

**Die Rolle sekretierter Proteine zu Beginn der pathogenen
Entwicklung von *Ustilago maydis***

Zur Erlangung des akademischen Grades eines
DOKTORS DER NATURWISSENSCHAFTEN

(Dr. rer. nat.)

Fakultät für Chemie und Biowissenschaften

Karlsruher Institut für Technologie (KIT) - Universitätsbereich

genehmigte

DISSERTATION

von

Kai Patrick Hofmann

aus Gießen

Mai 2012

Dekan: Prof. Dr. Martin Bastmeyer

Referent: Prof. Dr. Jörg Kämper

Korreferent: Prof. Dr. Reinhard Fischer

Tag der mündlichen Prüfung: 20.07.2012

千里之行，始于足下。

Eine Reise von tausend Meilen beginnt mit dem ersten Schritt.

(Laozi – Daodejing; übersetzt durch L. Geldsetzer)

Zusammenfassung

Ustilago maydis ist ein phytopathogener Basidiomyzeta und der Erreger des Maisbeulenbrands. Aufgrund der einfachen Kultivierung unter Laborbedingungen und der Zugänglichkeit der Pilzes für gezielte genetische Manipulation sowie durch die Verfügbarkeit der Genomsequenz und eines breiten Spektrums an Expressionsdaten gilt *U. maydis* als Modellsystem für Pilz-Pflanzen-Interaktionen, auch stellvertretend für viele andere phytopathogene Organismen.

Sekretierte Proteine sind unerlässlich für eine biotrophe Entwicklung. Den ersten Kontakt mit seinem Wirt stellt ein Pathogen über sekretierte Adhäsionsfaktoren her. In humanpathogenen Pilzen wie *Candida albicans* ist die essentielle Rolle der Adhäsion in der Virulenz bereits seit langem bekannt, doch nur wenige Studien beschäftigen sich mit den Adhäsionsfaktoren phytopathogener Pilze. Die Anhaftung von Phytopathogenen an die hydrophobe Cuticula der Wirtspflanze ist grundlegend für die Besiedelung der Wirtspflanze, doch die Identifizierung einzelner Adhäsine wird auch in der Postgenomischen Ära durch die funktionelle Redundanz und Sequenzheterogenität von Adhäsionsfaktoren erschwert. Diese Arbeit beschreibt Versuche zur Identifizierung und Charakterisierung von sekretierten Adhäsions- und Pathogenitätsfaktoren in *U. maydis*. Durch die Etablierung eines Flusskammer-basierten Adhäsionstests war es erstmals möglich, die Anhaftungsvorgänge von Sporidien nach Kontakt mit einer hydrophoben Oberfläche mikroskopisch zu untersuchen. Gestützt durch Expressionsdatenanalysen konnten durch komparative und strukturelle Analysen von Proteinsequenzdaten putative Adhäsion-Gene identifiziert werden. Zusätzlich wurde eine Anreicherungsmethode etabliert, welche die funktionelle Anreicherung von Adhäsion-vermittelnden Genen durch die heterologe Expression in adhäsions-defizienten *Saccharomyces cerevisiae* Zellen ermöglicht. Für diese Zwecke wurde eine *U. maydis*-Genbank erstellt, die repräsentativ für Filamente auf hydrophoben Oberflächen ist.

Sekretierte Effektorproteine manipulieren die Pflanzenabwehr und ermöglichen einem biotrophen Pilz wie *U. maydis* eine erfolgreiche Kolonisierung des Pflanzengewebes. Die Mechanismen der Suppression von Pflanzenabwehrreaktionen sind von Effektor zu Effektor unterschiedlich und oft nur ansatzweise verstanden. Diese Arbeit beschreibt die Charakterisierung des sekretierten Effektorproteins Plp2, dessen Identifizierung durch Expressionsanalysen von pathogenitätsspezifisch induzierten sekretierten Proteinen erfolgte. Deletionsmutanten von *plp2* sind vollständig apathogen und erfahren zum Zeitpunkt der Pflanzenpenetration eine massive Pflanzenabwehr. Es konnte gezeigt werden, dass die Expression des *plp2*-Gens in allen Stadien der biotrophen Entwicklung stark induziert ist. Sequenzvergleiche mit orthologen Proteinen aus *Ustilago hordei* und *Sporisorium reilianum* ermöglichten die Identifizierung konservierter Kernlokalisierungssequenzen (NLS) und Transaktivierungsdomänen (TAD). Durch die Etablierung eines Systems zur ektopischen Komplementation war es möglich, synthetisch hergestellte mutierte *plp2*-Allele auf ihre Fähigkeit zu überprüfen, den $\Delta plp2$ -Phänotyp zu komplementieren. Hierbei konnte gezeigt werden, dass sowohl eine putative NLS im C-Terminus als auch eine putative TAD-Sequenz im N-Terminus eine essentielle Rolle in der Funktionalität von Plp2 spielen. Diese Ergebnisse legen nahe, dass Plp2 in den Nukleus von Pflanzenzellen transloziert und eine transkriptionelle Modulation der Pflanzenabwehr bewirken kann.

Summary

Ustilago maydis is a phytopathogenic basidiomycete and the causative agent of corn smut disease. *U. maydis* is easily cultivated under laboratory conditions, accessible for targeted genetic manipulations and offers the availability of the whole genome sequence and a broad spectrum of microarray analyses. *U. maydis* has thus become a model organism for fungus-plant-interactions even for other phytopathogenic organisms.

Secreted proteins are indispensable for biotrophic development. The first contact between host and pathogen is mediated by secreted adhesion factors. In human-pathogenic fungi like *Candida albicans* the essential role of adhesion in virulence is long since understood, but few studies elucidating the role of adhesion factors of plant pathogenic fungi exist. Adhesion of a phytopathogen to the plant cuticle is a key step in plant colonization, but the identification of individual adhesins is hindered by functional redundancy and sequence heterogeneity even in the post-genomic era. This work shows attempts to identify and characterize secreted adhesins and pathogenicity factors in *U. maydis*. The establishment of a flow chamber-based test system for adhesion allowed new insights into the attachment of sporidia after contact with a hydrophobic surface. Comparative and structural analyses supported by analyses of expression data allowed the identification of putative adhesion candidate genes. In addition a flow chamber-based screening system for the functional enrichment of adhesion-mediating genes by heterologous expression in adhesion-deficient *Saccharomyces cerevisiae* cells was established, and a *U. maydis* cDNA library representative for filaments on hydrophobic surfaces was constructed.

Secreted effector proteins manipulate plant defense responses and thereby facilitate the successful colonization of a host plant by a biotrophic fungus like *U. maydis*. The mechanisms leading to plant defense suppression differ from effector to effector and are still largely unknown. This work describes the characterization of the secreted effector protein Plp2. Identification of Plp2 resulted from structural and expressional analyses of secreted proteins that are specifically upregulated upon plant infection. Deletion mutants of *plp2* are a pathogenic and sustain a massive plant defense response upon plant penetration. Expression of *plp2* is highly upregulated during all stages of pathogenic development. Sequence comparisons using orthologous protein sequences from *Ustilago hordei* and *Sporisorium reilianum* led to the identification of conserved nuclear localization signals (NLS) as well as transactivation domains (TAD). The establishment of a system for ectopic complementation allowed screening for complementation of the $\Delta plp2$ -phenotype by synthetically mutated *plp2*-Alleles. This system allowed the identification of a C-terminal NLS as well as an N-terminal TAD with essential roles in Plp2 function. These results indicate that Plp2 translocates into the plant nucleus, where it acts as a transcriptional modulator of plant defense responses.

Abkürzungen und Fachbegriffe

9aaTAD	„9 amino acid TAD“	PAMP	„pathogen associated molecular pattern“
Amp	Ampicillin	PBS	„phosphate buffered saline“
bE	bEast	PC	Phenol/Chloroform
bp	Basenpaar(e)	PCR	„polymerase chain reaction“
bW	bWest	PD	„potato dextrose“
cAMP	„cyclic adenosine monophosphate“	Phleo	Phleomycin
cDNA	„complementary DNA“	PKA	„protein kinase A“
C-terminal	carboxyterminal	PRR	„pattern recognition receptor“
Cbx	Carboxin	PS	Polystyrol
CFP	„cyan fluorescent protein“	PTFE	Polytetrafluorethylen
CM	„complete medium“	PTI	„PAMP-triggered immunity“
DAB	Diaminobenzidin	RACE	„rapid amplification of cDNA ends“
DIC	„differential intererence contrast“	ROS	„reactive oxygen species“
dpi	„days post infection“	RT	„reverse transcription“ oder Raumtemperatur
ds cDNA	„double stranded complementary DNA“	RXLR	Arginin-„beliebige Aminosäure“-Leucin- Arginin
ECM	„extracellular matrix“	SD	„synthetic drop-out“
ETI	„effector-triggered immunity“	SP	Signalpeptid zur Sekretion
ETS	„effector-triggered sensitivity“	ss cDNA	„single stranded complementary DNA“
Gal	Galaktose	STM	„spore tip mucilage“
GFP	„green fluorescent protein“	TIR	„toll-interleukin 1-like receptor“
Glc	Glukose	U	Unit (Enzymaktivitätseinheit)
H ₂ O <small>bid.</small>	zweifach destilliertes Wasser	UARS	„ <i>U. maydis</i> autonomously replicating sequence“
hpi	„hours post infection“	NKS	nicht-konventionelle Sekretion
HR	„hypersensitive response“	ü/N	über Nacht
Hyg	Hygromycin	Upm	Umdrehungen pro Minute
Kan	Kanamycin	Ura	Uracil
kb	Kilobasenpaar(e)	UV	ultraviolettes Licht
MAMP	„microbe associated molecular pattern“	Wt	Wildtyp
MAPK	„mitogen activated protein kinase“	TAD	„transactivation domain“
MM	Minimalmedium	TAL	„transcription-activator like“
NB-LRR	„nucleotide binding leucine rich repeat“	Tris	Trishydroxymethylaminomethan
N-terminal	aminoterminal	YFP	„yellow fluorescent protein“
NLS	„nuclear localization sequence“		
OD ₆₀₀	Optische Dichte bei 600 nm		
ORF	„open reading frame“		

Inhaltsverzeichnis

1. EINLEITUNG	1
1.1 <i>Ustilago maydis</i>	1
1.2 Der Lebenszyklus von <i>U. maydis</i>	3
1.3 Adhäsion in Pilzen	5
1.3.1 Adhäsion von <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	6
1.3.2 Adhäsion von <i>Candida albicans</i> und anderer pathogener <i>Candida</i> -Spezies	7
1.3.3 Adhäsion von <i>Ustilago maydis</i>	7
1.4 Etablierung der biotropen Interaktion durch Effektorproteine	11
1.4.1 Die pflanzliche Basalresistenz ermöglicht die Erkennung von Mikroben-assoziierten Strukturen	11
1.4.2 Effektoren vermitteln die Umgehung der pflanzlichen Basalresistenz	11
1.4.3 R-Gen-spezifische Abwehr ermöglicht die spezifische Erkennung von Effektorproteinen	12
1.4.4 Etablierung der phytopathogenen Interaktion	14
1.4.5 Effektorproteine in <i>Ustilago maydis</i>	14
1.5 Zielsetzung	16
2. ERGEBNISSE	17
2.1 Charakterisierung von Adhäsionsvorgängen bei <i>Ustilago maydis</i>	17
2.1.1 Abiotische hydrophobe Oberflächen ermöglichen Adhäsionstests für <i>S. cerevisiae</i> und <i>U. maydis</i>	17
2.1.2 <i>U. maydis</i> -Filamente haften an hydrophobe Oberflächen	18
2.1.3 Der komparative Filament-Adhäsionstest ermöglicht einen Vergleich der Adhäsionsstärke zweier <i>U. maydis</i> -Stämme	20
2.1.4 Der komparative Adhäsionstest initialer Sporidienanhaftung zeigt Gemeinsamkeiten und Unterschiede bei den verwendeten <i>U. maydis</i> -Stämmen auf	21
2.1.5 Die Verwendung einer Flusskammer ermöglicht die Beobachtung von Adhäsionsvorgängen unter definierten Bedingungen	23
2.1.6 Flusskammer-Adhäsionstests zeigen unipolare Adhäsion von <i>U. maydis</i> -Sporidien	24
2.1.7 Der Flusskammer-Adhäsionstest zeigt fehlende Sporidienadhäsion unter optimalen Wachstumsbedingungen	25
2.2 Identifizierung und Charakterisierung von Adhäsinen und putativen Regulatoren der Adhäsion	27
2.2.1 <i>in silico</i> -Identifizierung neuer Adhäsine in <i>U. maydis</i>	27
2.2.2 Funktionelle Charakterisierung der putativen Adhäsine-Deletionsmutanten	32
2.2.3 Identifizierung neuer Adhäsine im heterologen System	36

2.3 Identifizierung und Charakterisierung des sekretierten Effektors Plp2	42
2.3.1 Identifizierung der Plp-Effektorproteine	42
2.3.2 Das Protein Plp2	42
2.3.3 <i>plp2</i> ist ein Pathogenitätsfaktor	43
2.3.4 Mikroskopische Analysen von Plp2-Mutanten zeigen Appressorienbildung, aber kein invasives Wachstum	44
2.3.5 Die Expression von Plp2 wird während der pathogenen Entwicklung stark induziert	46
2.3.6 Komparative <i>in silico</i> -Proteindomänenanalysen ermöglichten die Identifizierung essentieller Proteindomänen	48
2.3.7 C-terminale Fusionsproteine von Plp2 sind nicht funktionell	50
2.3.8 Ein Komplementationssystem zur Überprüfung synthetischer <i>plp2</i> -Mutanten	50
2.3.9 Eine mutierte Kernlokalisierungssequenz beeinträchtigt die Proteinfunktion von Plp2	53
2.3.10 Eine putative Transaktivierungsdomäne hat Auswirkungen auf die Proteinfunktionalität von Plp2	55
3. DISKUSSION	57
3.1 Adhäsion von <i>Ustilago maydis</i>	57
3.1.1 Adhäsionstests mit hydrophoben Kunststoffen	57
3.1.2 Die Verwendung von CFP- und YFP-markierten Stämmen ermöglicht die komparative Analyse von Oberflächen-Adhäsionsunterschieden	58
3.1.3 Flusskammer-Adhäsionstests ermöglichen eine Analyse der Oberflächenanhaftung unter definierten Bedingungen	58
3.1.4 Die Einzeldelationen putativer Adhäsine zeigen keinen identifizierbaren Adhäsionsdefekte	59
3.1.5 <i>U. maydis</i> -Sporidien zeigen unipolare Adhäsion an hydrophobe Oberflächen	63
3.1.6 Die Sporidien-Anhaftung wird durch unbekannte Faktoren beeinflusst	64
3.1.7 Etablierung einer Anreicherungsmethode zur Identifizierung von Adhäsinen durch heterologe Expression in <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	65
3.1.8 Mögliche Erweiterungen des Flusskammersystems	67
3.1.9 Zusammenfassung und Ausblick	68
3.2 Der Effektor Plp2 und seine Rolle in der pathogenen Entwicklung von <i>Ustilago maydis</i>	71
3.2.1 Die Pst- und Plp-Effektoren zeigen ein charakteristisches Expressionsprofil	71
3.2.2 Der <i>plp2</i> -Promotor weist mehrere Biz1-Transkriptionsfaktor-Bindestellen auf	72
3.2.3 Expressionsanalysen zeigen <i>plp2</i> -Expression direkt nach der Penetration und in allen biotrophen Stadien der pathogenen Entwicklung	72
3.2.4 Eine <i>in planta</i> -Lokalisierung von Plp2 konnte aufgrund nicht-funktionaler C-terminaler Fusionsproteine nicht erfolgen	73
3.2.5 Plp2 ist ein Pathogenitätsfaktor	74
3.2.6 Eine essentielle Proteindomäne von Plp2 könnte eine Kernlokalisierung vermitteln	76
3.2.7 Eine putative Transaktivierungsdomäne nimmt Einfluss auf die Effektorfunktion von Plp2	78
3.2.8 Ausblick – Welche Rolle übernimmt Plp2 in der Modulation der Pflanzenabwehr?	79

4. MATERIAL UND METHODEN	82
4.1 Material und Bezugsquellen	82
4.1.1 Medien, Lösungen, Enzyme und Kits	82
4.1.2 Ausgangsstämme	84
4.1.3 Plasmide und Plasmidkonstruktionen	89
4.1.4 Oligonukleotide	94
4.2 Mikrobiologische, zellbiologische und genetische Methoden	103
4.2.1 <i>Escherichia coli</i>	103
4.2.2 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	104
4.2.3 <i>Ustilago maydis</i>	106
4.3 Molekularbiologische Standardmethoden	109
4.3.1 Isolierung von Nukleinsäuren	109
4.3.2 Handhabung von Nukleinsäuren	111
4.3.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR) basierte Techniken	114
4.3.4 Techniken zur mRNA Analyse	115
4.3.5 Generierung einer cDNA Bank	117
4.4 Flusskammersystem	121
4.4.1 Bestimmung der Flussrate der verwendeten Peristaltikpumpe	121
4.4.2 Assemblierung des Flusskammersystems	121
4.5 in silico-Methoden	123
Sequenz- und Strukturanalysen von DNA- und Proteinsequenzen	123
5. LITERATURVERZEICHNIS	124
6. ANHANG	134
6.1 Initiale Beobachtungen von Adhäsionsvorgängen von <i>Ustilago maydis</i>	134
6.1.1 Zell-Zell-Anhaftung ist bei <i>U. maydis</i> -Sporidien nicht zu beobachten	134
6.1.2 <i>U. maydis</i> -Sporidien zeigen in einem klassischen Agar-Adhäsionstest eine starke Substratanhaftung	135
6.2 Die Rolle pathogenitätsrelevanter Transkriptionsfaktoren in der Oberflächenadhäsion	136
6.3 Strukturanalysen identifizierter putativer Adhäsine	138
6.4 Die generierten Adhäsionsfaktor-Deletionsstämme zeigen keine Änderungen der Hydrophobizität von Hyphen	139

6.5 Konstruktion eines GATEWAY®-kompatiblen Expressionssystems zur heterologen Expression in <i>S. cerevisiae</i>	141
6.5.1 Klonierung eines binären Vektors für die induzierbare Expression von Fremdgenen in <i>S. cerevisiae</i>	141
6.5.2 Überprüfung der Galaktose-induzierten Genexpression eines in pKPH48 inserierten <i>gfp</i> -Gens	142
6.6 Generierung einer <i>U. maydis</i>-Genbank für die heterologe Expression in <i>S. cerevisiae</i>	143
6.6.1 Isolierung von mRNA aus <i>Ustilago maydis</i> -Filamenten	143
6.6.2 Transkription von cDNA und Klonierung der Genbank	144
6.6.3 Erste heterologe Expressionsreihen führen zu keiner Anreicherung adhärenter <i>S. cerevisiae</i> -Klone	145
6.6.4 Sequenzanalysen zeigen das Vorhandensein eines zusätzlichen Startcodons in der cDNA	147
6.7 Mutagenese von Kernlokalisierungssequenzen von <i>um04342</i>	149
6.8 Amplifikation der Enden der <i>um04342</i> mRNA (5'- und 3'-RACE)	151
6.9 Digitale Datensätze	152

1. Einleitung

1.1 *Ustilago maydis*

Im Ökosystem des Planeten nehmen Pilze eine zentrale Rolle als Zersetzer, mutualistische Symbionten oder Pathogene ein. Mit geschätzt 1,5 Millionen Spezies repräsentieren sie einen großen Anteil der lebenden Organismen, doch unser Verständnis beschränkt sich auf einige wenige Vertreter. Die höheren Pilze oder Dikarya umfassen die Phyla der Ascomycota und der Basidiomycota. Bekannteste Vertreter der Ascomycota sind unter anderem die Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae*, die Schimmelpilze der Familie *Aspergillus* sowie die humanpathogenen *Candida spp.* Das Phylum der Basidiomycota umfasst neben den bekannten Speisepilzen auch viele Mykorrhiza-Pilze sowie Tier- und Pflanzenpathogene (Celio *et al.* 2006). Eines der Subphyla der Basidiomycota umfasst die Brandpilze Ustilaginomycotina. Diesen gehören etwa 1500 Spezies meist phytopathogener Pilze an, die sich mit Ausnahme weniger Vertreter auf Angiospermen der Poaceae und Cyperaceae spezialisiert haben (Begerow *et al.* 2006). Der bekannteste Vertreter dieser Gruppe ist der dimorphe Basidiomyzot *Ustilago maydis*, der Erreger des Maisbeulenbrands, welcher bereits 1754 in Charles Bonnet's „Recherches sur l'usage des feuilles dans les plantes“ beschrieben wurde. Wie andere Brandpilze hat auch *U. maydis* ein enges Wirtsspektrum und infiziert lediglich *Zea mays* sowie die als Urform des Mais betrachtete Teosinte (Doebley 1992; Bölker 2001). Schon kurz nach Infektion bilden sich die typischen Krankheitssymptome aus: Infiziertes Blattgewebe weist chlorotische Bereiche auf und reagiert mit einer verstärkten Anthocyaneinlagerung. Nach wenigen Tagen kommt es dann zur Bildung der typischen Pflanzentumore (Abbildung 1A und 1B). Das Aufbrechen dieser Tumore setzt die tiefschwarzen Teliosporen frei, was der Maispflanze ein verbranntes Aussehen verleiht und dem Maisbeulenbrand seinen Namen bescherte (Abbildung 1B; Brefeld 1895; Christensen 1963). Die wirtschaftliche Bedeutung von *Ustilago maydis* wird generell als gering eingeschätzt und durch die Verwendung teilweise resistenter Maisvarietäten kommt es zu jährlichen Ernteeinbußen von nur etwa 2%. Dennoch beläuft sich der wirtschaftliche Schaden allein in den USA auf mehr als 1 Milliarde Dollar (Martinez-Espinoza *et al.* 2002; Allen *et al.* 2011). Unabhängig hiervon entwickelte sich der dimorphe Basidiomyzot jedoch zu einem der wichtigsten Modellorganismen der molekularen Biologie und der Genetik, was unter anderem auf die einfache Handhabung im Labor zurückzuführen ist. Die saprophytisch wachsenden Sporidien können ähnlich der Bäckerhefe *S. cerevisiae* leicht unter Laborbedingungen kultiviert werden und der vollständige Lebenszyklus von *U. maydis* kann unter kontrollierten Bedingungen in wenigen Wochen durchlaufen werden (Banuett 1995).

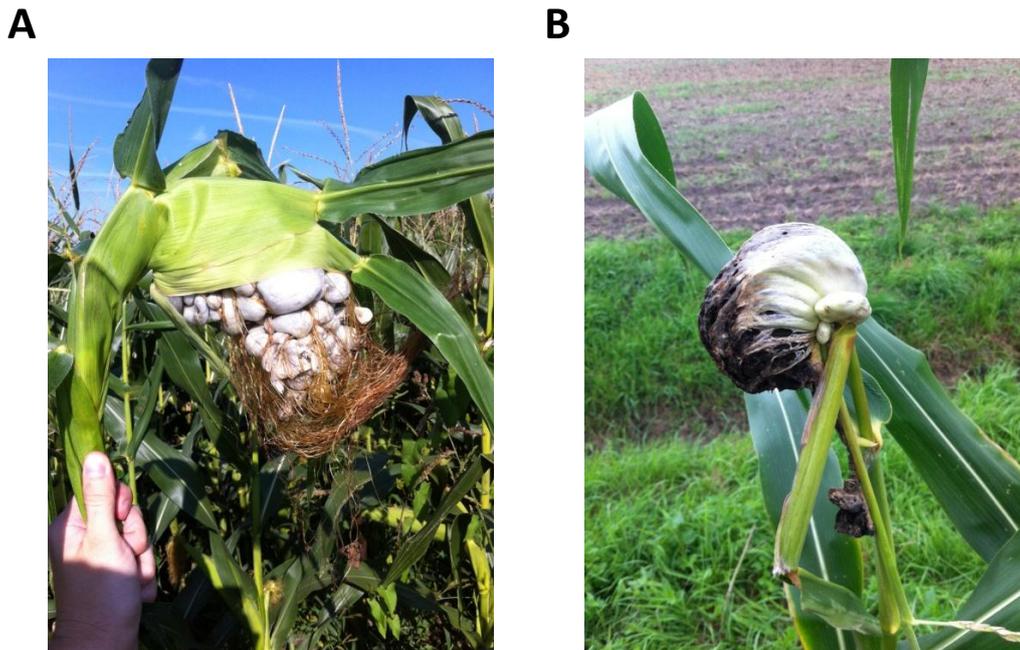


Abbildung 1: Krankheitssymptome an infizierten Maispflanzen. (A) Tumorgewebe eines Maiskolbens, die Maiskörner sind stark angeschwollen und grau verfärbt, sie enthalten die Teliosporen des Pilzes. Aufgenommen August 2011 in einem Maisfeld bei Rüppurr. (B) Tumorgewebe am Stängel einer Maispflanze, deutlich sind die aus dem Tumorgewebe freigesetzten schwarzen Teliosporen zu erkennen. Aufgenommen September 2011 in einem Maisfeld bei Karlsruhe.

Die Sporidien des Brandpilzes sind für genetische Modifikationen zugänglich, da *U. maydis* ein effizientes System zur homologen Rekombination besitzt (Wang *et al.* 1988; Kronstad *et al.* 1989; Brachmann *et al.* 2004; Kahmann und Kämper 2004; Holloman *et al.* 2008). Die Verfügbarkeit von dominanten Selektionsmarkern (Keon *et al.* 1991; Gold *et al.* 1994; Kojic und Holloman 2000) unterstützt die gezielte Manipulation chromosomaler DNA. Die Verwendung von Promotorsystemen für regulierbare Expression (Banks *et al.* 1993; Bottin *et al.* 1996; Brachmann *et al.* 2004) und Überexpression (Spellig *et al.* 1996; Hartmann persönliche Kommunikation) und der Einsatz einer Reihe fluoreszenter Proteine ermöglicht zellbiologische Untersuchungen wie beispielsweise *in vivo*-Mikroskopie von Genexpression und subzellulärer Protein-Lokalisierung (Zusammengefasst in Steinberg und Perez-Martin 2008). Revers-genetische, phylogenetische und Homologie-basierte Untersuchungen sind seit der Veröffentlichung der Genomsequenz ebenfalls möglich (Kämper *et al.* 2006). Die Grundlagenforschung mit *U. maydis* hat eine lange Tradition und führte bereits vor fast 50 Jahren zur Identifizierung von Mechanismen der homologer Rekombination (Holliday 1966). Bis heute hat sich das Modellsystem *U. maydis* für ein breites Feld molekularbiologischer Fragestellungen bewährt. Beispielsweise konnten im Pathosystem *U. maydis* pathogenitätsrelevante Signaltransduktionskaskaden offengelegt werden (Klosterman *et al.* 2007; Garcia-Pedrajas *et al.* 2008) und Einblicke in die Nährstoffversorgung des Pilzes während der pathogenen Interaktion gewonnen werden (Eichhorn *et al.* 2006; Horst *et al.* 2010; Wahl *et al.* 2010). Pathogenitätsstudien ermöglichten die Beschreibung Pflanzenorgan-spezifischer Genexpression in *U. maydis* (Skibbe *et al.* 2010) und die Identifizierung und funktionelle Charakterisierung neuartiger Effektorproteine (Kämper *et al.* 2006;

Döhlemann *et al.* 2009; Djamei *et al.* 2011; Döhlemann *et al.* 2011). Zellbiologische Untersuchungen an Filamenten von *U. maydis* vermittelten neue Erkenntnisse über Motorprotein-vermittelte Mikrotubuli-Organisation und Langstreckentransport von Proteinen und mRNA (Steinberg und Perez-Martin 2008; Vollmeister *et al.* 2012). Die Verfügbarkeit der *U. maydis*-Genomsequenz ermöglichte komparative phylogenetische Analysen des kürzlich veröffentlichten *Sporisorium reilianum*-Genoms (Schirawski *et al.* 2010). Trotz seiner geringen wirtschaftlichen Bedeutung zählt *U. maydis* weiterhin zu den zehn wissenschaftlich bedeutendsten phytopathogenen Pilzen (Dean *et al.* 2012).

1.2 Der Lebenszyklus von *U. maydis*

Ustilago maydis ist ein dimorpher Basidiomycet, dessen Lebenszyklus sich in eine saprophytische und eine biotrophe Wachstumsphase aufteilt. Nach dem Auskeimen der Teliosporen auf der Blattoberfläche bildet sich nach einer meiotischen Teilung die Probasidie, aus der durch Sprossung die haploiden Sporidien freigesetzt werden. Diese stellen das saprophytische Wachstumsstadium dar, ihre Zellteilung findet hefeartig durch Knospung statt. Durch die Fusion zweier genetisch kompatibler Sporidien zu einem Dikaryon kann der Organismus in die biotrophe Phase übergehen. Das Dikaryon wächst filamentös und dringt über appressorienartige Infektionsstrukturen in die Maispflanze ein. Dort erfolgt eine massive Proliferation der Pilzhyphen im Pflanzengewebe, die letztlich zur Bildung von Tumoren führt, in denen die Karyogamie und die Bildung neuer Teliosporen stattfindet (Christensen 1963). Eine Zusammenfassung der unterschiedlichen Phasen des Lebenszyklus findet sich in Abbildung 2.

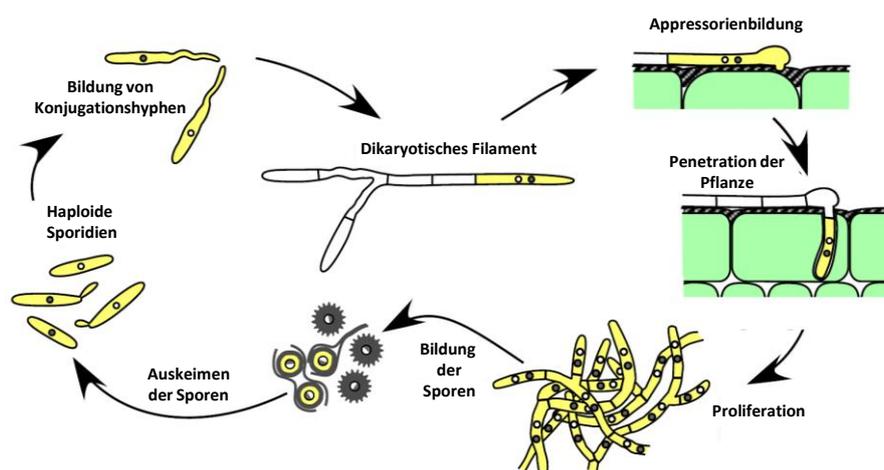
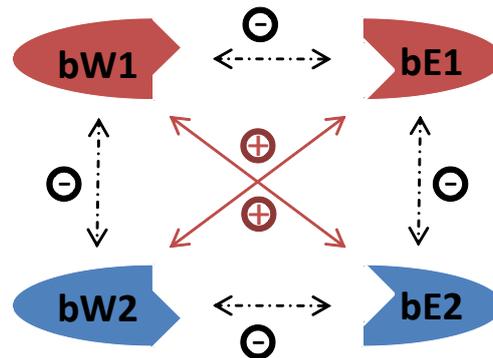


Abbildung 2: Der Lebenszyklus von *Ustilago maydis*. Zentraler Punkt des Lebenszyklus und Schlüssel zur pathogenen Entwicklung von *U. maydis* ist die Bildung des dikaryotischen Filaments durch Konjugation und Verschmelzung zweier kompatibler Sporidien. Das dikaryotische Filament wächst filamentös auf der Oberfläche und bildet schließlich ein Appressorium aus. Diese Struktur vermittelt die Penetration der Wirtspflanze. Nach erfolgreicher Penetration folgt die Proliferation im pflanzlichen Gewebe, die in der Induktion von Pflanzentumoren und der Bildung diploider Teliosporen gipfelt. Diese werden freigesetzt und können unter geeigneten Bedingungen auskeimen. Nach dem Auskeimen und einer meiotischen Teilung können neue Sporidien abgeschnürt werden. Durch Verschmelzung von kompatiblen Sporidien wird der Lebenszyklus erneut initiiert. Modifiziert nach (Kämper *et al.* 2006).

Zwei Kreuzungstyploci kontrollieren die genetische Kompatibilität der Sporidien. Der biallelische *a*-Lokus steuert die Zell/Zell-Erkennung und die Zellfusion mittels eines Pheromon/Rezeptor-Systems (Bölker *et al.* 1992; Spellig *et al.* 1994). Der multiallelische *b*-Lokus kodiert für die Gene *bE* und *bW*; diese nehmen die zentrale Schalterstellung in der pathogenen Entwicklung von *U. maydis* ein (Gillissen *et al.* 1992; Kämper *et al.* 1995). Während die C-terminalen Bereiche unterschiedlicher Allele von *bE* und *bW* mehr als 90% Homologie zueinander aufweisen, sind die N-terminalen Bereiche hoch variabel (Kronstad und Leong 1990; Schulz *et al.* 1990; Gillissen *et al.* 1992). Eine kompatible Interaktion der variablen N-Termini kann nur für unterschiedliche Allele erfolgen und führt zur Bildung eines funktionellen *bE/bW*-Heterodimers (siehe Abbildung 3A; Kämper *et al.* 1995). Dieses Heterodimer stellt den zentralen Regulator der pathogenen Entwicklung dar (Romeis *et al.* 2000; Brachmann *et al.* 2001). Haploide *U. maydis*-Stämme, welche kompatible *bE* und *bW*-Proteine exprimieren, können auch ohne Fusion mit einem kompatiblen Partner den vollständigen Entwicklungszyklus durchlaufen. Sie sind in der Lage, filamentös zu wachsen, Pflanzen zu infizieren und Tumorgenese zu induzieren und werden daher als solopathogen bezeichnet (Bölker *et al.* 1995; Kämper *et al.* 2006). Das *bE/bW*-Heterodimer kontrolliert die Transition vom saprophytischen zum biotrophen Wachstum und die damit verbundenen Änderungen von Metabolismus und Zellmorphologie durch transkriptionelle Aktivierung von Transkriptionsfaktoren und Zellzyklus-Regulatoren, der sogenannten Klasse I-Gene oder direkt *b*-regulierten Gene (Abbildung 3B; Brachmann *et al.* 2001). Der Transkriptionsfaktor *Rbf1* gehört zu den direkt *b*-regulierten Transkriptionsfaktoren und übernimmt eine Schlüsselfunktion in der *b*-abhängigen Regulationskaskade. Er kontrolliert die Expression der Klasse II-Gene, diese umfassen mit 91,7% den Großteil aller *b*-abhängigen Gene (Heimel *et al.* 2010). Diese indirekt *b*-regulierten Gene schließen ebenfalls eine Reihe von Transkriptionsfaktor-kodierenden Genen mit ein, zu diesen zählen unter anderem *biz1*, *hdp1* und *hdp2*. Das Zinkfinger-Protein *Biz1* verursacht durch Reprimierung des mitotischen Zyklus *Cib1* einen G2-Zellzyklusarrest und übernimmt zusätzlich eine Rolle in der Appressorienbildung und *biz1*-Deletionsstämme sind vollständig apathogen (Flor-Parra *et al.* 2006). Analysen von Expressionsdaten deuten darauf hin, dass *Biz1* ebenfalls eine Rolle in der pathogenitätsgebundenen Expression einer Reihe von Effektorproteinen übernimmt (Langner 2010; Hampel 2012). Weitere *b*-abhängige Pathogenitätsfaktoren sind die Mitogen-aktivierte Proteinkinase (MAPK) *Kpp6* und die Homeodomänen-Transkriptionsfaktoren *Hdp1* und *Hdp2* (Brachmann *et al.* 2003; Heimel *et al.* 2010).

A



B

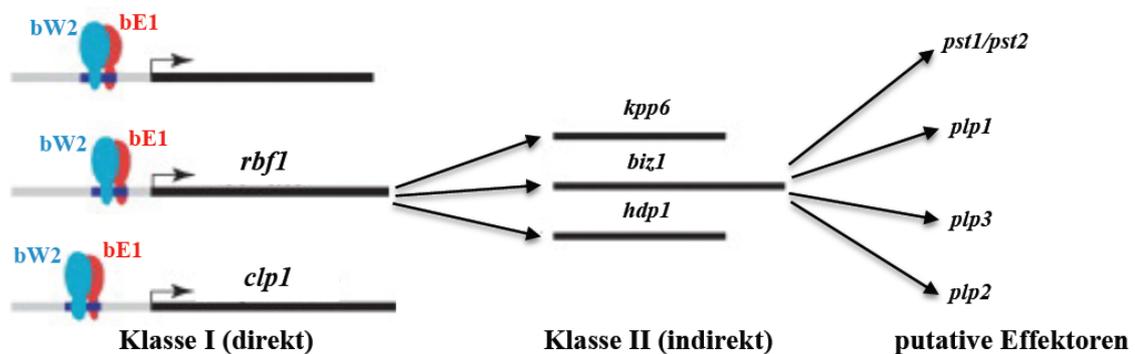


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Genregulation durch das bE/bW-Heterodimer. (A) bE und bW können nur ein funktionelles Heterodimer bilden, wenn sie von unterschiedlichen Allelen kodiert werden. Modifiziert nach (Brachmann 2001). (B) Schematische Darstellung eines Teils der *b*-induzierten Regulationskaskade. Das bE/bW-Heterodimer kontrolliert die Expression der Klasse I-Gene, welche wiederum für Transkriptionsfaktoren oder –regulatoren kodieren. Diese kontrollieren die Expression der Klasse II-Gene, allein Rbf1 kontrolliert hierbei die Expression von 91,7 % aller *b*-regulierten Gene. Die Klasse II-Gene umfassen wiederum Transkriptionsfaktor-kodierende Gene wie *biz1* und *hdp2*. Biz1 reguliert unter anderem die Expression putativer Effektorgene wie *pst1/pst2*, *plp1*, *plp2* und *plp3*. Aus (Hampel 2012).

1.3 Adhäsion in Pilzen

Durch alle Reiche des Lebens zieht sich die Fähigkeit von Organismen, an Substrate anhaften zu können. Adhäsion kann von der geschlechtlichen Assoziation zweier Zellen bis hin zur der Verankerung einzelner Zellen oder ganzer Zellverbände an ein Substrat reichen. Die Bildung von Zellaggregaten, Biofilmen oder die Assoziation zu multizellulären Organismen bieten in einer Vielzahl von Ökosystemen einen entscheidenden evolutionären Vorteil. In biotrophen Interaktionen spielt die erfolgreiche Anhaftung des Pathogens an den Wirtsorganismus eine Schlüsselrolle. Während alle pilzlichen Taxa Adhäsionsfähigkeiten aufzeigen, können die Mechanismen dieser Adhäsion höchst unterschiedlich ausfallen, meist sind Zellwand-assoziierte oder sekretierte Proteine beteiligt (Tucker und Talbot 2001). Zur Vereinfachung können Adhäsionsvorgänge in zwei Teilbereiche unterteilt werden: Zell-Zell-Anhaftung kann vegetativen wie sexuellen Ursprungs sein und wird meist

durch spezifische Ligand-Rezeptor-Interaktionen vermittelt. Oberflächenadhäsion hingegen beschreibt die Anhaftung einer individuellen Zelle an ein abiotisches oder biotisches Substrat. Diese kann durch Ligand-Rezeptor-Interaktionen vermittelt werden, wird aber oft durch auf die Oberfläche sekretierte Substanzen vermittelt und führt nicht selten zur Bildung von Biofilmen.

1.3.1 Adhäsion von *Saccharomyces cerevisiae*

Untersuchungen am Modellorganismus *Saccharomyces cerevisiae* haben viel zum Grundverständnis von Adhäsionsvorgängen beigetragen. Bei der Bäckerhefe *S. cerevisiae* sind sowohl Zell-Zell-Anhaftung als auch Substratanhaftung zu beobachten.

Die Zell-Zell-Anhaftung von *S. cerevisiae* kann in zwei Bereiche unterteilt werden. Die pheromoninduzierte, sexuelle Anhaftung kompatibler Kreuzungspartner wird als Agglutination bezeichnet und wird ausschließlich über Rezeptor-Ligand-Interaktionen vermittelt. Beteiligte Adhäsine sind die Agglutinine Aga1/Ag- α 1 und Fig2 (Roy *et al.* 1991; Zhang *et al.* 2002).

Die zweite Art der Selbstadhäsion von *S. cerevisiae* ist die vegetative, reversible Assoziation von Zellen. Diese wird als Flokkulation bezeichnet, da die Zell-Zell-Anhaftung in Flüssigkultur zur Bildung charakteristischer Flocken führt. Flokkulations-Phänotypen werden oftmals durch Rezeptor-Ligand-Interaktionen spezieller Proteine vermittelt. Diese Adhäsine werden Flokkuline genannt und umfassen die Mannoproteine Flo1, Flo5 und Flo9. Sie gehören zur Klasse der Lektine und vermitteln eine Ca^{2+} -abhängige Bindung von Mannoseresten der Glykoproteine benachbarter Zellen (Lindquist 1952; Mill 1964; Miki *et al.* 1982; Stratford 1989). Eine besondere Form der Flokkulation ist die Flor-Bildung. Mit Flor wird ein Biofilm aus Hefezellen bezeichnet, der sich unter bestimmten Bedingungen an der Grenzschicht zwischen Flüssigmedium und Luft bilden kann. Im Gegensatz zur Flokkulation wird die Flor-Bildung jedoch nicht durch Rezeptor-Ligand-Interaktionen, sondern vielmehr durch eine Erhöhung der Hydrophobizität der Zelloberfläche durch Flo11 begünstigt (Martinez *et al.* 1995; Zara *et al.* 2005). Flo11-vermittelte Adhäsionsvorgänge werden vermutlich Ca^{2+} - und Mannose-unabhängig durch hydrophobe Interaktionen vermittelt, doch die exakten Mechanismen der Flo11-vermittelten Flokkulation, Flor-Bildung und Biofilm-Bildung sind noch nicht zweifelsfrei aufgeklärt (Guo *et al.* 2000; Bayly *et al.* 2005).

S. cerevisiae zeigt neben der Fähigkeit zur Zell-Zell-Anhaftung auch eine Adhäsion an abiotische Oberflächen auf. Die Adhäsion an Agar wird beispielsweise durch die Adhäsine Flo11, Flo10 und Fig2, nicht jedoch durch die Mannoproteine Flo1, Flo5 und Flo9 vermittelt (Van Mulders *et al.* 2009). Zur Agar-Adhäsion trägt vermutlich auch die Flo10- oder Flo11-induzierte Bildung von Pseudohyphen bei, da diese in den Agar eindringen und hierdurch eine Agar-Adhäsion verstärken (Lo und Dranginis 1996; Lo und Dranginis 1998). Eine Adhäsion von *S. cerevisiae* an hydrophobe Kunststoffoberflächen wie Polystyrol, Polypropylen und Polyvinylchlorid kann ebenfalls beobachtet

werden. Diese wird vorrangig durch die hydrophoben Eigenschaften von Flo11 vermittelt (Reynolds und Fink 2001), eine Beteiligung der Adhäsine Flo1, Flo5, Flo9 und Flo10 kann hier jedoch nicht ausgeschlossen werden (Van Mulders *et al.* 2009).

Die Expression von *S. cerevisiae*-Adhäsinen unterliegt einer komplexen Regulation, die erst ansatzweise verstanden ist. Beteiligte Regulatoren sind unter anderem Transkriptionsfaktoren wie Flo8 und Mss11, die durch eine Vielzahl von Signaltransduktionskaskaden reguliert werden (Zusammengefasst in Brückner und Mösch 2012). Zusätzlich konnte auch die epigenetische Regulation von Flokkulation durch subtelomerische Positionierung einer Reihe von Flokkulin-Genen beobachtet werden (Teunissen und Steensma 1995; Fichtner *et al.* 2007; Bester *et al.* 2012).

1.3.2 Adhäsion von *Candida albicans* und anderer pathogener *Candida*-Spezies

Bei Adhäsionsvorgängen in den humanpathogenen Ascomyzenten *Candida albicans* und *Candida glabrata* steht die pathologische Rolle im Vordergrund. Die pathogene Entwicklung infektiöser *Candida*-Spezies ist eng an die Anhaftung an Wirtszellen gekoppelt, und für viele der identifizierten Adhäsine konnte eine direkte Beteiligung an der Virulenz festgestellt werden (Sundstrom 2002). Eine zentrale Rolle in der Anhaftung an biotische und abiotische Oberflächen spielen die Glykoproteine der ALS-Familie („agglutinin-like sequence“ oder Agglutinin-ähnliche Sequenz; zusammengefasst in Hoyer *et al.* 2008). Die N- und C-terminalen Bereiche der ALS-Proteine zeigen Homologien zum *S. cerevisiae*-Agglutinin- α auf. Der zentrale Bereich der ALS-Proteine ist durch Sequenzwiederholungen gekennzeichnet, deren Anzahl eine hohe Variabilität zwischen unterschiedlichen Allelen aufzeigt (Hoyer *et al.* 1995; Hoyer *et al.* 1998). Solche Sequenzwiederholungen sind charakteristisch für eine Vielzahl von *Candida*-Adhäsinen. Das Zellwandprotein Hwp1 besitzt ebenfalls charakteristische Aminosäuren-Sequenzwiederholungen und spielt eine bedeutende Rolle in der Filamentadhäsion und Pathogenität von *C. albicans* (Staab und Sundstrom 1998; Tsuchimori *et al.* 2000). In *Candida glabrata* vermitteln Lektine der Epa (epithelial adhesin oder Epithel-Adhäsion)-Familie eine Adhäsion an humane Epithelzellen, diese weisen ebenfalls charakteristische Wiederholungen der Aminosäuresequenz auf (Cormack *et al.* 1999; Kaur *et al.* 2005).

1.3.3 Adhäsion von *Ustilago maydis*

Der Lebensraum phytopathogener Pilze unterscheidet sich drastisch vom Lebensraum planktonischer oder humanpathogener Pilze. Pflanzen haben eine Reihe physischer Barrieren entwickelt, die direkte Zell-Zell-Kontakte zum Pathogen verhindern. Hierzu zählt die wachsige, stark hydrophobe Cuticula der Blattoberfläche, die in ihren physikalischen Eigenschaften einer abiotischen Oberfläche entspricht (Tucker und Talbot 2001). Die Teliospore stellt das erste Entwicklungsstadium von *Ustilago maydis* dar, welches mit der Blattoberfläche in Berührung kommt. Über die Mechanismen der Anhaftung der

Teliospore ist wenig bekannt, sie könnten von hydrophoben Interaktionen bis hin zu präformierten, spezialisierten Adhäsionsstrukturen reichen. Sie sind aber gekennzeichnet durch ihre Passivität, da in dem Überdauerungsstadium in der Regel noch keine aktive Adhäsionsproduktion stattfinden kann (Jones 1994). Der Kontakt mit der Blattoberfläche führt zu einer thigmotropischen Respons der Teliospore. Es folgt die Aktivierung eines Entwicklungsprogramms, welches die Bildung der Probasidie und die Abschnürung der haploiden Sporidien zur Folge hat. In diesen Wachstumsphasen ist das Phytopathogen in der Lage, durch die aktive Produktion und Sekretion von Adhäsinen die Anhaftung an das Substrat zu gewährleisten. Dieser Vorgang konnte für eine Vielzahl von Konidien, Sporidien und anderer früher Entwicklungsstadien phytopathogener Pilze gezeigt werden (Zusammenfassend beschrieben in Jones und Epstein 1990; Epstein und Nicholson 2006). Das Auskeimen der Teliospore und die Produktion von Adhäsinen sind eng mit der Erkennung der Wirtspflanze verbunden. Die Mechanismen dieser Wirtserkennung sind jedoch bis heute nur in Ansätzen verstanden. Sie können abhängig vom untersuchten Pathogen mit der Perzeption von chemischen Signalen oder physikalischen Oberflächeneigenschaften wie Hydrophobizität, Oberflächenfestigkeit und -topografie zusammenhängen (Jones 1994; Tucker und Talbot 2001). Für *U. maydis* kann sowohl die Hydrophobizität der Blattoberfläche als auch das Vorhandensein von Hydroxyfettsäuren und Cutin-Monomeren die Ausbildung des infektiösen Filaments einleiten (Mendoza-Mendoza *et al.* 2009). Als putativer Rezeptor für die Hydrophobizität wird das Transmembran-Mucin Msb2 diskutiert (Lanver *et al.* 2010b). Die eingeleitete Produktion von Faktoren zur Oberflächenadhäsion ist in vielen pathogenen Pilzen mit der Formation einer extrazellulären Matrix (ECM) verbunden (Braun und Howard 1994; Jones 1994). Elektronenmikroskopische Aufnahmen von *U. maydis*-Hyphen auf der Blattoberfläche zeigen ebenfalls das Vorhandensein einer ECM (siehe Abbildung 4), jedoch ist die Zusammensetzung dieser ECM bisher nicht bekannt.

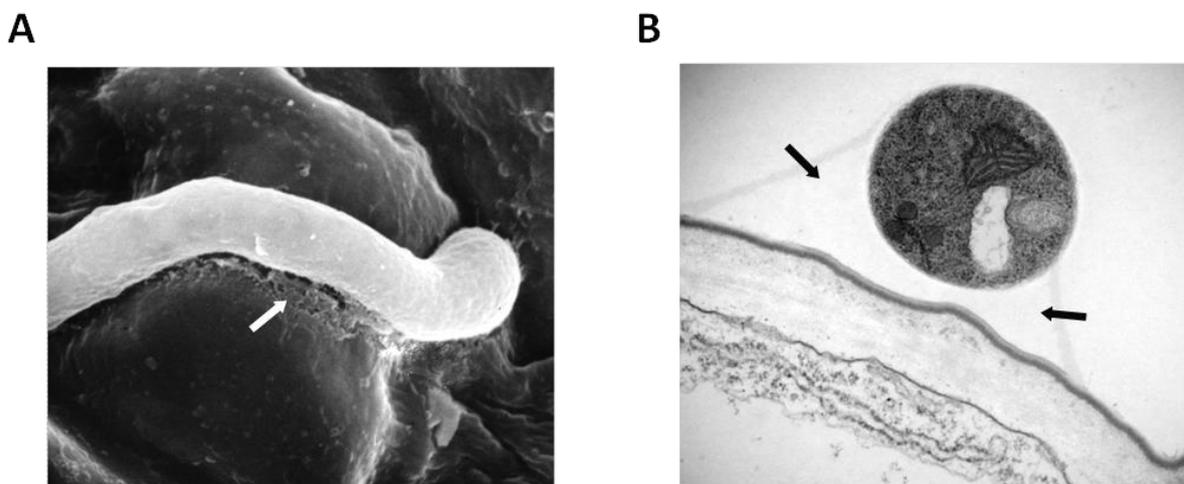


Abbildung 4: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von *U. maydis*-Hyphen auf der Blattoberfläche. (A) Aufsicht auf eine Pilzhyphe auf der Pflanzenoberfläche. Zwischen Hyphe und Pflanzencuticula ist eine schleimige Matrix zu erkennen (Pfeil), Aufnahme durch (Snetselaar, nicht publiziert). (B) Querschnitt einer Pilzhyphe auf der Blattoberfläche, deutlich zu erkennen ist die durch den Pilz sekretierte ECM (Pfeile), Aufnahme durch (Snetselaar, nicht publiziert).

Es konnten bereits eine Reihe von *U. maydis*-Proteinen identifiziert werden, die an Oberflächenadhäsion und somit auch an der Bildung einer ECM beteiligt sein können. So kodiert das Genom von *U. maydis* für zwei Hydrophobine, solche können durch ihre speziellen strukturellen Eigenschaften die physikalischen Eigenschaften einer Oberfläche ändern und so eine Substratadhäsion begünstigen (Wösten 2001). Für die *U. maydis*-Hydrophobine Hum2 und Hum3 konnte jedoch kein Defekt bezüglich der Oberflächenadhäsion beobachtet werden. Ein Pathogenitätsdefekt konnte lediglich bei einer Doppeldeletion von *hum3* und *rsp1* beschrieben werden. *rsp1* kodiert wiederum für ein sekretiertes Protein mit Sequenzwiederholungen (Teertstra *et al.* 2006; Müller *et al.* 2008a). Das Repellent Rep1, welches in *U. maydis* offenbar die funktionelle Rolle der Hydrophobine übernommen hat, wirkt sich positiv auf die Anhaftung von Filamenten an hydrophobe Oberflächen aus, scheint jedoch keinen direkten Einfluss auf die Pathogenität des Pilzes zu nehmen (Teertstra *et al.* 2006). In Abwesenheit von Rep1 kommt es zur Expression einer Reihe von kleinen sekretierten Proteinen. Diese könnten den Adhäsionsdefekt von $\Delta rep1$ -Stämmen abschwächen (Teertstra *et al.* 2011). Die Abundanz an sekretierten Proteinen und das Vorhandensein einer ECM legt nahe, dass weitere bisher nicht identifizierte Adhäsine in *U. maydis* existieren müssen, welche zur Anhaftung des Pilzes an die Blattoberfläche und somit zur Etablierung der pathogenen Entwicklung beitragen. Eine Zusammenfassung der einzelnen prä-penetrativen Entwicklungsstadien von *U. maydis* und die Rolle putativ beteiligter Adhäsine findet sich in Abbildung 5.

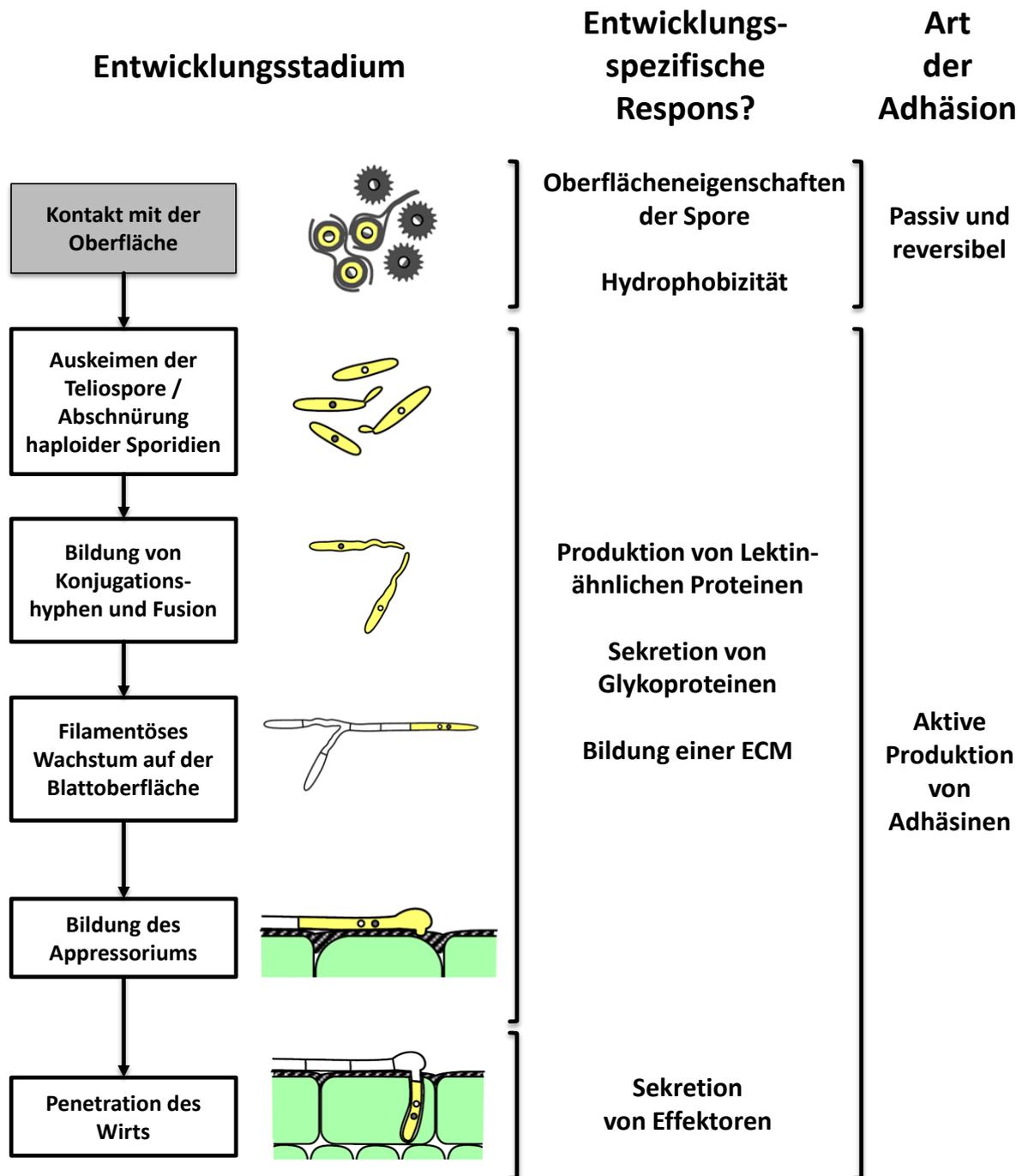


Abbildung 5: Flussdiagramm der aufeinanderfolgenden Stadien von Adhäsionsvorgängen bei *U. maydis*. Links sind die Stadien der prä-penetrativen Entwicklung aufgezeigt, die der pathogene Basidiomyzete durchläuft. In den verschiedenen Entwicklungsstadien reagiert der Pilz auf Umweltfaktoren mit einer spezifischen Respons. Das ? kennzeichnet den hypothetischen Charakter dieser Respons. Ein Großteil der auslösenden Umweltfaktoren und entwicklungsspezifischen Antworten des Pilzes ist nach wie vor nicht vollständig aufgeklärt. Die Mechanismen der Adhäsion können in passive Anhaftung, d.h. durch vorgegebene Strukturen, und aktive Produktion von Adhäsinen unterteilt werden. Modifiziert nach (Jones 1994) und (Kämper *et al.* 2006)

1.4 Etablierung der biotrophen Interaktion durch Effektorproteine

Pflanzen sind dem Angriff durch pathogene Organismen nicht schutzlos ausgeliefert, sie besitzen eine Immunabwehr, die sie in die Lage versetzt, Pathogene zu erkennen und Abwehrreaktionen einzuleiten. Diese pflanzliche Abwehr kann in zwei funktionell unterschiedliche Gruppen unterteilt werden. Die basale Abwehr vermittelt einer Pflanze eine unspezifische Resistenz gegenüber Pathogenen, während die Resistenzgen- oder R-Gen-spezifische Abwehr eine auf bestimmte Pathogene spezialisierte intensive Immunabwehr einleitet.

1.4.1 Die pflanzliche Basalresistenz ermöglicht die Erkennung von Mikroben-assoziierten Strukturen

Die basale Abwehr oder Basalresistenz ermöglicht einer Pflanze die Erkennung von Fremdorganismen, dies geschieht durch eine Rezeptor-vermittelte Perzeption von Elizitoren. Dies sind charakteristische Moleküle oder Molekülstrukturen, die bei pathogenen wie nicht-pathogenen Mikroorganismen auftreten und der Pflanze eine Nicht-Selbst-Erkennung ermöglichen (Dangl und Jones 2001). Lipopolysaccharide, die Flagellin-Untereinheit FLG22 und der prokaryotische Transkriptions-Elongationsfaktor Ef-Tu sind verbreitete prokaryotische Elizitoren; Elizitoren der Pilze sind unter anderem Chitin und Chitinmonomere, Ergosterol und das Enzym Xylanase (Nürnberger *et al.* 2004). Aufgrund ihrer Eigenschaften wurden Elizitoren als PAMPs („pathogen-associated molecular pattern“ oder Pathogen-assoziierte molekulare Muster) klassifiziert (Ausubel 2005), da ihr Vorkommen jedoch nicht auf Pathogene beschränkt ist, wurde die Bezeichnung MAMPs („microbe-associated molecular pattern“ oder Mikroben-assoziierte molekulare Muster) vorgeschlagen (Mackey und McFall 2006), bis heute sind beide Klassifizierungen in Verwendung. Die Pflanze erkennt PAMPs durch Transmembranrezeptoren, sogenannte PRRs („pattern recognition receptor“ oder Struktur-Erkennungs-Rezeptor), die strukturelle und funktionelle Ähnlichkeiten zu den TLRs („toll-like receptor“ oder Toll-ähnliche Rezeptoren) des Immunsystems höherer Eukaryoten aufweisen (Nürnberger *et al.* 2004). Die Aktivierung assoziierter Mitogen-aktivierter Proteinkinase-Kaskaden durch die PRRs stimuliert die Produktion antimikrobieller Substanzen und reaktiver Sauerstoffspezies. Dieser Vorgang wird auch als PTI („PAMP-triggered immunity“ oder PAMP-ausgelöste Immunität) bezeichnet, da sie zu einer Immunität der Pflanze gegenüber dem Pathogen führt (Dangl und Jones 2001).

