP- und mCherry-Signale für die angegebenen Stämme. Jeder Punkt spezifiziert ein biologisches Replikat. Mittlere Linie, Mittelwert; Fehlerbalken, Standardfehler des Mittelwerts. Die Signifikanz wurde mit einem einseitigen ANOVA mit post-hoc Tukey HSD Test bewertet. *** bezieht sich auf einen p-Wert kleiner oder gleich 0,001, **** bezieht sich auf einen p-Wert kleiner oder gleich 0,0001 und n.s. bezieht sich auf einen p-Wert größer als 0,05. **d** Zellen, die in einem Medium ohne Stickstoff inkubiert wurden, um die Biosynthese von MELs zu induzieren, wurden 4 Stunden nach der Induktion fluoreszenzmikroskopisch untersucht. GFP-Mac1 (cyan) wurde unter der Kontrolle seines endogenen Promotors in Zellen exprimiert, die mCherry-SKL (magenta) als peroxisomalen Marker enthielten. Größenstandard: 5 µm.

Bei der Untersuchung dieser Stämme fiel auf, dass auch in Zellen, die mCherry-Mac3 und GFP-SKL exprimierten, eindeutig Subpopulationen nachgewiesen werden konnten (Abb. 5a). Im Gegensatz dazu konnte ein hohes Maß von Kolokalisation zwischen den Signalen beider fluoreszierender Proteine nachgewiesen werden, wenn Zellen entweder GFP-SKL zusammen mit mCherry-SKL oder GFP-Mac3 zusammen mit mCherry-Mac3 exprimierten (Abb. 5b). Eine Quantifizierung der Kolokalisation durch Bestimmung des Korrelationskoeffizienten nach Bravais-Pearson (Pearson) bestätigte diese Ergebnisse (Abb. 5c). Die Entstehung peroxisomaler Subpopulationen erfolgt also unabhängig vom verwendeten fluoreszierenden Protein.

Desweitern wurde überprüft, ob es sich bei der Bildung von peroxisomalen Subpopulationen um ein natürlich vorkommendes Phänomen handelt oder ob die Bildung nur aus der Überexpression von Mac1 und Mac3 mit dem konstitutiven *otef*-Promotor (Spellig *et al*, 1996)

hervorging. Es wurde ein Stamm konstruiert, der neben dem peroxisomalen Marker mCherry-SKL unter der Kontrolle des konstitutiven *otef*-Promotors auch GFP-Mac1 unter Kontrolle seines natürlichen Promotors exprimierte (Abb. 5d). Dieser Promotor wird induziert, wenn die Zellen unter Stickstoffmangelbedingungen angezogen werden (Hewald *et al*, 2006). Bereits zuvor konnte gezeigt werden, dass GFP-Mac1 voll funktionsfähig ist (Freitag *et al*, 2014). Auch unter diesen endogenen Expressionsbedingungen wurde die Bildung peroxisomaler Subpopulationen beobachtet (Abb. 5d). Die Synthese der MELs findet demnach vermutlich nur in bestimmten Peroxisomen statt.

2.1.2 Die Acyltransferase Mac1 und Mac3 lokalisieren in peroxisomalen Subdomänen innerhalb des peroxisomalen Lumen

Bei der Untersuchung von GFP-Mac1 und GFP-Mac3 mit Hilfe von Epi-fluoreszenzmikroskopie wurde beobachtet, dass diese in punktförmigen Strukturen angereichert waren, die nur teilweise mit mCherry-SKL gefärbten Peroxisomen überlappten (Abb. 4). Daher wurde in Zusammenarbeit mit Kay Schink die Lokalisation von GFP-Mac1 und GFP-Mac3 durch hochauflösende Bildgebung mittels Structured Illumination Microscopy (SIM) analysiert (Gustafsson & Allen, 2016). Die Analyse der SIM-Bilder zeigte, dass GFP-Mac1 und GFP-Mac3 in einer distinkten fokalen Struktur häufig in der Peripherie der Peroxisomen konzentriert waren, während mCherry-SKL und GFP-SKL im gesamten organellären Lumen lokalisierten (Abb. 6a). Dieser auffällige Phänotyp konnte mit Hilfe von 3D-Rekonstruktionen noch besser sichtbar gemacht werden (Abb. 6b und 6c). Die Bildung von Subpopulation geht also einher mit der Bildung peroxisomaler Subdomänen. Um zu bewerten, wie sich diese Subdomänen über die Zeit verhalten, wurde eine Zeitserie von mikroskopischen Aufnahmen der gleichen Zelle angefertigt. Es zeigte sich, dass die GFP-Mac3 positiven Subdomänen über die Zeit stabil sind und sich in den Peroxisomen bewegen können (Abb. 6d).

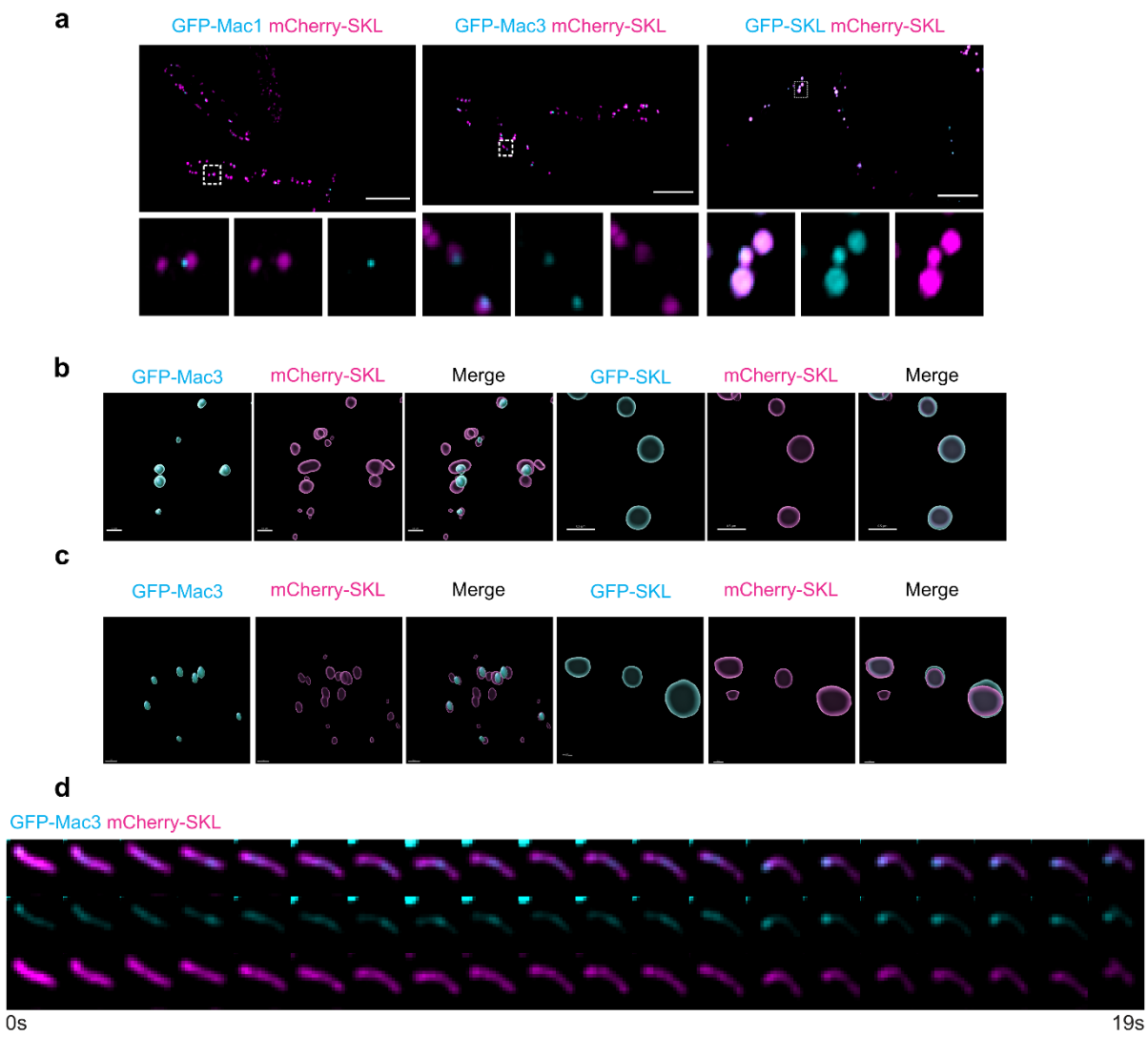


Abbildung 6: Die Acyltransferasen Mac1 und Mac3 befinden sich in stabilen peroxisomalen Subdomänen. **a** Die Zellen wurden mittels SIM untersucht. Repräsentative Bilder von Zellen, die GFP-Mac1 (cyan) und mCherry-SKL (magenta) (rechts), GFP-Mac3 (cyan) und mCherry-SKL (Mitte) und GFP-SKL (cyan) und mCherry-SKL (links) exprimieren. Die vollständigen Bilder werden als Überlagerungen beider Kanäle gezeigt. In den vergrößerten Ausschnitten sind einzelne Kanäle und eine Überlagerung gezeigt. Größenstandard: 5µm. **b** 3D-Rekonstruktion in x-y-Ebene von Peroxisomen die GFP-Mac3, GFP-SKL (cyan) und mCherry-SKL (magenta) enthalten. Größenstandard: 0.5µm. **c** 3D-Rekonstruktion in x-z-Ebene von Peroxisomen die GFP-Mac3, GFP-SKL (cyan) und mCherry-SKL (magenta) enthalten. Größenstandard: 0.5µm. **d** Zeitrafferaufnahmen von Epifluoreszenzmikroskopie eines Stammes der GFP-Mac3 und mCherry-SKL exprimiert. Es wurde ein Bild pro Sekunde aufgenommen. Gezeigt ist die Überlagerung der GFP- und mCherry-Signale.

Da die fokalen Strukturen häufig in der Peripherie der Peroxisomen lokalisiert waren, konnte nicht ausgeschlossen werden, dass diese außerhalb der Peroxisomen vorliegen. Um dies zu überprüfen wurde die Lokalisation von mCherry-Mac1 und mCherry-Mac3 in Stämmen untersucht, die auch das peroxisomale Membranprotein GFP-Pex12 exprimieren (Abb. 7).

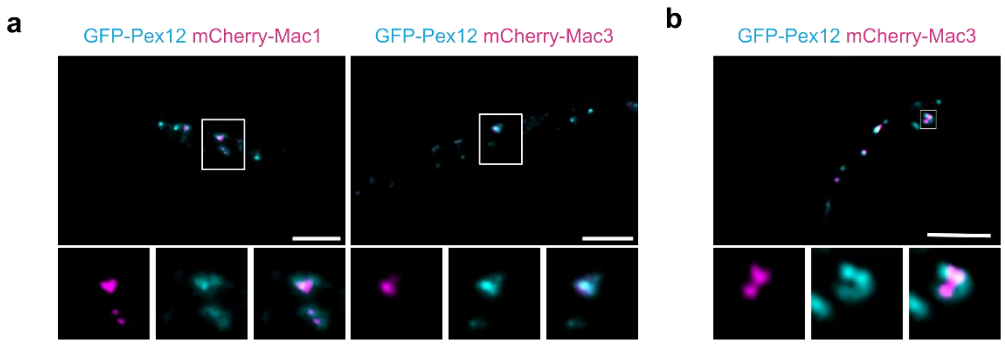


Abbildung 7: Peroxisomale Subdomänen befinden sich innerhalb des peroxisomalen Lumens.
a *U. maydis* Stämme, die N-terminal mCherry-markierte Versionen von Mac3 oder Mac1 (magenta) und das mit GFP markierte peroxisomale Membranprotein Pex12 (cyan) exprimieren, wurden mittels Fluoreszenzmikroskopie untersucht. Vollständige Bilder werden als Überlagerungen von zwei Kanälen gezeigt. In den Ausschnitten sind einzelne Kanäle und ihre Überlagerung abgebildet. **b** *U. maydis* Stämme, die GFP-markiertes Pex12 (cyan) und mCherry-Mac3 (magenta) exprimieren, wurden mittels SIM untersucht. Anordnung der Bilder wie in **a**. Die Größenstandards betragen 5 µm.

Sowohl die Aufnahmen mit dem Epifluoreszenzmikroskop als auch die SIM Aufnahmen zeigen, dass diese fokalen Strukturen innerhalb der Peroxisomen lokalisiert sind und es sich nicht um von außen mit der peroxisomalen Membran assoziierte Gebilde handelt.

2.2 Ein kurzes Aminosäuremotiv innerhalb des C-terminus der Acyltransferase Mac3 ist notwendig und ausreichend für die Bildung peroxisomaler Subdomänen

Die letzten 12 Aminosäuren am C-Terminus eines PTS1-Proteins tragen zur Effizienz des peroxisomalen Importvorgangs bei (Brocard & Hartig, 2006). Um festzustellen, ob der Import per se die Bildung von Subpopulationen beeinflusst, wurde die Lokalisation von GFP untersucht, das mit den C-terminalen 12 Aminosäuren von Mac1 beziehungsweise von Mac3 fusioniert wurde (GFP-PTS1$_{Mac1}$ bzw. GFP-PTS1$_{Mac3}$) (Abb. 8a). Die subzelluläre Lokalisation wurde im Vergleich zum peroxisomalen Reporter mCherry-SKL untersucht. Während GFP-PTS1$_{Mac3}$ in Subpopulationen angereichert war und in fokalen Subdomänen lokalisierte, war GFP-PTS1$_{Mac1}$ gleichmäßig im peroxisomalen Lumen verteilt (Abb. 8a). Nur das C-terminale Dodecamer von Mac3 enthält demnach Informationen, die für die fokale Anreicherung ausreichend sind, während eine derartige Information bei Mac1 an anderer Stelle im Protein zu finden sein muss.

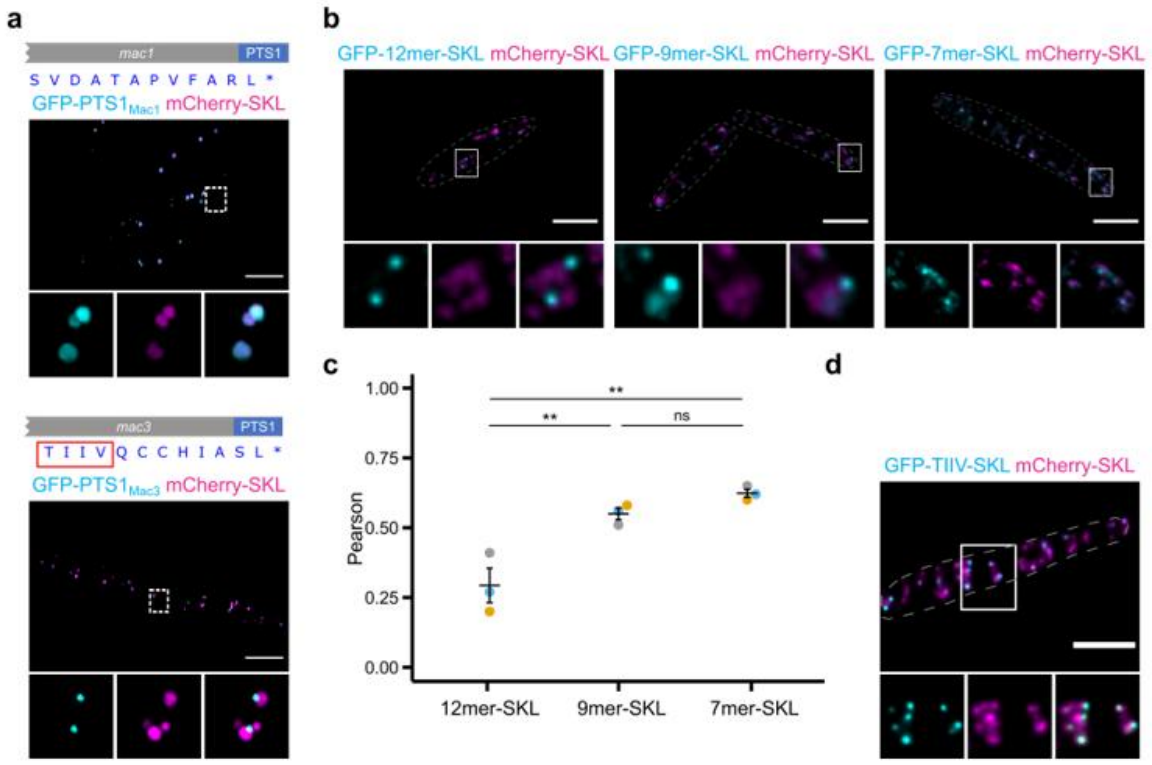


Abbildung 8: Ein kurzes Aminosäuremotiv ist notwendig und ausreichend für die Bildung peroxisomaler Subdomänen und Subpopulationen.
a Die letzten 12 Aminosäuren am C-Terminus (Dodecamere) von Mac1 und Mac3, die die PTS1-Motive enthalten sind dargestellt. Zellen, die GFP (cyan) fusioniert an dieses Dodecamer exprimieren, wurden mittels SIM analysiert. mCherry-SKL; magenta. Gezeigt sind repräsentative Bilder von Zellen. Vollständige Bilder sind als Überlagerungen von zwei Kanälen dargestellt. In den Ausschnitten sind die Signale der Einzelkanäle und ihre Überlagerung zu sehen. **b** Verkürzungen des C-terminalen Dodecamers wurden mit GFP (cyan) fusioniert und in Stämmen analysiert, die auch mCherry-SKL (magenta) exprimieren. Vollständige repräsentative Bilder sind als Überlagerungen der Signale aus GFP und mCherry Kanals dargestellt. In den Ausschnitten sind die Signale der Einzelkanäle und ihre Überlagerung gezeigt. Größenstandard: 5 µm**. c** Quantifizierung der Kolokalisation der in **b** gezeigten Experimente**.** Jeder Punkt spezifiziert ein biologisches Replikat. Mittlere Linie, Mittelwert; Fehlerbalken, Standardfehler des Mittelwerts. Die Signifikanz wurde mit einem einseitigen ANOVA mit post-hoc Tukey HSD Test bewertet. ** bezieht sich auf einen p-Wert kleiner oder gleich 0,01 und n.s. bezieht sich auf einen p-Wert größer als 0,05. **d** GFP, fusioniert mit einem Peptid, das aus dem kleinen Motiv Thr-Ile-Ile-Val (TIIV) und dem Prototyp PTS1 Ser-Lys-Leu (SKL) besteht, wurde zusammen mit mCherry-SKL exprimiert. Ein repräsentatives Bild ist gezeigt. Die Anordnung der Bilder entspricht **b**.

Mit Hilfe der Untersuchung von Verkürzungen des Dodecamers aus Mac3 gelang die Identifizierung eines kurzen Aminosäuremotivs mit der Sequenz Thr-Ile-Ile-Val (TIIV), dass für eine effiziente fokale Lokalisation von GFP ausreicht (Abb. 8b und 8c). Das Einfügen dieses Sequenzmotivs zwischen GFP und dem kanonischen SKL-Motiv vermittelt bereits eine fokale Akkumulation von GFP (Abb. 8d).

2.2.1 Die Bildung peroxisomaler Subpopulationen verläuft unabhängig vom Importweg in die Peroxisomen

Es stellte sich die Frage, ob der Importweg den die Proteine in die Peroxisomen wählen die Akkumulation in den Subdomänen/Subpopulationen beeinflusst. Es war möglich, dass dieser

Vorgang nur bei Proteinen stattfindet, die via PTS1 mit Hilfe von Pex5 importiert werden. Um dies zu testen, wurde ein Stamm hergestellt, der neben dem peroxisomalen Markerprotein mCherry-SKL auch ein PTS2-GFP-Reporterprotein exprimiert. Dieser Stamm diente als Kontrolle und wies eine hohe Kolokalisation beider Fluoreszenzsignale auf. Zusätzlich wurde ein Stamm hergestellt, der ein PTS2-GFP-Reporterprotein mit dem Zusatz der vier Aminosäuren TIIV an den C-terminus des GFPs, exprimieren kann (Abb. 9). Diese vier Aminosäuren waren ausreichend, um die Akkumulation von GFP in peroxisomalen Subdomänen hervorzurufen.

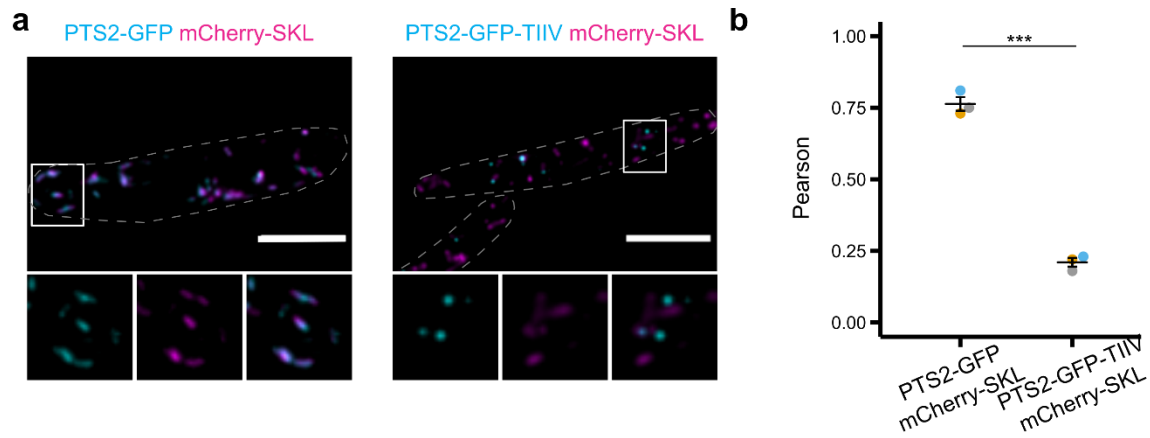


Abbildung 9: Die Akkumulation von GFP in peroxisomalen Subdomänen erfolgt auch beim PTS2-Import. **a** Repräsentative Aufnahmen von Zellen, die PTS2-GFP-Reporterproteine entweder mit oder ohne C-terminalem TIIV-Motiv (cyan) enthalten, wurden mit mCherry-SKL (magenta) koexprimiert. Vollständige Bilder werden als Überlagerungen der einzelnen Kanäle dargestellt. In den Ausschnitten sind einzelne Kanäle und überlagerte Kanäle abgebildet. Größenstandard: 5µm. **b** Quantifizierung zu den Experimenten aus **a**. Jeder Punkt spezifiziert ein biologisches Replikat. Mittlere Linie, Mittelwert; Fehlerbalken, Standardfehler des Mittelwerts. Die Signifikanz wurde durch einen ungepaarten, zweiseitigen Student's t-Test bewertet. *** bezieht sich auf einen p-Wert kleiner oder gleich 0,001.

Die Bildung peroxisomaler Subdomänen verläuft also unabhängig vom Importweg in die Peroxisomen.

2.2.2 Die Funktionalität des TIIV Motivs ist nicht auf Peroxisomen beschränkt

Um zu überprüfen, ob das Aminosäuremotiv TIIV nur in den Peroxisomen funktioniert oder auch in anderen Organellen aktiv ist, wurde ein Stamm hergestellt, der neben einem mitochondrialen Reporterprotein (MTS-mCherry) als weiteres mitochondriales Reporterprotein (MTS-GFP-TIIV) mit dem Zusatz der vier Aminosäuren TIIV an seinem C-Terminus exprimierte. Als Kontrolle diente ein Stamm der neben einem MTS-mCherry auch ein MTS-GFP exprimiert.

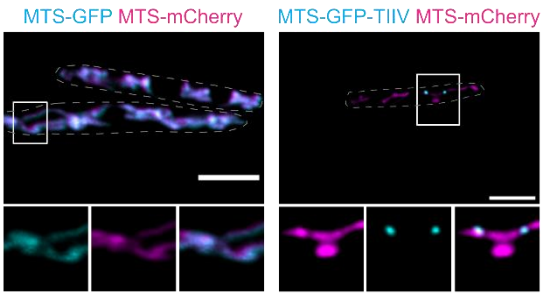


Abbildung 10: TIIV vermittelt ein fokale Loklaisierung in den Mitochondrien. GFP mit mitochondrialem Zielsteuerungssignal (MTS) am N-terminus und mit (rechts) oder ohne (links) C-terminalem TIIV-Motiv wurde zusammen mit MTS-mCherry exprimiert. Gezeigt sind repräsentative Epifluoreszenzbilder. In den vollständigen Bildern werden Überlagerungen der Fluoreszenzsignale der beiden Kanäle gezeigt. In den Ausschnitten sind die Signale einzelner Kanäle und die Überlagerungen gezeigt. Größenstandard: 5µm.

Das Experiment zeigte, dass der Zusatz der vier Aminosäuren TIIV ausreicht, um die Bildung fokaler Strukturen innerhalb der Mitochondrien auszulösen (Abb. 10).

Außerdem wurde die Funktionalität des TIIV-Motivs innerhalb des Zytosols der Zellen getestet. Dafür wurden Δ*pex5b* Deletionsstämme verwendet, die neben dem peroxisomalen Marker mCherry-SKL auch N-terminale GFP-Fusionen der beiden Acyltransferasen Mac3 und Mac1 exprimieren. In Abwesenheit des Importrezeptors Pex5b findet kein peroxisomaler Import in *U. maydis* statt (Ast *et al*, 2022).

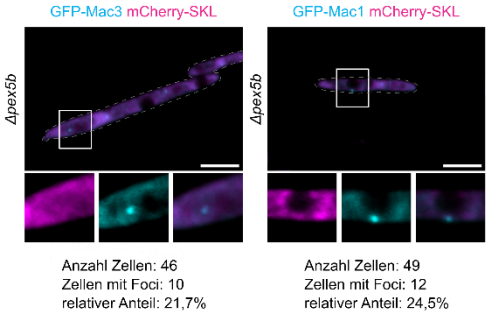


Abbildung 11: Bildung fokaler Strukturen im Zytosol von Δ*pex5b* Zellen. *U. maydis* Δ*pex5b* Mutanten, die N-terminale GFP-markierte Versionen von Mac3 (cyan) oder Mac1 (cyan) und das peroxisomale Markerprotein mCherry-SKL (magenta) exprimieren, wurden mittels Epifluoreszenzmikroskopie untersucht. Vollständige Bilder sind als Überlagerungen der Signale beider Kanäle dargestellt. In den Ausschnitten sind die Signale der Einzelkanäle und ihre Überlagerung dargestellt. Größenstandard: 5µm.

Es konnte die Bildung vereinzelter fokaler Strukturen innerhalb des Zytosol beobachtet werden (Abb. 11). Dies geschah jedoch mit deutlich niedrigerer Effizienz im Vergleich mit den Organellen. Nur in 20-25% der Zellen waren diese Strukturen zu beobachten. Außerdem waren im Durchschnitt nur etwa zwei Foci pro Zelle zu sehen (Abb. 11). Insgesamt zeigen diese Ergebnisse, dass das TIIV Motiv nicht nur in den Peroxisomen funktioniert. Die Bildung fokaler Strukturen erscheint effektiver, wenn die TIIV-haltigen Proteine in einem Organell konzentriert vorliegen.

2.2.3 Die Identität der ersten und der letzten Aminosäure im TIIV Motiv ist für die Bildung der Subdomänen entscheidend

Anschließend wurde untersucht, welche Aminosäuren des TIIV-Motivs besonders wichtig für die Bildung fokaler Strukturen sind. Um diese Aminosäuren zu identifizieren, wurden Varianten mit einzelnen Aminosäuresubstitutionen hergestellt (Abb. 12). Dafür wurde zuerst jede einzelne Aminosäure des Motivs durch ein Alanin ersetzt. Die Substitution des ersten und letzten Rests durch Alanin erhöhte die Kolokalisation von GFP mit mCherry-SKL deutlich. Daraufhin wurden noch andere Aminosäuren an erster und letzter Stelle getestet. Der größte Effekt wurde beobachtet, wenn anstelle von Valin an Position vier ein Arginin vorhanden war (Abb. 12a und b). Diese Stämme exprimieren darüber hinaus noch den peroxisomalen Marker mCherry-SKL.

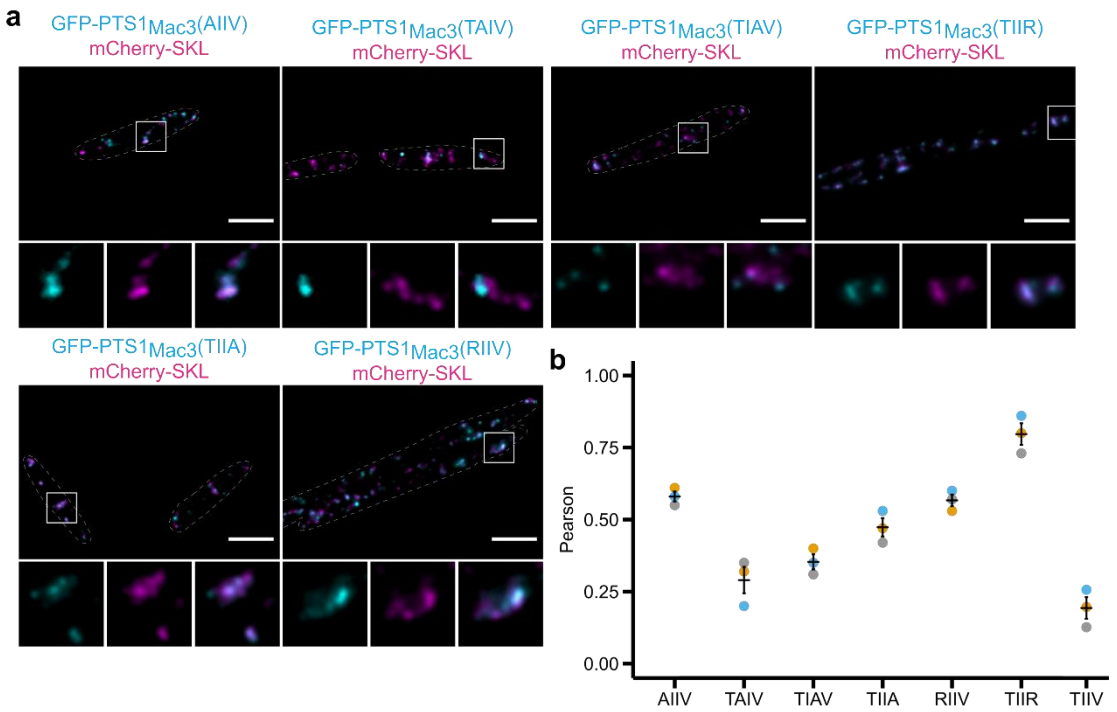


Abbildung 12: Die erste und die letzte Aminosäure im TIIV Motiv sind für die Bildung der Subpopulationen und Subdomänen entscheidend. a Repräsentative Bilder der Lokalisation von GFP (cyan) in Fusion mit den mutierten Varianten des Motivs. mCherry-SKL (magenta) diente als Marker für die Peroxisomen. In den vollständigen Bildern ist die Überlagerung der Signale aus beiden Kanälen dargestellt. In den Ausschnitten sind die Signale der Einzelkanäle und die Überlagerung der Signale zu sehen. Größenstandard: 5µm. **b** Die Quantifizierung zeigt die Pearson-Korrelationskoeffizienten von GFP- und mCherry-Signalen für die angegebenen Varianten. Jeder Punkt spezifiziert ein biologisches Replikat. Mittlere Linie, Mittelwert; Fehlerbalken, Standardfehler des Mittelwerts.

Aufgrund dieser Ergebnisse wurde ein GFP an Mac3 fusioniert, dass die V-zu-R-Substitution (GFP-Mac3-V_{570}R) enthält. Dieses Fusionsprotein zeigte eine deutliche Kolokalisation mit mCherry-SKL (Abb. 13a und 13b). Außerdem wurde ein Stamm hergestellt, der neben GFP-Mac3-V_{570}R auch noch mCherry-Mac3 exprimiert (Abb. 13a). Es zeigte sich, dass die V_{570}R

Mutation die Bildung fokaler Strukturen drastisch beeinträchtigt und mCherry-Mac3 und GFP-Mac3-V_{570}R nicht mehr gut kolokalisieren (Abb. 13b).

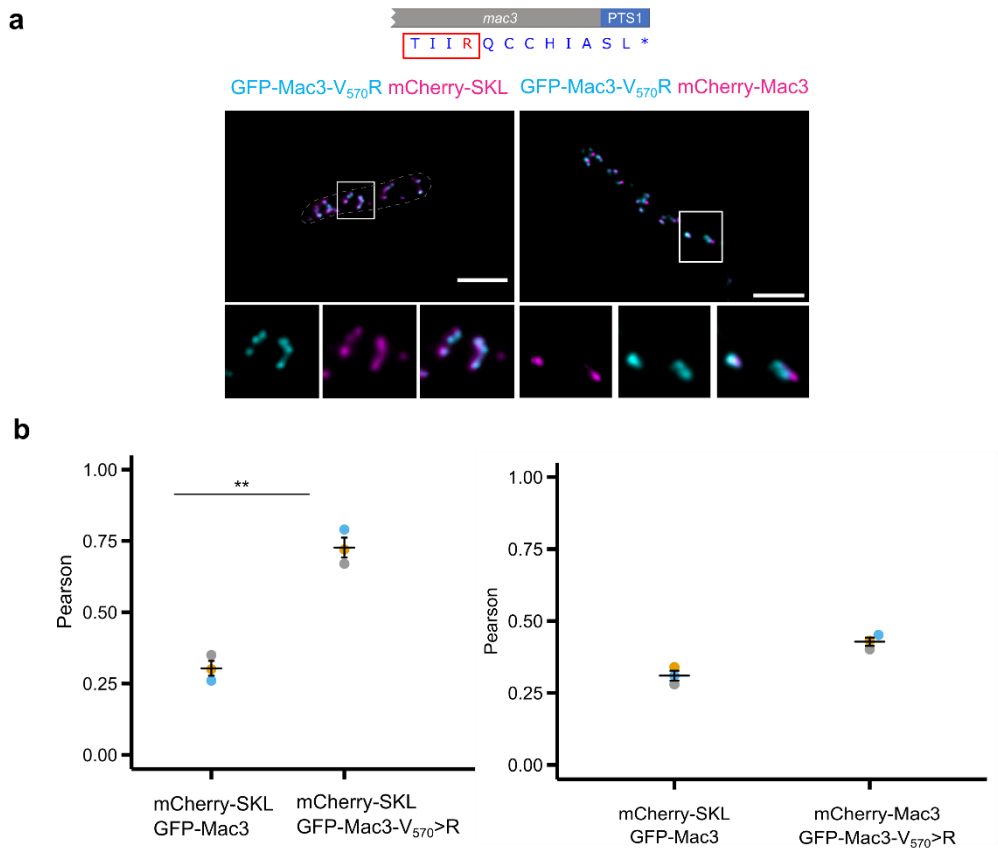


Abbildung 13: TIIV ist für fokale Lokalisation von Mac3 innerhalb des peroxisomalen Lumen und die Bildung von Subpopulationen notwendig. a Eine Variante von Mac3, die eine V-zu-R-Substitution innerhalb des TIIV-Motivs enthält, wurde mit GFP (cyan) markiert und die Lokalisation wurde mittels Epifluoreszenzmikroskopie in Stämmen analysiert, die entweder mCherry-SKL (magenta) oder mCherry-Mac3 (magenta) exprimieren. In den vollständigen Bildern ist Überlagerung der Signale aus beiden Kanälen dargestellt. In den Ausschnitten sind die Signale der Einzelkanäle und die Überlagerung der Signale zu sehen. Größenstandard: 5µm. **b** Quantifizierungen mittels Pearson Korrelation zu den Experimenten aus **a.** Jeder Punkt spezifiziert ein biologisches Replikat. Mittlere Linie, Mittelwert; Fehlerbalken, Standardfehler des Mittelwerts. Die Signifikanz wurde durch einen ungepaarten, zweiseitigen Student's t-Test bewertet. ** spezifiziert einen p-Wert kleiner oder gleich 0,01.