1.4.2 Effektoren vermitteln die Umgehung der pflanzlichen Basalresistenz

Zur Gewährleistung der erfolgreichen Infektion sekretieren pathogene Organismen Effektorproteine in den Zellzwischenraum oder das Zytoplasma der Pflanzenzelle. Diese Effektoren verursachen eine direkte oder indirekte Modulation der PTI. Beispielsweise verwendet das prokaryotische

Phytopathogen *Pseudomonas syringae* ein Typ-III-Sekretionssystem zur Insertion einer Reihe spezialisierter Effektorproteine in das Zytoplasma der Pflanzenzelle (Cunnac *et al.* 2009). Diese Effektoren interferieren mit PRRs oder den mit ihnen assoziierten Signaltransduktionskaskaden. Der *P. syringae* Effektor AvrPto bindet die pflanzlichen Rezeptorkinasen FLS2 und EFR, verhindert damit die Flagellin-induzierte PTI und ermöglicht dem Bakterium die erfolgreiche Kolonisierung des Wirts (Xiang *et al.* 2008). Die Wirkungsmechanismen eukaryotischer Effektoren sind erst in Ansätzen verstanden. Das den Apoplasten kolonisierende eukaryotische Phytopathogen *Cladosporium fulvum* interferiert mit der Chitin-vermittelten Basalresistenz durch Sekretion von Ecp6, welches selektiv Chitin-Oligosaccharide bindet und so deren Perzeption verhindert (de Jonge *et al.* 2010). Zusätzlich verhindert der Effektor Avr4 durch aktive Bindung des Chitinpolymers die Hydrolyse der Zellwand durch pflanzliche Chitinasen (van den Burg *et al.* 2006). Der Effektor Avr2 inhibiert extrazelluläre Cysteinproteinasen, die ebenfalls eine Rolle in der Basalresistenz spielen (van Esse *et al.* 2008). Ein Großteil der bekannten eukaryotischen Effektoren vollzieht seine Funktion in der Pflanzenzelle. Die Internalisierung der Effektoren geschieht im Gegensatz zu Prokaryoten nicht durch eine pathogen-kodierte Maschinerie. Bei Effektoren der Oomyzeten wurden konservierte N-terminale RXLR (Arg-X-Leu-Arg)- und dEER (Asp-Glu-Glu-Arg)-Motive beschrieben, die eine essentielle Funktion bei der Translokation spielen. Für Effektoren der Pilze konnte lediglich ein schwach konserviertes RXLR-ähnliches Motiv beschrieben werden (Kale und Tyler 2011). Die Internalisierung von Effektoren wird offenbar durch Bindung von Phosphatidylinositol-3-Phosphat durch das RXLR-Motiv und einer anschließenden Lipid Raft-vermittelten Endozytose gewährleistet (Kale 2012). Eine spezielle Gruppe von internalisierten Effektorproteinen sind die TAL („transcription activator-like“ oder Transkriptionsaktivator-ähnliche) Effektoren, diese translozieren in den Pflanzenzellkern und modulieren dort die pflanzliche Genexpression (Zusammengefasst in Scholze und Boch 2011). Eine Vielzahl von extra- und intrazellulär wirkenden Effektorproteinen ermöglichen pathogenen Organismen, auf mehreren Ebenen einer PAMP-vermittelten Basalresistenz entgegenzuwirken.

1.4.3 R-Gen-spezifische Abwehr ermöglicht die spezifische Erkennung von Effektorproteinen

Die erfolgreiche Umgehung der PTI durch sekretierte Effektorproteine führte zur Entwicklung eines zweiten, Pathogen-spezifischen Abwehrmechanismus bei Pflanzen, welcher erstmals vor über 50 Jahren mit der Gen-für-Gen-Hypothese umschrieben wurde. Diese postuliert die spezifische Erkennung eines Effektors (Das Produkt des *avr*- oder Avirulenz-Gens) durch ein spezifisches Genprodukt der Pflanze (Das Produkt des R- oder Resistenz-Gens) und einer darauf folgenden Immunität der Pflanze gegen das Pathogen. Aufgrund der zentralen Rolle des R-Gens in dieser Abwehrreaktion wird diese auch als R-Gen-spezifische Abwehr bezeichnet (Flor 1955; Keen 1990).

Die molekularen Grundlagen der R-Gen-spezifischen Resistenz sind heute gut verstanden. Da eine PRR-vermittelte Erkennung von PAMPs zur Aktivierung der PTI führen würde, wirken vom Pathogen

sekretierte Effektorproteine der PTI entgegen. Das Vorhandensein von Effektorproteinen ermöglicht der Pflanzenzelle jedoch deren Erkennung durch spezielle Rezeptormoleküle. Diese wurden als NB-LRR-Proteine („nucleotide binding leucin rich repeat“; auch NBS-LRR) beschrieben, da sie Nukleotid-bindende Eigenschaften aufweisen und Leucin-reiche Aminosäurewiederholungen besitzen (McHale *et al.* 2006). Die Erkennung von Effektoren durch NB-LRRs führt zur Aktivierung einer starken Immunantwort, diese wird ETI („effector-triggered immunity“ oder Effektor-ausgelöste Immunität) genannt (siehe Abbildung 6). Eine ETI ist in der Regel stärker ausgeprägt als eine PTI und führt oftmals zu lokal begrenztem Zelltod, was auch als HR (Hypersensitive Respons) bekannt ist (Coll *et al.* 2011). Diese Abwehrstrategie hat sich besonders bei biotrophen Pathogenen bewährt, da diese auf lebendes Pflanzenmaterial angewiesen sind. AvrPiz-t, ein sekretierter Effektor von *Magnaporthe oryzae*, unterdrückt den programmierten Zelltod in *Nicotiana tabacum*-Zellen, kann jedoch im Zytosol resistenter Pflanzen durch das R-Protein Piz-1 erkannt werden (Li *et al.* 2009). Die AvrPita-Effektorenfamilie von *Magnaporthe*-Spezies umfasst eine Reihe von Metalloproteasen, die von resistenten Reisvarianten durch den zytoplasmatischen R-Faktor Pi-ta erkannt werden können (Jia *et al.* 2000; Khang *et al.* 2008). In Pflanzen, die das R-Gen tragen, führt eine Sekretion des Effektorproteins somit nicht zur Kolonisierung, sondern im Gegenteil zur spezifischen Immunität gegen das Pathogen.

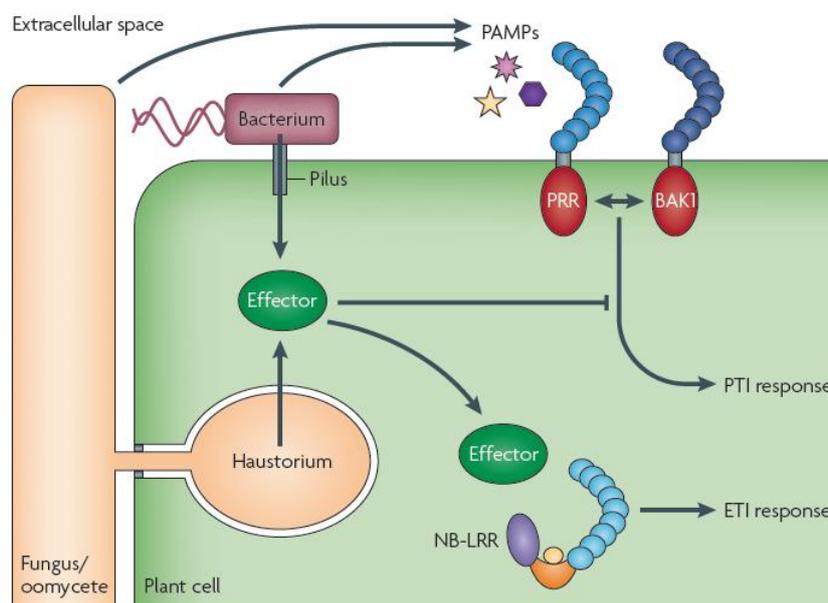


Abbildung 6: Schematische Darstellung der Erkennung von Pathogenen und Abwehrreaktionen der Pflanze. Durch den pathogenen Organismus in den Apoplasten freigesetzte Moleküle wie Lipopolysaccharide, Flagellin oder Chitin, auch als PAMPs oder MAMPs bezeichnet, werden durch PRRs erkannt und aktivieren die PTI. PRRs bestehen in der Regel aus einer extrazellulären Leucin-reichen Sequenzwiederholungs-Domäne (LRR, hellblau) und einer intrazellulären Kinasedomäne (rot). Viele PRRs interagieren mit BAK1 (brassinosteroid insensitive 1-associated kinase 1). Effektoren bakterieller Pathogene werden über ein Typ-III-Sekretionssystem in die Pflanzenzelle eingeführt, der Mechanismus der Internalisierung von Effektoren der Pilze und Oomyceten ist derzeit nicht vollständig geklärt. Intrazelluläre Effektoren unterdrücken die PTI, können jedoch durch NB-LRR-Rezeptoren erkannt werden, was zur ETI führt. NB-LRR-Proteine bestehen aus einer C-terminalen LRR-Domäne (hellblau), einer zentralen NB-Domäne (orange) die ATP oder ADP (gelb) binden kann, sowie einer N-terminalen TIR (Toll, Interleukin-1-Rezeptor) oder CC (coiled-coil)-Domäne (lila); nach (Dodds und Rathjen 2010).

1.4.4 Etablierung der phytopathogenen Interaktion

Um die phytopathogene Interaktion zu gewährleisten, muss ein biotropher Pilz die Pflanzenabwehr auf mehreren Ebenen unterbinden. Nach einer pflanzenseitigen Erkennung von PAMPs wird eine basale Abwehrreaktion in Gang gesetzt, welche jedoch durch sekretierte Effektorproteine unterdrückt wird. Resistenten Pflanzen gelingt durch die R-Gen-spezifische Erkennung dieser Effektoren wiederum die Abwehr des Pathogens durch Aktivierung der HR. Das Pathogen ist auf neue oder veränderte Effektoren angewiesen, die durch Umgehung oder Unterdrückung der R-Gen-spezifischen Abwehrreaktionen eine erfolgreiche Kolonisierung des Wirts ermöglichen (siehe Abbildung 7A). So führt das Wechselspiel von pflanzenseitiger Resistenzbildung und Resistenzunterdrückung durch Modifizierung des Effektor-Repertoires auf Seiten des Pathogens zu einer Co-Evolution von Pathogen und Wirtspflanze (siehe Abbildung 7B; Jones und Dangl 2006).

Betrachtet man die Abundanz sekretierter Proteine in phytopathogenen Pilzen, wird ihre Rolle in der biotrophen Interaktion deutlich. Genomanalysen von *U. maydis* offenbarten 386 sekretierte Proteine mit unbekannter Funktion (Müller *et al.* 2008b); der verwandte Basidiomycet *Sporisorium reilianum* besitzt ein ähnlich großes Repertoire (Schirawski *et al.* 2010). *Magnaporthe oryzae* weist mindestens 739 putativ sekretierte Proteine auf (Dean *et al.* 2005), und *Blumeria graminis* f.sp. *hordei* besitzt 248 Effektorkandidaten (Spanu *et al.* 2010). Die Rostpilze *Melampsora larici-populina* und *Puccinia graminis* f.sp. *tritici* zeigen vermutlich aufgrund von massiver Genomexpansion sogar 1184 bzw. 1105 Gene auf, welche für kleine sekretierte Proteine kodieren (Duplessis *et al.* 2011).

1.4.5 Effektorproteine in *Ustilago maydis*

Das Genom von *U. maydis* umfasst etwa 6900 Protein-kodierende Gene. Bioinformatische Analysen der Genomsequenz ermöglichten die Identifizierung von mindestens 426 sekretierten Proteinen (Kämper *et al.* 2006). Neuere Arbeiten beschreiben 168 sekretierte Proteine mit einer enzymatischen Funktion sowie 386 Proteine, denen bisher keine Funktion zugeordnet werden konnte (Müller *et al.* 2008b). Weiterführende Analysen der 386 sekretierten Proteine ohne Funktion ermöglichten die Identifizierung von 12 Genclustern, für 5 dieser Gencluster konnte eine Beteiligung an der Virulenz nachgewiesen werden (Kämper *et al.* 2006). Das Transmembranprotein Pit1 und der sekretierte Effektor Pit2, beide Teil eines Clusters sekretierter Pathogenitätsfaktoren, übernehmen eine Rolle in der erfolgreichen Unterdrückung der Pflanzenabwehr (Döhlemann *et al.* 2011). Es konnten weitere Effektoren beschrieben werden, die direkt oder indirekt an der Modulation der Pflanzenabwehr beteiligt sind. Die Deletion des sekretierten Effektors Pep1 verhindert die Proliferation von *U. maydis* nach Penetration der Epidermis aufgrund einer pflanzenseitig starken Induktion von Genen der Pflanzenabwehr (Döhlemann *et al.* 2009). Die sekretierte Chorismatmutase Cmu1 ist in der Lage, in Pflanzenzellen einzudringen, den metabolischen Status der Zelle zu ändern und so die erfolgreiche

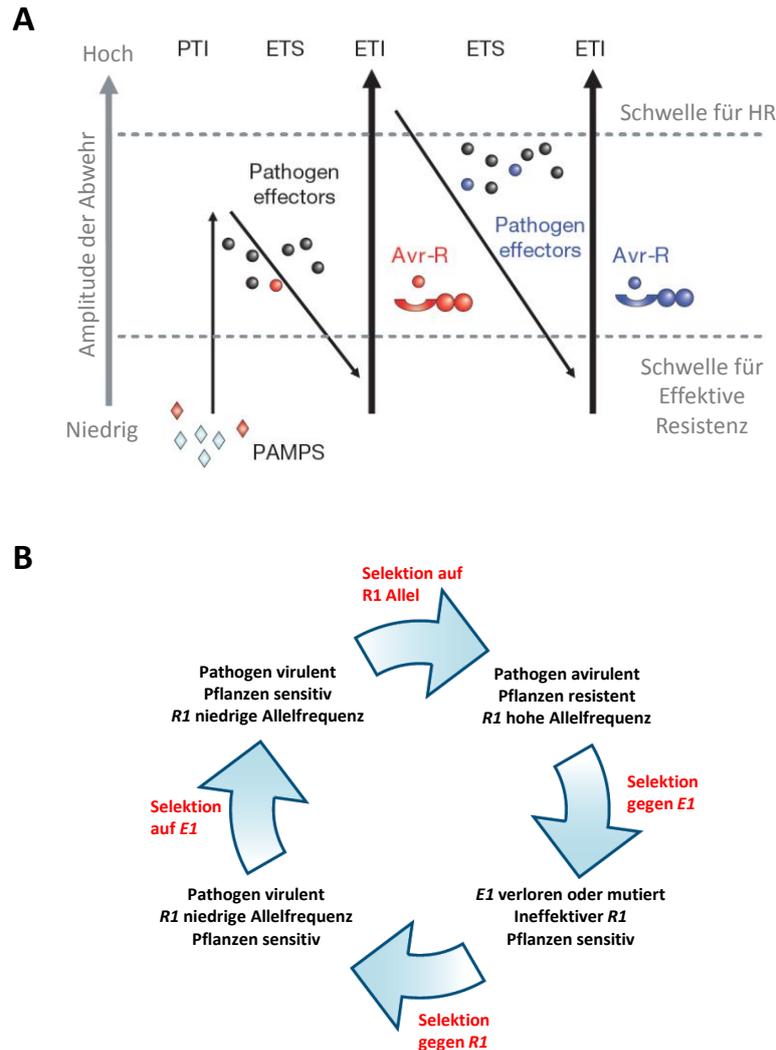


Abbildung 7: Schematische Darstellung der Amplitude der Pflanzenabwehr und Co-Evolution von R-Genen und Effektorproteinen. (A) Das „Zig-Zag-Modell“ der Amplitude der Pflanzenabwehr; In Phase I werden PAMPs (rotes Karo) durch PRRs erkannt, die PTI wird aktiviert. In Phase II kommt es durch eine erfolgreiche Applikation von Effektoren zur Unterdrückung der PTI (ETS, „effector triggered sensitivity“ oder Effektor-ausgelöste Sensitivität). In Phase III wird einer der Effektoren (angedeutet in rot) durch ein NB-LRR Protein erkannt, es folgt die ETI. Phase IV beschreibt die Selektion von Pathogenen, die den roten Effektor verloren oder beispielsweise durch horizontalen Gentransfer neue Effektorproteine erhalten haben; (Modifiziert nach Jones und Dangl 2006). (B) Ein Pathogen trägt ein Effektorgen E1, welches durch das seltene Allel R1 erkannt werden kann (oben). Daraus folgt eine erhöhte Allelfrequenz in der Population, Pathogene mit mutiertem Effektor werden selektiert, da sie auf R1-Pflanzen wachsen können (rechts). Die Effizienz von R1 lässt nach, auch weil einige R-Gene reduzierte Fitness aufweisen können (unten), dies resultiert in einem Rückgang der R1 Allelfrequenz. Die Population des Pathogens enthält weiterhin Individuen mit E1. In der Abwesenheit von R1 werden diese eine erhöhte Fitness aufweisen, die Allelfrequenz von E1 nimmt zu (links). Dies führt zu einem erneuten Anstieg von R1 (oben). In Populationen von Pflanzen und deren Pathogenen findet dieser Zyklus kontinuierlich mit einer Vielzahl von Effektoren und R-Genen statt; (Modifiziert nach Jones und Dangl 2006).

Kolonisierung der Pflanze zu unterstützen (Djamei *et al.* 2011). Die Biz1-regulierten Effektorproteine Pst1 und Pst2, sowie die Pst-ähnlichen Effektoren Plp1 und Plp3 spielen eine wichtige Rolle in der pathogenen Entwicklung von *U. maydis*, jedoch ist die genaue Funktion dieser Effektoren nicht vollständig aufgeklärt (Vranes 2006; Langner 2010; Hampel 2012). Trotz einer Fülle von aktuellen Untersuchungen bleiben die Funktionen des größten Teils sekretierter Proteine nach wie vor unbekannt.

1.5 Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit war die Identifizierung und Charakterisierung sekretierter Proteine mit einer Rolle in der frühen pathogenen Entwicklung des Maisbrandpilzes *Ustilago maydis*.

Der erste Teil dieser Arbeit beschäftigt sich mit der Rolle sekretierter Proteine an Adhäsionsvorgängen von *U. maydis*. Zu diesem Zweck sollten experimentelle Ansätze entwickelt werden, die eine qualitative und quantitative Erfassung von Adhäsionsvorgängen bei Sporidien und Filamenten ermöglichen. Unter Zuhilfenahme dieser sollte die Rolle der pathogenitätsrelevanten Transkriptionsfaktoren *biz1*, *hdp2* und *rbf1* in der transkriptionellen Regulation von Oberflächenadhäsion aufgeklärt werden. Zusätzlich sollte eine *de novo*-Identifizierung von Adhäsinen erfolgen. Dies sollte durch mehrere experimentelle Ansätze gewährleistet werden. Es sollte untersucht werden, ob eine direkte Identifizierung von Adhäsinkandidaten durch *in silico*-Analysen vorhandener Genomdatenbanken und Expressionsdaten möglich ist. Darauf aufbauend sollte analysiert werden, ob eine Deletion ausgewählter Kandidatengene mit einem Adhäsionsdefekt oder einer reduzierten Virulenz einhergeht. Zusätzlich sollte ein experimentelles System etabliert werden, welches die Isolierung von Adhäsingenen durch funktionelle Anreicherung gekoppelt mit einer heterologen Expression von *U. maydis*-Genen in *Saccharomyces cerevisiae* ermöglicht.

Im zweiten Teil dieser Arbeit steht die funktionelle Charakterisierung des sekretierten Effektors Plp2 im Vordergrund. Eine Reihe von *in vivo*-Studien sollten die Rolle des Effektorproteins in der pathogenen Entwicklung aufdecken. *in silico*-Analysen der Aminosäuresequenz von Plp2 und homologer Proteine aus *Sporisorium reilianum* und *Ustilago hordei* sollten zur Identifizierung funktionsrelevanter Proteindomänen dienen. Durch gezielte Mutation ausgewählter Domänen sollte deren Funktionalität in Komplementationsexperimenten untersucht werden. Expressionsanalysen sollten weitere Hinweise auf die Effektorfunktion liefern. Durch die Erstellung von Fusionsproteinen gekoppelt mit fluoreszenzmikroskopischen oder biochemischen Verfahren sollte die Lokalisierung des Plp2-Proteins während den biotrophen Entwicklungsstadien des Pilzes beschrieben werden.

Beide Teilaspekte dieser Arbeit sollten somit tiefere Einblicke in die funktionelle Vielfalt von sekretierten Proteinen und deren Rolle in der Etablierung der pathogenen Interaktion zwischen *U. maydis* und der Wirtspflanze *Zea mays* eröffnen.

2. Ergebnisse

Der erste Teil dieser Arbeit beschreibt eine Reihe von experimentellen Ansätzen zur Identifizierung und Charakterisierung von Proteinen mit einer Rolle in der Oberflächenadhäsion von *Ustilago maydis*. Der zweite Teil der Arbeit beschäftigt sich mit der Charakterisierung des sekretierten Effektorproteins Plp2 und dessen Rolle in der Etablierung der pathogenen Interaktion.

2.1 Charakterisierung von Adhäsionsvorgängen bei *Ustilago maydis*

Adhäsion ist ein zentraler Schlüsselpunkt für die Besiedelung eines Wirts durch einen pathogenen Organismus. Während Adhäsionsvorgänge in humanpathogenen Pilzen wie *Candida albicans* oder kommerziell relevanten Pilzen wie *Saccharomyces cerevisiae* bereits intensiv untersucht sind, gibt es nur wenige Arbeiten, die sich mit der Adhäsion phytopathogener Pilze beschäftigen. Ziel der folgenden Experimente war die Identifizierung putativer sekretierter Adhäsine beziehungsweise von Regulatoren der Adhäsionsexpression von *U. maydis*. Hierfür mussten zuerst Testsysteme etabliert werden, welche die Charakterisierung von Änderungen der Adhäsionsfähigkeit von Mutantenstämmen ermöglichen.

2.1.1 Abiotische hydrophobe Oberflächen ermöglichen Adhäsionstests für *S. cerevisiae* und *U. maydis*

Die Anhaftung von Pilzzellen an eine hydrophobe Oberfläche kann durch Verwendung einer hydrophoben Kunststoffoberfläche wie beispielsweise Polystyrol (PS) untersucht werden. Experimentell wird eine Flüssigkultur des zu untersuchenden Stammes auf eine Kunststoffoberfläche (meist eine Mikrotiterplatte oder Polystyrol-Petrischalen) appliziert und für einen definierten Zeitraum inkubiert. Nach Waschvorgängen anhaftende Zellen können mittels Kristallviolett-Färbung visualisiert werden. Mit dieser Methode ist es möglich, die Anhaftung von *S. cerevisiae*-Zellen und *U. maydis*-Sporidien beziehungsweise Filamenten an abiotische hydrophobe Oberflächen zu untersuchen (siehe Abbildung 8). Zusätzlich ergibt sich die Möglichkeit der mikroskopischen Analyse und somit der Quantifizierung von Adhäsionsvorgängen applizierter Kulturen. Ein weiterer Vorteil dieser Methode ist die Ähnlichkeit der Oberflächenbeschaffenheit einer abiotischen hydrophoben Kunststoffoberfläche zur hydrophoben Cuticula der Maispflanze. In einem solchen Test auf Adhäsion an hydrophobe Kunststoffoberflächen zeigten sowohl *S. cerevisiae* als auch *U. maydis* ein stammabhängig unterschiedliches Adhäsionsverhalten. In *S. cerevisiae* ist die Substratanhaftung hauptsächlich von der Expression des Flokkulins Flo11 abhängig, was die fehlende Adhäsion des

flo11Δ-Hefestamms zeigt. Bei der Beobachtung der Substratadhäsion von *U. maydis* zeigte sich eine starke Anhaftung vor allem bei dem solopathogenen Stamm SG200. Diese Anhaftung könnte teilweise auf die Bildung von Filamenten zurückzuführen sein. Für SG200-Derivate konnte bereits gezeigt werden, dass diese bei einer längeren Inkubation auf hydrophoben Kunststoffoberflächen Filamente ausbilden (Teertstra *et al.* 2006; Mendoza-Mendoza *et al.* 2009).

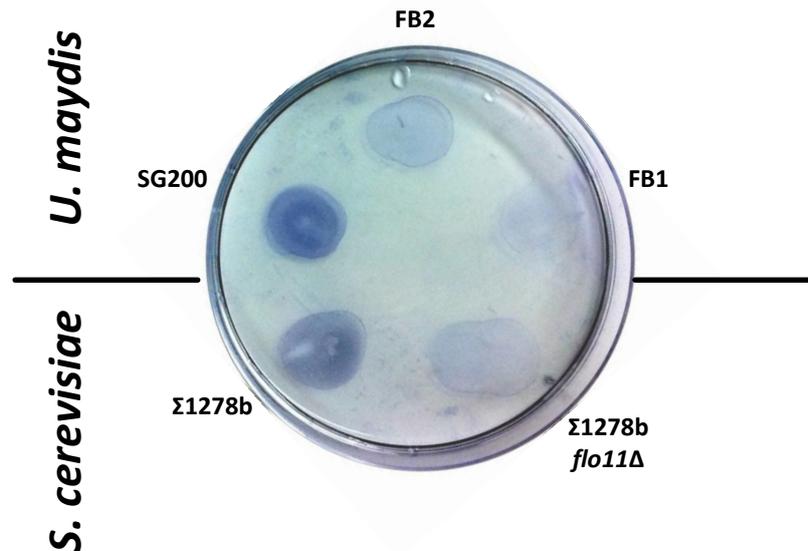


Abbildung 8: Polystyrol-Adhäsionstest für *S. cerevisiae*- und *U. maydis*-Stämme. Nach fünfstündiger Inkubation bei 28°C wurde die Polystyrol-Oberfläche der Petrischale mit einem mittelstarken Wasserfluss 10 Minuten lang überspült, verbliebene Zellen wurden mit Kristallviolett angefärbt. *flo11Δ*-Mutanten von *S. cerevisiae* zeigen die schwächste Oberflächenadhäsion, *S. cerevisiae*-Wildtypzellen hingegen bleiben zu einem großen Teil haften. Der *U. maydis*-Stamm FB1 zeigt die schwächste Anhaftung, FB2 zeigt eine etwas stärkere Adhäsion. Der solopathogene Stamm SG200, ein Derivat von FB1, zeigt hingegen eine starke Anhaftung.

2.1.2 *U. maydis*-Filamente haften an hydrophobe Oberflächen

Um die Anhaftung von *U. maydis* an eine hydrophobe Oberfläche zu untersuchen, wurden mittels eines Sprühgeräts Sporidien des solopathogenen haploiden Stammes SG200 auf eine hydrophobe Polytetrafluorethylen (PTFE)-Folie appliziert und 24 Stunden in einer 28°C warmen Feuchtekammer inkubiert. Unter diesen Bedingungen bilden SG200-Derivate auf der hydrophoben Oberfläche über 100 µm lange Filamente aus, welche mikroskopisch betrachtet werden können (siehe Abbildung 9). Zur Vereinfachung der mikroskopischen Untersuchung wurden fluoreszenzmarkierte SG200cfp und SG200yfp Sporidien verwendet, die im gleichen Verhältnis gemischt wurden. Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen nach 24 Stunden zeigten sowohl Sporidien als auch Filamente auf der hydrophoben Oberfläche. Ein Großteil der Sporidien befand sich in den Tropfen der applizierten Suspension, während viele der Filamente ein Wachstum aus diesen Tropfen heraus

aufzeigten (siehe Abbildung 9A). Mittels eines starken Wasserstroms wurden nicht-adhärenente Zellen von der Oberfläche abgewaschen. Hierbei wurden fast alle Sporidien entfernt, während ein Großteil der Filamente an der Oberfläche anhaftete. Außerdem war zu beobachten, dass durch das Waschen ein geringer Teil der Filamente seine Position änderte, was auf eine ungleiche Verteilung der Adhäsionsstärke über die Länge des Filaments hindeuten könnte (siehe Abbildung 9B). Eine generell fehlende Oberflächenadhäsion von Sporidien kann jedoch nicht postuliert werden, da experimentabhängig auch eine Adhäsion von Sporidien beobachtet werden konnte (siehe Abbildung 9C).

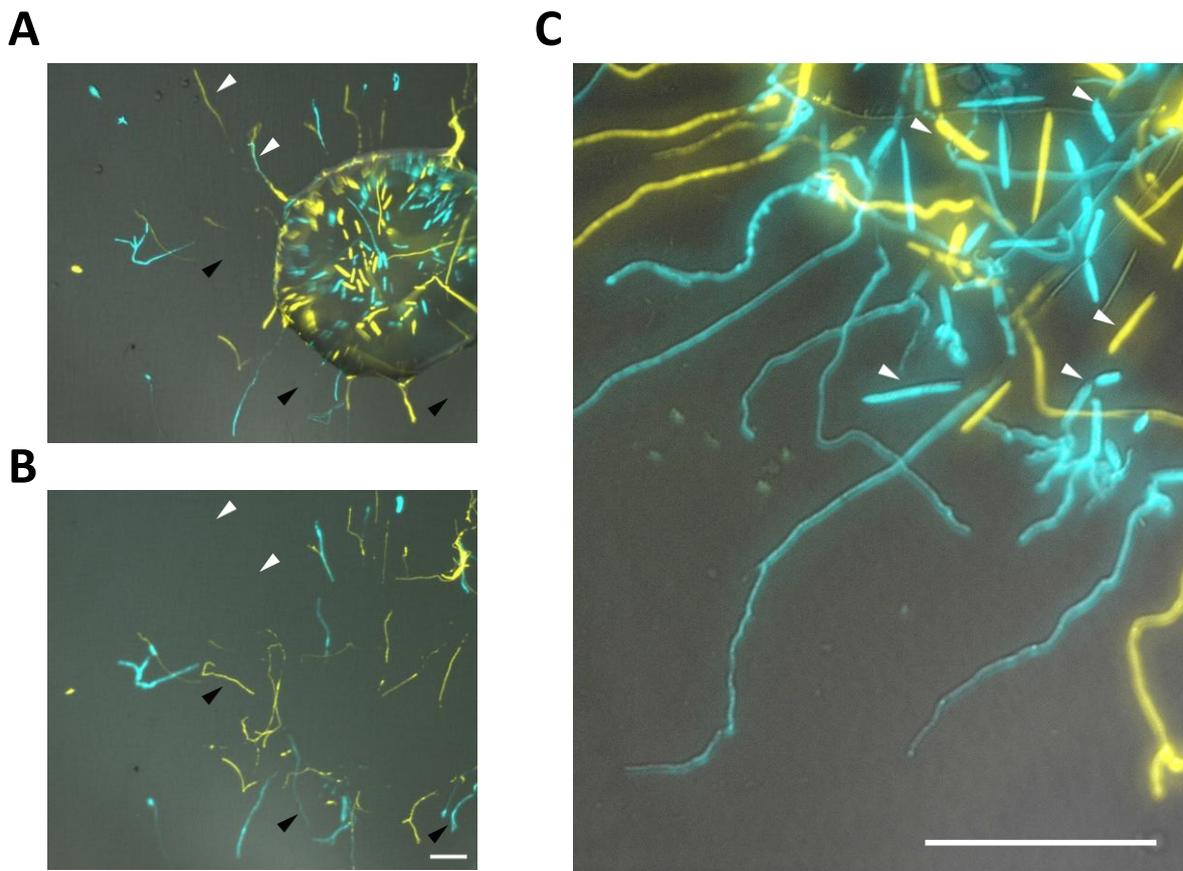


Abbildung 9: Fluoreszenzmikroskopische Analyse der Adhäsion von *U. maydis* an hydrophobe Oberflächen. *U. maydis*-Sporidien und Filamente nach 24h Inkubation auf einer hydrophoben (PTFE)-Oberfläche. Die verwendete *U. maydis*-Suspension bestand zu gleichen Teilen aus CFP- und YFP- markierten SG200-Zellen. Aufnahmen jeweils zusammengesetzt aus DIC-Kanal, YFP-Kanal (in gelb) und CFP-Kanal (in cyan) (A) *U. maydis*-Sporidien sind im Wassertropfen zu erkennen. *U. maydis*-Filamente wachsen meist aus dem Wassertropfen heraus. (B) Identischer Bildausschnitt zu A nach intensivem Waschen mit Wasser. Sporidien wurden fast vollständig abgewaschen, während ein Großteil der Filamente adhärert. Einige wenige Filamente wurden abgewaschen (weiße Pfeile) oder änderten ihre Position (schwarze Pfeile). (C) Eine weitere fluoreszenzmikroskopische Aufnahme. Hier sind nach dem Waschvorgang neben Filamenten auch eine Reihe adhärerender Sporidien zu beobachten (weiße Pfeile). Maßstabsbalken: 50µm.

2.1.3 Der komparative Filament-Adhäsionstest ermöglicht einen Vergleich der Adhäsionsstärke zweier *U. maydis*-Stämme

Die Verwendung fluoreszenzmarkierter Zellen ermöglicht den direkten Vergleich zweier unterschiedlicher Stämme unter identischen experimentellen Bedingungen. Für die folgenden Experimente wurden daher erneut die fluoreszenzmarkierten Stämme SG200cfp und SG200yfp verwendet. Um die Eignung dieser Stämme für komparative Experimente zu überprüfen, wurden Untersuchungen der Oberflächenadhäsion unter unterschiedlichen Nährstoffbedingungen durchgeführt. SG200cfp und SG200yfp aus axenischer Flüssigkultur wurden zuerst im jeweiligen Applikationsmedium (H₂O, PBS, MM-Minimalmedium, CM-Komplexmedium oder YEPS_L-Vollmedium) im gleichen Verhältnis gemischt. Vor der Applikation auf die hydrophobe Oberfläche wurde das SG200cfp/SG200yfp-Verhältnis überprüft. Hierfür wurden eine Reihe fluoreszenzmikroskopischer Aufnahmen der Suspension gemacht (Abbildung 10A) und mittels der Software Pixcavator (Student Edition) die absoluten Zellzahlen für SG200cfp und SG200yfp bestimmt. Diese dienen zur Berechnung des initialen SG200cfp/SG200yfp-Verhältnisses. Es folgte die Applikation der Zellen auf PTFE-Oberflächen und eine 24 Stunden umfassende Inkubation in einer Feuchtekammer bei 28°C. Nach intensiven Waschvorgängen wurden erneut fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der Filamente gemacht, die Anzahl der Filamente und das SG200cfp/SG200yfp-Verhältnis bestimmt (Abbildung 10B). Erwartungsgemäß zeigten sich in allen untersuchten Applikationsmedien nur geringe Änderungen des SG200cfp/SG200yfp-Verhältnisses (Abbildung 10C).

Eine Bestimmung der Adhäsionsfähigkeit von *U. maydis* war in allen untersuchten Medienbedingungen möglich. Es konnte jedoch beobachtet werden, dass die Länge und Anzahl ausgebildeter Filamente unter Mangelbedingungen, d.h. in H₂O und PBS, größer war als bei Anwesenheit von Nährstoffen wie in MM, CM und YEPS_L (Daten nicht gezeigt). Das Adhäsionsverhalten ist bei beiden Stämmen unter den unterschiedlichen Nährstoffbedingungen vergleichbar, für eine effiziente Ausbildung von Filamenten bei den verwendeten Stämmen sollten Mangelbedingungen bei der Applikation bevorzugt werden.

Wenngleich die absoluten SG200cfp/SG200yfp-Verhältnisse nur geringe Änderungen aufwiesen, zeigten sich größere Schwankungen bei vergleichbaren Einzelbestimmungen. Dies zeigt sich durch die verhältnismäßig hohe Standardabweichung der bestimmten SG200cfp/SG200yfp-Verhältnis-Mittelwerte (siehe Abbildung 10C). Der komparative Adhäsionstest ermöglicht qualitative Analysen von Adhäsionsvorgängen, eine quantitative Bestimmung ist jedoch nur eingeschränkt möglich.

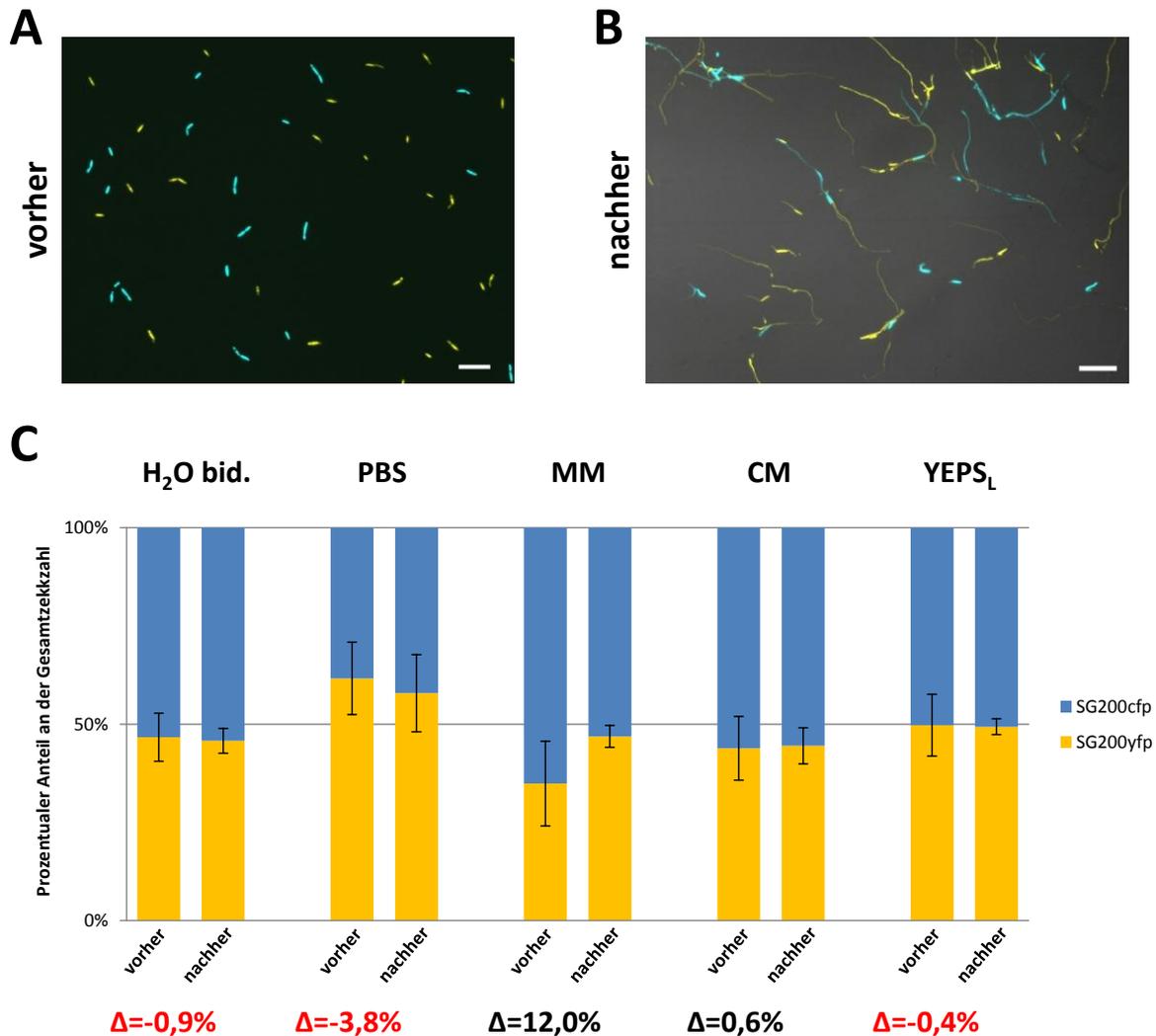


Abbildung 10: Komparativer Adhäsionstest für *U. maydis*-Filamente. (A) Das Verhältnis SG200cfp/SG200yfp vor Applikation auf die PTFE-Oberfläche wurde durch Auszählung der CFP- und YFP-Signale von 10 zufällig gewählten fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen (2,4 mm²) mittels Pixcavator (Student Edition) bestimmt; Aufnahmen zusammengesetzt aus CFP-Kanal (in cyan) und YFP-Kanal (in gelb). Zellzahlen variierten zwischen 100-500 ausgezählten Sporidien (B) Das Verhältnis der entsprechenden Filamente nach dem Waschvorgang wurde ebenfalls über Auszählung der CFP- und YFP-Signale von Filamenten mehrerer zufällig gewählter fluoreszenzmikroskopischer Aufnahmen (2,4 mm²) mittels Pixcavator (Student Edition) bestimmt; Aufnahmen zusammengesetzt aus DIC-Kanal, CFP-Kanal (in cyan) und YFP-Kanal (in gelb). Die Anzahl der Filamente variierte zwischen 1700-2500. (C) Gegenüberstellung der Zellverhältnisse SG200cfp(blau)/SG200yfp(gelb) vor Applikation und nach 15 minütigem Waschen von 24h alten Filamenten auf einer PTFE-Oberfläche. Die Applikation der *U. maydis*-Sporidien geschah sowohl in H₂O und PBS als auch in den Wachstumsmedien MM (Minimalmedium), CM (Komplexmedium) und YEPS_L (Vollmedium). Die absolute Änderung des Verhältnisses (Δ) ist in schwarz für positive und rot für negative Änderungen dargestellt.

2.1.4 Der komparative Adhäsionstest initialer Sporidienanhaftung zeigt Gemeinsamkeiten und Unterschiede bei den verwendeten *U. maydis*-Stämmen auf

Die Anhaftung von *U. maydis*-Sporidien an hydrophobe Oberflächen ist nicht reproduzierbar zu beobachten (Daten nicht gezeigt). Um Einblicke in die Sporidienadhäsion zu gewinnen, wurde zuerst ein vergleichender Adhäsionstest durchgeführt. SG200cfp- und SG200yfp-Sporidien wurden im

gleichen Verhältnis gemischt und im zehnmütigen Abstand unter unterschiedlichen Nährstoffbedingungen auf PTFE-Folie appliziert. Nach 60 min wurde intensiv mit Wasser gewaschen. Anschließend wurden durch fluoreszenzmikroskopische Analyse die absoluten Zellzahlen für SG200cfp und SG200yfp für die einzelnen Zeitpunkte bestimmt und gegenübergestellt (Abbildung 11). SG200cfp- und SG200yfp-Sporidien zeigten in diesen Experimenten bereits nach zehn Minuten eine Anhaftung an die hydrophobe Oberfläche. Die Anzahl adhärenter Zellen des Stammes SG200yfp stieg dabei unabhängig vom Applikationsmedium linear an und beträgt nach 60 Minuten etwa 200 bis 450. Interessanterweise verhielten sich SG200yfp- und SG200cfp-Zellen nicht identisch. SG200cfp-Zellen adhärten ebenfalls nach zehn Minuten und zeigten einen linearen Anstieg der Zellzahl innerhalb der ersten 60 Minuten, die absolute Zahl haftender Sporidien pro zehn Minuten Inkubation schien jedoch abhängig vom verwendeten Medium zu sein. Während in H₂O bid. und CM die Zahl haftender SG200cfp-Sporidien nach 60 Minuten mit der der SG200yfp Zellen vergleichbar war (jeweils etwa 250), waren in PBS und den Medien MM und YEPS_L nach 60 Minuten deutlich weniger SG200cfp-Zellen im Vergleich zu SG200yfp zu beobachten. Zu diesem Zeitpunkt war unklar, ob dieser Unterschied auf experimentelle Fluktuationen oder auf Unterschiede im Adhäsionsverhalten der beiden Stämme zurückzuführen ist. Um einen tieferen Einblick in die beobachteten Adhäsionsunterschiede zu gewinnen musste ein Adhäsionstest etabliert werden, der eine quantitative und reproduzierbare Bestimmung von Adhäsionsvorgängen ermöglichen kann.

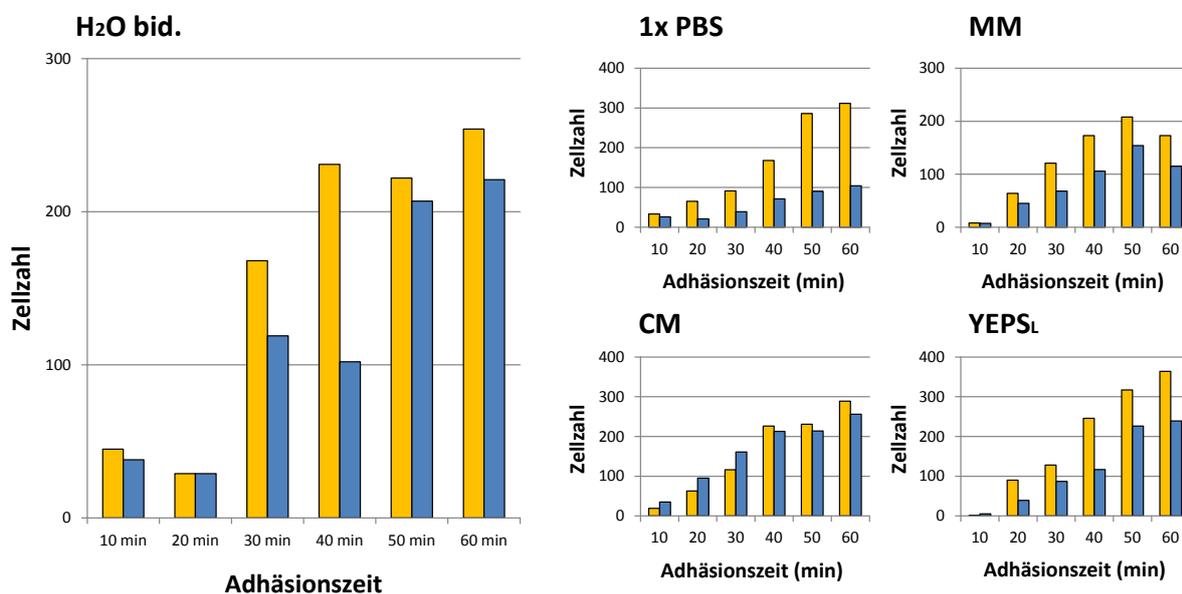


Abbildung 11: Komparativer Adhäsionstest für initiale Anhaftung von *U. maydis*-Sporidien. Es wurden die Zellzahlen von SG200cfp- (blau) und SG200yfp-Sporidien (gelb) nach einer Inkubationszeit von 10-60 min und anschließendem 15 minütigem Waschen auf einer PTFE-Oberfläche bestimmt. Die Applikation der *U. maydis*-Sporidien geschah sowohl in H₂O und PBS als auch in den Wachstumsmedien MM (Minimalmedium), CM (Komplexmedium) und YEPS_L (Vollmedium). Absolute Sporidienzahlen nach dem Waschen wurden mittels einer repräsentativen mikroskopischen Aufnahme (2,4 mm²) mit Pixcavator (Student Edition) bestimmt.

2.1.5 Die Verwendung einer Flusskammer ermöglicht die Beobachtung von Adhäsionsvorgängen unter definierten Bedingungen

Kommerziell erhältliche Flusskammern wie die „Parallel Plate Flow Chamber“ von Glycotech ermöglichen eine mikroskopische Betrachtung von Zellen in einem geschlossenen mikrofluiden Durchflusssystem. Durch Bestimmung der Flussrate mittels einer an das System angeschlossenen Peristaltikpumpe kann das Adhäsionsverhalten im System eingebrachter Zellen an ein frei wählbares Substrat untersucht werden. Die spezifische Oberflächenscherkraft τ_w kann durch Variation der Flusskanalgröße (abhängig von der verwendeten Dichtung) oder der Durchflussrate des Mediums exakt eingestellt werden (siehe Abbildung 12A). Die volumetrische Flussrate der verwendeten Peristaltikpumpe ist abhängig von der stufenlos einstellbaren Pumpengeschwindigkeit, daher wurde zuerst die Flussrate in Abhängigkeit der gewählten Einstellung bestimmt (siehe 4.4). Je nach verwendeter Dichtung (siehe Tabelle 1) ergeben sich somit frei wählbare Oberflächenscherkräfte von unter 10 bis weit über 120 $\mu\text{N}/\text{cm}^2$ (siehe Abbildung 12B). Für alle in dieser Arbeit durchgeführten Experimente wurde die Dichtung D verwendet, die Flussrate der Medien wurde, falls nicht gesondert beschrieben, während der Experimente konstant gehalten.

A

$$\tau_w = \mu \gamma = 6 \mu Q / a^2 b$$

τ_w	= Scherung
γ	= Scherrate, (1 / s)
μ	= Viskosität des Mediums
a	= Höhe des Flusskanals (cm)
b	= Breite des Flusskanals (cm)
Q	= Volumetrische Flussrate

B

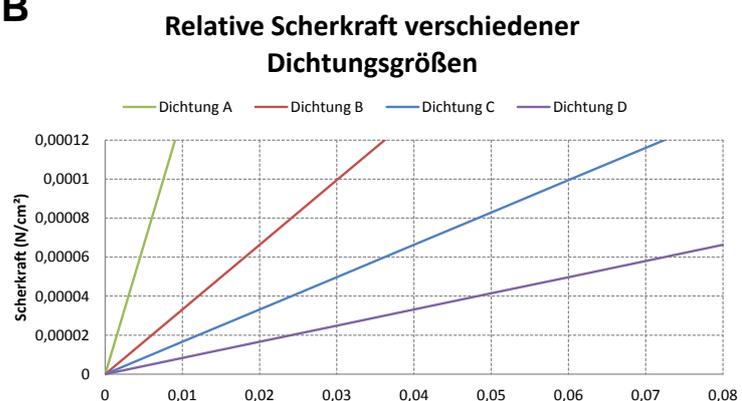
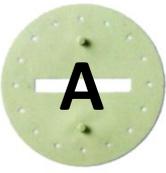
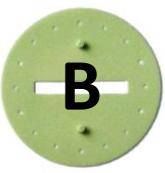
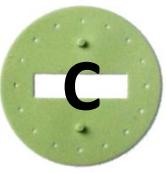


Abbildung 12: Bestimmung von volumetrischer Flussrate und Scherkraft im Flusskammersystem. (A) Berechnung der Schubspannung τ_w , also der Kraft, die im System auf die gegebene Fläche wirkt, in Bezug auf die gegebenen Parameter; Formel nach Glycotech FlowChamber Gebrauchsanweisung. (B) Grafische Darstellung der relativen Schubspannung in Abhängigkeit von der Dichtungsgröße und Flussrate (rechts).

Tabelle 1: Verfügbare Dichtungsgrößen für das Flusskammersystem.

Dichtung				
Höhe des Flusskanals a (cm)	0,0127	0,0254	0,0254	0,0254
Breite des Flusskanals b (cm)	0,25	0,25	0,5	1,0

2.1.6 Flusskammer-Adhäsionstests zeigen unipolare Adhäsion von *U. maydis*-Sporidien

Exemplarisch wurde die PTFE-Adhäsion von *U. maydis*-Sporidien des Stammes SG200 im Flusskammersystem untersucht. Zellen wurden hierfür in YEPS_L Flüssigmedium angezogen, in der logarithmischen Wachstumsphase mit H₂O bid. gewaschen und in H₂O bid. mit einer OD₆₀₀ von 0,2 in die Flusskammer eingebracht. Die Zellen wurden eine Stunde stehend inkubiert, anschließend wurden mit einer Scherkraft von 6,5 µN/cm² für fünf Minuten nicht-haftende Zellen entfernt (siehe Abbildung 13A). Hierbei war zu erkennen, dass die Anhaftung von Sporidien unipolar erfolgt, da alle beobachteten Sporidien sich an einem einzigen Punkt am Pol der Zelle um die eigene Achse in Richtung des Wasserflusses drehten. Dies wird in einer Zeitreihe deutlich, die aus mikroskopischen Aufnahmen erstellt wurde (siehe Abbildung 13B). Hierfür wurde nach dem Entfernen nicht-anhaftender Zellen ein Foto eines repräsentativen Teilbereichs der Flusskammer mikroskopisch aufgenommen. Es wurde erneut durch einen definierten Wasserfluss eine Scherkraft von 13 µN/cm² angelegt und nach fünf Minuten wiederum eine mikroskopische Aufnahme getätigt. Nach Erhöhung der Scherkraft auf 20 µN/cm² und weiterer fünf Minuten Wasserfluss wurde eine dritte mikroskopische Aufnahme getätigt. Die Betrachtung der Sporidien in diesen Bildausschnitten zeigt deutlich, dass Sporidien an einem einzelnen Punkt adhären und um diesen Punkt je nach Richtung des Wasserflusses frei drehbar scheinen (siehe rote Markierungen, Abbildung 13B). Nach weiteren Waschschritten bis hin zu der für die verwendete Kombination aus Dichtungsgröße und Peristaltikpumpe maximalen Scherkraft von 65µN/cm² hafteten alle beobachteten Sporidien weiterhin an (Daten nicht gezeigt).

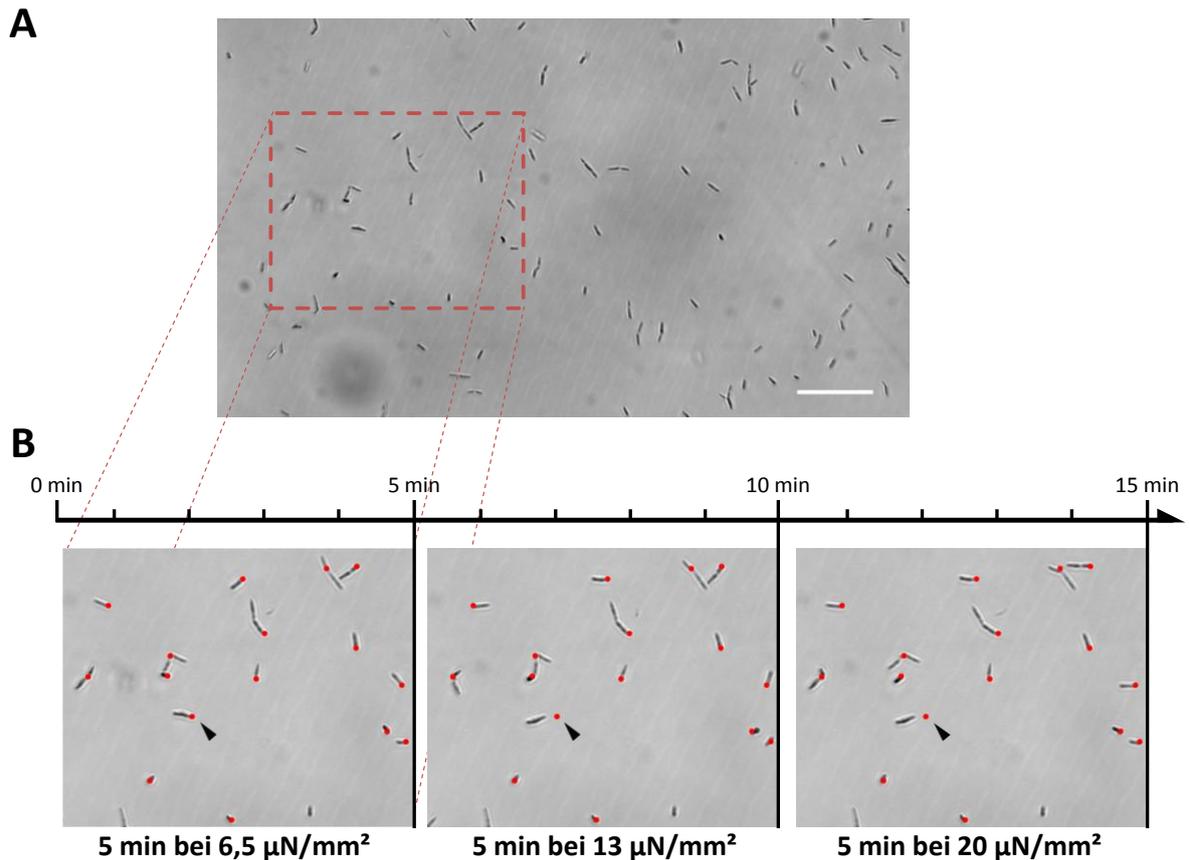


Abbildung 13: Lichtmikroskopische Betrachtung von *U. maydis* SG200-Sporidien, die in der Flusskammer an PS anhaften. (A) Durch fünfminütiges Spülen mit H₂O bid. und einer Scherkraft von 6,5 $\mu\text{N}/\text{mm}^2$ wurden nicht anhaftende Zellen entfernt und der Bildausschnitt festgehalten. Ein großer Teil der betrachteten Sporidien haftete lediglich mit einem Zellpol, was im Wasserfluss durch ein Wackeln der Sporidien deutlich wurde. Maßstabsbalken = 100 μm . (B) Ausschnitt aus Bild (A) zur Visualisierung der unipolaren Anhaftung. Es wurden weitere fünfminütige Spülgänge durchgeführt, die Scherkraft wurde sukzessive erhöht und mikroskopische Aufnahmen getätigt. Die Adhäsion fast aller beobachteten Sporidien konzentrierte sich auf einen Punkt, dieser befand sich an einem der beiden Zellpole (rote Fixpunkte). In einem Fall war eine Ablösung und Wiederanhaftung einer Sporidie zu beobachten (schwarzer Pfeil).

2.1.7 Der Flusskammer-Adhäsionstest zeigt fehlende Sporidienadhäsion unter optimalen Wachstumsbedingungen

Weitere Flusskammer-Adhäsionstests mit SG200-Sporidien deuteten starke Schwankungen der Anzahl anhaftender Sporidien an; in einigen Experimenten hafteten nur sehr wenige Sporidien, in anderen Experimenten zeigten fast 90% der Zellen eine Oberflächenadhäsion (Daten nicht gezeigt). Um die Gründe für diese Schwankungen aufzudecken, wurden SG200-Zellen unter optimalen Wachstumsbedingungen mit Zellen unter nicht-optimalen Wachstumsbedingungen verglichen. Optimal bedeutet in diesem Zusammenhang, dass die auf Festmedien kultivierten Ausgangskulturen, von welchen die Vorkulturen für Adhäsionsexperimente angeimpft wurden, nicht länger als zwei Tage und in dieser Zeit nie unter 28 °C inkubiert wurden. Nach zwei Tagen wurden solche Kulturen direkt auf eine neue Medienplatte überstrichen, sodass möglichst optimale Wachstumsbedingungen über den gesamten Wachstumszeitraum gegeben waren. Nicht-optimale Bedingungen bedeutet in diesem Fall,

dass die Ausgangskulturen auf dem Festmedium nach der 2-tägigen Inkubation für ein- oder mehrere Tage bei 4 °C aufbewahrt wurden und hiervon die Vorkulturen für Adhäsionstests angeimpft wurden. Von derartigen Ausgangskulturen angeimpfte Vor- und Hauptkulturen für Adhäsionstests wurden regelmäßig fotometrisch auf ihre Zelldichte überprüft und bei Bedarf mit vorgewärmtem Medium verdünnt, um konstante Wachstumsbedingungen und ein durchgängig logarithmisches Wachstum der Sporidien zu gewährleisten.

Die Anzahl adhärerender Zellen aus solchen Kulturen wurde in der Flusskammer nach einer Adhäsionszeit von einer Stunde und einer Waschzeit von 15 Minuten mit einer definierten Scherkraft von 10, 16, 25 oder 38 $\mu\text{N}/\text{cm}^2$ bestimmt. Es zeigte sich, dass von einer stationären Kultur angeimpfte Zellen teilweise ein deutlich höheres Adhäsionspotential aufwiesen als Sporidien unter optimalen Wachstumsbedingungen (siehe Abbildung 14). Der prozentuale Anteil anhaftender Zellen schwankte jedoch beträchtlich von unter 10% bis hin zu teilweise 90%. Logarithmisch wachsende Zellen hingegen, die in den letzten 48 Stunden keine stationäre Phase durchlaufen hatten, also unter optimalen Bedingungen herangezogen wurden, zeigten in der Regel nur geringe Adhäsionsfähigkeit. Dieser Effekt trat bei allen untersuchten Scherkräften auf (siehe Abbildung 14A).

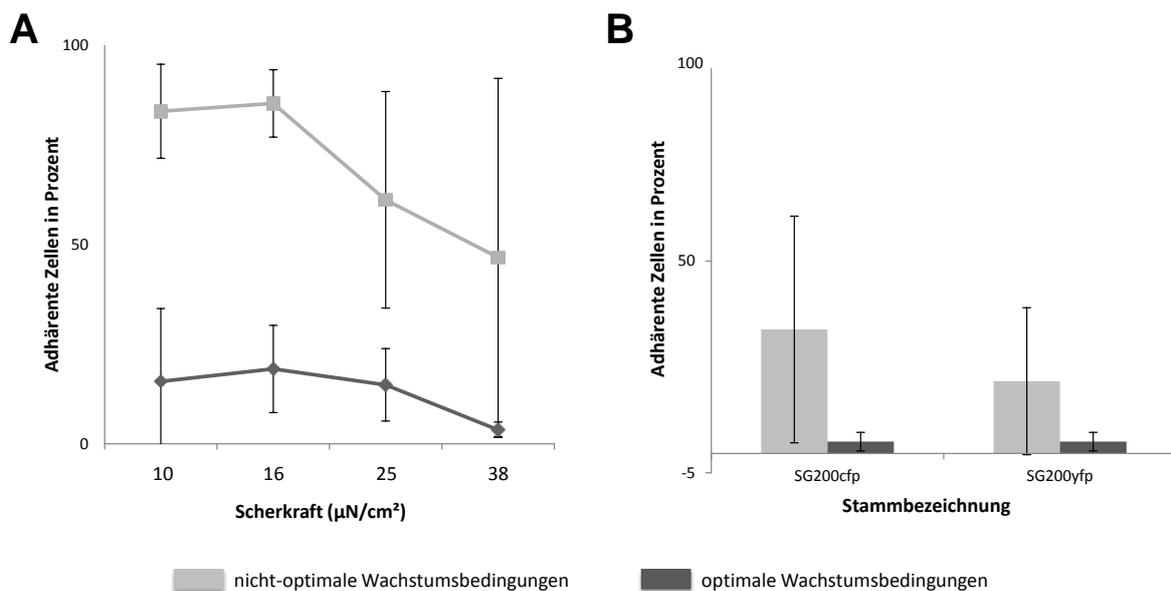


Abbildung 14: Adhäsionsexperimente im Flusskammersystem mit *U. maydis* SG200-Sporidien. (A) Bestimmung der absoluten Anzahl adhärenter Zellen nach 1h Ruhe in Abhängigkeit der für 15 min angelegten Scherkraft. Unter nicht-optimalen Bedingungen zeigen *U. maydis*-Sporidien teils starke Adhäsion, aber auch große Abweichungen der Messergebnisse. Unter optimalen Wachstumsbedingungen zeigen Zellen deutlich schwächere Adhäsion. Angaben in Prozent. (B) Bestimmung der Adhäsion von SG200cfp- und SG200yfp-Sporidien in Abhängigkeit von Wachstumsbedingungen nach 1h Ruhe und 15 min andauernder Scherkraft von 25 $\mu\text{N}/\text{cm}^2$. Auch hier zeigt sich ein starker Einfluss der Anzuchtbedingungen auf die Adhäsionsfähigkeit, nicht-optimale Wachstumsbedingungen begünstigen teilweise eine stärkere Adhäsion, jedoch unter Verlust der Reproduzierbarkeit. Angaben in Prozent.

Analog hierzu wurden auch die Stämme SG200cfp und SG200yfp auf ihre Adhäsionsfähigkeit in der Flusskammer unter optimalen und nicht-optimalen Wachstumsbedingungen untersucht, wiederum zeigten sich sowohl stärkere Adhäsion als auch größere Schwankungen der Messwerte unter nicht-

optimalen Bedingungen, während Adhäsion unter optimalen Wachstumsbedingungen fast vollständig ausblieb (siehe Abbildung 14B). Die Daten belegen, dass *U. maydis*-Sporidien aus optimalen Wachstumsbedingungen in einer Flusskammer nicht zur Adhäsion an hydrophobe Oberflächen neigen. Der Flusskammeradhäsionstest ermöglicht demnach nicht die gewünschte Quantifizierung von Adhäsionsereignissen bei *U. maydis*-Sporidien und kann lediglich als Ergänzung komparativer Untersuchungen verwendet werden. Im Rahmen der verwendeten Experimente konnte nicht geklärt werden, unter welchen Voraussetzungen *U. maydis*-Sporidien an einem Substrat anhaften können. Eine Untersuchung der Filamentadhäsion in der Flusskammer war nicht möglich, da die Bildung von Filamenten von *U. maydis* unter Flusskammerbedingungen nicht zu beobachten war (Daten nicht gezeigt).

2.2 Identifizierung und Charakterisierung von Adhäsinen und putativen Regulatoren der Adhäsion

2.2.1 *in silico*-Identifizierung neuer Adhäsine in *U. maydis*

Neben ihrer funktionellen Diversität sind Adhäsine oft redundant und weisen geringe Sequenzkonservierung untereinander auf. Dies erschwert eine bioinformatische Identifizierung von Adhäsinen auch in der Post-Genomischen Ära. Für die *in silico*-Identifizierung neuer Adhäsine wurden daher unterschiedliche Herangehensweisen gewählt. Zuerst wurde versucht, Adhäsine im Sekretom von *U. maydis* anhand Adhäsintypischer struktureller Eigenschaften zu identifizieren. Im zweiten Ansatz wurden putative Adhäsine durch Homologie zu bekannten Adhäsinen oder deren Regulatoren isoliert. Ein dritter Ansatz ermöglichte mithilfe von Expressionsdaten die Bestimmung der *b*-unabhängig auf der Pflanzenoberfläche am stärksten regulierten sekretierten Proteine.

2.2.1.1 Identifizierung durch Proteinstrukturanalysen

Von den 386 sekretierten Proteinen unbekannter Funktion des *U. maydis*-Genoms weisen insgesamt fünfzehn Proteine Sequenzwiederholungen auf Aminosäureebene auf (Müller *et al.* 2008b). Sequenzwiederholungen sind charakteristisch für eine Reihe struktureller Adhäsine. Zusätzlich umfasst diese Liste die bereits als Adhäsions- bzw. Pathogenitätsfaktoren beschriebenen Proteine Rep1, Hum3, Rsp1, und Rsp2. (siehe Abbildung 15). Ein Vergleich der Expressionswerte der übrigen Kandidaten dieser Liste ermöglichte die Identifizierung von Proteinen mit Sequenzwiederholungen, deren Expression zu Beginn der pathogenen Entwicklung induziert wird (Tabelle 2). Insgesamt wurden fünf Kandidatengene ausgewählt. *um03065* weist 16 Stunden nach der Infektion eine starke Induktion in solopathogenen SG200-Stämmen auf, während die Expression in FB1 zu diesem Zeitpunkt gering bleibt. Ähnlich verhält es sich mit *um00466*, welches in den Bayer Crop Science

Annotationen des *U. maydis*-Genoms als putatives „Salivary Glue Protein SGS-3“, ein Adhäsion aus *Drosophila melanogaster*, annotiert ist. Die Kandidatengene *um00480*, *um04248* und *um05104* fallen durch eine starke Induktion 16 Stunden nach Infektion sowohl in SG200 als auch in FB1 auf. Bei *um00480* und *um05104* geht die Expressionsstärke mit fortschreitender pathogener Entwicklung zurück. Dies könnte ein Hinweis auf eine Adhäsionsfunktion der Genprodukte sein, da solche innerhalb der Pflanze vermutlich nicht benötigt werden.

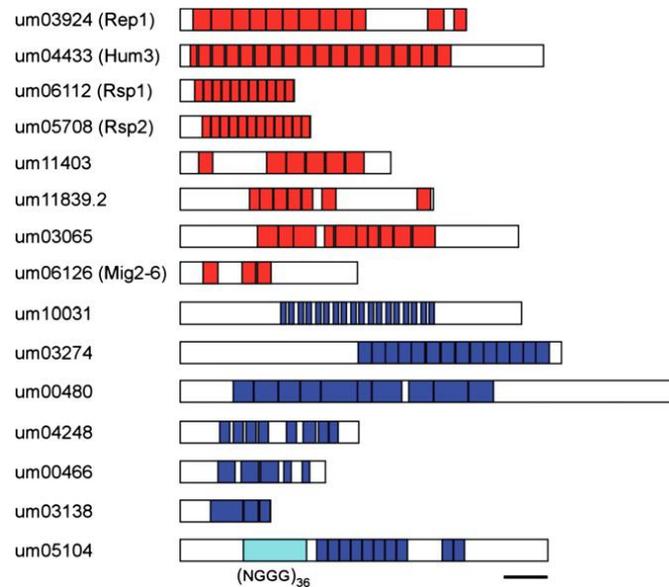


Abbildung 15: Auflistung sekretierter Proteine mit Sequenzwiederholungen. Schematische Darstellung der 15 Proteine mit mindestens drei internen Sequenzwiederholungen und ohne annotierte enzymatische Funktion. Sequenzwiederholungen in acht Proteinen (rot) sind durch putative Kex2-Protease-Spaltstellen voneinander getrennt, in sieben Proteinen waren keine entsprechenden Proteasespaltstellen erkennbar (blau). Angezeigte Sequenzwiederholungen kommen nicht in anderen beschriebenen Proteinen vor. Größenunterschiede zwischen Sequenzwiederholungen resultieren aus Deletionen oder Insertionen. Der hellblaue Bereich zeigt einen Bereich Glycin-reicher vier-Aminosäuren-Sequenzwiederholungen an. Größenstandard (schwarzer Balken) entspricht 100 Aminosäuren. Nach (Müller *et al.* 2008b).

Tabelle 2: Zusammenstellung der Expressionswerte sekretierter Proteine mit Sequenzwiederholungen.

MUMDB Accession Numer ^a	Probe Set ^b	Annotation des MIPS ^c	FB1 Pflanzen- oberfläche 16 hpi ^d	SG200 Pflanzen- oberfläche 16 hpi ^e	FB1xFB2 Tumor 5 dpi ^f	FB1xFB2 Tumor 5 dpi ^g	FB1xFB2 Tumor 5 dpi ^h
um03924	W120um002G_at	Rep1 – repellent protein 1 precursor	4311,1	7757,1	7941,7	7561,5	10063,8
um04433	W55um030G_at	Hum3 – hydrophobin 3	n/a*	n/a*	n/a*	n/a*	n/a*
um06112	W65um035G_at	hypothetical protein (Rsp1)**	n/a*	n/a*	n/a*	n/a*	n/a*
um05708	W10um151G_at	hypothetical protein (Rsp2)*	5527,0	8400,9	885,0	7493,3	11925,9
um11403	W70um006G_at	conserved hypothetical protein	1474,8	24,2	n/a*	n/a*	222,9
um11839	W110um094G_at	hypothetical protein	n/a*	n/a*	n/a*	n/a*	n/a*
um03065	C15um117G_at	putative protein	68,2	4721,5	n/a*	n/a*	n/a*
um06126	W11um267G_at	Mig2.6	n/a*	833,3	12452,1	7095,2	4509,6
um10031	C15um098G_at	related to embryonic protein DC-8	1441,1	111,2	163,4	180,4	424,9
um03274	C25um079G_at	conserved hypothetical protein	n/a*	242,4	4599,3	2316,4	1649,1
um00480	C82um028G_at	Msb2 – transmembrane mucin involved in surface sensing via MAP-kinase cascade	739,3	1504,2	412,2	514,9	556,1
um04248	W60um167G_at	putative protein	154,2	454,8	n/a*	n/a*	n/a*
um00466	W55um164G_at	hypothetical protein (SGS3-precursor***)	34,0	281,1	n/a*	22634,2	28246,9
um03138	C95um083G_at	hypothetical protein	93,1	102,1	238,4	4057,8	2222,1
um05104	W60um134G_at	putative protein	6856,7	9095,2	271,4	307,5	1816,5

^a Accession-Nummer des MIPS (Stand Februar 2012).

^b Bezeichnung des Probe Sets, das eine Identifizierung der auf den DNA-Microarrays enthaltenen Gene erlaubt.

^c Annotation des MIPS (Stand Februar 2012).

^d Relative Expressionswerte des jeweiligen Gens (Mittelwert aus 3 biologischen Replikaten) auf der Pflanzenoberfläche in FB1, 16 h nach Infektion.

^e Relative Expressionswerte des jeweiligen Gens (Mittelwert aus 3 biologischen Replikaten) auf der Pflanzenoberfläche in SG200, 16 h nach Infektion.

^f Relative Expressionswerte des jeweiligen Gens (Mittelwert aus 3 biologischen Replikaten) in der Pflanze in FB1xFB2-Kreuzungen, 5 Tage nach Infektion.

^g Relative Expressionswerte des jeweiligen Gens (Mittelwert aus 3 biologischen Replikaten) in der Pflanze in FB1xFB2-Kreuzungen, 9 Tage nach Infektion.

^h Relative Expressionswerte des jeweiligen Gens (Mittelwert aus 3 biologischen Replikaten) in der Pflanze in FB1xFB2-Kreuzungen, 13 Tage nach Infektion.

* Expressionsdaten nicht statistisch signifikant.

** Identifizierung durch (Müller *et al.* 2008a).

*** Annotation nach Bayer Crop Science

Ausgewählte Kandidatengene sind rot markiert

2.2.1.2 Identifizierung durch Sequenzdatenbankenanalyse

Eine Identifizierung von *Candida albicans*-Adhäsinen für eine anschließende Homologiesuche wurde mittels der *Candida*-Genomdatenbank (<http://www.candidagenome.org/>) durchgeführt. Ausgewählte Proteine der Zelloberfläche gehörten der ALS Familie (Agglutinin-ähnliche Sequenz) an, diese umfasst die Proteine ALS1 bis ALS7, ALS9-1 und ALS9-2 sowie ALS10, ALS11 und ALS12 (De Groot *et al.* 2003; Hoyer *et al.* 2008). Ebenso wurden die Zellwandproteine Wsc1 und Pry1 gewählt (De Groot *et al.* 2003; Sorgo *et al.* 2010). Die Identifizierung von Proteinomologen in *Ustilago maydis* geschah mittels BLASTP-Algorithmus (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Identifizierte homologe *U. maydis*-Proteine mit strukturellen Ähnlichkeiten zu Adhäsinen wurden mittels SignalP 4.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) und SecretomeP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SecretomeP/>) auf eine extrazelluläre Lokalisierung untersucht, und ein Vergleich der Expressionsprofile ermöglichte die Identifizierung von auf der Pflanzenoberfläche induzierten Kandidaten. Es wurden die Kandidaten Um01204, Um01513 und Um04211 gewählt, da es sich um sekretierte Proteine unbekannter Funktion handelt, welche in der pathogenen Entwicklung induziert sind. Auf eine Untersuchung identifizierter Glukosidasen und Proteasen wurde in dieser Arbeit verzichtet. Eine Zusammenfassung der Ergebnisse findet sich in Tabelle 3.

MUMDB Accession Nummer	probe set	MUMDB Annotation	Sekretions- signal	FBI 16 hpi Pflanzen- Pflanzenoberfläche	SG200 16 hpi Pflanzenoberfläche	FB1xFB2 5 dpi Tumor	FB1xFB2 9 dpi Tumor	FB1xFB2 13 dpi Tumor
um05361	W90um063G_at	related to Laccase I precursor	ja	34,0	37,8	102,2	2477,4	1202,6
um00454	W106um164G_at	related to MCD4 - sporulation protein	nein	368,3	365,4	604,4	658,5	700,9
um11988	W40um218G_at	putative protein	ja	4,9	5,8	21,3	22,7	19,4
um11546	C75um112G_at	conserved hypothetical protein	nein	332,1	455,1	677,3	783,7	727,6
um11266	C140um107G_at	probable lysophospholipase (pl)	ja	348,1	219,1	537,9	1295,7	1530,9
um01204	W50um018G_at	related to PRY1 - strong similarity to the plant PR-1 class of pathogen related proteins	ja	35,7	63,8	106,9	133,9	173,5
um01165	C85um108G_at	related to Glucan 1,3-beta-glucosidase precursor	nein	4,4	5,4	21,5	19,2	38,55
um10029	W75um022G_at	related to Glucan 1,3-beta-glucosidase precursor	nein	287,9	174,5	269,0	252,8	346,0
um10211	C35um063G_at	related to EXG1 - exo-beta-1,3-glucanase (II), major isoform	nein	264,0	155,0	92,5	237,3	263,8
um02178	C50um157G_at	related to aspartic protease	ja	241,7	94,8	135,2	324,3	625,3
um11427	UG13-15p13-73e11 RC at	related to SYF2 - pre-mRNA-splicing facto	nein	166,6	417,7	230,8	1538,7	4851,7
um00876	C30um020G_at	related to SPR1 - exo-1,3-beta-glucanase precursor	ja	207,7	2671,3	73,2	2224,2	5470,5
um01513	C30um024G_at	putative protein	ja	1808,9	2452,1	542,2	1079,0	2320,5
um04368	C150um145G_at	related to endo-1,3(4)-beta-glucanase	ja	159,3	177,4	50,9	33,8	261,0
um05054	C45um034G_at	conserved hypothetical protein	nein	99,8	101,6	82,5	80,1	103,5
um01089	C90um037G_at	related to nucleoporin	nein	217,4	239,2	158,7	125,8	222,7
um15084	C65um042G_at	conserved hypothetical protein	nein	666,0	306,8	181,8	222,0	179,6
um00064	C80um171G_at	related to pepsin precursor (aspartate protease)	ja	1540,7	329,2	187,6	310,5	571,5
um06102	W10um035G_at	related to Glucan 1,3-beta-glucosidase precursor	nein	1206,9	1101,2	129,0	550,0	640,3
um12184	W80um105G_at	conserved hypothetical protein; Endoglucanase	ja	627,8	478,4	26,9	23,3	131,7
um04364	W15um008G_at	probable EXG1 - Exo-1,3-beta-glucanase precursor	ja	375,5	287,5	109,4	76,4	51,4
um04211	W155um027G_at	conserved hypothetical protein	nein*	197,6	163,9	169,5	172,1	95,1
um03276	W20um079G_at	related to SRP40 - serine-rich protein with a role in pre-ribosome assembly or transport	nein	31,8	33,2	30,9	24,3	24,4
um06154	W10um231G_at	hypothetical protein	nein	67,7	80,0	44,4	47,8	21,6

^a Accession-Nummer des MIPS (Stand Februar 2012). ^b Bezeichnung des Probe Sets, das eine Identifizierung der auf den DNA-Microarrays enthaltenen Gene erlaubt. ^c Annotation des MIPS (Stand Februar 2012). ^d Relative Expressionswerte des jeweiligen Gens (Mittelwert aus 3 biologischen Replikaten) auf der Pflanzenoberfläche in FB1, 16 h nach Infektion. ^e Relative Expressionswerte des jeweiligen Gens (Mittelwert aus drei biologischen Replikaten) auf der Pflanzenoberfläche in SG200, 16 h nach Infektion. ^f Relative Expressionswerte des jeweiligen Gens (Mittelwert aus drei biologischen Replikaten) in der Pflanze in FB1xFB2-Kreuzungen, 5 Tage nach Infektion. ^g Relative Expressionswerte des jeweiligen Gens (Mittelwert aus drei biologischen Replikaten) in der Pflanze in FB1xFB2-Kreuzungen, 9 Tage nach Infektion. ^h Relative Expressionswerte des jeweiligen Gens (Mittelwert aus 3 biologischen Replikaten) in der Pflanze in FB1xFB2-Kreuzungen, 13 Tage nach Infektion. Ausgewählte Kandidatengene sind rot markiert. *kein Sekretionssignal nach SignalP, aber vermutlich unkonventionell sekretiert nach SecretomeP.

Zusätzlich sollten Regulatoren der Adhäsionsexpression identifiziert werden. Zu bekannten Regulatoren der pilzlichen Adhäsionsexpression gehören Tor1, Con7 und Cag8. Die Kinase Tor1 ist für ihre essentielle Funktion in der Adhäsion-Genexpression in *Candida albicans* bekannt (Bastidas *et al.* 2009). Das hoch konservierte Tor1-Homolog in *U. maydis* trägt die Accession-Nummer Um03216. Der Transkriptionsfaktor Con7 ist ein zentraler Regulator von Adhäsion und pathogener Entwicklung in dem Reispfadenpilz *Magnaporthe grisea* (Odenbach *et al.* 2007). Das durch BLASTP-Analysen identifizierte *U. maydis*-Con7-Homolog trägt die Accession-Nummer Um02717. Bei Cag8 handelt es sich um einen Regulator der G-Protein gekoppelten Signaltransduktion in *Metarhizium anisopliae* mit einer beschriebenen Funktion in Pathogenität und Hydrophobin-Expression (Fang *et al.* 2007). Das Cag8-Homolog in *U. maydis* trägt die Accession-Nummer Um02104.

2.2.1.3 Identifizierung durch Expressionsanalysen

Die Adhäsion von *U. maydis* ist eng mit der Bildung des infektiösen Filaments verknüpft. In Experimenten zur Sporidien- und Filamentadhäsion konnte jedoch keine Beteiligung der *b*-induzierten Transkriptionsfaktoren Rbf1, Biz1 und Hdp2 an der Adhäsionsregulation nachgewiesen werden (siehe Anhang 6.2). Die Expression von Adhäsinen in Filamenten erfolgt offenbar unabhängig vom bE/bW-Heterodimer. Auch haploide Stämme wie FB1 zeigen vereinzelt die Bildung sogenannter Stress-Filamente auf der Pflanzenoberfläche auf (Daten nicht gezeigt). Ein Vergleich der Expressionsprofile von FB1 oder SG200 Δ *rbf1* auf der Pflanzenoberfläche mit dem Expressionsprofil von FB1 in axenischer Kultur ermöglichte die Identifizierung von Genen, welche in Sporidien wie Filamenten auf der Pflanzenoberfläche *b*-unabhängig stark exprimiert werden (Vranes, pers. Mitteilung). Strukturelle Analysen der Proteinsequenzen von *b*-unabhängig auf der Pflanzenoberfläche induzierten Genen mit MUMDB- und BLASTP-Analysen führten zu Identifizierung von zehn Kandidatengenen, die entweder als putatives Adhäsion oder als putativer Regulator der Adhäsionsexpression fungieren könnten (siehe Tabelle 4). Es wurden mehrere bioinformatische Analysen durchgeführt, um eine Eignung dieser Kandidaten als Adhäsionskandidat zu bestätigen. Das Vorhandensein von Sequenzwiederholungen wurde mittels RADAR (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/Radar/>) und TRUST (<http://www.ibi.vu.nl/programs/trustwww/>) Analysen überprüft. Das Vorhandensein eines Signalpeptids zur Sekretion wurde mittels SignalP 4.0 und SecretomeP 2.0 überprüft. Desweiteren wurden PFAM und BLAST Analysen durchgeführt, um putative Funktionen der identifizierten Kandidatengene aufzudecken (Tabelle 5).

Tabelle 4: Auflistung aller ausgewählter putativer Adhäsine, welche *b*-unabhängig auf der Blattoberfläche induziert werden.

MUMDB Accession Numer ^a	Probe Set ^b	Annotation des MIPS ^c	Faktorielle Änderung der Expression	Faktorielle Änderung der Expression
			FB1 axenisch vs. FB1 Pflanze ^d	FB1 axenisch vs. SG200 Δ <i>rbf1</i> Pflanze ^e
um03664	W10um213G_at	conserved hypothetical protein	643,1	327,7
um05104	W60um134G_at	putative protein	117,3	146,0
um04385	W75um145G_at	hypothetical protein	109,9	70,3
um06085	W45um057G_at	conserved hypothetical protein	86,0	82,4
um11430	W75um285G_ W5um028G_s_at	conserved hypothetical protein	85,4	20,6
um06120	C100um035G_at	conserved hypothetical protein	67,7	2,9
um05704	C80um042G_at	conserved hypothetical protein	56,4	61,7
um03924	W120um002G_at	Rep1 - repellent protein 1 precursor	46,3	48,4
um00286	W50um208G_at	putative protein	36,3	30,5
um02865	C10um173G_at	hypothetical protein	12,8	7,3

^a Accession-Nummer des MIPS (Stand Februar 2012).

^b Bezeichnung des Probe Sets, das eine Identifizierung der auf den DNA-Microarrays enthaltenen Gene erlaubt.

^c Annotation des MIPS (Stand Februar 2012).

^d Faktorielle Expressionsänderung des jeweiligen Gens auf der Pflanzenoberfläche in FB1, 16 h nach Infektion im Vergleich zu FB1 in axenischer Kultur (NM Minimalmedium).

^e Faktorielle Expressionsänderung des jeweiligen Gens auf der Pflanzenoberfläche in SG200 Δ *rbf1*, 16 h nach Infektion im Vergleich zu FB1 in axenischer Kultur (NM Minimalmedium).

2.2.2 Funktionelle Charakterisierung der putativen Adhäsion-Deletionsmutanten

Es wurden Deletionsmutanten von insgesamt 17 der durch *in silico*-Analysen identifizierten Kandidatengene nach (Brachmann *et al.* 2004) generiert. Da für die Durchführung von komparativen Adhäsionstests das Vorhandensein der fluoreszierenden Proteine CFP oder YFP erforderlich ist, wurden Deletionen wahlweise im Stammhintergrund SG200cfp oder SG200yfp durchgeführt. Lediglich die Deletionen der Kandidatengene *um00466* und *um01513* wurden im Stammhintergrund SG200 deletiert. Komparative Adhäsionstests waren daher für diese Kandidaten nicht möglich. Die Erstellung von Deletionsmutanten für *um06085*, *um11430* und *um03216* (Homolog zu Tor1) war nicht möglich. Eine Zusammenfassung aller erstellten Deletionsmutanten und der putativen Funktion und/oder Homologie findet sich in Tabelle 5.

Tabelle 5: Zusammenfassung der Kandidatengene und erstellten Deletionsmutanten*.

MUMDB Accession Nummer ^a	Sekretion ^b	Sequenz- wiederhol- ungen ^c	putative Funktion/ Homologie ^d	Stamm- hintergrund der Deletion ^e
um00466	SP	3	Zeigt Homologie zu <i>Drosophila melanogaster</i> SGS-3 Adhäsion-Vorläuferprotein (Crosby und Meyerowitz 1986)	SG200
um01513	SP	3	keine bekannte Funktion	SG200
um00480	SP		Zeigt Homologie zu <i>S. cerevisiae</i> Msb2 (Lanver <i>et al.</i> 2010b)	SG200cfp
um04248	SP	8	keine bekannte Funktion	SG200cfp
um02717		6	Zeigt Homologie zu <i>M. grisea</i> Con7-Transkriptionsfaktor, einem Regulator für Adhäsionsexpression (Odenbach <i>et al.</i> 2007)	SG200cfp
um03065	SP	10	keine bekannte Funktion	SG200cfp
um05104	SP	13	Keine bekannte Funktion	SG200cfp
um02104			Zeigt Homologie zu <i>M. anisopliae</i> Cag8, einem G-Protein involviert in der Hydrophobin-expression (Fang <i>et al.</i> 2007)	SG200cfp
um10417		3	Zeigt Homologie zu <i>Schizophyllum commune</i> Transkriptionsfaktor GATA-6 (Ohm <i>et al.</i> 2010)	SG200cfp
um06085*			enthält 6 Transmembrandomänen, beteiligt an zellulärem Export und Sekretion	-
um11430*			beteiligt an zellulärem Export, Sekretion und Vesikeltransfer, besitzt eine sec14-ähnliche Phosphat-Bindedomäne (kommt in sekretorischen Proteinen vor)	-
um03216*			Tor1-Kinase (Heitman <i>et al.</i> 1991; Bastidas <i>et al.</i> 2009)	-
um04211	UKS	3	keine bekannte Funktion	SG200yfp
um00286		4	keine bekannte Funktion	SG200yfp
um01204	SP		Zeigt Homologie zu <i>S. cerevisiae</i> Pyl1; pathogenitätsrelevantes extrazelluläres Protein (Ku. <i>et al.</i> 1996)	SG200yfp
um03664	UKS		keine bekannte Funktion, enthält Domäne unbekannter Funktion DUF1338	SG200yfp
um05704	SP		keine bekannte Funktion	SG200yfp
um04385	SP		keine bekannte Funktion, enthält 11 Transmembrandomänen	SG200yfp
um02865	SP		Zeigt Homologie zu humanem Beta-IG-H3; Vertebraten-Adhäsion (LeBaron <i>et al.</i> 1995)	SG200yfp
um06120	SP		keine bekannte Funktion	SG200yfp

^a Accession-Nummer des MIPS (Stand Februar 2012).^b Vorhergesagte Sekretion des Peptids; Vorhandensein eines Signalpeptids (SP) nach SignalP 4.0 oder unkonventionelle Sekretion (UKS) nach SecretomeP 2.0^c Anzahl von Aminosäuresequenzwiederholungen ermittelt durch RADAR^d Putative Funktion durch MUMDB- oder BLAST-Analysen beziehungsweise ermittelte Proteinanalogien, Literaturverweise für homologe Proteine sind angegeben.^e Ausgangsstamm, in welchem die Deletion durchgeführt wurde. Die Transformation von Deletionskonstrukten der Gene *um06085*, *um11430* und *um03216* wurde im Stammhintergrund SG200cfp durchgeführt, eine erfolgreiche Deletion dieser Gene konnte jedoch nicht erreicht werden.

* Die Erstellung von Deletionsmutanten war nicht möglich.

2.2.2.1 Die Mehrzahl der Adhäsinkandidaten spielt keine Rolle in der pathogenen Entwicklung

Um zu testen, ob die Deletion eines Kandidaten zu Veränderungen in der Pathogenität führen, wurden Maispflanzen mit Sporidien-Suspensionen der einzelnen Deletionsstämme infiziert und die Krankheitssymptome sieben Tage nach Infektion ausgewertet (siehe Abbildung 16). Für Deletionen der Gene *um00286*, *um00466*, *um01204*, *um02717*, *um03065*, *um03664*, *um04211*, *um04385*, *um05104*, *um05704* und *um06120* konnte kein Pathogenitätsdefekt im Vergleich zu SG200 festgestellt werden. Der für $\Delta um00480$ bzw. $\Delta msb2$ aufgetretene Pathogenitätsdefekt wurde in parallelen Arbeiten durch (Lanver *et al.* 2010b) beschrieben und analysiert. Eine leicht reduzierte Pathogenität konnte bei den Deletionen von *um4248* und *um02865* beobachtet werden. Die Deletion eines einzelnen Adhäsins muss jedoch nicht zu einem Pathogenitätsdefekt führen, wie Deletionsstämme von *rep1* und *hum3* zeigen (Teertstra *et al.* 2006).

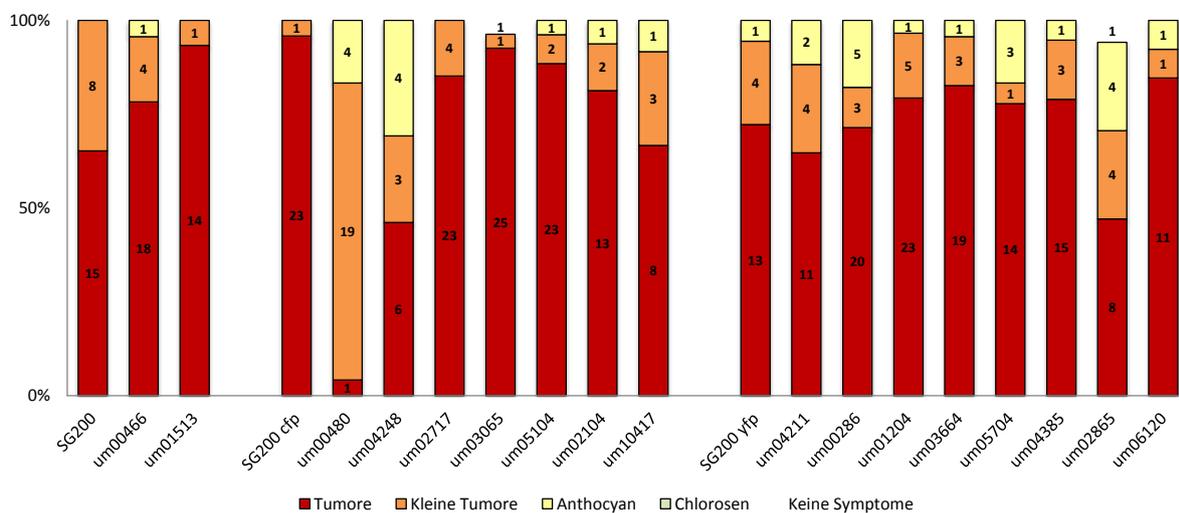


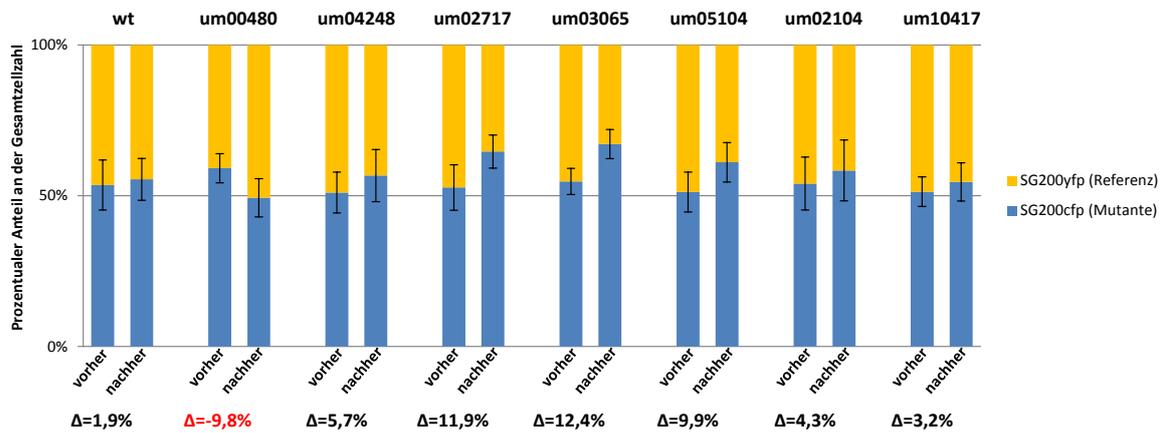
Abbildung 16: Pflanzeninfektionen mit den erstellten *U. maydis*-Deletionsmutanten. Auswertung der Infektionssymptome sieben Tage nach Infektion. Symptome wurden nach Schweregrad eingeteilt, Symptomstärke und Anzahl der Pflanzen mit jeweiligen Symptomen sind gekennzeichnet.

2.2.2.2 Mutanten der Kandidatengene zeigten im Filament-Adhäsionstest keine erkennbaren Adhäsionsdefekte

Zur genaueren Betrachtung der Filamentadhäsion wurden komparative Adhäsionsvergleiche mit den Deletionsmutanten durchgeführt. Analog zu den Initialexperimenten zur Filamentadhäsion wurden wiederum SG200cfp-Derivate mit SG200yfp und SG200yfp-Derivate mit SG200cfp verglichen. Je nach Stamm wurden hierbei zwei oder mehrere biologische Replikate untersucht (Siehe Material & Methoden für die genaue Anzahl biologischer Replikate). In allen Stämmen waren Änderungen in der Adhäsionsstärke zu beobachten, die von unter einem bis über 10% reichten. Mit Ausnahme von $\Delta um03065$ war für keinen Stamm eine statistisch signifikante Änderungen des Zellverhältnisses zu beobachten (siehe Standardabweichung, Abbildung 17A und 17B). Die beobachtete teils große

Standardabweichung machte erneut deutlich, dass kleinere Änderungen des Adhäsionsverhaltens mit dieser Methode nicht zu identifizieren sind. Für $\Delta um03065$ wurde eine leichte Verstärkung der Adhäsionsfähigkeit beobachtet, die sich jedoch nur unwesentlich über der beobachteten Standardabweichung der Werte liegt.

A



B

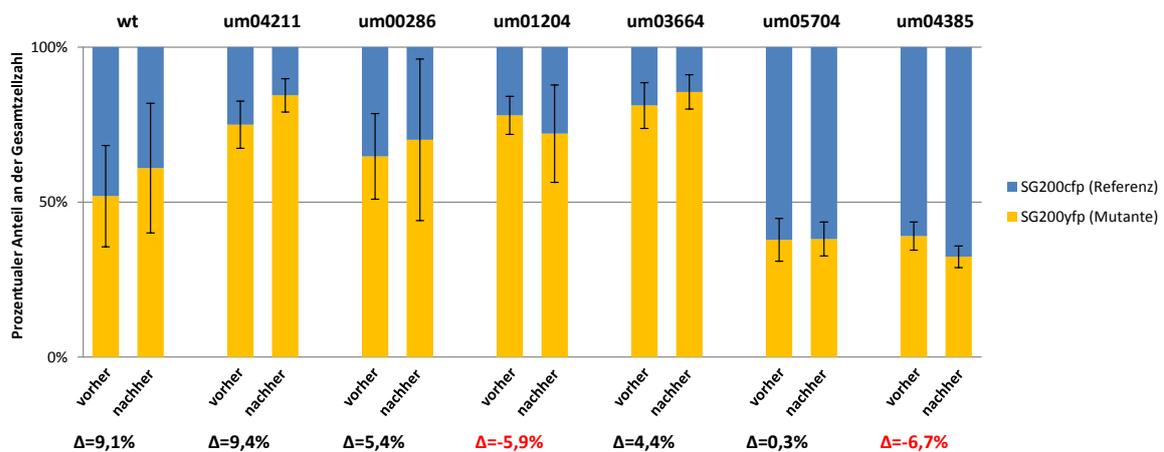


Abbildung 17: Filament-Adhäsionstest der generierten Kandidatengen-Deletionsmutanten. Dargestellt sind Mutanten im SG200cfp (A) und SG200yfp Hintergrund (B). Komparativer Filament-Adhäsionstest für Deletionsmutanten nach 15 minütigem Waschen von 24 h alten Filamenten auf einer PTFE-Oberfläche. Das Sporidienverhältnis vor Applikation und das Filamentverhältnis nach dem Waschvorgang wurde über Auszählung der CFP und YFP Signale von 10 zufällig gewählten fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen (2,4 mm²) mittels Pixcavator (Student Edition) bestimmt. Zellzahlen variierten zwischen 250-1000 ausgezählten Sporidien und 1x10³-1x10⁵ ausgezählten Filamenten. Die absolute Änderung des Verhältnisses (Δ) ist in Prozent in schwarz für positive und rot für negative Änderungen dargestellt. Prozentualer Anteil der SG200cfp Zellen in blau, Anteil der SG200yfp Zellen in gelb.

2.2.2.3 Im Flusskammer-Adhäsionstest konnten keine signifikanten Änderungen im Adhäsionsverhalten der Deletionsmutanten beobachtet werden

Die Anzahl adhärrierender Sporidien lag stammunabhängig in den meisten Fällen bei unter 10%. Dies ist mit den vorherigen Beobachtungen einer geringen Sporidienadhäsion in der Flusskammer in Einklang (siehe Abbildung 18). Für die Deletionsmutanten der Gene *um00466*, *um04248*, *um05704*, *um04385* und *um06120*, aber auch für SG200cfp wurde in einzelnen Versuchen die Adhäsion einer großen Zahl von Sporidien beobachtet. Eine Reproduzierbarkeit dieser starken Oberflächenadhäsion war jedoch in keinem der Stämme gegeben (siehe Abbildung 18D). Daher konnten die Gründe dieser Abweichungen im Adhäsionsverhalten nicht aufgedeckt werden. Abgesehen hiervon konnte die Beobachtung der Sporidienadhäsion der generierten Deletionsmutanten im Flusskammer-Adhäsionstest keine weiteren Erkenntnisse bringen.

2.2.3 Identifizierung neuer Adhäsine im heterologen System

Für die durch *in silico*-Ansätze identifizierte Kandidatengene konnte unter Zuhilfenahme der beschriebenen Analysemethoden keine abschließende Aussage über eine Beteiligung an der pilzlichen Oberflächenadhäsion getroffen werden. Auch die Etablierung des Flusskammer-Adhäsionstests ermöglichte keine verlässliche Analyse von Adhäsionsvorgängen bei *U. maydis*-Zellen. Die Verwendung einer Flusskammer ermöglicht jedoch auch Anreicherungsverfahren zur *de novo*-Identifizierung putativer Adhäsine. Die funktionelle Komplementation von adhäsions-defizienten *Saccharomyces cerevisiae*-Stämmen durch Fremdgene kann gezielt zur Identifizierung von Genen mit Einfluss auf pilzliche Adhäsion dienen.

2.2.3.1 Die Adhäsion von *S. cerevisiae*-Zellen im Flusskammersystem ist abhängig von Anzuchtmedium und Oberfläche

Eine Deletion des *S. cerevisiae*-Flokkulins *FLO11* führt zu einem fast vollständigen Verlust der Anhaftung an abiotische Oberflächen, während Zell-Zell-Adhäsion und Wachstum weitestgehend unbeeinflusst bleiben (Bayly *et al.* 2005). Für folgende Versuche wurden die Hefestämme YHUM0909 (Sigma1278b; *ura3-52*, im Folgenden mit Wt bezeichnet) und YHUM0924 (Sigma1278b; *ura3-52*, *flo11Δ::kanR*, im Folgenden mit *flo11Δ* bezeichnet) verwendet. Zur Überprüfung des Adhäsionsverhaltens der beiden Stämme wurden Analysen von Medien- und Oberflächeneffekten durchgeführt. Bereits bei der Probenvorbereitung wurde beobachtet, dass eine Pelletierung von Hefezellen, die in SD Medium angezogen wurden, erst bei sehr hohen Zentrifugalkräften eintrat, während eine Pelletierung von Hefezellen aus YEPD Vollmedium auch mit geringen Zentrifugalkräften möglich war (Daten nicht gezeigt). Mikroskopisch wurde ebenfalls eine stärkere Flokkulation jener Hefezellen beobachtet, die in SD Medium angezogen wurden (Daten nicht

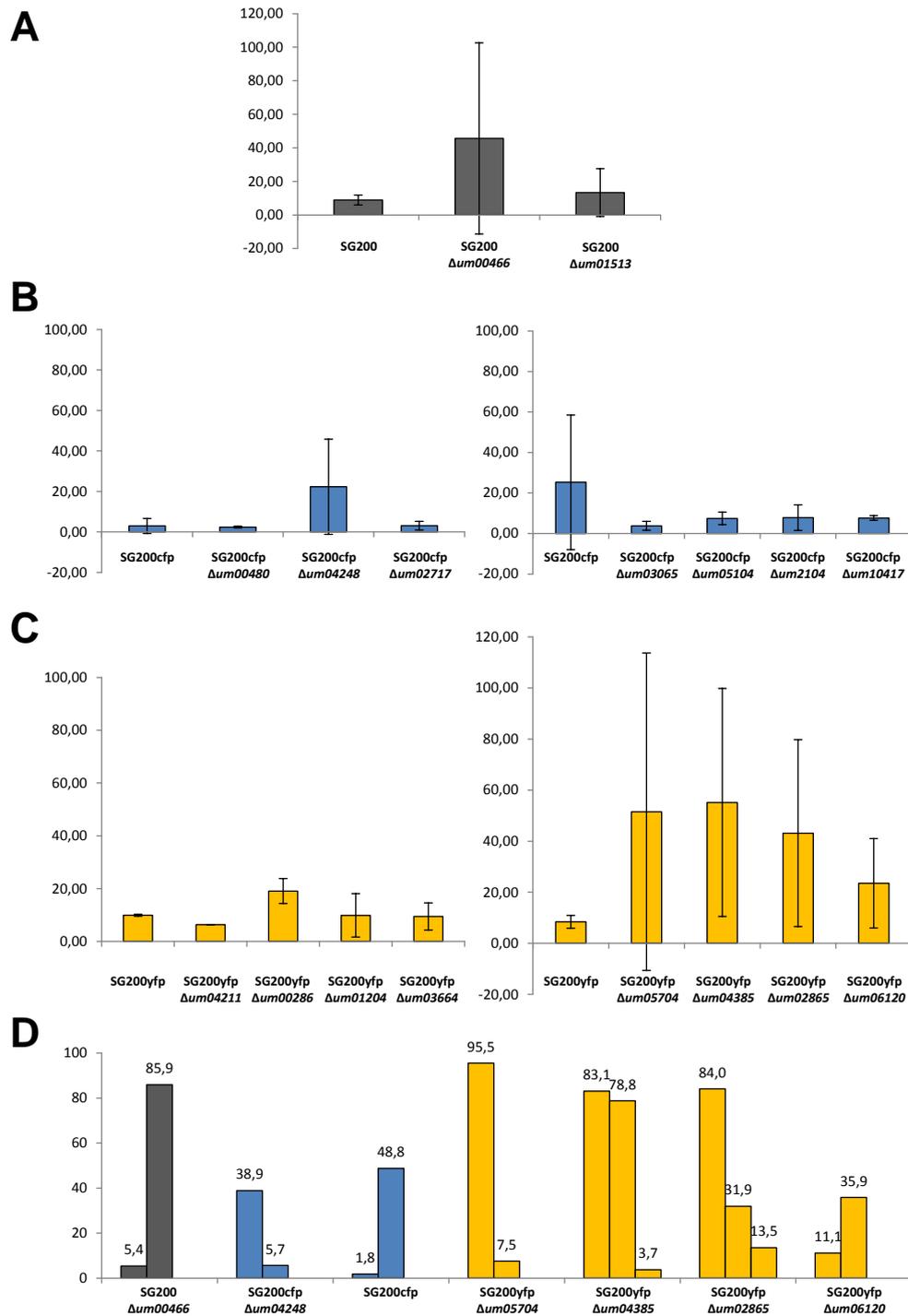


Abbildung 18: Absolute Zahl adhärenter Sporidien der Deletionsstämme im Flusskammer-System. Für die Experimente wurden *U. maydis* Sporidien mit einer OD600 = 0,2 in die Flusskammer appliziert und 1 h bei RT inkubiert. Es wurde ein Bildausschnitt mikroskopisch festgehalten und die Zellzahl vor dem Waschvorgang bestimmt. Dann wurde für 15 min ein Wasserfluss mit PBS und einer konstanten Scherkraft von 25 μ N/cm² angelegt. Erneut wurde derselbe Bildausschnitt mikroskopisch festgehalten und die Zellzahl nach dem Waschvorgang ermittelt. Als Kontrolle wurden jeweils die verwendete Ausgangsstamm SG200 (A), SG200cfp (B) oder SG200yfp (C) mit untersucht. Die absolute Zahl adhärenter Zellen errechnete sich aus dem Verhältnis Zellzahl nach dem Waschen zu Zellzahl vor dem Waschen, Angaben in Prozent. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte einer Doppelbestimmung, der Fehlerbalken gibt die Standardabweichung an. Große Änderungen der ansonsten schwachen Adhäsionsfähigkeit gehen mit einer hohen Standardabweichung einher. (D) Einzeldarstellung der Experimente mit hoher Standardabweichung. Dargestellt ist jeweils die Erst- und Zweitbestimmung des prozentualen Anteils adhärenter Zellen, sowie eine bei den Stämmen SG200yfp Δ um04385 und SG200yfp Δ um02865 zusätzlich durchgeführte Drittbestimmung. Stämme im SG200-Hintergrund in grau, SG200cfp-Derivate in blau und SG200yfp-Derivate in gelb.

gezeigt). Aufgrund dieses Medien-abhängigen und Flo11-unabhängigen Adhäsionseffekts wurde das Adhäsionsverhalten der verwendeten *S. cerevisiae*-Stämme unter verschiedenen Wachstumsbedingungen und auf unterschiedlichen hydrophoben Oberflächen bestimmt.

Hefezellen wurden in PBS-Puffer in die Flusskammer eingebracht und nach einer Stunde Adhäsionszeit einer konstanten Scherkraft von 25 $\mu\text{N}/\text{cm}^2$ für 15 Minuten ausgesetzt. Anschließend wurde der prozentuale Anteil verbleibender Zellen bestimmt. Es zeigte sich eine Abhängigkeit der Adhäsionsfähigkeiten von Wt und *flo11* Δ sowohl von den Anzuchtbedingungen als auch von der verwendeten Oberfläche (siehe Abbildung 19). Verwendung von Polystyrol führte in allen untersuchten Fällen zu einer schwächeren Adhäsionsfähigkeit, hydrophobere PTFE-Oberflächen hingegen schienen eine stärkere Adhäsion zu begünstigen. Den größten Effekt auf Adhäsion hatte die Wahl des Anzuchtmediums. Bei der Verwendung von YEPD Vollmedium waren die erwarteten Adhäsionsphänotypen zu beobachten: 25% - 50% der Wildtyp-Hefen adhärten hier an PS- oder PTFE-Oberflächen, während *flo11* Δ -Hefen fast vollständig abgeschwemmt wurden. Die Verwendung von SD Komplexmedium hingegen führte zu starken Schwankungen der technischen Replikate, auf PS wurde nur eine minimale Adhäsion aller verwendeten Hefestämme beobachtet, auf PTFE hingegen zeigten zum Teil sogar *flo11* Δ -Mutanten eine starke Oberflächenadhäsion. Um den *flo11* Δ -Phänotyp der verwendeten Stämme verlässlich reproduzieren zu können, wurde in folgenden Experimenten auf YEPD als Anzuchtmedium zurückgegriffen.

Eine Kultivierung der Hefezellen in Vollmedium führt über längere Zeit bei fehlendem Selektionsdruck zu einem Verlust der Plasmid-DNA (Dani and Zakian, 1983). Trotz der funktionellen Selektion der Anreicherung auf Fremdgenexpression könnte durch Plasmidverlust die Effizienz der Anreicherung sinken. Der Stamm KPHY01 trägt das Plasmid pKPH124. Dieses Plasmid entspricht einer GATEWAY®-vermittelten Insertion von *gfp* in den binären Genbank-Vektor pKPH48 (siehe unten) und ermöglicht die Überprüfung der Galaktose-induzierten Genexpression durch fluoreszenzmikroskopische Analysen. Nach einer 14-stündigen Induktion dieses Stammes und anschließender fluoreszenzmikroskopischen Betrachtung zeigten 75% der Hefezellen trotz fehlendem Selektionsdruck ein GFP Signal und somit Fremdgenexpression auf (siehe Anhang 6.3.2).

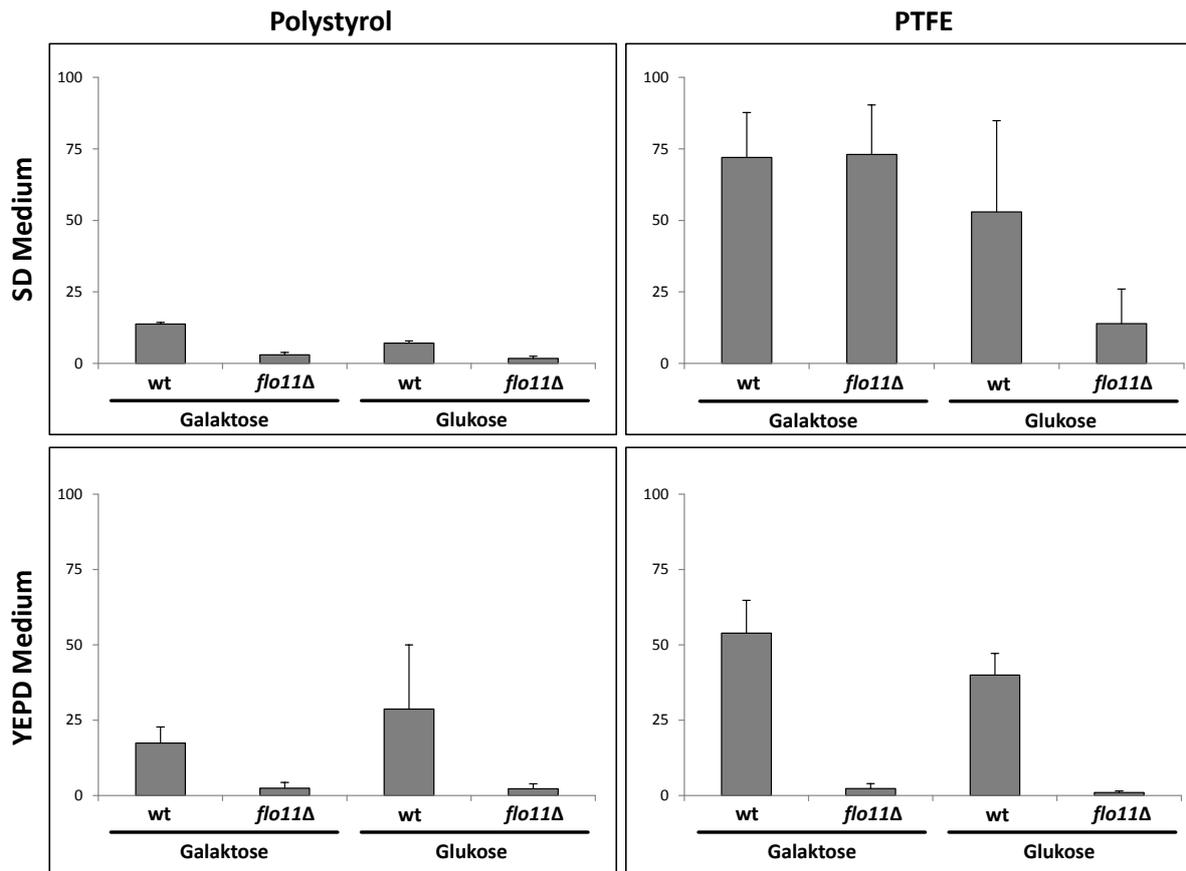


Abbildung 19: Absolute Zahl adhärenter Zellen von Wt- und *flo11Δ*-Stämmen von *S. cerevisiae*-Stämme in der Flusskammer in Abhängigkeit von Anzuchtmedien und hydrophober Oberfläche. Für die Experimente wurden *S. cerevisiae*-Zellen mit einer $OD_{600} = 0,4$ in die Flusskammer appliziert und 1 h bei RT inkubiert. Es wurde ein Bildausschnitt mikroskopisch festgehalten und die Zellzahl vor dem Waschvorgang bestimmt. Dann wurde für 15 min ein Wasserfluss mit PBS und einer konstanten Scherkraft von $25 \mu\text{N}/\text{cm}^2$ angelegt. Erneut wurde derselbe Bildausschnitt mikroskopisch festgehalten und die Zellzahl nach dem Waschvorgang ermittelt. Die Bestimmung der absoluten Zahl adhärenter Zellen errechnete sich aus dem Verhältnis Zellzahl nach dem Waschen zu Zellzahl vor dem Waschen. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte einer Doppelbestimmung, der Fehlerbalken gibt die Standardabweichung an. Auf Polystyrol ist eine geringere Anhaftung zu beobachten; Angaben in Prozent. Die Verwendung von SD Komplexmedium resultiert in einer starken Adhäsion von Wt- sowie *flo11Δ*-Stämmen. Die Verwendung von PTFE und YEPD Medium resultiert in den erwarteten phänotypischen Unterschieden der Wt- sowie *flo11Δ*-Stämme und einer geringen Standardabweichung.

2.2.3.2 Erstellung einer Genbank für die heterologe Expression

Für die Propagierung der Genbank in *E. coli* und *S. cerevisiae* wurde ein binärer Vektor benötigt. Bei dem gewählten Vektor handelte es sich um p416GALL, dieser ermöglicht durch ein GALL-Promotorfragment in *S. cerevisiae* die Galaktose-induzierbare Expression von in die Klonierungsstelle eingebrachten Gensequenzen (Mumberg *et al.* 1995). Um die Klonierung der cDNA-Bank zu gewährleisten, wurde in die Klonierungsstelle eine GATEWAY®-Klonierungskassette eingefügt, der entstandene GATEWAY®-kompatible binäre Vektor wurde pKPH48 genannt (siehe 6.5.1).

Die RNA für die cDNA-Synthese wurde von frühen Filamenten (sechs Stunden nach Applikation) auf einer hydrophoben Oberfläche isoliert und mit dem In-Fusion™ SMARTer™ cDNA-Library Construction Kit (Takara Clontech) in ds cDNA transkribiert. Die cDNA wurde mit *attB1*- und *attB2*-Klonierungsstellen für eine GATEWAY™-Klonierung modifiziert und in den Vektor pKPH48 transferiert (siehe 4.3.5 sowie 6.6 für eine genauere Beschreibung der einzelnen Schritte zur Generierung der cDNA-Bank). Erste Anreicherungsreihen waren erfolglos (siehe 6.6.3), führten jedoch zur Identifikation eines zusätzlichen ATG-Startcodons in der cDNA-Sequenz (siehe 6.6.4). Erst die sequenzspezifische Mutagenese der zusätzlichen ATG-Sequenz in der cDNA führte zur Generierung der finalen $\Delta 5'$ -ATG cDNA-Genbank, welche für die induzierbare Expression von *U. maydis*-Genen in adhäsions-defizienten *flo11Δ-S. cerevisiae*-Stämmen herangezogen werden konnte (siehe 6.6.5)

2.2.3.3 Induktion der Expressionsgenbank führt zu unspezifischer Adhäsion des verwendeten Hefestammes

Nach erfolgreicher Transformation der $\Delta 5'$ -ATG cDNA-Genbank in YHUM0924 wurde eine Anreicherungsreihe mit der Flusskammer durchgeführt. Die Plasmid-tragenden Hefezellen wurden in Anlehnung vorheriger Ergebnisse über Nacht induziert, in PBS mit einer $OD_{600} = 0,4$ in die Flusskammer appliziert, eine Stunde inkubiert und 15 Minuten bei $25 \mu\text{N}/\text{cm}^2$ gespült. Induzierte Zellen zeigten eine starke Oberflächenadhäsion auf, während nicht-induzierte Zellen keine Anhaftung zeigten (siehe Abbildung 20). Allerdings zeigte auch der induzierte KPHY01-Kontrollstamm eine mit der induzierten Genbank vergleichbar starke Oberflächenadhäsion. Die Galaktose-Induktion führt in diesem Stamm zur Expression von *gfp* und kann als Expressionskontrolle dienen, sollte aber nicht zu einer verstärkten Adhäsion führen.

Der Stamm YHUM0924 weist somit unter Galaktose-induzierten Bedingungen eine Flo11-unabhängige starke Oberflächenadhäsion auf, sobald er ein Derivat des binären Vektors pKPH48 trägt. Eine vergleichbare Adhäsion von YHUM0924 ohne das Plasmid ist hingegen nicht zu beobachten (siehe Abbildung 19). Der Hintergrund dieser unspezifischen Anhaftung des *flo11Δ*-Stammes konnte in dieser Arbeit nicht mehr untersucht werden.

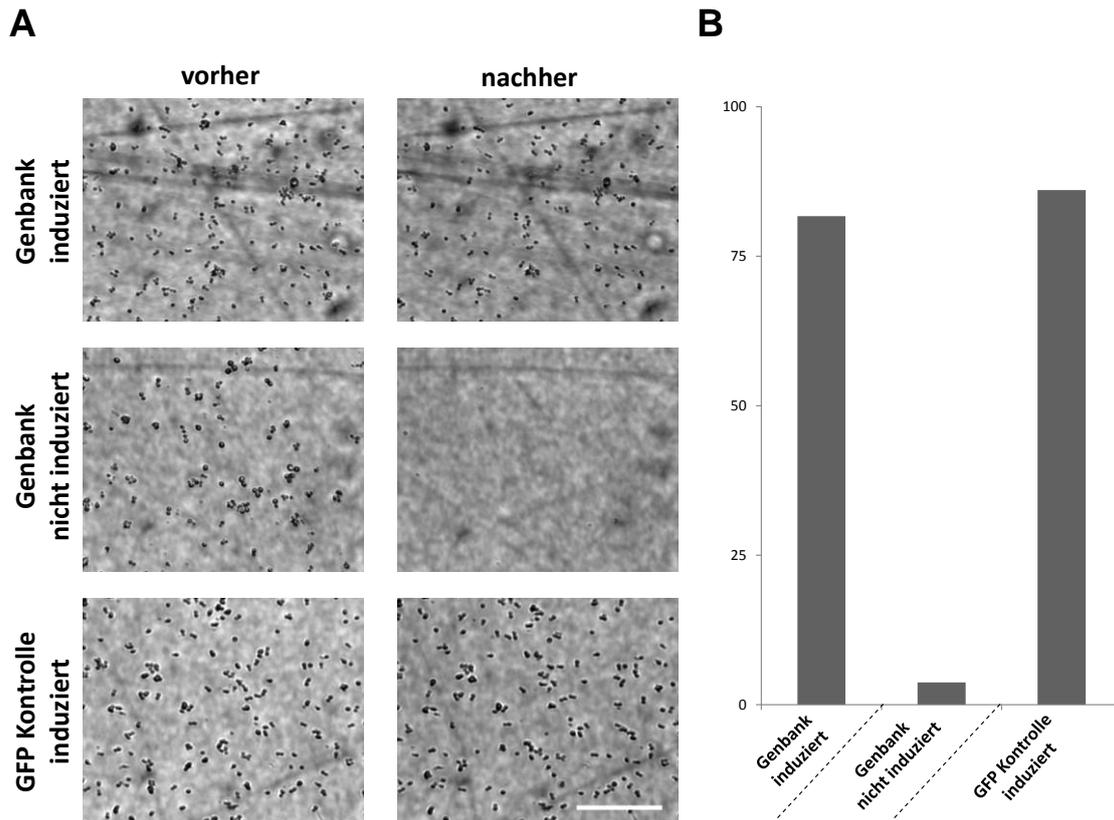


Abbildung 20: Adhäsionsverhalten Fremdgen-exprimierender *S. cerevisiae*-Zellen. (A) Für die Experimente wurden die Δ ATG_{cDNA}-Genbank tragende *S. cerevisiae*-Zellen (Stammbezeichnung KPHYL2) der Genbank ün in YEPD+2% Gal (induziert), YEPD+2% Glc (nicht-induziert) oder der Stamm KPHY01 (GFP Kontrolle) mit einer $OD_{600} = 0,4$ in die Flusskammer appliziert und 1 h bei RT inkubiert. Es wurde ein Bildausschnitt mikroskopisch festgehalten und die Zellzahl vor dem Waschvorgang bestimmt. Dann wurde für 15 min ein Wasserfluss mit PBS und einer konstanten Scherkraft von $25 \mu\text{N}/\text{cm}^2$ angelegt. Erneut wurde derselbe Bildausschnitt mikroskopisch festgehalten und die Zellzahl nach dem Waschvorgang ermittelt. (B) Einzelbestimmung der absoluten Zahl adhärenter Hefezellen. Die Bestimmung der absoluten Zahl adhärenter Zellen errechnete sich aus dem Verhältnis Zellzahl nach dem Waschen zu Zellzahl vor dem Waschen. Angaben in Prozent.