Diese Ergebnisse zeigen, dass das TIIV-Motiv für die fokale Lokalisation und Anreicherung in Peroxisomen Subpopulationen notwendig ist. Mutationen innerhalb des Motivs können zu einer gleichmäßigen Lokalisation von Mac3 führen.

2.2.4 Das TIIV Motiv fördert die Bildung von Aggregaten *in vitro*

Im nächsten Schritt wollte ich verstehen, wie sich die fokalen Strukturen innerhalb der Peroxisomen bilden. Es bestand die Möglichkeit, dass es sich um Kondensate handelt, die durch Selbstaggregation zu Stande kommen. Tatsächlich zeigen *in-silico* Analysen mit dem Aggrescan Tool (Conchillo-Solé *et al*, 2007), dass TIIV die Aggregationsfähigkeit beeinflussen könnte (Abb. 14a). Daher wurde ein *in vitro* Aggregationstest mit aus *Eschericha coli*

gereinigtem 6xHis-markiertem Mac3 durchgeführt. Es zeigte sich, dass dieses Fusionsprotein schneller und in größerem Umfang aggregiert als die Variante Mac3-V_{570}R (Abb. 14b). Analog zeigte gereinigtes 6xHis-GFP-TIIV eine deutlichere Aggregation als 6xHis-GFP-TIIR (Abb. 14c).

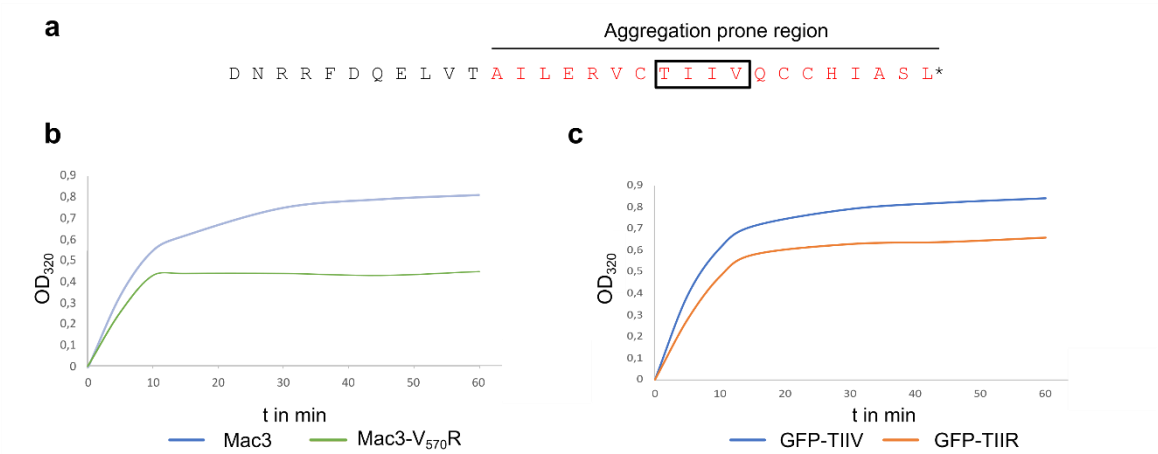


Abbildung 14: Ein kurzes Peptidmotiv verstärkt Aggregation *in vitro*. a Das TIIV-Motiv von Mac3 ist in einer aggregationsanfälligen Region lokalisiert. **b** Die Aggregation von His-markierten Versionen von Mac3-Proteinen wurde im Zeitverlauf gemessen. **c** Wie in **(b)**, aber die Aggregation der His-markierten Versionen von GFP-TIIV und GFP-TIIR wurde über die Zeit gemessen.

Diese *in vitro* Ergebnisse decken sich gut mit unseren *in vivo* Beobachtungen, wobei das TIIV-Motiv auch nur einen Teil eines komplexeren Mechanismus sein könnte. Insgesamt lassen die bisherigen Experimente vermuten, dass TIIV als Motiv für die Selbstorganisation von Proteinen wirkt und dies zur Kompartimentierung von Mac3 in peroxisomalen Subdomänen führt, was für die Bildung von Subpopulationen ausreicht.

2.2.5 Mac1 und Mac3 befinden sich in detergensresistenten Strukturen, die auch das Enzym Urat-Oxidase enthalten

In ultrastrukturellen Untersuchungen der Peroxisomen aus Säugetieren wurden parakristalline Kernstrukturen mit hoher Elektronendichte identifiziert, die als Hauptbestandteil das am Purin Abbau beteiligte Enzym Urat-Oxidase enthalten (Volkl *et al*, 1988). Es ergab sich die Vermutung, dass es sich bei diesen Strukturen, um mit den Mac1 und Mac3 Subdomänen vergleichbare Kondensate handeln könnte. Daher wurde die Lokalisation des putativen Orthologs der Urat-Oxidase aus *U. maydis* (UMAG_00672) mit Hilfe einer N-terminalen GFP-Fusion (GFP-Uox1) mit Fluoreszenzmikroskopie untersucht.

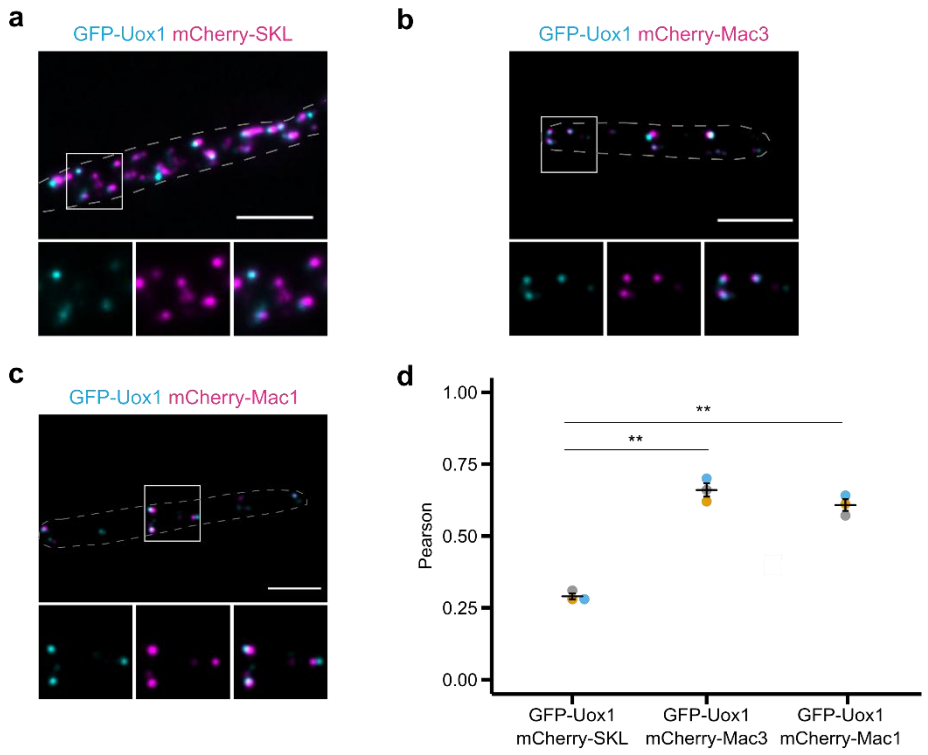


Abbildung 15: Die Urat-Oxidase aus *U. maydis* lokalisiert in peroxisomale Subdomänen und Subpopulationen. a Repräsentative epifluoreszenzmikroskopische Bilder von Zellen, die GFP-Uox1 (cyan) und mCherry-SKL (magenta) exprimieren. Vollständige Bilder werden als Überlagerungen der Signale von zwei Kanälen dargestellt. In den Ausschnitten sind die Signale der einzelnen Kanäle und die Überlagerungen abgebildet. Größenstandard: 5µm. **b** GFP-Uox1 und mCherry-Mac3; Aufbau der Abbildung wie in **a**. **c** GFP-Uox1 und mCherry-Mac1; Aufbau der Abbildung wie in **a**. **d** Quantifizierung der Kolokalisation der Experimente aus **a-c**. Dargestellt sind die Mittelwerte von drei Replikaten. Unterschiedliche Farben kennzeichnen einzelne Experimente. Mittlere Linie, Mittelwert; Fehlerbalken, Standardfehler des Mittelwerts. Die statistische Signifikanz wurde mit einem einseitigen ANOVA mit post-hoc Tukey HSD-Test berechnet. ** spezifiziert einen p-Wert kleiner oder gleich 0,01.

Vergleichbar mit den beiden Acyltransferasen Mac1 und Mac3, akkumuliert GFP-Uox1 in distinkten Foci innerhalb der Peroxisomen und segregiert in peroxisomale Subpopulationen (Abb. 15a). Dies deutet darauf hin, dass sich in *U. maydis* alle drei Proteine in ähnlichen Strukturen befinden. Tatsächlich führte die gemeinsame Expression von GFP-Uox1 und mCherry-Mac1 oder GFP-Uox1 und mCherry-Mac3 zu einem hohen Grad an Kolokalisation (Abb. 15b und c).

Es war bereits bekannt, dass die Kernstrukturen, die sich in den Peroxisomen in der Leber von Ratten befinden, einer Behandlung mit nichtionischen Detergenzien standhalten können (Tsukada et al., 1966). Daher wurden mit Hilfe von differentieller Zentrifugation Organellen aus Stämmen präpariert (Cramer *et al*, 2015), die mCherry-SKL und GFP-Mac3, mCherry-Mac3 und GFP-Uox1 oder mCherry-Mac1 und GFP-Mac3 enthielten. Mit Triton X-100 behandelte und unbehandelte Proben wurden mittels Epifluoreszenzmikroskopie untersucht.

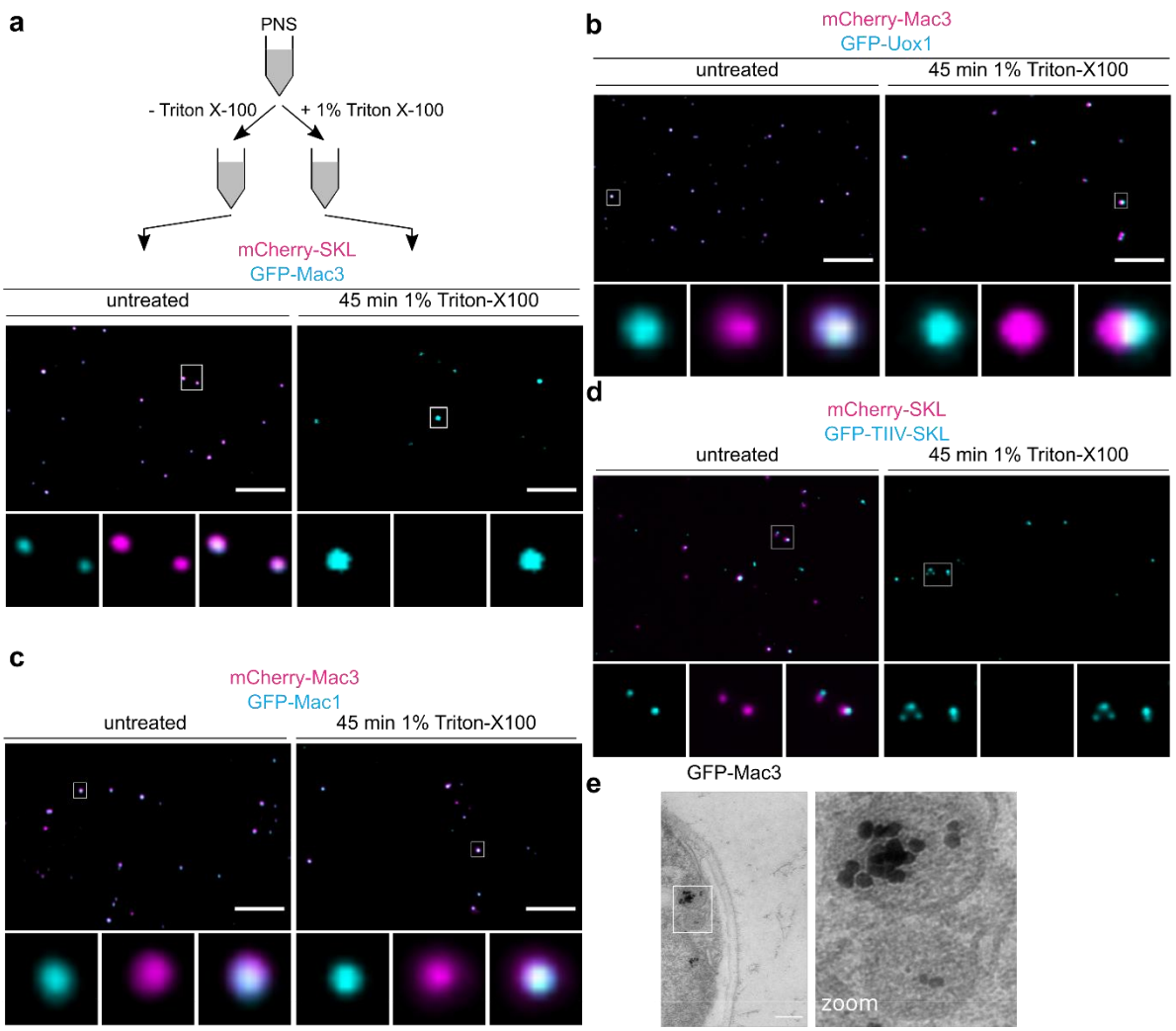


Abbildung 16: Mac1 und Mac3 assemblieren in Strukturen, die resistent gegenüber einer Behandlung mit Detergens sind und auch die Urat-Oxidase Uox1 enthalten. a Organell-Präparationen aus den angegebenen Stämmen wurden nach 45-minütiger Inkubation in Lysepuffer (links) oder mit Triton X-100 versetztem Lysepuffer (rechts) mittels Epifluoreszenzmikroskopie analysiert. In den Ausschnitten sind die Signale der einzelnen Kanäle und die überlagerten Signale abgebildet. Größenstandard: 5µm. **b-d** Das Experiment wurde wie in (a) für die angegebenen Proteine durchgeführt. Größenstandard: 5 µm. **e** Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme von Zellen, die GFP-Mac3 exprimieren. Die Färbung erfolgte durch Markierung von GFP-Mac3 mit Anti-GFP und anschließender Immunogold-Markierung verstärkt durch Silberpartikel. Größenstandard: 0,2 µm.

Während mCherry-SKL sehr empfindlich auf die Behandlung mit Triton X-100 reagierte, blieben Mac1, Mac3 und Uox1 innerhalb der punktförmigen Strukturen sichtbar (Abb. 16a – 16c). Sogar die GFP-TIIV-SKL positiven Foci stellten sich als Triton X-100 resistente Strukturen heraus (Abb. 16d). Das kleine Motiv TIIV löst demnach vermutlich die Bildung stabiler Kondensate aus, die den schon zuvor bekannten parakristallinen Kernstrukturen der Peroxisomen ähneln könnten.

Ferner konnte mit Hilfe der Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) in Kombination mit Immunogoldmarkierung eine fokale Akkumulation von GFP-Mac3 im peroxisomalen Lumen nachgewiesen werden (Abb. 16e). Die Transmissionselektronenmikroskopie wurde in Zusammenarbeit mit Thomas Heimerl durchgeführt.

2.2.6 Die beiden Acyltransferasen Mac3 und Mac1 lokalisieren unabhängig voneinander in peroxisomale Kernstrukturen

Während Mac3 ein TIIV Motiv enthält, das für die Akkumulation in fokalen Strukturen ausreichend ist, konnten wir in Mac1 kein derartiges Motiv identifizieren. Mac1 könnte ein bisher noch unbekanntes Signal enthalten. Alternativ könnte Mac1 auf Mac3 angewiesen sein, um in peroxisomalen Subdomänen zu lokalisieren.

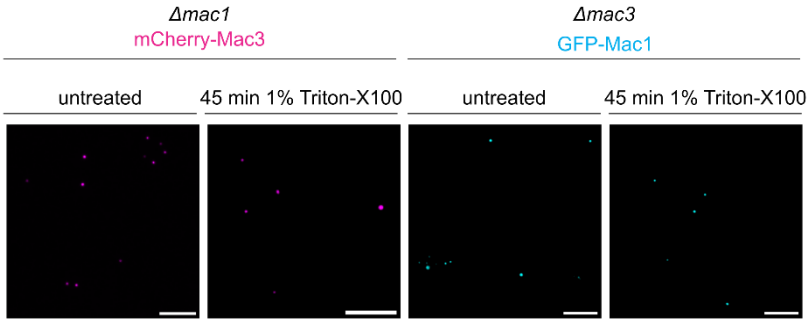


Abbildung 17: Die beiden Acyltransferasen Mac3 und Mac1 lokalisieren unabhängig voneinander in peroxisomale Kernstrukturen. Organellen Extrakte der angegebenen Stämme wurden nach 45-minütiger Inkubation in Lysepuffer (links) oder in mit Triton X-100 angereichertem Lysepuffer (rechts) mittels Epifluoreszenzmikroskopie analysiert. Größenstandard: 5µm.

Um zwischen diesen beiden Möglichkeiten zu unterscheiden wurden Organellenextrakte aus Zellen präpariert die entweder GFP-Mac1 in Δ*mac3* Zellen oder mCherry-Mac3 in Δ*mac1* Zellen exprimieren. Anschließend wurden diese Organellenpräparationen mit Triton X-100 behandelt und fluoreszenzmiroskopisch untersucht. In beiden Experimenten konnten Kondensate beobachtet werden, die auch nach Behandlung mit Triton X-100 stabil blieben (Abb. 17). Eine Interaktion der beiden Proteine ist demnach nicht ursächlich für die Akkumulation von Mac1 in den peroxisomalen Subdomänen.

2.2.7 Peroxisomale Subpopulationen entstehen nicht durch selektiven Import

Aus den bisherigen Experimenten wurde klar, dass sich die beiden Acyltransferasen Mac1 und Mac3 unabhängig vom Importweg nur in einer Teilmenge der Peroxisomen anreichern. Nun stellte sich die Frage, ob dieses Phänomen durch selektiven Import in bestimmte Peroxisomen hervorgerufen wird oder ob die Anreicherung in peroxisomalen Subpopulationen aus einer ungleichen Verteilung der luminalen Subdomänen während der Proliferation der Organellen resultiert. Zur Klärung dieser Frage wurde ein Experiment durchgeführt, in dem ein Puls von neusynthetisiertem GFP-Mac3 über die Zeit verfolgt wurde. Während mCherry-SKL konstitutiv exprimiert war, stand GFP-Mac3 unter der Kontrolle eines Arabinose-induzierbaren und Glukose-repressiblen *crg*-Promotors (Brachmann *et al*, 2001). Eine GFP-markierte

Version der Acyl-CoA-Oxidase 1 (Aox1; UMAG_02208), die bei konstitutiver Expression gleichmäßig in den Peroxisomen verteilt ist (Abb. 18a), diente in diesem Experiment als Kontrolle.

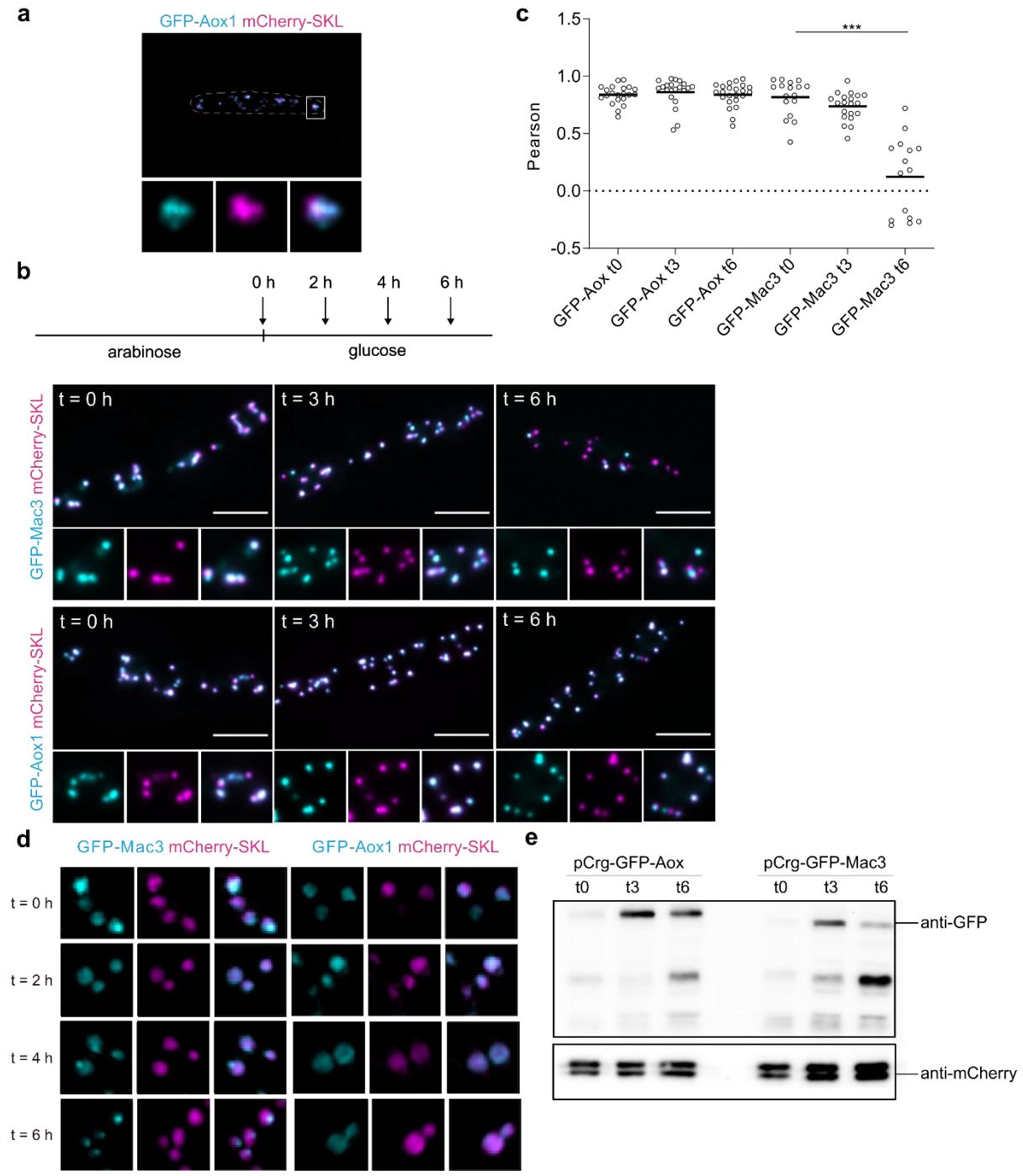


Abbildung 18: Peroxisomale Subpopulationen und Subdomänen bilden sich nicht durch selektiven Import. **a** *U. maydis* Stämme, die eine N-terminale GFP-markierte Version von Aox1 (cyan) und das peroxisomale Markerprotein mCherry-SKL (magenta) exprimieren, wurden mittels Epifluoreszenzmikroskopie untersucht. Die vollständigen Bilder sind als Überlagerungen des grünen und roten Kanals dargestellt. In den Ausschnitten sind einzelne Kanäle und überlagerte Kanäle gezeigt. Größenstandard: 5 µm. **b** Die Zellen wurden 2 Stunden lang in arabinosehaltigen Medium inkubiert, um die Expression der GFP-Fusionsproteine zu induzieren. Die Expression wurde durch Überführung in glukosehaltiges Medium gestoppt. Die Zellen wurden anschließend zu den angegebenen Zeitpunkten mittels Epifluoreszenzmikroskopie analysiert (unten). Die Lokalisation von GFP-Mac3 (cyan) wurde mit GFP-Aox1 (cyan) verglichen. Als Marker für die Peroxisomen diente mCherry-SKL (magenta). **c** Quantifizierung der Kolokalisation aus dem in **b** beschriebenen Experiment. Jeder Datenpunkt spezifiziert eine Zelle. Die Signifikanz wurde durch einen ungepaarten, zweiseitigen Student's t-Test bewertet. *** bezieht sich auf einen p-Wert kleiner oder gleich 0,001. **d** Experiment und Farbgebung wie in **c**. Die Zellen wurden zu den angegebenen Zeitpunkten nach Zugabe von Glukose mittels SIM analysiert. **e** Western Blot Analyse der Stabilität untersuchter Proteine während des „Pulse-Chase“ Experiments.

Die Induktion der GFP-Fusionsproteine wurde durch Inkubation in Medium mit Arabinose erzielt (Abb. 18b). Durch das Überführen der Zellen in Medium mit Glukose wurde eine weitere Genexpression gestoppt. Anschließend wurde die Lokalisation der fluoreszierenden Proteine zu verschiedenen Zeitpunkten mit Epifluoreszenzmikroskopie untersucht (Abb. 18b). Sowohl GFP-Mac3 als auch GFP-Aox1 waren zunächst gleichmäßig in den Peroxisomen verteilt (Abb. 18b). Zu späteren Zeitpunkten akkumulierte GFP-Mac3, aber nicht GFP-Aox1, in distinkten Foci und die Kolokalisation mit mCherry-SKL war deutlich reduziert (Abb. 18b - 18d). Außerdem konnte gezeigt werden, dass GFP-Aox1 stabiler über die Dauer des Experiments war und eine verringerte Degradation im Vergleich zu GFP-Mac3 aufwies (Abb. 18e). Diese Ergebnisse zeigen, dass peroxisomale Subdomänen nach dem Import in die Organellen entstehen. Subpopulationen entstehen vermutlich durch die Teilung der Peroxisomen, die zu einer ungleichen Verteilung der Subdomänen führen könnte. Selektive Degradation von GFP-Mac3 könnte zudem eine Rolle spielen.

2.2.8 Die peroxisomale Protease Lon hat keinen Einfluss auf die Bildung peroxisomaler Subdomänen

Sowohl aus Pilzen als auch aus Pflanzen ist bekannt, dass Proteasen aus der LON-Familie die Stabilität von bestimmten peroxisomalen Proteinen regulieren und außerdem für den Abbau von fehlgefalteten Aggregaten zuständig sind. Zusammen mit dem Prozess der Autophagie regulieren LON-Proteasen die Proteinhomöostase in Peroxisomen und sind essentiell für deren Funktionsfähigkeit. Bei LON-Proteasen handelt es sich um Proteasen aus der AAA+ Familie. Sie weisen eine konservierte LON-Domäne an ihrem N-terminus auf und besitzen des Weiteren eine AAA+ ATPase-Domäne und eine Peptidase-Domäne an ihrem C-terminus. Neben der proteolytischen Aktivität haben LON-Proteasen auch noch eine Funktion indem sie als Chaperon dienen können und die Faltung von peroxisomalen Proteinen unterstützen (Aksam *et al*, 2007; Goto-Yamada *et al*, 2014).

Um den Einfluss der LON-Protease aus *Ustilago maydis* (Um05558) auf die Stabilität peroxisomaler Matrixproteine zu überprüfen, wurde das zugehörige Gen in einem Stamm deletiert, der den peroxisomalen Marker mCherry-SKL exprimiert. In diesen Stamm wurden die beiden Konstrukte GFP-Mac3 und GFP-Aox1 in den Cbx-Lokus eingebracht. Danach wurde die Kolokalisation beider Fluoreszenzsignale mit Hilfe der Pearson Korrelation quantifiziert.

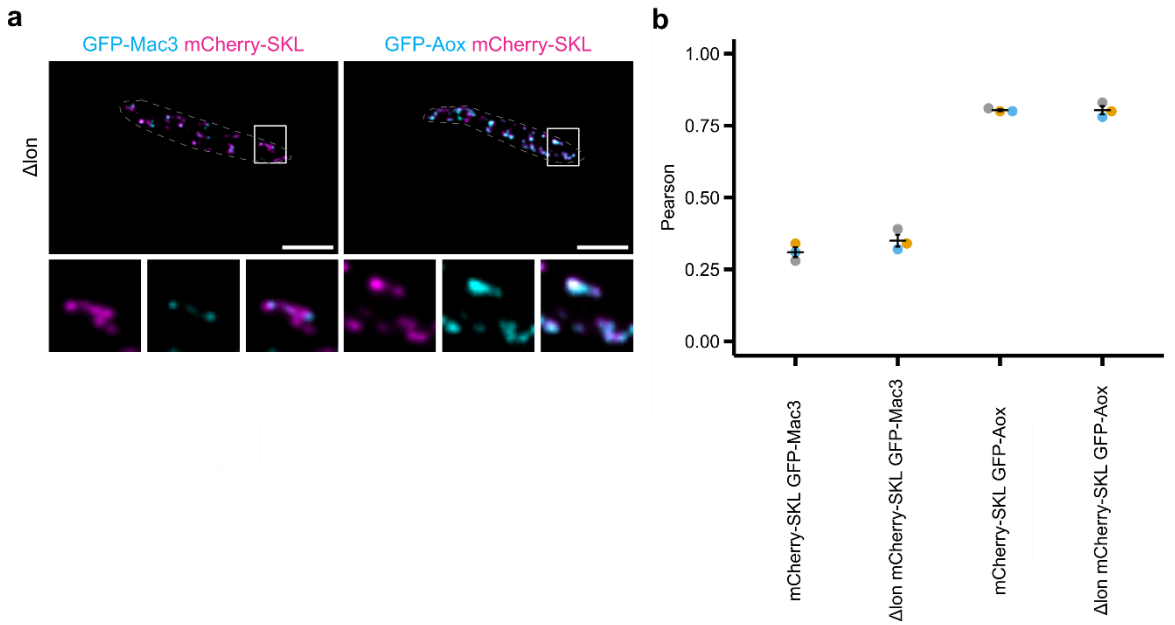


Abbildung 19: Die Deletion der peroxisomalen LON-Protease hat keinen Einfluss auf die Kolokalisation
a *U. maydis Lon*-Deletionsstämme, die N-terminal GFP-markierte Versionen von Mac3 oder Aox (cyan) und das peroxisomale Markerprotein mCherry-SKL (magenta) exprimieren, wurden mittels Epifluoreszenzmikroskopie untersucht. Vollständige Bilder werden als Überlagerungen der Signale von zwei Kanälen dargestellt. In den Ausschnitten sind die Signale der einzelnen Kanäle und die Überlagerungen abgebildet. Größenstandard: 5µm. **b** Quantifizierungen zeigen die Pearson-Korrelationskoeffizienten der GFP- und mCherry-Signale für die angegebenen Stämme. Jeder Punkt spezifiziert ein biologisches Replikat. Mittlere Linie, Mittelwert; Fehlerbalken, Standardfehler des Mittelwerts.

Diese Experimente zeigten, dass die peroxisomale LON-Protease keinen signifikanten Einfluss auf die Kolokalisation beider Fluoreszenzsignale hatte (Abb. 19) und die Bildung peroxisomaler Subdomänen nicht beeinflusst, indem es spezifisch für den Abbau asymmetrisch lokalisierender Proteine verantwortlich ist.

2.2.9 Die Rolle von Autophagie bei der Bildung peroxisomaler Subdomänen

Eine weitere Möglichkeit wäre, dass die Peroxisomen mit Kernstrukturen selektiv durch Autophagie abgebaut werden könnten. Daher sollte zunächst überprüft werden, ob sich die Bildung peroxisomaler Subpopulationen bzw. Subdomänen ändert, wenn Autophagie blockiert wird. Dafür wurde das für Autophagie essentielle Gen *atg8* (Um05567) im Stamm MB215 mCherry-SKL GFP-Mac3 deletiert (nachfolgend als Δ*atg8* bezeichnet). ATG8 wirkt ähnlich wie Ubiquitin und kann Proteine bzw. Zellorganellen für den Abbau durch das Autophagosom markieren. Es ist essentiell für die Herausbildung der Doppelmembran um das entstehende Autophagosom (Ichimura *et al*, 2004).

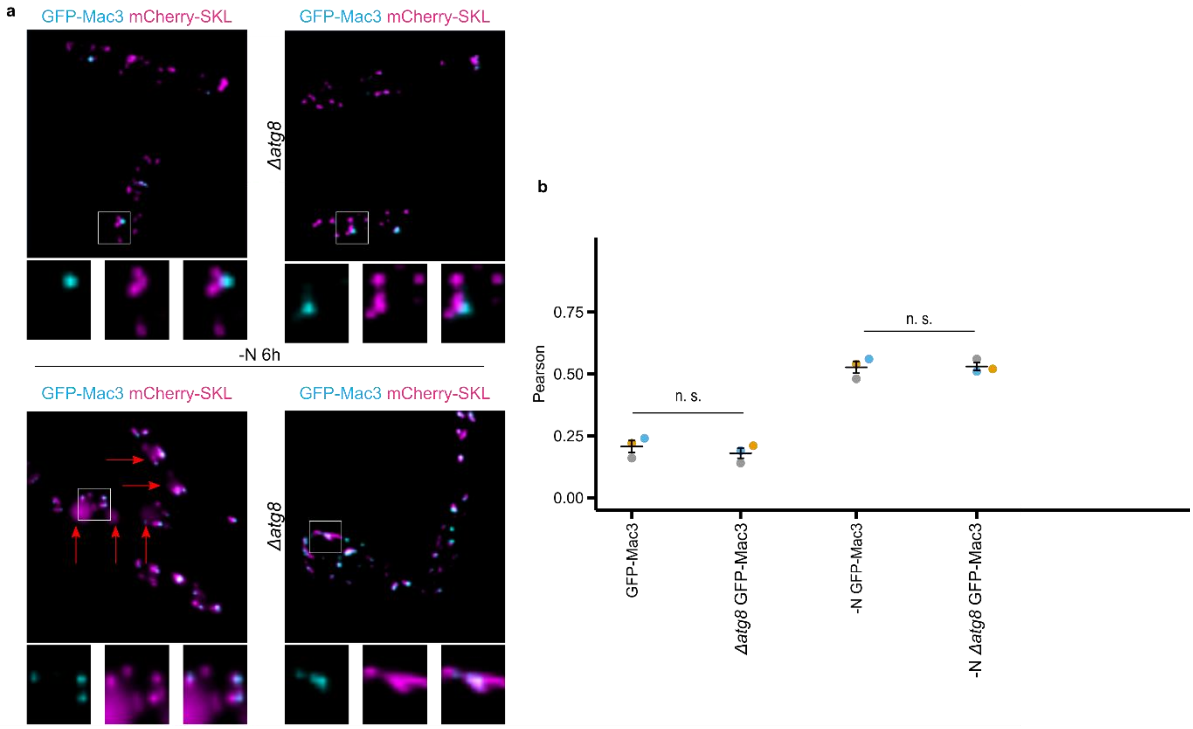


Abbildung 20. Der Einfluss von Autophagie auf die Bildung peroxisomaler Subpopulationen bzw. Subdomänen.
a Die peroxisomale Lokalisation von GFP-Mac3 wurde im Stamm MB215 mCherry-SKL bzw. MB215 mCherry-SKL Δ*atg8* untersucht. Die fluoreszenzmikroskopische Analyse zeigt eine Akkumulation von GFP-Mac3 in fokalen Strukturen innerhalb der Peroxisomen, wenn die Zellen unter normalen Bedingungen gewachsen sind (oben) und eine bessere Kolokalisation von GFP-Mac3 mit dem peroxisomalen Marker mCherry-SKL, wenn die Zellen für 6 Stunden ohne eine Stickstoffquelle gewachsen sind (unten). Stickstoffmangel löst Autophagie im Stamm MB215 mCherry-SKL aus (Bildung von Vakuolen (rote Pfeile) mit Akkumulierung des mCherry Signals in diesen), während der Stamm MB215 mCherry-SKL *Δatg8* nicht mehr in der Lage ist Autophagie zu induzieren. Vollständige Bilder werden als Überlagerungen der Signale von zwei Kanälen dargestellt. In den Ausschnitten sind die Signale der einzelnen Kanäle und die Überlagerungen abgebildet. Größenstandard: 5µm. **b** Quantifizierung zu den Experimenten aus **a**. Jeder Punkt spezifiziert ein biologisches Replikat. Mittlere Linie, Mittelwert; Fehlerbalken, Standardfehler des Mittelwerts. Die Signifikanz wurde durch einen ungepaarten, zweiseitigen Student's t-Test bewertet. n.s. bezieht sich auf einen p-Wert größer als 0,05.