2.3 Identifizierung und Charakterisierung des sekretierten Effektors Plp2

Effektoren sind Modulatoren der Pflanzenabwehr, die eine erfolgreiche Kolonisierung einer Wirtspflanze durch das Pathogen gewährleisten. Funktionell und sequenziell stark unterschiedlich kann die Rolle eines Effektorproteins unterschiedlich sein. Die folgenden Experimente befassen sich mit der Charakterisierung des pathogenitätsrelevanten Effektorproteins Plp2.

2.3.1 Identifizierung der Plp-Effektorproteine

Expressionsdaten-Analysen führten zur Identifizierung der sekretierten Proteine Pst1 und Pst2 („**p**enetration **s**top“), die Deletion von *pst1* oder *pst2* führt zum vollständigen Verlust der Pathogenität. Der Effektor Pst1 weist putative Kernlokalisierungssequenzen (NLS) auf, in Pst2 konnten putative Transaktivierungsdomänen (TAD) identifiziert werden, und erste *in vivo*-Lokalisierungsstudien deuten zusätzlich auf eine Lokalisierung der Pst-Proteine im pflanzlichen Zellkern hin (Langner 2010 und Vranes, pers. Mitteilung). Um ähnliche Effektorproteine zu identifizieren wurden Gene ausgewählt, welche für sekretierte Proteine ohne bekannte Funktionen kodieren, eine starke Induktion in den frühen Stadien der pathogenen Entwicklung erfahren und durch die Überexpression des Transkriptionsfaktors Biz1 induzierbar sind. Weitere Auswahlkriterien waren das Vorhandensein von putativen NLS- und TAD-Sequenzen in der Proteinsequenz. Hierdurch konnten die Effektorproteine Plp1, Plp2 und Plp3 („**p**st-**l**ike **p**rotein“) identifiziert werden (Vranes, persönliche Mitteilung). Die Charakterisierung und Lokalisierung von Plp1 und Plp3 wurde bereits an anderer Stelle beschrieben (Hampel 2012). Diese Arbeit befasst sich im Folgenden mit der Charakterisierung von Plp2.

2.3.2 Das Protein Plp2

Das 3324 Nukleotide umfassende intronfreie Gen *plp2* (*um04342*) liegt auf dem 14. Chromosom und ist somit nicht Teil der zuvor beschriebenen Gencluster mit pathogenitätsrelevanten sekretierten Proteinen (Kämper *et al.* 2006). Der GC-Gehalt ist mit 57,2 % leicht erhöht im Vergleich zum GC-Gehalt des *U. maydis*-Genoms von 54% (Schirawski *et al.* 2010). Das kodierte Protein Plp2 umfasst 1107 Aminosäuren mit einem vorausgesagten Molekulargewicht von 112,5 kDa. In den nahe verwandten Organismen *Sporisorium reilianum* und *Ustilago hordei* konnten die homologen Proteine Sr15229 und Uh06791 identifiziert werden. Sr15229 zeigt zu Um04342 48% Identität (BLOSUM62), umfasst 1072 Aminosäuren mit einem vorhergesagten Molekulargewicht von 108,3 kDa, das korrespondierende Gen *sr15229* hat einen GC-Gehalt von 64,6%. Uh06791 zeigt eine Identität von 41% (BLOSUM62) zu Plp2, umfasst 1106 Aminosäuren und weist ein vorhergesagtes Molekulargewicht von 115,3 kDa auf (Kahmann, nicht publiziert). Da uns keine Daten über die Gensequenz von *uh06791* vorlagen, konnte der GC-Gehalt nicht bestimmt werden.

2.3.3 *plp2* ist ein Pathogenitätsfaktor

Deletionsmutanten von *plp2* im SG200-Stammhintergrund sind in Infektionsstudien vollständig apathogen. Die ektopische Integration von *plp2* unter Kontrolle eines 2,5 kb umfassenden *plp2*-Promotorfragments vermag die Pathogenität eines solchen Stammes vollständig wiederherzustellen (siehe Abbildung 21A). Auch auxotrophe *U. maydis*-Mutanten können reduzierte Virulenz oder Apathogenität aufweisen. Um sicherzustellen, dass es sich bei *plp2* tatsächlich um einen Pathogenitätsfaktor handelt, wurde das Wachstum von SG200 Δ *plp2*-Stämmen in Minimalmedium überprüft. Auxotrophe Mutanten würden in Minimalmedium einen Wachstumsdefekt aufweisen, das Wachstum von SG200 Δ *plp2*-Stämmen war in Minimalmedium jedoch vergleichbar mit dem SG200-Wildtypstamm (siehe Abbildung 21B). *plp2* ist somit ein echter Pathogenitätsfaktor.

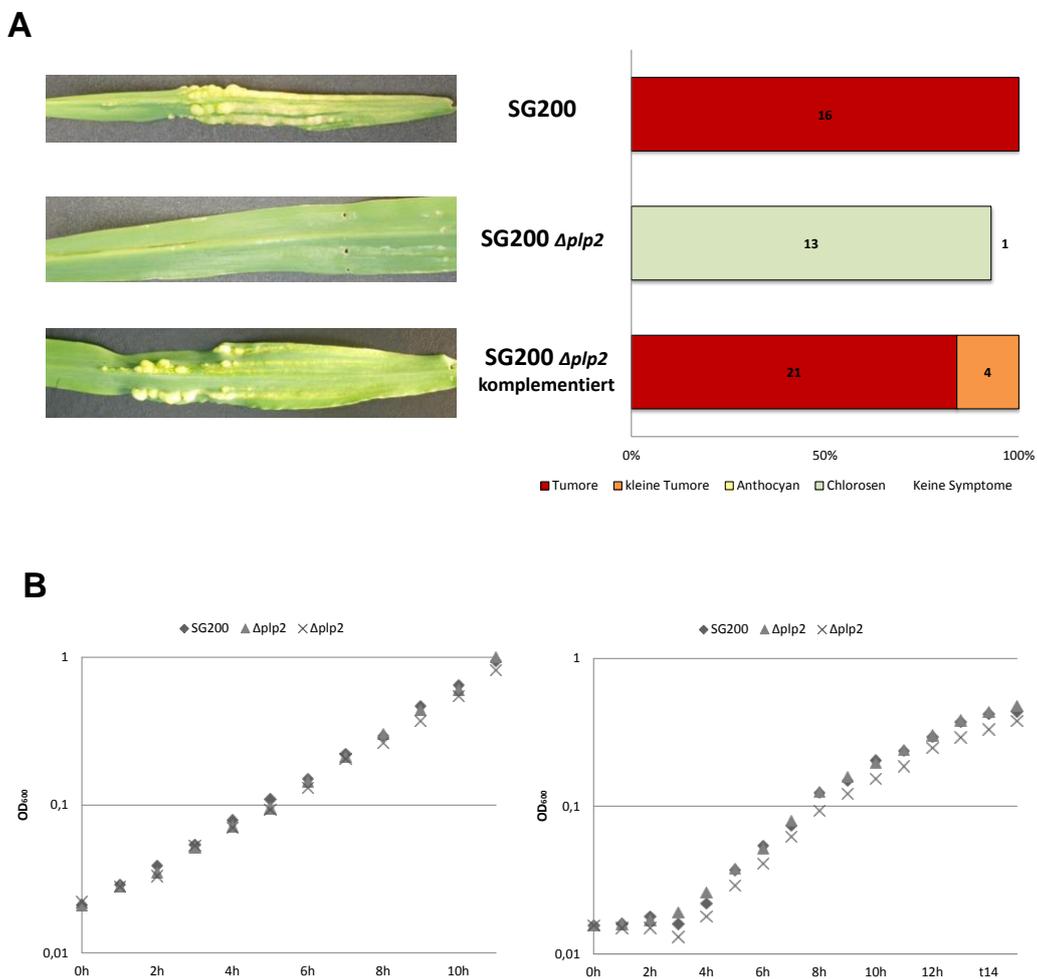


Abbildung 21: Phänotypische Analyse von *plp2*-Deletionsstämmen. (A) Krankheitssymptome an Maispflanzen sieben Tage nach Infektion. Links: Fotografien des jeweils dritten Blatts unterhalb der Injektionsstelle; Tumore und Chlorosen der Blätter sind in Infektionen mit SG200-Wildtyp und in Infektionen mit dem Komplementationsstamm SG200 Δ *plp2**comp* (*a1mfa2 bW2bE1 Δ um04342::Hyg^R ip'[P_{plp2}:plp2]ip^S*) gut zu erkennen, während Pflanzen aus Infektionen mit SG200 Δ *plp2* lediglich leichte Chlorosen ohne weitere Krankheitssymptome aufweisen. Rechts: Stärke der Krankheitssymptome infizierter Maispflanzen in Infektionsexperimenten; die Anzahl der Pflanzen mit den jeweiligen Symptomen ist angegeben. (B) Wachstumskurve von Wildtyp-SG200 (◆) und den Δ *plp2*-Stämmen SG200 Δ *plp2*⁹⁷ (×) und SG200 Δ *plp2*¹¹ (▲) in Y₁-Vollmedium (links) und MM-Minimalmedium (rechts). Es sind keine Änderungen im Wachstumsverhalten zu erkennen.

2.3.4 Mikroskopische Analysen von Plp2-Mutanten zeigen Appressorienbildung, aber kein invasives Wachstum

Die mikroskopische Betrachtung von *U. maydis* Filamenten auf der Blattoberfläche macht den Pathogenitätsdefekt der *plp2*-Deletion in SG200 deutlich. Die Hyphen zeigen die Bildung eines Appressoriums auf der Pflanzenoberfläche, es ist jedoch keine Proliferation von Pilzhypen innerhalb des Pflanzengewebes zu beobachten. Dieser Phänotyp gleicht dem einer Deletion von *pst1* oder *pst2* (Langner 2010). Interessanterweise sind bei lichtmikroskopischer Betrachtung eine Reihe von pflanzlichen Abwehrreaktionen zu beobachten. So kommt es zur Ausbildung von Papillen, und ein massiver Vesikeltransport innerhalb der Pflanzenzelle, oftmals entlang definierter Wege, zur Penetrationsstelle ist zu beobachten (siehe Abbildung 22A und 22B). Die Wanderung eines Pflanzenzellkerns zur Penetrationsstelle war ebenfalls zu beobachten (siehe Abbildung 22C).

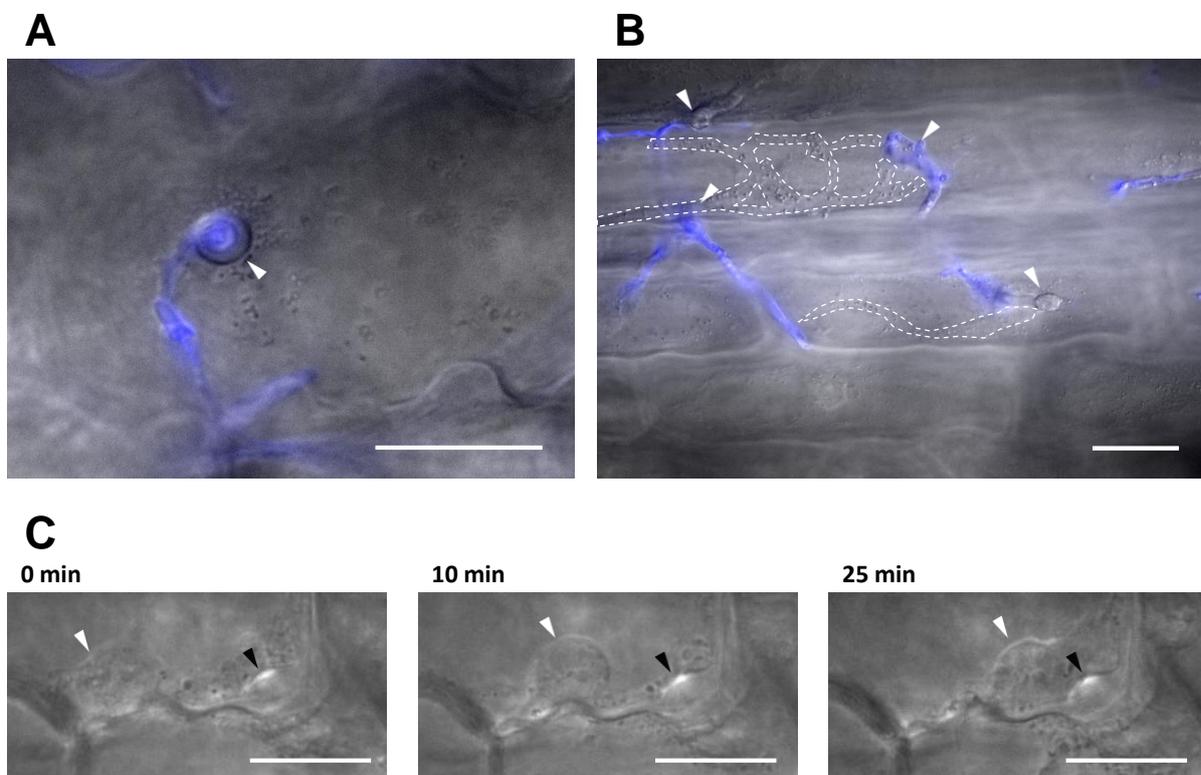
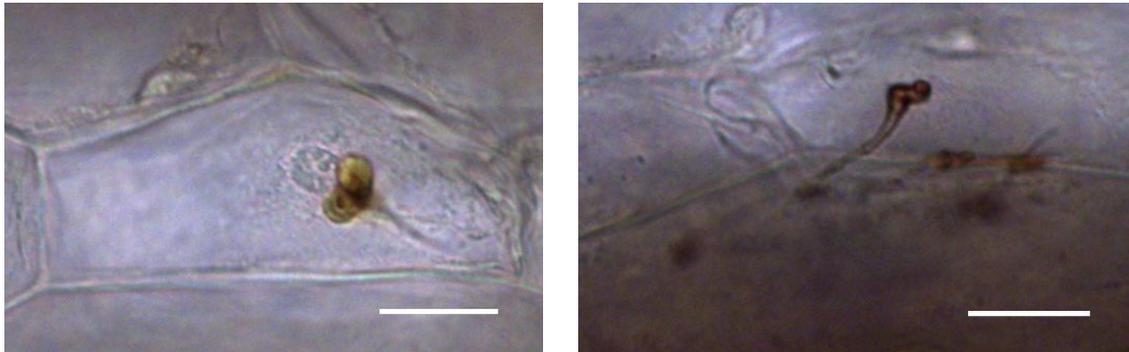


Abbildung 22: Mikroskopische Analyse von *plp2*-Deletionsmutanten. (A) SG200 Δ *plp2*-Filament auf der Blattoberfläche von *Zea mays* mit CalcoFluor angefärbt (blau). CalcoFluor färbt lediglich die auf der Oberfläche exponierten Hyphenbereiche und dringt nicht ins Pflanzengewebe ein. Die pilzliche Entwicklung stoppt direkt nach Bildung des Appressoriums (Pfeil). Es ist die Bildung großer papillärer Strukturen zu beobachten. Ebenso ist ein massiver Transport von Vesikeln zu und von der Penetrationsstelle zu beobachten. (B) Pflanzenzellen mit direktem Kontakt zu SG200 Δ *plp2*-Hyphen zeigen massiven Vesikeltransport zu den Penetrationsstellen (weiße Pfeile), doch auch benachbarte Zellen ohne direkten Pilzkontakt zeigen starke Vesikelbewegungen. Die Vesikelbewegung verläuft oft entlang definierter Bereiche (weiß markiert). (C) Neben starken Vesikelbewegungen in der Pflanzenzelle konnte auch die Bewegung des Pflanzenzellkerns (weißer Pfeil) zur Stelle einer erfolglosen Penetration (schwarzer Pfeil) durch eine SG200 Δ *plp2*-Hyphne beobachtet werden. Maßstabsbalken jeweils 20 μ m.

Die papillären Strukturen zeigten bei Betrachtung in den Fluoreszenzkanälen für GFP und RFP eine starke Hintergrundfluoreszenz (siehe Abbildung 27 in Abschnitt 2.3.7). Die Diaminobenzidin (DAB)-Färbung von Pflanzenpräparaten zeigte eine Akkumulation von reaktiven Sauerstoffspezies in den papillären Strukturen (Abbildung 23).

A



B

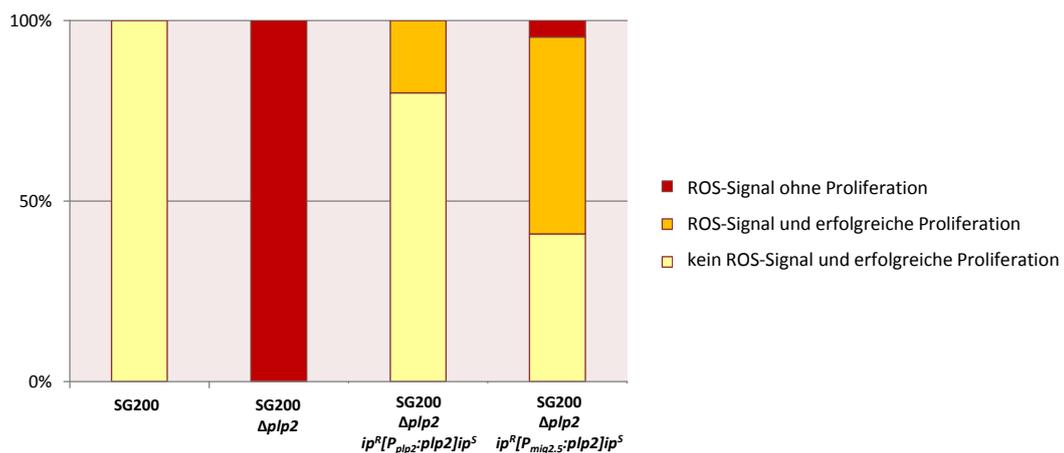


Abbildung 23: Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) bei erfolgloser Penetration durch SG200 $\Delta plp2$ - und Komplementations-Stämme.

(A) Mikroskopische Betrachtung von EtOH-entfärbten Pflanzenpräparaten aus Infektionsstudien mit SG200 $\Delta plp2$, welche zuvor mit Diaminobenzidin (DAB) behandelt wurden. DAB wird bei Anwesenheit von H₂O₂ oxidiert und verfärbt sich dabei braun. Hierdurch können Bereiche mit akkumulierten reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) nachgewiesen werden. Die Pflanzenpräparate zeigen eine Braunfärbung der papillären Strukturen sowie eine intensive Braunfärbung des Penetrationsapparates. Maßstabsbalken: 20 μ m. (B) Quantitative Bestimmung der Penetrationsstellen, welche eine DAB-vermittelte Braunfärbung aufwiesen. Es wurden drei bis fünf lichtmikroskopische Übersichtsaufnahmen von EtOH-entfärbten Pflanzenpräparaten aus Infektionsstudien mit SG200, SG200 $\Delta plp2$, SG200 $\Delta plp2 comp$ (ektopische Komplementation mit *plp2* unter Kontrolle des *P_{plp2}*) und KPH92 (ektopische Komplementation mit *plp2* unter Kontrolle des *P_{mig2.5}*, siehe hierzu 2.3.8) angefertigt. Es wurden die absoluten Zahlen der Penetrationsstellen bestimmt, welche (i) keine Braunfärbung und Proliferation, (ii) Braunfärbung und Proliferation sowie (iii) Braunfärbung und fehlende Proliferation aufzeigten. In SG200 war an keiner der Penetrationsstellen eine Braunfärbung zu erkennen, SG200 $\Delta plp2$ zeigte an allen Penetrationsstellen ROS-Signale und fehlende Proliferation. Beide Komplementations-Stämme zeigten Proliferation nach erfolgter Penetration, jedoch war an manchen Penetrationsstellen eine leichte Braunfärbung zu beobachten.

2.3.5 Die Expression von Plp2 wird während der pathogenen Entwicklung stark induziert

plp2 wurde als Biz1-reguliertes Gen identifiziert, was auf eine Induktion der Expression zu Beginn der pathogenen Entwicklung hindeutet. Zur genaueren Untersuchung der *plp2*-Expression wurden zuerst *plp2*-Deletionsmutanten im FB1-Stammhintergrund (KPH110 und KPH111) und FB2-Stammhintergrund (KPH112, KPH113 und KPH114) erstellt. In Infektionsexperimenten konnte gezeigt werden, dass Kreuzungen dieser Stämme mit kompatiblen Wildtyp-FB1 bzw. FB2-Stämmen pathogen sind, während Kreuzungen von FB1 Δ *plp2*- und FB2 Δ *plp2*-Stämmen wie auch die SG200 Δ *plp2*-Stämme vollständig apathogen sind (Daten nicht gezeigt). Der Stamm KPH111 diente nun zur Generierung von *plp2*-Promotor-GFP-Fusionen. Hierfür wurde über homologe Rekombination die Hygromycin-Resistenzkassette von KPH111 durch eine PCR-generierte *gfp*-Carboxinresistenz-Kassette ersetzt, die erzeugten Stämme wurden mit KPH131, KPH132 und KPH136 bezeichnet (Genotyp jeweils: *a1 b1 Δ um04342[P_{um04342}:gfp,ip^R]*). Analog hierzu wurden auch *plp2*-Promotor-GFP-Fusionen in KPH113 erstellt, die erzeugten Stämme wurden mit KPH133, KPH134 und KPH135 bezeichnet (Genotyp jeweils: *a2 b2 Δ um04342[P_{um04342}:gfp,ip^R]*). Infektionsstudien mit Kreuzungen dieser *plp2*-Promotor-GFP-Fusionsstämme mit Wildtyp-Stämmen sollten Aufschlüsse über die Expression von *plp2* im pflanzlichen Gewebe geben. Fluoreszenzmikroskopische Analysen dieser Pflanzeninfektionen zeigten die Abwesenheit von GFP-Signalen in Filamenten auf der Pflanzenoberfläche. Direkt nach der Penetration ist eine starke Induktion des GFP-Markers zu erkennen (siehe Abbildung 24A).

Zur weiteren Analyse der *plp2*-Expression während der pathogenen Entwicklung wurde eine quantitative PCR Analyse durchgeführt. Für die cDNA-Synthese wurde RNA aus verschiedenen Stadien des pathogenen Wachstums verwendet. Es zeigte sich, dass die *plp2*-Expression 24 Stunden nach Infektion eine Induktion aufweist. Die Abundanz von *plp2*-Transkripten steigt jedoch in den späteren Infektionsstadien weiter an. Erst 13 Tage nach Infektion ist ein leichter Rückgang der Expressionsstärke zu beobachten (siehe Abbildung 24B).

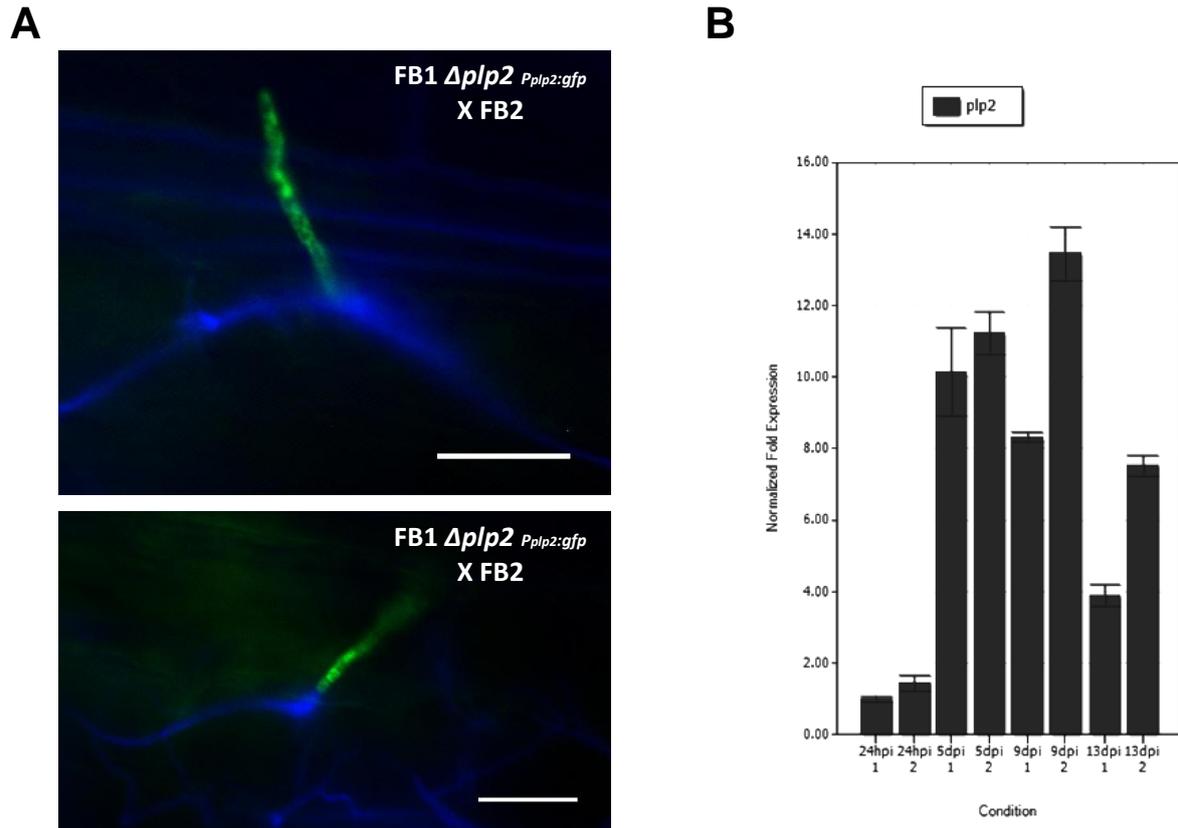


Abbildung 24: Expressionsanalysen für *plp2*. (A) Fluoreszenzmikroskopische Analyse von Infektionsstrukturen auf der Blattoberfläche infizierter Pflanzen 24 hpi. Für die Infektion wurden die kompatiblen haploiden Stämme pKPH131 und FB2 verwendet. In pKPH131 ist ein *gfp*-Gen an den Promotorbereich von *plp2* fusioniert, hierdurch ist die *gfp*-Expression an die Induktion des *P_{plp2}* gekoppelt. Die erfolgreiche Penetration des Dikaryons wird durch das funktionelle *plp2* des Wt-Stammes FB2 gewährt. Pilzhypen sind mit CalcoFluor angefärbt (blau). CalcoFluor färbt lediglich die auf der Oberfläche exponierten Hyphenbereiche und dringt nicht ins Pflanzengewebe ein. GFP-Signale sind in (grün) dargestellt. Auf der Pflanzenoberfläche findet keine *gfp*-Expression statt, da keine Überlappung von blauen und grünen Hyphenbereichen zu beobachten ist. Innerhalb der Pflanze ist ein starkes GFP-Signal zu erkennen. Maßstabsbalken: 20 μ m. (B) Real-Time Quantitative PCR-Analyse der Expression von *plp2* zu den Zeitpunkten 24 hpi (Stammhintergrund SG200), 5 dpi, 9 dpi und 13 dpi (jeweils Tumormaterial von Infektionsexperimenten mit FB1xFB2-Kreuzungen). Eine Induktion der Expression ist bereits 24 hpi zu erkennen, eine starke *plp2*-Induktion findet jedoch erst zu späteren Zeitpunkten der pathogenen Entwicklung statt. Ein leichter Rückgang der Expression ist bei der Sporenbildung (13dpi) zu beobachten. Für jeden der Zeitpunkte wurden zwei biologische Replikate untersucht. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte aus zwei technischen Replikaten, die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung (SD) dar. Die Normalisierung der relativen Genexpression erfolgte durch Verwendung des eukaryotischen Translationsinitiationsfaktor 2b (*eIF2b um04869*) als Referenzgen.

2.3.6 Komparative *in silico*-Proteindomänenanalysen ermöglichten die Identifizierung essentieller Proteindomänen

Um Rückschlüsse auf funktionelle Domänen der Proteinsequenz von Plp2 zu ziehen, wurden bioinformatische Analysen der vorhergesagten Proteinsequenz durchgeführt. Referenzanalysen wurden ebenfalls mit den sequenzhomologen Proteinen Sr15229 aus *Sporisorium reilianum* (<http://mips.helmholtz-muenchen.de/genre/proj/sporisorium/>) und Uh06791 aus *Ustilago hordei* (Kahmann, nicht publiziert) durchgeführt. Das Vorhandensein eines Signalpeptids zur Sekretion wurde in allen drei Proteinhomologen mittels SignalP 4.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) bestätigt (Abbildung 25).

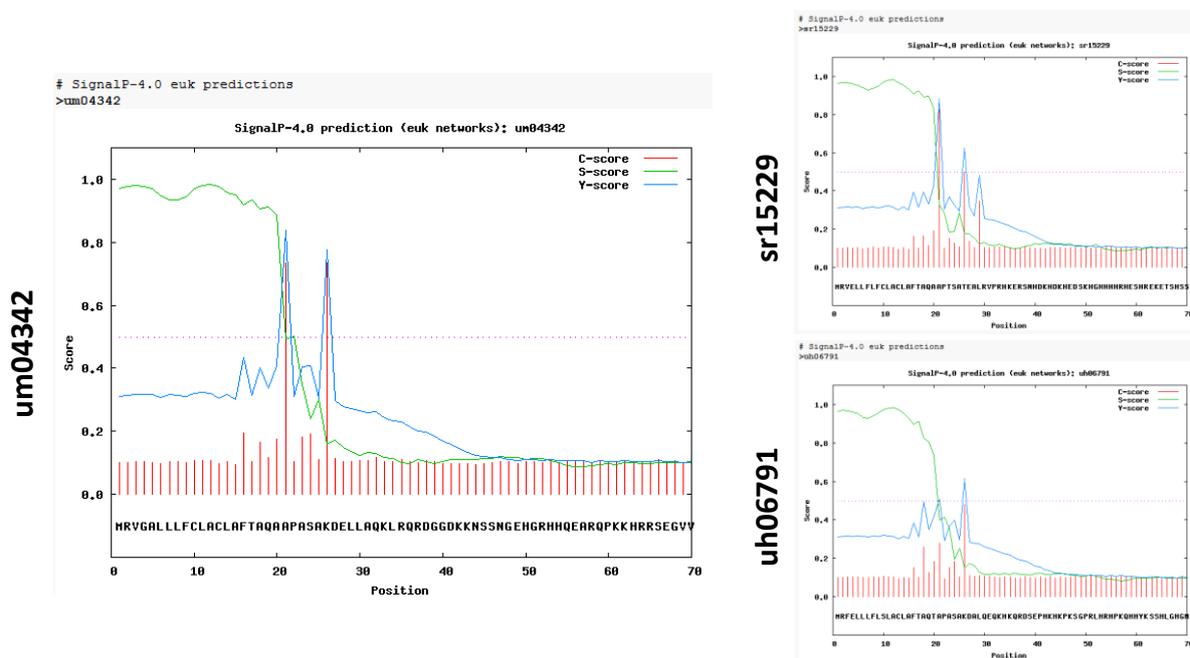


Abbildung 25: SignalP-Analyse der Signalsequenzen. Signalsequenzvorhersage mit SignalP4.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>), vorhergesagte Schnittstelle von umPlp2 nach Aminosäure 20 (AQA-AP), von srPlp2 nach Aminosäure 20 (AQA-AP) und von uhPlp2 nach Aminosäure 25 (ASA-KD).

Ein Vergleich der Proteinsequenzen zueinander wurde mit ClustalW erstellt (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>, Abbildung 26). Hierdurch konnten Proteindomänen mit hoher Sequenzkonservierung auf Aminosäureebene identifiziert werden. Weitere Analysen mittels WoLF PSORT (<http://wolfsort.org/>) und 9aaTAD (<http://www.es.embnat.org/Services/EMBNAT/htdoc/9aatad/>) führten außerdem zur Identifizierung putativer funktioneller Domänen wie Kernlokalisierungs- und Transaktivierungs-Domänen (siehe hierzu auch 2.3.9 und 2.3.10).

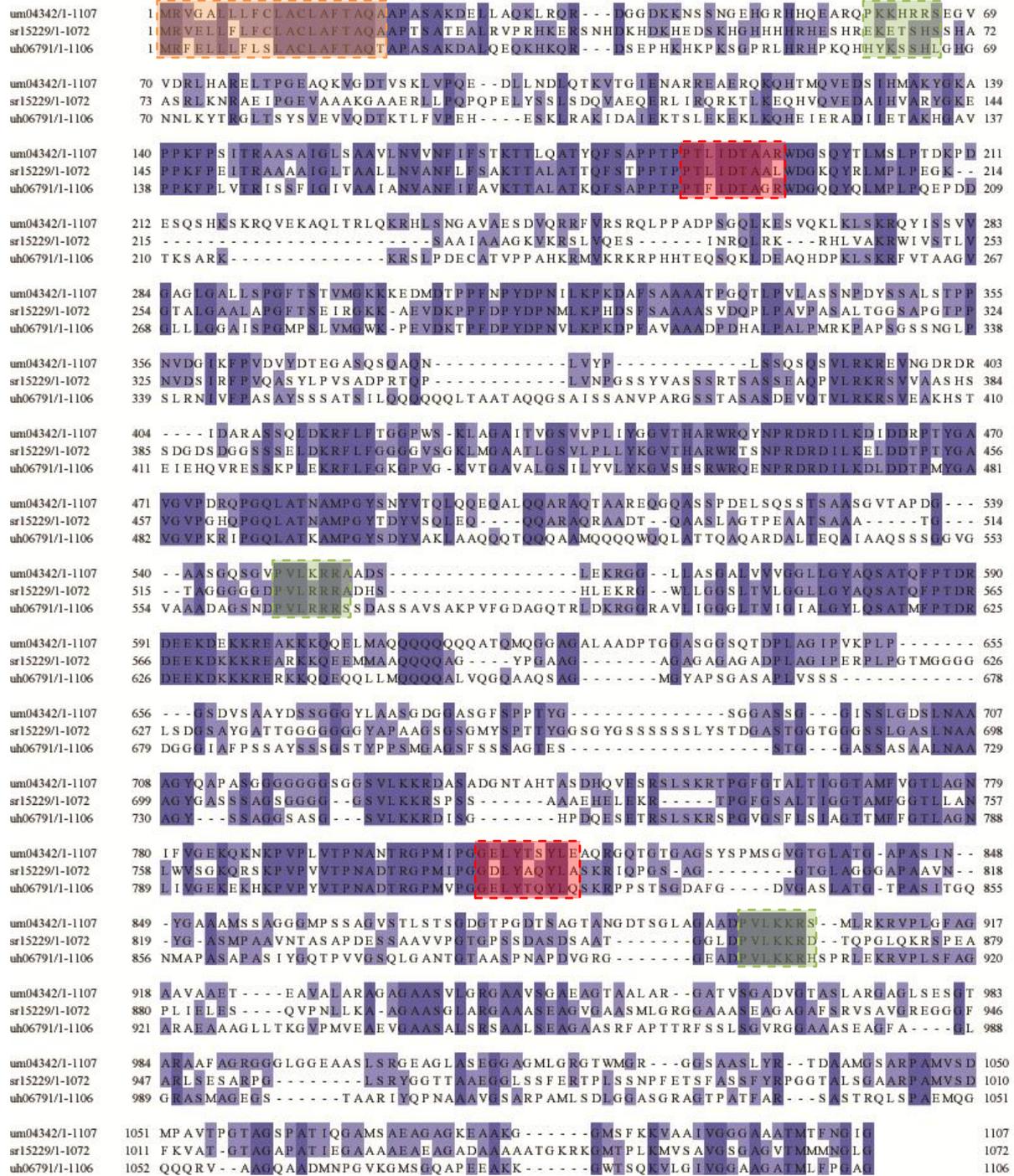


Abbildung 26: Sequenzvergleiche von Plp2 (Um04342) und homologer Proteinsequenzen Sr15229 und Uh06791. Sequenzabgleich der vorhergesagten Proteinsequenzen von umPlp2, srPlp2 und uhPlp2 mit ClustalW2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>) unter Verwendung der voreingestellten Parameter (Protein Weight Matrix: Gonnet; GAP OPEN: 10; GAP EXTENSION: 0.1). Konservierte Bereiche sind in blau dargestellt, die Farbstärke gibt den Grad der Konservierung an. Durch weitere Analysen mit Zusatzprogrammen identifizierte putative Proteindomänen (siehe unten) sind farblich hervorgehoben: **Orange:** Signalpeptid; **Grün:** putative Kernlokalisierungssequenz; **Rot:** putative Transaktivierungsdomäne. Proteinsequenzen von Um04342 und Sr15229 nach MIPS-Datenbank, Proteinsequenz von Uh06781 nach (Kahmann, nicht publiziert).

2.3.7 C-terminale Fusionsproteine von Plp2 sind nicht funktionell

Für die Lokalisierung des Plp2-Proteins in der Pflanze wurden Plp2-GFP-Fusionsproteine erzeugt. Hierfür wurde eine PCR-generierte *plp2::gfp*-Hygromycinresistenz-Kassette in SG200 transformiert, durch homologe Integration des Konstruktes in den 3'-Bereich von *plp2* entstanden die Stämme KPH88, KPH89, KPH90 und KPH91 (Genotyp: *a1mfa2 bW2bE1 um04342:gfp*). Infektionsstudien mit diesen Stämmen zeigten eine Phänokopie des $\Delta plp2$ -Stammes auf. Eine fluoreszenzmikroskopische Lokalisierung des Plp2-GFP-Fusionsproteins in Pflanzenpräparaten war aufgrund einer starken Autofluoreszenz der beobachteten papillären Strukturen nicht möglich (siehe Abbildung 27).

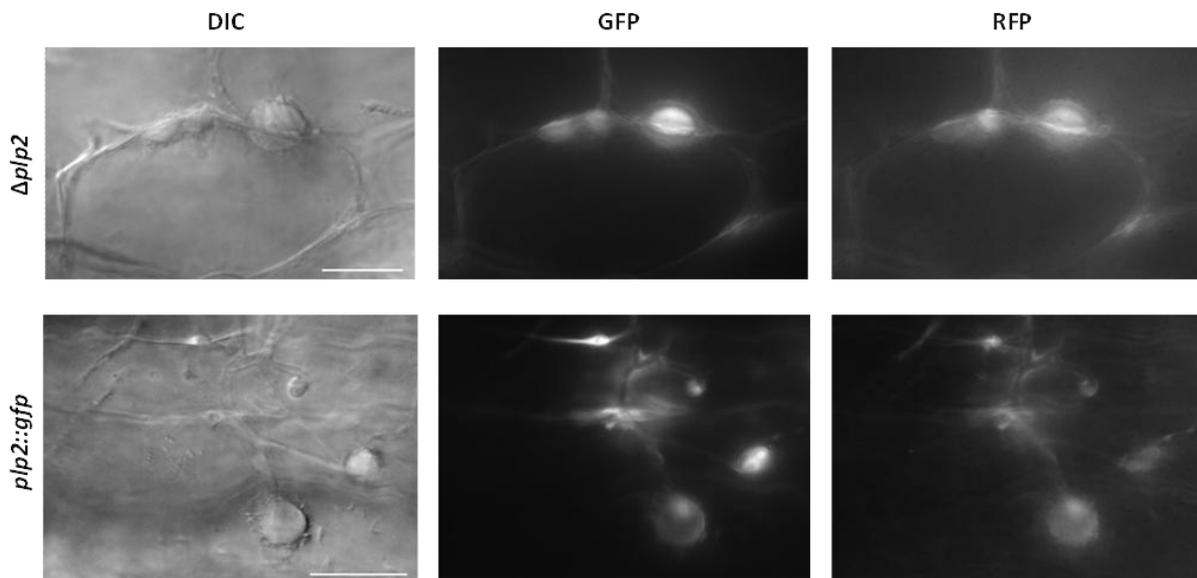


Abbildung 27: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von Infektionsexperimenten mit SG200 $\Delta plp2$ - oder SG200 $plp2::gfp$ -Stämmen. Mikroskopische Aufnahmen der Blattoberfläche drei Tage nach Infektion; der SG200 $plp2::gfp$ -Stamm zeigt dieselbe inkompatible Interaktion mit der Maispflanze wie ein SG200 $\Delta plp2$ -Stamm. Es ist die Bildung großer papillärer Strukturen an allen Penetrationsstellen zu beobachten. Die beobachtete Fluoreszenz dieser Strukturen im GFP-Kanal ist sowohl bei SG200 $\Delta plp2$ - als auch bei SG200 $\Delta plp2::gfp$ -Infektionen zu beobachten und somit nicht auf das Plp2-GFP-Fusionsprotein zurückzuführen. Die im RFP-Kanal beobachtete Autofluoreszenz ist ein weiterer Hinweis auf den unspezifischen Charakter der beobachteten GFP-Signale. Maßstabsbalken: 20 μm .

2.3.8 Ein Komplementationssystem zur Überprüfung synthetischer *plp2*-Mutanten

Zur Identifizierung von für die Proteinfunktion von Plp2 essentiellen Sequenzmotiven wurde ein GATEWAY®-kompatibles Vektorsystem etabliert. Der für diese Komplementationsexperimente verwendete Vektor pJF1 (Farfing 2004) enthält ein unter der Kontrolle des *mig2.5*-Promotors exprimiertes *egfp*-Gen für eine stabile Plasmidintegration in den Carboxinresistenz-vermittelnden *ip*-Lokus. Die Einführung einer GATEWAY®-Kassette zwischen *mig2.5*-Promotor und *egfp* ermöglicht sowohl die schnelle *in vitro*-Rekombination von PCR-generierten mutierten *plp2*-Allelen in diesen Komplementationsvektor als auch, falls gewünscht, die Erstellung von C-terminalen Protein-GFP Fusionen (Vranes, pers. Mitteilung). Mithilfe dieses Systems wurden drei Allele von *plp2* auf die

Fähigkeit zur Komplementation überprüft. Das Wildtyp-Allel *plp2* umfasst den vollständigen *plp2*-ORF inklusive Signalpeptid und Stopp-Codon. Das N-terminal verkürzte Allel $plp2^{\Delta 1-66}$ entspricht einer Deletion des Signalpeptids. Das Allel $plp2^{\Delta 3386-3388}$ umfasst den vollständigen *plp2*-ORF ohne das Stopp-Codon, was im Kontext des verwendeten Komplementationskonstruktes zu einer C-terminalen GFP-Fusion führt (siehe Abbildung 28).

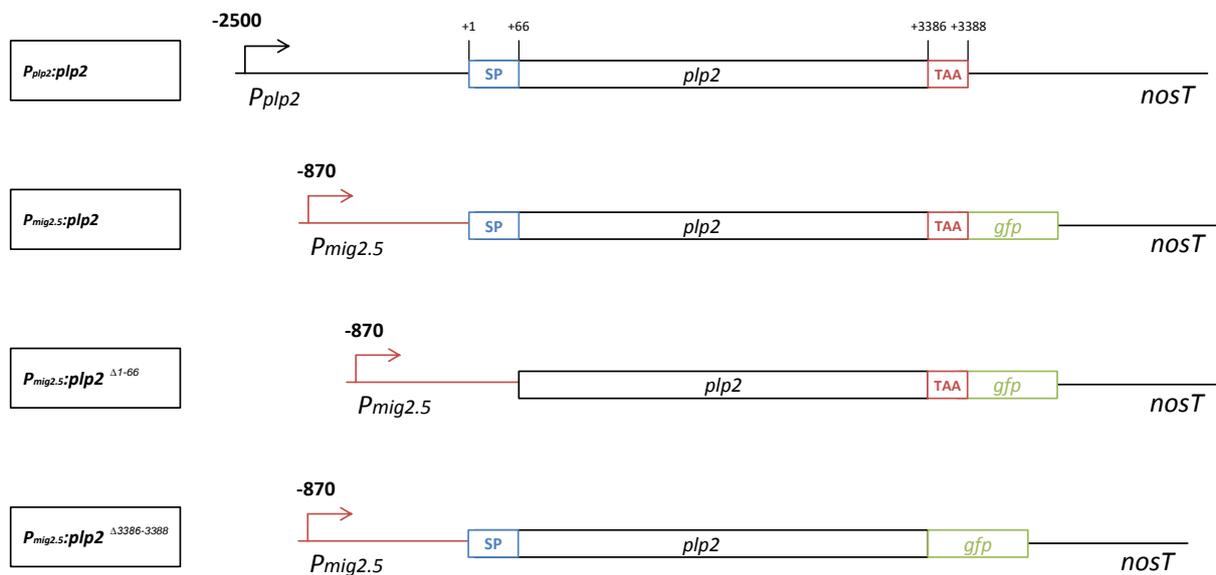
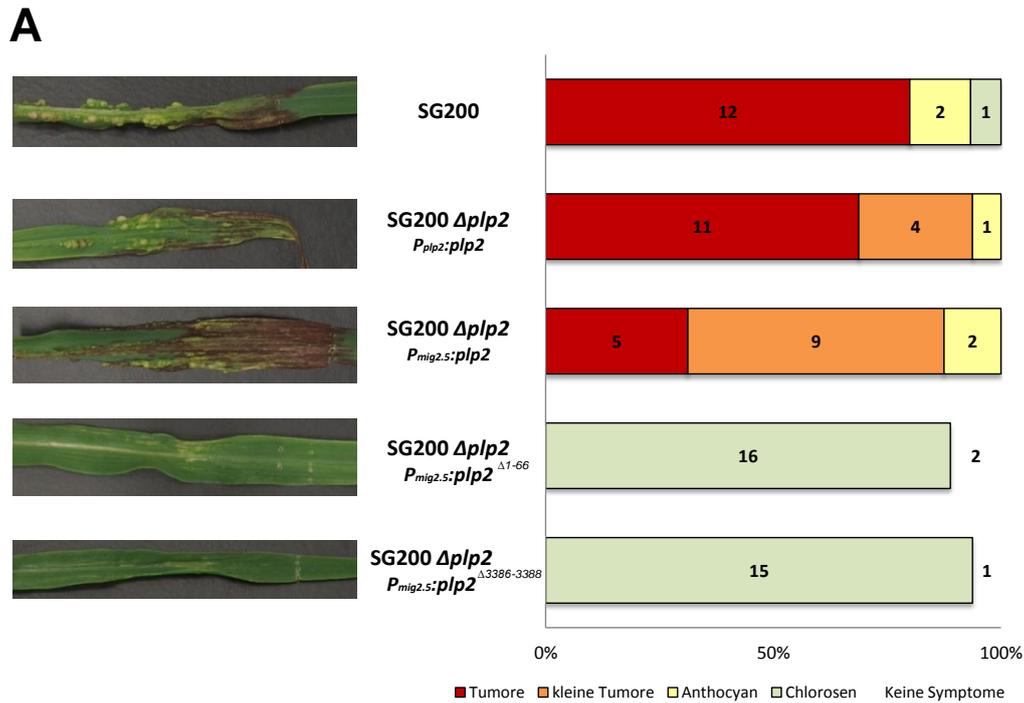


Abbildung 28: Schematische Darstellung der Konstrukte zur ektopischen Komplementation von $\Delta plp2$ -Stämmen. Neben dem Vollängen-Konstrukt unter Kontrolle des endogenen *plp2*-Promotors wurden Konstrukte unter Kontrolle des pflanzeninduzierten *mig2.5*-Promotors hergestellt. In diesem Kontext wurden sowohl *plp2* als auch die modifizierten Allele $plp2^{\Delta 1-66}$ (entspricht einer Deletion des vorhergesagten Signalpeptids) und $plp2^{\Delta 3386-3388}$ (entspricht einer Deletion des Stopp-Codons und somit einer C-terminalen GFP-Fusion) konstruiert. Alle Konstrukte enthielten den *nos*-Terminatorbereich und wurden über homologe Rekombination in den *ip*-Lokus inseriert.

In den folgenden Komplementationsexperimenten wurden SG200 $\Delta plp2$ -Stämme mit diesen Konstrukten transformiert. Die erzeugten Stämme KPH92, KPH93 und KPH94 entsprechen der Integration von $P_{mig2.5}:plp2$ in den *ip*-Lokus, dieses führte zu einer fast vollständigen Rückgewinnung der Pathogenität.

Durch Integration des unter der Kontrolle des $P_{mig2.5}$ stehenden $plp2^{\Delta 1-66}$ Allels, welches einer Deletion des N-terminalen Signalpeptids entspricht, entstanden die Stämme KPH98, KPH99 und KPH100, diese waren wie die Ausgangsstämme vollständig apathogen. Die Stämme KPH95, KPH96 und KPH97 tragen die Integration des Allels $P_{mig2.5}:plp2^{\Delta 3386-3388}$, exprimieren durch das Fehlen des Stoppcodons (siehe Abbildung 28) ein Plp2:GFP-Fusionsprotein unter Kontrolle des $P_{mig2.5}$ und waren ebenfalls apathogen (Eine Zusammenfassung der phänotypischen Analysen findet sich in Abbildung 29). Somit konnte gezeigt werden, dass eine Komplementation unter dem *mig2.5*-Promotor möglich ist. Ebenso konnte erneut bestätigt werden, dass eine C-terminale Proteinfusion die Funktionalität von Plp2 negativ beeinflusst (siehe hierzu auch 2.3.7).



B

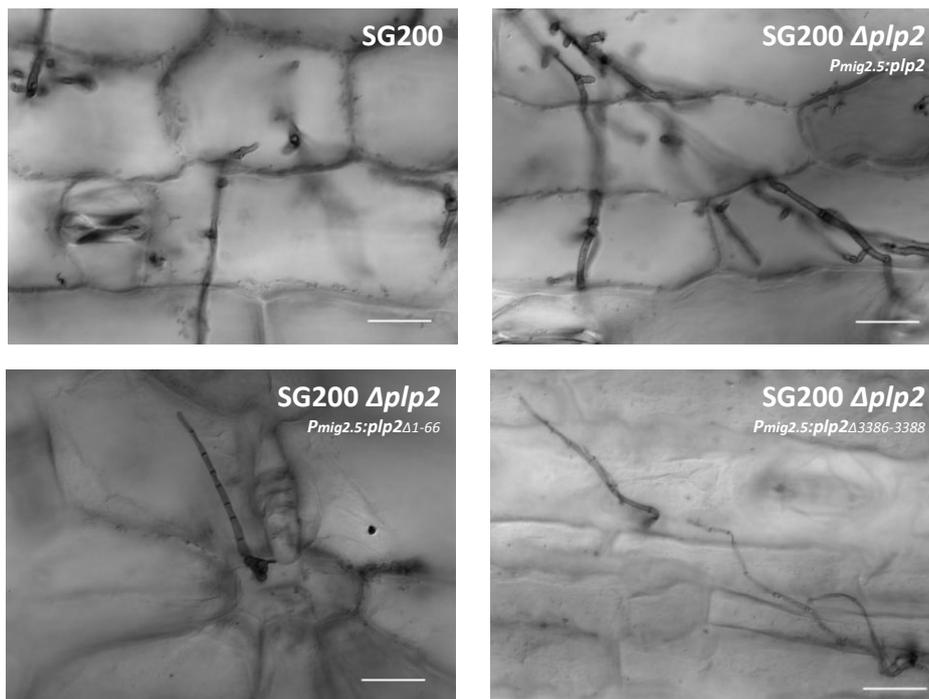


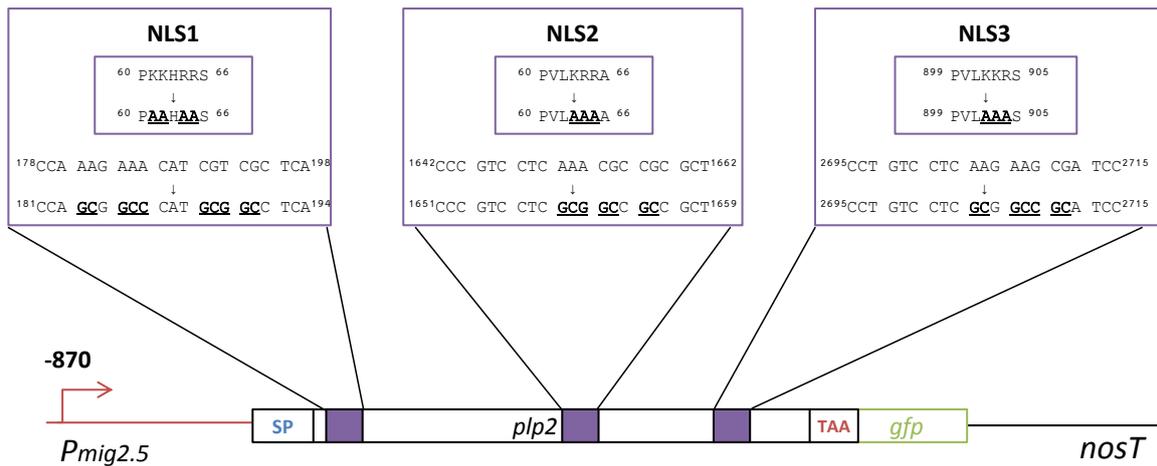
Abbildung 29: Komplementationsexperimente von SG200 $\Delta plp2$ -Stämmen. (A) Krankheitssymptome an Maispflanzen sieben Tage nach Infektion. Links: Fotografien des jeweils dritten Blatts unterhalb der Injektionsstelle; Tumore, Anthocyanbildung und Chlorosen der Blätter sind in der SG200-Infektion sowie in Infektionen mit den SG200 $\Delta plp2$ -Komplementationen mit *P_{plp2}:plp2* und *P_{mig2.5}:plp2* zu beobachten; mit den SG200 $\Delta plp2$ -Komplementationen *P_{mig2.5}:plp2 ^{$\Delta 1-66$}* und *P_{mig2.5}:plp2 ^{$\Delta 3386-3388$}* infizierte Pflanzen zeigen wie SG200 $\Delta plp2$ -Infektionen nur leichte Chlorosen auf. Rechts: Stärke der Krankheitssymptome infizierter Maispflanzen in Infektionsexperimenten; die Anzahl der Pflanzen mit den jeweiligen Symptomen ist angegeben. (B) Mikroskopische Analyse von Chlorazol Black E-angefärbten Maisblättern. Durch die Chlorazol Black E-Färbung werden Pilzzellwände sowohl außerhalb als auch innerhalb des Pflanzenmaterials angefärbt. Sowohl SG200 als auch der mit *P_{mig2.5}:plp2* komplementierte SG200 $\Delta plp2$ -Stamm zeigen die erfolgreiche Proliferation im pflanzlichen Gewebe. Mit den Konstrukten *P_{mig2.5}:plp2 ^{$\Delta 1-66$}* und *P_{mig2.5}:plp2 ^{$\Delta 3386-3388$}* komplementierte SG200 $\Delta plp2$ -Stämme zeigen hingegen keine Proliferation nach der Appressorienbildung auf.

2.3.9 Eine mutierte Kernlokalisierungssequenz beeinträchtigt die Proteinfunktion von Plp2

Anhand von *in silico*-Analysen der Plp2-Sequenz mit und ohne Signalpeptid mittels WoLF PSORT (<http://wolfsort.org/>) konnten drei potentielle Kernlokalisierungssequenzen, NLS1 mit PKKHRRS bei Aminosäure 60 bis 66, NLS2 mit PVLKRRA bei Aminosäure 548 bis 554 und NLS3 mit PVLKKRS bei Aminosäure 899 bis 905, identifiziert werden. Um eine Rolle in der Proteinfunktion zu untersuchen, wurden vier modifizierte *plp2*-Allele mittels PCR-vermittelter Mutagenese hergestellt, in denen jeweils die NLS1, NLS2, NLS3 oder alle drei NLS mutiert wurden. Für die Mutation einer NLS wurden alle für Arginin- oder Lysin-kodierenden Codons mit Alanin-kodierenden Codons ersetzt (Zusammenfassung in Abbildung 30A und 30B). Eine genauere Beschreibung der mutierten *plp2*-Allele findet sich in Anhang 6.7.

Die mutierten *plp2*-Allele wurden mittels GATEWAY®-Klonierung in pJF1_GW1 kloniert und die Konstrukte in den SG200 Δ *plp2*-Stammhintergrund integriert. SG200 Δ *plp2*-Stämme waren nach homologer Integration von $P_{plp2}:plp2^{mutNLS1}$ oder $P_{plp2}:plp2^{mutNLS2}$ in den *ip*-Lokus erneut in der Lage, die Maispflanze zu infizieren und Tumore zu induzieren. Durch Integration von $P_{plp2}:plp2^{mutNLS3}$ oder $P_{plp2}:plp2^{mutNLS123}$ in den *ip*-Lokus konnte der Deletionsphänotyp von SG200 Δ *plp2*-Stämmen hingegen nur partiell komplementiert werden, und dies nur, wenn es sich um eine mehrfache Integration des verwendeten Konstrukts handelte (siehe Abbildung 30C).

A



B

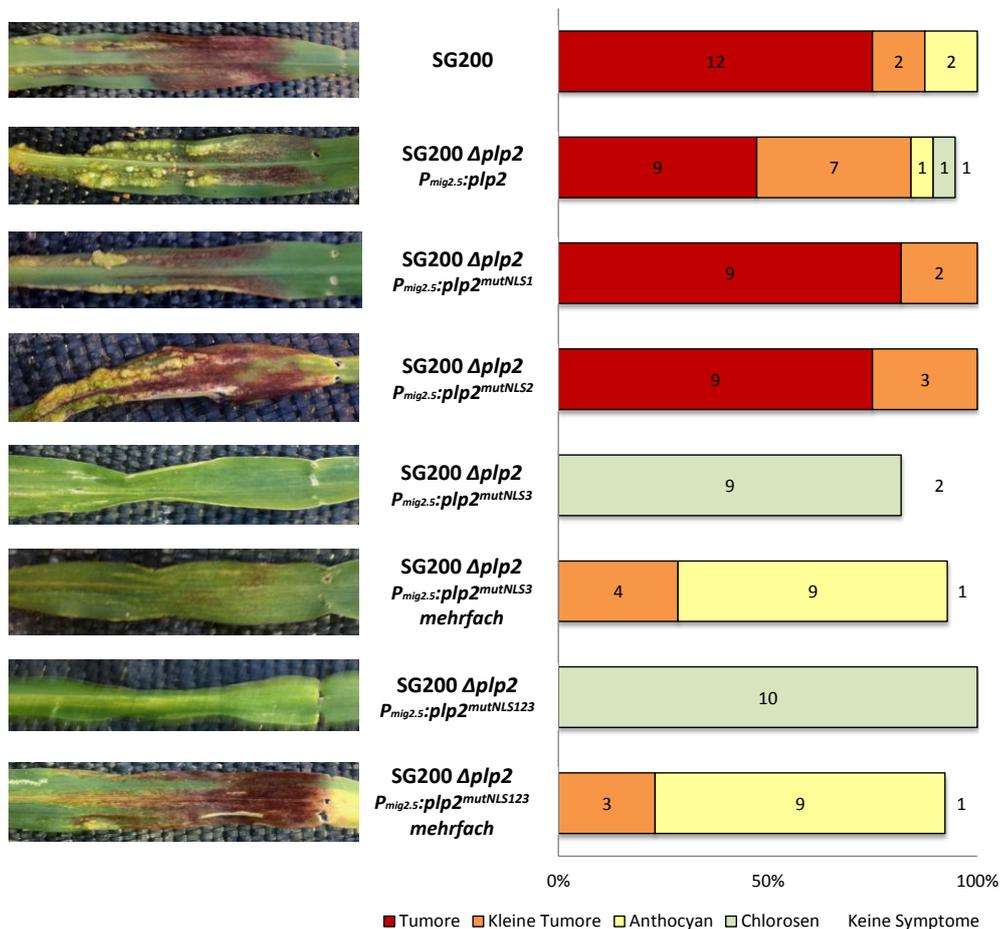


Abbildung 30: Komplementation von SG200 Δ plp2 mit Allelen von *plp2*, welche Mutationen in putativen NLS-Sequenzen aufweisen.