Unter Autophagie induzierenden Bedingungen (-N) zeigte sich eine deutliche Zunahme der Kolokalisation von mCherry-SKL und GFP-Mac3, jedoch sowohl im WT als auch in der Mutante (Abb. 20a und b). Manche rot fluoreszierenden Proteine können als Marker für die Autophagie von Organellen benutzt werden, da sie auch in der Vakuole stabil bleiben (Riccio *et al*, 2019). Eine Akkumulation des gegenüber vakuolärer Degradation stabilen mCherry innerhalb der Vakuolen war in den Δ*atg8*- Mutanten nicht zu erkennen, was auf den Verlust der Autophagie in Δ*atg8* Zellen hinweist. Diese Daten zeigen, dass peroxisomale Subdomänen nicht durch eine selektive Autophagie abgebaut werden. Auch in Autophagie Mutanten bilden sich immer noch peroxisomale Subdomänen und Subpopulationen aus.

2.3 Peroxisomale Kernstrukturen dienen der metabolischen Kompartimentierung

2.3.1 Die Bildung peroxisomaler Kernstrukturen ist für die Bildung von Glykolipiden nicht relevant.

Im weiteren Verlauf dieser Arbeit wurde die physiologische Funktion der peroxisomalen Kernstrukturen untersucht. Zunächst stellte sich die Frage, ob die Mac3-Variante GFP-Mac3-V_{570}R, die nicht mehr in den Kernstrukturen lokalisiert, noch in der Lage ist, MELs zu produzieren. Daher wurde in Zusammenarbeit mit Björn Sandrock die Aktivität von GFP-Mac3 und GFP-Mac3-V_{570}R *in vivo* untersucht. Diese Analyse erfolgte in Stämmen, denen die Acyltransferase Mac2 fehlt (Δ*mac2*), da sich die beiden Enzyme Mac2 und Mac3 in ihrer Funktion überlappen, was die Einschätzung erschweren könnte (Hewald *et al*, 2006; Becker *et al*, 2021).

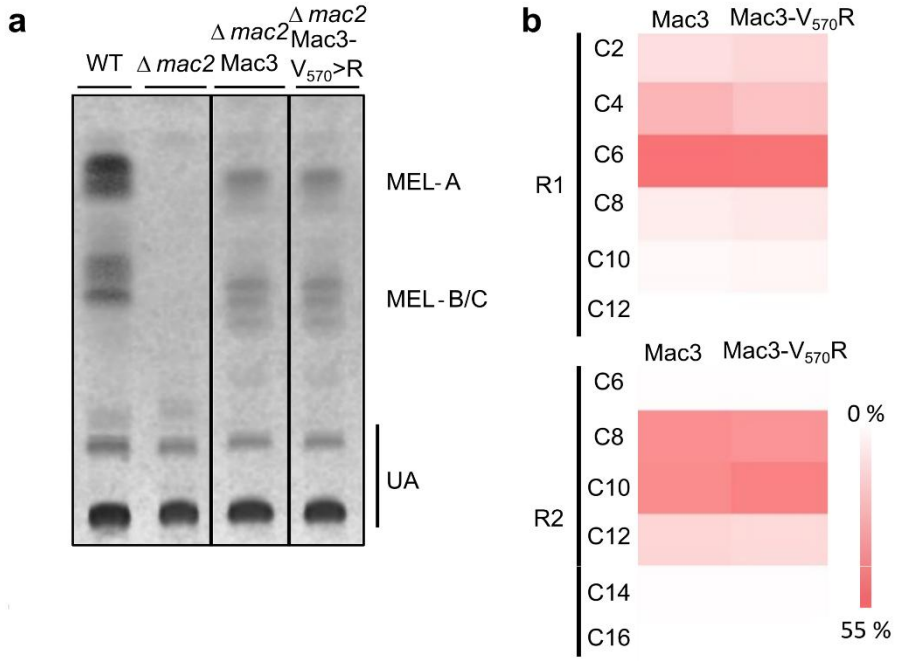


Abbildung 21: Die Variation Mac3-V_{570}R beeinflusst nicht die Fähigkeit der Acyltransferase Mac3 MELs zu produzieren. a Die von den angegebenen Stämmen produzierten MELs wurden mittels Dünnschichtchromatographie analysiert. MEL-Varianten, die anhand ihrer Acylreste unterschieden werden können (Hewald *et al*, 2006), bezeichnet man als MEL-A und MEL-B/C; Ustilaginsäuren (UAs) sind eine andere Klasse von Glykolipiden, die von *U. maydis* produziert, aber nicht in Peroxisomen synthetisiert werden (Freitag *et al*, 2014; Teichmann 2006). **b** Die Heatmaps zeigen die Acylierungsmuster der MELs am Zuckergrundgerüst, die sich durch Expression von Mac3 bzw. Mac3-V_{570}R ergaben. Die Daten wurden aus einer LC-MS-Analyse abgeleitet

Die unter Stickstoffmangel hergestellten MELs aus den Stämmen, die entweder GFP-Mac3 oder GFP-Mac3-V_{570}R in Δ*mac2* Zellen exprimieren, wurden präpariert und weiter

charakterisiert. Die Zusammensetzung und Menge der MELs wurde mit Hilfe von Dünnschichtchromatographie und zusätzlich mit Hilfe von Massenspektrometrie (LC-MS) bestimmt (Abb. 21a und b). Es war überraschend, dass die Expression beider Enzymvarianten zur Produktion vergleichbarer Mengen nahezu identischer MEL-Varianten führte. Die Herstellung von Glykolipide verläuft demnach unabhängig von der Bildung der peroxisomalen Kernstrukturen.

2.3.2 Unterschiedliche Acyl-CoA Oxidasen lokalisieren nicht in den peroxisomalen Kernstrukturen

Da die Lokalisation von Mac3 in den Kernstrukturen und die damit verbundene Ausbildung von peroxisomalen Subpopulationen nicht wesentlich für die Synthese von MELs zu sein scheint, hat diese Segregation vermutlich eine andere biologische Funktion. Es war aufgefallen, dass die Acyl-CoA-Oxidase Aox1 - ein typisches β-Oxidationsenzym - sich nicht im Laufe der Zeit in peroxisomalen Kernstrukturen anreicherte (Abb. 18a). Es stellte sich die Frage, ob andere Enzyme mit einer Funktion während der β-Oxidation ebenfalls nicht in die Kernstrukturen gelangen können. Tatsächlich lokalisierten zwei weitere Acyl-CoA-Oxidasen mit möglicher Funktion beim Fettsäureabbau (Ast *et al*, 2022) auch nicht in den peroxisomalen Kernstrukturen (Abb. 22). Es ergab sich die Hypothese, dass Kernstrukturen und resultierende Subpopulationen zu einem Raum für eine ungestörte peroxisomale Fettsäureoxidation führen könnten.

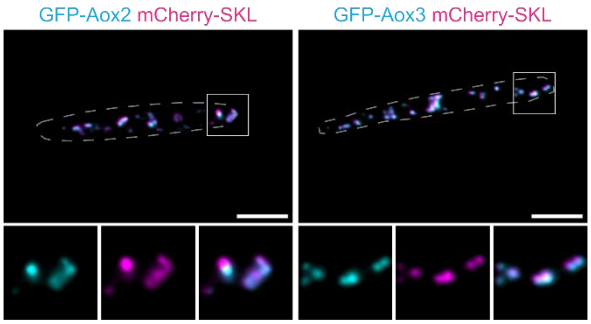


Abbildung 22: Zwei weitere Enzyme mit potentieller Relevanz für die β-Oxidation liegen nicht in den peroxisomalen Kernstrukturen vor. Repräsentative Epifluoreszenzbilder von Zellen, die GFP-fusioniert mit zwei Acyl-CoA-Oxidasen (cyan) und mCherry-SKL (magenta) exprimieren. Vollständige Bilder werden als Überlagerungen der einzelnen Kanäle gezeigt. In den Ausschnitten sind einzelne Kanäle und überlagerte Kanäle abgebildet. Größenstandard: 5µm.

2.3.3 Die Expression von Mac3-V_{570}R beeinträchtigt das Wachstum auf Ölsäure

Falls die Bildung der Kernstrukturen tatsächlich dazu dient die Enzyme für den Abbau von Fettsäuren räumlich von peroxisomalen Enzymen anderer Funktion zu trennen, könnte die Expression von gleichmäßig verteiltem Mac3-V_{570}R den effektiven Fettsäureabbau stören. Daher wurde das Wachstum von Stämmen, die entweder GFP-Mac3 oder GFP-Mac3-V_{570}R exprimieren, auf Medium mit Ölsäure als einziger C-Quelle untersucht (Abb. 23a). Die Expression von GFP-Mac3-V_{570}R führte zu einer deutlichen Beeinträchtigung. Dies war vor allem in der Vergrößerung der Kolonieränder sichtbar, die eine Bildung von Filamenten zeigte (Abb. 23b). Zellen, die GFP-Mac3 exprimieren wiesen diesen Phänotyp nicht auf (Abb. 23a und b). Beide Fusionsproteine lagen in ähnlicher Menge vor, so dass es sich vermutlich nicht um einen Dosis Effekt handelt (Abb. 23c).

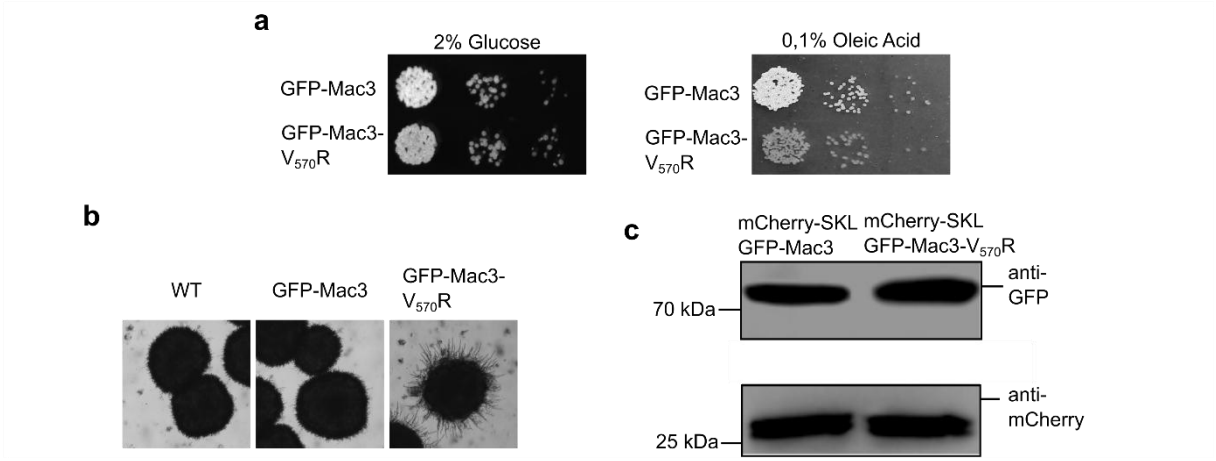


Abbildung 23: Die V570R Variation innerhalb des TIIV Motivs von Mac3 führt zu einer Wachstumsbeeinträchtigung auf ölsäurehaltigen Medium. a Verdünnungen der angegebenen Stämme wurden auf Minimalmedien mit Glukose oder Ölsäure als Kohlenstoffquelle getropft. **b** Vergrößerungen von Kolonien, die auf Ölsäuremedium gewachsen sind, zeigen eine abweichende Koloniemorphologie bei Expression der mutierten Version. **c** Immunoblot zeigt die Expressionsniveaus von GFP-Mac3 und GFP-Mac3-V_{570}R.

2.3.4 Die Expression von Mac3-V_{570}R verringert den Sauerstoffverbrauch in Ölsäure Medium

Um festzustellen, ob der peroxisomale Stoffwechsel tatsächlich durch die Expression von GFP-Mac3-V_{570}R beeinflusst wird, wurde in Zusammenarbeit mit Judith Klatt der Sauerstoffverbrauch von Flüssigkulturen gemessen, denen Ölsäure als einzige Kohlenstoffquelle zur Verfügung stand. Die Expression des gleichmäßig lokalisierenden GFP-Mac3-V_{570}R resultierte in einer langsameren metabolischen Anpassung, wenn die Zellen von Glukose auf Ölsäure Medium umgestellt wurden – es ergab sich eine langsamere Beschleunigung des Sauerstoffverbrauchs (Abb. 24b). Der Sauerstoffverbrauch in

glukosehaltigem Medium war bei beiden Stämmen vergleichbar (Abb. 24a). Die Akkumulation von Mac3 in peroxisomalen Kernstrukturen ermöglicht demnach eine luminale Kompartimentierung die einen effizienten peroxisomalen Stoffwechsel unterstützt.

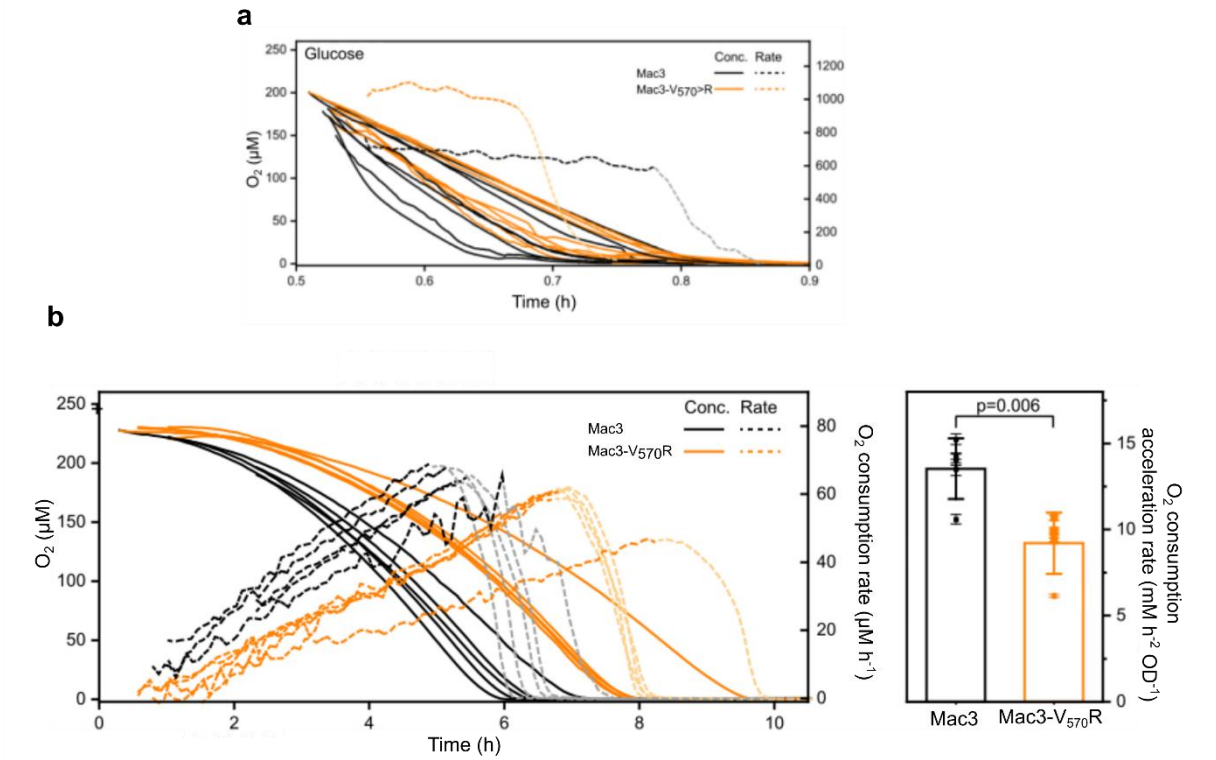


Abbildung 24: Peroxisomale Kernstrukturen ermöglichen die metabolische Kompartimentierung von Peroxisomen. a Die Beschleunigung des Sauerstoffverbrauchs von Zellen, die in glukosehaltigen Medium angezogen wurden, wurde im Zeitverlauf aufgezeichnet. **b** Die Beschleunigung des Sauerstoffverbrauchs von Zellen, die von Glukose auf Ölsäure umgestellt wurden, wurde im Zeitverlauf aufgezeichnet (links). Die Beschleunigungsrate des Sauerstoffverbrauchs wurde aufgetragen (rechts). Die Fehlerbalken geben den Standardfehler des Mittelwerts an. Die Signifikanz wurde mit dem Student's t-Test ermittelt.

2.3.5 Die Urat-Oxidase Uox1 enthält ein TRIV Motiv, dass wie TIIV in Mac3 notwendig für die Akkumulation in Kernstrukturen ist

Es stellt sich die Frage, ob die Akkumulation von Enzymen in peroxisomalen Kernstrukturen eine generelle Strategie darstellen könnte, um einen effizienten peroxisomalen Fettsäuremetabolismus zu ermöglichen. Das Enzym Urat-Oxidase Uox1 aus *U. maydis* enthält kein TIIV-Motiv, allerdings das sehr ähnliche Motiv TRIV. Wenn GFP-TRIV-SKL mit dem peroxisomalen Marker mCherry-SKL koexprimiert wurde, konnte man ebenfalls die Akkumulation von GFP-TRIV-SKL in fokalen Strukturen innerhalb der Peroxisomen beobachten (Abb. 25a). Analog zu unseren Experimenten mit der Acyltranferase Mac3 wurde der Valin Rest an der letzten Position des Motivs durch einen Argininrest ersetzt. Dieser Austausch reichte wiederum aus, um die Lokalisation von Uox1 zu verändern (Abb. 25b und c). GFP-Uox1-V_{124}R war gleichmäßig in allen mCherry-SKL Peroxisomen verteilt. Außerdem

zeigte sich, dass aus *E. coli* gereinigtes 6xHIS-Uox1 Fusionsprotein schneller und in größerem Umfang aggregierte als die Variante 6xHIS-Uox1-V_{124}R (Abb. 25d). Das TRIV Motiv aus Uox1 ist demnach ebenfalls für die Akkumulation in multimeren Kondensaten notwendig und ausreichend.

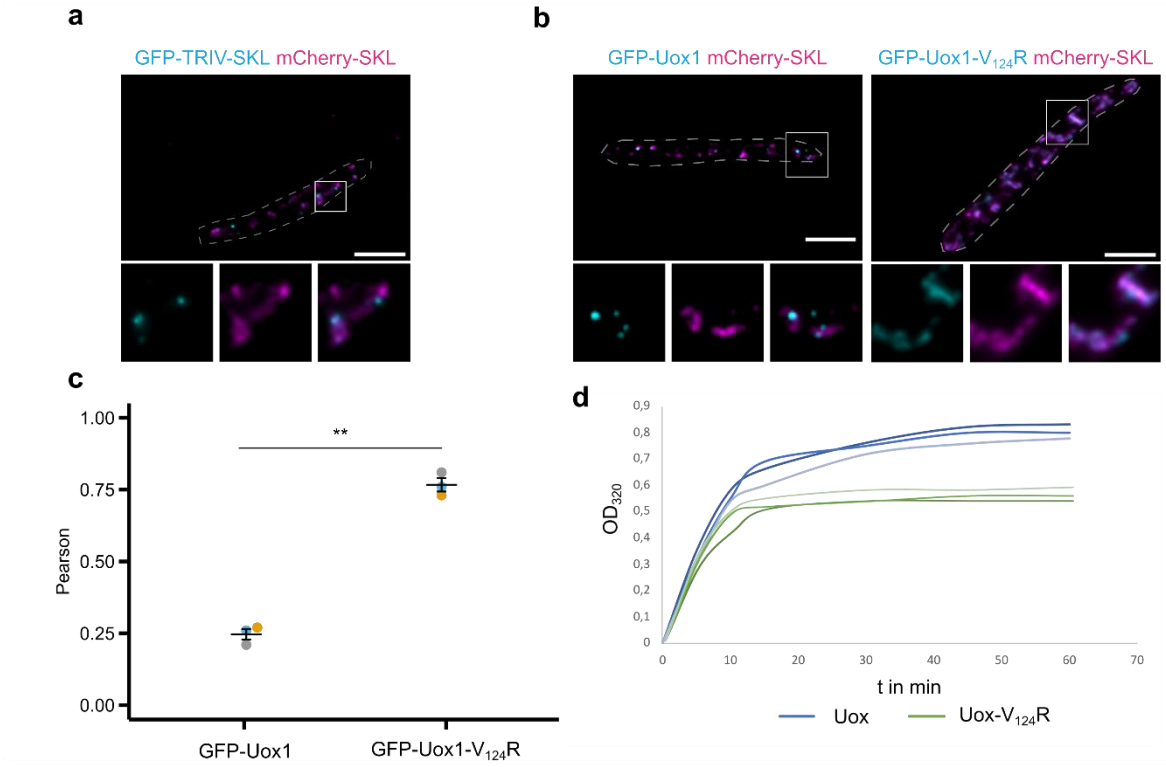


Abbildung 25: Die Urat-Oxidase Uox1 enthält ein TRIV Motiv, welches notwendig und ausreichend für die Lokalisation in peroxisomale Kernstrukturen ist. a Repräsentatives Bild von Zellen, die GFP-TRIV-SKL und mCherry-SKL exprimieren. Vollständige Bilder werden als Überlagerungen der einzelnen Kanäle gezeigt. In den Ausschnitten sind einzelne Kanäle und überlagerte Kanäle abgebildet. Größenstandard: 5µm. **b** Repräsentative Epifluoreszenzbilder von Zellen, die GFP-Uox1 (Cyan) oder GFP-Uox1-V124R (Cyan) und mCherry-SKL (Magenta) exprimieren. Vollständige Bilder werden als Überlagerungen der einzelnen Kanäle gezeigt. In den Ausschnitten sind einzelne Kanäle und überlagerte Kanäle abgebildet. Größenstandard: 5µm. **c** Die Quantifizierungen zeigen die Pearson-Korrelationskoeffizienten der GFP- und mCherry-Signale für die angegebenen Stämme. Dargestellt sind die Mittelwerte von drei Replikaten. Unterschiedliche Farben kennzeichnen einzelne Experimente. Mittlere Linie, Mittelwert; Fehlerbalken, Standardfehler des Mittelwerts. Die Signifikanz wurde durch einen ungepaarten, zweiseitigen Student's t-Test bewertet. ** bezieht sich auf einen p-Wert kleiner oder gleich 0,01**. d** Die Aggregation von His-markierten Versionen von Uox1-Proteinen wurde im Zeitverlauf gemessen.

2.3.6 Die Bildung peroxisomaler Kernstrukturen ermöglicht effizientes Wachstum auf Ölsäure auch in Gegenwart von Uox1

Um zu überprüfen ob Zellen, die die veränderte Variante exprimierten, in der Tat phänotypisch identisch zu Stämmen waren, die GFP-Mac3-V_{570}R exprimierten, wurden die Zellen in unterschiedlichen Verdünnungen auf Medium getropft, das Ölsäure als einzige Kohlenstoffquelle enthielt. Tatsächlich konnte in diesem Experiment ein sehr ähnlicher

Wachstumsdefekt beobachtet werden wie bei Expression von GFP-Mac3-V_{570}R (Abb. 23a und b), obwohl beide Uox1 Fusionsproteine in vergleichbarem Ausmaß exprimiert wurden (Abb. 23c).

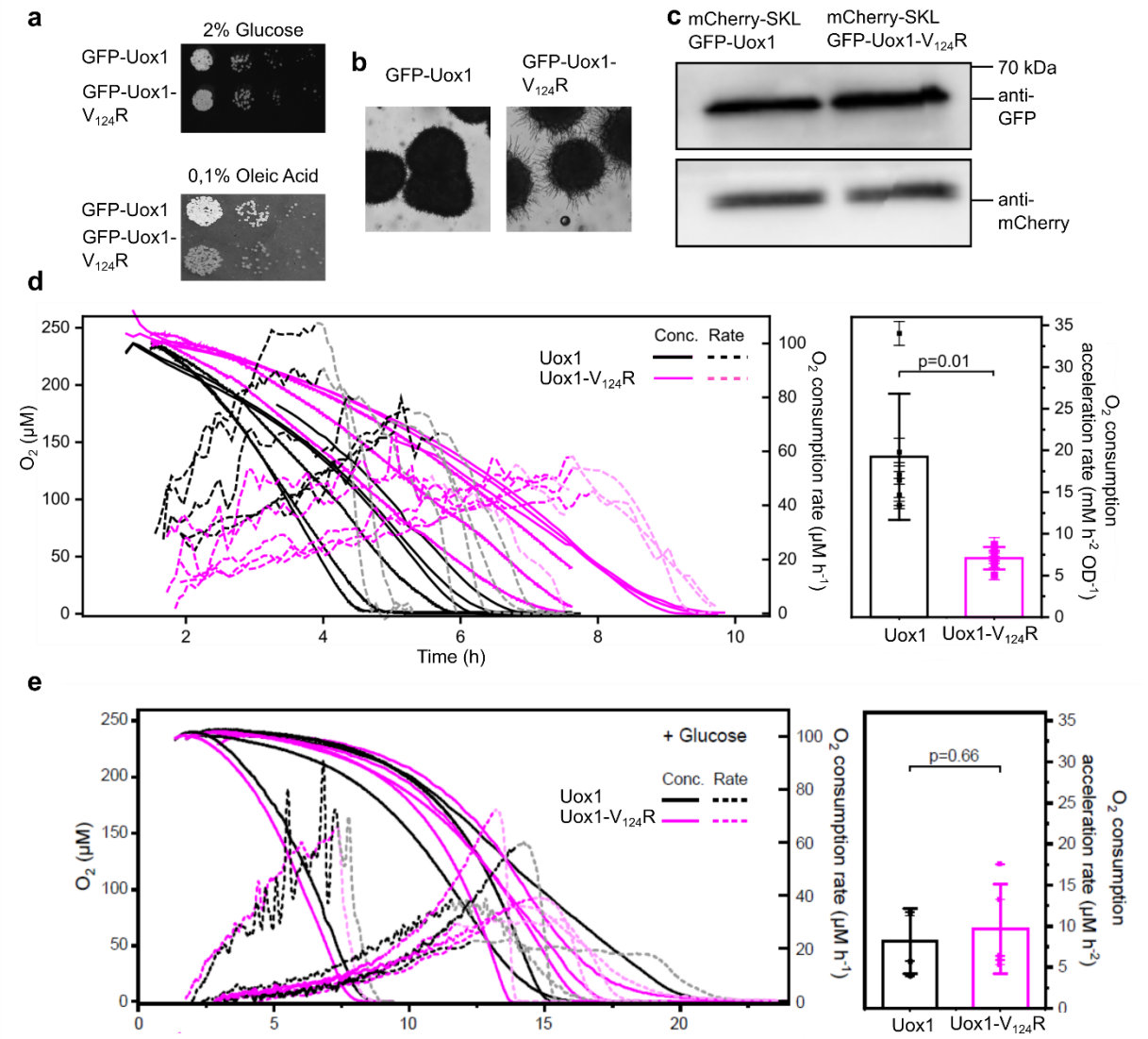


Abbildung 26: Die Urat-Oxidase Uox1 lokalisiert in peroxisomale Kernstrukturen um einen effizienten Ablauf der β-Oxidation zu ermöglichen. a Serielle Verdünnungen der angegebenen Stämme wurden auf Minimalmedien mit Glukose oder Ölsäure als Kohlenstoffquelle getropft. **b** Vergrößerungen von Kolonien, die auf Ölsäuremedium gewachsen sind, zeigen eine abweichende Koloniemorphologie bei Expression der Uox1 Variante mit gleichmäßiger peroxisomaler Lokalisation. **c** Der Immunoblot zeigt die Proteinmenge der Uox1-Varianten. **d** Der Sauerstoffverbrauch von Zellen, die von Glukose auf Ölsäure umgestellt wurden, wurde über die Zeit aufgezeichnet (links). Die Beschleunigungsrate des Sauerstoffverbrauchs wurde ebenfalls aufgezeichnet. Die Fehlerbalken geben den Standardfehler des Mittelwerts an. Die Signifikanz wurde mit dem Student's t-Test ermittelt. **e** Die Beschleunigung des Sauerstoffverbrauchs von Zellen, die in Glukose-haltigen Medium angezogen wurden, wurde im Zeitverlauf aufgezeichnet.

Auch in diesem Fall wurde in Zusammenarbeit mit Judith Klatt der Sauerstoffverbrauch von Kulturen gemessen, die entweder GFP-Uox1-V_{124}R oder GFP-Uox1 exprimierten. Hier zeigte sich analog zu unseren Experimenten mit den verschiedenen Mac3 Versionen, dass die Expression der Variante mit gleichmäßiger Lokalisation zu einem geringeren

Sauerstoffverbrauch führt, wenn die Zellen mit Ölsäure als einziger Kohlenstoffquelle konfrontiert wurden (Abb. 26d), während der Sauerstoffverbrauch in glukosehaltigem Medium bei beiden Stämmen vergleichbar war (Abb. 26e). Dies lässt darauf schließen, dass die Lokalisation peroxisomaler Proteine in Kernstrukturen eine generelle Strategie zu Kompartimentierung des peroxisomalen Lumens darstellen könnte.

2.3.7 Fehlerhafte Lokalisation peroxisomaler Matrixproteine führt zu einem überfüllten peroxisomalen Lumen und eingeschränkter β-Oxidation

Aus den vorangegangenen Experimenten wurde deutlich, dass die fehlerhafte Lokalisation peroxisomaler Matrixproteine einen effizienten Ablauf der β-Oxidation einschränkt. Eine Möglichkeit wäre, dass die Aktivität von Uox1 und Mac3 mit dem Prozess der β-Oxidation interferiert. Anderseits wäre es auch möglich, dass bereits die bloße Anwesenheit der Enzyme ausreicht um diesen Prozess zu stören. Das Lumen könnte quasi mit falschen Proteinen kontaminiert sein.

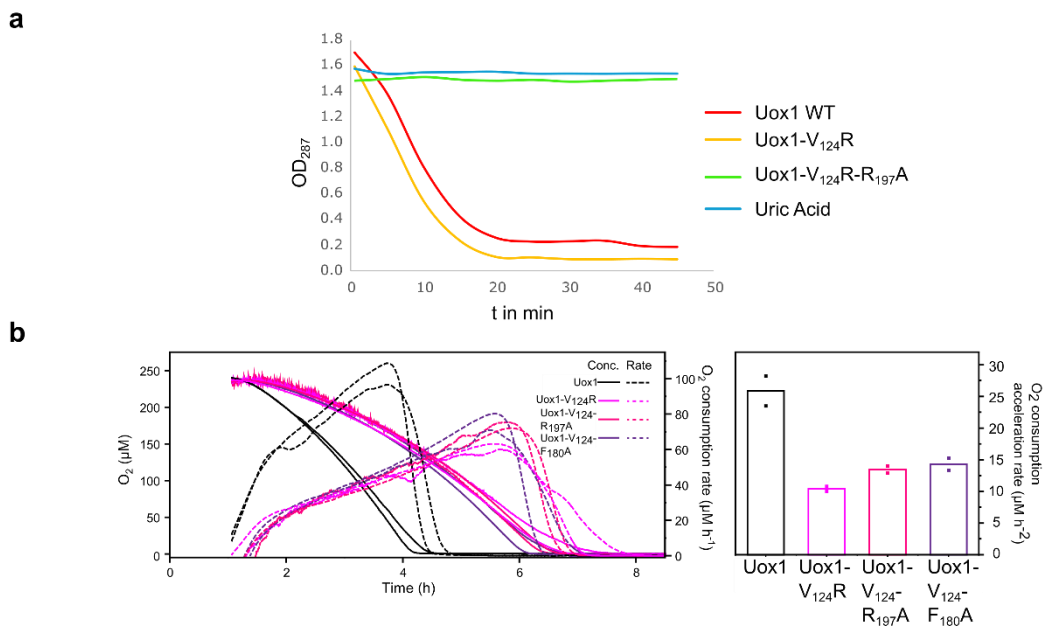


Abbildung 26: Die Aktivität der Urat-Oxidase Uox1 ist nicht entscheidend für den eingeschränkten peroxisomalen Stoffwechsel. a Aktivitätsassay von Uox1 Varianten. **b** Der Sauerstoffverbrauch von Zellen, die von Glukose auf Ölsäure umgestellt wurden, wurde über die Zeit aufgezeichnet (links). Die Beschleunigungsrate des Sauerstoffverbrauchs wurde aufgezeichnet (rechts). Die Fehlerbalken geben den Standardfehler des Mittelwerts an.

Um zu überprüfen, welche dieser beiden Möglichkeiten zutrifft, wurde ein Stamm konstruiert, der eine Version der Urat-Oxidase exprimiert, die neben der V124R Substitution eine weitere Substitution R197A enthält (GFP-Uox1-V_{124}R-R_{197}A). Diese Mutation sollte die Aktivität des Enzyms verhindern. Tatsächlich konnten wir zeigen, dass diese Version biologisch inaktiv ist (Abb. 26a). Ist die biologische Aktivität für die Beeinträchtigung der β-Oxidation

verantwortlich, sollte diese Version der Urat-Oxidase den Sauerstoffverbrauch nicht beeinflussen. In Zusammenarbeit mit Judith Klatt wurde der Sauerstoffverbrauch von Kulturen gemessen, die entweder GFP-Uox1, GFP-Uox1-V_{124}R oder GFP-Uox1-V_{124}R-R_{197}A exprimieren, wenn Ölsäure als einzige Kohlenstoffquelle vorlag. Jedoch resultierte die Expression von GFP-Uox1-V_{124}R-R_{197}A nicht in einem erhöhten Sauerstoffverbrauch. Die Stämme ähnelten in ihrem Sauerstoffverbrauch den Stämmen, die GFP-Uox1-V_{124}R exprimieren (Abb. 26b). Bereits die bloße Anwesenheit der Enzyme im peroxisomalen Lumen zu einem falschen Zeitpunkt beeinträchtigt demnach den Ablauf der β-Oxidation.

2.4 Peroxisomale Proteine mit vielfältiger Funktion sind in Kernstrukturen angereichert.

Die Lokalisation in peroxisomale Kernstrukturen könnte ein wichtiges Prinzip sein, das die metabolische Kompartimentierung des peroxisomalen Lumens ermöglicht. Um zu verstehen, ob weitere Proteine in peroxisomalen Subdomänen und schließlich in Subpopulationen lokalisiert sind, wurden weitere PTS1-Proteine getestet. Es wurden sowohl Proteine, die ein Aminosäuremotiv ähnlich dem TIIV Motiv enthalten als auch PTS1-Proteine ohne ein derartiges Motiv auf ihre peroxisomale Lokalisation untersucht. Die Identifizierung der TIIV PTS1-Proteine erfolgte mittels regulärer Ausdrücke *in silico*. Als Identifizierungsmuster dienten die folgenden Sequenzmöglichkeiten T [I,L,V] [I,L,V] [I,L,V] [I,L,V] (Anhang 1).

Für jedes dieser Proteine wurde eine N-terminale GFP-Fusion unter Kontrolle des konstitutiven *otef*-Promotors (Spellig *et al*, 1996) hergestellt und diese in den *IP*-Lokus eines *U. maydis* WT Stammes integriert, der das peroxisomale Markerprotein mCherry-SKL exprimiert (Freitag *et al*, 2012). Anschließend erfolgte eine fluoreszenzmikroskopische Untersuchung der Zellen.

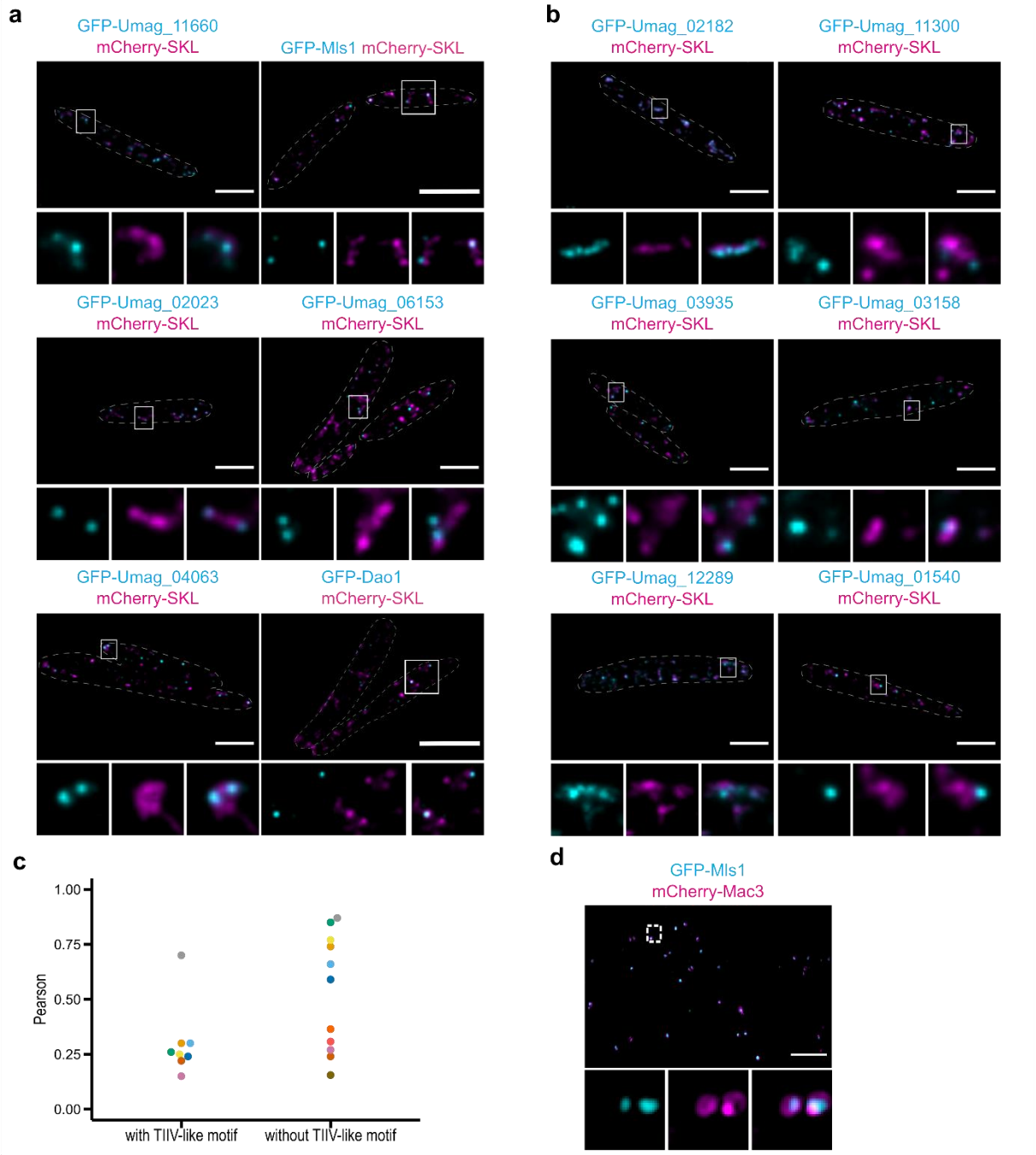


Abbildung 27: PTS1-Proteine mit und ohne T [I,L,V] [I,L,V] [I,L,V] [I,L,V]. *U. maydis-Stämme*, die N-terminal GFP-markierte Versionen von Kandidatenproteinen (cyan) mit TIIV-ähnlichen Motiven **(a)** oder ohne TIIV-ähnlichen Motiven **(c)** und das peroxisomale Markerprotein mCherry-SKL (magenta) exprimieren, wurden mittels Epifluoreszenzmikroskopie untersucht. Vollständige Bilder werden als Überlagerungen der einzelnen Kanäle gezeigt. In den Ausschnitten sind einzelne Kanäle und überlagerte Kanäle abgebildet. Größenstandard: 5µm. Die Umag-Nummern sind Gen-Identifikationsnummern, die über NCBI zugänglich sind. **c** Die Quantifizierung zeigt den Mittelwert der Pearson-Korrelationskoeffizienten der GFP-Signale (Kandidatenproteine; cyan) und der mCherry-Signale (mCherry-SKL; magenta). Quantifizierungen für drei Replikate für jedes der analysierten Kandidatenproteine. **d** Die Kolokalisation der angegebenen Fusionsproteine wurde mittels SIM analysiert. Anordnung der Bilder wie oben.

Sechs von sieben Proteinen mit einem TIIV-ähnlichen Motiv waren in Kernstrukturen angereichert. Jedoch zeigten fünf von zehn Proteinen ohne ein solches Motiv ebenfalls diese Art der Lokalisation, was auf einen breiteren Konsensus der Aggregationsmotive hinweist

(Abb. 27a-c). Dieses Ergebnis zeigt, dass die Fähigkeit peroxisomale Subdomänen zu bilden, eine Eigenschaft von vielen peroxisomalen Proteinen aus *U. maydis* ist und nicht etwa eine Ausnahme. Zu diesen Proteinen gehört unter anderem eine vorhergesagte D-Amino-Oxidase Dao1 (UMAG_05703), aber auch die Malat-Synthase Mls1 (UMAG_15004), ein Enzym, das am Glyoxylat-Stoffwechsel beteiligt ist (Abb. 27a). Interessanterweise überschneidet sich das Signal von Mls1 nicht vollständig mit dem von Mac3. Es können also voneinander getrennte peroxisomale Subdomänen entstehen (Abb. 27d). Die Charakterisierung dieser zusätzlichen Segregation ist ein spannendes Thema für weitere Forschungen. D-Aminosäure-Oxidase und Urat-Oxidase lokalisieren auch in Säugetieren in peroxisomale Kernstrukturen (Hayashi et al., 1971). Dies weist auf ein evolutionär konserviertes Phänomen hin.

2.5 Prinzipien der Bildung peroxisomaler Kernstrukturen erscheinen evolutionär konserviert

Um herauszufinden, ob die Prinzipien für die Bildung der Subdomänen konserviert sind, wurde die Lokalisation der mit GFP fusionierten murinen Urat-Oxidase *Mm*Uox1 in *U. maydis* Zellen untersucht, die außerdem entweder mCherry-SKL oder mCherry-Mac3 enthalten. Auch hier zeigte sich bei GFP-*Mm*Uox1 und mCherry-Mac3 ein höherer Grad an Kolokalisation als bei GFP-*Mm*Uox1 und mCherry-SKL (Abb. 28a). Darüber hinaus zeigte sich, dass GFP-*Mm*Uox1 enthaltende Strukturen bei der Behandlung von Organellenextrakten mit Detergenzien stabil bleiben (Abb. 28b).

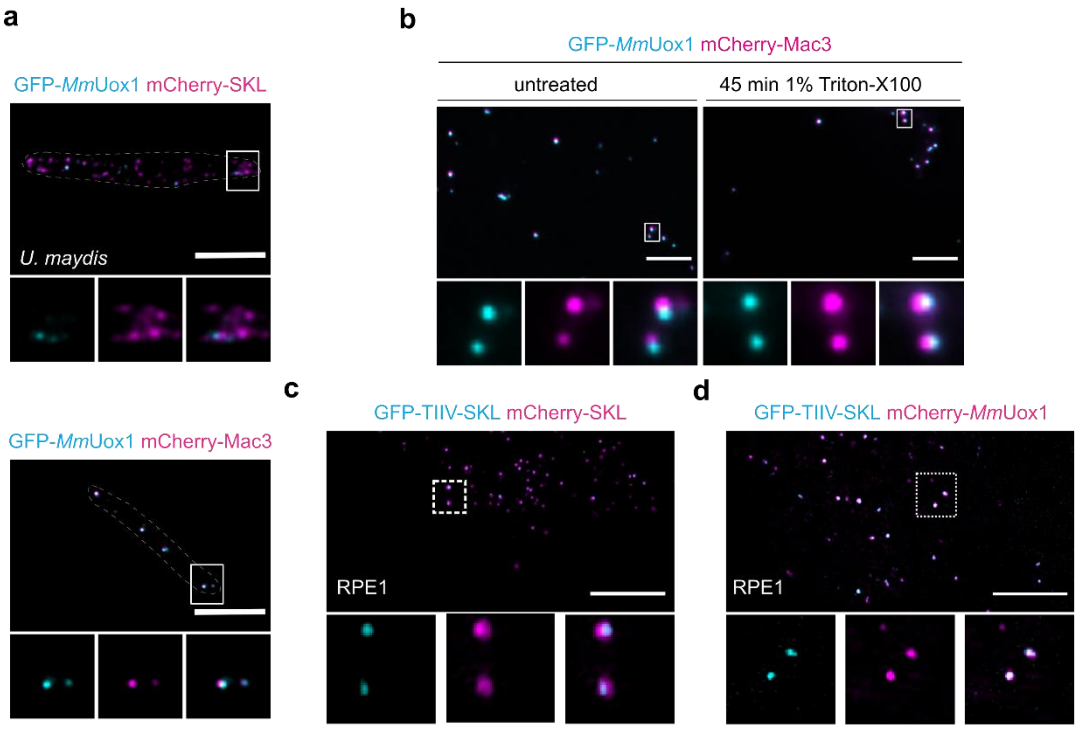


Abbildung 28: Prinzipien der Bildung peroxisomaler Subdomänen erscheinen evolutionär konserviert. a M. *musculus*-Urat-Oxidase (*Mm*UOX1) wurde mit GFP (cyan) markiert und in *U. maydis-Zellen* exprimiert, die entweder mCherry-SKL (magenta) oder mCherry-Mac3 (magenta) koexprimieren. Vollständige Bilder werden als Überlagerungen der einzelnen Kanäle gezeigt. In den Ausschnitten sind einzelne Kanäle und überlagerte Kanäle abgebildet. Größenstandard: 5µm. **b** Organell-Präparationen der angegebenen Stämme wurden nach Inkubation in mit Triton X-100 versetztem Lysepuffer (rechts) mittels Epifluoreszenzmikroskopie untersucht. Präparate, die in Lysepuffer ohne Triton X-100 inkubiert wurden, dienten als Kontrolle (links). Größenstandard: 5µm. **c** GFP-TIIV-SKL und mCherry-SKL exprimierende Konstrukte wurden in RPE1-Zellen transfiziert. Die Zellen wurden mittels SIM analysiert. Vollständige Bilder werden als Überlagerungen der einzelnen Kanäle gezeigt. In den Ausschnitten sind einzelne Kanäle und überlagerte Kanäle abgebildet. Größenstandard: 5µm. **d** *Mus musculus* Urat-Oxidase (*Mm*UOX1) wurde mit mCherry (magenta) markiert und zusammen mit GFP-TIIV-SKL (cyan) in RPE1-Zellen exprimiert. Die Zellen wurden mittels SIM analysiert. Repräsentative Bilder sind wie oben angeordnet.

Die Bildung von Kernstrukturen in Peroxisomen könnte also in Pilzen und Säugern analogen Prinzipien folgen. Um diese Hypothese weiter zu bestätigen, wurde GFP mit TIIV-SKL fusioniert und dieses Konstrukt zusammen mit mCherry-SKL in menschlichen Retinal-Pigment-Epithelial-1-Zellen (RPE1) exprimiert. Die subzelluläre Lokalisation der fluoreszierenden Proteine wurde in Zusammenarbeit mit Kay Schink mittels SIM analysiert. Dabei wurde, wie bei *U. maydis,* eine Anreicherung von GFP-TIIV-SKL in definierten Subdomänen von Peroxisomen in RPE1-Zellen beobachtet (Abb. 28c). Um zu prüfen, ob diese Strukturen auch für ein Protein angereichert sind, das im nativen parakristallinen Kern von Säugetier Peroxisomen vorkommt, haben wir GFP-TIIV-SKL zusammen mit mCherry-markiertem *Mm*Uox1 exprimiert. GFP-TIIV-SKL zeigte eine ausgeprägte Kolokalisation mit mCherry-*Mm*Uox1 (Abb. 28d). Beide Proteine sind demnach in der gleichen Region der Peroxisomen lokalisiert.

2.5.1 Woroninkörper als Extremfall peroxisomaler Subpopulationen

Das Protein HexA ist in filamentösen Ascomyceten die wichtigste kristalline Komponente der von den Peroxisomen abgeleiteten Woroninkörper (Jedd & Chua, 2000). Die heterologe Expression des *Aspergillus nidulans* HexA Proteins in *U. maydis*, führte zu einem hohen Grad an Kolokalisation mit GFP-Mac3, aber nicht mit mCherry-SKL und war ebenso in detergensresistenten Strukturen zu finden (Abb. 29). Woroninkörper könnten daher eine spezialisierte Variante eines generellen Phänomens darstellen.

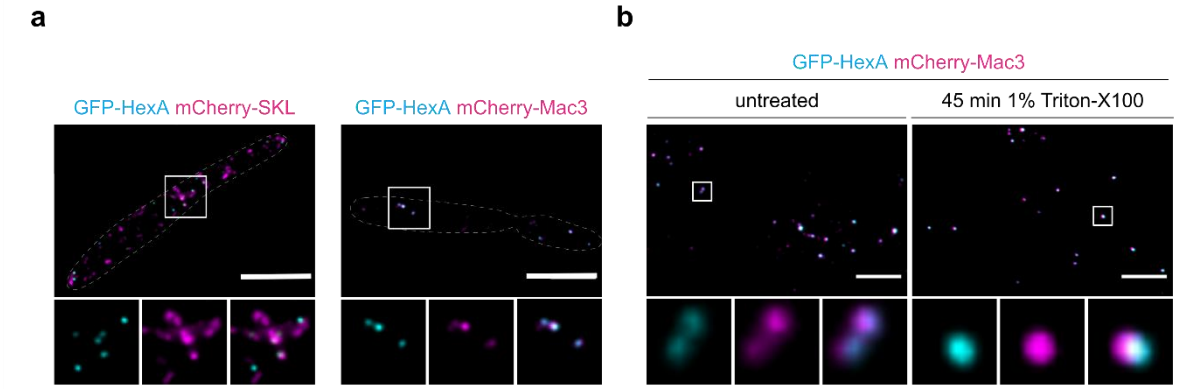


Abbildung 29: Das Woroninkörper Protein HexA kolokalisiert mit Mac3. a *U. maydis* Stämme, die eine N-terminal GFP-markierte Version von *A. nidulans* HexA (cyan) und mCherry-SKL (magenta) oder mCherry-Mac3 (magenta) exprimieren, wurden mittels Epifluoreszenzmikroskopie untersucht. Vollständige Bilder werden als Überlagerungen der einzelnen Kanäle gezeigt. In den Ausschnitten sind einzelne Kanäle und überlagerte Kanäle abgebildet. Größenstandard: 5µm. **b** Organellen-Präparationen der angegebenen Stämme wurden nach Inkubation in mit Triton X-100 angereichertem Lysepuffer (rechts) mittels Epifluoreszenzmikroskopie analysiert. Präparate, die in Lysispuffer ohne Triton X-100 inkubiert wurden, dienten als Kontrolle (links). Anordnung der Bilder wie in **a**.

3 Diskussion

3.1 Das kurze Aminosäuremotiv TIIV ist hinreichend für die Bildung peroxisomaler Subdomänen

Durch eine Analyse verkürzter Varianten des C-terminalen Bereichs der Acyltransferase Mac3 wurde das kleine Aminosäuremotiv TIIV als hinreichend für die Bildung peroxisomaler Subpopulationen identifiziert (Abb. 8). Auf dieser Grundlage konnten mehrere Kandidatenproteine mit ähnlichen Motiven identifiziert werden (Anhang 1). Diese Kandidaten akkumulierten bis auf eine Ausnahme in peroxisomalen Subdomänen, während Proteine aus einer Kontrollgruppe ohne ein vergleichbares Motiv im Schnitt eine bessere Kolokalisation aufwiesen (Abb. 27). Dies unterstreicht die biologische Relevanz des identifizierten Motivs. Aus Substitutionsanalysen wurde anschließend deutlich, dass insbesondere die erste und letzte Position innerhalb des Motivs entscheidend für die Lokalisation in peroxisomalen Kernstrukturen war (Abb. 12). Außerdem zeigte sich, dass eine ganze Reihe von Variationen von TIIV immer noch die Akkumulation in Subdomänen vermittelt (Anhang 2). Auf dieser Grundlage lassen sich womöglich noch eine Reihe weiterer Proteine identifizieren, die auf dem gleichen Weg in Subpopulationen sortiert werden. Wahrscheinlich spielt die Position des Motivs innerhalb des Proteins eine Rolle. So lagen einige der identifizierten Aminosäuremotive der Kandidatenproteinen innerhalb von aggregationsanfälligen Regionen auf der Außenseite der Proteine (Anhang 3) (Conchillo-Solé *et al*, 2007). Das allerdings auch 5 von 10 getesteten Proteinen ohne ein derartiges Motiv in Subdomänen bzw. Subpopulationen lokalisierten, zeigt die Redundanz des zugrundeliegenden Mechanismus an.

Aus unterschiedlichen biologischen Systemen ist bereits bekannt, dass bestimmte Aminosäuremotive eine Aggregation von Proteinen und damit die Bildung von zellulären Subdomänen fördern (Wang *et al*, 2010). So werden zum Beispiel im endoplasmatischen Retikulum GPAT-Enzyme in spezielle Subdomänen in das ER lokalisiert. Dies basiert auf kleinen hydrophoben Motiven in diesen Proteinen (Gidda *et al*, 2011). Außerdem bildet die Aggregation via hydrophober Interaktion die biochemische Grundlage vieler neurologischer Krankheiten (Shastry, 2003). Phasen-Separierung und damit die Bildung cytosolischer Subdomänen kann auch von hydrophoben Interaktionen abhängen (Hyman *et al*, 2014).

Eine weitere Möglichkeit wäre, dass es sich bei den kurzen Aminosäuremotiven um eine Oligomerisierungsdomäne handelt. Diese könnten die Oligomersierung einzelner Proteine initiieren und aus diesen Oligomeren könnten anschließend die Kondensate entstehen. So konnte bereits in *Drosophila melanogaster* und in menschlichen Zellen gezeigt werden, dass

kurze Aminosäuremotive mit einem breiten Konsensus als Oligomerisierungsdomänen dienen können (Cowieson *et al*, 2000; Li & Hristova, 2010). Dies deckt sich mit in dieser Arbeit gemachten Beobachtungen. Einige Derivate des TIIV Motivs führen ebenfalls zu einer ungleichmäßigen peroxisomalen Lokalisation. Es fehlen momentan noch weitere Experimente, um sicher sagen zu können, dass es sich bei diesen Motiven um Oligomerisierungsdomänen handelt.

3.2 Biologische Bedeutung peroxisomaler Subdomänen und Subpopulationen

3.2.1 Bedeutung von peroxisomalen Kernstrukturen für einen effizienten Stoffwechsel

Elektronendichte Kerne sind große Kondensate, die seit der Entdeckung der Peroxisomen bekannt sind (De Duve & Baudhuin, 1966). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Kompartimentierung des Lumens über vergleichbare Kernstrukturen für die Bildung funktionstüchtiger Peroxisomen erforderlich ist. Varianten von Uox1 und Mac3, die eine homogene Verteilung im peroxisomalen Lumen aufwiesen, beeinträchtigten das Wachstum, die Zellmorphologie und den O_2-Verbrauch, wenn die Zellen mit Ölsäure als einziger Kohlenstoffquelle konfrontiert wurden (Abb. 24 und 26). Eine mögliche Erklärung für eine gestörte β-Oxidation wäre, dass die enzymatische Aktivität von delokalisiertem Mac3 bzw. Uox1 den effizienten Ablauf der β-Oxidation beeinträchtigt. Anderseits wäre es auch möglich, dass die Anwesenheit der eigentlichen Enzyme bereits zu einer gestörten β-Oxidation führt. Die während dieser Arbeit generierten Daten deuten eher auf die zweite Möglichkeit hin. So führte die Expression von Mutanten, die sowohl in ihrer Lokalisation als auch in ihrer Aktivität beeinträchtigt waren, zu einer gestörten β-Oxidation (Abb. 26 und 30).

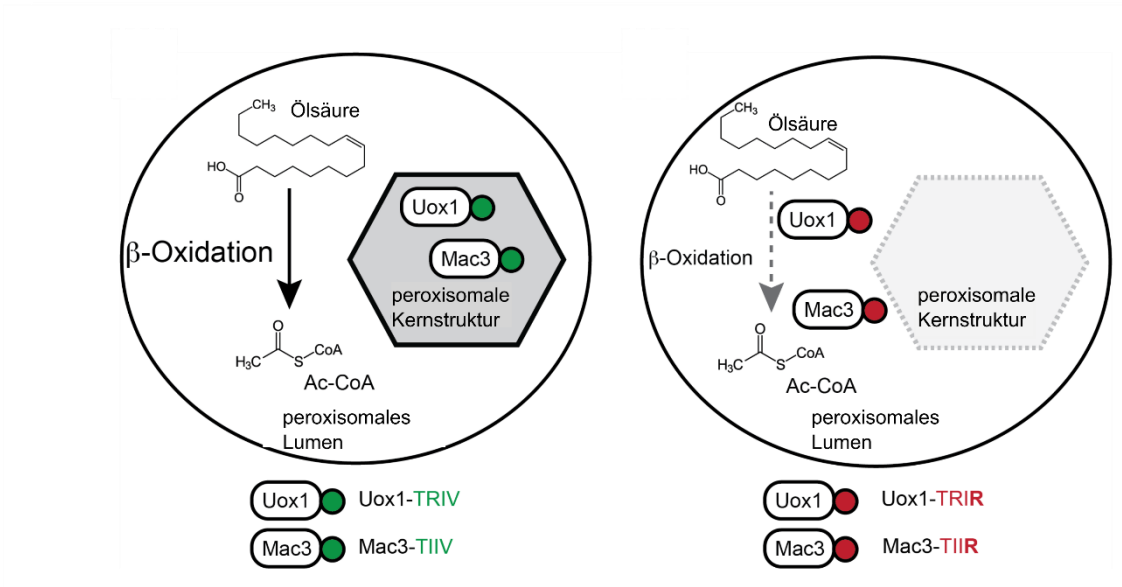


Abbildung 30: Uox1 und Mac3 lokalisieren in peroxisomale Kernstrukturen, während mehrere β-Oxidationsenzyme homogen im gesamten peroxisomalen Lumen verteilt sind (links). Die Mutation der Motive für die Selbstassemblierung wirkte sich auf die Lokalisation von Uox1 und Mac3 und das Wachstum von Zellen aus, die mit Ölsäure als Kohlenstoffquelle konfrontiert wurden (rechts).

So konnten Studien bereits zeigen, dass Überfüllung die Proteinstruktur, die Faltung, die Form, die Konformationsstabilität, die Bindung kleiner Moleküle, die enzymatische Aktivität, die Protein-Protein-Wechselwirkungen, die Protein-Nukleinsäure-Wechselwirkungen und pathologische Aggregationen beeinflussen kann (Kuznetsova *et al*, 2014). Zum Beispiel arbeiten sowohl die Kupfer Oxidase Fet3p aus *S. cerevisiae* als auch die bovine alkaline Phosphatase effektiver in einer weniger überfüllten Umgebung (Pozdnyakova & Wittung-Stafshede, 2010; Kobori *et al*, 2007). Es gibt zahlreiche Beispiele, in denen eine überfüllte Umgebung Proteine anfälliger gegenüber Aggregation macht. So konnte gezeigt werden, dass das Lysozym aus Hühnern ab einer gewissen Konzentration an umgebenen Biomolekülen zu einer verstärkten Aggregation neigt (Van Den Berg *et al*, 1999). Die selektive Bildung der Kernstrukturen könnte demnach dem Schutz für das β-Oxidationskompartiment dienen. Dafür spricht auch, dass Enzyme mit ganz unterschiedlicher Aktivität in den Kernstrukturen akkumulieren, nicht aber die Acyl-CoA Oxidasen. Inwieweit sich die Kernstrukturen untereinander unterscheiden und welche der Enzyme innerhalb dieser Kondensate aktiv sind, ist ein spannendes Thema für zukünftige Arbeiten.

Allerdings gibt es auch Fälle, in denen die Bildung höherer Proteinstrukturen effektiver in einer überfüllten Umgebung abläuft. So verläuft die Assemblierung ribosomaler Untereinheiten in *E. coli* effektiver sobald die Umgebung protein-reicher ist (Murray & Thompson, 1980). Auch dies stimmt mit den in dieser Arbeit generierten Ergebnissen überein. So konnten auch wir

zeigen, dass die Bildung dieser Kondensate in einer potentiell überfüllten Umgebung innerhalb des Peroxisoms effektiver funktioniert als in einer weniger überfüllten Umgebung im Zytosol (Abb. 11).

In peroxisomalen Kernstrukturen von *U. maydis* findet sich ein breites Spektrum von Enzymen mit unterschiedlichen Funktionen, mit Ausnahme von Schlüsselenzymen für die β-Oxidation wie z. B. die Acyl-CoA-Oxidasen (Abb. 22). Ein weiteres Schlüsselenzym der peroxisomalen β-Oxidation, Mfe2, hingegen weist kein konventionelles PTS-Signal auf und wird auf anderem Weg in Peroxisomen importiert (Klose & Kronstad, 2006). Eine verlässliche Quantifizierung der Fluoreszenzsignale mit dem peroxisomalem Marker mCherry-SKL war jedoch nicht möglich, da sowohl eine N- als auch C-terminal markierte Version von Mfe2 einen starken zytosolischen Hintergrund aufwies (Anhang 4). Zu den Enzymen, die in peroxisomalen Kernstrukturen zu finden sind, gehören zum einen die am Sekundärstoffwechsel beteiligten Acyltransferasen Mac1 und Mac3 und H_2O_2 produzierende Enzyme (Dao1 und Uox1). Zum anderen wurden aber auch weniger gut charakterisierte Enzyme identifiziert, wie eine Epoxidhydrolase, die sogar in Mäusen ein TIIV-ähnliches Motiv enthält und möglicherweise eine Rolle bei der Entgiftung von Xenobiotika spielt (Anhang 3) (Newman *et al*, 2005; Morisseau, 2013). Xenobiotika können bei Nagetieren für eine massive Vermehrung der Leberperoxisomen sorgen, was auch zu einer verstärkten Expression von Enzymen führt, die an der β-Oxidation von Fettsäuren beteiligt sind, insbesondere der Acyl-CoA-Oxidase, die Wasserstoffperoxid erzeugt - ein potenzieller Faktor für oxidative DNA-Schäden und Lebertumorgenese. So konnte gezeigt werden, dass eine langfristige Exposition gegenüber diesen Verbindungen bei Nagetieren zu Lebervergrößerung, Hyperplasie und schließlich zu Leberzellkarzinomen führt (Reddy *et al*, 1983).

Interessanterweise wurden bereits Orthologe von Dao1 und Uox1 in peroxisomalen Kernstrukturen von Säugetierzellen entdeckt (Hayashi et al., 1981.; Volkl et al., 1988), was auf eine funktionelle Bedeutung der Kernstrukturen in weit entfernt verwandten eukaryotischen Arten hindeutet. Für H_2O_2-produzierende Enzyme ist eine peroxisomale Lokalisation intuitiv, da Peroxisomen dieses Stoffwechselprodukt durch Katalasen entgiften. Auch die H_2O_2 produzierende Methanol-Oxidase mehrerer Hefearten sind in Kristalloiden innerhalb der Peroxisomen angereichert (Veenhuis *et al*, 1981; Vonck & Van Bruggen, 1992; Vonck *et al*, 2016). Zuvor wurden in einer anderen Arbeit Subpopulationen von Rattenleberperoxisomen identifiziert, die sich in ihrem Proteingehalt unterscheiden. Dabei konnte gezeigt werden, dass verschiedene Peroxisomenpopulationen ein verändertes Verhältnis von peroxisomaler Acyl-

CoA-Oxidase zu Urat-Oxidase - einem typischen Bestandteil peroxisomaler Kernstrukturen in diesem Gewebe - aufweisen (Mohr & Völkl, 2002; Völkl *et al*, 1999). Diese Daten stimmen mit unseren Ergebnissen überein und deuten auf ein evolutionär konserviertes Phänomen hin: Die Bildung von peroxisomalen Subpopulationen könnte im Allgemeinen mit der Bildung peroxisomaler Kernstrukturen einhergehen, was die Entstehung von metabolisch spezialisierten peroxisomalen Subpopulationen in verschiedenen Eukaryoten ermöglicht.

Die biophysikalischen Eigenschaften der Kernstrukturen von *U. maydis* sind nach wie vor ungeklärt. Ob es sich dabei um kristalline Strukturen handelt, wie sie bei der Urat-Oxidase und der Methanol-Oxidase beobachtet wurden (De Duve & Baudhuin, 1966; Veenhuis *et al*, 1981), oder ob sie andere Merkmale aufweisen, wie sie für Kondensate der D-Aminosäure-Oxidase von Nierenzellen beschrieben wurden (Angermüller & Fahimi, 1988), ist ein interessantes Thema für zukünftige Studien. Angermüller & Fahimi zeigen in einer detaillierten licht- und elektronenmikroskopischen Untersuchung die ausgeprägte Heterogenität in der Verteilung der D-Aminosäure-Oxidase in den Peroxisomen der Rattenleber und -niere. Sie konnten eine stärkere D-Aminosäure-Oxidase Aktivität in periportalen Regionen im Vergleich zu perivenösen Regionen der Leber sowie unterschiedliche Färbungsintensitäten zwischen den Peroxisomen - sogar nebeneinander in derselben Zelle – beobachten, was auf funktionelle Unterschiede und Subpopulationen hindeutet. Zusammen mit unseren Daten deutet diese Arbeit stark darauf hin, dass Peroxisomen nicht einheitlich sind, sondern sogar innerhalb einer einzigen Zelle spezialisierte Aufgaben erfüllen können. Dies wird durch weitere Arbeiten über die Variabilität peroxisomaler Enzyme wie Katalase und α-Hydroxysäureoxidase unterstützt (Angermüller *et al*, 1986; Goldfischer, 1987; Fahimi, 1982).

Peroxisomale Subdomänen ähneln in gewisser Weise dem Nucleolus im Zellkern, einer gut charakterisierten membranlosen Subdomäne. *In vitro* trennen sich gereinigte Proteine des Nucleolus in Tröpfchen, die unterschiedliche, nicht koaleszierende Phasen enthalten. Diese Tröpfchen ähneln den Nukleoli *in vivo* und sind in Schichten aufgebaut. Diese strukturierte Anordnung wird durch Unterschiede in den biophysikalischen Eigenschaften der Phasen verursacht, insbesondere durch die Oberflächenspannung der Tröpfchen, die sich aus den Merkmalen ihrer makromolekularen Komponenten ergibt (Feric *et al*, 2016; Sleeman & Trinkle-Mulcahy, 2014).

Analog zu diesen Experimenten könnte man gereinigte Proteine aus peroxisomalen Subdomänen mit Proteinen mischen, die eine gleichmäßige Verteilung im Peroxisom

aufweisen. Ziel wäre es, zu untersuchen, ob sich auch in diesem Fall separate Phasen bilden, ähnlich wie bei den Nukleoli.

Die Bildung peroxisomaler Kernstrukturen geht der Bildung von peroxisomalen Subpopulationen voraus. Zuerst akkumulieren bestimmte peroxisomale Proteine in fokalen Kernstrukturen und werden dann anschließend während der Peroxisomenproliferation ungleichmäßig auf die neu entstehenden Peroxisomen verteilt. Die sogenannten Woroninkörper aus *N. crassa* und anderen Pilzen ähneln den in *U. maydis* charakterisierten Subpopulationen in dieser Hinsicht prinzipiell. Auch hier geht die Bildung einer kristallinen peroxisomalen Substruktur, basierend auf der Oligomerisierung von HexA Proteinen, der Bildung einer spezialisierten Peroxisomen Population voraus (Jedd & Chua, 2000). Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Proteine, die in anderen Systemen als Bestandteile peroxisomaler Kernstrukturen oder Subpopulationen identifiziert wurden, wie z. B. die murine Urat-Oxidase und das Woroninkörperprotein HexA, eine fokale Akkumulation innerhalb der Peroxisomen von *Ustilago maydis* aufweisen. Auch dies lässt auf ein grundlegendes und konserviertes Organisationsprinzip schließen. Es ist möglich, dass Elemente wie das kurze Aminosäuremotiv TIIV die anfängliche Assoziation induzieren. Dies wird durch die in meiner Arbeit generierten Daten unterstützt. Die Einführung von Variationen in die relevanten Motive aus Uox1 und Mac3 hat deren Aggregationsfähigkeit auf sehr ähnliche Weise beeinflusst (Abb. 14 und 25). Als nächstes könnte man untersuchen wie andere Proteine aus peroxisomalen Kernstrukturen löslicher gemacht werden können und ob dadurch die luminale Kompartimentierung nicht nur in *U. maydis*, sondern auch in anderen biologischen Systemen verhindert werden kann. Das in dieser Arbeit identifizierte Phänomen macht auch aus evolutionsbiologischer Sicht Sinn. Akzessorische und spezialisierte peroxisomale Stoffwechselwege können sich vermutlich besser durchsetzen, wenn sie die β-Oxidation nicht stören.