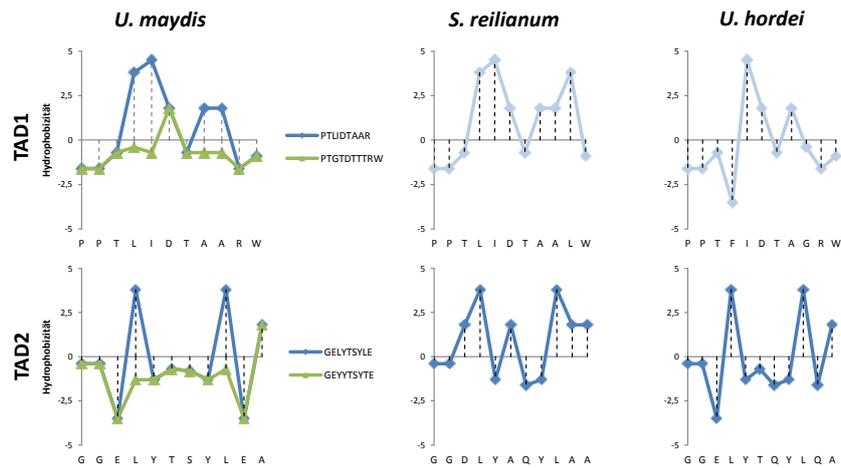
(A) Schematische Darstellung der identifizierten NLS-Sequenzen, angezeigt sind Position im Protein sowie die nativen und mutierten DNA- und Aminosäuresequenzen (B) Krankheitssymptome an Maispflanzen sieben Tage nach Infektion. Links: Fotografien des jeweils dritten Blatts unterhalb der Injektionsstelle; Tumore, Anthocyanbildung und Chlorosen der Blätter sind bei der SG200-Infektion sowie in Infektionen mit den SG200 Δ plp2-Komplementationen durch *P_{mig2.5}:plp2*, *P_{mig2.5}:plp2^{mutNLS1}* und *P_{mig2.5}:plp2^{mutNLS2}* zu beobachten; die SG200 Δ plp2-Komplementationen mit den Konstrukten *P_{mig2.5}:plp2^{mutNLS3}* und *P_{mig2.5}:plp2^{mutNLS123}* verursachen in den Infektionen ähnlich zur SG200 Δ plp2-Infektion nur leichte Chlorosen; Infektionen mit SG200 Δ plp2-Komplementationen mit einer multiplen Insertion der Konstrukte *P_{mig2.5}:plp2^{mutNLS3}* und *P_{mig2.5}:plp2^{mutNLS123}* zeigen Chlorosen und Anthocyanbildung sowie vereinzelte kleine Tumore (<1mm) an den Maispflanzen auf. Rechts: Stärke der Krankheitssymptome infizierter Maispflanzen in Infektionsexperimenten; die Anzahl der Pflanzen mit den jeweiligen Symptomen ist angegeben. Auswertung von Infektionsexperimenten der Komplementationsexperimente.

2.3.10 Eine putative Transaktivierungsdomäne hat Auswirkungen auf die Proteinfunktionalität von Plp2

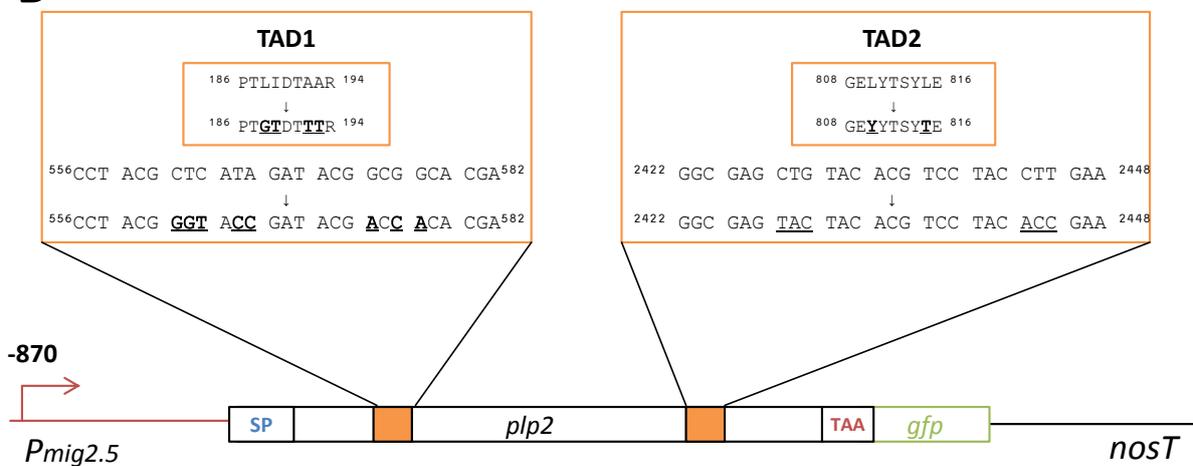
Eine Transaktivierungsdomäne (TAD) spielt eine fundamentale Rolle bei der Interaktion von Transkriptionsfaktoren mit der Transkriptionsmaschinerie. TADs können in ihrer Aminosäuresequenz höchst unterschiedlich sein und lediglich strukturelle Ähnlichkeiten aufweisen, was eine Vorhersage erschwert. Es ist jedoch ein Subtypus von TADs, die sogenannte 9 Aminosäure-Transaktivierungsdomäne (9aaTAD), bekannt. Eine solche kann mittels der bioinformatischen Analysesoftware 9aaTAD (<http://www.es.embnet.org/Services/EMBnetAT/htdoc/9aatad/>) vorhergesagt werden (Piskacek *et al.* 2007). Mit diesem Programm konnten in der Aminosäuresequenz von Plp2 zwei putative 9aaTADs identifiziert werden: Die Sequenz PTLIDTAAR (TAD1) bei Aminosäure 186 und die Sequenz GELYTSYLE (TAD2) bei Aminosäure 808. Es wurden anschließend vergleichende Analysen der Proteinhomologen srPlp2 und uhPlp2 durchgeführt. Während die TAD1 eine wesentlich höhere Sequenzkonservierung aufweist (PTLIDTAAR in *U. maydis*, PTLIDTAAL in *S. reilianum* und PTFIDTAGR in *U. hordei*), konnte der Algorithmus 9aaTAD lediglich die *U. maydis*-Sequenz als Transaktivierungsdomäne identifizieren. TAD2 zeigt eine wesentlich geringere Sequenzkonservierung (GELYTSYLE in *U. maydis*, GDLYAQYLA in *S. reilianum* und GELYTQYLQ) dennoch bleibt der Kontext der Aminosäuren in Bezug auf ihre Hydrophobizität erhalten (siehe Abbildung 31A). Auch konnten alle drei Varianten der Proteindomäne von 9aaTAD als Transaktivierungsdomäne identifiziert werden. Interessanterweise wird für srPlp2 durch 9aaTAD auch eine Transaktivierungsdomäne mit der Sequenz GAAERLLPQ bei Aminosäure 70 vorhergesagt, diese Sequenz ist jedoch weder in umPlp2 noch in uhPlp2 konserviert oder als 9aaTAD zu erkennen. Zur Analyse der putativen Transaktivierungsdomänen wurden wie schon bei den NLS-Sequenzen synthetische *plp2*-Allele durch sequenzspezifische Mutation der TAD-Domänen kreiert. Hierfür wurden die Codons, welche für Aminosäuren der hydrophoben Bereiche der TAD kodieren (Aminosäuren der Gruppe F, L, I, V, A, M), durch Codons ersetzt, welche für neutrale beziehungsweise hydrophile Aminosäuren kodieren (Aminosäuren aus der Gruppe G, S, T, D, E, N, Q, W, Y, R, K und H; siehe Abbildung 31B). Durch PCR-vermittelte Mutagenese wurden so die Allele *plp2^{mutTAD1}* und *plp2^{mutTAD2}* generiert. Die Konstrukte wurden wie zuvor über pJF1_GW1 in den *ip*-Lokus von SG200 Δ *plp2*-Stämmen integriert und auf Komplementation hin überprüft.

Die vollständige Komplementation des Deletionsphänotyps von SG200 Δ *plp2*-Stämmen war möglich, wenn eine Einzelintegration des *P_{mig2.5}:plp2^{mutTAD2}*-Konstruktes in den *ip*-Lokus erfolgte. Die durch Einzelintegration des *P_{mig2.5}:plp2^{mutTAD1}*-Konstruktes in SG200 Δ *plp2* generierten Stämme KPH147 und KPH148 zeigten Chlorosen und Anthocyanbildung in infiziertem Blattgewebe, aber keine Bildung von Tumoren (siehe Abbildung 31C). Mikroskopisch waren keine starken Pflanzenabwehrreaktionen zu beobachten, eine Papillenbildung wie in SG200 Δ *plp2*-Infektionen beschrieben blieb aus und Hyphen zeigten Proliferation im pflanzlichen Gewebe auf (vorläufige Ergebnisse).

A



B



C

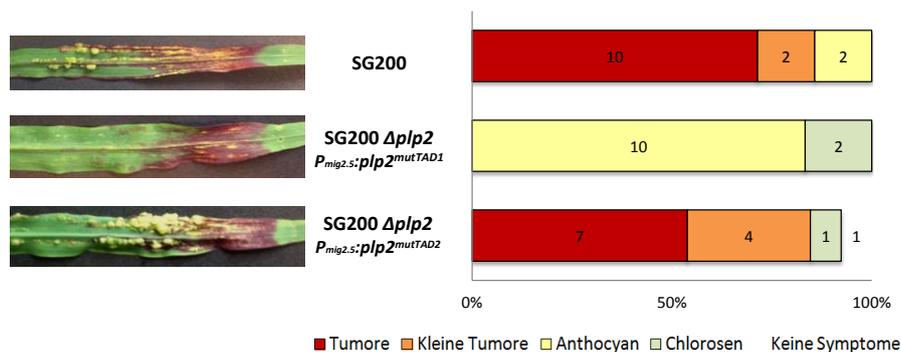


Abbildung 31: Putative Transaktivierungsdomänen von Plp2. (A) Hydrophobizitätsplot der Aminosäuren in den durch 9aaTAD identifizierten putativen Transaktivierungsdomänen von umPlp2 sowie srPlp2 und uhPlp2. TAD1 wurde nur in umPlp2 identifiziert, TAD2 war in allen drei orthologen Proteinen auffindbar. (B) Schematische Darstellung der Lage der putativen TAD von umPlp2 sowie Sequenzänderungen für die mutierten Allele *plp2^{mutTAD1}* und *plp2^{mutTAD2}*. (C) Krankheitssymptome an Maispflanzen sieben Tage nach Infektion. Links: Fotografien des jeweils dritten Blatts unterhalb der Injektionsstelle; Tumore, Anthocyanbildung und Chlorosen sind bei der SG200-Infektion sowie in den Infektionen mit dem SG200 $\Delta plp2$ -Komplementationskonstrukt mit *P_{mig2.5}:plp2^{mutTAD2}* zu beobachten; bei Infektion mit SG200 $\Delta plp2$ -Komplementation mit dem Konstrukt *P_{mig2.5}:plp2^{mutTAD1}* zeigen Maispflanzen leichte Chlorosen und Anthocyanbildung, aber keine Tumore. Rechts: Stärke der Krankheitssymptome infizierter Maispflanzen in Infektionsexperimenten; die Anzahl der Pflanzen mit den jeweiligen Symptomen ist angegeben.

3. Diskussion

3.1 Adhäsion von *Ustilago maydis*

Die Hydrophobizität einer Oberfläche wird als ein zentrales physikochemisches Signal zur Einleitung der pilzlichen Anhaftung und Entwicklung diskutiert (Jones 1994; Tucker und Talbot 2001). So zeigen viele pflanzenpathogene Pilze neben der Wirtsanhaftung auch eine starke Adhäsion an inerte hydrophobe Kunststoffe wie Polystyrol (PS), Polyvinylchlorid (PVC) oder Polytetrafluorethylen (PTFE, auch unter dem Handelsnamen Teflon® bekannt). Die Verwendung hydrophober Kunststoffe ermöglicht auch bei *U. maydis* die mikroskopische Beschreibung von frühen morphologischen und entwicklungspezifischen Vorgängen (Teertstra *et al.* 2006; Berndt 2009; Mendoza-Mendoza *et al.* 2009; Lanver 2010a).

3.1.1 Adhäsionstests mit hydrophoben Kunststoffen

Für die Untersuchung der Adhäsion von *S. cerevisiae* und anderen Pilzen an hydrophobe Plastikoberflächen werden Kulturen auf die Oberfläche von transparenten Kunststoff-Kulturschalen oder in Mikrotiterplatten appliziert. Diese werden nach einer definierten Inkubationszeit mit fließendem Wasser gespült oder in einem Wasserbecken geschwenkt, um nicht-adhärierende Zellen abzuspülen (Barki *et al.* 1993; Reynolds und Fink 2001). Auf der Plastikoberfläche verbliebene Zellen werden mit Kristallviolett angefärbt oder durch fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen nachgewiesen (siehe Abbildung 8). Dies ermöglicht eine qualitative Bestimmung anhaftender Zellen, ist effizient und kostengünstig, doch eine exakte Bestimmung der bei den Waschvorgängen auf die Zellen einwirkenden Scherkräfte ist nicht möglich. Dies schränkt die Reproduzierbarkeit vor allem bei der Untersuchung milder Adhäsionsdefekte ein.

Die Verwendung von Kunststoffoberflächen zur Untersuchung der Substratadhäsion von *U. maydis* bietet den Vorteil, dass Sporidien solopathogener Stämme auf hydrophoben Oberflächen filamentös auswachsen und so die Adhäsion der infektiösen Filamente untersucht werden kann. Das Ausmaß der Filament-Bildung hängt bei *U. maydis* von der Hydrophobizität des Substrats ab, und stark hydrophobe Materialien wie PTFE und Parafilm™ eignen sich besser als Polystyrol, welches für die Herstellung der meisten Laborplastikwaren wie Kulturschalen und Mikrotiterplatten verwendet wird (Berndt 2009; Mendoza-Mendoza *et al.* 2009).

3.1.2 Die Verwendung von CFP- und YFP-markierten Stämmen ermöglicht die komparative Analyse von Oberflächen-Adhäsionsunterschieden

Die starke Anhaftung von *U. maydis* an hydrophobes PTFE ermöglichte die Etablierung eines komparativen Adhäsionstests, der durch die Verwendung von fluoreszenzmarkierten *U. maydis*-Stämmen die Bestimmung der relativen Änderung der Substratadhäsion von Filamenten durch Vergleich mit einem Referenzstamm gestattet (vgl. 2.1.3). Die quantitative Bestimmung von Adhäsionsvorgängen mit diesem System unterliegt jedoch einer Reihe von Einschränkungen. Die fluoreszenzmikroskopische Bestimmung des CFP/YFP-Verhältnisses ist nicht zu jedem Zeitpunkt während der Untersuchungen möglich. Eine verlässliche Bestimmung des CFP/YFP-Verhältnisses kann nur vor der Applikation der Zellsuspension auf die hydrophobe Oberfläche und nach Durchführung der Waschvorgänge erfolgen (siehe Abbildung 10). Eine mikroskopische Betrachtung von Adhäsionsvorgängen während der Waschvorgänge ist nur schwierig durchführbar. Aufgrund dieser Einschränkungen konnte nicht geklärt werden, aus welchen Gründen es zu den beobachteten teilweise starken Fluktuationen bei den ausgezählten CFP/YFP-Verhältnissen bei Wildtyp-SG200-Stämmen kam (vgl. Standardabweichung in 2.1.3 und 2.2.1). So war es nötig, große Zellzahlen für die Bestimmung der CFP/YFP-Verhältnisse vor Applikation und nach den Waschvorgängen auszuwerten, um verlässliche Aussagen über relative Adhäsionsänderungen treffen zu können. Die quantitative Bestimmung der relativen Adhäsionsänderungen gestaltet sich mit dieser Methode daher als arbeitsintensiv. Um die Schwächen dieses komparativen Adhäsionstests zumindest teilweise auszugleichen, wurde ein weiterer, Flusskammer-basierter Adhäsionstest etabliert.

3.1.3 Flusskammer-Adhäsionstests ermöglichen eine Analyse der Oberflächenanhaftung unter definierten Bedingungen

Das erste Flusskammersystem zur mikroskopischen Betrachtung von Zellen in einem laminaren Wasserfluss wurde für die Untersuchung der Adhäsion von Leukozyten entwickelt (Forrester und Lackie 1984). Flusskammersysteme ermöglichten die mikroskopische Betrachtung der Adhäsionsvorgänge von Leukozyten und anderer humaner Zellen in einer laminaren Strömung, wobei die Stärke der Strömung gezielt vom Experimentator bestimmt werden kann. Dieser entscheidende Vorteil von Flusskammersystemen gegenüber herkömmlichen Waschtests führte beispielsweise zur Aufdeckung von Mechanismen der Leukozyten- und Krebszelladhäsion (Usami *et al.* 1993; Ruel *et al.* 1995; Moss *et al.* 1999; Brown und Larson 2001). Flusskammersysteme sind nicht auf die Verwendung mit humanen Zelllinien beschränkt, sondern können ebenso für die Untersuchung von Adhäsionsvorgängen bei Mikroorganismen angewendet werden (Busscher und van der Mei 1995). So konnten Flusskammer-basierte Experimente neue Erkenntnisse über die Adhäsion des humanpathogenen Ascomyzeten *Candida albicans* an inerten Oberflächen wie Silikon, aber auch an humanen Epithelzellen vermitteln (Busscher *et al.* 1997; Glee *et al.* 2001). Flusskammersysteme

eignen sich für Adhäsionsexperimente mit phytopathogenen Bakterien (Laue *et al.* 2008; Bahar *et al.* 2010), *S. cerevisiae* (Guillemot *et al.* 2006) oder phytopathogenen Pilzen wie *Magnaporthe grisea* (Hamer *et al.* 1988) und *Colletotrichum graminicola* (Chaky *et al.* 2001). Im Rahmen dieser Arbeit gelang die Etablierung des Flusskammersystems für eine Verwendung mit *U. maydis*. Hierdurch wurde erstmals eine mikroskopische Beobachtung von den Vorgängen der Sporidienanhaftung in laminaren Strömungen möglich (siehe 2.1.6). Die Analyse der Adhäsion von Filamenten in der Flusskammer war nicht möglich, da mit den verwendeten Stämmen unter den gegebenen Bedingungen keine Bildung von Filamenten beobachtet wurde.

3.1.4 Die Einzeldelationen putativer Adhäsine zeigen keinen identifizierbaren Adhäsionsdefekte

Es konnte bereits gezeigt werden, dass die Deletion einzelner Adhäsine bei pathogenen Pilzen zur Verringerung von Anhaftung und Virulenz führen kann (Gale *et al.* 1998; Brandhorst *et al.* 1999; Loza *et al.* 2004). Zu den bekanntesten Adhäsionsfaktoren biotropher Pilze zählen die Hydrophobine, welche erstmals in *Schizophyllum commune* beschrieben wurden (Wösten *et al.* 1993; Wösten 2001). Hydrophobine sind kleine, Cystein-reiche Proteine und lagern sich nach erfolgter Sekretion spontan zu einem amphiphatischen Proteinfilm zusammen. Dieser Proteinfilm ändert die physikalischen Eigenschaften der Oberfläche und unterstützt die Adhäsion des Pathogens an die Wirtsoberfläche (Wösten *et al.* 1994). In *U. maydis* wurden ebenfalls zwei Hydrophobin-kodierende Gene beschrieben. Keinem der beiden Hydrophobine konnte jedoch eine direkte Rolle in der Substratanhaftung nachgewiesen werden (Teertstra *et al.* 2006). Interessanterweise führt eine Deletion des Hydrophobin-kodierenden *hum3* in Zusammenhang mit einer Deletion von *rsp1*, welches für ein sekretiertes Protein mit Sequenzwiederholungen kodiert, zu einem vollständigen Pathogenitätsverlust, während Einzeldelationen dieser Gene ohne erkennbaren Phänotyp bleiben (Müller *et al.* 2008a). Dieser Pathogenitätsverlust ist jedoch nicht auf eine verminderte Adhäsion, sondern vielmehr auf eine ausbleibende Proliferation im Pflanzengewebe nach erfolgter Penetration zurückzuführen. Welche spezielle Rolle Hum3 in der Pathogenität des Pilzes spielt und welche Funktion Hum2 in der Entwicklung des Basidiomyzeten übernimmt, bleibt offen. Weitere bekannte *U. maydis*-Adhäsine sind die Repellent-Peptide (Teertstra *et al.* 2006). Diese entstehen durch proteolytische Spaltung des Propeptids Rep1, werden sekretiert und bilden einen Hydrophobin-ähnlichen amphiphatischen Film, welcher die Oberflächeneigenschaften des Substrats zu ändern vermag. Die Hydrophobizität von $\Delta rep1$ -Filamenten ist stark reduziert, auf hydrophoben Plastikoberflächen zeigen sie eine verringerte Anhaftung auf. Trotz dieser Einschränkungen zeigen $\Delta rep1$ -Stämme weiterhin volle Virulenz.

In dieser Arbeit wurden weitere putative Adhäsine durch eine Reihe von *in silico*-Analysen identifiziert (siehe 2.2.2). Die Überprüfung der Expressionsprofile von Proteinen mit Sequenzwiederholungen zeigte, dass neben den bereits untersuchten Adhäsine-Genen *rep1*, *hum3* und *rsp2* die Kandidatengene *um00466*, *um00480*, *um03065* und *um05104* eine starke Expression auf der

Pflanzenoberfläche zu Beginn der pathogenen Entwicklung erfahren und somit geeignete Adhäsinkandidaten sind (siehe Tabelle 2).

Durch Analyse von Sequenzhomologien wurden die für sekretierte Proteine kodierenden Kandidatengene *um01204*, *um01513* und *um04211* identifiziert, welche sich ebenfalls durch eine starke Expression zu Beginn der pathogenen Entwicklung auszeichnen (siehe Tabelle 3). Ebenso wurden putative Regulatoren identifiziert, hierzu zählten das für das Tor1-Homolog kodierende *um03216*, das für ein Con7-Homolog kodierende *um02717* sowie das für ein Cag8-Homolog kodierende *um02104* (siehe Tabelle 3 und Tabelle 5). Tor1 ist eine von Pilzen bis zum Menschen konservierte Proteinkinase und in *C. albicans* für seine essentielle Rolle in der Regulation der Expression von Adhäsinen bekannt (Bastidas *et al.* 2009). Con7 ist ein Transkriptionsfaktor, der in *Magnaporthe grisea* essentielle pathogenitätsrelevante Entwicklungsvorgänge wie die Adhäsion und Appressorienbildung kontrolliert (Odenbach *et al.* 2007). Cag8 ist ein Regulator der G-Protein-gekoppelten Signaltransduktion und übernimmt die Rolle eines zentralen Regulators der pathogenen Entwicklung und Hydrophobin-Expression in dem insektenpathogenen Pilz *Metharhizium anisopliae* (Fang *et al.* 2007).

Die Analyse *b*-unabhängig auf der Pflanzenoberfläche induzierter Gene gepaart mit strukturellen Analysen der kodierten Proteinsequenzen ermöglichte schließlich die Identifizierung der putativen Adhäsingene *um03216*, *um04211*, *um01204*, *um03664*, *um05704*, *um04385*, *um02865*, *um06120*. Weiterhin wurden die Kandidaten *um06085* und *um11430* gewählt. Diese Gene kodieren für Proteine, welchen durch SignalP und SecretomeP keine Sekretion vorausgesagt wurde. Sie wurden dennoch ausgewählt, da es sich bei Um06085 um einen membranständigen Transporter handelt und Um11430 eine Sec14-ähnliche Lipid-Bindedomäne trägt, welche häufig in sekretorischen Proteinen auftritt (siehe Tabelle 4 und Tabelle 5). Weitere identifizierte Kandidaten waren das für einen Transkriptionsfaktor kodierende *um10417* sowie *um00286.2*, welches zu den am stärksten *b*-unabhängig-pflanzeninduzierten Genen zählt und für ein Protein kodiert, das durch Sequenzwiederholungen gekennzeichnet ist.

Eine Generierung von Deletionsmutanten für die Kandidatengene *um06085*, *um11430* und *um03216* war nicht möglich. *um06085* kodiert für ein Protein mit Ähnlichkeiten zu Transmembran-Transportproteinen, *um11430* für ein Protein mit Ähnlichkeiten zu Phosphatidyl-Inositol-Transferproteinen und *um03216* für das *U. maydis* Homolog der Tor1 Kinase. Alle drei Proteine könnten eine essentielle Funktion in der Zellmorphologie oder -entwicklung übernehmen. In *Candida albicans* reguliert Tor1 unter anderem die Adhäsinexpression, eine Deletion von *tor1* ist aber aufgrund der essentiellen Funktion der Kinase in Signaltransduktionskaskaden nicht möglich (Bastidas *et al.* 2009).

Mit den 17 erfolgreich generierten Deletionsmutanten wurden eine Reihe phänotypischer Analysen durchgeführt, hierzu gehörten die Untersuchung der Hydrophobizität der Filamente, das Verhalten in Pathogenitätsstudien sowie die anschließende Untersuchung von Adhäsionsvorgängen von Sporidien und Filamenten. Filamentöse *U. maydis* Kulturen auf Aktivkohlemedien sind stark hydrophob. $\Delta rep1$ -Stämme zeigten neben einer geringeren Anhaftung an hydrophobe Oberflächen auch eine niedrigere Hydrophobizität filamentöser Kolonien auf (Teertstra *et al.* 2006). Die hydrophoben Eigenschaften von Pilzhyphen könnten an der Substratadhäsion beteiligt sein (Jones 1994; Tucker und Talbot 2001). Die in dieser Arbeit erstellten Deletionsmutanten putativer Adhäsingene zeigten jedoch keine Änderung der Hydrophobizität von Filamenten auf (siehe Anhang 6.3).

Die durchgeführten Pathogenitätsstudien zeigten die attenuierte Virulenz von $\Delta um00480$ -Stämmen (siehe Abbildung 16). Wie sich jedoch herausstellte, fanden parallel zu dieser Arbeit bereits Untersuchungen zu Um00480 statt, welches als Ortholog zum *S. cerevisiae*-Transmembranmucin Msb2 in *U. maydis* identifiziert wurde. Die verminderte Virulenz von $\Delta msb2$ -Stämmen ist auf dessen Rolle in Signaltransduktion und Appressorienbildung zurückzuführen (Lanver *et al.* 2010b). Weiterhin weisen lediglich die Stämme $\Delta um04248$ und $\Delta um02865$ eine leicht verringerte Virulenz auf. Ob diese auf Adhäsionsvorgänge zurückzuführen ist, bleibt fraglich, da in Adhäsionsexperimenten mit Filamenten keine nennenswerten Adhäsionsdefekte in diesen Stammhintergründen nachgewiesen werden konnten (siehe Abbildung 17). Es ist nicht auszuschließen, dass es sich bei den Genen *um04248* und *um02865* um Virulenzfaktoren handelt, eine weitere Charakterisierung ist unabdingbar, wurde im Rahmen dieser Arbeit jedoch nicht weiter verfolgt. Bei Untersuchungen der Pathogenität von Deletionsmutanten ist zu beachten, dass SG200 und SG200-Derivate eine hohe Virulenz aufzeigen (siehe Abbildung 16). Adhäsionsdefekte müssen nicht mit einem starken Phänotyp einhergehen, wie die unveränderte Pathogenität des $\Delta rep1$ -Stammes belegt. Durch die Verwendung von *U. maydis*-Stämmen mit attenuierter Virulenz kann eine Charakterisierung milder Phänotypen erfolgen. Der Stamm CL13, ein solopathogener haploider Stamm ohne kompatibles Pheromon/Rezeptor-System, zeigt im direkten Vergleich mit SG200 eine deutlich reduzierte Virulenz auf und eignet sich für die Analyse von milden Phänotypen (Bölker *et al.* 1995; Djamei *et al.* 2011).

Ein weiterer Grund, weshalb für den Großteil der Deletionsstämme keine Virulenz- oder Adhäsionsphänotypen beobachtet werden konnten, wäre eine funktionelle Redundanz der deletierten Adhäsionsfaktoren. Pathogene wie nicht-pathogene Organismen besitzen ein großes Repertoire an Adhäsinen mit oftmals überlappenden Funktionen. Die funktionelle Redundanz von Adhäsionsfaktoren ist beispielsweise für eine Vielzahl pathogener Bakterien bekannt und wird einerseits mit der hohen Adhäsionsstärke durch multiple Interaktionen zwischen Zelle und Substrat in Verbindung gebracht. Andererseits stellen Adhäsine oft Elizitoren der Immunabwehr des Wirts da, und eine kompensatorische Expression funktionell ähnlicher, aber strukturell unterschiedlicher Adhäsine kann die Auslösung einer pflanzenseitigen Abwehrreaktion verhindern (Virji 2009). Auch in

niederen und höheren Eukaryoten sind Adhäsionsfaktoren oft funktionell redundant. Sowohl Agglutinine als auch Flokkuline der Bäckerhefe *S. cerevisiae* zeigen überlappende, aber nicht identische Funktionen auf (Zusammengefasst in Dranginis *et al.* 2007). Die große Anzahl unterschiedlicher ALS-Proteine in *C. albicans* deutet auf eine partielle Redundanz einzelner Adhäsine hin (Hoyer *et al.* 2008), und für die Adhäsine Hwp1, Als1 und Als3 von *C. albicans* wurden bereits komplementäre Funktionen beschrieben (Nobile *et al.* 2008). Bei den indirekt an der Adhäsion beteiligten O-Mannosyltransferasen Mnt1p und Mnt2p von *C. albicans* handelt es sich um partiell redundante Faktoren der Glykosylierung von Proteinen, sekretierte Glykoproteine können wiederum als Adhäsionsfaktoren fungieren (Munro *et al.* 2005).

Bei den meisten bekannten Adhäsinen von humanpathogenen Organismen und Vertebraten handelt es sich um Membran-verankerte Proteine. Gerade bei phytopathogenen Pilzen spielen jedoch auch sekretierte Adhäsine eine Rolle, welche nicht in der Membran verankert werden, sondern sich zu einer klebrigen extrazellulären Matrix zwischen Substrat und Pilzhyphe zusammenlagern. Die „Klebrigkeit“ von *U. maydis*-Kolonien auf Agar-Oberflächen (vgl. 6.1.2), die feste Adhäsion von Filamenten an hydrophobe inerte Substrate (siehe 2.1.2) sowie elektronenmikroskopische Aufnahmen (siehe Abbildung 4) deuten auf eine Adhäsion-vermittelnde sekretierte extrazelluläre Matrix (ECM) hin. Eine solche Matrix sekretierter Substanzen ist für eine Vielzahl von phytopathogenen Pilzen beschrieben, doch die genaue Zusammensetzung ist meist unbekannt (Tucker und Talbot 2001; Epstein und Nicholson 2006). Als „Klebstoffe“ einer solchen extrazellulären Matrix werden oftmals Glykoproteine und Proteoglykane genannt (Epstein und Nicholson 2006). Die Wichtigkeit glykosylierter Proteine in der Substratanhaftung zeigt sich bei der Betrachtung von Mutanten, welche einen Defekt in der Glykosylierung aufweisen. O-Mannosyltransferasen sind für die Glykosylierung sekretierter oder membranständiger Proteine verantwortlich. Das Fehlen von solchen Protein-Mannosyltransferasen führt zu einer drastischen Reduktion von Substratanhaftung und Virulenz bei humanpathogenen Pilzen wie *C. albicans* und phytopathogenen Pilzen wie *Magnaporthe grisea* (Timpel *et al.* 1998; Timpel *et al.* 2000; Tucker und Talbot 2001). Auch bei *U. maydis* spielt die Mannosyltransferase Pmt4 eine in der Agar-Adhäsion und der Penetration der Pflanzenoberfläche entscheidende Rolle (Fernandez-Alvarez *et al.* 2009; Fernandez-Alvarez *et al.* 2012). Bei dreizehn von siebzehn in dieser Arbeit untersuchten putativen Adhäsionsfaktoren handelt es sich um sekretierte Proteine unbekannter Funktion. Fünf dieser putativen Adhäsine zeigen drei oder mehr N-Glykosylierungsstellen auf, Um00480 weist sogar sieben und Um06120 zwölf N-Glykosylierungsstellen auf (siehe Tabelle 8 im Anhang). O-Glykosylierungsmuster sind ebenfalls bei elf der dreizehn sekretierten Proteine vorhanden, eine sehr starke O-Glykosylierung tritt offenbar bei den Proteinen Um01513, Um00480 und Um04211 ein (siehe Tabelle 8 im Anhang). Bis auf Um00466 scheinen somit alle identifizierten sekretierten Adhäsinkandidaten mehr oder weniger stark glykosyliert zu sein. Glykoproteine können durch ihre physikochemischen Eigenschaften eine Interaktion des Pilzes mit einem hydrophoben Substrat vermitteln (Epstein und Nicholson 2006). Es ist jedoch zu beachten, dass Adhäsionsvorgänge

der ECM nicht grundsätzlich passiver Natur sind. Sekretierte Esterasen und Cutinasen in der ECM phytopathogener Pilze wie *Colletotrichum lindemuthianum* und *Erysiphe graminis* sorgen beispielsweise für die aktive Degradation der hydrophoben Pflanzencuticula und begünstigen hierdurch sowohl Adhäsion als auch Penetration (Nicholson *et al.* 1988; Pascholati *et al.* 1992; Pascholati *et al.* 1993). Die adhäsionsvermittelnde ECM ist eine heterogene und essentielle Struktur mit einer Vielzahl von funktionell unterschiedlichen und oftmals redundanten Proteinen, und eine Rolle der untersuchten putativen Adhäsion-Kandidaten in der Bildung einer ECM kann nach wie vor nicht ausgeschlossen werden.

3.1.5 *U. maydis*-Sporidien zeigen unipolare Adhäsion an hydrophobe Oberflächen

U. maydis-Sporidien zeigen bereits nach zehn Minuten eine Anhaftung an hydrophobe Plastikoberflächen auf (vgl. 2.1.4). Die Anzahl haftender Zellen steigt innerhalb der ersten 60 Minuten linear an, es ist jedoch davon auszugehen, dass sich ein Großteil der Zellen innerhalb der ersten zehn Minuten auf dem Substrat niedergelassen hat (Daten nicht gezeigt). Dies deutet auf eine aktive Produktion und Sekretion von Adhäsionsfaktoren hin. Substratadhäsion durch bereits in der Zellwand der Sporidie verankerte Adhäsine würde einen massiven Anstieg der Zellzahl in den ersten 15-20 Minuten und eine anschließende Sättigung erwarten lassen. Die komparative Untersuchung der Sporidienanhaftung unterliegt denselben Einschränkungen wie die komparative Untersuchung der Adhäsion von Filamenten. Um die Vorgänge der initialen Sporidienanhaftung besser verstehen zu können, wurden mit dem Flusskammersystem die Stadien der Sporidienanhaftung mikroskopisch analysiert.

Die Anhaftung eines Großteils der Sporidien scheint nicht über die gesamte Zelloberfläche vermittelt zu werden, sondern findet gerichtet an einem der Zellpole statt. Bei dem Reispathogen *Magnaporthe grisea* findet nach dem Auskeimen die Anhaftung der Keimschläuche an der Sporenspitze über die Sekretion einer klebrigen Matrix, der sogenannten STM („spore tip mucilage“ oder Schleimstoffe der Sporenspitze) statt (Koga und Nakayachi 2004). Unsere Beobachtungen zeigen, dass die Anhaftung von *U. maydis*-Sporidien über einen vergleichbaren Mechanismus stattfindet. Erst kürzlich konnte der gerichtete Transport und die apikale Sekretion der Zellwand-modifizierenden Chitinsynthase Mcs1 in *U. maydis*-Sporidien gezeigt werden (Schuster *et al.* 2012). Somit ist gezeigt, dass für das filamentöse Wachstum benötigte Proteine gerichtet am Zellpol sekretiert werden können. Aus diesem apikalen Teil der Sporidie entwickelt sich die Hyphenspitze. In vielen filamentösen Pilzen wurde eine hochorganisierte dynamische Struktur beschrieben, die den Namen „Spitzenkörper“ trägt und das gerichtete polarisierte Wachstum der Hyphe organisiert (Zusammengefasst in Virag und Harris 2006). Komponenten dieses Spitzenkörpers wie der Exozyst vermitteln die apikale Exozytose von sekretorischen Vesikeln (Zusammengefasst in Sudbery 2011). Die apikale Sekretion von Proteinen

bereits im sporidialen Stadium vermittelt somit auch die initiale Anhaftung von Sporidien, welche im Begriff sind, das filamentöse Wachstum einzuleiten.

3.1.6 Die Sporidien-Anhaftung wird durch unbekannte Faktoren beeinflusst

Die physikalischen und chemischen Reize, welche die Expression und Sekretion von adhäsionsfördernden Glykoproteinen in *U. maydis* induzieren, sind bisher nicht bekannt. Sporidien, welche auf hydrophobe PTFE-Folien aufgesprüht wurden, zeigen bereits nach 10 Minuten eine Tendenz zur Oberflächenadhäsion, jedoch konnte sich diese in ihrer Stärke experimentabhängig unterscheiden. Bei Untersuchungen in der Flusskammer zeigten Sporidien in der Regel nur eine sehr geringe Neigung zur Oberflächenanhaftung, vereinzelt war jedoch eine sehr starke Anhaftung mit teilweise bis zu 90% anhaftender Zellen zu beobachten (siehe Abbildung 18). Auftretende Fluktuationen bei der Substratanhaftung von Sporidien konnten teilweise mit den Wachstumsbedingungen der Ausgangsstämme in Verbindung gebracht werden. Eine massive Sporidienanhaftung trat vermehrt auf, wenn die Ausgangsstämme, welche zur Inokulation der Vorkultur verwendet wurde, für einen oder mehrere Tage im Kühlschrank aufbewahrt wurden (Daten nicht gezeigt). Bei jungen Ausgangskulturen, welche maximal drei Tage auf der Medienplatte angewachsen und zwischenzeitlich nicht unter 28 °C inkubiert wurden, war hingegen in der Regel nur eine minimale Anhaftung der Sporidien in der Flusskammer zu beobachten (siehe Abbildung 18). Für *S. cerevisiae* ist bekannt, dass eine Vielzahl von Umweltfaktoren zur Induktion der Adhäsion-Expression beitragen kann, viele Umweltsignale werden über MAP-Kinasekaskaden oder cAMP-PKA-abhängige Signaltransduktion vermittelt (Zusammengefasst in Brückner und Mösch 2012). Auch in *U. maydis* spielen MAPK-Kaskaden und die cAMP-PKA-vermittelte Signaltransduktion eine essentielle Bedeutung bei der Erkennung von Umweltfaktoren (Zusammengefasst in Brefort *et al.* 2009). Solche Signalkaskaden zeichnen sich allerdings durch ihre schnelle Respons auf perzipierte Stimuli aus. Bei den untersuchten Stämmen lag der Zeitraum der stationären Wachstumsphase jedoch bereits 8 und 12 Verdopplungszyklen zurück. Es ist daher unwahrscheinlich, dass durch Signalkaskaden vermittelte Stimuli für die beobachteten Fluktuationen verantwortlich sind. Wenngleich es an dieser Stelle hoch spekulativ ist, könnten auftretende Fluktuationen ein Hinweis auf die epigenetische Regulation der beteiligten Adhäsine sein. Eine etablierte genomische Prägung könnte auch nach vielen Verdopplungszyklen die Expression von Adhäsion-Genen beeinflussen. Die hier gezeigten Ergebnisse deuten an, dass unter optimalen Wachstumsbedingungen Adhäsion-Gene epigenetisch dereguliert werden, so dass auch beim Kontakt mit einer hydrophoben Oberfläche keine Adhäsionproduktion stattfindet. Sind ein oder mehrere Wachstumsfaktoren erschöpft, gehen Sporidien in die stationäre Phase über. Halten diese ungünstigen Bedingungen über einen längeren Zeitraum an, kommt es zu Änderungen im epigenetischen Prägungsmuster. Zusammenhänge zwischen epigenetischen Regulationsmechanismen und der Differenzierung von Pilzzellen beim Übergang in

die stationäre Phase konnte bereits bei *S. cerevisiae* nachgewiesen werden (Aragon *et al.* 2008). Dass Adhäsine tatsächlich einer epigenetischen Regulation unterliegen, konnte bereits mehrfach gezeigt werden. Für *S. cerevisiae* ist bekannt, dass viele Laborstämme im Laufe ihrer Evolution die Fähigkeit zur Flokkulation verloren haben. Einer der Gründe hierfür ist die epigenetische Deregelung der beteiligten Flokkuline (Halme *et al.* 2004). Auch in *Candida glabrata* konnte für Virulenz-verknüpfte Oberflächenproteine der Epa-Klasse eine epigenetische Regulation nachgewiesen werden (De Las Penas *et al.* 2003). Weitere Pathogene, darunter *Plasmodium falciparum* und *Trypanosoma spp.*, weisen ebenfalls subtelomerische Anreicherungen von Glykoproteinen auf (Zusammengefasst in Verstrepen und Fink 2009). Die epigenetische Deregelung von nicht-benötigten Adhäsingenen könnte somit ein allgemeines Phänomen bei der Regulation von Adhäsion bei eukaryotischen Organismen sein.

3.1.7 Etablierung einer Anreicherungs Methode zur Identifizierung von Adhäsinen durch heterologe Expression in *Saccharomyces cerevisiae*

Die heterologe Expression von Adhäsingenen ermöglicht die Identifizierung eines einzelnen Adhäsionsfaktors unabhängig davon, ob dieser eine funktionelle Redundanz zu anderen Adhäsinen aufweist. In Anreicherungs Methoden können Adhäsine gezielt anhand ihrer Adhäsions-vermittelnden Funktion isoliert werden. Dies erfordert die Expression der Adhäsine in einem Organismus, der selbst keine Substratadhäsion aufweist oder dessen Substratadhäsionsfähigkeit herabgesetzt ist. Der Ascomyzet *Saccharomyces cerevisiae* eignet sich hervorragend für die heterologe Expression von Adhäsinen, da Adhäsionsvorgänge in diesem Modellorganismus vergleichsweise gut verstanden sind. *S. cerevisiae* ist nicht pathogen und weist keinerlei Adhäsion an humane Epithelzellen auf. Durch Expression einer *Candida albicans* Genbank in *S. cerevisiae* konnte das *Candida*-Adhäsigen *ALS1* identifiziert werden, dessen Expression es *S. cerevisiae* Zellen ermöglicht, an humane Epithelzellen anzuhaften (Barki *et al.* 1993; Fu *et al.* 1998b).

Wildtyp-*S. cerevisiae*-Stämme können an hydrophobe Plastikoberflächen anhaften. Die Genprodukte, welche maßgeblich an dieser Substratadhäsion beteiligt sind, sind bekannt. Die spezifische Deletion beteiligter Adhäsine ermöglicht die Generierung von Stämmen, welche in ihrer Substratadhäsion eingeschränkt und somit für Anreicherungsversuche geeignet sind. Die Adhäsion von *S. cerevisiae*-Zellen an Plastikoberflächen wird vorrangig durch das Flokkulin Flo11 vermittelt. *flo11Δ*-Stämme zeigen eine drastisch reduzierte Substratadhäsion (Reynolds und Fink 2001). Ein weiterer Faktor mit einer zentralen Rolle in der Substratanhaftung ist Flo8, hierbei handelt es sich um einen transkriptionellen Regulator der Flokkulinexpression, der neben der Flokkulation auch die Anhaftung an hydrophobe Oberflächen durch Induktion von Adhäsigen-Genen wie *FLO11* steuert (Kobayashi *et al.* 1999). Durch die Verwendung von adhäsions-defizienten *flo8Δ*- oder *flo11Δ*-Hefestämmen sowie die Verwendung einer Flusskammer für die Anreicherung konnte beispielsweise das *Candida*-Adhäsigen

Epa1 identifiziert werden, welches den Adhäsionsverlust der Mutantenstämme zu komplementieren vermag (Li und Palecek 2003).

Die in dieser Arbeit etablierte Anreicherungsreihe richtete sich nach dem Protokoll von (Li und Palecek 2003). Für die Anreicherungen wurde der *flo11Δ*-Hefestamm YHUM0924 verwendet, ein Σ 1278b-basierter Stamm mit *ura3-52* Auxotrophiemarker. Als Wildtyp-Kontrolle diente der Stamm YHUM0909, ebenfalls ein Σ 1278b-Derivat mit dem *ura3-52* Auxotrophiemarker.

Die ersten Flusskammer-Untersuchungen zeigten, dass *flo11Δ*-Stämme durchaus eine verringerte Adhäsion aufzeigen, dieser Effekt jedoch stark von den verwendeten Medien abhängt. So zeigen Hefezellen nach der Anzucht in SD-Vollmedium große Schwankungen im Adhäsionsverhalten und eine Flo11-unabhängige Adhäsion an hydrophobes PTFE (siehe Abbildung 19). Das Auftreten von Flo11-unabhängiger Adhäsion an Plastikoberflächen ist bekannt, die molekularen Grundlagen sind hingegen noch nicht erforscht (S. Brückner, pers. Mitteilung). Offenbar können auch andere Flokkuline wie Flo1, Flo5, Flo9 und Flo11 stamm- und umweltabhängig ebenfalls Substratadhäsion vermitteln (Van Mulders *et al.* 2009). Um die Flo11-unabhängige Adhäsion gering zu halten wurden alle Anreicherungsreihen in YEPD-Medium durchgeführt. In diesem Medium war sowohl in Glukose als auch in Galaktose keine Adhäsion von *flo11Δ*-Zellen zu beobachten (siehe Abbildung 19).

Die cDNA für die in den Anreicherungsreihen verwendete Genbank wurde aus mRNA transkribiert, welche aus sechs Stunden alten Filamenten auf hydrophober Oberfläche gewonnen wurde (siehe 6.6). Zu diesem Zeitpunkt ist mit einer starken Adhäsion-Expression zu rechnen, da polares Wachstum und Adhäsion im Zentrum der Entwicklung des frühen Filaments stehen. Die gewonnene cDNA wurde in den binären Vektor pKPH48 kloniert, dieser ermöglicht eine Galaktose-induzierbare Expression in *S. cerevisiae*. Die induzierbare Expression hat mehrere Vorteile. Die konstitutive Expression von Fremdgenen, darunter auch Adhäsine, in *S. cerevisiae* könnte wachstums-mindernde oder sogar zytotoxische Wirkung zeigen und hierdurch die Effizienz der Transformation oder auch der Anreicherungsreihen herabsetzen. Zugleich ermöglicht der verwendete *GALL*-Promotor die Reprimierung der Fremdgenexpression durch Verwendung von Glukose. Somit kann direkt überprüft werden, ob die Adhäsion isolierter Klone durch die Fremdgen-Expression oder Fremdgen-unabhängig durch andere Faktoren hervorgerufen wird. Nach der erfolgreichen Generierung der cDNA-Bank wurde diese in den *flo11Δ*-Stammhintergrund eingeführt und für Anreicherungsreihen mit der Flusskammer herangezogen (siehe 6.6.5).

Die Anreicherungsreihen der Genbank wurden in der Flusskammer unter definierten Bedingungen durchgeführt. Es zeigte sich erneut eine starke Flo11-unabhängige Substratadhäsion. Diese starke Adhäsion trat ausschließlich bei der Galaktose-Induktion bei Plasmid-tragenden Stämmen auf, während sowohl Wt- als auch *flo11Δ*-Stämme ohne Plasmid in Galaktose-haltigem Medium keine vergleichbare Adhäsion aufwiesen (siehe Abbildung 19). Interessanterweise war diese Adhäsion

abhängig vom Vorhandensein des Plasmids, nicht jedoch von dem enthaltenen Gen. So zeigten auch das GFP-Kontrollplasmid pKPH124-tragende Stämme eine intensive Oberflächenadhäsion. Aus welchem Grund plasmidtragende *flo11Δ*-Stämme bei der Induktion der Fremdenexpression eine Flo11-unabhängige Adhäsion an hydrophobe Oberflächen aufweisen, bleibt unklar. Die Regulation der *S. cerevisiae*-Flokkuline ist komplex. Alleine für die Regulation der *FLO11*-Expression sind unterschiedlichste Umweltsignale wie Aminosäure-, Stickstoff- und Glukoseverfügbarkeit und pH-Wert über eine Vielzahl von Signalkaskaden mit der Aktivität von über 20 Transkriptionsfaktoren und mindestens zwei Chromatinmodifikatoren verknüpft (Brückner und Mösch 2012). Es ist zu erwarten, dass die Kontrolle anderer Flokkuline einer ähnlich komplexen Regulation unterliegt. Es kann nicht abschließend geklärt werden, warum der *S. cerevisiae*-Stammhintergrund YHUM0924 Flo11-unabhängige Substratadhäsion aufweist. Es besteht jedoch auch die Möglichkeit, weitere adhäsionsdefiziente Hefestämme für eine Expression der Genbank in Betracht zu ziehen.

Es konnte bereits gezeigt werden, dass die Expression des *Candida*-Adhäsins Epa1 in *S. cerevisiae* eine Substratadhäsion nicht nur in *flo11Δ*-Stämmen, sondern auch in *flo8Δ*-Stämmen vermittelt (Li und Palecek 2003). Flo8 ist ein zentraler Regulator der Adhäsinexpression und *flo8Δ*-Stämme zeigen keinerlei Flokkulation und Oberflächenadhäsion aufzeigen (Kobayashi *et al.* 1996; Kobayashi *et al.* 1999). Es besteht die Möglichkeit, dass die Flo11-unabhängige Substratadhäsion in *flo8Δ*-Stämmen ebenfalls ausbleibt. Durch eine Verwendung eines *flo8Δ*-Stammhintergrund könnte die erfolgreiche Anreicherung Adhäsions-vermittelnder Genkandidaten aus der erstellten Genbank gewährleistet werden.

3.1.8 Mögliche Erweiterungen des Flusskammersystems

Die Etablierung des Flusskammersystems ermöglichte erstmals die Untersuchung von *U. maydis* in einer laminaren Strömung. Die Anwendbarkeit des Flusskammersystems kann noch erweitert werden. Die wichtigste benötigte Erweiterung ist die Untersuchung von Filamenten im laminaren Fluss, da dies die Charakterisierung von Komponenten der extrazellulären Matrix ermöglichen würde. In den beschriebenen Experimenten konnte unter Flusskammerbedingungen keine Bildung von Filamenten durch SG200-Sporidien beobachtet werden. Auf hydrophoben Oberflächen findet das Hyphenwachstum von SG200 vorrangig an der Peripherie der Suspensionstropfen statt. Das Vorhandensein einer Luft-Wasser-Grenzschicht könnte eine wichtige Rolle in der Induktion des filamentösen Wachstums spielen. Solche Grenzflächen existieren in der Flusskammer nicht, das verwendete Flusskammersystem erfordert für einen konstanten laminaren Fluss den vollständigen Ausschluss von Luft. Für eine Untersuchung von Filamentadhäsion im Flusskammersystem müsste eine Induktion des filamentösen Wachstums stattfinden. Chemische Reize wie die zusätzliche Applikation von Hyaluronsäure und Chitinmonomeren, die filamentöses Wachstum auf hydrophoben Oberflächen anregen können (Mendoza-Mendoza *et al.* 2009), könnten auch in der Flusskammer einen vergleichbaren Effekt zeigen. Der lipophile Charakter dieser Substanzen könnte jedoch eine

Verwendung in der mit Wasser gefüllten Flusskammer unmöglich machen, Zellen müssten vor der Applikation in die Flusskammer entsprechend vorinkubiert werden. Eine weitere Möglichkeit zur Induktion des *b*-vermittelten filamentösen Wachstums ist die Verwendung eines Stammes wie AB31, in dem die C-Quellen-abhängige Induktion eines kompatiblen bE/bW-Heterodimers möglich ist (Brachmann 2001). Die Expressionsstärke des bE/bW-Heterodimer ist in diesen Stämmen deutlich stärker als in SG200, was mit einer stärkeren Bildung von Filamenten einhergeht.

Die sekretierte extrazelluläre Matrix von *U. maydis*-Filamenten vermittelt eine starke Oberflächenadhäsion. Die Redundanz einzelner Adhäsine in solchen Biofilmen erschwert ihre Charakterisierung, eine Abschwächung der Gesamtadhäsion könnte jedoch die Charakterisierung einzelner Adhäsine vereinfachen. Eine Reihe chemischer Agenzien zur Modulation von Adhäsionsstrukturen ist bereits bekannt. Lektin-ähnliche Bindungen können beispielsweise durch die Zugabe von kompetitiv inhibierenden Zuckern wie Mannose aufgelöst werden (Stratford 1989). Eine Reihe von chemischen Agenzien zur Deglykosylierung von Glykoproteinen steht ebenfalls zur Verfügung, deren Anwendung in der Flusskammer empfiehlt sich aufgrund der hohen Toxizität solcher Substanzen jedoch nicht. Grundsätzlich zeigen Biofilm-inhibierende Substanzen oft zytotoxische Wirkung, es konnten aber auch Substanzen identifiziert werden, welche nur eine schwache Toxizität aufweisen. Hierzu gehört die aus Seegrass (*Zostera marina*) isolierte phenolische Zosterinsäure (p-Sulfooxy-Zimtsäure). Diese kann die Adhäsion und Biofilmbildung bei einer Reihe von Pilzen wie *Candida albicans*, *Magnaporthe grisea* und *Colletotrichum lindemuthianum* inhibieren (Stanley *et al.* 2002; Villa *et al.* 2010; Villa *et al.* 2011). Glykosylierungsinhibitoren wie Tunicamycin oder das Lektin ConA (Concanavalin A) könnten ebenfalls zu einer konzentrationsabhängigen Abschwächung der Oberflächenadhäsion verwendet werden (Apoga *et al.* 2001). Es gibt demnach eine Reihe von Substanzen, deren Verwendung die Charakterisierung von milden Adhäsionsdefekten von Filamenten der erstellten Deletionsmutanten in der Flusskammer ermöglichen könnte.

3.1.9 Zusammenfassung und Ausblick

Die Untersuchung von Adhäsionsvorgängen bei der Substratanhaftung ist mit Einschränkungen möglich, doch eine *de novo*-Identifizierung von Adhäsinen ist auch in der postgenomischen Ära von *U. maydis* weiterhin schwierig. Die vorliegenden Ergebnisse deuten darauf hin, dass Substratadhäsion bei *U. maydis* in einigen Bereichen Ähnlichkeiten zu anderen phytopathogenen Pilzen aufweist, doch eignen sich nicht alle Entwicklungsstadien für die Untersuchung von Adhäsionsvorgängen. Die in dieser Arbeit etablierten Methoden sind ein guter Ansatz für die Untersuchung von Adhäsion. Der Identifizierung und molekularen Charakterisierung einzelner Adhäsine muss jedoch erst ein genaueres Verständnis jener entwicklungsspezifischen Schritte vorangehen, die zu einer Expression und Sekretion von Adhäsinen führen.

Die beschriebenen Ergebnisse ermöglichen die Aufstellung eines Modells zur Anhaftung von *U. maydis* zu Beginn der pathogenen Entwicklung. Dieses kann in unterschiedliche Stadien unterteilt werden. Im ersten Stadium findet der Erstkontakt zwischen der Sporidie und der hydrophoben Cuticula des Blattes statt. Durch die Perzeption von Umweltsignalen, wie sie beispielsweise durch den Hydrophobizitäts-Sensor Msb2 vermittelt werden könnten, kommt es zur aktiven Produktion und apikalen Sekretion von adhäsiven Substanzen. Die Aktivierung der Adhäsineexpression kann jedoch durch epigenetische Deregulierung verhindert werden. Eine solche epigenetische Deregulierung findet offenbar statt, wenn *U. maydis* für einen langen Zeitraum unter idealen Bedingungen im saprophytischen Wachstum verbleiben kann und somit keinen Bedarf an Oberflächenadhäsion aufzeigt.

Der Zellpol, an dem die initiale Sekretion von Adhäsinen stattfindet, bildet in der zweiten Adhäsionsphase die Spitze des wachsenden Filaments aus. Bei SG200-Sporidien kann hier direkt die Bildung des infektiösen Filaments erfolgen, während haploide Wildtyp-Stämme zuerst Konjugationshyphen ausbilden, die aufeinander zuwachsen und eine Fusion kompatibler Sporidien ermöglichen. Das Wachstum des infektiösen Filaments und der Konjugationshyphen ist dabei vermutlich von einer umfangreichen apikalen Sekretion adhäsiver Substanzen begleitet, welche sich zwischen Hyphne und Pflanzencuticula zu einer massiven extrazellulären Matrix zusammenlagern (siehe Abbildung 4).

Das dritte Stadium bildet den Abschluss des Wachstums außerhalb der Pflanze. Ebenfalls durch Umweltsignale wie Hydrophobizität und Hydroxyfettsäuren kommt es an der Hyphenspitze zur Ausbildung des Appressoriums. Das Appressorium ist eine spezialisierte Struktur, an der die massive Sekretion von Faktoren erfolgt, welche eine erfolgreiche Pflanzenpenetration gewährleisten sollen. Im Appressorium findet neben der Sekretion von Adhäsinen auch die Sekretion von Pathogenitätsfaktoren wie Effektormolekülen statt. Diese sind in der Lage, die Pflanzenabwehr zu modulieren und das Wachstum der Pilzhyphen innerhalb des Pflanzengewebes zu ermöglichen. Eine schematische Darstellung der drei Stadien der *U. maydis*-Adhäsion findet sich in Abbildung 32.