Die Charakterisierung der funktionell unterschiedlichen luminalen peroxisomalen Kompartimente oder der Peroxisomen Subpopulationen steht erst am Anfang. Peroxisomen sind sehr einfache vesikuläre Strukturen und zeigen typischerweise keine Anzeichen einer Kompartimentierung durch interne Membranstrukturen. Eine bemerkenswerte Ausnahme bilden die kürzlich identifizierten intraluminalen Vesikel von pflanzlichen Peroxisomen, die einen alternativen Weg für die metabolische Kompartimentierung der Peroxisomen darstellen (Wright & Bartel, 2020). Bei Mitochondrien z. B. ist die interne Kompartimentierung viel ausgeprägter und wird zum Teil durch ein komplexes inneres Membransystem erreicht (Giacomello *et al*, 2020; Spinelli & Haigis, 2018). Darüber hinaus wurden funktionell

unterschiedliche Subpopulationen dieses Organells beschrieben (Collins *et al*, 2002; Kuznetsov & Margreiter, 2009). Erst kürzlich wurden in Säugetierzellen metabolisch unterschiedliche Mitochondrienpopulationen entdeckt. Sie spezialisieren sich entweder auf die ATP-Synthese oder auf die Biosynthese von Aminosäuren. Diese Aufteilung in Subpopulationen beruht auf der Multimerisierung der Pyrrolin-5-Carboxylat-Synthase (Ryu *et al*, 2024). Die Entstehung von metabolisch unterschiedlichen Organellensubpopulationen erscheint demnach ein grundlegendes Regulationsprinzip zu sein. Nachdem für Jahrzehnte die Entschlüsselung der Proteome von Organellen im Vordergrund der Forschung stand erscheint es nun an der Zeit die interne Kompartimentierung einzelner Organellen besser zu verstehen.

3.2.2 Degradation peroxisomaler Subdomänen

Eine Frage, die durch die in dieser Arbeit gewonnen Ergebnisse nicht beantwortet werden konnte, ist wie peroxisomale Subdomänen abgebaut werden können. Peroxisomen können genau wie andere Zellorganellen durch Autophagie degradiert und ihre Bestandteile recycelt werden (Mizushima, 2007). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass Autophagie neben peroxisomaler LON-Proteasen eine wichtige Rolle für die Degradation von fehlgefalteten peroxisomalen Matrixproteinen spielt (Aksam *et al*, 2007). Außerdem ist Pexophagie in Pflanzen entscheidend für den Abbau bestimmter peroxisomaler Matrixproteine wie etwa der Malat-Synthase. Diese selektiven Degradationsprozesse ist essentiell für die Anpassung des peroxisomalen Proteoms an die Entwicklung oder sich ändernde Umweltbedingungen (Young & Bartel, 2016). Tatsächlich ist die erhöhte Degradation von Peroxisomen vermutlich auch für die Ausprägung peroxisomaler Erbkrankheiten von Bedeutung. Die meisten peroxisomalen Krankheiten aus dem Zellweger Spektrum werden durch die Mutation in einem der drei Genen, die für die Proteine des AAA+ ATPase Komplex kodieren, verursacht. Diese scheinen auch eine Rolle bei der peroxisomalen Qualitätskontrolle zu spielen (Nazarko, 2017). Eine Fehlfunktion dieser Proteine erhöht die Rate von Pexophagie, was wiederum entscheidend zur Schwere der Erkrankung beitragen könnte. Tatsächlich konnte gezeigt werden, dass sich Symptome der Erkrankung durch pharmakologische und genetische Intervention mit Pexophagie in Zellkultur abschwächen lassen und langsamer voranschreiten (Law *et al*, 2017). Peroxisomen werden für den Abbau durch Autophagie mit Atg8/LC-3 markiert (Li & Vierstra, 2012; Farré *et al*, 2008). Es gibt bereits Hinweise darauf, dass peroxisomale Proteinaggregate durch Autophagie eliminiert werden könnten. So konnte in *Hansenula polymorpha* gezeigt werden, dass Peroxisomen mit Proteinaggregaten selektiv durch einen Prozess entfernt werden an dem sowohl die peroxisomale Teilungsmaschinerie als auch Autophagie beteiligt sind.

Wenn eine mutierte Katalase Variante im peroxisomalen Lumen Aggregate bildet, werden diese Aggregate zunächst durch asymmetrische Teilung isoliert, wobei kleinere peroxisomale Vesikel entstehen, die diese Aggregate enthalten. Anschließend werden diese Vesikel gezielt über die Autophagie abgebaut, ein Prozess, der die mit der Autophagie verbundenen Proteine Atg1 und Atg11 erfordert. Beeinträchtigungen der peroxisomalen Teilungsmaschinerie (z. B. bei dnm1- oder pex11-Mutanten) oder der Autophagie (z. B. bei atg11-Mutanten) führen zu einer verminderten Beseitigung dieser Aggregate, was zu einem erhöhten Gehalt an reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) und einem beeinträchtigten Zellwachstum führt (Manivannan *et al*, 2013).

In dieser Arbeit konnte jedoch weder in Stämmen, die eine Deletion des für die LON-Protease kodierenden Gens noch für *atg8* Mutanten eine signifikante Änderung der Stabilität ungleichmäßig lokalisierter Reporterproteine im Vergleich mit Proteinen, die auf alle Peroxisomen verteilt waren, festgestellt werden (Abb. 19 und 20). Daher ist es eher unwahrscheinlich, dass einer dieser beiden Wege verantwortlich für die selektive Degradation der peroxisomalen Subdomänen ist.

Es gibt erste Hinweise darauf, dass peroxisomale Matrixproteine auch aus den Peroxisomen heraustransportiert werden, um dann im Anschluss im Zytosol unter Beteiligung des Proteasoms degradiert zu werden (Zolman *et al*, 2005; Gabaldón *et al*, 2006; Burkhart *et al*, 2013; Lingard *et al*, 2009). Dabei könnte der Abbau analog zur ER-assoziierten Protein Degradation (ERAD) ablaufen (Hoseki *et al*, 2010). In *Arabidopsis thaliana* konnte gezeigt werden, dass die beiden Ubiquitinligasen Pex2 und Pex10 eine wichtige Rolle für die Stabilität gewisser peroxisomaler Matrixproteine spielen (Burkhart *et al*, 2014). In *A. thaliana* gibt es einige weitere Hinweise darauf, dass die Ubiquitinierung und der anschließende Export bestimmter peroxisomaler Matrix- und Membranproteine essentiell für deren Abbau ist (Burkhart *et al*, 2013; Lingard *et al*, 2009; Williams, 2014). Es gibt außerdem Daten, die eine direkte Beteiligung des Proteasoms beim Abbau der peroxisomalen Membranproteine Pex3 und Pex16 nahelegen (Huybrechts *et al*, 2009). Es könnte sein, dass auch in anderen Organismen peroxisomale Matrixproteine mit Ubiquitin konjugiert und so für den Abbau durch das Proteasom markiert werden. Um dies zu überprüfen, könnte man Inhibitoren des Proteasoms verwenden und untersuchen, ob sich die Stabilität von in Subdomänen lokalisierten Proteinen im Vergleich zu Kontrollproteinen signifikant verändert (Liu *et al*, 2007; Devarajan *et al*, 2020).

Für den Fall, dass peroxisomale Matrixproteine tatsächlich vor ihrer Degradation in das Zytoplasma transportiert werden, würde auch der „Cytoplasm-to-vacuolar targeting pathway“ (CVT) als ein möglicher Mechanismus für den Abbau in Frage kommen. Dabei werden

Proteinaggregate im Zytosol von einer einfachen Membran umschlossen und anschließend für den Abbau in die Vakuole transportiert (Scott *et al*, 1996). Dieser Prozess ist allerdings ebenso wie Autophagie abhängig von unterschiedlichen Atg-Proteinen (Umekawa & Klionsky, 2012; Scott *et al*, 1996). Da jedoch der Abbau von peroxisomalen Matrixproteinen bereits in Δ*atg8* Zellen untersucht wurde und keine Auffälligkeiten festgestellt werden konnten (Abb. 20), handelt es sich hierbei vermutlich nicht um den verantwortlichen Mechanismus für die Degradation ungleichmäßig lokalisierender peroxisomaler Matrixproteine. Zum vollständigen Ausschluss dieser Möglichkeit, müssten jedoch noch zusätzliche *atg*-Gene ausgeschaltet werden, um den CVT Pathway komplett zu verhindern (Umekawa & Klionsky, 2012).
In Hefe konnte ein spezieller Weg zum selektiven Abbau mitochondrialer Proteine beobachtet werden, durch dessen Aktivität nur eine Untergruppe von Membranproteinen aus den inneren und äußeren Membranen der Mitochondrien abgebaut wird, während der Rest des Organells intakt bleibt. Dieser selektive Abbau geschieht durch die Sortierung der Zielproteine in ein aus den Mitochondrien stammendes Kompartiment (MDC), welches den in Verlauf meiner Arbeit charakterisierten Subdomänen ähnelt. Dieses Kompartiment wird durch die Teilungsmaschinerie der Mitochondrien freigesetzt und wiederum durch Autophagie eliminiert. Für die Bildung von MDCs sind die Importrezeptoren Tom70/71 erforderlich (Hughes *et al*, 2016). Peroxisomale Subdomänen könnten ein analoges Subkompartiment innerhalb der Peroxisomen darstellen und durch die Teilungsmaschinerie der Peroxisomen freigesetzt werden, um anschließend innerhalb des Zytosols abgebaut zu werden. Jedoch müsste es sich hierbei um einen anderen Mechanismus als um typische Autophagie handeln, da die Deletion von *atg8* nicht zu einer Akkumulation peroxisomaler Subdomänen führt.

3.3 Ausblick

Meine Ergebnisse eröffnen spannende Perspektiven für die zukünftige Forschung zu peroxisomalen Subdomänen und ihrer Funktion. Um die biophysikalischen Eigenschaften dieser Kernstrukturen besser zu verstehen, wären weiterführende Studien zur molekularen Zusammensetzung und den physikalischen Eigenschaften der Kondensate sinnvoll. Aufgrund der vorliegenden Ergebnisse lässt sich noch nicht mit Sicherheit sagen, ob es sich bei peroxisomalen Subdomänen in *U, maydis* um kristalline Strukturen handelt oder ob sie sich durch einen Prozess bilden, der auf dem Prinzip der Phasenseparierung basiert. Dies könnte je nach Protein auch unterschiedlich sein.

Darüber hinaus ist es wichtig, die Mechanismen zu untersuchen, die den Abbau peroxisomaler Subdomänen steuern. Die Rolle von Ubiquitin und dem Proteasom konnte dabei im ein Fokus sein, da Autophagie obsolet erscheint.

Die genauere Charakterisierung der Funktion der Subdomänen für die Kompartimentierung des peroxisomalen Metabolismus ist ebenfalls interessant. Dienen die peroxisomalen Subdomänen nur dazu, um die β-Oxidation von anderen sekundären Stoffwechselwegen zu trennen oder gibt es auch noch andere Prozesse in Peroxisomen die beeinträchtigt werden, wenn Enzyme aus diesen Kernstrukturen nicht mehr korrekt lokalisieren?

Schließlich stellt sich die Frage nach der Konservierung dieser Strukturen. Der Vergleich zwischen verschiedenen Organismen könnte zeigen, inwiefern die Bildung und Funktion peroxisomaler Subdomänen konserviert ist und welche Anpassungen im Laufe der Evolution stattgefunden haben.

Insgesamt bieten diese Erkenntnisse eine gute Grundlage, um die interne Struktur von Peroxisomen weiter zu erforschen, um ihre Bedeutung genauer zu verstehen.

4 Material und Methoden

4.1 Mikroorganismen, Materialien und Chemikalien

4.1.1 Verwendete Mikroorganismen

***E. coli*-Stämme**

Für alle in dieser Arbeit mit *E. coli* durchgeführten Klonierungen wurde der Stamm Top10 (Invitrogen, Karlsruhe) verwendet. Dieser Stamm besitzt folgende genetische Marker: *F⁻ mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ80lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 araD139 Δ(ara-leu)7697 galU galK rpsL* (Str^R) *endA1 nupG*

***U. maydis*-Stämme**

Die folgende Tabelle listet alle hier verwendeten *U. maydis* Stämme auf. Alle unten genannten Stämme basieren auf dem Stamm Bub8 (Weinzierl et al., 2002).

Tabelle 2: In dieser Arbeit verwendete *U. maydis*-Stämme

Stamm	Genotyp	Resistenz	Referenz
Bub8 mCherry-SKL	*a2 b4* P_{otef}*:mcherry-SKL*	Hyg^R	Freitag et al., 2012
MB215 mCherry-SKL	*a2 b13* P_{otef}*:mcherry-SKL*	Hyg^R	Freitag et al., 2012
Bub8 mCherry-SKL GFP-Mac1	*a2 b4* P_{otef}*:mcherry-SKL* $ip^R[P_{otef}$*:egfp-Mac1]*ip^S	Hyg^R, Cbx^R	Freitag et al., 2014
MB215 mCherry-SKL GFP-Mac1	*a2 b13* P_{otef}*:mcherry-SKL* $ip^R[P_{otef}$*:egfp-Mac1]*ip^S	Hyg^R, Cbx^R	Freitag et al., 2014
Bub8 mCherry-SKL GFP-Mac3	*a2 b4* P_{otef}*:mcherry-SKL* $ip^R[P_{otef}$*:egfp-Mac3]*ip^S	Hyg^R, Cbx^R	Diese Arbeit
MB215 mCherry-SKL GFP-Mac3	*a2 b13* P_{otef}*:mcherry-SKL* $ip^R[P_{otef}$*:egfp-Mac3]*ip^S	Hyg^R, Cbx^R	Diese Arbeit
Bub8 GFP-SKL mCherry-Mac1	*a2 b4* P_{otef}*:egfp-SKL* $ip^R[P_{otef}$*:mcherry-Mac1]*ip^S	Hyg^R, Cbx^R, G^R	Diese Arbeit
Bub8 mCherry-Mac3 GFP-SKL	*a2 b4* $ip^R[P_{otef}$*:mcherry-Mac3]*ip^S P_{otef}*:egfp-SKL*	Hyg^R, Cbx^R	Diese Arbeit
Bub8 GFP-Mac3 mCherry-Mac3	*a2 b4* $ip^R[P_{otef}$*:egfp-Mac3]*ip^S $ip^R[P_{otef}$*:mcherry-Mac3]*ip^S	Cbx^R, G^R	Diese Arbeit
Bub8 GFP-SKL mCherry-SKL	*a2 b4* P_{otef}*:egfp-SKL* $ip^R[P_{otef}$*:mcherry-SKL]*ip^S	Hyg^R, Cbx^R, G^R	Diese Arbeit
MB215 mCherry-SKL GFP-Uox1	*a2 b13* P_{otef}*:mcherry-SKL* $ip^R[P_{otef}$*:egfp-Uox1]*ip^S	Hyg^R, Cbx^R	Diese Arbeit
MB215 GFP-Uox1 mCherry-Mac1	*a2 b13* P_{otef}*:mcherry-Mac1* $ip^R[P_{otef}$*:egfp-Uox1]*ip^S	Hyg^R, Cbx^R	Diese Arbeit
MB215 GFP-Uox1 mCherry-Mac3	*a2 b13* P_{otef}*:mcherry-Mac3* $ip^R[P_{otef}$*:egfp-Uox1]*ip^S	Hyg^R, Cbx^R	Diese Arbeit
MB215 mCherry-Mac3 GFP-MmUox1	*a2 b13* P_{otef}*:mcherry-Mac3* $ip^R[P_{otef}$*:egfp-MmUox1]*ip^S	Hyg^R, Cbx^R	Diese Arbeit
MB215 mCherry-SKL GFP-MmUox1	*a2 b13* P_{otef}*:mcherry-SKL* $ip^R[P_{otef}$*:egfp-MmUox1]*ip^S	Hyg^R, Cbx^R	Diese Arbeit
Bub8 mCherry-SKL GFP-$PTS1_{Mac1}$	*a2 b4* P_{otef}*:mcherry-SKL* $ip^R[P_{otef}$*:egfp-*$PTS1_{Mac1}$*]*ip^S	Hyg^R, Cbx^R	Diese Arbeit
Bub8 mCherry-SKL GFP-$PTS1_{Mac3}$	*a2 b4* P_{otef}*:mcherry-SKL* $ip^R[P_{otef}$*:egfp-*$PTS1_{Mac3}$*]*ip^S	Hyg^R, Cbx^R	Diese Arbeit
MB212 mCherry-SKL GFP-TIIV-SKL	*a2 b13* P_{otef}*:mcherry-SKL* $ip^R[P_{otef}$*:egfp-TIIV-SKL]*ip^S	Hyg^R, Cbx^R	Diese Arbeit
MB215 mCherry-SKL PTS2-GFP	*a2 b13* P_{otef}*:mcherry-SKL* $ip^R[P_{otef}$*:PTS2-egfp]*ip^S	Hyg^R, Cbx^R	Kremp et al., 2020
MB215 mCherry-SKL PTS2-GFP-TIIV	*a2 b13* P_{otef}*:mcherry-SKL* $ip^R[P_{otef}$*:PTS2-egfp-TIIV]*ip^S	Hyg^R, Cbx^R	Diese Arbeit
MB215 MTS-mCherry MTS-GFP-TIIV	*a2 b13* P_{otef}*:MTS-mcherry* $ip^R[P_{otef}$*:MTS-egfp]*ip^S	Hyg^R, Cbx^R	Diese Arbeit
MB215 MTS-mCherry MTS-GFP	*a2 b13* P_{otef}*:MTS-mcherry* $ip^R[P_{otef}$*:MTS-egfp-TIIV]*ip^S	Hyg^R, Cbx^R	Diese Arbeit
MB215 mCherry-SKL GFP-12mer-SKL (TIIVQCCHIASL)	*a2 b13* P_{otef}*:mcherry-SKL* $ip^R[P_{otef}$*:egfp-12mer-SKL]*ip^S	Hyg^R, Cbx^R	Diese Arbeit

MB215 mCherry-SKL GFP-9mer-SKL (VQCCHIASL)	*a2 b13 P_{otef}:mcherry-SKL ip^R[P_{otef}:egfp-9mer-SKL]ip^S*	Hyg^R, Cbx^R	Diese Arbeit
MB215 mCherry-SKL GFP-7mer-SKL (CCHIASL)	*a2 b13 P_{otef}:mcherry-SKL ip^R[P_{otef}:egfp-7mer-SKL]ip^S*	Hyg^R, Cbx^R	Diese Arbeit
Bub8 GFP-Mls1 mCherry-Mac1	*a2 b4 ip^R[P_{otef}:egfp-Mls1]ip^S ip^R[P_{otef}:mcherry-Mac1]ip^S*	Cbx^R, G^R	Diese Arbeit
Bub8 GFP-Mls1 mCherry-Mac3	*a2 b4 ip^R[P_{otef}:egfp-Mls1]ip^S ip^R[P_{otef}:mcherry-Mac3]ip^S*	Cbx^R, G^R	Diese Arbeit
Bub8 GFP-Mls1 mCherry-SKL	*a2 b4 ip^R[P_{otef}:egfp-Mls1]ip^S ip^R[P_{otef}:mcherry-SKL]ip^S*	Cbx^R, H^R	Diese Arbeit
Bub8 mCherry-SKL GFP-Aox1	*a2 b4 P_{otef}:mcherry-SKL ip^R[P_{otef}:egfp-Aox1]ip^S*	Hyg^R, Cbx^R	Diese Arbeit
MB215 mCherry-SKL GFP-Umag_11660	*a2 b13 P_{otef}:mcherry-SKL ip^R[P_{otef}:egfp-umag_11660]ip^S*	Hyg^R, Cbx^R	Diese Arbeit
MB215 mCherry-SKL GFP-Umag_02023	*a2 b13 P_{otef}:mcherry-SKL ip^R[P_{otef}:egfp-umag_02023]ip^S*	Hyg^R, Cbx^R	Diese Arbeit
MB215 mCherry-SKL GFP-Umag_04063	*a2 b13 P_{otef}:mcherry-SKL ip^R[P_{otef}:egfp-umag_04063]ip^S*	Hyg^R, Cbx^R	Diese Arbeit
MB215 mCherry-SKL GFP-Umag_04479	*a2 b13 P_{otef}:mcherry-SKL ip^R[P_{otef}:egfp-umag_04479]ip^S*	Hyg^R, Cbx^R	Diese Arbeit
MB215 mCherry-SKL GFP-Umag_06153	*a2 b13 P_{otef}:mcherry-SKL ip^R[P_{otef}:egfp-umag_06153]ip^S*	Hyg^R, Cbx^R	Diese Arbeit
MB215 mCherry-SKL GFP-Dao1	*a2 b13 P_{otef}:mcherry-SKL ip^R[P_{otef}:egfp-Dao1]ip^S*	Hyg^R, Cbx^R	Diese Arbeit
MB215 mCherry-SKL GFP-Mls1	*a2 b13 P_{otef}:mcherry-SKL ip^R[P_{otef}:egfp-Mls1]ip^S*	Hyg^R, Cbx^R	Diese Arbeit
MB215 mCherry-SKL GFP-Umag_02097	*a2 b13 P_{otef}:mcherry-SKL ip^R[P_{otef}:egfp-umag_02097]ip^S*	Hyg^R, Cbx^R	Diese Arbeit
MB215 mCherry-SKL GFP-Umag_02182	*a2 b13 P_{otef}:mcherry-SKL ip^R[P_{otef}:egfp-umag_02182]ip^S*	Hyg^R, Cbx^R	Diese Arbeit
MB215 mCherry-SKL GFP-Umag_06455	*a2 b13 P_{otef}:mcherry-SKL ip^R[P_{otef}:egfp-umag_06455]ip^S*	Hyg^R, Cbx^R	Diese Arbeit
MB215 mCherry-SKL GFP-Umag_11300	*a2 b13 P_{otef}:mcherry-SKL ip^R[P_{otef}:egfp-umag_11300]ip^S*	Hyg^R, Cbx^R	Diese Arbeit
MB215 mCherry-SKL GFP-Umag_01540	*a2 b13 P_{otef}:mcherry-SKL ip^R[P_{otef}:egfp-umag_01540]ip^S*	Hyg^R, Cbx^R	Diese Arbeit
MB215 mCherry-SKL GFP-Umag_01332	*a2 b13 P_{otef}:mcherry-SKL ip^R[P_{otef}:egfp-umag_01332]ip^S*	Hyg^R, Cbx^R	Diese Arbeit
MB215 mCherry-SKL GFP-Umag_03935	*a2 b13 P_{otef}:mcherry-SKL ip^R[P_{otef}:egfp-umag_03935]ip^S*	Hyg^R, Cbx^R	Diese Arbeit
MB215 mCherry-SKL GFP-Umag_02862	*a2 b13 P_{otef}:mcherry-SKL ip^R[P_{otef}:egfp-umag_02862]ip^S*	Hyg^R, Cbx^R	Diese Arbeit
MB215 mCherry-SKL GFP-Umag_03158	*a2 b13 P_{otef}:mcherry-SKL ip^R[P_{otef}:egfp-umag_03158]ip^S*	Hyg^R, Cbx^R	Diese Arbeit
MB215 mCherry-SKL GFP-Aox1	*a2 b13 P_{otef}:mcherry-SKL ip^R[P_{otef}:egfp-Aox1]ip^S*	Hyg^R, Cbx^R	Diese Arbeit
MB215 mCherry-SKL GFP-Umag_12289	*a2 b13 P_{otef}:mcherry-SKL ip^R[P_{otef}:egfp-umag_12289]ip^S*	Hyg^R, Cbx^R	Diese Arbeit
MB215 mCherry-SKL GFP-Aox1	*a2 b13 P_{otef}:mcherry-SKL ip^R[Pcrg:egfp-AOX1]ip^S*	Hyg^R, Cbx^R	Diese Arbeit
MB215 mCherry-SKL GFP-Mac3	*a2 b13 P_{otef}:mcherry-SKL ip^R[Pcrg:egfp-Mac3]ip^S*	Hyg^R, Cbx^R	Diese Arbeit
MB215 mCherry-Mac3 GFP-HexA	*a2 b13 P_{otef}:mcherry-Mac3 ip^R[P_{otef}:egfp-HexA]ip^S*	Hyg^R, Cbx^R	Diese Arbeit
MB215 mCherry-SKL GFP-HexA	*a2 b13 P_{otef}:mcherry-SKL ip^R[P_{otef}:egfp-HexA]ip^S*	Hyg^R, Cbx^R	Diese Arbeit
MB215 mCherry-SKL GFP-AIIV	*a2 b13 P_{otef}:mcherry-SKL ip^R[P_{otef}:egfp-PTS1Mac3(AIIV)]ip^S*	Hyg^R, Cbx^R	Diese Arbeit
MB215 mCherry-SKL GFP-TAIV	*a2 b13 P_{otef}:mcherry-SKL ip^R[P_{otef}:egfp-PTS1Mac3(TAIV)]ip^S*	Hyg^R, Cbx^R	Diese Arbeit
MB215 mCherry-SKL GFP-TIAV	*a2 b13 P_{otef}:mcherry-SKL ip^R[P_{otef}:egfp-PTS1Mac3(TIAV)]ip^S*	Hyg^R, Cbx^R	Diese Arbeit
MB215 mCherry-SKL GFP-TIIA	*a2 b13 P_{otef}:mcherry-SKL ip^R[P_{otef}:egfp-PTS1Mac3(TIIA)]ip^S*	Hyg^R, Cbx^R	Diese Arbeit
MB215 mCherry-SKL GFP-RIIV	*a2 b13 P_{otef}:mcherry-SKL ip^R[P_{otef}:egfp-PTS1Mac3(RIIV)]ip^S*	Hyg^R, Cbx^R	Diese Arbeit
MB215 mCherry-SKL GFP-TIIR	*a2 b13 P_{otef}:mcherry-SKL ip^R[P_{otef}:egfp-PTS1Mac3(TIIR)]ip^S*	Hyg^R, Cbx^R	Diese Arbeit
MB215 mCherry-SKL Pmac1-GFP-Mac1	*a2 b13 P_{otef}:mcherry-SKL ip^R[Pmac1:egfp-Mac1]ip^S*	Hyg^R, Cbx^R	Diese Arbeit
MB215 GFP-Mac3-PTS1Mac1	*a2 b13 [P_{otef}:egfp-Mac3-PTS1Mac1]ip^S*	Cbx^R	Diese Arbeit
MB215 Δmac2 Δpex6 GFP-Mac3-PTS1Mac1	*a2 b13 [P_{otef}:egfp-Mac3-PTS1Mac1]ip^S*	$Gent^R$, Cbx^R	Diese Arbeit
MB215 Δmac2 Δpex6	a2 b13	$Gent^R$	Freitag, et al. 2014
MB215 GFP-Mac3	*a2 b13 [P_{otef}:egfp-Mac3]ip^S*	Cbx^R	Diese Arbeit
MB215 Δmac2 Δpex6 GFP-Mac3	*a2 b13 [P_{otef}:egfp-Mac3]ip^S*	$Gent^R$, Cbx^R	Diese Arbeit
MB215 mCherry-SKL GFP-UMAG_02028	*a2 b13 P_{otef}:mcherry-SKL ip^R[P_{otef}:egfp-Umag_02028]ip^S*	Hyg^R, Cbx^R	Diese Arbeit
MB215 mCherry-SKL GFP-UMAG_01966	*a2 b13 P_{otef}:mcherry-SKL ip^R[P_{otef}:egfp-Umag_01966]ip^S*	Hyg^R, Cbx^R	Diese Arbeit
MB215 mCherry-SKL GFP-Mac3-V570R	*a2 b13 P_{otef}:mcherry-SKL ip^R[P_{otef}:egfp-Mac3-V570R]ip^S*	Hyg^R, Cbx^R	Diese Arbeit
MB215 mCherry-SKL GFP-Uox1-V124R	*a2 b4 P_{otef}:mcherry-SKL ip^R[P_{otef}:egfp-Uox1-V124R]ip^S*	Hyg^R, Cbx^R	Diese Arbeit

4.1.2 Vektoren

In der nachfolgenden Tabelle sind die in dieser Arbeit verwendeten Plasmide mit entsprechender Referenz dargestellt.

Tabelle 4: In dieser Arbeit verwendete Vektoren

Bezeichnung	Resistenz	Verwendung	Referenz
pETEF-GFP-Ala6-MMXN-Cbx (pETEF)	A, C	s. u. hergestellte Plasmide	Böhmer et al., 2008
pCrG-GFP-Ala6-MMXN-Cbx	A, C	s. u. hergestellte Plasmide	(Brachmann *et al*, 2001)
Pet24d	Kan	s. u. hergestellte Plasmide	Thermo Scientific
MTS-GFP	A, C	s. u. hergestellte Plasmide	Bortfeld et al., 2004
PTS2-GFP	A, C	s. u. hergestellte Plasmide	Kremp et al., 2020

Im Folgenden sind die in dieser Arbeit hergestellte Plasmide aufgelistet.

Tabelle 5: In dieser Arbeit erstellte Plasmide

Plasmid	Restriktionsschnittstellen	Vektor	Referenz
pGFP-SKL	BsrGI HindII	pmCherry-SKL	Diese Arbeit
pmCherry-Mac1	BsrGI	pGFP-Mac1 pmCherry	Diese Arbeit
pGFP-Mac3	EcoRV	potef-GFP-Ala6-MMXN (Böhmer et al., 2008)	Diese Arbeit
pmCherry-Mac3	BsrGI	pGFP-Mac1 pmCherry	Diese Arbeit
pGFP-Uox1	MluI XbaI	potef-GFP-Ala6-MMXN (Böhmer et al., 2008)	Diese Arbeit
pGFP-PTS1$_{Mac1}$			Diese Arbeit
pGFP-PTS1$_{Mac3}$			Diese Arbeit

	MluI XbaI	potef-GFP-Ala6-MMXN (Böhmer et al., 2008)	
pGFP-Mls1	EcoRV	potef-GFP-Ala6-MMXN (Böhmer et al., 2008)	Diese Arbeit
pGFP-Aox1	EcoRV	potef-GFP-Ala6-MMXN (Böhmer et al., 2008)	Diese Arbeit
pGFP-Umag_11660	MluI NotI	potef-GFP-Ala6-MMXN (Böhmer et al., 2008)	Diese Arbeit
pGFP-Umag_02023	MluI NotI	potef-GFP-Ala6-MMXN (Böhmer et al., 2008)	Diese Arbeit
pGFP-Umag_04063	MluI NotI	potef-GFP-Ala6-MMXN (Böhmer et al., 2008)	Diese Arbeit
pGFP-Umag_04479	MluI NotI	potef-GFP-Ala6-MMXN (Böhmer et al., 2008)	Diese Arbeit
pGFP-Umag_06153	MluI NotI	potef-GFP-Ala6-MMXN (Böhmer et al., 2008)	Diese Arbeit
pGFP-Umag_02097	MluI NotI	potef-GFP-Ala6-MMXN (Böhmer et al., 2008)	Diese Arbeit
pGFP-Umag_02182	MluI NotI	potef-GFP-Ala6-MMXN (Böhmer et al., 2008)	Diese Arbeit
pGFP-Umag_06455	MluI NotI	potef-GFP-Ala6-MMXN (Böhmer et al., 2008)	Diese Arbeit
pGFP-Umag_11300	MluI NotI	potef-GFP-Ala6-MMXN (Böhmer et al., 2008)	Diese Arbeit
pGFP-Umag_02862	MluI NotI	potef-GFP-Ala6-MMXN (Böhmer et al., 2008)	Diese Arbeit
pGFP-Umag_03158	MluI NotI	potef-GFP-Ala6-MMXN (Böhmer et al., 2008)	Diese Arbeit
pGFP-Umag_12289	MluI NotI	potef-GFP-Ala6-MMXN (Böhmer et al., 2008)	Diese Arbeit
pGFP-Dao1	MluI NotI	potef-GFP-Ala6-MMXN (Böhmer et al., 2008)	Diese Arbeit
pGFP-TIIV	MluI XbaI	potef-GFP-Ala6-MMXN (Böhmer et al., 2008)	Diese Arbeit

pGFP-HexA	MluI XbaI	potef-GFP-Ala6-MMXN (Böhmer et al., 2008)	Diese Arbeit
pGFP-minimal motif	MluI XbaI	potef-GFP-Ala6-MMXN (Böhmer et al., 2008)	Diese Arbeit
PTS2-GFP TIIV	MluI XbaI	potef-GFP-Ala6-MMXN (Böhmer et al., 2008)	Diese Arbeit
MTS-GFP-TIIV	MluI XbaI	potef-GFP-Ala6-MMXN (Böhmer et al., 2008)	Diese Arbeit
GFP-12mer-SKL (TIIVQCCHIASL)	MluI XbaI	potef-GFP-Ala6-MMXN (Böhmer et al., 2008)	Diese Arbeit
GFP-9mer-SKL (VQCCHIASL)	MluI XbaI	potef-GFP-Ala6-MMXN (Böhmer et al., 2008)	Diese Arbeit
GFP-7mer-SKL (CCHIASL)	MluI XbaI	potef-GFP-Ala6-MMXN (Böhmer et al., 2008)	Diese Arbeit
pEGFP-Mini_PTS1-SKL	BsrGI SalI	pEGFP-C1 (Clontech)	Diese Arbeit
pmCherry-Uricase	BglII SalI	pmCherry-C1 (Clontech)	Diese Arbeit
GFP-PTS1Mac3(TIIR)	MluI XbaI	potef-GFP-Ala6-MMXN (Böhmer et al., 2008)	Diese Arbeit
GFP-PTS1Mac3(RIIV)	MluI XbaI	potef-GFP-Ala6-MMXN (Böhmer et al., 2008)	Diese Arbeit
GFP-PTS1Mac3(AIIV)	MluI XbaI	potef-GFP-Ala6-MMXN (Böhmer et al., 2008)	Diese Arbeit
GFP-PTS1Mac3(TAIV)	MluI XbaI	potef-GFP-Ala6-MMXN (Böhmer et al., 2008)	Diese Arbeit
GFP-PTS1Mac3(TIAV)	MluI XbaI	potef-GFP-Ala6-MMXN (Böhmer et al., 2008)	Diese Arbeit
GFP-PTS1Mac3(TIIA)	MluI XbaI	potef-GFP-Ala6-MMXN (Böhmer et al., 2008)	Diese Arbeit
Pmac1-GFP-Mac1	KpnI XmaI	potef-GFP-Mac1	Diese Arbeit
T7-GFP	BsaI	pET24d (Novagen)	Diese Arbeit
T7-GFP-TIIV	BsaI	pET24d (Novagen)	Diese Arbeit

GFP-Mac3	MscI NotI	potef-GFP-Ala6-MMXN (Böhmer et al., 2008)	Diese Arbeit
GFP-Mac3-PTS1Mac1	MscI NotI	potef-GFP-Ala6-MMXN (Böhmer et al., 2008)	Diese Arbeit
T7-GFP-TIIR	BsaI	pET24d (Novagen)	Diese Arbeit
pGFP-Mac3-V570R	AscI XbaI	potef-GFP-Ala6-MMXN (Böhmer et al., 2008)	Diese Arbeit
T7-Mac3	BsaI	pET24d (Novagen)	Diese Arbeit
T7-Mac3-V570R	BsaI	pET24d (Novagen)	Diese Arbeit
pGFP-Umag_02028	MluI XbaI	potef-GFP-Ala6-MMXN (Böhmer et al., 2008)	Diese Arbeit
pGFP-Umag_01966	MluI NotI	potef-GFP-Ala6-MMXN (Böhmer et al., 2008)	Diese Arbeit
pGFP-Uox1-V124R	Gibson Assembly Gibson Assembly	potef-GFP-Ala6-MMXN (Böhmer et al., 2008)	Diese Arbeit
pGFP-Uox1-V124R	Gibson Assembly Gibson Assembly	potef-GFP-Ala6-MMXN (Böhmer et al., 2008)	Diese Arbeit

4.1.3 Oligonukleotide (Primer)

In der folgenden Tabelle sind die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide und deren Verwendung aufgelistet. Sie wurden von der Firma ‚Sigma-Aldrich Biotechnology, L.P. Und Sigma-Aldrich Co.‘ synthetisiert. Die Nukleotidsequenz ist jeweils in 5‘ nach 3‘-Richtung angegeben.

Tabelle 6: In dieser Arbeit verwendete Oligonukleotide

Oligonukleotide	Sequenz [5'-3']
Mac3_fwd	atatGAAGCTATCccATGCCGAATACCTTCG
Mac3_rev	atatGATATCCTAAAGTGAAGCAATGTGACAGC
Uox1_fwd	atatggcgcgccatgtctggcaaagcttcctcc
Uox1_rev	atattctagatcagagcttagcagcagacaagc

Mac3_PTS1_fwd	cgcgtaACGATCATCGTCCAGTGCTGTCACATTGCTTCACTTTAGt
Mac3_PTS1_rev	ctagaCTAAAGTGAAGCAATGTGACAGCACTGGACGATGATCGTa
Mls1_fwd	atatGATATCccATGTCCGTCGAAGGCGTCC
Mls1_rev	atatGATATCTCAGATACGCGCAGGCGC
Aox1_fwd	atatGATATCccATGGCGTCTACTCGCCCTG
Aox1_rev	atatGATATCTCACAACCTCGCCCGTTCAG
11660_fwd	atatacgcgtaatgttgctgatcaggcaacgaaacgg
11660_rev	atatgcggccgcctacagcttcgacttgagttgctggtc
02023_fwd	atatggcgcgccatgtcggttgcaacgaagggggc
02023_rev	atatgcggccgcctacaggcgggcttgttctccagc
04063_fwd	atatacgcgtaATGTTGGACATCACTGCTTCTCG
04063_rev	atatgcggccgcCTAGAGCTTACTTGTCATCCACCC
04479_fwd	atatacgcgtaATGCAGAAGATCGGACCATAC
04479_rev	atatgcggccgcTCACAGTTTCGCCTTTCC
06153_fwd	atatacgcgtaATGACGCAGCCTAGCTCC
06153_rev	atatgcggccgcCTACAGATTTGCTCGCGGC
02097_fwd	atatacgcgtaatgacctcctctaaaatcatgatgccg
02097_rev	atatgcggccgctcaaagctttgacctcgcgtggctgg
02182_fwd	atatacgcgtaatgcccaaggacgcagctcccg
02182_rev	atatgcggccgcttacagacgaggctggaactggatgc
06455_fwd	atatacgcgtaatgcaagaagtggaactacgtataccttc
06455_rev	atatgcggccgctcacagcctggatggcgagctcg
11300_fwd	atatacgcgtaatgaagctttctgtatcgtcttgcaagg
11300_rev	atatgcggccgcctacagcttcgacttgagttgctggtc
02862_fwd	atatggcgcgccatgagggagactaaactgcacatcccc
02862_rev	atatgcggccgcctacaagcgcgacttggctctttgtg
03158_fwd	atatggcgcgccatgtcaggttggacgcccatc
03158_rev	atatgcggccgcttacaacttgctcttagctgcagcgg
12289_fwd	atatacgcgtaatgttggttgtgggactcaccgg
12289_rev	atatgcggccgcttacagcttgctgctgggcaagg
Dao1_fwd	atatggcgcgccatgacaaatcaacttcacgtagtgg
Dao1_rev	atatgcggccgcctacagcctcgactggcgacc
TIIV_fwd	cgcgtaACCATCATCGTCcagtgctgtcacattgcttcactttagt
TIIV_rev	ctagactaaagtgaagcaatgtgacagcactgGCGGATGATCAGta
HexA_fwd	atatacgcgtaATGGGTTACTACGACGACGACG
HexA_rev	atattctagaTTATAGACGGGAAGAGTGGATG
TIIV_minimal_fwd	cgcgtaaccatcatcgtcaagtcgaagttgtaat
TIIV_minimal_rev	ctagattacaacttcgacttgacgatgatggtta
TIIV_fwd	cgcgtaACCATCATCGTCcagtgctgtcacattgcttcactttagt
TIIV_rev	ctagactaaagtgaagcaatgtgacagcactgGCGGATGATCAGta
TIIV_fwd	cgcgtaACCATCATCGTCcagtgctgtcacattgcttcactttagt
TIIV_rev	ctagactaaagtgaagcaatgtgacagcactgGCGGATGATCAGta
12mer_SKL_fwd	cgcgtaACCATCATCgtccagtgctgtcacatttcgaagttgtaa
12mer_SKL_rev	ctagttacaacttcgaaatgtgacagcactggacGATGATGGTta
9mer_SKL_fwd	cgcgtagtccagtgctgtcacatttcgaagttgtaa
9mer_SKL_rev	ctagttacaacttcgaaatgtgacagcactggacta
7mer_SKL_fwd	cgcgtatgtcacatttcgaagttgtaa
7mer_SKL_rev	ctagttacaacttcgaaatgtgacata

Mini-PTS1-SKL_fwd	gtacaaggccgcggcagccgccgcacgcgtgACCATCATTGTAAAATCAAAGTTGtagg
Mini-PTS1-SKL_rev	tcgacctaCAACTTTGATTTTACAATGATGGTcacgcgtgcggcggctgccgcggcctt
TIIR fw	cgcgtaACCATCATCCGCcagtgctgtcacattgcttcactttagt
TIIR rev	ctagactaaagtgaagcaatgtgacagcactgGCGGATGATGGTta
RIIV fw	cgcgtaCGCATCATCGTCcagtgctgtcacattgcttcactttagt
RIIV rev	ctagactaaagtgaagcaatgtgacagcactgGACGATGATGCGta
AIIV fw	cgcgtaGCCATCATCGTCcagtgctgtcacattgcttcactttagt
AIIV rev	ctagactaaagtgaagcaatgtgacagcactgGACGATGATGGCta
TAIV fw	cgcgtaACCGCCATCGTCcagtgctgtcacattgcttcactttagt
TAIV rev	ctagactaaagtgaagcaatgtgacagcactgGACGATGGCGGTta
TIAV fw	cgcgtaACCATCGCCGTCcagtgctgtcacattgcttcactttagt
TIAV rev	ctagactaaagtgaagcaatgtgacagcactgGACGGCGATGGTta
TIIA fw	cgcgtaACCATCATCGCCcagtgctgtcacattgcttcactttagt
TIIA rev	ctagactaaagtgaagcaatgtgacagcactgGGCGATGATGGTta
pmac1 fw	caGGTAccgctcatgcatttcc
pmac1 rev	cacccgggatgtctgcgatgacgaaccg
Al323 GFP fw	TTAAGGTCTCCCATGGGCgTGAGCAAGGGCGAGGAGC
Al323 GFP rev	TTAAGGTCTCCTCGAGttaCTTGTACAGCTCGTCCATGCCG
Al323 GFP fw	TTAAGGTCTCCCATGGGCgTGAGCAAGGGCGAGGAGC
Al323 GFP-TIIV rev	TTAAGGTCTCCTCGAGttagacGATGATggtCTTGTACAGCTCGTCCATGCCG
Ml502	gc*tacgtag*cATGCCGAATACCTTCGAGCAAG
Ml503	ga*gcggccgc*CTAAAGTGAAGCAATGTGACAGCACTGG
Ml502	gc*tacgtag*cATGCCGAATACCTTCGAGCAAG
Ml504	gagcggccgcCTAGAGACGAGCAAACACAGGAGCGGTCGCATCGACCGAGCAG
Al323 GFP fw	TTAAGGTCTCCCATGGGCgTGAGCAAGGGCGAGGAGC
Al323 GFP-TIIR rev	TTAAGGTCTCCTCGAGttacctGATGATggtCTTGTACAGCTCGTCCATGCCG
Mac3_fwd	atatggcgcgccatgccgaataccttcgagca
Mac3(TIIR)_rev	atattctagactaaagtgaagcaatgtgacagcactgcctgatgatcgtgcagacgcgttccaagatgg
Al323 Mac3 fw	TTAAGGTCTCCCATGGGCccgaataccttcgagcaagt
Al323 Mac3 rev	TTAAGGTCTCCTCGAGctaaagtgaagcaatgtgac
Al323 Mac3 fw	TTAAGGTCTCCCATGGGCccgaataccttcgagcaagt
Al323 Mac3(TIIR) rev	TTAAGGTCTCCTCGAGctaaagtgaagcaatgtgacagcactgcctgatgatcgtgcagacgcgttccaagat
02028_fwd	cgcgtaGGAGAAGCAGTGCCATTCACTGAACGGGCGAGGTTGTGAt
02028_rev	ctagaTCACAACCTCGCCCGTTCAGTGAATGGCACTGCTTCTCCta
01966_fwd	atatACGCGTcATGTCGAACTCTGATCCAAAGG
01966_rev	atatgcggccgcCTAAAGGTTCGACCTCTCGGC
Uox1_fwd frag 1	ACAAGGCCGCGGCAGCCGCCGCACGCGTGGaaatgtctggcaaagcttcctc
Uox_rev frag1	cttgtgagcaccaccgtctttctgatccaacctaatacgcgtccacttgtgct
Uox1_fwd frag 2	acgcgtattaggttggatcag
Uox_rev frag2	aacgatctgcagccgggcggccgctCTAGAtcagagcttagcagcagaca

4.1.4 Labormaterialien und Geräte

Spezielle Geräte für bestimmte Methoden sind in der jeweiligen Methodenbeschreibung aufgeführt. Zur Zentrifugation von Reaktionsgefäßen (1,5 und 2 ml) diente eine Heraeus Biofuge pico und der Zentrifugation größerer Reaktionsgefäße (15 und 50 ml) eine Heraeus Multifuge. Der Erwärmung von Reaktionsgefäßen auf eine definierte Temperatur dienten Thermomixer (Eppendorf, Hamburg).

Weitere allgemeinen Materialen sind mit ihren Bezugsquellen untenstehend gelistet:

Blottingpapier (Roth)
Cryo-Röhrchen (Sarstedt)
Reaktionsgefäße (1,5 ml, 2 ml ,15 ml, 50 ml; Sarstedt)
Kunststoff-Küvetten (Sarstedt)
Petrischalen (Sarstedt)
Pipettenspitzen (Sarstedt)
PVDF-Membran (Roth)
Sterile Spritzen und Kanülen (Braun)
Sterilfilter (Sarstedt)

4.1.5 Kits

Tabelle 7: In dieser Arbeit verwendete Fertigkits

Kit	Bezugsquelle	Verwendung
ZR Plasmid Miniprep-Classic Kit	*Zymo Research* (Kalifürnien, USA)	Präparation von Plasmid-DNA aus *Escherichia coli*
Gel/PCR DNA Fragment Extraction Kit	Geneaid (Hamburg)	Elution von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen

4.1.6 Chemikalien

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien wurden vornehmlich von Difco (Augsburg), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe) und Sigma-Aldrich (Deisenhofen) bezogen und waren von der Qualität überwiegend p.a..

4.1.7 Enzyme

Restriktionsenzyme wurden von Fermentas/Thermo Scientific (St. Leon-Rot) oder New England Biolabs (NEB; Frankfurt) bezogen. Für die DNA-Amplifikation kamen die Polymerasen Phusion Hot Start High-Fidelity DNA-Polymerase (Finnzymes/NEB, Frankfurt)

oder die KOD Extreme Polymerase (Novagen/Merck, Darmstadt) zum Einsatz. Der enzymatische Abbau von RNA bzw. DNA erfolgte unter Verwendung von RNase A von AppliChem (Gatersleben). Für den Gibson-Mix wurde die T4 DNA Ligase (Roche; Mannheim) verwendet. Lysozym (Roche) oder Novozym 234 (Novo Nordisc, Kopenhagen) bzw. Lysing enzymes aus Trichoderma harzianum (Sigma-Aldrich) wurden für die Degradierung bakterieller bzw. pilzlicher Zellwände eingesetzt.

4.1.8 Puffer, Lösungen und Nährmedien

Standardlösungen und Puffer wurden nach Sambrook *et. al.*, 1989 hergestellt. Die benötigten Puffer für die einzelnen Methoden sind in der Beschreibung der Methoden aufgeführt. Falls erforderlich wurden die Puffer, Lösungen und Nährmedien vor ihrer Verwendung in einem Autoklav bei 121°C für 20 min autoklaviert oder mit Hilfe eines Sterilfilters sterilisiert.

4.1.9 Antibiotika

Tabelle 8: In dieser Arbeit verwendete Antibiotika

Antibiotika	Endkonzentration
Ampicillin	100 µg / ml
Geneticin (G418)	200 - 400 µg / ml
Hygromycin B	200 - 300 µg / ml
Nourseothricin	150 µg / ml

4.2 Kultivierung von Mikroorganismen

4.2.1 Kultivierung von *E. coli*

E. coli wurde in einer Flüssigkultur im autoklavierten dYT-Medium bei 37°C gezüchtet. Falls erforderlich, wurde dem Medium 100 µg/ml Ampicillin hinzugefügt, um die Selektion zu erleichtern. Für die Kultivierung auf Festmedium wurde dYT-Agar verwendet, auf dem ebenfalls 100 µg/ml Ampicillin zur Selektion der transformierten Bakterien eingearbeitet wurde. Zur Langzeitlagerung wurden die Kulturen mit Glycerin im Verhältnis 50:50 vermischt und bei -80°C eingefroren.

<u>dYT-Flüssigmedium</u>

16 g/l Trypton

10 g/l Hefeextrakt
5 g/l NaCL
falls erforderlich: 100 µg/ml Ampicillin

dYT- Glycerin
dYT-Medium
80% (v/v) 87% Glycerin

dYT-Agar
dYT mit 2,0 % (w/v) Agar
falls erforderlich: 100 µg/ml Ampicillin

4.2.2 Kultivierung von *U. maydis*

Die Kultivierung von *U. maydis* erfolgte in einem flüssigen YEPS-light-Medium auf einem Schüttler bei 200 Umdrehungen pro Minute und 30°C. Für Medien, die bestimmte Kohlenstoff- oder Stickstoffquellen enthalten sollten, wurden dem YNB-Medium die entsprechenden Zusatzstoffe beigemischt. Für die Kultivierung auf Festmedien wurden Potato-Dextrose (PD)-Agar sowie Regenerationsagar-light verwendet. Falls notwendig, wurde den Festmedien das Antibiotikum Carboxin (2 µg/ml) hinzugefügt.
Zur dauerhaften Lagerung der *U. maydis* Stämme wurde die Kultur mit 50% NSY-Glycerin vermischt und bei -80°C eingefroren, wenn die Kulturen gut gewachsen waren. Falls nicht anders angegeben, wurden Kulturen aus der logarithmischen Wachstumsphase mit einer OD600 zwischen 0,7 und 1 verwendet.

YEPS-light Flüssigmedium
10 g/l Hefeextrakt
4 g/l Pepton
0,4 % (w/v) Saccharose

YNB-Medium
1,7 g/l Yeast Nitrogen Base
0,2 % (w/v) Ammoniumsulfat

Zusätze:
1,0 % (w/v) Glukose oder/und
0,1% (v/v) Ölsäure
0,05% (v/v) Tween40

PD-Agar
24 g/l Potato-Dextrose Broth
2,0 % (w/v) Agar

NSY-Glycerin
0,8 % (w/v) Nutrient Broth
0,1 % (w/v) Hefeextrakt
0,5 % (w/v) Sucrose
80% (v/v) 87% Glycerin

4.3 Molekularbiologische Methoden

4.2.3 Wachstumstests auf Festmedium

Für die Analyse der Wachstumsphänotypen wurden logarithmisch wachsende Kulturen von *U. maydis* Stämmen zweimal mit Wasser gewaschen und auf eine OD600 von 1 eingestellt. Von dieser Lösung wurden jeweils 4 µl einer seriellen Verdünnung auf die entsprechenden Festmedien getropft. Die Inkubation erfolgte dann für zwei bis vier Tage bei 30°C.

4.3.1 Herstellung und Transformation chemisch kompetenter *E. coli*-Zellen

Um chemisch kompetente Top10-E. coli-Zellen herzustellen, wurde die Methode von Hanahan *et al*, 1991, angewendet. Zunächst wurden die Zellen in magnesiumfreiem SOB-Medium so lange kultiviert, bis sie eine OD600 zwischen 0,3 und 0,4 erreichten. Anschließend wurden die Zellen in eiskalte 50-ml-Falconröhrchen überführt und bei 4000 U/min für 10 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Die Zellen wurden dann in 20 ml eiskalten CCMB80-Puffer resuspendiert und für 20 Minuten in einem Eis-Wasserbad inkubiert. Nach einer erneuten Zentrifugation bei den gleichen Bedingungen wurden die Zellen in 4 ml CCMB80-Puffer resuspendiert, aliquotiert und bei -80°C eingefroren.

SOB-Medium
20 g/l Trypton
5 g/l Hefeextrakt

10 mM NaCl
2,5 mM KCl

CCMB80-Puffer
10 mM KAc pH 7,0
80 mM $CaCl_2$
20 mM $MnCl_2$
10 mM $MgCl_2$
10 % Glycerin
in H_2O_{bid}: pH 6,4 mit 0,1 M HCl einstellen und steril filtrieren

Um chemisch kompetente *E. coli* Zellen zu transformieren, wurden 20 µl eines Gibson-Reaktionsansatzes oder 1 µl einer Plasmidlösung mit einem Aliquot von etwa 50 µl chemisch kompetenter Zellen vermischt. Diese Mischung wurde für 20 Minuten auf Eis stehen gelassen. Danach erfolgte ein Hitzeschock für 1 Minute bei 42°C, gefolgt von einer 2-minütigen Abkühlung auf Eis. Anschließend wurde die Transformationslösung auf Selektivmediumplatten ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert.

4.3.2 Transformation von *U. maydis*

Um *U. maydis* zu transformieren, wurde ein leicht modifiziertes Protokoll nach Schulz *et al*, 1990, angewendet. Zunächst wurden 50 ml einer *U. maydis*-Kultur mit einer optischen Dichte zwischen 0,5 und 1 für 5 Minuten bei 3500 U/min zentrifugiert. Die Zellen wurden einmal in 20 ml SCS-Lösung gewaschen. Anschließend wurden sie in 5 ml SCS mit 2 mg/ml Novozym 234 oder 20 mg/ml *T. harzianum* Lysing Enzymen aufgenommen, um Protoplasten zu erzeugen. Sobald etwa 80 % der Zellen protoplastiert waren, wurde 25 ml eiskalte SCS-Lösung hinzugefügt und die Zellsuspension für 10 Minuten bei 2300 U/min bei 4°C zentrifugiert. Die Zellen wurden anschließend zweimal mit eiskalter SCS-Lösung gewaschen, um die Enzyme zu entfernen. Danach erfolgte eine weitere Waschung mit eiskalter STC-Lösung, gefolgt von der Aufnahme in 0,5 ml STC-Lösung. Diese Protoplasten konnten entweder direkt transformiert oder bei -80°C eingefroren und später verwendet werden.

SCS-Lösung
1 M Sorbitol in
20 mM Na-Citrat pH 5,8; sterilfiltriert

STC-Lösung
100 mM CaCl2
1 M Sorbitol in 10 mM Tris-HCl pH 7,5; sterilfiltriert

STC/PEG-Lösung
40% PEG4000 in STC; sterilfiltriert

Regenerations-Agar
Top:
1 M Sorbitol in YEPS
1,5% (w/v) Bactoagar
Bottom:
wie Top, zusätzlich doppelt konzentriertes Antibiotikum

Um *U. maydis* zu transformieren, wurde zunächst 50 µl der auf Eis gekühlten Protoplastensuspension vorsichtig mit linearisierter DNA von 100 ng bis zu 5 µg vermischt. Das Ganze wurde in einem Volumen von maximal 10 µl durchgeführt und für 10 Minuten auf Eis inkubiert. Danach wurde 0,5 ml STC/PEG-Lösung hinzugefügt, und die Mischung wurde für weitere 15 Minuten ebenfalls auf Eis gelagert.
Anschließend wurde die Zellsuspension auf Regenerations-Agar ausgestrichen, der zuvor mit 10 ml Top-Agar ohne Antibiotikum überschichtet wurde. Der Bottom-Agar enthält dabei doppelt so viel Antibiotikum wie das normale Selektionsmedium. Die Platten wurden dann für drei bis sieben Tage bei 30°C oder bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Inkubation wurden einzelne Kolonien auf Selektionsmedium vereinzelt, um die transformierten Zellen weiter zu isolieren.

4.3.3 Restriktionsenzymatische Spaltung von DNA

Restriktionsendonukleasen sind Enzyme, die an bestimmten Schnittstellen im DNA-Molekül schneiden. Aufgrund ihrer spezifischen Schnittstellen können sie genutzt werden, um einen Vektor zu analysieren. Für solche Analysen wird zunächst die benötigte Enzymmenge berechnet:

$$\text{Enzymmenge für 1 } \mu g \text{ DNA} = \frac{Größe\ von\ \lambda \text{ x } Schnittstellen\ im\ Vektor}{Größe\ des\ Plasmids\ (kb) \text{x } Schnittstellen\ in\ \lambda}$$

Eine Enheit (U) des Enzyms ist definiert als die Menge, die bei 37°C in einer Stunde vollständig 1 µg λ-DNA schneidet. Die verwendeten Enzyme liegen in der Regel in einer Konzentration von 10 U/µl vor.
Um die Restriktion durchzuführen, braucht man außerdem einen spezifischen Puffer (10-fache Konzentration), der dem Reaktionsansatz hinzugefügt wird. Das Volumen des Reaktionsansatzes hängt von der Menge an DNA ab, die man verwenden möchte.

4.3.4 Gibson Assembly

Gibson-Assembly ist eine Methode, um mehrere DNA-Fragmenten miteinander zu verbinden, unabhängig von ihrer Sequenz oder Länge (Gibson *et al*, 2009). Dabei laufen drei enzymatische Schritte ab:

1. Zuerst entfernt die T5-Exonuklease die DNA an den Enden der Fragmente und bildet einzelne, einsträngige 3'-Überhänge. Diese Überhänge ermöglichen es den Fragmenten, sich an den komplementären Stellen zu verbinden (annealen).
2. Anschließend füllt die Phusion-DNA-Polymerase die Lücken zwischen den verbundenen Fragmenten auf.
3. Zum Schluss verbindet die Taq-DNA-Ligase die freien 5'-Phosphatgruppen mit den 3'-Hydroxylgruppen, sodass die Fragmente endgültig zusammengefügt werden.

Für eine Gibson-Assembly-Reaktion werden die entsprechenden DNA-Produkte in gleichen Mengen in 5 µl Pipettier-Tuben gegeben und anschließend zu 15 µl eines 1,33-fach konzentrierten Gibson-Assembly-Mastermixes hinzugefügt. Die Reaktion läuft dann für 60 Minuten bei 50°C.

<u>Gibson-Assembly-Mastermix</u>

5x Isothermaler Reaktionspuffer

10 U/µl T5 Exonuklease

2 U/µl Phusion-DNA-Polymerase

40 U/µl Taq-DNA-Ligase

H_2O_{bid} ad 1,2 ml

<u>Ansatz für eine Reaktion</u>

15 µl Gibson-Assembly-Mix (1,33x)

1-4 µl zu inserierendes DNA-Fragment, bei Bedarf mehrere unterschiedliche Fragmente

1 µl verdauter Vektor

H_2O_{bid} ad 20 µl

4.3.5 Bestimmung der DNA-Konzentration

Die Konzentration der DNA wurde anhand des Vergleiches mit einem Mengenstandard (λ-DNA in definierter Konzentration, 50 bzw. 100 ng DNA) im Agarosegel unter UV-Licht abgeschätzt.

4.3.6 DNA-Sequenzierungen

Die Sequenzierung von DNA-Fragmenten und Plasmiden erfolgte nach der Kettenabbruchmethode (Sanger *et al*, 1977) und wurde von der Firma MWG Eurofins durchgeführt, indem die entsprechenden Fragmente im folgenden Ansatz eingeschickt wurden:

5 µl DNA des Fragments/Plasmids
2 µl forward oder reverse Primer
10 µl H_2O

4.3.7 Auftrennung von DNA-Fragmenten mittels Agarose-Gelelektrophorese

Mittels Gelelektrophorese werden Nukleinsäuren in einem elektrischen Feld nach ihrer Größe getrennt (Sharp *et al*, 1973). Dabei wandert die DNA aufgrund ihrer negativen Ladung in Richtung Anode. Für die Gele wurde in der Regel eine Agarosekonzentration von etwa 1 % verwendet. Zur Herstellung des Agarosegels wurde die benötigte Menge Agarose in 1x TAE-Puffer durch Aufkochen gelöst und anschließend mit Ethidiumbromid versetzt, das eine Endkonzentration von 0,5 µg/ml hat. Das flüssige Gel wurde in eine Gelform mit etwa 1 cm Höhe und den Maßen 10 x 12 cm gegossen, in die ein Kamm eingesteckt wurde. Nach dem Erstarren wurde der Kamm entfernt, und das feste Gel in eine Gelkammer gelegt, die mit 1x TAE-Puffer gefüllt wurde.

Die DNA-Proben wurden in Auftragspuffer aufgenommen und in die Taschen des Gels geladen. Während der Elektrophorese wurde bei einer Stromstärke von 120 mA bzw. 130 V gearbeitet, sodass die DNA nach ihrer Größe aufgetrennt wurde. Als Größenstandard diente der GenerulerTM DNA-Ladder-Mix der Firma Fermentas. Nach Abschluss der Elektrophorese wurden die DNA-Banden unter UV-Licht (304 nm) sichtbar gemacht und anschließend fotografiert, zum Beispiel mit einem Gel-Dokumentationssystem wie dem GelDoc-EZ Imager von BioRad in München.

<u>50x TAE-Puffer</u>
2 M Tris-Base
2 M Acetat
50 mM EDTA
in H_2O_{bid}

Als Auftragspuffer wurde der 6x-Ladepuffer der Firma Fermentas benutzt.

4.3.8 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Die PCR-Reaktion (Bell, 1989) ist eine Methode, um bestimmte, doppelsträngige DNA-Abschnitte zu vervielfältigen. Dabei kommt eine spezielle, hitzestabile Polymerase zum Einsatz, die zusammen mit kurzen DNA-Stücken, den Primern (Oligonukleotiden), und den Bausteinen (dNTPs) arbeitet, um gezielt die gewünschten DNA-Fragmente zu kopieren. In dieser Arbeit wurde die Phusion-DNA-Polymerase verwendet. Dieses Enzym ist besonders hitzestabil und besteht aus einer DNA-Bindedomäne, die mit einer Proofreading-Polymerase aus dem Pyrococcus-Arten fusioniert ist.

Der PCR-Prozess läuft in vier typischen Schritten ab: Zuerst wird die doppelte DNA durch Erhitzen auf 98°C in einzelne Stränge aufgespalten (Denaturierung). Dann binden die Primer bei Temperaturen zwischen 50 und 65°C an die einzelnen DNA-Stränge (Annealing). Im nächsten Schritt, bei 72°C, synthetisiert die Polymerase neue, komplementäre DNA-Stränge, beginnend an den Primern (Elongation). Danach wird die Temperatur wieder auf 98°C erhöht, um den Zyklus neu zu starten.

Mit jedem Zyklus vervielfacht sich die Ziel-DNA, sodass nach mehreren Durchläufen aus wenigen DNA-Molekülen eine große Menge entsteht. Für die Standard-PCRs mit Phusion-Polymerase wurde jeweils ein Volumen von 50 µl verwendet. Die genauen Temperaturen und Zeiten für die einzelnen Schritte können je nach Primer und Ziel-DNA angepasst werden. Die Reaktionen wurden in einem Thermocycler (z.B. von Biometra, Göttingen) durchgeführt.

<u>Phusion-Polymerase</u>

1 ng - 300 ng Matrizen-DNA

250 µM dNTPs (1:1:1:1 Verhältnis)

1 µM Oligonukleotid forward

1 µM Oligonukleotid reverse

1 x konzentrierter Phusion GC-Puffer (Finnzymes)

0,5 U Phusion-Polymerase

Programm: 98°C/1 min – (98°C/30 s - 50-65°C/15 s - 72°C/ x min) x 32 - 72°C/5 min (Ansatz zwischen 20 und 50 µl)

KOD Extreme Polymerase
1 ng - 300 ng Matrizen-DNA
250 µM dNTPs (1:1:1:1 Verhältnis)
1 µM Oligonukleotid 1
1 µM Oligonukleotid 2
1 x konzentrierter KOD-Puffer (Novagen)
1 U KOD-Extreme Polymerase

Programm: 94°C/2 min – (94°C/30 s - 50-65°C/15 s - 68°C/x min) x 32- 68°C/10 min

4.3.9 Exzision von Agarose-Gel-Fragmenten

Um bestimmte DNA-Fragmente aus dem Agarosegel zu isolieren, wurden die entsprechenden Banden ausgeschnitten und die DNA anschließend mit dem „Gel/PCR Fragment Extraktions-Kit“ von Geneaid gemäß den Anweisungen des Herstellers extrahiert.

4.4 Biochemische Methoden

4.4.1 Präparation von Proteinen

Die Proteinextrakte aus *Ustilago maydis* wurden gemäß dem Verfahren von Kushnirov, 2000 hergestellt. Zunächst wurden die benötigten Zellen aus einer logarithmisch wachsenden Kultur durch Zentrifugation bei 13.000 U/min für 1 Minute abgesetzt. Das Zellpellet wurde anschließend in 200 µl einer 0,1 M Natriumhydroxid-Lösung neu suspendiert und für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dieser Inkubation erfolgte eine erneute Zentrifugation, um Zellreste abzutrennen.
Das Pellet wurde dann in SDS-Probenpuffer aufgenommen, wobei die Menge an Zellmaterial der Menge entspricht, die bei 2 OD600 pro 25 µl Puffer enthalten ist. Die Proben wurden bei 95°C für 5 Minuten denaturiert. Nach der Denaturierung wurde erneut zentrifugiert (bei 13.000 U/min für 1 Minute), um Zellrückstände zu entfernen. Der Überstand, der die gelösten Proteine enthält, wurde in ein frisches Gefäß überführt und bei -80°C gelagert.

SDS-Probenpuffer
2% (w/v) SDS
6% (v/v) Glycerin

0.025% (w/v) Bromphenolblau

50 mM Dithiothreitol in 50 mM Tris-HCl, pH 6.8

4.4.2 Auftrennung von Proteinen mittels Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Zur Trennung der Proteine wurde die Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Laemmli, 1970) verwendet. Bei diesem Verfahren binden die Proteine SDS, wodurch ihnen eine negative Ladung verliehen wird. Dadurch können sie in einem elektrischen Feld nach ihrer Molekülgröße aufgetrennt werden. Das Gel bestand aus zwei Schichten: Die untere Schicht war das Trenngel, das die Proteine entsprechend ihrer Größe separiert, während die obere Schicht als Sammelgel diente und die Proteine vor dem Eintritt ins Trenngel konzentrierte.

Das fertige Gel wurde in eine Gelkammer (Mini Protean System; Bio-Rad) eingesetzt und mit SDS-Laufpuffer gefüllt. Zur Bestimmung der Molekulargewichte der aufgetragenen Proteine wurde eine Page Ruler Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific) verwendet. Die Elektrophorese wurde bei einem Strom von 20 bis 25 mA pro Gel durchgeführt.

<u>SDS-Laufpuffer</u>

200 mM Glycin

0,2 % w/v) SDS

in 25 mM Tris-HCl, pH 8,8

<u>Sammelgel</u>

5 % (v/v) Acrylamid

0,1 % (w/v) SDS

in 125 mM Tris-HCl pH 6,8

0,1 % (w/v) Ammoniumperoxodisulfat

0,05 % (v/v) TEMED

<u>Trenngel</u>

8 bis 10 % (v/v) Acrylamid

0,1 % (w/v) SDS

in 375 mM Tris-HCl pH 8,8

0,1 % (w/v) Ammoniumperoxodisulfat

0,05 % (v/v) TEMED

4.4.3 Transfer und Nachweis von Proteinen auf Membranen (Western Blot)

Die im Gel aufgetragenen Proteine wurden mittels des Wet-Transfer-Systems (Bio-Rad) auf eine PVDF-Membran übertragen. Zur Aktivierung wurde die Membran kurz in Methanol getaucht. Das Gel wurde möglichst luftblasenfrei auf die aktivierte Membran gelegt. Anschließend wurden oben und unten jeweils drei Whatman-Papiere, die in Western-Transfer-Puffer getränkt waren, auf das Gel gelegt, gefolgt von in Transfer-Puffer getränkten Schwämmen. Der gesamte Stapel wurde in einer Kassette fixiert und in die mit Western-Transfer-Puffer gefüllte Wet-Blot-Apparatur eingesetzt. Diese Apparatur wurde auf Eis platziert, und die Proteine wurden bei 35 V über Nacht auf die Membran übertragen.

Western-Transfer-Puffer

200 mm Glycin

20 % (v/v) Methanol

in 25 mM Tris-HCl; pH 10,4

Die auf der Membran übertragenen Proteine wurden mittels Antikörper nachgewiesen. Zunächst wurde die Membran in Blockierlösung (TBS-T mit 5% Milchpulver) für 30 Minuten bei Raumtemperatur schüttelnd inkubiert. Anschließend erfolgte die Inkubation mit primären Antikörpern (verdünnt zwischen 1:1000 und 1:5000) in TBS-T mit 5% Milchpulver, wobei die Membran für 2 Stunden bei Raumtemperatur schwenkend behandelt wurde. Nach der Inkubation wurde die Membran fünfmal je 30 Sekunden unter starkem Schütteln mit TBS-T gewaschen.