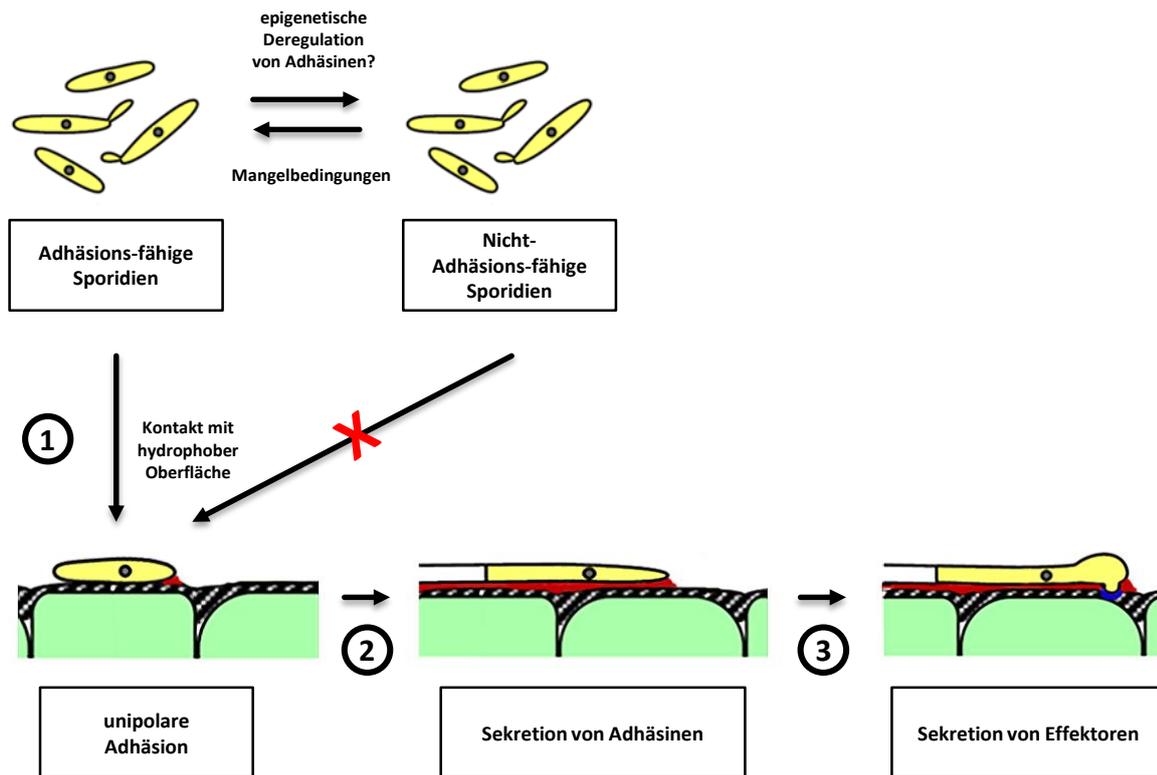


Abbildung 32: Darstellung des hypothetischen Modells zur Adhäsion von *U. maydis*-Sporidien und Filamenten. Die epigenetische Deregulation von Adhäsins-Genen verhindert deren Expression in Sporidien, welche durch ein großes Nährstoffangebot für lange Zeit saprophytischem Wachstum unterliegen. Durch Mangelbedingungen ändern sich die Prägungsmuster und Adhäsins-Expression kann stattfinden. Durch Kontakt mit einer hydrophoben Oberfläche (1) wird die Expression und unipolare Sekretion von Adhäsinen (rot) induziert. Auf die erfolgreiche Anhaftung folgt das filamentöse Wachstum (2), welches von einer weiteren, vermutlich ebenfalls stark polaren Sekretion von Adhäsinen begleitet wird. Schließlich kommt es zur Ausbildung des Appressoriums (3), was mit der Expression und Sekretion von Effektorproteinen (blau) an der Infektionsstruktur begleitet wird (Kämper *et al.* 2006).

3.2 Der Effektor Plp2 und seine Rolle in der pathogenen Entwicklung von *Ustilago maydis*

Sekretierte Effektorproteine ermöglichen einem biotrophen Organismus die Umgehung der pflanzlichen Immunabwehr. Das Genom von *Ustilago maydis* kodiert bis zu 386 putative Effektorproteine (Kämper *et al.* 2006). Eine kleine Anzahl dieser Effektoren konnte bereits identifiziert und funktionell beschrieben werden (Döhlemann *et al.* 2009; Langner 2010; Djamei *et al.* 2011; Döhlemann *et al.* 2011; Hampel 2012). Der Großteil des Effektor-Repertoires ist jedoch weiterhin unbekannt. Die Analyse von Expressionsdaten kann zur Identifizierung neuer Effektorproteine führen, wie die Entdeckung der Effektorgruppen der Pst- und Plp-Proteine beweist (Vranes, pers. Mitteilung).

3.2.1 Die Pst- und Plp-Effektoren zeigen ein charakteristisches Expressionsprofil

Durch systematische Deletionsanalysen *biz1*-abhängig regulierter Kandidatengene konnten die Effektorgene *pst1* und *pst2* identifiziert werden (Vranes 2006). Ein Vergleich der Expressionsprofile von *pst1* und *pst2* mit anderen für sekretierte Proteine kodierenden Gene ermöglichte die Identifizierung der *plp* („*pst*-like protein“ oder *pst*-ähnliches Protein)-Gene. Das Expressionsmuster dieser Gene gleicht dem der *pst*-Gene (siehe Abbildung 33). Infektionsexperimente mit Deletionsmutanten bestätigen die Effektorrolle dieser Gruppe, da eine Beeinträchtigung der Virulenz bei $\Delta plp1$ und $\Delta plp3$ sowie ein vollständiger Pathogenitätsverlust bei $\Delta plp2$ zu beobachten war (Hampel 2012 und diese Arbeit).

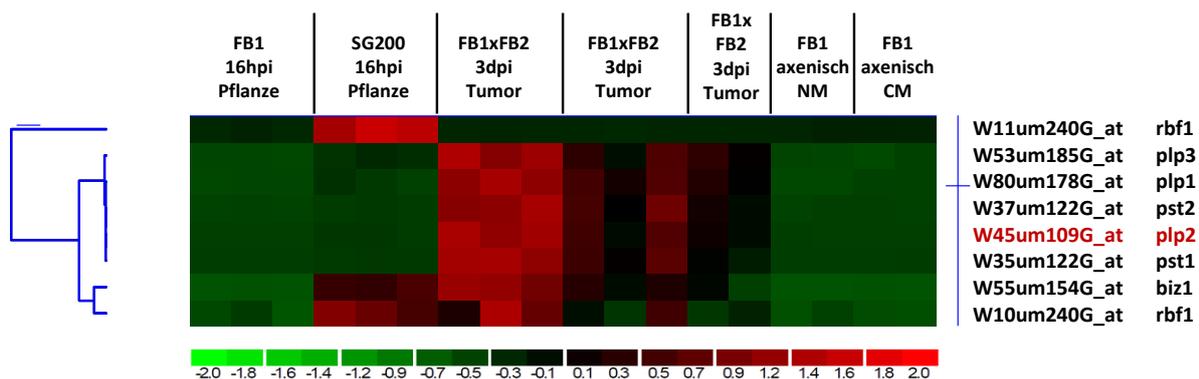


Abbildung 33: Hierarchische Cluster-Analyse von Biz1-induzierten Effektorgenen während verschiedener Stadien der pathogenen Entwicklung. Gezeigt ist die hierarchische Cluster-Analyse (Eisen *et al.* 1998; Golub *et al.* 1999) der identifizierten Biz1-abhängig exprimierten Effektorgene *plp1/plp2* sowie *plp1*, *plp2* und *plp3* während verschiedener Stadien der pathogenen Entwicklung. Zusätzlich dargestellt sind die Expressionsprofile der beteiligten Transkriptionsfaktoren Rbf1 und Biz1. Der Farbcode (unten) gibt die relative Expressionsstärke der Signale an.

3.2.2 Der *plp2*-Promotor weist mehrere Biz1-Transkriptionsfaktor-Bindestellen auf

Die *pst* und *plp* Effektorgene wurden als Biz1-induzierte Gene identifiziert (Vranes, pers. Kommunikation). DNA-Bindemotivsuchen beschreiben zwei mögliche Biz1-Bindemotive, einerseits das 7 bp umfassende 5'-GNGTGGG-3' (Flor-Parra *et al.* 2006), andererseits das durch *in silico*-Bindemotivsuchen identifizierten 5 bp umfassende Biz1-Bindemotiv 5'-GTGGG-3' (Finkernagel 2007). Die Analyse der Promotorsequenz von *plp2* offenbart mehrere übereinstimmende Bindemotive. Dem 2006 beschriebenen Biz1 Bindemotiv entspricht die Sequenz 5'-GTGTGGG-3' bei -1084 bp, dem 2007 beschriebenen kürzeren Bindemotiv entsprechen zwei weitere 5'-GTGGG-3'-Sequenzen bei -1368 bp und -860 bp. Die bei -222 bp gelegene Sequenz 5'-GTGGGTGGG-3' entspricht beiden Bindemotiven, wobei das 5 bp-Motiv sogar zweifach in dieser Sequenz enthalten ist. Es konnte bereits gezeigt werden, dass für die Biz1-abhängige Induktion des *um01240*-Promotors eine Biz1-Bindestelle bei -219 bp verantwortlich ist (Finkernagel 2007). Somit liegt nahe, dass die Sequenz bei -222 bp des *um04342*-Promotors maßgeblich an der Biz1-vermittelten Transkriptionsaktivierung beteiligt ist.

Ein weiteres Biz1-Bindemotiv mit 5'-GTGTGGG-3' wurde bei -2633 bp identifiziert, dieses übernimmt keine essentielle Funktion in der Expression von *plp2*, da das in den erfolgreichen Komplementationsexperimenten eingesetzte *plp2*-Promotorfragment lediglich 2,5 kb umfasst, dieses Bindemotiv somit außerhalb des voll funktionsfähigen Promotorfragments liegt (siehe Abbildung 28). Weitere Promotoranalysen sind nötig, um die genaue Rolle von Biz1 in der Aktivierung von *um04342* aufzuklären. Analog zu (Finkernagel 2007) könnte ein System zur induzierbaren Expression von Biz1 verwendet werden. Durch Fusion unterschiedlich langer *plp2*-Promotorfragmente an *gfp* kann mit diesem System die aktivierende Rolle einzelner Bindemotive direkt an der Stärke der Reporterexpression ermittelt werden. Auch wäre es möglich, putative Bindestellen des *plp2*-Promotors zu mutieren und den Effekt der Mutation auf die Biz1-vermittelte *plp2*-Induktion zu überprüfen.

3.2.3 Expressionsanalysen zeigen *plp2*-Expression direkt nach der Penetration und in allen biotrophen Stadien der pathogenen Entwicklung

Ein über homologe Rekombination vermittelter Austausch des genomischen *plp2* durch *gfp* ermöglichte die fluoreszenzmikroskopische Analyse der Expression durch den *plp2*-Promotor. In Konsens mit den Expressionsdaten zeigten Sporidien in axenischer Kultur keine *gfp* Expression (Daten nicht gezeigt). Auf der Blattoberfläche zeigten dikaryotische Filamente von *U. maydis* erst nach Bildung des Appressoriums und Penetration der Pflanze ein GFP-Signal (siehe Abbildung 24). Quantitative PCR-Analysen bestätigten eine frühe Induktion der Expression von *plp2* 24 Stunden nach Infektion. Die Expressionsstärke stieg im Zeitraum von fünf bis neun Tagen nach Infektion kontinuierlich an und auch im Tumorgewebe 13 Tage nach Infektion konnte eine starke Expression

von *plp2* beobachtet werden. Diese Daten decken sich mit den zuvor beschriebenen Expressionsdaten aus MicroArray-Analysen (siehe Abbildung 33).

Vergleichbare Expressionsmuster sind für eine Vielzahl von Effektorgenen beschrieben worden. Promotor-GFP-Fusionen zeigten, dass die Expression des *U. maydis*-Effektors Pep1 ebenfalls zum Zeitpunkt der Pflanzenpenetration induziert wird (Döhlemann *et al.* 2009). Auch die Expression der Effektorgene *pit1* und *pit2* ist während der pathogenen Entwicklung stark induziert, unter axenischen Bedingungen ist hingegen keine Effektorexpression zu beobachten (Döhlemann *et al.* 2011). Für weitere pathogene Pilze wie beispielsweise den hemibiotrophen *Colletotrichum higginsianum* konnte gezeigt werden, dass die Expression einer Vielzahl von Effektorgenen koordiniert zu Beginn und während der pathogenen Interaktion stattfindet (Kleemann *et al.* 2012).

Die konstitutiv starke Expression des Plp2 Effektors ist ein Hinweis darauf, dass das Protein nicht nur in frühen Infektionsstadien, sondern während der gesamten pathogenen Entwicklung benötigt wird. Ein ähnliches Phänomen ist für den *U. maydis* Effektor Pep1 beschrieben. Diesem Effektorprotein wird sowohl eine essentielle Rolle in der Penetration der Pflanzenzelle als auch in der Zell-Zell-Passage während der Proliferation im pflanzlichen Gewebe zugesprochen (Döhlemann *et al.* 2009). Es ist nicht auszuschließen, dass das Effektorprotein Plp2 neben seiner essentiellen Rolle in der Etablierung der pathogenen Interaktion zusätzliche Funktionen in späteren Entwicklungsstadien übernimmt. Dies könnte die durchgängig hohe Expression des Effektors in allen biotrophen Entwicklungsstadien erklären. Für weitere Rückschlüsse auf die Funktion des Effektors Plp2 in späteren Stadien der pathogenen Entwicklung ist es unabdingbar, eine erfolgreiche Proteinlokalisierung durch funktionelle Plp2-Reporter-Fusionskonstrukte zu gewährleisten.

3.2.4 Eine *in planta*-Lokalisierung von Plp2 konnte aufgrund nicht-funktionaler C-terminaler Fusionsproteine nicht erfolgen

Sequenzanalysen mit dem Onlineserver WoLF Psort (<http://wolfpsort.org/>) sagen eine extrazelluläre Lokalisierung von Plp2 voraus (extr: 20.0, plas: 5.0 mit *k for kNN*: 27). Der *U. maydis*-Effektor Plp2 und die Orthologe uhPlp2 und srPlp2 weisen laut SIGNALP 4.0 eine N-terminale Signalsequenz zur Sekretion auf (Emanuelsson *et al.* 2007; Petersen *et al.* 2011). Die Signalpeptid-vermittelte Sekretion ist essentiell für die Funktion von Plp2, da ein N-terminal verkürztes Allel von *plp2* keine funktionelle Komplementation ermöglicht (vgl. 2.3.7). Bisherige Versuche, das Plp2-Protein mit einem C-terminalen Reporter gen zu fusionieren, blieben erfolglos. Sowohl die C-terminale Fusion von GFP in ektopischer Komplementation (vgl. 2.3.7) als auch eine C-terminale Fusion mit den Hämagglutinin(HA) oder GFP-Reportern durch Integration der Fusionskonstrukte in den nativen *plp2*-Lokus (Daten nicht gezeigt) erwiesen sich als nicht-funktionell. Die resultierenden Stämme waren

nicht in der Lage, die Maispflanze zu penetrieren, und zeigten eine Phänokopie der Deletionsstämme auf.

N-terminale Proteinmodifikationen sekretierter Proteine gestalten sich aufgrund der für die Sekretion benötigten Signalsequenz als schwierig. Ein Reporter kann nicht N-terminal an das Propeptid fusioniert werden, da dies eine Sekretion verhindern würde. Vielmehr müssen N-terminale Reporter zwischen Signalsequenz und Peptidsequenz des Effektors eingefügt werden. Eine solche N-terminale GFP-Fusion konnte erfolgreich generiert werden und ist in der Lage, die Pathogenität eines $\Delta plp2$ -Stammes durch ektopische Integration unter Kontrolle des Mig2.5-Promotors zu komplementieren (vorläufige Ergebnisse). Durch die erfolgreiche Fusion von GFP an das Plp2 Protein werden fluoreszenzmikroskopische Lokalisierungsstudien im Pflanzengewebe möglich. Weiterhin war es möglich, eine 3xHA-Sequenz in die NLS1 von Plp2 zu inserieren, auch dieses Fusionsprotein ist voll funktionsfähig und die ektopische Integration des Fusionskonstruktes unter der Kontrolle des Mig2.5-Promotors sorgt ebenfalls für eine vollständige Komplementation des $\Delta plp2$ -Apathogenitäts-Phänotyps (vorläufige Ergebnisse). Die Präparation von Tumorgewebe und die Isolierung der Pflanzen-Zellkernfraktion konnte bereits Hinweise auf eine Lokalisierung der HA-markierten Effektoren Pst1, Pst2 und Plp1 in Pflanzen-Zellkernen geben (Hampel 2012, und Vranes, pers. Mitteilung). Mit dieser Methode könnte unterstützend zur fluoreszenzbasierten Lokalisierung auch der biochemische Nachweis von Plp2^{NLS2::3xHA} im Pflanzenzellkern erfolgen. Eine weitere Möglichkeit der Lokalisierung von Plp2-HA-Fusionskonstrukten in der Pflanze wäre die Immunogold-Markierung, diese konnte bereits erfolgreich für die Lokalisierung des *U. maydis*-Effektors Cmu1 angewendet werden (Djamei *et al.* 2011).

3.2.5 Plp2 ist ein Pathogenitätsfaktor

Die Deletion von *plp2* führte zu keinem identifizierbaren Wachstumsdefekt in axenischer Kultur, was aufgrund des Expressionsmusters zu erwarten war. In Infektionsexperimenten erwiesen sich Deletionsmutanten als apathogen. Während die Bildung infektiöser Filamente nicht beeinträchtigt war, kam es zu einem vollständigen Stopp der pathogenen Entwicklung. Dieser Phänotyp ist vergleichbar mit Deletionsmutanten der Effektoren Pst1, Pst2 und Pep1 (Vranes 2006; Döhlemann *et al.* 2009). An den Stellen der erfolglosen Penetration ist eine massive Pflanzenabwehrreaktion zu beobachten, jedoch findet keine Anthocyanbildung in infizierten Blattbereichen statt. Die Bildung von Anthocyan ist in der Regel eine Begleiterscheinung der Pflanzenabwehr, auch wenn das zytoplasmatische Anthocyan selbst vermutlich keine direkte Funktion in der Pathogenabwehr hat (Close und Beadle 2003; Gould 2004). Die Bildung einer papillären Struktur und die damit verbundene lokalisierte Produktion reaktiver Sauerstoffspezies ist ein Hinweis auf eine unspezifische Abwehrreaktionen der Maispflanze gegen das Eindringen von Pilzen (Cadena-Gomez und Nicholson 1987). In der phytopathogenen Interaktion des Rostpilzes *Uromyces vignae* mit seiner Wirtspflanze *Vigna*

unguiculata konnte gezeigt werden, dass Wanderungen des Zellkerns zur Penetrationsstelle sowohl in resistenten als auch sensitiven Pflanzen zu beobachten sind (Heath *et al.* 1997). Es wird spekuliert, dass die Zellkernwanderung eine Antwort auf die Manipulation der Pflanzenabwehr durch den biotrophen Pilz darstellt und somit als ein frühes Anzeichen einer hypersensitiven Respons (HR) betrachtet werden kann. Die Bildung zahlreicher Vesikel im Zytoplasma der Pflanzenzelle konnte ebenfalls in vielen Fällen mit einer HR in Verbindung gebracht werden (Bestwick *et al.* 1995; Liu *et al.* 2005; Mur *et al.* 2008). Die in dieser Arbeit beobachteten Vesikel bewegten sich entlang einer Vielzahl von dynamischen Strängen durch die Vakuole der Pflanzenzelle (siehe Abbildung 22B), hierbei handelt es sich vermutlich um transvakuoläre Stränge (Hofmeister 1867; Mitsuhashi *et al.* 2000; Kutsuna und Hasezawa 2002). Transvakuoläre Stränge sind hoch-dynamische zytoplasmatische Strukturen, welche die Pflanzenvakuole durchlaufen, von Aktinsträngen durchzogen sind und unter anderem einen Langstreckentransport von sekretorischen und endozytotischen Vesikeln vermitteln können (Ruthardt *et al.* 2005; Thomas *et al.* 2009). Der hier beschriebene massive Transport von Vesikeln entlang solcher Stränge in der inkompatiblen Interaktion zwischen $\Delta plp2$ -Stämmen und der Maispflanze unterstützt die Hypothese, dass diese bei Abwehrreaktionen der Pflanze gegen Pathogene eine entscheidende Rolle spielen.

Die in dieser Arbeit beobachteten Pflanzenabwehrreaktionen gegen $\Delta plp2$ -Stämme zeigten typische Abwehrreaktionen der Basalresistenz wie die Bildung von Anthocyanen, papillärer Strukturen und reaktiver Sauerstoffspezies auf. Zusätzlich konnten aber auch mit der HR in Verbindung stehende Abwehrreaktionen wie Zellkernwanderungen und die Ausbildung transvakuolärer Stränge beobachtet werden. Das Auftreten von HR-typischen abgestorbenen Pflanzenzellen war hingegen in der Regel nur auf Bereiche mit einer hohen *U. maydis*-Hyphendichte beschränkt (Daten nicht gezeigt). In den beobachteten inkompatiblen Interaktionen von avirulenten $\Delta plp2$ -Stämmen mit der Maispflanze scheint es demnach Überlappungen dieser beiden Abwehrmechanismen zu geben.

Es stellt sich die Frage, auf welcher Ebene die Suppression der Pflanzenabwehr durch Plp2 erfolgt. Die Signalpeptid-vermittelte Sekretion des Effektors ist essentiell für seine Funktion (vgl. 2.3.7), da jedoch keine *in planta* Lokalisierung von Plp2 möglich war, ist unklar, ob die Suppression der Pflanzenabwehr im Apoplasten oder in der Pflanzenzelle erfolgt. Eine Translokation des Effektors in die Pflanzenzelle könnte über RXLR-ähnliche Motive vermittelt werden. Im Gegensatz zu den RXLR-Motiven der Oomyzeten zeigen pilzliche RXLR-ähnliche Motive jedoch keine eindeutige Konsensussequenz auf (Kale *et al.* 2010). Dies erschwert die *in silico*-Identifizierung solcher Motive, und für Plp2 und den orthologen Proteinen aus *U. hordei* und *S. reilianum* konnten keine konservierten RXLR-ähnlichen Motive identifiziert werden (siehe Abbildung 26). Eine Translokation des Proteins in die Pflanzenzelle ist dennoch nicht ausgeschlossen. Sollte Plp2 tatsächlich in die Pflanzenzelle aufgenommen werden, stellt sich die Frage nach der Funktion in der Zelle. Für prokaryotische zytoplasmatische Effektoren sind eine Vielzahl von Mechanismen zur Unterdrückung

der Pflanzenabwehr bekannt. Sie können durch gezielte Ubiquitinierung von NB-LRR-interagierenden Proteinen die Signaltransduktion unterbrechen, die mRNA-Homöostase der Pflanzenzelle stören oder mit Phosphorylierungs-Kaskaden interferieren (Zusammengefasst in Block *et al.* 2008). Aus *Pseudomonas syringae* ist eine Klasse von Effektorproteinen bekannt, welche in der Lage sind, DNA sequenzspezifisch zu binden. Diese TAL („transcription activator-like“ oder Transkriptionsaktivator-ähnliche)-Effektoren werden in den Pflanzenzellkern importiert, binden sequenzspezifisch ihre Ziel-DNA-Sequenzen und modulieren die Expression von Genen der Pflanzenabwehr (Zusammengefasst in Scholze und Boch 2011). Die Kernlokalisierung solcher TAL-Effektoren wird über NLS-Sequenzen der C-terminalen Domäne vermittelt, eine Interaktion des Effektors mit Transkriptionsfaktoren wird über Transaktivierungsdomänen vermittelt, welche ebenfalls in der C-terminalen Domäne lokalisieren. Interessanterweise konnten durch Sequenzanalysen von Plp2 und den orthologen Proteinen aus *U. hordei* und *S. reilianum* sowohl das Vorhandensein von putativen Kernlokalisierungs- als auch Transaktivierungsdomänen gezeigt werden.

3.2.6 Eine essentielle Proteindomäne von Plp2 könnte eine Kernlokalisierung vermitteln

Die Analyse der Sequenz von Plp2 mit WoLF PSORT erzielte drei putative Kernlokalisierungssequenzen (NLS). Während NLS1 keine Sequenzkonservierung zu den Orthologen uhPlp2 aus *Ustilago hordei* und srPlp2 aus *Sporisorium reilianum* aufzeigt, weisen NLS2 und NLS3 eine Konservierung zwischen allen drei Orthologen auf. Alle drei putativen NLS Sequenzen liegen in einem Bereich geringer Sequenzkonservierung, während die Sequenzen von NLS2 und NLS3 hingegen hoch konserviert sind (vgl. 2.3.6). Komplementationsexperimente mit mutierten NLS-Sequenzen zeigten, dass NLS1 und NLS2 keine essentielle Rolle in der Proteinfunktion besitzen. Eine Mutation der NLS3 hingegen resultiert in einem nicht funktionellen Protein, ebenso die Mutation aller drei putativer NLS-Sequenzen (siehe Abbildung 30). Interessanterweise können jedoch sowohl *plp2*^{NLS3mut} als auch *plp2*^{NLS123mut} in mehrfacher Kopienzahl einen Δ *plp2*-Phänotyp zumindest teilweise komplementieren. Eine Erklärungsmöglichkeit ist, dass die partielle Komplementation von *plp2*^{NLS3mut} bzw. *plp2*^{NLS123mut} durch einen Gendosiseffekt verursacht wird. Es ist bekannt, dass NLS-Sequenzen abhängig von Aminosäuresequenz, Sequenzkontext und sogar abhängig vom Organismus unterschiedlich starke Kernlokalisierung vermitteln (Roberts *et al.* 1987; Kosugi *et al.* 2009). Es könnte demnach sein, dass NLS3 eine starke Kernlokalisierung in Pflanzenzellen vermittelt, während NLS1 und NLS2 eine schwache oder gar keine Kernlokalisierung vermitteln. Es ist auch nicht auszuschließen, dass weitere schwache Kernlokalisierungssequenzen im Protein vorhanden sind, die durch WoLF PSORT nicht erkannt wurden. Die putativen Kernlokalisierungssequenzen NLS2 und NLS3 zeigen eine hohe Sequenzkonservierung zu den orthologen Proteinen aus *S. reilianum* und *U. hordei* auf (siehe Abbildung 26). Interessanterweise konnten zwei weitere Sequenzabschnitte von Plp2 identifiziert werden, die ein ähnliches Sequenzmotiv aufweisen. Hierbei handelte es sich um die

Sequenzen N-SVLRKR-C bei Aminosäure 390 und N-SVLKKR-C bei Aminosäure 727. Auch diese Sequenzen sind zwischen den orthologen Proteinen hoch konserviert. Für diese vier Sequenzmotive kann eine Konsensussequenz ermittelt werden, die den hohen Grad der Konservierung zwischen den Sequenzen auf dem Protein und unter den orthologen Proteinen deutlich macht (Abbildung 34). Dieses Sequenzmotiv zeigt deutliche Homologien zu den bekannten klassischen Kernlokalisierungssequenzen auf. Die beschriebene Konsensussequenz für eine einteilige Kernlokalisierungssequenz ist N-K-R/K-X-K/R-C und wurde von der ursprünglich identifizierten Kernlokalisierungssequenz des SV40-großen-T-Antigens N-PKKKRKV-C abgeleitet (Dingwall und Laskey 1991). Eine neuere Arbeit beschreibt weitere, nicht-klassische Kernlokalisierungssequenzen, die trotz Abweichungen von der klassischen Konsensussequenz abhängig vom untersuchten Organismus eine erfolgreiche Kernlokalisierung gewährleistet. Einteilige Kernlokalisierungssequenzen können in fünf Klassen unterteilt werden, diese weisen eine abweichende Interaktion mit dem Alpha-Importin auf, dem zentralen Faktor für die Kerntranslokation. Aminosäure-Substitutionsexperimente in diesen Arbeiten deuten an, dass das Vorhandensein von Prolin und Valin im N-terminalen Bereich der NLS einen positiven Effekt auf die Kernlokalisierung in *Nicotiana tabacum* haben kann (Kosugi *et al.* 2009). So könnte das in Plp2 auftretende (P/S)VL(K/R)(K/R)R-Motiv eine weitere Kernlokalisierungssequenz darstellen, die jedoch nicht in allen Sequenzvarianzen bioinformatisch erkannt wird. Dies könnte bedeuten, dass noch mindestens zwei weitere putative schwache NLS-Sequenzen des Proteins zu einer Kernlokalisierung vermitteln können.

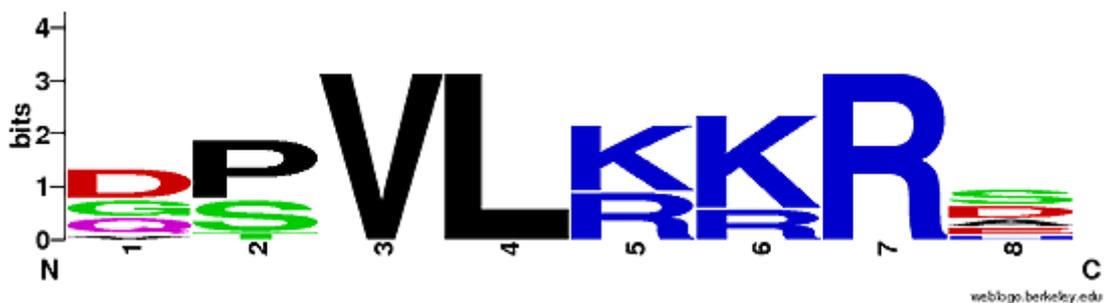


Abbildung 34: Konsensussequenz des identifizierten konservierten Sequenzmotivs. Zur Ermittlung des Sequenzmotivs wurden alle vier identifizierten Aminosäuresequenzen der drei Orthologe umPlp2, uhPlp2 und srPlp2 zusammengefasst; Grafische Darstellung mittels Weblogo (<http://weblogo.berkeley.edu/>).

Um die Funktionalität einer NLS zu überprüfen, können NLS-Sequenzen N- oder C-terminal an GFP fusioniert werden. Aufgrund der hohen Sequenzkonservierung von NLS-Sequenzen kann daher in der Regel die Kernlokalisierung des NLS-GFP-Fusionsproteins durch die heterologe Expression in einem Modellorganismus wie *S. cerevisiae* oder *U. maydis* überprüft werden. In *U. maydis* konnte die Funktionalität der drei untersuchten Kernlokalisierungssequenzen bisher nicht bestätigt werden. Die Überexpression von 1xNLS-GFP-Fusionen zeigte bei allen drei putativen NLS-Sequenzen eine zytoplasmatische Lokalisierung des GFP-Signals ohne eine sichtbare Anreicherung im Zellkern (Daten nicht gezeigt). Es gilt jedoch zu beachten, dass unterschiedliche NLS-Sequenzen abhängig vom

Organismus unterschiedlich gut im Zellkern lokalisieren, und eine Sequenz, welche die Translokation in einen Pflanzenzellkern vermittelt, nicht zwangsweise auch die Translokation in einen pilzlichen Zellkern vermittelt (Kosugi *et al.* 2009). Des Weiteren spielt der Proteinkontext bei der Funktion einer NLS eine entscheidende Rolle. Die Funktion einer NLS kann je nach Lage im Protein maskiert werden, was zu einer Fehllokalisierung führen kann (Roberts *et al.* 1987). Dieser Effekt kann durch eine multiple Kopienzahl der Signalsequenz überdeckt werden. So konnte in *Caenorhabditis elegans* gezeigt werden, dass die Fusion einer einzelnen Kopie der viralen Kernlokalisierungssequenz NLS^{SV40} an GFP nur eine minimale Akkumulation von GFP im Nukleus zur Folge hat, während die Fusion einer vierfachen Kopie der NLS^{SV40} an GFP zu einer verbesserten Kernlokalisierung des GFP führt (Lyssenko *et al.* 2007). Um die Funktionalität der Plp2-NLS-Sequenzen nicht auszuschließen, müssten daher auch multiple Fusionen der NLS-Sequenzen an N- oder C-Terminus eines konstitutiv exprimierten GFP in *S. cerevisiae*, *U. maydis* und eventuell sogar in pflanzlichen Zellen untersucht werden. Es kann an dieser Stelle dennoch nicht ausgeschlossen werden, dass nicht die fehlende Kernlokalisierung, sondern andere Effekte wie beispielsweise eine Fehlfaltung des Proteins oder der Verlust einer Protein-Interaktionsdomäne zum Verlust der Proteinfunktion führen.

3.2.7 Eine putative Transaktivierungsdomäne nimmt Einfluss auf die Effektorfunktion von Plp2

In prokaryotischen TAL-Effektoren übernehmen neben den NLS-Sequenzen für die Kernlokalisierung auch die Transaktivierungsdomänen (TAD) der C-terminalen Domäne eine essentielle Funktion (Zusammengefasst in Dean 2011). Transaktivierungsdomänen ermöglichen die Interaktion von Transkriptionsfaktoren mit allgemeinen Transkriptionsaktivatoren wie TAF9. TADs zeigen auf Sequenzebene in der Regel keine Gemeinsamkeiten auf, durch strukturelle Analysen konnte jedoch die Klasse der 9aaTADs (9 Aminosäuren-Transaktivierungsdomäne) beschrieben werden. Hierbei handelt es sich um ein für viele eukaryotische Transkriptionsfaktoren charakteristisches 9 Aminosäuren-langes Motiv. Die Software 9aaTAD ermöglicht eine bioinformatische Vorhersage solcher 9aaTADs (Piskacek *et al.* 2007). Analysen mit dem 9aaTAD-Algorithmus erzielten zwei putative 9aaTADs in umPlp2 mit den Sequenzen N-PTLIDTAAR-C für TAD1 und N-GELYTSYLE-C für TAD2. Der Algorithmus war jedoch nicht in der Lage, die TAD1 in den homologen Sequenzen N-PTLIDTAAL-C aus srPlp2 und N-PTIFDTAGR-C aus uhPlp2 zu identifizieren. Die TAD2 wurde auch in den homologen Sequenzen N-GDLYAQYLA-C von srPlp2 und N-GELYTQYLQ-C erfolgreich identifiziert. Bei 9aaTADs spielen hydrophobe Aminosäuren vermutlich eine zentrale Rolle in der Rekrutierung von Transkriptionsaktivatoren (Drysdale *et al.* 1995). In Plp2 und beiden Orthologen weisen sowohl TAD1 als auch TAD2 ein charakteristisches und konserviertes Muster hydrophober Aminosäuren auf (siehe Abbildung 31A). Um eine Funktion dieser hydrophoben Aminosäuren zu eluzidieren, wurden durch gezielte Mutagenese von *plp2* die hydrophoben Aminosäuren (Leucin, Isoleucin oder Alanin) durch geladene Aminosäuren (Glycin, Threonin oder Tryptophan) ersetzt (siehe

Abbildung 31B). In Infektionsexperimenten zeigte eine Mutation der TAD2 keine nennenswerten Defekte. Im Falle einer Mutation von TAD1 ist jedoch erneut ein Apathogenitätsphänotyp zu beobachten (siehe Abbildung 31C). Interessanterweise ist ein Stamm, der das *plp2*^{TAD1mut}-Allel trägt in der Lage, die Pflanzenzelle zu penetrieren, eine intensive Pflanzenabwehr mit Bildung von Papillen wie bei $\Delta plp2$ -Stämmen ist nicht zu beobachten. Dennoch kann der Pilz nicht im Pflanzengewebe proliferieren (vorläufige Ergebnisse). Der phänotypische Unterschied zwischen *plp2*^{TAD1mut}- und $\Delta plp2$ -Stämmen kann sogar makroskopisch beobachtet werden, da neben Chlorosen auch eine Bildung von Anthocyanen zu beobachten ist, weitere Krankheitssymptome bleiben hingegen aus. Im Rahmen dieser Arbeit war es nicht mehr möglich, weitere phänotypische Analysen der *plp2*^{TAD1mut}-Stämme durchzuführen. Ob die Papillenbildung tatsächlich vollständig ausbleibt, kann beispielsweise durch die Anfärbung von Callose oder reaktiver Sauerstoffspezies gezeigt werden (Huckelhoven *et al.* 1999; Zahiri *et al.* 2010; Luna *et al.* 2011).

3.2.8 Ausblick – Welche Rolle übernimmt Plp2 in der Modulation der Pflanzenabwehr?

In dieser Arbeit konnten Einblicke in die Rolle des Effektorproteins Plp2 bei der Modulation der Pflanzenabwehr gewonnen werden. $\Delta plp2$ -Stämme sind apathogen und werden mit einer massiven Abwehrreaktion der Pflanze konfrontiert. Sowohl eine putative NLS als auch eine putative TAD tragen zur Funktionalität des Proteins bei, was auf eine Rolle von Plp2 als Transkriptionsmodulator schließen lässt. Nicht nur für die prokaryotischen TAL-Effektoren, sondern auch für eine Reihe von eukaryotischen Effektorproteinen konnte bereits deren Translokation in den Pflanzenzellkern gezeigt werden. So sind die modular aufgebauten Proteine der CRN-Familie des phytopathogenen Oomyzeten *Phytophthora infestans* im Nukleus infizierter Pflanzen zu finden (Schornack *et al.* 2010). Die Effektoren des pathogenen Pilzes *Magnaporthe grisea* zeigen unterschiedlichste Lokalisierung während der pathogenen Interaktion, der Effektor PWL2 transloziert in den Zellkern infizierter Pflanzenzellen, während der Effektor BAS1 im Zytoplasma verbleibt, sich von dort aus aber auch in das Zytoplasma benachbarter Zellen verbreiten kann (Khang *et al.* 2010). Der sekretierte Effektor SP7 des symbiotischen Pilzes *Glomus intraradices* interagiert im pflanzlichen Zellkern mit dem Transkriptionsfaktor ERF19, welcher eine große Rolle in der Induktion von Pflanzenabwehr-Genen spielt (Kloppholz *et al.* 2011). Die transkriptionelle Modifikation der Wirtspflanze durch sekretierte Effektoren scheint somit ein weit verbreiteter Mechanismus zur Etablierung der biotrophen Interaktion zwischen Pilz und Wirt zu sein.

Nach einer Mutation der TAD1 des Plp2-Effektors ist der Pilz nicht mehr in der Lage, in der Pflanze zu proliferieren, kann jedoch erfolgreich die Pflanzenzelle penetrieren. Eine wie bei $\Delta plp2$ -Stämmen beobachtete intensive Pflanzenabwehr tritt hier nicht ein, dennoch zeigen infizierte Pflanzen keine Tumorbildung, somit muss die pilzliche Entwicklung innerhalb des Pflanzengewebes gestört sein. Unter Umständen schränken die Mutationen der NLS3 oder TAD1 die Funktionalität von Plp2 ein.

Das Vorhandensein separater Pflanzenabwehrreaktion in Epidermis und Mesophyll wurden bereits für *Arabidopsis thaliana* beschrieben, und die putative Aufteilung einer prä-penterativen Abwehr der Epidermis und einer post-penetrativen Abwehr des Mesophylls wurde auch für das *U. maydis*-*Z. mays*-Pathosystem postuliert (Lipka *et al.* 2005; Döhlemann *et al.* 2011). Ein nur teilweise funktionelles Plp2 könnte die Penetration der Epidermis ermöglichen, doch die weitere Proliferation im Mesophyll würde durch ein nur partiell funktionierendes Plp2 durch die post-penetrative zweite Pflanzenabwehr verhindert werden. Durch Überexpression von teilfunktionellem Plp2, wie sie aus der multiplen Integration in den *ip*-Locus resultiert, könnte jedoch auch die zweite Abwehr des Mesophylls wieder erfolgreich unterbunden werden. Es stellt sich an dieser Stelle jedoch die Frage, aus welchem Grund $P_{mig2.5}:plp2^{mutNLS3}$ - und $P_{mig2.5}:plp2^{mutTAD1}$ -Komplementationen phänotypisch nicht identisch sind. Es müsste zusätzlich überprüft werden, ob eine multiple Integration des $P_{mig2.5}:plp2^{mutTAD1}$ -Konstruktes zu einer Rückgewinnung der Pathogenität führt, wie es bei der NLS3 gezeigt werden konnte.

Eine weitere Erklärung dieses Phänomens wäre eine duale Funktion des Effektorproteins. Der Effektor Plp2 könnte sowohl im Zytoplasma als auch im Nukleus der Pflanzenzelle wichtige, aber mechanistisch unterschiedliche Funktionen übernehmen. So könnte Plp2 im Zytoplasma mit PRRs, NB-LLRs oder Signaltransduktionskaskaden interagieren und hierdurch die Basalresistenz in der Epidermis unterdrücken. *plp2*-Deletionsmutanten erfahren daher eine umfassende Pflanzenabwehrreaktion. Neben dieser Funktion könnte Plp2 jedoch zusätzlich als transkriptioneller Modulator der Pflanzenabwehr fungieren. Hierbei würden sowohl die NLS3- als auch die TAD1-Domäne eine essentielle Rolle spielen. Die Proteinvariante $Plp2^{mutNLS3}$ würde von der Pflanzenzelle ins Zytoplasma internalisiert und könnte die Basalresistenz unterdrücken. Sie würde jedoch nur sehr ineffizient in den Pflanzennukleus transloziert. Die transkriptionelle Modulation der Pflanzenabwehr könnte nicht stattfinden, es würden die pflanzenseitige Aktivierung der HR und eine massive Pflanzenabwehrreaktion folgen. Durch die mehrfach-Integration des $P_{mig2.5}:plp2^{mutNLS3}$ -Konstruktes in den *ip*-Lokus von $SG200\Delta plp2$ mit einer Überexpression von $plp2^{mutNLS3}$ zu rechnen. Durch die große Zahl mutierter Plp2-Moleküle im Zytoplasma der Pflanzenzellen könnte trotz ineffizienter Kerntranslokation eine ausreichende Menge an Effektorproteinen in den Nukleus translozieren und dort die erfolgreiche Deregulation der Pflanzenabwehr gewährleisten.

Die Proteinvariante $Plp2^{mutTAD1}$ hingegen würde wie das Wt-Plp2 im Pflanzenzellkern lokalisieren, dort aber nicht mit den Ziel-Transkriptionsfaktoren interagieren können. $Plp2^{mutTAD1}$ -Moleküle wären weiterhin in der Lage, die zytoplasmatische Unterdrückung der Basalresistenz der Epidermis zu vollziehen, was zu einer initialen Kolonisierung des Epidermisgewebes durch $SG200\Delta plp2$ -Stämme mit einem ektopisch integrierten $P_{mig2.5}:plp2^{mutTAD1}$ -Konstrukt führen würde. Eine weitere Proliferation im Mesophyll würde jedoch durch die post-penetrative Abwehrreaktion des Mesophylls verhindert werden, welche ein voll funktionsfähiges Plp2 normalerweise unterdrückt. Offenbar ist die

Modulation der Pflanzenabwehr durch den Effektor Plp2 weitaus komplexer, als es mit den klassischen Mechanismen der Basalresistenz und R-Gen-spezifischen Resistenz erklärt werden könnte.

Weitere Untersuchungen sind nötig, um die Hypothese einer dualen Funktion von Plp2 zu unterstützen. Durch Chlorazol-gefärbte Pflanzenpräparate müsste genauer untersucht werden, bei welchementwicklungsspezifischen Schritt die pathogene Entwicklung der SG200 $plp2^{mutTAD1}$ -Stämme stoppt. Weitere Komplementationsexperimente müssten folgen, welche eine Aussage über die Expression der mutierten $plp2$ -Allele unter dem nativen Promotor ermöglichen. Das hier verwendete Komplementationssystem ermöglicht die ektopische Komplementation von $\Delta plp2$ -Stämmen. Für die Expression eingebrachter $plp2$ -Allele wurde der Pflanzen-induzierte $mig2.5$ -Promotor verwendet, die Expressionsprofile von $P_{mig2.5}$ und P_{plp2} sind jedoch nicht identisch (Basse *et al.* 2002 und Vranes, pers. Mitteilung). Dies könnte der Grund dafür sein, dass Krankheitssymptome in Infektionsexperimenten mit $plp2$ unter Kontrolle des $P_{mig2.5}$ etwas schwächer ausfallen als mit $plp2$ unter Kontrolle des P_{plp2} (siehe Abbildung 29A). Auch das Auftreten reaktiver Sauerstoffspezies ist bei der Penetration der Maispflanze durch SG200 $\Delta plp2$ -Stämme mit ektopisch integriertem $P_{mig2.5}:plp2$ häufiger als bei SG200 $\Delta plp2$ -Stämmen mit ektopisch integriertem mit $P_{plp2}:plp2$ (siehe Abbildung 23). Um Positions- und Expressionseffekte bei der Komplementation zu minimieren, könnten die in dieser Arbeit generierten, synthetischen $plp2$ -Allele über homologe Rekombination direkt in den $plp2$ -Lokus von SG200 $\Delta plp2$ inseriert werden. Durch Austausch der für die $plp2$ -Deletion verwendeten Hygromycin-Resistenzkassette mit einem synthetischen $plp2$ -Allel könnte so eine Komplementation der Deletion im korrekten genomischen Kontext erreicht werden. Auch müssten weitere Experimente zur Lokalisierung von Plp2 in der Pflanzenzelle erfolgen, um die duale Funktion von Plp2 zu bestätigen. Eine ektopische Komplementation von $\Delta plp2$ -Stämmen mit N-terminalen und internen $plp2$ - gfp -Fusionskonstrukten war erfolgreich (vorläufige Daten). Mit solchen Stämmen müsste die fluoreszenzmikroskopische Lokalisierung von Plp2-GFP in der Pflanzenzelle erfolgen. Zusätzlich müsste die Fähigkeit zur Rekrutierung von Transkriptionsaktivatoren durch Plp2 durch Hefe-Zwei-Hybrid Analysen in *S. cerevisiae* genauer untersucht werden. Ähnliche Experimente wurden bereits für die Effektoren Plp1 und Plp3 durchgeführt, konnten in diesen Fällen jedoch keine Interaktion der Effektoren mit Transkriptionsaktivatoren nachweisen (Hampel 2012). Ist eine Kernlokalisierung des Plp2-Proteins bestätigt, könnten beispielsweise Hefe-Zwei-Hybrid Analysen Aufschluss über die Interaktionspartner des Effektors in der Pflanzenzelle bieten.

4. Material und Methoden

4.1 Material und Bezugsquellen

4.1.1 Medien, Lösungen, Enzyme und Kits

Chemikalien

Alle in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien waren p.a. Qualität und wurden von den Firmen Carl Roth, Sigma-Aldrich, Merck, Fluka, Seakem, Duchefa, Difco, BioRad, Amersham, Pharmacia, und Invitrogen bezogen. Für weitere Einzelheiten siehe (Brachmann 2001).

Puffer und Lösungen

Standard-Puffer und Lösungen wurden nach (Ausubel *et al.* 1987) und (Sambrook *et al.* 1989) hergestellt. Spezielle Puffer und Lösungen sind unter den jeweiligen Methoden aufgeführt.

Medien

Medien für die Kultivierung von *E. coli*

(Sambrook *et al.* 1989)

Für Selektionsmedien wurden nach dem Autoklavieren 100 µg/mL Ampicillin, 40 µg/mL Kanamycin oder 25 µg/mL Chloramphenicol zugegeben.

LB-Medium

10 g Bacto Trypton
5 g Hefeextrakt
10 g NaCl
mit H₂O bid. auf 1 L aufgefüllt und autoklaviert; für Festmedium 15 g Bacto Agar zugefügt.

YT-Festmedium

10 g Trypton
5 g Hefeextrakt
10 g NaCl
15 g Bacto Agar
mit H₂O bid. auf 1 L aufgefüllt und autoklaviert.

dYT-Flüssigmedium

6 g Trypton
10 g Hefeextrakt
5 g NaCl
mit H₂O bid. auf 1 L aufgefüllt und autoklaviert.

S.O.C. Medium

5 g Hefeextrakt
20 g Trypton
0,6 g NaCl
0,2 g KCl
mit H₂O bid. auf 1L aufgefüllt und autoklaviert; für Festmedium 15 g Bacto Agar zugefügt. Nach dem Autoklavieren 10 mL einer sterilen 1 M MgCl₂ Lösung, 10 mL einer sterilen 1 M MgSO₄ Lösung und 14,4 mL einer sterilen 50% (w/v) Glukose Lösung zugefügt.

Medien für die Kultivierung von *S. cerevisiae*

(Guthrie und Fink 2004)

YEPD-Medium

10 g Hefeextrakt
20 g Bacto Pepton
für Festmedium 15 g Bacto Agar zugefügt, mit H₂O bid. auf 980 mL aufgefüllt und autoklaviert. Nach dem Autoklavieren 2% (v/v) 50% Glukose (1% f.c.) oder 2% (v/v) 25% Galaktose (1% f.c.) zugefügt.

5x SD-URA Glukose

6,7 g Yeast Nitrogen Base
1,7 g Synthetic Complete (Kaiser) Drop-Out Supplement –
-Leu/-Trp/-His/-Ura
in 200 mL H₂O bid. gelöst und mit 2 mL steriler L-Tryptophan Lösung (10 g/L), 2 mL steriler L-Histidin-HCl Lösung (10 g/L) und 6 mL steriler L-Leucin Lösung (10 g/L) versetzt. Mit 760 mL sterilem H₂O bid. (Flüssigmedium) oder 760 mL autoklaviertem 2% Bacto Agar (Festmedium) und 40 mL 50% (w/v) Glukose angesetzt.

5x SD-URA Galaktose

6,7 g Yeast Nitrogen Base
1,7 g Synthetic Complete (Kaiser) Drop-Out Supplement –
-Leu/-Trp/-His/-Ura

in 200 mL H₂O bid. gelöst und mit 2 mL steriler L-Tryptophan Lösung (10 g/L), 2 mL steriler L-Histidin-HCl Lösung (10 g/L) und 6 mL steriler L-Leucin Lösung (10 g/L) versetzen. Mit 720 mL sterilem H₂O bid. (Flüssigmedium) oder 720 mL autoklaviertem 2% Bacto Agar (Festmedium) und 80 mL 25% (w/v) Galaktose aufgefüllt.

Medien für die Kultivierung von *U. maydis*

Für Selektionsmedien wurden nach dem Autoklavieren 2 µg/mL Carboxin bzw. 200 µg/mL Hygromycin zugegeben.

YEPS_L Vollmedium (Tsukuda et al. 1988)

10 g Yeast Extract
4 g Pepton
4 g Sucrose
mit H₂O bid. auf 1 L aufgefüllt und autoklaviert.

CM-Komplexmedium (Holliday 1974; Banuett und Herskowitz 1989)

1.5 g NH₄NO₃
2.5 g Caseinhydrolysat
0.5 g DNA
1 g Yeast Extract
10 mL Vitamin-Lösung (s.u.)
62.5 mL Salz-Lösung (s.u.)
0.5 mL Spurenelement-Lösung
mit H₂O bid. auf 980 mL aufgefüllt und mit NaOH auf pH 7.0 eingestellt; nach dem Autoklavieren 20 mL 50% (w/v) Glukose zugefügt.

Minimalmedium (Scherer et al. 2006)

62,5 mL Salz-Lösung (s.u.)
30 mM L-Glutamin
mit H₂O bid. auf 980 mL aufgefüllt, pH-Wert auf 7,0 mit NaOH eingestellt und sterilfiltriert. Nach dem Sterilfiltrieren:
20 mL 50% (w/v) Glukose-Lösung (f.c.1%) hinzugefügt.

NSY-Glycerinmedium (Einfriermedium)

8 g Nutrient Broth
1 g Yeast Extract
5 g Sucrose
800 mL 87% Glycerin
mit H₂O bid. auf 1 L aufgefüllt und autoklaviert.

PD-Festmedium

24 g Potato Dextrose Broth
20 g Bacto Agar
(für Aktivkohlemedium zusätzlich 10 g Aktivkohle)
mit H₂O bid. auf 1 L aufgefüllt und autoklaviert.

Regenerierungsagar (Schulz et al. 1990)

1) Top-Agar:
1.5% (w/v) Bacto-Agar
1 M Sorbitol
in YEPS-Medium (s.o.)

2) Bottom-Agar:
wie 1), zusätzlich 4 µg/mL Carboxin oder 400 µg/mL Hygromycin

Salzlösung (Holliday 1974)

8 g KH₂PO₄
2 g Na₂SO₄
1 g MgSO₄ x 7 H₂O
4 g MgSO₄ x 7 H₂O
1,32 g CaCl₂ x 2 H₂O
Mit H₂O bid. auf 1 L aufgefüllt und sterilfiltriert.

Spurenelement-Lösung (Holliday 1974)

60 mg H₃BO₃
191 mg MnCl₂
400 mg ZnCl₂
47 mg NaMoO₄ x 2 H₂O
140 mg FeCl₃ x 6 H₂O
557 mg CuSO₄ x 5H₂O
Mit H₂O bid. auf 1 L aufgefüllt und sterilfiltriert.

Vitamin-Lösung (Holliday 1974)

100 mg Thiamin
20 mg Calciumpanthothenat
50 mg p-Aminobenzoesäure
20 mg Nikotinsäure
20 mg Cholinchlorid
40 mg myo-Inositol
50 mg Folsäure
Mit H₂O bid. auf 1 L aufgefüllt und sterilfiltriert.

Enzyme

Restriktionsenzyme, Polymerasen und DNA-modifizierende Enzyme wurden, wenn nicht anderweitig erwähnt oder bereits in einem Kit enthalten, von New England Biolabs (NEB) bezogen. BP Clonase™ II Enzyme Mix und LR Clonase™ II Enzyme Mix wurden von Invitrogen bezogen. Taq Polymerase stammte aus einer Laborpräparation.

Verwendete Kits

In dieser Arbeit wurden die Kits JETSORB (Genomed) zur Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen, TOPO TA Cloning Kit Dual Promotor (Invitrogen) zur Klonierung von DNA-Fragmenten, Gateway® Vector Conversion System (Invitrogen) für die Modifikation von Plasmiden für eine Verwendung des GATEWAY®

Systems, QiaQuick PCR Purification Kit (Qiagen) für die Aufreinigung von Plasmiden und PCR Reaktionen, QiaPrep Miniprep Kit zur Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*, DIG High-Prime Kit (Roche) zur Herstellung DIG-markierter Sonden für den Southern-Blot, RNeasy Kit (Qiagen) zur Aufreinigung von Gesamt-RNA Präparationen sowie RotiPrep Plasmid Mini (Carl Roth) zur Aufreinigung von Plasmiden vor der Sequenzierung, ProtoScript AMV First Strand cDNA Synthesis Kit (NEB) und SuperScript III (Invitrogen) für die reverse Transkription von mRNA und das In-Fusion™ SMARTer™ cDNA Library Construction Kit (Takara Clontech) für die Generierung von ds-cDNA aus kleinen Mengen mRNA verwendet.

Sonstige Materialien

Falls nicht gesondert erwähnt wurden alle verwendeten Labormaterialien bei den Firmen Carl-Roth, Hartenstein, MAGV und NeoLab bezogen. Weitere Materialien schließen ein: PTFE-Folie (Laborbedarf H. Saur), PTFE-Platten (0.25 mm; Norton Fluorplast), PS-6-Kammer-Platten (OrangeScientific), Parallel Plate FlowChamber (Glycotech Corporation), Silastic Laboratory Tubing (Glycotech Corporation), Liquid Body Latex (Latexa Deutschland GmbH).

4.1.2 Ausgangsstämme

Escherichia coli-Stämme

Für die Transformation der cDNA Bank wurde der Stamm ElectroMAX™ DH5 α -E™ (Invitrogen) verwendet, bei dem es sich um ein Derivat des *E. coli*-Stammes DH5 α ™ mit folgendem Genotyp handelt: F- ϕ 80lacZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF) U169 recA1 endA1 hsdR17 (rk-, mk+) gal- phoA supE44 λ - thi-1 gyrA96 relA1.

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

Für alle übrigen Klonierungen wurde der Stamm TOP10 (Invitrogen) verwendet, bei dem es sich um ein Derivat des *E. coli*-Stammes DH10B mit folgenden genetischen Markern handelt: F- mcrA Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC) ϕ 80lacZ Δ M15 Δ lacX74 nupG recA1 araD139 Δ (ara-leu)7697 galE15 galK16 rpsL(StrR) endA1 λ -.

Die Nomenklatur von *E. coli*-Stämmen richtet sich nach (Demerec et al. 1966)

Saccharomyces cerevisiae-Stämme

Der Stamm YHUM0909 diene als Wildtyp-Kontrollstamm für die Genbank-Expression, er hat den Genotyp Σ 1278b *MATa ura3-52* und geht aus dem Stamm HOG105 durch stabile Integration von *TRP1* hervor. Der Stamm YHUM0924 diene als adhäsionsdefizienter Stamm für die Expression der Genbank, er hat den Genotyp Σ 1278b *MATa ura3-52 flo11 Δ ::KANR* und geht aus dem Stamm HOG322 durch stabile Integration von *TRP1* hervor. Beide Stämme zur Verfügung gestellt von Stefan Brückner und Hans-Ulrich Mösch (Philipps-Universität Marburg).

Maisvarietäten (*Zea mays* spec.)

Für alle Pflanzeninfektionen wurde die Maisvarietät Early Golden Bantam (Olds Seed Company, Madison, Wisconsin, USA) verwendet.

Ustilago maydis-Stämme

Tabelle 6: Ausgangsstämme.

Stamm	Genotyp	Resistenz	Referenz
FB1	<i>a1 b1</i>	-	(Banuett und Herskowitz 1989)
FB2	<i>a2 b2</i>	-	(Banuett und Herskowitz 1989)
SG200	<i>a1:mfa2 bE1bW2</i>	Phleo ^R	(Kämper et al. 2006)

SG200cfp	<i>a1mfa2 bW2bE1 ip^r[P_{oma}:cfp]ip^s</i>	Phleo ^R , Cbx ^R	(Flor-Parra <i>et al.</i> 2006)
SG200yfp	<i>a1mfa2 bW2bE1 ip^r[P_{oma}:yfp]ip^s</i>	Phleo ^R , Cbx ^R	(Flor-Parra <i>et al.</i> 2006)
SG200 Δbiz1	<i>a1mfa2 bW2bE1 Δbiz1::Hyg^R</i>	Phleo ^R , Cbx ^R	(Flor-Parra <i>et al.</i> 2006)
SG200 Δhdp2	<i>a1mfa2 bW2bE1 Δhdp2::Hyg^R</i>	Phleo ^R , Cbx ^R	(Scherer, nicht publiziert)
SG200 Δrbf1	<i>a1mfa2 bW2bE1 Δrbf1::Hyg^R</i>	Phleo ^R , Cbx ^R	(Heimel <i>et al.</i> 2010)
SG200Δbiz1 cfp	<i>a1mfa2 bW2bE1 ip^r[P_{oma}:cfp]ip^s Δbiz1::Hyg^R</i>	Phleo ^R , Cbx ^R , Hyg ^R	(Flor-Parra <i>et al.</i> 2006)
SG200Δbiz1 yfp	<i>a1mfa2 bW2bE1 ip^r[P_{oma}:yfp]ip^s Δbiz1::Hyg^R</i>	Phleo ^R , Cbx ^R , Hyg ^R	(Flor-Parra <i>et al.</i> 2006)
SG200Δhdp2 cfp (UMS89)	<i>a1mfa2 bW2bE1 ip^r[P_{oma}:cfp]ip^s Δhdp2::Hyg^R</i>	Phleo ^R , Cbx ^R , Hyg ^R	(Scherer, nicht publiziert)
SG200Δhdp2 yfp (UMS90)	<i>a1mfa2 bW2bE1 ip^r[P_{oma}:yfp]ip^s Δhdp2::Hyg^R</i>	Phleo ^R , Cbx ^R , Hyg ^R	(Scherer, nicht publiziert)
SG200Δrbf1 cfp (UMS87)	<i>a1mfa2 bW2bE1 ip^r[P_{oma}:cfp]ip^s Δrbf1::Hyg^R</i>	Phleo ^R , Cbx ^R , Hyg ^R	(Heimel <i>et al.</i> 2010)
SG200Δrbf1 yfp (UMS88)	<i>a1mfa2 bW2bE1 ip^r[P_{oma}:yfp]ip^s Δrbf1::Hyg^R</i>	Phleo ^R , Cbx ^R , Hyg ^R	(Heimel <i>et al.</i> 2010)
SG200Δplp2^{#7}	<i>a1mfa2 bW2bE1 Δum04342::Hyg^R</i>	Phleo ^R , Hyg ^R	(Vranes, nicht publiziert)
SG200Δplp2^{#11}	<i>a1mfa2 bW2bE1 Δum04342::Hyg^R</i>	Phleo ^R , Hyg ^R	(Vranes, nicht publiziert)
SG200Δplp2comp^{#2}	<i>a1mfa2 bW2bE1 Δum04342::Hyg^R ip^r[P_{plp2}:plp2]ip^s</i>	Phleo ^R , Cbx ^R , Hyg ^R	(Schaaf, nicht publiziert)
SG200Δplp2comp^{#2}	<i>a1mfa2 bW2bE1 Δum04342::Hyg^R ip^r[P_{plp2}:plp2]ip^s</i>	Phleo ^R , Cbx ^R , Hyg ^R	(Schaaf, nicht publiziert)
SG200Δplp2comp^{#2}	<i>a1mfa2 bW2bE1 Δum04342::Hyg^R ip^r[P_{plp2}:plp2]ip^s</i>	Phleo ^R , Cbx ^R , Hyg ^R	(Schaaf, nicht publiziert)

Tabelle 7: In dieser Arbeit hergestellte *U. maydis*-Stämme.