Daraufhin wurde ein sekundärer, HRP-gekoppelter Antikörper in einer Verdünnung von 1:20.000 in Blockierlösung hinzugefügt und die Membran für 45 Minuten schwenkend inkubiert. Es folgten erneut fünf Waschschritte à 30 Sekunden mit TBS-T. Für die Entwicklung des Signals wurde die Membran jeweils drei Minuten lang mit SuperSignal West Pico oder SuperSignal West Femto (Thermo Fisher Scientific) behandelt. Die resultierenden Signale wurden mit einem Chemocam Imaging System (Intas, Göttingen) aufgenommen und anschließend mit ImageJ (Schneider *et al*, 2012) ausgewertet.

TBS-T

0,1 % (v/v) Tween 20 in TBS

Primäre Antikörper

Anti-GFP (Torrey Pines; 1:5000)

Anti-mCherry (Abcam; 1:1000)

Sekundäre Antikörper

Ziege-Anti-Maus-HRP (1:10.000 – 1:50.000; ThermoFisher).

Ziege-Anti-Hase-HRP (1:10.000 – 1:50.000; ThermoFisher)

4.4.4 Subzelluläre Fraktionierung

Die biochemische Analyse der Proteinlokalisation mittels Dichtegradientenzentrifugation wurde nach einem modifizierten Protokoll von Cramer *et al*, 2015 durchgeführt. Nach den Schritten 1–16 wurde ein „postnuclear supernatant“ (PNS) gewonnen. Die PNS-Konzentration wurde mit einem Photometer bestimmt und auf eine OD600 von 1 eingestellt, indem Lysis-Puffer hinzugefügt wurde. Anschließend wurden 1000 µl Portionen bei -80°C gelagert.

Für die Dichtegradienten wurde ein Aliquot auf Eis aufgetaut und bei 13.000 U/min (Upm) für 5 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt, und das Pellet in 210 µl Lysis-Puffer resuspendiert. Der Gradient bestand aus Schichten von 333 µl 35%, 666 µl 30%, 666 µl 25% und 333 µl 20% NycoDenz, gelöst in Gradientenpuffer A, die vorsichtig in 3 ml Polycarbonatröhrchen (Beckman Coulter, Brea) übereinandergeschichtet wurden. Daraufhin wurde ein Volumen von 200 µl des jeweiligen PNS vorsichtig auf den Gradienten aufgetragen. Die Röhrchen wurden in einer Beckman L7-65 Ultrazentrifuge mit einem Sorwall TST 60.4 Schwenkrotor bei 35.000 U/min für 90 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurden zwölf Fraktionen à 182 µl vorsichtig von der Oberfläche des Gradienten entnommen und entweder direkt bei -80°C gelagert oder mit Proteinprobenpuffer gemischt.

Zur Weiterverarbeitung wurden die PNS-Fraktionen auf Eis aufgetaut, bei 10.000 x g für 10 Minuten bei 4°C zentrifugiert und anschließend im Verhältnis 1:10 in Lysepuffer konzentriert. Die Proben wurden in zwei Hälften geteilt, wobei die Aliquots jeweils 45 Minuten lang in Lysepuffer mit 1 % Triton-X-100 oder nur in Lysepuffer inkubiert wurden. Die Präparate wurden unmittelbar nach Inkubation mittels Epifluoreszenzmikroskopie analysiert, nachdem sie auf Agarosekissen (1 %, w/v) immobilisiert worden waren.

Lysis-Puffer

0,5 mM Na_2-EDTA

1 mM KCl 0,6 M Sorbitol

Protease-Inhibitoren:

1 µg/mL Antipain

1 µg/mL Aprotinin

0,2 mg/mL Benzamidinehydrochlorid
1 µg/mL Bestatin
1 µg/mL Chymostatin
1 µg/mL Leupeptin
0,2 mg/mL NaF
1 µg/mL Pepstatin
10 µg/mL PMSF

Gradientenpuffer A (ohne Sucrose)
1 mM Na2-EDTA
1 mM KCl
0.1 % (v/v) ethanol

in 5 mM MES; pH 6, eingestellt mit KOH

DTT Puffer
10 mM Dithiotreitol (direkt vor Benutzung zugesetzt)
in 100 mM Tris
Sorbitol-Puffer zur Spheroplastierung
1,2 M Sorbitol
in 20 mM MES, pH 7,4

4.4.5 Aggregationsassays

Das Protein wurde in 1x SEC-Puffer auf eine Konzentration von 2 µM verdünnt (Gesamtvolumen 10 ml). 10 µl einer 1 M DTT-Stammlösung (Endkonzentration 1 mM) wurden hinzugefügt. Das Gemisch wurde auf Eis sorgfältig gemischt und für 30 Minuten auf Raumtemperatur gebracht. Anschließend wurden die Proben 60 Minuten lang bei 55°C inkubiert. Der 1x SEC-Puffer wurde bei OD320nm gemessen. Die OD320nm wurde zu verschiedenen Zeitpunkten (0, 5, 10, 15, 30 und 60 Minuten) gemessen. Die Daten wurden mit Microsoft Excel aufgezeichnet.

4.4.6 Heterologe Proteinexpression in *E. coli* und Proteinaufreinigung

Offene Leserahmen, die für die Proteine Mac3, Mac3-V_{570}R, GFP-TIIR und GFP-TIIV kodieren, wurden durch PCR amplifiziert und unter Verwendung von *BsaI-Restriktionsstellen* in einen modifizierten pET24d-Vektor (Novagen) kloniert. Beide Proteine enthielten einen N-

terminalen 6xHIS-Tag. Die Proteine wurden in *E. coli* BL21(DE3) (Novagen) über 16 Stunden bei 30°C in LB-Medium mit 1% w/v Laktose produziert. Die Zellen wurden mit einem Microfluidizer (M110-L, Microfluidics) lysiert. Nach der Lyse wurden die Zelltrümmer durch Zentrifugation (50.000 x g) entfernt. Alle Proteine wurden durch Nickel-Ionen-Affinitäts- und Größenausschlusschromatographie gereinigt (Czech *et al*, 2022). Der SEC-Puffer bestand aus 20 mM HEPES-Na (pH 7,5), 200 mM NaCl und 20 mM KCl.

4.4.7 Aktivitätsassays

Wir haben das Protokoll aus zwei verschiedenen Quellen übernommen (Kalcker et al., 1947; Galbán et al., 2015). Kurz gesagt wurden 300 µl Boratpuffer (20 mM Borsäure, 15 mM Natriumchlorid, 5 mM Natriumtetraborat, pH 8,4) und 450 µl Harnsäurelösung (20 mg Harnsäure in 25 mM NaOH, pH 8,0) in eine Küvette gegeben, gemischt und als Ausgangspunkt gemessen, bevor das Protein hinzugefügt wurde. Anschließend wurden 200 µl Enzym (ca. 50 µM in Boratpuffer) zugegeben und 30 s nach Zugabe des Enzyms wurde die erste Messung durchgeführt. Anschließend wurde die Küvette mit Parafilm verschlossen und in ein Wasserbad bei 30°C gestellt. Während der Reaktion wurde alle 5 Minuten eine Messung durchgeführt, bis keine Veränderung der Absorption mehr auftrat. Als Kontrolle wurden 750 µl Puffer und 200 µl Enzym gemischt, während der Reaktionszeit im Wasserbad gehalten und nach 50 min gemessen. Die Absorption wurde mit einem Ultrospec 2100 pro UV/vis-Spektrometer bei 287 nm mit einer Polystrol/Polystyrol-Küvette (10 x 4 x 45 mm) gemessen. Als Blindwert wurde Boratpuffer verwendet. Für die Harnsäuremessung wurden 450 µl Harnsäurelösung in eine Küvette mit 500 µl Boratpuffer gegeben. Die Messungen wurden wie oben beschrieben durchgeführt.

4.4.8 Sauerstoffverbrauchsmessungen

Um abzuschätzen, ob die Verlagerung von Kernproteinen in das peroxisomale Lumen den Ölsäure-Stoffwechsel beeinflusst, gingen wir davon aus, dass die Oleat-Oxidationsraten mit den Sauerstoff-Verbrauchsraten in Zusammenhang stehen, wenn Ölsäure als einzige Kohlenstoffquelle hinzugefügt wird. Daher haben wir die Dynamik des Sauerstoffverbrauchs nach dem Übergang zu Ölsäure untersucht. *U. maydis*-Zellen wurden bis zu einer OD600 von 1 in YNB-Medium mit 2 % (w/v) Glukose und 0,5 % (w/v) Ammoniumsulfat gezüchtet. Um Glukose zu entfernen, wurden die Kulturen dreimal in YNB gewaschen. Anschließend wurde die OD600 in YNB-Medium mit 0,5 % (w/v) Ammoniumsulfat auf 0,01 eingestellt. Ölsäure und Tween-40 wurden vorgemischt und in einer Endkonzentration von 0,2 % (v/v) bzw. 0,1 % (v/v) zugegeben. Die Kulturen wurden in gasdichte Septumgefäße (Exetainer, Labco, UK)

überführt, die mit Sensorspots (Pyroscience, Deutschland) ausgestattet waren, die berührungslose Sauerstoffmessungen in den Gefäßen durch ein faseroptisches Auslesesystem (FireSting-Pro, Pyroscience, Deutschland) ermöglichten. Die Fläschchen wurden ohne Kopfraum verschlossen, und die Sauerstoff-Konzentration wurde überwacht (Pyro Workbench), während die Kulturen kontinuierlich gerührt wurden. Die Sauerstoffverbrauchsrate wurde als erste Ableitung der Konzentration nach der Zeit berechnet. Die Beschleunigung, die die kombinierte Wirkung von Wachstum und metabolischer Anpassung widerspiegelt, wurde durch lineare Regression dieser Raten über die Zeit bestimmt. Analoge Kontrollexperimente wurden für Zellen durchgeführt, die in YNB mit Glukose als Kohlenstoffquelle inkubiert wurden.

4.5 Mikroskopie

4.5.1 Epifluoreszenzmikroskopie

Die fluoreszenzmikroskopische Analyse von *U. maydis* erfolgte mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops des Typs Axioskop 2 (Firma Zeiss). Die Anregung der unterschiedlichen Chromophore erfolgte mittels zur Wellenlänge passender Filter. Die zu untersuchenden Zellen wurden in einem Volumen von 4 µl auf einen mit einer ca. 0,5 mm dicken Wasseragarschicht (1%) bedeckten Objektträger aufgetropft. Anschließend wurde das Deckglas aufgelegt. Der Wasseragar diente zur Fixierung der Zellen an ihrer Position, um unscharfe Bilder zu vermeiden. Vergleichsfotos wurden im Durchlicht gemacht. Die Dokumentation der Aufnahmen erfolgte mit einer Kamera der Firma Zeiss (Typ MegaFire) und der Software Volocity (Improvision). Die Aufnahme von Videos erfolgte über einen Zeitraum von 60 Sekunden mit 2 Frames pro Sekunde. Gezeigt werden die mittleren 80 Frames, welche einen Zeitraum von 40 Sekunden repräsentieren Die Protein Lokalisation wurde mithilfe von dekonvolierten Z-Stapeln der entsprechenden Fluoreszenzkanäle bestimmt. Die Punktspreizfunktionen (PSF), die für die Dekonvolution erforderlich waren, wurden unter Verwendung des Richards und Wolf-Modells mit dem ImageJ-Plugin "PSF Generator" erstellt (Kirshner, 2012). Die Dekonvolution der einzelnen Z-Stapel wurde dann mit dem ImageJ-Plugin "DeconvolutionLab" durchgeführt, wobei der Richardson-Lucy-Algorithmus mit 25 Wiederholungen angewendet wurde (Vonesch und Unser, 2008).

Name	**Exzitation**	**Emission**
GFP	485/9.0 nm	510/9.0 nm
mCherry	590/9.0 nm	610/9.0 nm

4.5.2 Structured Illumination Mikroskopie

Die dreidimensionale strukturierte Beleuchtungsmikroskopie wurde auf einem Deltavision OMX V4 Mikroskop mit einem Olympus x60 NA 1.42 Objektiv und drei PCO edges CMOS Kameras und 488 nm und 568 nm Laserlinien durchgeführt. Die Zellen wurden mit einem Gittermuster beleuchtet. Für jede Bildebene wurden 15 Rohbilder (3 Orientierungen, 5 Phasen) aufgenommen. Die Software SoftWoRx (Applied Precision, GE Healthcare) wurde für die Bildrekonstruktion, Ausrichtung und Projektion verwendet. Die Bilder wurden in ImageJ/Fiji77 verarbeitet. Für die 3D-Visualisierung der peroxisomalen Subdomänen wurden Oberflächen mit Imaris (Oxford Instruments) erzeugt. Imaris segmentiert Objekte und erzeugt dann 3D-Oberflächen/3D-Netze aus diesen Objekten, die dann als 3D-Objekte visualisiert werden. Das „hohle“ ringförmige Aussehen basiert auf der Visualisierung der Oberfläche in den Bildern in Abb. 1f und S2g, wobei eine teilweise transparente Textur aufgetragen wurde. Alternativ wurden SIM-Bilder mit einem Zeiss ELYRA PS.1 Mikroskop mit einer ANDOR iXon 987 EMCCD-Kamera (Belichtungszeit: 50 ms, Verstärkung: 5) unter Verwendung eines alpha Plan-Apochromat 100x/1.46 Oil DIC M27 Elyra Objektivs mit 488 nm (HR Diode 488-200, 3%) und 564 nm (HR DPSS 561-200, 5%) Laserlinien als Anregungsquellen aufgenommen. Pro Ebene wurden 15 Bilder (3 Rotationen, 5 Phasen) aufgenommen. Die Software ZEN (Zeiss) wurde für die Verarbeitung der SIM-Rekonstruktionen verwendet.

4.5.3 Transmission Elektronen Mikroskopie

Zur Visualisierung von *U. maydis*-Zellen, die GFP-Mac3 exprimieren, mit Hilfe der Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) wurden 50 ml logarithmisch wachsende Zellen geerntet und unter hohem Druck eingefroren (Wohlwend HPF Compact 02). Nach anschließender Gefriersubstitution (mit Aceton, das 0,25% (w/v) Osmiumtetroxid, 0,2% (w/v) Uranylacetat, 0,05% (w/v) Rutheniumrot und 5% (v/v) Wasser enthält) (Leica AFS2) wurden die Zellen in Epon812-Ersatzharz (Fluka) eingebettet. Die eingebetteten Zellen wurden in 50 nm dünne Schnitte geschnitten (Leica EM UC7 RT), die für die Immunmarkierung mit Anti-GFP (Rockland; Verdünnung 1:500) verwendet wurden. Als Sekundärantikörper wurde ein an ultrakleine Goldpartikel gekoppelter Kaninchen-Anti-Ziegen-Antikörper verwendet (Aurion, Verdünnung 1:100). Anschließend wurde ein Silberanreicherungsverfahren durchgeführt und die Schnitte wurden mit 2 % (w/v) Uranylacetat und 0,5 % (w/v) Bleizitrat nachgefärbt. Die Analyse der Proben wurde mit einem JEOL JEM2100 TEM durchgeführt, das mit einer Fast-Scan 2k CCD TVIPS (Gauting, Deutschland) F214 Kamera ausgestattet ist. Die Bilder wurden in ImageJ77 verarbeitet.

4.6 Statistische Auswertung

Mikroskopische Daten wurden in drei unabhängigen Replikaten gesammelt. Pro Kultur wurden mindestens fünf Bilder quantifiziert. Der Pearson-Korrelationskoeffizient wurde mit Volocity 5.5.2 berechnet. Superplots und Student's t-Tests wurden mit RStudio 1.2.1335 und R 3.6.0 durchgeführt. Blots sind wie folgt strukturiert: Mittellinie: Mittelwert; Fehlerbalken: Standardfehler des Mittelwerts; große Kreise: Mittelwert der Experimente; kleine Kreise: Datenpunkte der Experimente. P-Werte wurden mit einem ungepaarten, zweiseitigen Student's t-Test berechnet. Für Daten mit mehreren Vergleichen wurde mit dem Programm GraphPad Prism (8.0.2) ein 1-Wege-Anova in Verbindung mit einem Tukey-Post-Test durchgeführt. Zur Quantifizierung von Kontakten zwischen Mitochondrien und Peroxisomen wurden fünf Bilder pro Stamm mit mindestens fünf Zellen aus 3 unabhängigen Experimenten analysiert. Peroxisomen wurden als Mitochondrien-assoziiert gezählt, wenn keine schwarzen Pixel zwischen den fluoreszierenden Signalen der jeweiligen Markerproteine erkennbar waren. Zur Berechnung der Pearson-Korrelationskoeffizienten enthielten alle analysierten Bilder zehn oder mehr Zellen. Die Auswertung wurde ohne Kenntnis der Genotypen durchgeführt. Für die Quantifizierungen von Signalintensitäten wurde die Intensität des peroxisomalen Signals im Verhältnis zum Gesamtsignal pro Zelle mit ImageJ (Schneider et al., 2012) quantifiziert. Alle Experimente wurden zumindest in Triplikaten durchgeführt.

5. Referenzen

Agne B, Meindl NM, Niederhoff K, Einwächter H, Rehling P, Sickmann A, Meyer HE, Girzalsky W & Kunau WH (2003) Pex8p: An intraperoxisomal organizer of the peroxisomal import machinery. *Mol Cell* 11: 635–646

Aksam EB, Koek A, Kiel JAKW, Jourdan S, Veenhuis M & Van Der Klei IJ (2007) A peroxisomal Lon protease and peroxisome degradation by autophagy play key roles in vitality of Hansenula polymorpha cells. *Autophagy* 3(2) 96-105

Anderson RM, Bitterman KJ, Wood JG, Medvedik O & Sinclair DA (2003) Nicatinamide and PNC1 govern lifespan extension by calorie restriction in Saccharomyces cerevisiae. *Nature* 423: 181–185

Angermüller S & Fahimi HD (1988) Heterogenous staining of d-amino acid oxidase in peroxisomes of rat liver and kidney - A light and electron microscopic study. *Histochemistry* 88: 277–285

Angermüller S, Leupold C, Zaar K & Fahimi HD (1986) Electron microscopic cytochemical localization of α-hydroxyacid oxidase in rat kidney cortex - Heterogeneous staining of peroxisomes. *Histochemistry* 85: 411–418

Ast J, Bäcker N, Bittner E, Martorana D, Ahmad H, Bölker M & Freitag J (2022) Two Pex5 Proteins With Different Cargo Specificity Are Critical for Peroxisome Function in Ustilago maydis. *Front Cell Dev Biol* 10: 1–13

Bäcker N, Ast J, Martorana D, Renicke C, Berger J, Mais CN, Christ M, Stehlik T, Heimerl T, Wernet V, *et al* (2025) Peroxisomal core structures segregate diverse metabolic pathways. *Nat Commun* 16 (1) 1802

Banuett F & Herskowitz I (1989) Different a alleles of Ustilago maydis are necessary for maintenance of filamentous growth but not for meiosis . *Proc Natl Acad Sci* 86: 5878–5882

Banuett, F., & Herskowitz, I. (1994). Morphological transitions in the life cycle of Ustilago maydis and their genetic control by the a and b loci. *Experimental mycology*, *18*(3), 247-266.

Bartoszewska, M., Opaliński, Ł., Veenhuis, M., & van der Klei, I. J. (2011). The significance of peroxisomes in secondary metabolite biosynthesis in filamentous fungi. *Biotechnology letters*, *33*(10), 1921-1931.

Baudhuin P & De Duve C C O M B I N E D B I O C H E M I C A L AND M O R P H O L O G I C A L STUDY OF P A R T I C U L A T E Analysis of Preparations Enriched in Lysosomes or in Particles Containing Urate Oxidase , D-Amino Acid Oxidase , and Catalase. 219–243

Bauwe H, Hagemann M & Fernie AR (2010) Photorespiration: players, partners and origin. *Trends Plant Sci* 15: 330–336

Becker F, Stehlik T, Linne U, Bölker M, Freitag J & Sandrock B (2021) Engineering Ustilago maydis for

production of tailor-made mannosylerythritol lipids. *Metab Eng Commun* 12: 0–6

Bell J (1989) The polymerase chain reaction. *Immunol Today* 10: 351–355

Benador IY, Veliova M, Mahdaviani K, Petcherski A, Wikstrom JD, Assali EA, Acín-Pérez R, Shum M, Oliveira MF, Cinti S, *et al* (2018) Mitochondria Bound to Lipid Droplets Have Unique Bioenergetics, Composition, and Dynamics that Support Lipid Droplet Expansion. *Cell Metab* 27: 869-885.e6

Van Den Berg B, Ellis RJ & Dobson CM (1999) Effects of macromolecular crowding on protein folding and aggregation. *EMBO J* 18: 6927–6933

Bittner E, Stehlik T & Freitag J (2022) Sharing the wealth: The versatility of proteins targeted to peroxisomes and other organelles. *Front Cell Dev Biol* 10: 1–17

Bittner, E., Stehlik, T., Lam, J., Dimitrov, L., Heimerl, T., Schöck, I., ... & Freitag, J. (2024). Proteins that carry dual targeting signals can act as tethers between peroxisomes and partner organelles. *PLoS Biology*, *22*(2), e3002508.

Blobel G & Sabatini DD (1971) Ribosome-Membrane Interaction in Eukaryotic Cells BT - Biomembranes: Volume 2. In, Manson LA (ed) pp 193–195. Boston, MA: Springer US

Bölker M, Basse CW & Schirawski J (2008) < i> Ustilago maydis</i> secondary metabolism—From genomics to biochemistry. *Fungal Genet Biol* 45: S88--S93

Bölker M, Urban M & Kahmann R (1992) The a mating type locus of U. maydis specifies cell signaling components. *Cell* 68: 441–450

Bolte K, Rensing SA & Maier UG (2015) The evolution of eukaryotic cells from the perspective of peroxisomes: Phylogenetic analyses of peroxisomal beta-oxidation enzymes support mitochondria-first models of eukaryotic cell evolution. *BioEssays* 37: 195–203

Brachmann A, Weinzierl G, Kämper J & Kahmann R (2001) Identification of genes in the bW/bE regulatory cascade in Ustilago maydis. *Mol Microbiol* 42: 1047–1063

Breitling R, Sharif O, Hartman ML & Krisans SK (2002) Loss of compartmentalization causes misregulation of lysine biosynthesis in peroxisome-deficient yeast cells. *Eukaryot Cell* 1: 978–986

Brocard, C., & Hartig, A. (2006). Peroxisome targeting signal 1: is it really a simple tripeptide?. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, *1763*(12), 1565-1573.

Burkhart, S. E., Kao, Y. T., & Bartel, B. (2014). Peroxisomal ubiquitin-protein ligases peroxin2 and peroxin10 have distinct but synergistic roles in matrix protein import and peroxin5 retrotranslocation in Arabidopsis. *Plant physiology*, *166*(3), 1329-1344.

Burkhart, S. E., Lingard, M. J., & Bartel, B. (2013). Genetic dissection of peroxisome-associated matrix protein degradation in Arabidopsis thaliana. *Genetics*, *193*(1), 125-141.

Busch JD, Fielden LF, Pfanner N & Wiedemann N (2023) Mitochondrial protein transport: Versatility of translocases and mechanisms. *Mol Cell* 83: 890–910

Camões F, Islinger M, Guimarães SC, Kilaru S, Schuster M, Godinho LF, Steinberg G & Schrader M (2015) New insights into the peroxisomal protein inventory: Acyl-CoA oxidases and -dehydrogenases are an ancient feature of peroxisomes. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res* 1853: 111–125

Di Cara F (2020) Peroxisomes in host defense. *PLoS Pathog* 16: 1–10

Di Cara F, Sheshachalam A, Braverman NE, Rachubinski RA & Simmonds AJ (2017) Peroxisome-Mediated Metabolism Is Required for Immune Response to Microbial Infection. *Immunity* 47: 93-106.e7

Choudhry SK, Singh R, Williams CP & van der Klei IJ (2016) Stress exposure results in increased peroxisomal levels of yeast Pnc1 and Gpd1, which are imported via a piggy-backing mechanism. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res* 1863: 148–156

Christensen JJ (1963) Corn smut caused by Ustilago maydis. *Monogr Am Phytopathol Soc* 2: 41 pp.

Collins TJ, Berridge MJ, Lipp P & Bootman MD (2002) Mitochondria are morphologically and functionally heterogeneous within cells. *EMBO J* 21: 1616–1627

Conchillo-Solé, O., de Groot, N. S., Avilés, F. X., Vendrell, J., Daura, X., & Ventura, S. (2007). AGGRESCAN: a server for the prediction and evaluation of" hot spots" of aggregation in polypeptides. *BMC bioinformatics*, *8*(1), 65.

Costello JL, Passmore JB, Islinger M & Schrader M (2018) Multi-localized Proteins: The Peroxisome-Mitochondria Connection. In *Proteomics of Peroxisomes: Identifying Novel Functions and Regulatory Networks*, del Río LA & Schrader M (eds) pp 383–415. Singapore: Springer Singapore

Cowieson NP, Partridge JF, Allshire RC & McLaughlin PJ (2000) Dimerisation of a chromo shadow domain and distinctions from the chromodomain as revealed by structural analysis. *Curr Biol* 10: 517–525

Cramer J, Effelsberg D, Girzalsky W & Erdmann R (2015) Small-scale purification of peroxisomes for analytical applications. *Cold Spring Harb Protoc* 2015: 838–845

Czech L, Mais CN, Kratzat H, Sarmah P, Giammarinaro P, Freibert SA, Esser HF, Musial J, Berninghausen O, Steinchen W, *et al* (2022) Inhibition of SRP-dependent protein secretion by the bacterial alarmone (p)ppGpp. *Nat Commun* 13: 1–14

Dammai V & Subramani S (2001) The human peroxisomal targeting signal receptor, Pex5p, is translocated into the peroxisomal matrix and recycled to the cytosol. *Cell* 105: 187–196

Debelyy, M. O., Platta, H. W., Saffian, D., Hensel, A., Thoms, S., Meyer, H. E., ... & Erdmann, R. (2011).

Ubp15p, a ubiquitin hydrolase associated with the peroxisomal export machinery. *Journal of Biological Chemistry*, *286*(32), 28223-28234.

Dellero Y, Jossier M, Schmitz J, Maurino VG & Hodges M (2016) Photorespiratory glycolate-glyoxylate metabolism. *J Exp Bot* 67: 3041–3052

Delmaghani S, Defourny J, Aghaie A, Beurg M, Dulon D, Thelen N, Perfettini I, Zelles T, Aller M, Meyer A, *et al* (2015) Hypervulnerability to Sound Exposure through Impaired Adaptive Proliferation of Peroxisomes. *Cell* 163: 894–906

Devarajan, S., Meurer, M., van Roermund, C. W. T., Chen, X., Hettema, E. H., Kemp, S., ... & Williams, C. (2020). Proteasome-dependent protein quality control of the peroxisomal membrane protein Pxa1p. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, *1862*(9), 183342.

Dixit E, Boulant S, Zhang Y, Lee ASY, Odendall C, Shum B, Hacohen N, Chen ZJ, Whelan SP, Fransen M, *et al* (2010) Peroxisomes Are Signaling Platforms for Antiviral Innate Immunity. *Cell* 141: 668–681

Djamei A & Kahmann R (2012) Ustilago maydis: Dissecting the Molecular Interface between Pathogen and Plant. *PLoS Pathog* 8: 11–14

Djamei A, Schipper K, Rabe F, Ghosh A, Vincon V, Kahnt J, Osorio S, Tohge T, Fernie AR, Feussner I, *et al* (2011) Metabolic priming by a secreted fungal effector. *Nature* 478: 395–398

Doehlemann, G., Van Der Linde, K., Aßmann, D., Schwammbach, D., Hof, A., Mohanty, A., ... & Kahmann, R. (2009). Pep1, a secreted effector protein of Ustilago maydis, is required for successful invasion of plant cells. *PLoS pathogens*, *5*(2), e1000290.

De Duve, C. A. B. P., & Baudhuin, P. (1966). Peroxisomes (microbodies and related particles). *Physiological reviews*, *46*(2), 323-357.

Effelsberg D, Cruz-Zaragoza LD, Tonillo J, Schliebs W & Erdmann R (2015) Role of pex 21p for piggyback import of Gpd1p and Pnc1p into peroxisomes of saccharomyces cerevisiae. *J Biol Chem* 290: 25333–25342

Erdmann, R., & Blobel, G. (1996). Identification of Pex13p a peroxisomal membrane receptor for the PTS1 recognition factor. *The Journal of cell biology*, *135*(1), 111-121.

Fagarasanu M, Fagarasanu A & Rachubinski RA (2006) Sharing the wealth: Peroxisome inheritance in budding yeast. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res* 1763: 1669–1677

Fagarasanu M, Fagarasanu A, Tam YYC, Aitchison JD & Rachubinski RA (2005) Inp1p is a peroxisomal membrane protein required for peroxisome inheritance in Saccharomyces cerevisiae. *J Cell Biol* 169: 765–775

Fahimi, H. D., Reinicke, A., Sujatta, M., Yokota, S., Ozel, M., Hartig, F., & Stegmeier, K. (1982). The short-and

long-term effects of bezafibrate in the rat. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *386*, 111-135.

Farré, J. C., Manjithaya, R., Mathewson, R. D., & Subramani, S. (2008). PpAtg30 tags peroxisomes for turnover by selective autophagy. *Developmental cell*, *14*(3), 365-376.

Feldbrügge M, Kellner R & Schipper K (2013) The biotechnological use and potential of plant pathogenic smut fungi. *Appl Microbiol Biotechnol* 97: 3253–3265

Feng P, Wu X, Erramilli SK, Paulo JA, Knejski P, Gygi SP, Kossiakoff AA & Rapoport TA (2022) A peroxisomal ubiquitin ligase complex forms a retrotranslocation channel. *Nature* 607: 374–380

Ferdinandusse S, Denis S, Faust PL & Wanders RJA (2009) Bile acids: The role of peroxisomes. *J Lipid Res* 50: 2139–2147

Feric M, Vaidya N, Harmon TS, Mitrea DM, Zhu L, Richardson TM, Kriwacki RW, Pappu R V. & Brangwynne CP (2016) Coexisting Liquid Phases Underlie Nucleolar Subcompartments. *Cell* 165: 1686–1697

Ferreira, A. R., Marques, M., & Ribeiro, D. (2019). Peroxisomes and innate immunity: antiviral response and beyond. *International journal of molecular sciences*, *20*(15), 3795.

Francisco T, Pedrosa AG, Rodrigues TA, Abalkhail T, Li H, Ferreira MJ, van der Heden van Noort GJ, Fransen M, Hettema EH & Azevedo JE (2024) Noncanonical and reversible cysteine ubiquitination prevents the overubiquitination of PEX5 at the peroxisomal membrane. *PLoS Biol* 22: 1–23

Freitag J, Ast J & Bölker M (2012) Cryptic peroxisomal targeting via alternative splicing and stop codon read-through in fungi. *Nature* 485: 522–525

Freitag J, Ast J, Linne U, Stehlik T, Martorana D, Bölker M & Sandrock B (2014) Peroxisomes contribute to biosynthesis of extracellular glycolipids in fungi. *Mol Microbiol* 93: 24–36

Freitag, J., Lanver, D., Böhmer, C., Schink, K. O., Bölker, M., & Sandrock, B. (2011). Septation of infectious hyphae is critical for appressoria formation and virulence in the smut fungus Ustilago maydis. *PLoS pathogens*, *7*(5), e1002044.

Fujiki, Y., Nashiro, C., Miyata, N., Tamura, S., & Okumoto, K. (2012). New insights into dynamic and functional assembly of the AAA peroxins, Pex1p and Pex6p, and their membrane receptor Pex26p in shuttling of PTS1-receptor Pex5p during peroxisome biogenesis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, *1823*(1), 145-149.

Gabaldón, T. (2010). Peroxisome diversity and evolution. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, *365*(1541), 765-773.

Gabaldón, T., Snel, B., Zimmeren, F. V., Hemrika, W., Tabak, H., & Huynen, M. A. (2006). Origin and evolution of the peroxisomal proteome. *Biology Direct*, *1*(1), 8.

Galbán, J., Andreu, Y., Almenara, M. J., de Marcos, S., & Castillo, J. R. (2001). Direct determination of uric

acid in serum by a fluorometric-enzymatic method based on uricase. *Talanta*, *54*(5), 847-854.

Galiani, S., Waithe, D., Reglinski, K., Cruz-Zaragoza, L. D., Garcia, E., Clausen, M. P., ... & Eggeling, C. (2016). Super-resolution microscopy reveals compartmentalization of peroxisomal membrane proteins. *Journal of Biological Chemistry*, *291*(33), 16948-16962.

Galland N, Demeure F, Hannaert V, Verplaetse E, Vertommen D, Smissen P Van Der, Courtoy PJ & Michels PAM (2007) Characterization of the role of the receptors PEX5 and PEX7 in the import of proteins into glycosomes of Trypanosoma brucei. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res* 1773: 521–535

Gao, Y., Skowyra, M. L., Feng, P., & Rapoport, T. A. (2022). Protein import into peroxisomes occurs through a nuclear pore–like phase. *Science*, *378*(6625), eadf3971.

Gatto, G. J., Geisbrecht, B. V., Gould, S. J., & Berg, J. M. (2000). Peroxisomal targeting signal-1 recognition by the TPR domains of human PEX5. *Nature structural biology*, *7*(12), 1091-1095.

Geiser E, Przybilla SK, Engel M, Kleineberg W, Büttner L, Sarikaya E, Den Hartog T, Klankermayer J, Leitner W, Bölker M, *et al* (2016) Genetic and biochemical insights into the itaconate pathway of Ustilago maydis enable enhanced production. *Metab Eng* 38: 427–435

Giacomello M, Pyakurel A, Glytsou C & Scorrano L (2020) The cell biology of mitochondrial membrane dynamics. *Nat Rev Mol Cell Biol* 21: 204–224

Gibson DG, Young L, Chuang RY, Venter JC, Hutchison CA & Smith HO (2009) Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases. *Nat Methods* 6: 343–345

Gidda, S. K., Shockey, J. M., Falcone, M., Kim, P. K., Rothstein, S. J., Andrews, D. W., ... & Mullen, R. T. (2011). Hydrophobic-domain-dependent protein–protein interactions mediate the localization of GPAT enzymes to ER subdomains. *Traffic*, *12*(4), 452-472.

Goldfischer SL (1987) Pathogenesis of Zellweger's Cerebro-Hepato-Renal Syndrome and Related Peroxisome Deficiency Diseases BT - Peroxisomes in Biology and Medicine. In, Fahimi HD & Sies H (eds) pp 323–334. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg

Gonzalez, N. H., Felsner, G., Schramm, F. D., Klingl, A., Maier, U. G., & Bolte, K. (2011). A single peroxisomal targeting signal mediates matrix protein import in diatoms. *PloS one*, *6*(9), e25316.

Goto-Yamada, S., Mano, S., Nakamori, C., Kondo, M., Yamawaki, R., Kato, A., & Nishimura, M. (2014). Chaperone and protease functions of LON protease 2 modulate the peroxisomal transition and degradation with autophagy. *Plant and cell physiology*, *55*(3), 482-496.

Gould, S. J., Kalish, J. E., Morrell, J. C., Bjorkman, J., Urquhart, A. J., & Crane, D. I. (1996). Pex13p is an SH3 protein of the peroxisome membrane and a docking factor for the predominantly cytoplasmic PTs1 receptor. *The Journal of cell biology*, *135*(1), 85-95.

Gustafsson M & Allen JR (2016) Structured Illumination Microscopy. *Carl Zeiss*

Han M, Bushong EA, Segawa M, Tiard A, Wong A, Brady MR, Momcilovic M, Wolf DM, Zhang R, Petcherski A, *et al* (2023) Spatial mapping of mitochondrial networks and bioenergetics in lung cancer. *Nature* 615: 712–719

Hanahan D, Jessee J & Bloom FRBT-M in E (1991) [4] Plasmid transformation of Escherichia coli and other bacteria. In *Bacterial Genetic Systems* pp 63–113. Academic Press

Hayashi, H., Suga, T., & Niinobe, S. (1971). Studies on peroxisomes: I. Intraparticulate localization of peroxisomal enzymes in rat liver. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, *252*(1), 58-68.

Hewald, S., Linne, U., Scherer, M., Marahiel, M. A., Kämper, J., & Bölker, M. (2006). Identification of a gene cluster for biosynthesis of mannosylerythritol lipids in the basidiomycetous fungus Ustilago maydis. *Applied and environmental microbiology*, *72*(8), 5469-5477.

Hiltunen JK & Qin YM (2000) β-Oxidation - Strategies for the metabolism of a wide variety of acyl-CoA esters. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Biol Lipids* 1484: 117–128

Hoepfner D, Schildknegt D, Braakman I, Philippsen P & Tabak HF (2005) Contribution of the endoplasmic reticulum to peroxisome formation. *Cell* 122: 85–95

Holliday, R. (1961). The genetics of Ustilago maydis. *Genetics Research*, *2*(2), 204-230.

Holliday, R. (2004). Early studies on recombination and DNA repair in Ustilago maydis. *DNA repair*, *3*(6), 671-682.

Holloman, W. K. (2011). Unraveling the mechanism of BRCA2 in homologous recombination. *Nature structural & molecular biology*, *18*(7), 748-754.

Holloman WK, Schirawski J & Holliday R (2008) The homologous recombination system of Ustilago maydis. *Fungal Genet Biol* 45: 31–39

Honsho M, Abe Y & Fujiki Y (2017) Plasmalogen biosynthesis is spatiotemporally regulated by sensing plasmalogens in the inner leaflet of plasma membranes. *Sci Rep* 7: 1–14

Hoseki, J., Ushioda, R., & Nagata, K. (2010). Mechanism and components of endoplasmic reticulum-associated degradation. *Journal of biochemistry*, *147*(1), 19-25.

Hughes, A. L., Hughes, C. E., Henderson, K. A., Yazvenko, N., & Gottschling, D. E. (2016). Selective sorting and destruction of mitochondrial membrane proteins in aged yeast. *Elife*, *5*, e13943.

Huybrechts SJ, Van Veldhoven PP, Brees C, Mannaerts GP, Los G V. & Fransen M (2009) Peroxisome dynamics in cultured mammalian cells. *Traffic* 10: 1722–1733

Hyman, A. A., Weber, C. A., & Jülicher, F. (2014). Liquid-liquid phase separation in biology. *Annual review of*

cell and developmental biology, *30*(1), 39-58.

Ichimura, Y., Imamura, Y., Emoto, K., Umeda, M., Noda, T., & Ohsumi, Y. (2004). In vivo and in vitro reconstitution of Atg8 conjugation essential for autophagy. *Journal of Biological Chemistry*, *279*(39), 40584-40592.

Inoue, M., Fujishiro, N., Imanaga, I., & Sakamoto, Y. (2002). Role of ATP decrease in secretion induced by mitochondrial dysfunction in guinea-pig adrenal chromaffin cells. *The Journal of Physiology*, *539*(1), 145-155.

Islinger, M., Cardoso, M. J. R., & Schrader, M. (2010). Be different—the diversity of peroxisomes in the animal kingdom. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, *1803*(8), 881-897.

Islinger M, Grille S, Fahimi HD & Schrader M (2012) The peroxisome: An update on mysteries. *Histochem Cell Biol* 137: 547–574

Jedd, G., & Chua, N. H. (2000). A new self-assembled peroxisomal vesicle required for efficient resealing of the plasma membrane. *Nature cell biology*, *2*(4), 226-231.

Kämper J, Kahmann R, Bölker M, Ma LJ, Brefort T, Saville BJ, Banuett F, Kronstad JW, Gold SE, Müller O, *et al* (2006a) Insights from the genome of the biotrophic fungal plant pathogen Ustilago maydis. *Nature* 444: 97–101

Kämper, J., Kahmann, R., Bölker, M., Ma, L. J., Brefort, T., Saville, B. J., ... & Birren, B. W. (2006). Insights from the genome of the biotrophic fungal plant pathogen Ustilago maydis. *Nature*, *444*(7115), 97-101.

Kämper J, Reichmann M, Romeis T, Bölker M & Kahmann R (1995) Multiallelic recognition: Nonself-dependent dimerization of the bE and bW homeodomain proteins in ustilago maydis. *Cell* 81: 73–83

Kempiński B, Chełstowska A, Poznański J, Król K, Rymer Ł, Frydzińska Z, Girzalsky W, Skoneczna A, Erdmann R & Skoneczny M (2020) The Peroxisomal Targeting Signal 3 (PTS3) of the Budding Yeast Acyl-CoA Oxidase Is a Signal Patch. *Front Cell Dev Biol* 8: 198

Kirshner, H., Aguet, F., Sage, D., & Unser, M. (2013). 3-D PSF fitting for fluorescence microscopy: implementation and localization application. *Journal of microscopy*, *249*(1), 13-25.

Kistler HC & Broz K (2015) Cellular compartmentalization of secondary metabolism. *Front Microbiol* 6: 1–11

van der Klei, I. J., & Veenhuis, M. (2006). PTS1-independent sorting of peroxisomal matrix proteins by Pex5p. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, *1763*(12), 1794-1800.

Klose, J., & Kronstad, J. W. (2006). The multifunctional β-oxidation enzyme is required for full symptom development by the biotrophic maize pathogen Ustilago maydis. *Eukaryotic Cell*, *5*(12), 2047-2061.

Kobori T, Iwamoto S, Takeyasu K & Ohtani T (2007) Biopolymers Volume 85 / Number 4 295. *Biopolymers* 85: 392–406

König J, Baumann S, Koepke J, Pohlmann T, Zarnack K & Feldbrügge M (2009) The fungal RNA-binding protein Rrm4 mediates long-distance transport of ubi1 and rho3 mRNAs. *EMBO J* 28: 1855–1866

Kremp M, Bittner E, Martorana D, Klingenberger A, Stehlik T, Bölker M & Freitag J (2020) Non-AUG Translation Initiation Generates Peroxisomal Isoforms of 6-Phosphogluconate Dehydrogenase in Fungi. *Front Cell Dev Biol* 8: 251

Kretschmer, M., Klose, J., & Kronstad, J. W. (2012). Defects in mitochondrial and peroxisomal β-oxidation influence virulence in the maize pathogen Ustilago maydis. *Eukaryotic cell*, *11*(8), 1055-1066.

Kumar, R., Islinger, M., Worthy, H., Carmichael, R., & Schrader, M. (2024). The peroxisome: an update on mysteries 3.0. *Histochemistry and Cell Biology*, *161*(2), 99-132.

Choudhry, S. K., de Boer, R., & van der Klei, I. J. (2018). Yeast cells contain a heterogeneous population of peroxisomes that segregate asymmetrically during cell division. *Journal of Cell Science*, *131*(3), jcs207522.

KUNAU W-H, BüHNE S, DE LA GARZA M, KIONKA C, MATEBLOWSKI M, SCHULTZ-BORCHARD U & THIERINGER R (1988) Comparative enzymology of β-oxidation. *Biochem Soc Trans* 16: 418–420

Kunau WH, Dommes V & Schulz H (1995) β-Oxidation of fatty acids in mitochondria, peroxisomes, and bacteria: A century of continued progress. *Prog Lipid Res* 34: 267–342

Kunze, M. (2020). The type-2 peroxisomal targeting signal. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, *1867*(2), 118609.

Kunze, M., Pracharoenwattana, I., Smith, S. M., & Hartig, A. (2006). A central role for the peroxisomal membrane in glyoxylate cycle function. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, *1763*(12), 1441-1452.

Kuravi K, Nagotu S, Krikken AM, Sjollema K, Deckers M, Erdmann R, Veenhuis M & van der Klei I (2006) Dynamin-related proteins Vps1p and Dnm1p control peroxisome abundance in Saccharomyces cerevisiae. *J Cell Sci* 119: 3994–4001

Kushnirov V V. (2000) Rapid and reliable protein extraction from yeast. *Yeast* 16: 857–860

Kuznetsov A V. & Margreiter R (2009) Heterogeneity of mitochondria and mitochondrial function within cells as another level of mitochondrial complexity. *Int J Mol Sci* 10: 1911–1929

Kuznetsova, I. M., Turoverov, K. K., & Uversky, V. N. (2014). What macromolecular crowding can do to a protein. *International journal of molecular sciences*, *15*(12), 23090-23140.

Laemmli, U. K. (1970). SDS-page Laemmli method. *Nature*, *227*(5259), 680-685.

Law KB, Bronte-Tinkew D, Di Pietro E, Snowden A, Jones RO, Moser A, Brumell JH, Braverman N & Kim PK (2017) The peroxisomal AAA ATPase complex prevents pexophagy and development of peroxisome

biogenesis disorders. *Autophagy* 13: 868–884

Lazarow PB (2006) Chapter 3.1.7. The import receptor Pex7p and the PTS2 targeting sequence. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res* doi:10.1016/j.bbamcr.2006.08.011 [PREPRINT]

Lazarow, P. B., & Fujiki, Y. (1985). Biogenesis of peroxisomes. *Annual review of cell biology*, *1*(1), 489-530.

Van Der Leij I, Franse MM, Elgersma Y, Distel B & Tabak HF (1993) PAS10 is a tetratricopeptide-repeat protein that is essential for the import of most matrix proteins into peroxisomes of Saccharomyces cerevisiae. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90: 11782–11786

Li E & Hristova K (2010) Receptor tyrosine kinase transmembrane domains: Function, dimer structure and dimerization energetics. *Cell Adhes Migr* 4: 249–254

Li, F., & Vierstra, R. D. (2012). Autophagy: a multifaceted intracellular system for bulk and selective recycling. *Trends in plant science*, *17*(9), 526-537.

Lingard, M. J., Monroe-Augustus, M., & Bartel, B. (2009). Peroxisome-associated matrix protein degradation in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *106*(11), 4561-4566.

Liu, C., Apodaca, J., Davis, L. E., & Rao, H. (2007). Proteasome inhibition in wild-type yeast Saccharomyces cerevisiae cells. *Biotechniques*, *42*(2), 158-162.

Liu, F., Lu, Y., Pieuchot, L., Dhavale, T., & Jedd, G. (2011). Import oligomers induce positive feedback to promote peroxisome differentiation and control organelle abundance. *Developmental cell*, *21*(3), 457-468.

Manivannan S, De Boer R, Veenhuis M & Van Der Klei IJ (2013) Lumenal peroxisomal protein aggregates are removed by concerted fission and autophagy events. *Autophagy* 9: 1044–1056

McCollum D & Subramani S (1993) The pas8 mutant of Pichia pastoris exhibits the peroxisomal protein import deficiencies of Zellweger syndrome cells--the PAS8 protein binds to the COOH-terminal tripeptide peroxisomal targeting signal, and is a member of the TPR protein family. *J Cell Biol* 59: 115–125

Mizushima, N. (2007). Autophagy: process and function. *Genes & development*, *21*(22), 2861-2873.

Mohr, H., & Völkl, A. (2002). Isolation of peroxisomal subpopulations from mouse liver by immune free-flow electrophoresis. *Electrophoresis*, *23*(13), 2130-2137.

Morisseau C (2013) Role of epoxide hydrolases in lipid metabolism. *Biochimie* 95: 91–95

Motley AM, Hettema EH, Ketting R, Plasterk R & Tabak HF (2000) Caenorhabditis elegans has a single pathway to target matrix proteins to peroxisomes. *EMBO Rep* 1: 40–46

Müller WH, Bovenberg RAL, Groothuis MH, Kattevilder F, Smaal EB, Van der Voort LHM & Verkleij AJ (1992) Involvement of microbodies in penicillin biosynthesis. *BBA - Gen Subj* 1116: 210–213

Müller WH, van der Krift TP, Krouwer AJ, Wösten HA, van der Voort LH, Smaal EB & Verkleij AJ (1991) Localization of the pathway of the penicillin biosynthesis in Penicillium chrysogenum. *EMBO J* 10: 489–495

Murray MG & Thompson WF (1980) Nucleic Acids Research Nucleic Acids Research. *Methods* 12: 8235–8251

Nazarko TY (2017) Pexophagy is responsible for 65% of cases of peroxisome biogenesis disorders. *Autophagy* 13: 991–994

Newman JW, Morisseau C & Hammock BD (2005) Epoxide hydrolases: Their roles and interactions with lipid metabolism. *Prog Lipid Res* 44: 1–51

Nötzel C, Lingner T, Klingenberg H & Thoms S (2016) Identification of new fungal peroxisomal matrix proteins and revision of the PTS1 consensus. *Traffic* 17: 1110–1124

Odendall C, Dixit E, Stavru F, Bierne H, Franz KM, Durbin AF, Boulant S, Gehrke L, Cossart P & Kagan JC (2014) Diverse intracellular pathogens activate type III interferon expression from peroxisomes. *Nat Immunol* 15: 717–726

Otera H, Okumoto K, Tateishi K, Ikoma Y, Matsuda E, Nishimura M, Tsukamoto T, Osumi T, Ohashi K, Higuchi O, *et al* (1998) Peroxisome Targeting Signal Type 1 (PTS1) Receptor Is Involved in Import of Both PTS1 and PTS2: Studies with PEX5 -Defective CHO Cell Mutants . *Mol Cell Biol* 18: 388–399

Otzen M, Wang D, Lunenborg MGJ & van der Klei IJ (2005) Hansenula polymorpha Pex20p is an oligomer that binds the peroxisomal targeting signal 2 (PTS2). *J Cell Sci* 118: 3409–3418

Pan R, Liu J, Wang S & Hu J (2020) Peroxisomes: versatile organelles with diverse roles in plants. *New Phytol* 225: 1410–1427

Pedrosa, A. G., Francisco, T., Bicho, D., Dias, A. F., Barros-Barbosa, A., Hagmann, V., ... & Azevedo, J. E. (2018). Peroxisomal monoubiquitinated PEX5 interacts with the AAA ATPases PEX1 and PEX6 and is unfolded during its dislocation into the cytosol. *Journal of Biological Chemistry*, *293*(29), 11553-11563.

Pohlmann, T., Baumann, S., Haag, C., Albrecht, M., & Feldbrügge, M. (2015). A FYVE zinc finger domain protein specifically links mRNA transport to endosome trafficking. *Elife*, *4*, e06041.

Poirier Y, Antonenkov VD, Glumoff T & Hiltunen JK (2006) Peroxisomal β-oxidation—a metabolic pathway with multiple functions. *Biochim Biophys Acta* 1763: 1413–1426

Pozdnyakova I & Wittung-Stafshede P (2010) Non-linear effects of macromolecular crowding on enzymatic activity of multi-copper oxidase. *Biochim Biophys Acta - Proteins Proteomics* 1804: 740–744

Purdue PE, Yang X & Lazarow PB (1998) Pex18p and Pex21p, a novel pair of related peroxins essential for peroxisomal targeting by the PTS2 pathway. *J Cell Biol* 143: 1859–1869

Reddy JK, Lalvvai ND & Farber E (1983) Carcinogenesis by hepatic peroxisome proliferators: Evaluation of the

risk of hypolipidemic drugs and industrial plasticizers to humans. *Crit Rev Toxicol* 12: 1–58

Reumann S & Weber APM (2006) Plant peroxisomes respire in the light: Some gaps of the photorespiratory C2 cycle have become filled-Others remain. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res* 1763: 1496–1510

Rhodin, J. (1954). Correlation of ultrastructural organization and function in normal and experimentally changed proximal convoluted tubule cells of the mouse kidney. *Thesis Kalolinska Instutet*.

Riccio, V., Vissa, M., McQuibban, A., & Kim, P. K. (2019). Lysosome targeting RedGreen-assay: selective autophagy sensing assay for mammalian cells. *Bio-protocol*, *9*(24), e3455-e3455.

Rochaix JD (2022) Chloroplast protein import machinery and quality control. *FEBS J* 289: 6908–6918

Rouiller C & Bernhard W (1956) "Microbodies" and the problem of mitochondrial regeneration in liver cells. *J Cell Biol* 2: 355–360

Rucktäschel, R., Girzalsky, W., & Erdmann, R. (2011). Protein import machineries of peroxisomes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, *1808*(3), 892-900.

Ryu, K. W., Fung, T. S., Baker, D. C., Saoi, M., Park, J., Febres-Aldana, C. A., ... & Thompson, C. B. (2024). Cellular ATP demand creates metabolically distinct subpopulations of mitochondria. *Nature*, *635*(8039), 746-754.

Sanger F, Nicklen S & Coulson AR (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74: 5463–5467

Schliebs, W., Girzalsky, W., & Erdmann, R. (2010). Peroxisomal protein import and ERAD: variations on a common theme. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *11*(12), 885-890.

Schliebs W & Kunau WH (2006) PTS2 Co-receptors: Diverse proteins with common features. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res* 1763: 1605–1612

Schneider CA, Rasband WS & Eliceiri KW (2012) NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods* 9: 671–675

Schrader M, Costello J, Godinho LF & Islinger M (2015) Peroxisome-mitochondria interplay and disease. *J Inherit Metab Dis* 38: 681–702

Schrader, T. A., Carmichael, R. E., Islinger, M., Costello, J. L., Hacker, C., Bonekamp, N. A., ... & Schrader, M. (2022). PEX11β and FIS1 cooperate in peroxisome division independently of mitochondrial fission factor. *Journal of Cell Science*, *135*(13), jcs259924.

Schulz B, Banuett F, Dahl M, Schlesinger R, Schäfer W, Martin T, Herskowitz I & Kahmann R (1990) The b alleles of U. maydis, whose combinations program pathogenic development, code for polypeptides containing a homeodomain-related motif. *Cell* 60: 295–306

Schuster M, Schweizer G, Reissmann S & Kahmann R (2016) Genome editing in Ustilago maydis using the CRISPR--Cas system. *Fungal Genet Biol* 89: 3–9

Scott, S. V., Hefner-Gravink, A., Morano, K. A., Noda, T., Ohsumi, Y., & Klionsky, D. J. (1996). Cytoplasm-to-vacuole targeting and autophagy employ the same machinery to deliver proteins to the yeast vacuole. *Proceedings of the national academy of sciences*, *93*(22), 12304-12308.

Shai, N., Schuldiner, M., & Zalckvar, E. (2016). No peroxisome is an island—peroxisome contact sites. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, *1863*(5), 1061-1069.

Sharp PA, Sugden B & Sambrook J (1973) Detection of Two Restriction Endonuclease Activities in Haemophilus parainfluenzae Using Analytical Agarose-Ethidium Bromide Electrophoresis. *Biochemistry* 12: 3055–3063

Shastry, B. S. (2003). Neurodegenerative disorders of protein aggregation. *Neurochemistry international*, *43*(1), 1-7.

Skowyra ML & Rapoport TA (2022) PEX5 translocation into and out of peroxisomes drives matrix protein import. *Mol Cell* 82: 3209-3225.e7

Sleeman JE & Trinkle-Mulcahy L (2014) Nuclear bodies: New insights into assembly/dynamics and disease relevance. *Curr Opin Cell Biol* 28: 76–83

Smith, J. J., & Aitchison, J. D. (2013). Peroxisomes take shape. *Nature reviews Molecular cell biology*, *14*(12), 803-817.

Snetselaar KM & Mims CW (1994) Light and electron microscopy of Ustilago maydis hyphae in maize. *Mycol Res* 98: 347–355

Speijer D (2017) Evolution of peroxisomes illustrates symbiogenesis. *BioEssays* 39: 1–8

Spellig, T., Bottin, A., & Kahmann, R. (1996). Green fluorescent protein (GFP) as a new vital marker in the phytopathogenic fungus Ustilago maydis. *Molecular and General Genetics MGG*, *252*(5), 503-509.

Spinelli JB & Haigis MC (2018) The multifaceted contributions of mitochondria to cellular metabolism. *Nat Cell Biol* 20: 745–754

Stehlik T, Kremp M, Kahnt J, Bölker M & Freitag J (2020) Peroxisomal targeting of a protein phosphatase type 2C via mitochondrial transit. *Nat Commun* 11: 1–11

Stehlik, T., Sandrock, B., Ast, J., & Freitag, J. (2014). Fungal peroxisomes as biosynthetic organelles. *Current opinion in microbiology*, *22*, 8-14.

Steinberg, G., & Perez-Martin, J. (2008). Ustilago maydis, a new fungal model system for cell biology. *Trends in cell biology*, *18*(2), 61-67.

Stiebler AC, Freitag J, Schink KO, Stehlik T, Tillmann BAM, Ast J & Bölker M (2014) Ribosomal Readthrough at a Short UGA Stop Codon Context Triggers Dual Localization of Metabolic Enzymes in Fungi and Animals. *PLOS Genet* 10: 1–9

Subramani, S. (1998). Components involved in peroxisome import, biogenesis, proliferation, turnover, and movement. *Physiological reviews*, *78*(1), 171-188.

Terfrüchte M, Joehnk B, Fajardo-Somera R, Braus GH, Riquelme M, Schipper K & Feldbrügge M (2014) Establishing a versatile Golden Gate cloning system for genetic engineering in fungi. *Fungal Genet Biol* 62: 1–10

Theos AC, Martina A, Hurbain I, Peden AA, Sviderskaya E V, Stewart A, Robinson MS, Bennett DC, Cutler DF, Bonifacino JS, *et al* (2005) Functions of adaptor protein (AP)-3 and AP-1 in tyrosinase sorting from endosomes to melanosomes. *Mol Biol Cell* 16: 5356–5372

Titorenko VI, Nicaud JM, Wang H, Chan H & Rachubinski RA (2002) Acyl-CoA oxidase is imported as a heteropentameric, cofactor-containing complex into peroxisomes of Yarrowia lipolytica. *J Cell Biol* 156: 481–494

Tsukada, H., Mochizuki, Y., & Fujiwara, S. (1966). The nucleoids of rat liver cell microbodies: fine structure and enzymes. *The Journal of Cell Biology*, *28*(3), 449-460.

Umekawa, M., & Klionsky, D. J. (2012). The cytoplasm-to-vacuole targeting pathway: a historical perspective. *International journal of cell biology*, *2012*(1), 142634.

Veenhuis M, van Dijken JP, Pilon SAF & Harder W (1978) Development of crystalline peroxisomes in methanol-grown cells of the yeast Hansenula polymorpha and its relation to environmental conditions. *Arch Microbiol* 117: 153–163

Veenhuis M, Harder W, van Dijken JP & Mayer F (1981) Substructure of Crystalline Peroxisomes in Methanol-Grown Hansenula polymorpha : Evidence for an In Vivo Crystal of Alcohol Oxidase . *Mol Cell Biol* 1: 949–957

Volkl A, Baumgart E & Fahimi HD (1988) Localizaton of urate oxidase in the crystalline cores of rat liver peroxisomes by immunocytochemistry and immunoblotting. *J Histochem Cytochem* 36: 329–336

Völkl A, Mohr H & Fahimi HD (1999) Peroxisome subpopulations of the rat liver: Isolation by immune free flow electrophoresis. *J Histochem Cytochem* 47: 1111–1117

Vonck J & Van Bruggen EFJ (1992) Architecture of peroxisomal alcohol oxidase crystals from the methylotrophic yeast Hansenula polymorpha as deduced by electron microscopy. *J Bacteriol* 174: 5391–5399

Vonck J, Parcej DN & Mills DJ (2016) Structure of alcohol oxidase from pichia pastoris by cryo-electron microscopy. *PLoS One* 11: 1–20

Walter T & Erdmann R (2019) Current Advances in Protein Import into Peroxisomes. *Protein J* 38: 351–362

Wanders RJA (2014) Metabolic functions of peroxisomes in health and disease. *Biochimie* 98: 36–44

Wanders, R. J., & Waterham, H. R. (2006). Biochemistry of mammalian peroxisomes revisited. *Annu. Rev. Biochem.*, *75*(1), 295-332.

Wang D, Visser N V., Veenhuis M & Van der Klei IJ (2003) Physical Interactions of the Peroxisomal Targeting Signal 1 Receptor Pex5p, Studied by Fluorescence Correlation Spectroscopy. *J Biol Chem* 278: 43340–43345

Wang, W., Nema, S., & Teagarden, D. (2010). Protein aggregation—Pathways and influencing factors. *International journal of pharmaceutics*, *390*(2), 89-99.

Williams C (2014) Going against the flow: A case for peroxisomal protein export. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res* 1843: 1386–1392

Williams, C., van den Berg, M., Sprenger, R. R., & Distel, B. (2007). A conserved cysteine is essential for Pex4p-dependent ubiquitination of the peroxisomal import receptor Pex5p. *Journal of Biological Chemistry*, *282*(31), 22534-22543.

Woodward AW & Bartel B (2005) The Arabidopsis peroxisomal targeting signal type 2 receptor PEX7 is necessary for peroxisome function and dependent on PEX5. *Mol Biol Cell* 16: 573–583

Wright ZJ & Bartel B (2020) Peroxisomes form intralumenal vesicles with roles in fatty acid catabolism and protein compartmentalization in Arabidopsis. *Nat Commun* 11: 1–13

Yang X, Edward Purdue P & Lazarow PB (2001) Eci1p uses a PTS1 to enter peroxisomes: Either its own or that of a partner, Dci1p. *Eur J Cell Biol* 80: 126–138

Yifrach E, Holbrook-Smith D, Bürgi J, Othman A, Eisenstein M, van Roermund CW, Visser W, Tirosh A, Rudowitz M, Bibi C, *et al* (2022) Systematic multi-level analysis of an organelle proteome reveals new peroxisomal functions. *Mol Syst Biol* 18: 1–21

Young, P. G., & Bartel, B. (2016). Pexophagy and peroxisomal protein turnover in plants. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, *1863*(5), 999-1005.

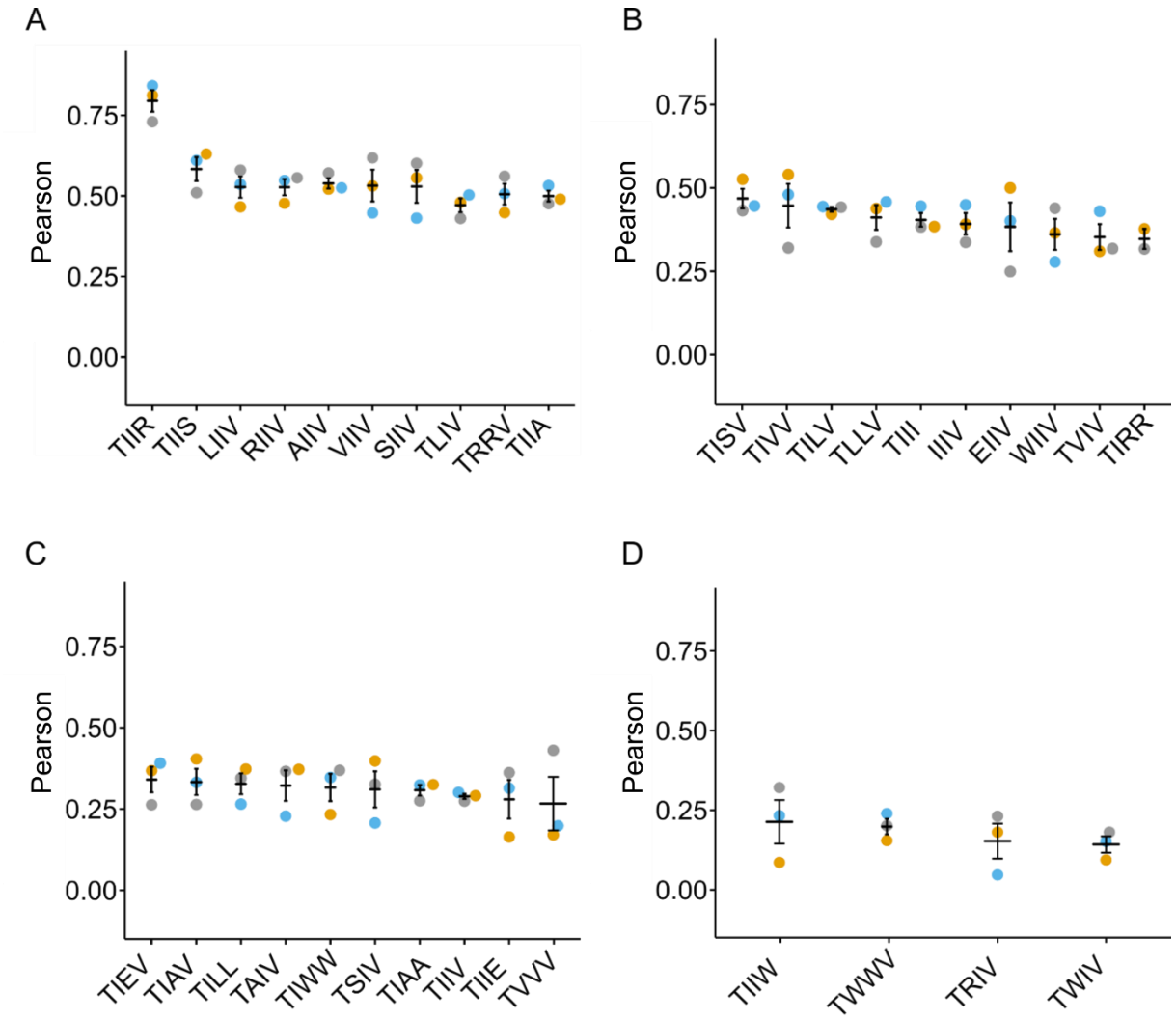
Zolman, B. K., Monroe-Augustus, M., Silva, I. D., & Bartel, B. (2005). Identification and functional characterization of Arabidopsis PEROXIN4 and the interacting protein PEROXIN22. *The Plant Cell*, *17*(12), 3422-3435.

6 Anhang

Anhang 1

NCBI Acsession Number	predicted function	length	TIIV-like motif	localization into Subdomains/ -populations
UMAG_11660	Choline/carnitine acyltransferase domain-containing protein	713 aa	yes	no
UMAG_04479	4-coumarate-CoA ligase	564 aa	yes	yes
UMAG_04063	AB hydrolase-1 domain-containing protein	395 aa	yes	yes
UMAG_02023	Long-chain fatty alcohol oxidase involved in the omega-oxidation pathway of lipid degradation	772 aa	yes	yes
UMAG_06153	4-coumarate-CoA ligase	573 aa	yes	yes
UMAG_01438	Acyltransferase involved in MEL production	578 aa	yes	yes
UMAG_03116	Acyltransferase involved in MEL production	591 aa	yes	yes
UMAG_02208	Acyl-coenzyme A oxidase	688 aa	no	no
UMAG_02182	Putative NADPH-dependent beta-ketoacyl reductase (RhlG)	292 aa	no	no
UMAG_11300	DinB-like domain-containing protein	261 aa	no	no
UMAG_12289	Dephospho-CoA kinase	280 aa	no	no
UMAG_03935	FAD dependent oxidoreductase domain-containing protein	521 aa	no	yes
UMAG_03158	Enoyl-CoA hydratase	322 aa	no	yes
UMAG_01540	FMO1-flavin-containing monooxygenase	579 aa	no	yes
UMAG_02097	Enoyl-CoA hydratase/isomerase domain-containing protein	318 aa	no	no
UMAG_06455	Serine aminopeptidase S33 domain-containing protein	309 aa	no	yes
UMAG_01966	acyl-CoA oxidase	743 aa	no	no
UMAG_02028	acyl-CoA oxidase	718 aa	no	no
UMAG_15004	malate synthase	527 aa	yes	yes
UMAG_05703	D-amino acid oxidase	365 aa	yes	yes
UMAG_02862	AB hydrolase-1 domain-containing protein	562 aa	no	yes
UMAG_03122	GH16 domain-containing protein	442 aa	no	yes

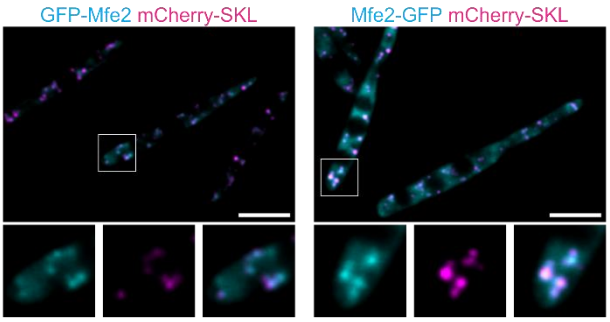
Anhang 2



Anhang 3

NCBI Accession Number	predicted function	length	TIIV-like motif	motif inside of aggregation prone region	position of the motif
UMAG_11660	Choline/carnitine acyltransferase domain-containing protein	713 aa	yes	no	$T_{385}IVV_{388}$
UMAG_04479	4-coumarate-CoA ligase	564 aa	yes	yes	$T_{84}VLL_{87}$
UMAG_04063	AB hydrolase-1 domain-containing protein	395 aa	yes	yes	$T_{46}LLL_{49}$
UMAG_02023	Long-chain fatty alcohol oxidase involved in the omega-oxidation pathway of lipid degradation	772 aa	yes	yes	$T_{243}LIV_{246}$
UMAG_06153	4-coumarate-CoA ligase	573 aa	yes	yes	$T_{92}ILV_{95}$
UMAG_01438	Acyltransferase involved in MEL production	578 aa	yes	yes	$T_{567}IIV_{570}$
UMAG_15004	malate synthase	527 aa	yes	yes	$T_{239}VLI_{242}$
UMAG_05703	D-amino acid oxidase	365 aa	yes	yes	$T_{217}VLI_{220}$

Anhang 4



Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei Herrn Dr. Johannes Freitag, Prof. Dr. Michael Bölker und Prof. Dr. Gert Bange für die Gelegenheit meine Dissertation in ihren Arbeitsgruppen durchführen zu dürfen, bedanken.
Weiter bedanke ich mich bei der Arbeitsgruppe Bölker die mich herzlich aufgenommen hat und mir immer Hilfestellungen gab. Insbesondere danke ich Dr. Johannes Freitag für die hervorragende Betreuung während dieser Zeit.
Meiner Familie bin ich sehr dankbar dafür mir dieses Studium ermöglicht zu haben. Danke, dass ich mich immer auf euch verlassen kann und ihr immer für mich da seid!