Stamm	Genotyp	Resistenz	Ausgangsstamm
KPH6	<i>a1:mfa2 bE1bW2 Δum00466::Hyg^R</i>	Phleo ^R , Hyg ^R	SG200
KPH7	<i>a1:mfa2 bE1bW2 Δum00466::Hyg^R</i>	Phleo ^R , Hyg ^R	SG200
KPH8	<i>a1:mfa2 bE1bW2 Δum00466::Hyg^R</i>	Phleo ^R , Hyg ^R	SG200
KPH9	<i>a1mfa2 bW2bE1 ip^r[P_{oma}:cfp]ip^s Δum00480::Hyg^R</i>	Phleo ^R , Cbx ^R , Hyg ^R	SG200cfp
KPH10	<i>a1mfa2 bW2bE1 ip^r[P_{oma}:cfp]ip^s Δum00480::Hyg^R</i>	Phleo ^R , Cbx ^R , Hyg ^R	SG200cfp
KPH11	<i>a1mfa2 bW2bE1 ip^r[P_{oma}:cfp]ip^s Δum00480::Hyg^R</i>	Phleo ^R , Cbx ^R , Hyg ^R	SG200cfp
KPH12	<i>a1mfa2 bW2bE1 ip^r[P_{oma}:cfp]ip^s Δum00480::Hyg^R</i>	Phleo ^R , Cbx ^R , Hyg ^R	SG200cfp
KPH13	<i>a1mfa2 bW2bE1 ip^r[P_{oma}:cfp]ip^s Δum00480::Hyg^R</i>	Phleo ^R , Cbx ^R , Hyg ^R	SG200cfp
KPH14	<i>a1mfa2 bW2bE1 ip^r[P_{oma}:cfp]ip^s Δum00480::Hyg^R</i>	Phleo ^R , Cbx ^R , Hyg ^R	SG200cfp
KPH15	<i>a1mfa2 bW2bE1 ip^r[P_{oma}:cfp]ip^s Δum04248::Hyg^R</i>	Phleo ^R , Cbx ^R , Hyg ^R	SG200cfp
KPH16	<i>a1mfa2 bW2bE1 ip^r[P_{oma}:cfp]ip^s Δum04248::Hyg^R</i>	Phleo ^R , Cbx ^R , Hyg ^R	SG200cfp
KPH17	<i>a1mfa2 bW2bE1 ip^r[P_{oma}:cfp]ip^s Δum04248::Hyg^R</i>	Phleo ^R , Cbx ^R , Hyg ^R	SG200cfp
KPH18	<i>a1mfa2 bW2bE1 ip^r[P_{oma}:cfp]ip^s Δum04248::Hyg^R</i>	Phleo ^R , Cbx ^R , Hyg ^R	SG200cfp
KPH19	<i>a1mfa2 bW2bE1 ip^r[P_{oma}:cfp]ip^s Δum02717::Hyg^R</i>	Phleo ^R , Cbx ^R , Hyg ^R	SG200cfp

KPH67	<i>a1mfa2 bW2bE1 ip'[P_{oma:yfp}]ip^s Δum02865::Hyg^R</i>	Phleo ^R , Cbx ^R , Hyg ^R	SG200yfp
KPH68	<i>a1mfa2 bW2bE1 ip'[P_{oma:yfp}]ip^s Δum02865::Hyg^R</i>	Phleo ^R , Cbx ^R , Hyg ^R	SG200yfp
KPH69	<i>a1mfa2 bW2bE1 ip'[P_{oma:yfp}]ip^s Δum02865::Hyg^R</i>	Phleo ^R , Cbx ^R , Hyg ^R	SG200yfp
KPH70	<i>a1mfa2 bW2bE1 ip'[P_{oma:yfp}]ip^s Δum02865::Hyg^R</i>	Phleo ^R , Cbx ^R , Hyg ^R	SG200yfp
KPH71	<i>a1mfa2 bW2bE1 ip'[P_{oma:yfp}]ip^s Δum06120::Hyg^R</i>	Phleo ^R , Cbx ^R , Hyg ^R	SG200yfp
KPH72	<i>a1mfa2 bW2bE1 ip'[P_{oma:yfp}]ip^s Δum06120::Hyg^R</i>	Phleo ^R , Cbx ^R , Hyg ^R	SG200yfp
KPH73	<i>a1mfa2 bW2bE1 ip'[P_{oma:yfp}]ip^s Δum06120::Hyg^R</i>	Phleo ^R , Cbx ^R , Hyg ^R	SG200yfp
KPH76	<i>a1 b1 ip'[P_{oma:cfp}]ip^s</i> (nicht Southern/PCR überprüft)	Cbx ^R	FB1
KPH77	<i>a1 b1 ip'[P_{oma:cfp}]ip^s</i> (nicht Southern/PCR überprüft)	Cbx ^R	FB1
KPH78	<i>a1 b1 ip'[P_{oma:cfp}]ip^s</i> (nicht Southern/PCR überprüft)	Cbx ^R	FB1
KPH79	<i>a1 b1 ip'[P_{oma:yfp}]ip^s</i> (nicht Southern/PCR überprüft)	Cbx ^R	FB1
KPH80	<i>a1 b1 ip'[P_{oma:yfp}]ip^s</i> (nicht Southern/PCR überprüft)	Cbx ^R	FB1
KPH81	<i>a1 b1 ip'[P_{oma:yfp}]ip^s</i> (nicht Southern/PCR überprüft)	Cbx ^R	FB1
KPH82	<i>a2 b2 ip'[P_{oma:cfp}]ip^s</i> (nicht Southern/PCR überprüft)	Cbx ^R	FB2
KPH83	<i>a2 b2 ip'[P_{oma:cfp}]ip^s</i> (nicht Southern/PCR überprüft)	Cbx ^R	FB2
KPH84	<i>a2 b2 ip'[P_{oma:cfp}]ip^s</i> (nicht Southern/PCR überprüft)	Cbx ^R	FB2
KPH85	<i>a2 b2 ip'[P_{oma:yfp}]ip^s</i> (nicht Southern/PCR überprüft)	Cbx ^R	FB2
KPH86	<i>a2 b2 ip'[P_{oma:yfp}]ip^s</i> (nicht Southern/PCR überprüft)	Cbx ^R	FB2
KPH87	<i>a2 b2 ip'[P_{oma:yfp}]ip^s</i> (nicht Southern/PCR überprüft)	Cbx ^R	FB2
KPH88	<i>a1mfa2 bW2bE1 um04342:gfp</i>	Phleo ^R , Hyg ^R	SG200Δum04342#7
KPH89	<i>a1mfa2 bW2bE1 um04342:gfp</i>	Phleo ^R , Hyg ^R	SG200Δum04342#7
KPH90	<i>a1mfa2 bW2bE1 um04342:gfp</i>	Phleo ^R , Hyg ^R	SG200Δum04342#7
KPH91	<i>a1mfa2 bW2bE1 um04342:gfp</i>	Phleo ^R , Hyg ^R	SG200Δum04342#7
KPH92	<i>a1mfa2 bW2bE1 Δum04342 ip'[P_{mig2.5:um04342:STOP-gfp}]ip^s</i>	Phleo ^R , Hyg ^R , Cbx ^R	SG200Δum04342#7
KPH93	<i>a1mfa2 bW2bE1 Δum04342 ip'[P_{mig2.5:um04342:STOP-gfp}]ip^s</i>	Phleo ^R , Hyg ^R , Cbx ^R	SG200Δum04342#7
KPH94	<i>a1mfa2 bW2bE1 Δum04342 ip'[P_{mig2.5:um04342:STOP-gfp}]ip^s</i>	Phleo ^R , Hyg ^R , Cbx ^R	SG200Δum04342#7
KPH95	<i>a1mfa2 bW2bE1 Δum04342 ip'[P_{mig2.5:um04342:gfp}]ip^s</i>	Phleo ^R , Hyg ^R , Cbx ^R	SG200Δum04342#7
KPH96	<i>a1mfa2 bW2bE1 Δum04342 ip'[P_{mig2.5:um04342:gfp}]ip^s</i>	Phleo ^R , Hyg ^R , Cbx ^R	SG200Δum04342#7
KPH97	<i>a1mfa2 bW2bE1 Δum04342 ip'[P_{mig2.5:um04342:gfp}]ip^s</i>	Phleo ^R , Hyg ^R , Cbx ^R	SG200Δum04342#7
KPH98	<i>a1mfa2 bW2bE1 Δum04342 ip'[P_{mig2.5:um04342₆₁₋₃₃₂₄:STOP-gfp}]ip^s</i>	Phleo ^R , Hyg ^R , Cbx ^R	SG200Δum04342#7
KPH99	<i>a1mfa2 bW2bE1 Δum04342 ip'[P_{mig2.5:um04342₆₁₋₃₃₂₄:STOP-gfp}]ip^s</i>	Phleo ^R , Hyg ^R , Cbx ^R	SG200Δum04342#7
KPH100	<i>a1mfa2 bW2bE1 Δum04342 ip'[P_{mig2.5:um04342₆₁₋₃₃₂₄:STOP-gfp}]ip^s</i>	Phleo ^R , Hyg ^R , Cbx ^R	SG200Δum04342#7
KPH101	<i>a1mfa2 bW2bE1 Δum04342 1x ip'[P_{mig2.5:um04342_{NLS1mut}:STOP-gfp}]ip^s</i>	Phleo ^R , Hyg ^R , Cbx ^R	SG200Δum04342#7
KPH102	<i>a1mfa2 bW2bE1 Δum04342 nx ip'[P_{mig2.5:um04342_{NLS1mut}:STOP-gfp}]ip^s</i>	Phleo ^R , Hyg ^R , Cbx ^R	SG200Δum04342#7
KPH103	<i>a1mfa2 bW2bE1 Δum04342 1x ip'[P_{mig2.5:um04342_{NLS1mut}:STOP-gfp}]ip^s</i>	Phleo ^R , Hyg ^R , Cbx ^R	SG200Δum04342#7
KPH104	<i>a1mfa2 bW2bE1 Δum04342 1x ip'[P_{mig2.5:um04342_{NLS2mut}:STOP-gfp}]ip^s</i>	Phleo ^R , Hyg ^R , Cbx ^R	SG200Δum04342#7
KPH105	<i>a1mfa2 bW2bE1 Δum04342 1x ip'[P_{mig2.5:um04342_{NLS3mut}:STOP-gfp}]ip^s</i>	Phleo ^R , Hyg ^R , Cbx ^R	SG200Δum04342#7
KPH106	<i>a1mfa2 bW2bE1 Δum04342 nx ip'[P_{mig2.5:um04342_{NLS3mut}:STOP-gfp}]ip^s</i>	Phleo ^R , Hyg ^R , Cbx ^R	SG200Δum04342#7
KPH107	<i>a1mfa2 bW2bE1 Δum04342 1x ip'[P_{mig2.5:um04342_{NLS3mut}:STOP-gfp}]ip^s</i>	Phleo ^R , Hyg ^R , Cbx ^R	SG200Δum04342#7
KPH108	<i>a1mfa2 bW2bE1 Δum04342 nx ip'[P_{mig2.5:um04342_{NLS123mut}:STOP-gfp}]ip^s</i>	Phleo ^R , Hyg ^R , Cbx ^R	SG200Δum04342#7
KPH109	<i>a1mfa2 bW2bE1 Δum04342 1x ip'[P_{mig2.5:um04342_{NLS123mut}:STOP-gfp}]ip^s</i>	Phleo ^R , Hyg ^R , Cbx ^R	SG200Δum04342#7
KPH110	<i>a1mfa2 bW2bE1 Δum04342 1x ip'[P_{mig2.5:um04342_{NLS123mut}:STOP-gfp}]ip^s</i>	Phleo ^R , Hyg ^R , Cbx ^R	SG200Δum04342#7
KPH110	<i>a1 b1 Δum04342::Hyg^R</i>	Hyg ^R	FB1
KPH111	<i>a1 b1 Δum04342::Hyg^R</i>	Hyg ^R	FB1
KPH113	<i>a2 b2 Δum04342::Hyg^R</i>	Hyg ^R	FB2
KPH114	<i>a2 b2 Δum04342::Hyg^R</i>	Hyg ^R	FB2

KPH115	<i>a2 b2 Δum04342::Hyg^R</i>	Hyg ^R	FB2
KPH116	<i>a1mfa2 bW2bE1 ip^r[P_{oma}:cfp]ip^s Δum04342::Hyg^R</i>	Phleo ^R , Hyg ^R , Cbx ^R	SG200cfp
KPH117	<i>a1mfa2 bW2bE1 ip^r[P_{oma}:cfp]ip^s Δum04342::Hyg^R</i>	Phleo ^R , Hyg ^R , Cbx ^R	SG200cfp
KPH118	<i>a1mfa2 bW2bE1 ip^r[P_{oma}:cfp]ip^s Δum04342::Hyg^R</i>	Phleo ^R , Hyg ^R , Cbx ^R	SG200cfp
KPH119	<i>a1 b1 um04342:HA</i>	Hyg ^R	FB1
KPH120	<i>a1 b1 um04342:HA</i>	Hyg ^R	FB1
KPH121	<i>a1 b1 um04342:HA</i>	Hyg ^R	FB1
KPH122	<i>a2 b2 um04342:HA</i>	Hyg ^R	FB2
KPH123	<i>a2 b2 um04342:HA</i>	Hyg ^R	FB2
KPH124	<i>a2 b2 um04342:HA</i>	Hyg ^R	FB2
KPH125	<i>a1 b1um04342:Strep_HA</i>	Hyg ^R	FB1
KPH126	<i>a1 b1 um04342:Strep_HA</i>	Hyg ^R	FB1
KPH127	<i>a1b1 um04342:Strep_HA</i>	Hyg ^R	FB1
KPH128	<i>a2 b2 um04342:Strep_HA</i>	Hyg ^R	FB2
KPH129	<i>a2 b2 um04342:Strep_HA</i>	Hyg ^R	FB2
KPH130	<i>a2 b2 um04342:Strep_HA</i>	Hyg ^R	FB2
KPH131	<i>a1 b1 Δum04342[P_{um04342}:gfp,ip^R]</i>	Cbx ^R	KPH111
KPH132	<i>a1 b1 Δum04342[P_{um04342}:gfp,ip^R]</i>	Cbx ^R	KPH111
KPH131	<i>a2 b2 Δum04342[P_{um04342}:gfp,ip^R]</i>	Cbx ^R	KPH113
KPH131	<i>a2 b2 Δum04342[P_{um04342}:gfp,ip^R]</i>	Cbx ^R	KPH113
KPH131	<i>a2 b2 Δum04342[P_{um04342}:gfp,ip^R]</i>	Cbx ^R	KPH113
KPH136	<i>a1 b1 Δum04342[P_{um04342}:gfp,ip^R]</i>	Cbx ^R	KPH111
KPH137	<i>a1mfa2 bW2bE1 ip^r[P_{otef}:NLS1:gfp]ip^s</i>	Phleo ^R , Cbx ^R	SG200
KPH138	<i>a1mfa2 bW2bE1 ip^r[P_{otef}:NLS1:gfp]ip^s</i>	Phleo ^R , Cbx ^R	SG200
KPH139	<i>a1mfa2 bW2bE1 ip^r[P_{otef}:NLS2:gfp]ip^s</i>	Phleo ^R , Cbx ^R	SG200
KPH140	<i>a1mfa2 bW2bE1 ip^r[P_{otef}:NLS2:gfp]ip^s</i>	Phleo ^R , Cbx ^R	SG200
KPH141	<i>a1mfa2 bW2bE1 ip^r[P_{otef}:NLS3:gfp]ip^s</i>	Phleo ^R , Cbx ^R	SG200
KPH142	<i>a1mfa2 bW2bE1 ip^r[P_{otef}:NLS3:gfp]ip^s</i>	Phleo ^R , Cbx ^R	SG200
KPH143	<i>a1mfa2 bW2bE1 ip^r[P_{otef}:NLS3:gfp]ip^s</i>	Phleo ^R , Cbx ^R	SG200
KPH144	<i>a1mfa2 bW2bE1 Δum04342 1x ip^r[P_{mig2.5}:um04342_{TAD2mut}:STOP-gfp]ip^s</i>	Phleo ^R , Cbx ^R	SG200Δum04342#7
KPH145	<i>a1mfa2 bW2bE1 Δum04342 1x ip^r[P_{mig2.5}:um04342_{TAD2mut}:STOP-gfp]ip^s</i>	Phleo ^R , Cbx ^R	SG200Δum04342#7
KPH146	<i>a1mfa2 bW2bE1 Δum04342 1x ip^r[P_{mig2.5}:um04342_{TAD1mut}:STOP-gfp]ip^s</i>	Phleo ^R , Cbx ^R	SG200Δum04342#7
KPH147	<i>a1mfa2 bW2bE1 Δum04342 1x ip^r[P_{mig2.5}:um04342_{TAD1mut}:STOP-gfp]ip^s</i>	Phleo ^R , Cbx ^R	SG200Δum04342#7
KPH148	<i>a1mfa2 bW2bE1 Δum04342 1x ip^r[P_{mig2.5}:um04342_{TAD1mut}:STOP-gfp]ip^s</i>	Phleo ^R , Cbx ^R	SG200Δum04342#7
KPH149	<i>a1:mfa2 bE1bW2 Δum01513::Hyg^R</i>	Phleo ^R , Hyg ^R	SG200

Die homologen Rekombinationsereignisse wurden, wenn nicht gesondert angemerkt, bei allen in dieser Arbeit hergestellten Stämmen mittels Southern-Blot Analyse und/oder analytischer PCR verifiziert.

4.1.3 Plasmide und Plasmidkonstruktionen

Falls nicht gesondert erwähnt trugen alle Plasmide eine Ampizillin-Resistenzkassette zur Selektion in *E. coli*. Alle Klonierungsschritte wurden durch Restriktionsanalysen überprüft, alle eingebrachten PCR-Amplifikate wurden sequenziert.

Ausgangsplasmide

pUC19 (Yanisch-Perron *et al.* 1985)

Klonierungsvektor, Blau/Weiß-Selektion ist möglich.

pCRII-Topo (Invitrogen)

Vektor zur Klonierung von PCR-Produkten mittels Topoisomerase-Aktivität. Die entsprechenden PCR-Amplifikate können mit EcoRI wieder ausgeschnitten werden; Blau/Weiß-Selektion ist möglich.

pBS-hhn (J. Kämper, pers. Mitteilung)

Enthält eine 1.884 bp Hygromycin-Resistenzkassette als SfiI-Fragment. Das *hph*-Gen wird dabei von dem *hsp70*-Promotor und dem *nos*-Terminator flankiert. Die Kassette wird flankiert von der 5'-SfiI-Schnittstelle 5'-GGCCTAGATGGCC-3' und von der 3'-SfiI-Schnittstelle 5'-GGCCTGAGTGGCC-3'.

p123 (Aichinger 2000)

Enthält *gfp* unter der Kontrolle des *otef*-Promotors für die homologe Integration in der *ip*-Lokus.

p123GW (M. Vranes, pers. Mitteilung)

Enthält die zwischen den *otef*-Promotor und *gfp* inserierte GATEWAY®-Leserahmen-Kassette A.

p416GalL (Mumberg *et al.* 1994)

Ein für die Propagierung in *E. coli* und *S. cerevisiae* geeigneter Expressionsvektor. Enthält die *CEN6_ARS4* Replikationssequenz zur Propagierung und das *GALL*-Promotorfragment für die induzierbare Expression von in die Klonierungsstelle inserierten Genen in *S. cerevisiae*.

pGE101 (Ladendorf, pers. Mitteilung)

Ursprünglich verwendet zur Klonierung einer cDNA Bank, enthält ein modifiziertes *gfp* für die konstitutive Expression in *E. coli*.

pDONR221 (Invitrogen)

Donorvektor mit M13 Forward und M13 Reverse Primer-Bindestellen, ermöglicht eine GATEWAY® *in vitro* Klonierung von PCR Fragmenten. Trägt eine Kanamycin-Resistenzkassette sowie eine GATEWAY®-Klonierungskassette mit Chloramphenicol-Resistenzkassette und *ccdB*-Selbstmordgen.

pJF1_GW1 (M. Vranes, pers. Mitteilung)

Entstanden durch die Inserierung der GATEWAY®-Leserahmen-Kassette A in pJF (Farfsing 2004). Enthält ein 860 bp umfassendes XhoI und NcoI flankiertes *mig2.5*-Promotorfragment, gefolgt von der GATEWAY®-Kassette und dem 717 bp großen *gfp* ORF. Ermöglicht die GATEWAY®-vermittelte Insertion eines PCR Fragments für die generierung einer C-terminalen GFP-Fusion unter der Kontrolle des *P_{mig2.5}* - Promotors.

pCS2 (C. Schaaf, pers. Mitteilung)

Vektor für die C-terminale Fusion eines *gfp* an den ORF von *pst2*, trägt das SfiI-HindIII-flankierte Vektorrückrad mit pUC Replikationsursprung, die SfiI-flankierte *gfp*-Hyg-Kassette aus pUMa317 sowie ein 699 bp umfassendes HindIII-SfiI-Fragment des 3'-Bereichs des *pst2*-ORFs.

pCS2-StrepII (C. Schaaf, pers. Mitteilung)

Enthält die 3030 bp große *2xStrep*-Hygromycin-Kassette, welche für C-terminale Fusionen verwendet werden kann. Die Kassette wird flankiert von der 5'-SfiI-Schnittstelle 5'-GGCCAACGCGGCC-3' und von der 3'-SfiI-Schnittstelle 5'-GGCCTGAGTGGCC-3'.

pCS2-StrepIII (C. Schaaf, pers. Mitteilung)

Enthält die 3090 bp große *3xstrep*-Hygromycin-Kassette, welche für C-terminale Fusionen verwendet werden kann. Die Kassette wird flankiert von der 5'-SfiI-Schnittstelle 5'-GGCCAACGCGGCC-3' und von der 3'-SfiI-Schnittstelle 5'-GGCCTGAGTGGCC-3'.

pCS2-dt (C. Schaaf, pers. Mitteilung)

Enthält die 3189 bp große *3xstrep-3xha*-Hygromycin-Kassette, welche für C-terminale Fusionen verwendet werden kann. Die Kassette wird flankiert von der 5'-SfiI-Schnittstelle 5'-GGCCAACGCGGCC-3' und von der 3'-SfiI-Schnittstelle 5'-GGCCTGAGTGGCC-3'.

pDS33 (Schuler, pers. Mitteilung)

„Entry-Vektor“ aus pDONR221 mit einem *gfp*-Insert.

pUMa261 (Brachmann *et al.* 2004)

Enthält eine 2722 bp große Hygromycin-Kassette, welche für die Ligation von Deletionskonstrukten verwendet werden kann. Das *hph*-Gen wird dabei von dem *hsp70*-Promotor und dem *hsp70*-Terminator flankiert. Die Kassette wird flankiert von der 5'-SfiI-Schnittstelle 5'-GGCCTAGATGGCC-3' und von der 3'-SfiI-Schnittstelle 5'-GGCCTGAGTGGCC-3'.

pUMa317 (Becht *et al.* 2006)

Enthält die 3733 bp große *gfp*-Hygromycin-Kassette, welche für C-terminale Fusionen verwendet werden kann. Die Kassette wird flankiert von der 5'-SfiI-

Schnittstelle 5'-GGCCAACGCGGCC-3' und von der 3'-SfiI-Schnittstelle 5'-GGCTGAGTGGCC-3'.

pUMa647 (Zarnack, pers. Mitteilung)

Enthält die 5161 bp große 3xgfp-Hygromycin-Kassette, welche für C-terminale Fusionen verwendet werden kann. Die Kassette wird flankiert von der 5'-SfiI-Schnittstelle 5'-GGCCAACGCGGCC-3' und von der 3'-SfiI-Schnittstelle 5'-GGCTGAGTGGCC-3'.

pUMa792 (Feldbrügge, pers. Mitteilung)

Enthält die 3102 bp große 3xha-Hygromycin-Kassette, welche für C-terminale Fusionen verwendet werden kann. Die Kassette wird flankiert von der 5'-SfiI-Schnittstelle 5'-GGCCAACGCGGCC-3' und von der 3'-SfiI-Schnittstelle 5'-GGCTGAGTGGCC-3'.

pOMA-CFP (Vranes 2006)

Dieser Vektor enthält das *cfp*-Gen unter der Kontrolle des *oma*-Promotors. Verwendet zur homologen Integration von *P_{oma}::cfp* in den *ip*-Locus von *U. maydis*.

pOMA-YFP

Dieser Vektor enthält das *yfp*-Gen unter der Kontrolle des *oma*-Promotors. Verwendet zur homologen Integration von *P_{oma}::cfp* in den *ip*-Locus von *U. maydis*.

Lineare Ausgangs-Konstrukte

GATEWAY®-Leserahmen-Kassette A (Invitrogen)

Lineare GATEWAY®-Kassette mit Leserahmen A für die Insertion in einen linearisierten Zielvektor; enthält die *attR* Klonierungsstellen, die Chloramphenicol-Resistenzkassette und das *ccdB*-Selbstmordgen.

GATEWAY®-Leserahmen-Kassette B (Invitrogen)

Lineare GATEWAY®-Kassette mit Leserahmen B für die Insertion in einen linearisierten Zielvektor; enthält die *attR* Klonierungsstellen, die Chloramphenicol-Resistenzkassette und das *ccdB*-Selbstmordgen.

In dieser Arbeit hergestellte Plasmide

pKPH26

„Destination-Vektor“ aus einer GATEWAY®-LR *in vitro* Klonierung eines PCR-Produkts, welches ein 2638 bp *um04342*-Promotorfragment gefolgt von dem vollständigen *um04342*-ORF inklusive Stopp-Codon umfasst, in den Vektor p123GW für die ektopische Komplementation einer $\Delta plp2$ -Deletion.

pKPH27

„Entry-Vektor“ aus einer GATEWAY®-BP *in vitro*-Klonierung eines PCR-Produkts, welches einem im 5'-Bereich um 66 bp verkürzten Fragment des *um04342*-

ORF ohne Stopp-Codon entspricht, in den Vektor pDONR221; trägt die Kanamycin-Resistenzkassette

pKPH28

Vier-Fragment-Ligation von einem SfiI-Fragment aus pCS2, einem ApaI, HindIII-Fragment aus pCS2, einem PCR-generierten, ApaI und SfiI geschnittenen ~1 kb umfassenden 3'-Bereich von *um04342* ohne Stop Codon sowie einem PCR-generierten, HindIII und SfiI geschnittenen 1 kb umfassenden Fragment der 5'-gelegenen Flanke von *um04342*. Ermöglicht die *in locus-um04342:gfp* Fusion in *U. maydis*; trägt Amp- und Kan-Resistenzkassetten.

pKPH29

Derivat von p416GalL, welches durch Deletion der 3' vom *URA*-Marker gelegenen NsiI Schnittstelle erzeugt wurde.

pKPH31

„Destination-Vektor“ aus einer GATEWAY®-LR *in vitro* Klonierung eines PCR-Produkts, welches den *um04342* ORF inklusive 5' Signalsequenz und Stopp-Codon umfasst, in den Vektor pJF1_GW1, ermöglicht die ektopische Komplementation einer $\Delta plp2$ Deletion unter Kontrolle des *P_{mig2.5}* Promotors.

pKPH32

„Destination-Vektor“ aus einer GATEWAY®-LR *in vitro* Klonierung eines PCR-Produkts, welches den *um04342* ORF inklusive 5'-Signalsequenz und ohne Stopp-Codon umfasst, in den Vektor pJF1_GW1, ermöglicht die ektopische Komplementation einer $\Delta plp2$ Deletion unter Kontrolle des *P_{mig2.5}* Promotors.

pKPH33

„Destination-Vektor“ aus einer GATEWAY®-LR *in vitro* Klonierung eines PCR-Produkts, welches einem im 5' Bereich um 66 bp verkürzten Fragment des *um04342* ORF inklusive Stopp-Codon entspricht, in den Vektor pJF1_GW1, ermöglicht die ektopische Komplementation einer $\Delta plp2$ Deletion unter Kontrolle des *P_{mig2.5}* Promotors.

pKPH34

„Destination-Vektor“ aus einer GATEWAY®-LR *in vitro* Klonierung eines PCR-Produkts aus der NLS1 Mutagenese-PCR auf pKPH26, in den Vektor pJF1_GW1, ermöglicht die ektopische Komplementation einer $\Delta plp2$ Deletion unter Kontrolle des *P_{mig2.5}* Promotors.

pKPH35

„Destination-Vektor“ aus einer GATEWAY®-LR *in vitro* Klonierung eines PCR-Produkts aus der NLS2 Mutagenese-PCR auf pKPH26, in den Vektor pJF1_GW1, ermöglicht die ektopische Komplementation einer $\Delta plp2$ Deletion unter Kontrolle des *P_{mig2.5}* Promotors.

pKPH36

„Destination-Vektor“ aus einer GATEWAY®-LR *in vitro* Klonierung eines PCR-Produkts aus der NLS123 Mutagenese-PCR auf pKPH26, in den Vektor pJF1_GW1, ermöglicht die ektopische Komplementation einer $\Delta plp2$ Deletion unter Kontrolle des $P_{mig2.5}$ Promotors.

pKPH37

„Destination-Vektor“ aus einer GATEWAY®-LR *in vitro* Klonierung eines PCR-Produkts aus der NLS3 Mutagenese-PCR auf pKPH26, in den Vektor pJF1_GW1, ermöglicht die ektopische Komplementation einer $\Delta plp2$ Deletion unter Kontrolle des $P_{mig2.5}$ Promotors.

pKPH38

„Entry-Vektor“ aus einer GATEWAY®-BP *in vitro* Klonierung eines PCR-Produkts aus der NLS1 Mutagenese-PCR auf pKPH26, in den Vektor pDONR221; trägt die Kanamycin-Resistenzkassette.

pKPH39

„Entry-Vektor“ aus einer GATEWAY®-BP *in vitro* Klonierung eines PCR-Produkts aus der NLS2 Mutagenese-PCR auf pKPH26, in den Vektor pDONR221; trägt die Kanamycin-Resistenzkassette.

pKPH40

„Entry-Vektor“ aus einer GATEWAY®-BP *in vitro* Klonierung eines PCR-Produkts aus der NLS123 Mutagenese-PCR auf pKPH26, in den Vektor pDONR221; trägt die Kanamycin-Resistenzkassette.

pKPH41

Austausch des SfiI-Fragments der *gfp*-Hygromycin-Kassette aus pKPH28 mit einem SfiI Fragment der *3xha*-Hygromycin-Kassette aus pUMa792. Ermöglicht die *in locus um04342:3xha* Fusion in *U. maydis*; trägt Amp- und Kan-Resistenzkassetten.

pKPH42

Austausch des SfiI-Fragments der *gfp*-Hygromycin-Kassette aus pKPH28 mit einem SfiI-Fragment der StrepII-Hygromycin-Kassette aus pCS2-StrepII. Ermöglicht die *in locus um04342:strepII* Fusion in *U. maydis*; trägt Amp- und Kan-Resistenzkassetten.

pKPH43

Austausch des SfiI Fragments der *gfp*-Hygromycin-Kassette aus pKPH28 mit einem SfiI-Fragment der *3xstrep*-Hygromycin-Kassette aus pCS2-StrepIII. Ermöglicht die *in locus um04342:strepIII* Fusion in *U. maydis*; trägt Amp- und Kan-Resistenzkassetten.

pKPH44

Insertion eines PCR-amplifizierten, NsiI-Schnittstellen sowie SMART-Klonierungsstellen flankierten, PCR-

amplifizierten *gfp*-Fragments aus pGE101 in die EcoRI Schnittstelle von pKPH29.

pKPH45

Topoisomerase-vermittelte Integration des Ligationsprodukts aus der Ligation eines SfiI geschnittenen 1 kb Fragments der 5'-Flanke von *um04342*, eines SfiI geschnittenen 1 kb Fragments der 3'-Flanke von *um04342* und der durch SfiI aus dem Vektor pUMa261 gewonnenen Hygromycin-Resistenzkassette in den Vektor pCRII-TOPO. Ermöglicht die Amplifikation des *um04342* Deletionskonstrukts für *U. maydis* Transformationen.

pKPH46

Austausch des SfiI-Fragments der *gfp*-Hygromycin-Kassette aus pKPH28 mit einem SfiI Fragment der *3xha-3xstrep*-Hygromycin-Kassette aus pCS2-dt. Ermöglicht die *in locus um04342:3xha:3xstrep* Fusion in *U. maydis*; trägt Amp- und Kan-Resistenzkassetten.

pKPH48

Ligation der GATEWAY® Kassette B in den SmaI geöffneten Vektor p416GalL. Ermöglicht die LR-Clonase-vermittelte Integration von attB-flankierten PCR Amplifikaten; trägt Amp- und Chloramphenicolresistenz sowie das *ccdB*-Selbstmordgen sowie den Auxotrophiemarker *URA3* für die Propagierung in *S. cerevisiae*.

pKPH50

„Entry-Vektor“ aus einer GATEWAY®-BP *in vitro* Klonierung eines PCR-Produkts, welches den *um04342*-ORF inklusive 5' Signalsequenz und Stopp-Codon umfasst, in den Vektor pDONR221; trägt die Kanamycin-Resistenzkassette.

pKPH51

„Entry-Vektor“ aus einer GATEWAY®-BP *in vitro* Klonierung eines PCR-Produkts, welches den *um04342*-ORF inklusive 5' Signalsequenz und ohne Stopp-Codon umfasst, in den Vektor pDONR221; trägt die Kanamycin-Resistenzkassette.

pKPH52

„Entry-Vektor“ aus einer GATEWAY®-BP *in vitro* Klonierung eines PCR-Produkts, welches einem im 5' Bereich um 66 bp verkürzten Fragment des *um04342*-ORF inklusive Stopp-Codon entspricht, in den Vektor pDONR221; trägt die Kanamycin-Resistenzkassette.

pKPH53

Ein aus einer QuikChange-PCR-Mutagenese gewonnenes Derivat von pKPH50. Entspricht einem „Entry-Vektor“ welcher den *um04342*-ORF inklusive 5' Signalsequenz, Stopp-Codon und einer mutierten TAD1 umfasst, im Vektorhintergrund pDONR221; trägt die Kanamycin-Resistenzkassette.

pKPH54

Ein aus einer QuikChange-PCR-Mutagenese gewonnenes Derivat von pKPH50. Entspricht einem „Entry-Vektor“ welcher den *um04342*-ORF inklusive 5' Signalsequenz, Stopp-Codon und einer mutierten TAD2 umfasst, im Vektorhintergrund pDONR221; trägt die Kanamycin-Resistenzkassette.

pKPH56

„Destination-Vektor“ aus einer GATEWAY®-LR *in vitro* Klonierung des *um04342*-ORF inklusive 5' Signalsequenz, Stopp-Codon und einer mutierten TAD1 aus pKPH53 in den Vektor pJF1_GW1, ermöglicht die ektopische Komplementation einer *Δplp2* Deletion unter Kontrolle des *P_{mig2.5}* Promotors.

pKPH57

„Destination-Vektor“ aus einer GATEWAY®-LR *in vitro* Klonierung des *um04342*-ORF inklusive 5' Signalsequenz, Stopp-Codon aus pKPH50 in den Vektor pKPH48, ermöglicht eine Galaktose-induzierbare Expression in *S. cerevisiae*.

pKPH58

„Destination-Vektor“ aus einer GATEWAY®-LR *in vitro* Klonierung des *um04342*-ORF ohne 5' Signalsequenz, Stopp-Codon aus pKPH52 in den Vektor pKPH48, ermöglicht eine Galaktose-induzierbare Expression in *S. cerevisiae*.

pKPH59

Drei-Fragment-Ligation eines SfiI und NotI geschnittenen 984 bp umfassenden PCR-Fragments der 5' Flanke von *um04342*, eines SfiI und KpnI geschnittenen 955 bp umfassenden PCR Fragments der 3' Flanke von *um04342* und dem KpnI und NotI geschnittenen Vektorrückrats von p123.

pKPH101

Entry-Vektor aus einer GATEWAY®-BP *in vitro* Klonierung eines PCR-Produkts, welches den *um04342-TAD1mut*-ORF aus pKPH53 ohne 5'-Signalsequenz und ohne Stopp-Codon umfasst.

pKPH102

Entry-Vektor aus einer GATEWAY®-BP *in vitro* Klonierung eines PCR-Produkts, welches den *um04342-TAD2mut*-ORF aus pKPH54 ohne 5'-Signalsequenz und ohne Stopp-Codon umfasst.

pKPH105

Entry-Vektor aus einer GATEWAY®-BP *in vitro* Klonierung eines PCR-Produkts, welches einer PCR-vermittelten Fusion von 5'-Signalsequenz, *gfp* und dem *um04342*-ORF mit Stopp-Codon entspricht.

pKPH124

„Destination-Vektor“ aus einer GATEWAY®-LR *in vitro* Klonierung eines *gfp* aus dem „Entry-Vektor“ in

den Vektor pKPH48, ermöglicht die Galaktose-induzierbare Expression von *gfp* in *S. cerevisiae*.

pKPH201

pCR-TOPOII mit dem Insert aus der 3'-RACE-Reaktion von *um04342*.

pKPH202

„Destination-Vektor“ aus einer GATEWAY®-LR *in vitro* Klonierung des *um04342*-ORF ohne 5' Signalsequenz und ohne Stopp-Codon aus pKPH27 in den Vektor pGBKT7GW, entspricht einem Hefe-Zwei-Hybrid Ködervektor.

pKPH203

„Destination-Vektor“ aus einer GATEWAY®-LR *in vitro*-Klonierung des *um04342-TAD1mut*-ORF ohne 5' Signalsequenz und ohne Stopp-Codon aus pKPH101 in den Vektor pGBKT7GW, entspricht einem Hefe-Zwei-Hybrid Ködervektor.

pKPH204

Entstanden durch Austausch des *gfp* in p123 durch ein PCR-amplifiziertes *nls1-gfp*-Fragment über NcoI und NotI.

pKPH205

Entstanden durch Austausch des *gfp* in p123 durch ein PCR-amplifiziertes *nls2-gfp*-Fragment über NcoI und NotI.

pKPH206

Entstanden durch Austausch des *gfp* in p123 durch ein PCR-amplifiziertes *nls3-gfp*-Fragment über NcoI und NotI.

Isolierte Plasmide aus der ersten Anreicherungsreihe

Folgende Plasmide im pKPH48-Plasmidhintergrund wurden aus der ersten Anreicherungsreihe der Genbank mit zusätzlichem ATG gewonnen und der 5'-Bereich der Insert-DNA sequenziert. Die Konstrukte enthalten die cDNA des angegebenen *U. maydis* Gens. Bei Insert-Größen von > 900 bp kann keine Aussage darüber getroffen werden, ob es sich um ein Vollängenkonstrukt handelt. Bekannte verkürzte Konstrukte sind mit einem * gekennzeichnet. Nicht identifizierbare Inserts sind mit „n/a“ gekennzeichnet. Es ist zu beachten, dass aufgrund des zusätzlichen ATGs vermutlich keine Expression des Gens in *S. cerevisiae* stattgefunden hat. In seltenen Fällen handelte es sich bei dem Insert um eine revers transkribierte ribosomale RNA, diese sind mit „rRNA“ gekennzeichnet.

pKPH60	<i>um03704</i>	pKPH152	<i>um06182</i>
pKPH61	<i>um10399</i>	pKPH153	<i>um11261</i>
pKPH62	n/a	pKPH154	<i>um10586</i>

pKPH63	um02508*	pKPH155	um11054	pKPH110	um00029	pKPH196	um10956
pKPH64	um00119	pKPH156	um10114	pKPH111	um01478	pKPH197	um01422
pKPH65	um01366	pKPH157	um05595	pKPH112	um10382	pKPH198	um01976*
pKPH66	um10714	pKPH158	um06504	pKPH113	um10149	pKPH199	um00844
pKPH67	rRNA	pKPH159	um00181	pKPH114	um05893*	pKPH200	n/a
pKPH68	um06357*	pKPH160	um01150	pKPH115	um03726.2	pKPH207	n/a
pKPH69	um01984*	pKPH161	um02361	pKPH116	um11135	pKPH208	um00157*
pKPH70	um04771*	pKPH162	um11916	pKPH117	um01466	pKPH209	um11914
pKPH71	um01103	pKPH163	n/a	pKPH118	um02360	pKPH210	um03310
pKPH72	um05428*	pKPH164	rRNA	pKPH119	um03002	pKPH211	um0413
pKPH73	um04278	pKPH165	um02353	pKPH120	um04217	pKPH212	um01984
pKPH74	um06085*	pKPH166	um05812	pKPH121	um03507*	pKPH213	um00967
pKPH75	um03284*	pKPH167	um11412	pKPH122	um11673	pKPH214	um11120
pKPH76	um02412*	pKPH168	um05785	pKPH125	um11270	pKPH215	um11170
pKPH77	um02242	pKPH169	n/a	pKPH126	n/a	pKPH216	um02064
pKPH78	um10753	pKPH170	um01984	pKPH127	um00862	pKPH217	rRNA
pKPH79	um01466*	pKPH171	um04967	pKPH128	um06051	pKPH218	um10438
pKPH80	um10659*	pKPH172	um01009	pKPH129	rRNA	pKPH219	um11505
pKPH81	um03704	pKPH173	um11400	pKPH130	um03074	pKPH220	um00598*
pKPH82	n/a	pKPH174	n/a	pKPH131	um01364	pKPH221	um11600*
pKPH83	um11744*	pKPH175	um11233	pKPH132	rRNA	pKPH222	um01984
pKPH84	um03237	pKPH176	um10985	pKPH133	n/a	pKPH223	um05584
pKPH85	um06182	pKPH177	um10488	pKPH134	n/a	pKPH224	um02444
pKPH86	um10147	pKPH178	um01873	pKPH135	um03192	pKPH225	um05584
pKPH87	um01948	pKPH179	n/a	pKPH136	um00068	pKPH226	um02774
pKPH88	um04277	pKPH180	um04926	pKPH137	um05883	pKPH227	um12135
pKPH89	um10859	pKPH181	um00315	pKPH138	rRNA	pKPH228	n/a
pKPH90	um11412	pKPH182	um11563	pKPH139	um10659	pKPH229	um11054
pKPH91	um01060	pKPH183	n/a	pKPH140	um00496	pKPH230	um04313
pKPH92	um02477	pKPH184	um00924	pKPH141	um03533	pKPH231	um04313
pKPH93	um04277	pKPH185	um03655	pKPH142	um10676	pKPH232	um02158*
pKPH94	um10149	pKPH186	um03340	pKPH143	um01984	pKPH233	n/a
pKPH95	rRNA	pKPH187	um10110	pKPH145	rRNA	pKPH234	um10177*
pKPH96	um06051	pKPH188	um06138	pKPH146	um03682.2	pKPH235	um05040
pKPH97	um11135	pKPH189	um01984	pKPH147	um00154	pKPH236	n/a
pKPH98	um10859	pKPH190	rRNA	pKPH148	rRNA	pKPH237	um10772
pKPH99	um04885	pKPH191	um01984*	pKPH149	um04138	pKPH238	um10177*
pKPH100	n/a	pKPH192	um03354	pKPH150	um00181	pKPH239	um11088*
pKPH107	n/a	pKPH193	um03924*	pKPH151	um11465	pKPH240	um05785
pKPH108	n/a	pKPH194	um04588				
pKPH109	um00496	pKPH195	um03445				

4.1.4 Oligonukleotide

Sämtliche Oligonukleotide wurden von der Firma Eurofins MWG Operon synthetisiert. Die Nukleotidsequenz ist jeweils vom 5'-Ende in Richtung 3'-Ende angegeben.

Folgende Oligonukleotide dienen zur Amplifikation der linken (lb) und der rechten (rb) Flanken zur Konstruktion und zur Amplifikation (lbn + rbn) von Deletionskonstrukten wie in Abschnitt 4.2.3 beschrieben.

Deletion von um00289:

00289lb_for

CTC TGT GCG AAC CTG CTT G

Verwendet zur Amplifikation der linken Flanke von um00289.

00289lb_rev

TGA GGC CAT CTA GGC CGC GCG GAG ATG CGA TTT AG

Verwendet zur Amplifikation der linken Flanke von um00289. Die SfiI-Schnittstelle ist kompatibel zur Resistenzkassette aus pBS-hhn.

00289rb_for

TGA GGC CTG AGT GGC CCA GTG CCT AGC ACT CGT TCC

Verwendet zur Amplifikation der rechten Flanke von um00289.

00289rb_rev

TTC GTC GGA CCT CCG ATA C

Verwendet zur Amplifikation der rechten Flanke von um00289.

00289orf_for

ATT GCG CTA TGC ACT GGG

Bindet im ORF von um00289.

00289orf_rev

GCT GGC TGA GAT GAA GAG TC

Bindet im ORF von um00289.

Deletion von um00466:

466lb_for

GAA GCG GCT CTA CTG GAA

Verwendet für die Amplifikation der linken Flanke von um00466.

466lb_rev

TGA GGC CTG AGT GGC CTG TTG AGG AAA GTT CGG TAG AC

Verwendet für die Amplifikation der linken Flanke von um00466.

466rb_for

GGC CGA ACC TAG AGT GAA G

Verwendet für die Amplifikation der rechten Flanke von um00466.

466rb_rev

GGT GGC CAT CTA GGC CGG AGT CAC CAC GAC TAC TAA

Verwendet für die Amplifikation der rechten Flanke von um00466. Die SfiI-Schnittstelle ist kompatibel zur Resistenzkassette aus pBS-hhn.

0466ORF-for

CTA GTT CCA TTC GTT GTA CTC GCC

Bindet im ORF von um00466.

0466ORF-rev

GGT AGA GAC CTG AGT TTC GAG C

Bindet im ORF von um00466.

Deletion von um00480:

480lb_for

ACT CCA TCC ACC CTC TAG C

Verwendet zur Amplifikation der linken Flanke von um00480.

480lb_rev

GGT GGC CGC GTT GGC CGC CAT GCC GCC AAA GAG ACA AG

Verwendet zur Amplifikation der linken Flanke von um00480. Die SfiI-Schnittstelle ist kompatibel zur GFP-Resistenzkassette aus pUMa317.

480rb_for

TGA GGC CTG AGT GGC CCG GAA CGC TTT CTT TGG ACA TC

Verwendet zur Amplifikation der rechten Flanke von um00480.

480rb_rev

TTG CTC GTC GCA TTT ACC TCT C

Verwendet zur Amplifikation der rechten Flanke von um00480.

ORF480_for

CTG TTT CGA CCC AAC TTC C

Bindet im ORF von um00480.

ORF480_rev

ACG AGG TGG TGC TGT TAG

Bindet im ORF von um00480.

Deletion von um01204:

01204lb_for

AGC GCT TCG TCT TGC TCT C

Verwendet zur Amplifikation der linken Flanke von um01204.

01204lb_rev

TGA GGC CTG AGT GGC CTG GGC CTA GAG ATG CGA TG
Verwendet zur Amplifikation der linken Flanke von *um01204*.

01204rb_for

TGA GGC CAT CTA GGC CAG TGA GTG CCT CCG ATG AC
Verwendet zur Amplifikation der rechten Flanke von *um01204*. Die SfiI-Schnittstelle ist kompatibel zur Resistenzkassette aus pBS-hhn.

01204rb_rev

TGC CCA CGT CGA ATC AAG
Verwendet zur Amplifikation der rechten Flanke von *um01204*.

01204orf_for

TCC TGG ACT GCG AAG TGT G
Bindet im ORF von *um01204*.

01204orf_rev

CCC TTG CGT CAG TCT CTT G
Bindet im ORF von *um01204*.

Deletion von *um01513*:

um01513lb_for

GAT CCG CCC TCG TCA CTC
Verwendet zur Amplifikation der linken Flanke von *um01513*.

um01513lb_rev

TGA GGC CAT CTA GGC CGG TGA GAG ATG CTA GGA GAT
CAG
Verwendet zur Amplifikation der linken Flanke von *um01513*. Die SfiI-Schnittstelle ist kompatibel zur Resistenzkassette aus pBS-hhn.

um01513rb_for

TGA GGC CTG AGT GGC CGG GCT TAG TCC TTC TTA GGT
CC
Verwendet zur Amplifikation der rechten Flanke von *um01513*.

um01513rb_rev

GAG GGT GCT TGC TTG TGA G
Verwendet zur Amplifikation der rechten Flanke von *um01513*.

um01513lbn

GCA GGT CGC GTC AAA AGG ATG
Bindet in der linken Flanke von *um01513*.

um01513rbn

CTC AAG CAC CTC GAG TAA GAA CG
Bindet in der rechten Flanke von *um01513*.

Deletion von *um02104*:

2104lb_for

GGA TGT CAT CTC GTA CGG ATC AAC
Verwendet zur Amplifikation der linken Flanke von *um02104*.

2104lb_rev

TTA GGC CGC GTT GGC CTA GGA GAG AGG CAT GGT GGA
G
Verwendet zur Amplifikation der linken Flanke von *um02104*. Die SfiI-Schnittstelle ist kompatibel zur GFP-Resistenzkassette aus pUMa317.

2104rb_for

TGA GGC CTG AGT GGC CCG TTC GCT CCA ACT TCC TAA
TC
Verwendet zur Amplifikation der rechten Flanke von *um02104*.

2104rb_rev

CTT GCC CTT GCT GAC ATC C
Verwendet zur Amplifikation der rechten Flanke von *um02104*.

2104lbn

GCG TGT GGT TCG AAA TCC C
Bindet in der linken Flanke von *um02104*.

2104rbn

TTC CAA GGC TGC TGG AGA C
Bindet in der rechten Flanke von *um02104*.

2104orf_for

GCA TGA CTC TTC CTC CTA CAG
Bindet im ORF von *um02104*.

2104orf_rev

TCG AGG TGG TGT GGA AAC
Bindet im ORF von *um02104*.

Deletion von *um02717*:

2171lb_for

CTC TGG CCG TTC TTC TTC
Verwendet für die Amplifikation der linken Flanke von *um02717* (Schreibfehler bei der Primerbestellung).

2171lb_rev

GGT GGC CGC GTT GGC CGC CAT TCG GGC AGA CAA TGG
Verwendet für die Amplifikation der linken Flanke von *um02717* (Schreibfehler bei der Primerbestellung). Die SfiI-Schnittstelle ist kompatibel zur GFP-Resistenzkassette aus pUMa317.

2171rb_for

TGA GGC CTG AGT GGC CAA AGG CAG CCC TCA GAT CAG
Verwendet für die Amplifikation der rechten Flanke von *um02717* (Schreibfehler bei der Primerbestellung).

2171rb_rev

GGT GCT CTC GCA GAT CAT GAA G
Verwendet für die Amplifikation der rechten Flanke von *um02717* (Schreibfehler bei der Primerbestellung).

2717lbn

ATC GTC CAA GCG CCA ATC AG
Bindet in der linken Flanke von *um02717*.

2717rbn

TGA CGT ACA GTT GCG GTC TC
Bindet in der rechten Flanke von *um02717*.

2717orf_for

GTA ATG CCG ATG GTA ATG CTG
Bindet im ORF von *um02717*.

2717orf_rev

TCT CAT AGC GTT CTG CGT AAG
Bindet im ORF von *um02717*.

Deletion von *um02865*:

02865lb_for

GGC TCA GCC TCA CAA TCA C
Verwendet zur Amplifikation der linken Flanke von *um02865*.

02865lb_rev

TGA GGC CAT CTA GGC CTG TCA CTA CTG CTG GTG AAC
Verwendet zur Amplifikation der linken Flanke von *um02865*. Die SfiI-Schnittstelle ist kompatibel zur Resistenzkassette aus pBS-hhn.

02865rb_for

TGA GGC CTG AGT GGC CTG CTG GTC CAC AGC TAG TC
Verwendet zur Amplifikation der rechten Flanke von *um02865*.

02865rb_rev

TCG TCC AAA GGC ATA CAG TG
Verwendet zur Amplifikation der rechten Flanke von *um02865*.

02865orf_for

ACT CTT GAC GGC ACT AAC GG
Bindet im ORF von *um02865*.

02865orf_rev

TGC CAG ATG GTC TTG CCT TG
Bindet im ORF von *um02865*.

Deletion von *um03065*:

3065lb_for

GGT TCG CTG TAC AAC GAA GTG
Verwendet für die Amplifikation der linken Flanke von *um03065*.

3065lb_rev

TGA GGC CTG AGT GGC CAT CCC TTC TCT TTC GCC TTC TC
Verwendet für die Amplifikation der linken Flanke von *um03065*.

3065rb_for

GGT GGC CGC GTT GGC CGC ACG CAT CGC GAA ATA GGA
Verwendet für die Amplifikation der rechten Flanke von *um03065*. Die SfiI-Schnittstelle ist kompatibel zur GFP-Resistenzkassette aus pUMa317.

3065rb_rev

GCG AGC TAG AGC GTT ACA T
Verwendet für die Amplifikation der rechten Flanke von *um03065*.

3065lbn

TCG GTG ATC TGC CAG GAG TG
Bindet in der linken Flanke von *um03065*.

3065rbn

AAC CTG TGA GTT GGG AAG AG
Bindet in der rechten Flanke von *um03065*.

3065orf_for

AAC CTG TGA GTT GGG AAG AG
Bindet im ORF von *um03065*.

3065orf_rev

TCA GCG TTG TCG TGA GTA TC
Bindet im ORF von *um03065*.

Deletion von *um03216*:

3216lb_for

CCA CCG TTA CAG TTG TGA C
Verwendet zur Amplifikation der linken Flanke von *um03216*.

3216lb_rev

GGT GGC CGC GTT GGC CGA CAT TAT GAT GAC GGT GAT GAC
Verwendet zur Amplifikation der linken Flanke von *um03216*. Die SfiI-Schnittstelle ist kompatibel zur GFP-Resistenzkassette aus pUMa317.

3216rb_for

TGA GGC CTG AGT GGC CTG CGC ATC CTG CAA TTC
Verwendet zur Amplifikation der rechten Flanke von *um03216*.

3216rb_rev

AGC GGA TGA GGT GAT TCG
Verwendet zur Amplifikation der rechten Flanke von *um03216*.

3216lbn

CTC GAG GCC AAC GAG AAT GC
Bindet in der linken Flanke von *um03216*.

3216rbn

GGT GTG AGG CTT CGA CTG AAC
Bindet in der rechten Flanke von *um03216*.

3216orf_for

GCA GCA GTT TCA TCC CTA CG
Bindet im ORF von *um03216*.

3216orf_rev

CTC CTC GGC GAA ATA GTG TG
Bindet im ORF von *um03216*.

Deletion von *um03664*:

03664lb_for

TTT GAC AGG CGT GAG TTG C
Verwendet zur Amplifikation der linken Flanke von *um03664*.

03664lb_rev

TGA GGC CTG AGT GGC CGG ACC CTG CTT GCT CAA TG
Verwendet zur Amplifikation der linken Flanke von *um03664*.

03664rb_for

TGA GGC CAT CTA GGC CAC AGG CAA GTC GAG AAC C
Verwendet zur Amplifikation der rechten Flanke von *um03664*. Die SfiI-Schnittstelle ist kompatibel zur Resistenzkassette aus pBS-hhn.

03664rb_rev

CTC GAC ACT GCG TAT CCT C
Verwendet zur Amplifikation der rechten Flanke von *um03664*.

03664orf_for

CGC CCA TCT TGT TCG TCT TC
Bindet im ORF von *um03664*.

03664orf_rev

CAC GGA TTA CGC CGA GAC AG
Bindet im ORF von *um03664*.

Deletion von *um04211*:

04211lb_for

TCG CCA CGC TAT CCA AAC G
Verwendet zur Amplifikation der linken Flanke von *um04211*.

04211lb_rev

TGA GGC CTG AGT GGC CCG AGC GCA TTA ATC CTT GCC
Verwendet zur Amplifikation der linken Flanke von *um04211*.

04211rb_for

TGA GGC CAT CTA GGC CAC CAG AGC AGC GAT GTA AGG
Verwendet zur Amplifikation der rechten Flanke von *um04211*. Die SfiI-Schnittstelle ist kompatibel zur Resistenzkassette aus pBS-hhn.

04211rb_rev

TGT TTG AGC GTG TGC GTA TG
Verwendet zur Amplifikation der rechten Flanke von *um04211*.

04211orf_for

GTT GCA CGA GGT CAG AAA TG
Bindet im ORF von *um04211*.

04211orf_rev

CCC TTC AAC AGC TTC TTG AG
Bindet im ORF von *um04211*.

Deletion von *um04248*:

4248lb_for

CTC GAC GAT CAC ATC TTC TAC C
Verwendet zur Amplifikation der linken Flanke von *um04248*.

4248lb_rev

TGA GGC CTG AGT GGC CCG TTG AAC TTC ATC CCG TTT CC
Verwendet zur Amplifikation der linken Flanke von *um04248*.

4248rb_for

GGT GGC CGC GTT GGC CGC GAG GGA GAG GAA CTT CAT C
Verwendet zur Amplifikation der rechten Flanke von *um04248*. Die SfiI-Schnittstelle ist kompatibel zur GFP-Resistenzkassette aus pUMa317.

4248rb_rev

CTT CAC GCT GCA CTA TTG
Verwendet zur Amplifikation der rechten Flanke von *um04248*.

ORF4248_for

ACC TCC TGA TCC TTG TTG TC
Bindet im ORF von *um04248*.

ORF4248_rev

GAA GTT CCT CTC CCT CCT TTC
Bindet im ORF von *um04248*.

Deletion von um04385:

04385lb_for

ATC CGT GCG GTT TGT GAT TG

Verwendet zur Amplifikation der linken Flanke von um04385.

04385lb_rev

TGA GGC CTG AGT GGC CAC ATG ACC CGC ATT CAG C

Verwendet zur Amplifikation der linken Flanke von um04385.

04385rb_for

TGA GGC CAT CTA GGC CAA GAG TCA CAC CGA CAT GG

Verwendet zur Amplifikation der rechten Flanke von um04385. Die SfiI-Schnittstelle ist kompatibel zur Resistenzkassette aus pBS-hhn.

04385rb_rev

GCG CTG CCT CTT TAT TCA C

Verwendet zur Amplifikation der rechten Flanke von um04385.

04385orf_for

GCT GGA CCA AGT GGA CAA AG

Bindet im ORF von um04385.

04385orf_rev

GCG AGG CGT GCA AAG TAT C

Bindet im ORF von um04385.

Deletion von um05104:

5104lb_for

GAA CAT CCA GCG CAT CTC

Verwendet für die Amplifikation der linken Flanke von um05104.

5104lb_rev

GGT GGC CTG AGT GGC CTC AAC GTC GTG GCC TGA TCG

Verwendet für die Amplifikation der linken Flanke von um05104.

5104rb_for

GGT GGC CGC GTT GGC CGC CAT CTC CGT TGC GAA AGG

Verwendet für die Amplifikation der rechten Flanke von um05104. Die SfiI-Schnittstelle ist kompatibel zur GFP-Resistenzkassette aus pUMa317.

5104rb_rev

TTT GCC GCC GTC TAC TCA C

Verwendet für die Amplifikation der rechten Flanke von um05104.

5104lbn

TTC GTT GCA GCC GAG CTT AC

Bindet in der linken Flanke von um05105.

5104rbn

CCA TCT TCC CAC TTT CGG ACA TTC

Bindet in der rechten Flanke von um005104.

5104orf_for

GTT GTT GTC GCC AAT GTT TC

Bindet im ORF von um05104.

5104orf_rev

GAA ACG GCA ATG GTA ATT CC

Bindet im ORF von um05104.

Deletion von um05704:

05704lb_for

CAT CCT CGG TGG AAG CTT TG

Verwendet zur Amplifikation der linken Flanke von um05704.

05704lb_rev

TGA GGC CTG AGT GGC CCT CTC GCT TCG TAG CAG TTC

Verwendet zur Amplifikation der linken Flanke von um05704.

05704rb_for

TGA GGC CAT CTA GGC CGG TCA AGG CGA GAA GAG GAG

Verwendet zur Amplifikation der rechten Flanke von um05704. Die SfiI-Schnittstelle ist kompatibel zur Resistenzkassette aus pBS-hhn.

05704rb_rev

TCA GCC GAG ACT AAG TCA GC

Verwendet zur Amplifikation der rechten Flanke von um05704.

05704orf_for

AGT TGG CCC AGC AAA GAC C

Bindet im ORF von um05704.

05704orf_rev

TCG CCG ACA CAT CCA CAA G

Bindet im ORF von um05704.

Deletion von um06085:

06085lb_for

AAG CGC AGT TTC CGT GAT TC

Verwendet zur Amplifikation der linken Flanke von um06085.

06085lb_rev

TGA GGC CAT CTA GGC CGA GGT TGA TGC GGA AGG AAG

Verwendet zur Amplifikation der linken Flanke von um06085. Die SfiI-Schnittstelle ist kompatibel zur Resistenzkassette aus pBS-hhn.

06085rb_for

TGA GGC CTG AGT GGC CTG CAC ATC CGC CTA CAA C
Verwendet zur Amplifikation der rechten Flanke von *um06085*.

06085rb_rev

GCA TTT GTG CGC GAT CTG
Verwendet zur Amplifikation der rechten Flanke von *um06085*.

06085orf_for

ACC AAC CTC ACC GAC AAC
Bindet im ORF von *um06085*.

06085orf_rev

GCG TGT CAG CGA ATT CAA C
Bindet im ORF von *um06085*.

Deletion von *um06120*:

06120lb_for

GAC GTG CTA CGT CGA CAA G
Verwendet zur Amplifikation der linken Flanke von *um06120*.

06120lb_rev

TGA GGC CTG AGT GGC CTG TGC ACG GCA TAT GGT TC
Verwendet zur Amplifikation der linken Flanke von *um06120*.

06120rb_for

TGA GGC CAT CTA GGC CAG ACG GAC GGT ACG TCT TC
Verwendet zur Amplifikation der rechten Flanke von *um06120*. Die SfiI-Schnittstelle ist kompatibel zur Resistenzkassette aus pBS-hhn.

06120rb_rev

AGG ACT GTC AAC GGA AAT CG
Verwendet zur Amplifikation der rechten Flanke von *um06120*.

06120orf_for

ACG CGA GCA TCT TGA TCG AG
Bindet im ORF von *um06120*.

06120orf_rev

TGG TCG AGT TTG CCT TTC C
Bindet im ORF von *um06120*.

Deletion von *um10417*:

10417lb_for

TGC GGA TTG GTG AGG AGG AG
Verwendet zur Amplifikation der linken Flanke von *um10417*.

10417lb_rev

AAT GGC CTG AGT GGC CAA GCG ACA GCG CAA GTG AG
Verwendet zur Amplifikation der linken Flanke von *um10417*.

10417rb_for

AAT GGC CGC GTT GGC CAT CAT CGA GGA GGA CGA GAG
GTA G
Verwendet zur Amplifikation der rechten Flanke von *um10417*. Die SfiI-Schnittstelle ist kompatibel zur GFP-Resistenzkassette aus pUMa317.

10417rb_rev

GAT ACC GCT CGG TGC GAT TC
Verwendet zur Amplifikation der rechten Flanke von *um10417*.

10417lbn

GAA TCT CGC CAA GCC AGT C
Bindet in der linken Flanke von *um10417*.

10417rbn

CCT CCA TCT ACG CAC CTT C
Bindet in der rechten Flanke von *um10417*.

10417orf_for

GAT GTG AAG TTG CGA CAA GG
Bindet im ORF von *um10417*.

10417orf_rev

CAA GCC GTT GCC ATT CTA TC
Bindet im ORF von *um10417*.

Deletion von *um11430*:

11430lb_for

AGA AGC ATG GAC GGA AGA G
Verwendet zur Amplifikation der linken Flanke von *um11430*.

11430lb_rev

TGA GGC CTG AGT GGC CCA TGG GCA AGG CCT GAA AG
Verwendet zur Amplifikation der linken Flanke von *um11430*.

11430rb_for

TGA GGC CAT CTA GGC CTG CGA TTG TCG ATC GTT GG
Verwendet zur Amplifikation der rechten Flanke von *um11430*. Die SfiI-Schnittstelle ist kompatibel zur Resistenzkassette aus pBS-hhn.

11430rb_rev

CGA TCA AGC ATC GAC GTT AC
Verwendet zur Amplifikation der rechten Flanke von *um11430*.

11430orf_for

AGT GAG ACA GCC CAG TTT AG
Bindet im ORF von *um11430*.

11430orf_rev

TCG CCT CCA TTG CTC TTT AC
Bindet im ORF von *um11430*.

Pbshhn_Sfi-LB1

CGA GGC CTA GAT GGC CGA ACG TG
Bindet in der *hyg* Kasette von pBS-hhn, ermöglicht die Amplifikation der Hyg-Kasette mit einer zu pUMa317 kompatiblen SfiI-Schnittstelle.

Pbshhn_Sfi-LB2

CGA GGC CAA CGC GGC CGA ACG TGG TAA CTA CCA GCG
Bindet in der *hyg* Kasette von pBS-hhn, ermöglicht die Amplifikation der Hyg-Kasette mit einer zu pUMa317 kompatiblen SfiI-Schnittstelle.

Folgende Oligonukleotide wurden für der Erstellung und Modifikation der cDNA Bank sowie für die Klonierung der Ausgangs- und Zielvektoren verwendet.

pGW101GFP_NsiI_f

CAG GAA TTC ATG CAT CGG CCT TAA AGC TCA TCA TGT
Bindet im *gfp* von pGE101, erzeugt eine NsiI Schnittstelle sowie eine SMART Klonierungsstelle der Sequenz 5'-TTGATACCACTGCTT-3'; verwendet zur Amplifikation von *gfp* für die Klonierung in pKPH29.

pGW101GFP_NsiI_r

CAG GAA TTC ATG CAT AAT TCG GCC ATT AAG GCC C
Bindet im *gfp* von pGE101, erzeugt eine NsiI Schnittstelle sowie eine SMART Klonierungsstelle der Sequenz 5'-TTGATACCACTGCTT-3'; verwendet zur Amplifikation von *gfp* für die Klonierung in pKPH29.

5' SMART attB1

GGG GAC AAG TTT GTA CAA AAA AGC AGG CTA AGC AGT
GGT ATC AAC GC
Bindet in der SMART-Klonierungsstelle, verwendet zur GATEWAY®-Modifizierung der SMARTer ds cDNA.

3'SMART attB2

GGG GAC CAC TTT GTA CAA GAA AGC TGG GTC GCA GAG
TAC TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT NV
Oligo d(T)-Primer, bindet in der 3'-gelegenen SMART-Klonierungsstelle, verwendet zur GATEWAY®-Modifizierung der SMARTer ds cDNA.

Folgende Oligonukleotide wurden für die Deletion und die Klonierung von Komplementationskonstrukten verwendet (Vranes, pers. Mitteilung):

um04342_lb1

AGT CGT CGA GTG ACG AG
Verwendet zur Amplifikation der linken Flanke von *um04342*.

um04342_lb2

GTT GGC CAT CTA GGC CGA CGA GTG AAA CAG TGC TGG
Verwendet zur Amplifikation der linken Flanke von *um04342*. Die SfiI-Schnittstelle ist kompatibel zur Resistenzkasette aus pBS-hhn.

um04342_rb1

TCG GAA GGA AGA GAA ACG TC
Verwendet zur Amplifikation der rechten Flanke von *um04342*.

04342_rb1_hindII

GTT AAG CTT TCG GAA GGA AGA GAA ACG TC
Ähnlich zu 04342_rb1, erzeugt eine HindIII Klonierungsstelle.

um04342_rb2

GTT GGC CTG AGT GGC CGA CCA CCT CTC TCT GCG
Verwendet zur Amplifikation der rechten Flanke von *um04342*.

um04342_lbn

TGA AGG GCC ACC TCA TCT G
Bindet in der linken Flanke von *um04342*.

um04342_rbn

ACA AGC AAA GGT CTC ACC C
Bindet in der rechten Flanke von *um04342*.

um04342_orf1

AAG CCG GAT GAA AGT CAG
Bindet im ORF von *um04342*.

um04342_orf2

ATT CGG AGG CGT TGA AAG
Bindet im ORF von *um04342*.

um04342_comp

GGG GAC AAG TTT GTA CAA AAA AGC AGG CTT CAC CGT
CGA GGA ACG AGT AG
Bindet außerhalb des 5' Bereichs des *um04342* Lokus, verwendet zur Amplifikation des Komplementationskonstrukts.

attb1_um04342

GGG GAC AAG TTT GTA CAA AAA AGC AGG CTT CAC CAT
GCG AGT CGG GGC ATT G
Bindet im ORF von *um04342*. Verwendet zur Amplifikation des *um04342* ORFs, führt eine 5'-attB1 Klonierungsstelle an das resultierende PCR-Produkt ein.

um04342_attb1-sp

GGG GAC AAG TTT GTA CAA AAA AGC AGG CTT CAC CAT
GGC CTC GGC CAA AG
Bindet im *um04342* ORF, verwendet zur Amplifikation von *um04342* ohne die 5'-Signalsequenz. Erzeugt eine attB1 Klonierungsstelle am 5'-Ende des PCR-Produkts.

um04342_attb2

GGG GAC CAC TTT GTA CAA GAA AGC TGG GTC TTA ACC
GAT ACC GTT AAA TG

Bindet im *um04342* ORF, verwendet zur Amplifikation von *um04342*. Erzeugt eine attB2 Klonierungsstelle am 3'-Ende des PCR-Produkts.

um04342_attb2-st

GGG GAC CAC TTT GTA CAA GAA AGC TGG GTC ACC GAT
ACC GTT AAA TGT C

Bindet im *um04342* ORF, verwendet zur Amplifikation von *um04342* ohne Stopp-Codon. Erzeugt eine attB2 Klonierungsstelle am 3'-Ende des PCR-Produkts.

Folgende Oligonukleotide wurden für die GFP-Fusionskonstrukte verwendet:

04342lb1-gfp

GTT GGG CCC AGC GTA CTC CAG GAT TCG

Bindet im *um04342* ORF, verwendet zur Amplifikation des 1 kb umfassenden 5'-Bereichs von *um04342*.

04342_3xgfp_kink

GAT GGC CGC GTT GGC CGC AAC AAC AAC AAC GCC CGA
GAT ACC GGG ACC GAT ACC GTT AAA TGT CAT G

Bindet im *um04342* ORF, verwendet zur Amplifikation von *um04342* ohne Stopp-Codon. Erzeugt eine Linkersequenz sowie eine zu der GFP-Hygromycin-Kassette von pUMa317 kompatiblen SfiI-Schnittstelle am 3'-Ende des PCR-Produkts.

um04342_lb2_Pgfp

GTT GGC CGC GTT GGC CGA CGA GTG AAA CAG TGC TGG

Bindet im ORF von *um04342*, verwendet zur Amplifikation eines 1112 bp Fragments des *um04342*-ORFs, welches als linke Flanke für die in lokus-*um04342::gfp*-Fusion diente, führt eine mit der 3xGFP-Kassette aus pUMa647 komplementäre SfiI-Schnittstelle der Sequenz 5'-GGCCGCGTTGGCC-3' ein.

fuPCRgfp04342_1

GGT GAA CAG CTC CTC GCC CTT GCT CAC CAT GCC GGC
AGG CGC AGC TTG GGC CGT G

Bindet im ORF von *um04342*. Verwendet zur Amplifikation der linken Flanke von *um04342* inklusive Startcodon und 5' Signalsequenz für eine Fusions-PCR mittels Sequenzkomplementarität zu fuPCRgfp04342_2.

fuPCRgfp04342_2

ATG GTG AGC AAG GGC GAG GAG

Bindet im ORF von *gfp*. Verwendet zur Amplifikation von *gfp* aus p123 für eine Fusions-PCR.

fuPCRgfp04342_3

CTT GTA CAG CTC GTC CAT GCC

Bindet im ORF von *gfp*. Verwendet zur Amplifikation von *gfp* aus p123 für eine Fusions-PCR.

fuPCRgfp04342_4

CAC TCT CGG CAT GGA CGA GCT GTA CAA GGC CGG CGC
CTC GGC CAA AGA TGA ATT G

Bindet im ORF von *um04342*. Verwendet zur Amplifikation von *um04342* ohne 5' Signalsequenz für eine Fusions-PCR mittels Sequenzkomplementarität zu fuPCRgfp04342_3.

Folgende Oligonukleotide wurden für sequenzgerichtete Mutation von *um04342* verwendet:

um04342-dNLS1_3

CCA GCG GCC CAT GCG GCC TCA GAA GGC GTC GTT GAC

Bindet im ORF von *um04342*. Verwendet zur gerichteten Mutagenese von pKPH50.

um04342-dNLS1_5

GGC CGC ATG GGC CGC TGG TTG GCG CGC TTC

Bindet im ORF von *um04342*. Verwendet zur gerichteten Mutagenese von pKPH50.

um04342-dNLS2_3

CCC GTC CTC GCG GCC GCC GCT GCT GAT AGT CTG GAG

Bindet im ORF von *um04342*. Verwendet zur gerichteten Mutagenese von pKPH50.

um04342-dNLS2_5

AGC GGC GGC CGC GAG GAC GGG AAC ACC GC

Bindet im ORF von *um04342*. Verwendet zur gerichteten Mutagenese von pKPH50.

um04342-dNLS3_3

CCT GTC CTC GCG GCC GCA TCC ATG TTG CGA AAG CGA
G

Bindet im ORF von *um04342*. Verwendet zur gerichteten Mutagenese von pKPH50.

um04342-dNLS3_5

GGA TGC GGC CGC GAG GAC AGG ATC TGC CGC

Bindet im ORF von *um04342*. Verwendet zur gerichteten Mutagenese von pKPH50.

um04342tad1_c

GCC ATC CCA TCG TGT GGT CGT ATC GGT ACC CGT AGG
CGG TGT AGG TGG C

Bindet im ORF von *um04342*. Verwendet zur gerichteten Mutagenese von pKPH50 über das QuikChange-PCR-Mutagenese Protokoll.

um04342tad1_w

GCC ACC TAC ACC GCC TAC GGG TAC CGA TAC GAC CAC
ACG ATG GGA TGG C

Bindet im ORF von *um04342*. Verwendet zur gerichteten Mutagenese von pKPH50 über das QuikChange-PCR-Mutagenese Protokoll.

um04342tad2_c

CCC TCT GAG CTT CGG TGT AGG ACG TGT AGT ACT CGC
CGC CCG G

Bindet im ORF von *um04342*. Verwendet zur gerichteten Mutagenese von pKPH50 über das QuikChange-PCR-Mutagenese Protokoll.

um04342tad2_w

CCG GGC GGC GAG TAC TAC ACG TCC TAC ACC GAA GCT
CAG AGG G

Bindet im ORF von *um04342*. Verwendet zur gerichteten Mutagenese von pKPH50 über das QuikChange-PCR-Mutagenese Protokoll.

Folgende Oligonukleotide wurden diverse Kunstrunkte und Klonierungen mit dem Gen *um04342* verwendet:

um04342_lb1_bamhi

AAT GGA TCC AGT CGT CGA GTG ACG AG

Bindet im Promotorbereich von *um04342*, ähnlich zu *um04342_lb1*, fügt eine BamHI Schnittstelle ein.

um04342_lb2_naen

GCG CGG CCG CGA CGC CGG CGA CGA GTG AAA CAG TGC
TGG

Bindet im Promotorbereich von *um04342*, verwendet für die Klonierung von pKPH59, diente der Amplifikation eines 984 bp großen Fragments der linken Flanke von *um04342*, fügt eine NaeI-Schnittstelle und eine NotI-Schnittstelle ein.

um04342_rb1_bamh

TTG GGA TCC TCG GAA GGA AGA GAA ACG TC

Bindet im 3'-Bereich von *um04342*, ähnlich zu *um04342_lb1*, fügt eine BamHI Schnittstelle ein.

um04342_rb2_kpni

ATC GGT ACC GAC CAC CTC TCT CTG CG

Bindet im 3'-Bereich von *um04342*, verwendet für die Klonierung von pKPH59, diente der Amplifikation eines 955 bp großen Fragments der rechten Flanke von *um04342*, fügt eine KpnI-Schnittstelle ein.

um04342_lb1_SfiI

GAG GGC CTC CCT GGC CAG TCG TCG AGT GAC GAG

Bindet im Promotorbereich von *um04342*, v verwendet für die Klonierung von pKPH59, diente der Amplifikation eines 984 bp großen Fragments der linken Flanke von *um04342*, fügt eine SfiI-Schnittstelle mit der Sequenz 5'-GGCCTCCCTGGCC-3' ein.

um04342_rb1_SfiI

GAG GGC CAG GGA GGC CTC GGA AGG AAG AGA AAC GTC

Bindet im 3'-Bereich von *um04342*, verwendet für die Klonierung von pKPH59, diente der Amplifikation eines 955 bp großen Fragments der rechten Flanke von *um04342*, fügt eine SfiI-Schnittstelle mit der Sequenz 5'-GGCCTCCCTGGCC-3' ein.

Folgende Oligonukleotide wurden für die quantitative PCR Analyse verwendet:

RT04342_f

TGG CAC TTG GAT GGG TAG G

Bindet im *um04342*-ORF. Verwendet zur quantitativen PCR-Analyse.

RT04342_r

GGT GTA ACA GCA GGC ATG TC

Bindet im *um04342*-ORF. Verwendet zur quantitativen PCR-Analyse.

RT_eIF2b_f (Heimel et al. 2010)

ATC CCG AAC AGC CCA AAC

Bindet im eukaryotischen Translationsinitiationsfaktor 2b (eIF2b *um04869*), verwendet zur Normalisierung der quantitativen PCR-Reaktionen.

RT_eIF2b_r (Heimel et al. 2010)

ATC GTC AAC CGC AAC CAC

Bindet im eukaryotischen Translationsinitiationsfaktor 2b (eIF2b *um04869*), verwendet zur Normalisierung der quantitativen PCR-Reaktionen.

Folgende Oligonukleotide wurden für Amplifikation von mRNA Enden verwendet:

um04342RACE3'

GGG AAG GAA GCA GCC AAG GGA GGT ATG

Bindet im *um04342*-ORF. Verwendet zur Amplifikation des 3'-Bereichs.

um04342RACE3'n

GTG GTG GTG CTG CTG CTA CCA TGA C

Bindet im *um04342*-ORF. Verwendet zur Amplifikation des 3'-Bereichs.

um04342RACE5'n

AAA AGA GAA GCA ATG CCC CGA CTC GC

Bindet im *um04342*-ORF. Verwendet zur Amplifikation des 5'-Bereichs.

um04342RACE5'

GGC CGT GAA GGC TAA GCA TGC CAA G

Bindet im *um04342*-ORF. Verwendet zur Amplifikation des 5'-Bereichs.

um04342RACEctrlf

ATA GCT CGA ACG GCG AGC ACG GTC

Bindet im *um04342*-ORF. Verwendet zur Kontrolle der RACE-Amplifikation.

um04342RACEctrlr

GCT TGT CCG TGG GCA AGG ACA TCA G

Bindet im *um04342*-ORF. Verwendet zur Kontrolle der RACE-Amplifikation.

um04342qPCR_fw

TGG CAC TTG GAT GGG TAG G

Bindet im ORF von *um04342*. Verwendet für quantitative PCR Analysen.**um04342qPCR_rev**

GGT GTA ACA GCA GGC ATG TC

Bindet im ORF von *um04342*. Verwendet für quantitative PCR Analysen.

Folgende Oligonukleotide wurden zur Sequenzierung von DNA Fragmenten verwendet

p416GalL_seq_for

CCT CTA TAC TTT AAC GTC AAG G

Bindet im GalL Promotor, ermöglicht die Sequenzierung des 5'-Bereichs von in pKPH48 inserierten DNA Fragmenten.

p416GalL_seq_rev

GTG AAT GTA AGC GTG ACA TAA C

Bindet im GalL Promotor, ermöglicht die Sequenzierung des 3'-Bereichs von in pKPH48 inserierten DNA Fragmenten.

um04342seq0

CCT GTG TGG CAC CTA GAT TTT G

Bindet im ORF von *um04342*.**um04342seq1**

GGC ATC AAT TCG ATC TCG

Bindet im ORF von *um04342*.**um04342seq2**

ATA AAG TTC CCT GTC GAC G

Bindet im ORF von *um04342*.**um04342seq3**

AAC ATG GCT GTA CCT CCG

Bindet im ORF von *um04342*.**um04342seq4**

CGG CAA CAC TGC TCA TAC

Bindet im ORF von *um04342*.**uni24** (Brachmann 2001)

ACG ACG TTG TAA AAC GAC GGC CAG

Bindet im Polylinker pUC19- und pCR-TOPO-basierter Vektoren, vergleichbar mit M13 forward.

rev24 (Brachmann 2001)

TTC ACA CAG GAA ACA GCT ATG ACC

Bindet im Polylinker pUC19- und pCR-TOPO-basierter Vektoren, vergleichbar mit M13 reverse.

4.2 Mikrobiologische, zellbiologische und genetische Methoden

4.2.1 *Escherichia coli*

Kultivierung von *E. coli*

E. coli-Stämme wurden entweder als Schüttelkulturen bei 180 Upm oder auf Festmedien unter aeroben Bedingungen bei 37 °C kultiviert. Übernachtskulturen wurden entweder aus bei -80 °C gelagerten Glycerinkulturen oder von bewachsenen YT/Antibiotikum-Platten, die weniger als einen Monat bei 4 °C gelagert waren, angeimpft.

Bestimmung der Zelldichte

Die Zelldichte von Flüssigkulturen wurde fotometrisch in einem Pharmacia LKB Ultraspec III Fotometer bei 600 nm bestimmt. Um eine lineare Abhängigkeit sicherzustellen, wurden für die Messung der OD₆₀₀ die Kulturen durch entsprechende Verdünnung auf einen Wert unterhalb von 0,5 verdünnt. Als Nullwert wurde die

OD₆₀₀ des jeweiligen Kulturmediums verwendet, eine OD₆₀₀ = 1,0 entspricht etwa 10⁹ Zellen/ml.

Transformation von CaCl₂-behandelten *E. coli*

(Modifiziert nach Cohen *et al.* 1972)

Zur Herstellung chemisch-kompetenter Bakterienzellen wurden 200 mL dYT-Medium 1:200 mit einer frischen Top10TM- oder DB3.1TM-Übernachtskultur angeimpft und bis zu einer OD₆₀₀ = 0,5 – 0,8 bei 37 °C und 180 Upm inkubiert. Die Zellen wurden durch Zentrifugation für 15 min bei 3.000 Upm und 4 °C (Heraeus Varifuge 3.0R) pelletiert und in 100 mL eiskalter 50 mM CaCl₂-Lösung resuspendiert. Nach 30 min Inkubation auf Eis wurden die Zellen erneut abzentrifugiert (15 min, 3.000 Upm, 4 °C, Heraeus Varifuge 3.0R), der Überstand abgenommen und die Zellen in 10 mL eiskalter 50 mM CaCl₂-Lösung, die 15% (v/v) Glycerin enthält, resuspendiert. Die Zellsuspension wurde zu je 200 µL

aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

Zur Transformation wurden die Zellen auf Eis aufgetaut, jeweils 50 µL wurden mit 10 µL Plasmidlösung (1-5 ng Plasmid) versetzt und 15 min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock von 1 min bei 42 °C wurde der Transformationsansatz 1 min auf Eis inkubiert und anschließend zur phänotypischen Expression der durch das transformierte Plasmid vermittelten Antibiotikaresistenz mit 500 µL dYT-Medium versetzt und 30 min bei 1400 Upm und 37 °C in einem Eppendorf-Wärmeblock inkubiert. 200 µL des Transformationsansatzes wurde auf YT-Antibiotikum-Platten ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Auf diese Weise konnte eine Transformationsrate von 10^7 Transformanden pro 1 µg eingesetzter Plasmid-DNA erreicht werden.

Elektroporations-Transformation von *E. coli* (Modifiziert nach Taketo 1988)

Zur Vorbereitung von elektrokompenten Bakterienzellen wurden 250 mL dYT-Medium mit $OD_{600} = 0,01$ einer frischen DH5 α -ETM-Übernachtskultur angeimpft und bis zu einer $OD_{600} = 0,6$ bei 37 °C und 180 Upm inkubiert. Die Zellen wurden dann für 15-30 min auf 4 °C herunter gekühlt und anschließend abzentrifugiert (300 Upm, 15 min, 4 °C, Sorvall RC6+).

Das Pellet wurde in 250 mL kaltem Wasser resuspendiert, abzentrifugiert, erneut in kaltem Wasser (125 ml) resuspendiert und wieder pelletiert. Anschließend wurden die Zellen in 10 mL kaltem 10%igem Glycerin resuspendiert, abzentrifugiert und schließlich in 360 µL kaltem 10%igem Glycerin aufgenommen. Die Zellen wurden in 20 µL Aliquots aufgeteilt und entweder direkt für die Elektroporation verwendet oder in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C aufbewahrt.

Für die Transformation wurden die elektrokompenten Zellen falls nötig auf Eis aufgetaut. Zu 20 µL Zellsuspension wurden maximal 2 µL DNA hinzugefügt und 1 min auf Eis inkubiert. Der Transformationsansatz wurde daraufhin in eine vorgekühlte 0,2 cm breite Elektroporationsküvette (PepLab) überführt und die Küvette in die vorgesehene Halterung des Elektroporators gestellt (Gene Pulser II, BioRad). Direkt danach wurde der Puls ausgelöst (25 mF, 2,0 kV, 200 Ω), die Entladungszeit sollte etwa 5 msec betragen. Im Anschluss an die Entladung wurde sofort 1 mL SOC-Medium in den Transformationsansatz pipettiert. Die Zellen wurden zur Regenerierung eine Stunde bei 37 °C und 180 Upm inkubiert und anschließend auf YT-Antibiotikum-Platten ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Auf diese Weise konnte eine Transformationsrate von bis zu 10^{10} Transformanden pro 1 µg eingesetzter Plasmid-DNA erreicht werden.

4.2.2 *Saccharomyces cerevisiae*

Kultivierung von *S. cerevisiae*

S. cerevisiae-Stämme wurden standardmäßig als Schüttelkulturen bei 180 Upm oder auf Festmedien unter aeroben Bedingungen bei 28°C oder 30°C kultiviert. Übernachtskulturen wurden von frisch ausgestrichenen YEPD-Platten bzw. SD(-ura)-Selektionsplatten oder von YEPD-Platten bzw. SD(-ura)-Selektionsplatten angeimpft, die weniger als eine Woche bei 4 °C gelagert waren.

Transformation von *S. cerevisiae* (Modifiziert nach Ito *et al.* 1983)

Für die Transformation von *S. cerevisiae* Zellen wurden 50 mL vorgewärmtes YEPD-Medium mit $OD_{600} = 0,1$ einer frischen Übernachtskultur des Stammes YHUM0924 angeimpft und bis zu einer OD_{600} von 0,6 bei 30 °C und 180 Upm inkubiert. Die Hefezellen wurden durch Zentrifugation (Heraeus Biofuge stratos für 3 min bei 2000 Upm und Raumtemperatur) geerntet und in 15 mL sterilem H₂O resuspendiert, abzentrifugiert und in 10 mL SORB-Lösung gewaschen, erneut abzentrifugiert und in 360 µL SORB aufgenommen. Es wurden 40 µL Lachssperma-DNA (Invitrogen) zugegeben, welche

zuvor für 10 min bei 100°C in einem Eppendorf-Wärmeblock denaturiert und anschließend sofort auf Eis gekühlt wurde. An diesem Schritt können die Zellen in 50 µL Aliquots bei -80°C eingefroren werden.

Für die Transformation wurden 50 µL der kompetenten Zellen falls nötig auf Eis aufgetaut, mit 1 µL Plasmid-DNA versetzt und gemischt. Anschließend wurde das 6-fache Volumen steriler Lit-PEG-Lösung zugefügt, gemischt und der Ansatz für 30 min bei 30 °C inkubiert. Nach einem Hitzeschock für 15 min bei 42 °C wurden die Zellen 3 min bei 2.000 Upm in einer Heraeus Biofuge pico abzentrifugiert, einmal mit YEPD-Medium gewaschen und in 100 µL TE-Puffer resuspendiert. Dieser Ansatz wurde auf einer SD(-ura)-Selektionsplatte ausplattiert.

Für die Transformation der Genbank wurde nach demselben Protokoll verfahren, ausgehend jedoch von einem Volumen von 250 mL Ausgangskultur mit einer $OD_{600} = 0,6$ und eine entsprechende Hochskalierung von H₂O und SORB-Lösung in den Wasch- und Resuspensionsschritten; alle Zentrifugationsschritte fanden in einer Sorvall RC6+ Zentrifuge statt. Die erhaltenen 2 mL Zellsuspension wurden mit 2 µg Genbank-DNA gemischt und weiterhin wie zuvor beschrieben verfahren. Nach Resuspension in TE-Puffer

wurden 0,1 µl, 1 µL und 10 µL des Ansatzes entnommen, auf 100 µL mit TE-Puffer aufgefüllt und jeweils auf SD(-ura)-Selektionsplatten ausplattiert. Dies diente zur Bestimmung der Transformationseffizienz, der Rest des Ansatzes wurde bis zu deren Bestimmung bei 4 °C aufbewahrt. Nach Ermittlung der Transformationseffizienz wurde die Genbank auf großen SD(-ura)-Selektionsplatten mit einer Zellzahl von 1000 Zellen/Platte ausplattiert, üN bei 28 °C inkubiert und am nächsten Tag mit TE-Puffer abgeschwämmt und vereint. Für Glycerinkulturen wurden 1,6 mL dieser Suspension mit 0,4 mL 50 % Glycerin versetzt, mit flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

SORB:

100 mM LiAc
10 mM Tris-Cl, pH 8,0
1 mM Na₂-EDTA, pH 8,0
1 M Sorbitol
in H₂O bid.

Lit/PEG:

50 g PEG-3500
10 mL Lithium-Acetat-Lösung (100 mM)
in 100 mL H₂O bid., sterilfiltriert

Adhäsionstest von *S. cerevisiae* Zellen an Polystyrol

Für den Polystyrol-Adhäsionstest wurden *S. cerevisiae* Zellen in 50 mL vorgewärmtes YEPD-Glukose Medium mit einer OD₆₀₀ von 0,1 von einer frischen Übernachtskultur angeimpft und vier Stunden bei 30 °C und 180 Upm inkubiert. Anschließend wurde 1 mL der Kultur abzentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 1 mL PBS Puffer resuspendiert. Anschließend wurde die Suspension auf eine PS-Petrischale appliziert und drei Stunden bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Petrischale mit 20 mL H₂O bid. gefüllt und 15 min bei 60 Upm auf einem „Bellydancer“ (New Brunswick Bio Dancer) gewaschen. Die Petrischale wurde vollständig entleert und mit 1% Kristallviolett-Lösung (100 mg/L Kristallviolett und 40 mg/L Hexanol) überschichtet. Nach fünf minütiger Inkubation bei RT wurde die Kristallviolett-Lösung vollständig entfernt, Reste sehr vorsichtig mit 20 mL H₂O bid. abgespült und die Petrischale bei RT getrocknet. Fotografische Aufnahmen wurden mit einer 5-Megapixel iSight Kamera (Apple) durchgeführt.

Adhäsionstest von *S. cerevisiae* Zellen an Agar-Oberflächen

S. cerevisiae Stämme wurden auf PD-Agar ausgestrichen und drei Tage bei 28 °C inkubiert. Das Abwaschen erfolgte 30 Sekunden lang unter fließendem Wasser an einem Wasserhahn. Fotografische Aufnahmen wurden mit einer 5-Megapixel iSight Kamera (Apple) durchgeführt.

Flusskammer-Adhäsionstest von *S. cerevisiae* Zellen

(Modifiziert nach Li und Palecek 2003)

Für den Flusskammer-Adhäsionstest wurden *S. cerevisiae* Zellen in 50 mL vorgewärmtes SD oder YEPD-Glukose bzw. SD oder YEPD-Galaktose mit einer OD₆₀₀ von 0,1 von einer frischen Übernachtskultur angeimpft und mindestens sechs Stunden bei 30 °C und 180 Upm inkubiert. Die OD₆₀₀ der verwendeten Hefezellen wurde regelmäßig kontrolliert, ab einer OD₆₀₀ von 0,5 wurde eine 1:2 Verdünnung in vorgewärmtem SD oder YEPD-Glukose bzw. SD oder YEPD-Galaktose vorgenommen. Zur Applikation in die Flusskammer wurde die OD₆₀₀ bestimmt, 2-10 mL der Kultur entnommen und 5 Minuten bei 3500 Upm und Raumtemperatur abzentrifugiert (Heraeus Biofuge pico). Die Zellen wurden im selben Volumen an PBS-Puffer gewaschen, erneut abzentrifugiert, und das Pellet in PBS-Puffer resuspendiert, hierbei wurde eine OD₆₀₀ von 0,4 eingestellt.

Es folgte eine kurze Sonifizierung zur Auflösung von Zellklumpen (Sonopuls GM3080 mit Sonotrode MA73, Amplitude 40%, dreimal Puls á 10 sec).

Die Hefezellen wurden nun in eine 1 mL Spritze aufgenommen und mittels dieser in das Flusskammersystem überführt. Nach einer einstündigen Inkubation wurde eine mikroskopische Aufnahme eines repräsentativen Bildausschnittes mittels eines inversen Mikroskops (Zeiss Axiovert 135), einer CCD Kamera (Zeiss AxioCam MRm) und der Software AxioVision 4.7 (Zeiss) aufgenommen. Anschließend wurde mittels der Peristaltikpumpe (Pharmacia LKB Pump P-1) eine laminare Strömung gewünschter Stärke für 5 oder 15 Minuten erzeugt. Es folgte eine weitere mikroskopische Aufnahme desselben Bildausschnittes.

Bestimmung der absoluten Adhäsion:

Für die Bestimmung der absoluten Adhäsion wurde die Zellzahl auf beiden mikroskopischen Aufnahmen bestimmt. Die absolute Zahl adhärenter Zellen errechnete sich aus dem Verhältnis Zellzahl nach dem Waschen zu Zellzahl vor dem Waschen und wurde i.d.R. in Prozent angegeben.

Bestimmung der relativen Adhäsion:

Da auch beim Wt-YHUM0909-Stamm nicht alle Zellen anhaften und die Adhäsion experimentabhängig leicht schwanken kann, wurde die relative Adhäsion im Verhältnis zum Wt bestimmt.

In einer Experimentenreihe wurde für die Bestimmung der relativen Adhäsion die Zellzahl aller Versuchreihen eines Experimentes auf beiden mikroskopischen Aufnahmen bestimmt. Die absolute Zahl adhärenter Zellen errechnete sich aus dem Verhältnis Zellzahl nach dem Waschen zu Zellzahl vor dem Waschen und wurde i.d.R. in Prozent angegeben.

In jedem Experiment wurde ein zusätzlicher Flusskammer-Adhäsionstest mit dem Wt-Hefestamm YHUM0909 durchgeführt und für diesen ebenfalls die

absolute Zahl adhärenter Zellen bestimmt. Dieser Wert wurde mit 1 gleichgesetzt.

Die relative Zahl adhärenter Zellen errechnete sich aus dem Verhältnis der Absoluten Zahl adhärenter Zellen in einem Experiment zu der Absoluten Zahl adhärenter Zellen des Wt-YHUM0909-Stammes.

Anreicherungsreihen mit der Flusskammer:

Für Anreicherungen wurde nach Beendigung des Experiments die PTFE-Scheibe mit den adhärenenden

Zellen sehr vorsichtig mit einer Pinzette von der Flusskammer getrennt und mit 55 °C warmem, flüssigen SD(-ura)-Agar überschichtet. Zur Anzucht der isolierten Hefezellen wurden diese anschließend für vier Tage bei 30 °C in einer Feuchtekammer inkubiert und angewachsene Kolonien in SD(-ura)-Flüssigmedium überführt.

(Informationen zur Assemblierung der Flusskammer finden sich unter 4.4).

4.2.3 *Ustilago maydis*

Kultivierung von *Ustilago maydis*

U. maydis-Stämme wurden standardmäßig entweder als Schüttelkulturen bei 200 Upm oder auf Festmedien unter aeroben Bedingungen bei 28 °C kultiviert. Übernachtskulturen wurden entweder aus bei -80 °C gelagerten Glycerinkulturen oder von bewachsenen PD-Platten, die weniger als einen Monat bei 4 °C gelagert waren, angeimpft.

Bestimmung der Zelldichte bei *U. maydis*

Die Zelldichte von Flüssigkulturen wurde fotometrisch in einem Pharmacia LKB Ultraspec III Fotometer bei 600 nm bestimmt. Um eine lineare Abhängigkeit sicherzustellen, wurden für die Messung der OD₆₀₀ die Kulturen durch entsprechende Verdünnung auf einen Wert unterhalb von 0,5 verdünnt. Als Nullwert wurde die OD₆₀₀ des jeweiligen Kulturmediums verwendet, eine OD₆₀₀ = 1,0 entspricht etwa $1-5 \times 10^7$ Zellen/ml

Transformation von *U. maydis*

(Schulz *et al.* 1990; Gillissen *et al.* 1992)

Von einer auf Festmedien wachsenden Kultur wurde eine 4 mL YEPS_T-Flüssigkultur angesetzt und für 8-10 h bei 28 °C geschüttelt. Diese Vorkultur wurde anschließend 1:300 in 50 mL frischem YEPS-Medium verdünnt und bei 28 °C bis zu einer Zelldichte von $1-2 \times 10^7$ Zellen/ml (bis maximal OD₆₀₀ = 1,0) geschüttelt. Nach Erreichen des optimalen Zelltiters wurden die Zellen durch Zentrifugation (3.200 Upm, 10 min, 4 °C, Heraeus Varifuge 3.0R) geerntet, einmal mit 25 mL SCS gewaschen und in 2 mL SCS mit 12,5 mg/ml Novozym resuspendiert. Die in diesem Puffer bei Raumtemperatur erfolgende Protoplastierung kann mikroskopisch verfolgt werden, da die zigarrenförmigen Zellen nach Lyse der Zellwand eine kugelige Form einnehmen. Nach vollständiger Protoplastierung (5 - 30 min) wurden 10 mL SCS zugegeben und die Protoplasten durch zehnmünütige Zentrifugation bei 2.300 Upm (4 °C, Heraeus Varifuge 3.0R) pelletiert. Um das Novozym vollständig zu entfernen, wurde dieser Waschgang noch

dreimal wiederholt. Anschließend wurde mit 10 mL STC gewaschen und das Pellet danach in einem Volumen von 0,5 mL eiskaltem STC aufgenommen. Die so behandelten Protoplasten können 3-4 h auf Eis oder aliquotiert bei -80 °C mehrere Monate (bzw. Jahre) aufbewahrt werden. Zur integrativen Transformation wurden 50 µL Protoplasten mit 1-5 µL linearisierter Plasmid-DNA (ca. 5 µg) und 1 µL Heparin-Lösung für 10 min auf Eis inkubiert. Bei einer Transformation mit selbstreplizierenden Plasmiden wurde nur ca. 1 µg DNA eingesetzt. Nach Zugabe von 0,5 mL STC/PEG folgte eine weitere Inkubation von 15 min auf Eis. Anschließend wurde der gesamte Transformationsansatz auf einer kurz vorher mit Top-Agar überschichteten Hygromycin- bzw. Carboxin-Bottom-Agarplatte ausgestrichen. Nach zwei bis fünf Tagen Inkubation bei 28 °C wurden die gewachsenen Kolonien mit Zahnstochern auf PD-Platten, die Hygromycin bzw. Carboxin enthielten, vereinzelt.

Hydrophobizitätsbestimmung von *U. maydis* Filamenten

modifiziert nach (Puhalla 1968) und (Teertstra *et al.* 2006).

Um *U. maydis*-Stämme auf ihre Fähigkeit filamentöses Wachstum zu induzieren, zu testen, wurden logarithmisch wachsende Kulturen in YEPS-Medium verwendet. 1-4 µL dieser Kulturen wurden auf PD-Aktivkohleplatten getropft. Sollten Kreuzungen auf filamentöses Wachstum untersucht werden, wurde zuerst die optische Dichte der zu kreuzenden Kulturen bestimmt, einander angeglichen und gleiche Volumina miteinander gemischt, bevor die Kulturen auf Aktivkohleplatten getropft wurden. Die Platten wurden bei 28 °C inkubiert. Nach zwei bis drei Tagen ist der Fuz⁺-Phänotyp filamentös wachsender Stämme gut zu erkennen und vom glatten Fuz⁻-Phänotyp nicht filamentös wachsender Stämme klar zu unterscheiden.

Durch Applikation von 10 µL H₂O bid. auf die Oberfläche von Fuz⁺-Kolonien und einer seitlichen Betrachtung kann der Wasserkontaktwinkel als Maß der Hydrophobizität bestimmt werden. Hierfür wurden

fotografische Aufnahmen getätigt. Anhand dieser kann mit der durch Young postulierten Gleichung der Wasserkontaktwinkel bestimmt werden:

$$\cos \Theta = (\sigma^S - \sigma^{LS}) / \sigma^L \text{ (siehe Abbildung 35).}$$

Methode des liegenden Tropfens

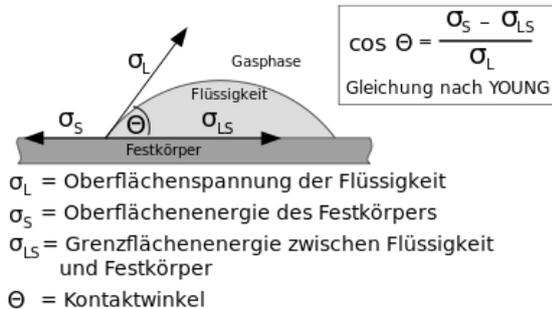


Abbildung 35: Bestimmung des Wasserkontaktwinkels nach Young. Der Wasserkontaktwinkel Θ ist durch die Oberflächenspannung der Flüssigkeit, die Oberflächenenergie des Festkörpers und die Grenzflächenenergie zwischen Flüssigkeit und Festkörper determiniert. (Quelle: de.wikipedia.org; April 2012, URL: <http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/2/2d/Kontaktwinkel.svg>)

Fotografische Aufnahmen wurden mit einer 5-Megapixel iSight Kamera (Apple) durchgeführt und für eine weitere Bildbearbeitung in Photoshop CS2 (Adobe) übernommen. In der vorliegenden Arbeit wurde die Hydrophobizität der Filamente lediglich durch allgemeine Zuordnung in die Klassen „hydrophil“, „hydrophob“ und „superhydrophob“ vorgenommen (siehe Abbildung 36).

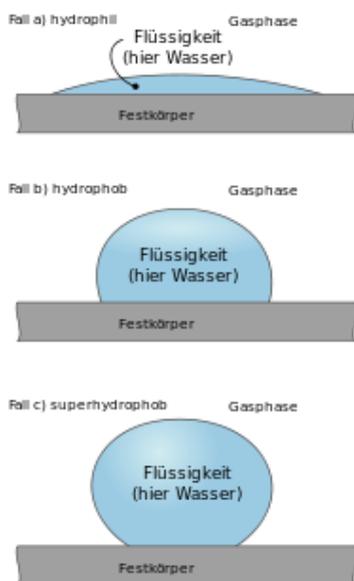


Abbildung 36: Bestimmung des Wasserkontaktwinkels nach Young. Der Wasserkontaktwinkel Θ ist durch die Oberflächenspannung der Flüssigkeit, die Oberflächenenergie des Festkörpers und die Grenzflächenenergie zwischen Flüssigkeit und Festkörper determiniert. (Quelle: de.wikipedia.org; April 2012, URL: <http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/2/2d/Kontaktwinkel.svg>)

http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/8/80/Kontaktwinkel_Typen.svg)

Pflanzeninfektionen

Für Pathogenitätstests wurde eine Spritzinfektion verwendet, bei der 300 μ l einer Pilzsuspension in das Innere des Blattwirtels sieben Tage alter Maispflanzen (Early Golden Bantam) injiziert wurden. Die entsprechenden Stämme wurden in YEPS_L Flüssigmedium bis zu einer OD₆₀₀ \approx 0,8 angezogen, durch Zentrifugation (3000 Upm, 5 min, RT) pelletiert und in H₂O bid. aufgenommen (OD₆₀₀ \approx 3,0). Die kompatiblen Stämme wurden vor der Infektion 1:1 gemischt. Die Bonitur erfolgte sieben Tage nach Infektion.

Calcofluor-Färbung

20-50 μ l Zellen (auch auf der Pflanzenoberfläche) wurden mit einer 1:100-Verdünnung einer Calcofluorfärbelösung (Stocklösung: 10 mg/ml in DMSO) überschichtet. Die Präparate wurden zwei Minuten bei RT inkubiert und anschließend einmal mit PBS gewaschen.

Chlorazol Black E-Färbung

Drei bis acht Tage nach der Pflanzeninfektion wurden die Blätter ca. 1 cm unter der Injektionsstelle abgetrennt. Es folgte eine Entfärbung der Blattsnitte für drei bis vier Tage in 100%igem Ethanol. Nachdem die Schnitte in H₂O bid. gewaschen wurden, erfolgte die Inkubation in 10%-iger KOH bei 90°C (max. sechs Stunden). Danach wurde die KOH Lösung vorsichtig abpipettiert und die Chlorazol Black E -Lösung aufpipettiert. Es folgte eine Inkubation ÜN bei 60°C und danach die Entnahme der Färbelösung. Die Präparate können in 50%igem Glycerin aufbewahrt werden.

Chlorazol Black E-Lösung:

0,03% f. c. Chlorazol (Sigma) in H₂O bid., Glycerin und Milchsäure im Mischverhältnis 1:1:1.

Diaminobenzidinfärbung

Für Diaminobenzidin (DAB)-Färbungen wurden Blattspalten infizierter Pflanzen (3. Blatt) in voller Länge geerntet und mit der Schnittfläche für 12 h in einer 1 mg/ml DAB Lösung inkubiert (RT/dunkel). Danach wurden die Blätter in einem Ethanol-Chloroform-Gemisch (4:1) bei 4 °C entfärbt (ein bis zwei Tage; dunkel) und mikroskopisch analysiert. Konserviert wurden die Präparate in 10% Glycerol bei dunkler Lagerung (RT).

Adhäsionstest von *U. maydis* Zellen an Polystyrol

Für den Polystyrol-Adhäsionstest wurden *U. maydis* Zellen in 50 mL vorgewärmtes YEPS_L-Medium mit einer OD₆₀₀ von 0,1 von einer frischen Übernachtskultur angeimpft und vier Stunden bei 28 °C und 180 Upm inkubiert. Anschließend wurde 1 mL der Kultur abzentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 1 mL H₂O bid. resuspendiert. Anschließend wurde die Suspension auf eine PS-Petrischale appliziert und drei Stunden bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Petrischale mit 20 mL H₂O bid. gefüllt und 15 min bei 60 Upm auf einem „Bellydancer“ (New Brunswick Bio Dancer) gewaschen. Die Petrischale wurde vollständig entleert und mit 1% Kristallviolettlösung (100 mg/L Kristallviolett und 40 mg/L Hexanol) überschichtet. Nach 5 min Inkubation bei RT wurde die Kristallviolettlösung vollständig entfernt, Reste sehr vorsichtig mit 20 mL H₂O bid. abgespült und die Petrischale bei RT getrocknet. Fotografische Aufnahmen wurden mit einer 5-Megapixel iSight Kamera (Apple) durchgeführt und für eine weitere Bildbearbeitung in Photoshop CS2 (Adobe) übernommen.

Adhäsionstest von *U. maydis* Zellen an Agar-Oberflächen

U. maydis Stämme wurden auf PD-Agar ausgestrichen und drei Tage bei 28 °C inkubiert. Das Abwaschen erfolgte 30 Sekunden lang unter fließendem Wasser an einem Wasserhahn. Fotografische Aufnahmen wurden mit einer 5-Megapixel iSight Kamera (Apple) durchgeführt und für eine weitere Bildbearbeitung in Photoshop CS2 (Adobe) übernommen.

Adhäsionstest von *U. maydis* Zellen an PTFE (Teflon®)

Für PTFE-Adhäsionstests wurden *U. maydis* CFP- und YFP-Zellen jeweils von einer frischen Übernachtskultur in 50 mL vorgewärmtes YEPS_L-Medium mit einer OD₆₀₀ von 0,05 überimpft und vier Stunden bei 28 °C und 180 Upm inkubiert. Es wurde die OD₆₀₀ beider Kulturen bestimmt. Anschließend wurde 1 mL jeder Kultur in einem 1,5 mL Reagiergefäß abzentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet jeweils in H₂O bid. resuspendiert, dabei wurde eine OD₆₀₀ von 0,2 eingestellt. Es folgte die mikroskopische Bestimmung der Zellzahl mit einer Thoma-Zählkammer, um die tatsächliche Zellzahl / mL für CFP- und YFP-Zellen zu ermitteln. Anhand dieser Zellzahl wurden nun CFP- und YFP-Zellen zu gleichen teilen gemischt. Für eine Kontrolle des CFP-/YFP-Verhältnisses wurden 10 µL entnommen, jeweils 5 µL auf einen Objektträger appliziert und unter dem Fluoreszenzmikroskop (Axio Imager.Z1, ZEISS) wurden 10 zufällig gewählte Ausschnitte für eine spätere Auszählung der CFP- und YFP-Zellen mittels einer CCD Kamera (Zeiss AxioCam MRm) und der Software AxioVision 4.7 (Zeiss) aufgenommen.

Die Applikation des Zellgemisches geschah entweder durch pipettieren von 5-20 µL oder durch Aufsprühen mit einem EcoSpray Sprühgerät (Carl Roth). Inkubationszeiten variierten mit den durchgeführten Versuchen:

(a) Für die initiale Sporidienhaftung wurde getropft, im 10 minütigen Abstand wurde ein 5 µL Tropfen der Zellsuspension auf die PTFE-Folie appliziert. Nach 60 min wurde mit einer Spritzflasche und etwa 200 mL H₂O bid. die Oberfläche gründlich abgespült.

(b) Für die Filamentanhaftung wurde entweder getropft oder (für komparative Analysen mit hohen Filament-Zahlen) aufgesprüht. Anschließend wurde die PTFE-Folie vorsichtig in eine Feuchtekammer überführt und 24 h lang bei 28 °C inkubiert. Zum Waschen wurde die Folie mit der Filament-benetzten Seite nach unten auf eine mit H₂O bid. gefüllte Petrischale gelegt und 15 min bei 60 Upm auf einem „Bellydancer“ (New Brunswick Bio Dancer) geschüttelt.

Die Mikroskopische Analyse der PTFE-Folie geschah aufgrund des hydrophoben Charakters durch direkte fluoreszenzmikroskopische Untersuchung der trockenen PTFE-Oberfläche. Mikroskopische Aufnahmen wurden wiederum mit einer CCD Kamera (Zeiss AxioCam MRm) und der Software AxioVision 4.7 (Zeiss) durchgeführt.

Die Auszählung der Zellen geschah entweder manuell oder durch Verwendung der Software Pixcavator Student Edition (Intelligent Perception).

Flusskammer-Adhäsionstest von *U. maydis* Zellen

(Modifiziert nach Li und Palecek 2003)

Für den Flusskammer-Adhäsionstest wurden *U. maydis* Zellen in 50 mL vorgewärmtes YEPS_L-Medium mit einer OD₆₀₀ von 0,1 von einer frischen, nicht überwachsenen (OD₆₀₀ < 0,5) Übernachtskultur angeimpft und mindestens vier Stunden bei 28 °C und 180 Upm inkubiert. Die OD₆₀₀ dieser Kultur wurde regelmäßig kontrolliert, ab einer OD₆₀₀ von 0,5 wurde eine 1:2 Verdünnung in vorgewärmtem YEPS_L vorgenommen. Zur Applikation in die Flusskammer wurde die OD₆₀₀ bestimmt, 2 mL der Kultur entnommen und fünf Minuten bei 3500 Upm und Raumtemperatur abzentrifugiert (Heraeus Biofuge pico). Die Zellen wurden im selben Volumen H₂O bid. gewaschen, erneut abzentrifugiert, und das Pellet in H₂O bid. resuspendiert, hierbei wurde eine OD₆₀₀ von 0,2 eingestellt.

Die Sporidien wurden in eine 1 mL Spritze überführt und mittels dieser in das Flusskammersystem überführt.

Nach einer einstündigen Inkubation wurde eine mikroskopische Aufnahme eines repräsentativen Bildausschnittes mittels eines inversen Mikroskops (Zeiss Axiovert 135), einer CCD Kamera (Zeiss AxioCam MRm) und der Software AxioVision 4.7 (Zeiss) aufgenommen. Anschließend wurde mittels der Peristaltikpumpe (Pharmacia LKB Pump P-1) eine laminare Strömung gewünschter Stärke für 5 oder 15

Minuten erzeugt. Es folgte eine weitere mikroskopische Aufnahme desselben Bildausschnittes.

(Weitere Informationen zur Assemblierung der Flusskammer unter 4.4)

Mikroskopie und Bildverarbeitung

Die zellmorphologische Betrachtung von *U. maydis* erfolgte an einem Fluoreszenzmikroskop (Axio Imager.Z1, ZEISS) mittels Normarski-Optik. Für DIC-Mikroskopie und Fluoreszenz-Mikroskopie wurde ein 40-faches EC Plan-NEOFLUAR Objektiv (ZEISS) mit 0,75 numerischer Apertur verwendet. 5 µL der entsprechenden Kultur bzw. des fixierten Präparats wurden zur Analyse

auf Objektträger getropft. Für die Betrachtung und fotografische Dokumentation sind Zelldichten von etwa $2,5 \times 10^6$ Zellen/ml ideal, die Kulturen sollten entsprechend verdünnt werden. Für die Fluoreszenzmikroskopische Betrachtung wurde für das eGFP ein Filter mit Anregungsspektrum von 470-495 nm und Emissionsspektrum von 525 nm eingesetzt. Digitale Aufnahmen mit einer hochauflösenden CCD-Kamera (AxioCam MRm) wurden mit dem Programm AxioVisionLE 4.7 (ZEISS) nachbearbeitet (Bildausschnitt, Kontrastverstärkung, Maßstabskalierung) und als TIFF-Dateien für die weitere Bearbeitung mit dem Bildbearbeitungsprogramm Photoshop CS2 (Adobe) abgespeichert.

4.3 Molekularbiologische Standardmethoden

4.3.1 Isolierung von Nukleinsäuren

Minipräparation von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Die Isolierung erfolgte durch „Lyse durch Kochen“ nach (Sambrook *et al.* 1989). 1,5 mL einer *E. coli*-Übernachtskultur wurden 30 s bei 13.000 Upm (Heraeus Biofuge 15) pelletiert. Das Zellpellet wurde in 350 µL STET-Puffer resuspendiert, nach Zugabe von 25 µL Lysozym-Lösung kräftig geschüttelt und anschließend 45 s bei 95 °C in einem Eppendorf-Heizblock inkubiert. Die lysierten Zellen und die denaturierte genomische DNA wurden 10 min bei 13.000 Upm abzentrifugiert (Heraeus Biofuge 15) und danach mit einem sterilen Zahnstocher aus der wässrigen Lösung entfernt. Die Reinigung der Plasmid-DNA erfolgte durch Fällung mit 40 µL 3 M Na-Acetat, pH 5,3 und 420 µL Isopropanol bei RT für 5 min und anschließender Zentrifugation für 5 min bei 13.000 Upm (Heraeus Biofuge 15). Das Pellet wurde mit 70% Ethanol gewaschen und nach Trocknung in 50 – 100 µL TE-Puffer mit 50 µg/ml RNase A aufgenommen. Mit dieser Methode gelang es routinemäßig, aus 1,5 mL Übernachtskultur etwa 50 µg Plasmid-DNA zu isolieren.

STET:

10 mM Tris-Cl, pH 8,0
100 mM NaCl
1 mM Na₂-EDTA
5% (v/v) Triton X-100
in H₂O bid.

Lysozym-Lösung:

10 mg/ml Lysozym
10 mM Tris-Cl, pH 8,0
in H₂O bid.

Isolierung genomischer DNA aus *U. maydis*
(Hoffman und Winston 1987)

Es wurden 1,5 mL einer Übernachtskultur in YEPS_L-Flüssigmedium zusammen mit 0,3 g Glasperlen in einem 2 mL Eppendorf-Reaktionsgefäß pelletiert (13.000 Upm, 30 sec, RT), der Überstand abgegossen und das Pellet in 400 µL Ustilago-Lysispuffer und 500 µL TE-Phenol/Chloroform aufgenommen. Die Proben wurden für 10 min auf einem Vibrax-VXR Schüttler geschüttelt. Nach Phasentrennung (13.000 Upm, 5 min, RT) wurden 400 µL des Überstands in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt und mit 1 mL Ethanol gefällt. Nach Zentrifugation (13.000 Upm, 30 sec, RT) wurde das Pellet in 50 µL TE mit 20 µg/ml RNase A aufgenommen, bei 50°C resuspendiert und bei -20°C aufbewahrt.

Ustilago-Lysispuffer:

50 mM Tris-Cl, pH 7,5
50 mM Na₂-EDTA
1% (w/v) SDS in H₂O bid.

TE-Phenol/Chloroform:

Mischung aus gleichen Teilen
Phenol (mit TE- Puffer äquilibriert)
und Chloroform.

Isolierung von Plasmid-DNA aus *S. cerevisiae*
(nach Vranes, pers. Mitteilung)

Eine *S. cerevisiae* Kolonie wurde in 2,5 mL SD-ura Medium angeimpft und über Nacht bei 28 oder 30 °C und 180 Upm inkubiert. 1,5 mL dieser Übernachtskultur wurden in Reagiergefäße überführt und bei 13.000 Upm 1 min abzentrifugiert (Heraeus Biofuge pico). Das Pellet wurde in 300 µL Ustilago-Lysispuffer (s.o.) resuspendiert und 15 min auf einem Vibrax-VXR Schüttler bei 1400-1800 Upm geschüttelt. Anschließend wurde die

Suspension für 15 min bei 65 °C (Eppendorf Thermomixer comfort) inkubiert, danach 150 µL 5 M NaCl zugeben und kurz gevortext, was zum Ausfällen von Proteinverunreinigungen führt. Diese wurden durch 15 min Zentrifugation bei 13.000 Upm (Hereaus Biofuge pico) pelletiert, der Überstand (400 µL) in ein neues Reagiergefäß überführt, 500 µL Isopropanol zugegeben, durch invertieren gemischt und 15 min bei RT inkubiert. Die Pelletierung der ausfallenden DNA wurde durch 15 min Zentrifugation bei 13.000 Upm (Hereaus Biofuge pico) erreicht, der Überstand wurde verworfen. Anschließend wurde mit 500 µL 70% EtOH gewaschen, 5 min bei 13.000 Upm zentrifugiert (Hereaus Biofuge pico), der Überstand verworfen und das Pellet 10 min bei RT getrocknet. Das Pellet wurde anschließend in 50 µL TE/RNase aufgenommen und bei 50 °C gelöst. Vor Sequenzierreaktionen wurde eine Säulenaufreinigung der Plasmid-DNA durchgeführt.

RNA-Isolierung aus Flüssigkulturen nach der Trizol-Methode

Diese Methode orientiert sich am Protokoll der Firma Invitrogen und wurde zur Präparation von Gesamt-RNA aus *U. maydis* Flüssigkulturen verwendet. 50 mL Flüssigkultur ($OD_{600} \approx 0,5$) wurden pelletiert (3.500 Upm, 5 min, RT), der Überstand verworfen und das Pellet in 2 mL Trizol resuspendiert, dieser Ansatz kurz gevortext und nach Zugabe von ca. 0,3 g Glasperlen für fünf min in einer Kugelmühle (Retsch) bei 30 Hz aufgeschlossen. Nach einer Inkubation bei RT für fünf Minuten wurden pro mL Trizol 200 µL Chloroform zugegeben. Alle folgenden Angaben sind ebenso pro mL eingesetztem Trizol zu verstehen. Die Ansätze wurden anschließend kurz gevortext und zwei bis drei min bei RT inkubiert. Nach Zentrifugation (13.000 Upm, 4 °C, 15 min) wurde die wässrige Phase abgenommen, in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und nach Zugabe von 500 µL Isopropanol 10 min bei RT gefällt. Nach erneuter Zentrifugation (13.000 Upm, 4 °C, 10 min) wurde die pelletierte RNA mit 75% Ethanol gewaschen und erneut zentrifugiert (13.000 Upm, 4 °C, 5 min). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet für fünf min bei RT getrocknet, anschließend in 50 µL Nuklease-freiem H₂O (Ambion) aufgenommen und für 10 min bei 55 °C resuspendiert. Eine Quantitäts- und Qualitätskontrolle erfolgte durch fotometrische Messung am NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer sowie durch Analyse auf einem Agilent 2100-Bioanalyzer (siehe Angaben des Herstellers).

RNA-Isolierung aus pflanzlichem Material nach der Trizol-Methode

Isolierung von Gesamt-RNA aus Pilzkulturen die in Flüssigmedium gewachsen waren, sowie aus infiziertem Pflanzenmaterial: Auf das tiefgefrorene Zellpellet, bzw. das mit Hilfe von flüssigem Stickstoff zu einem feinen Pulver gemörserte Tumormaterial (~250 mg), wurde 1 ml

Trizol pipettiert, dieser Ansatz kurz gevortext und nach Zugabe von ca. 0,3 g Glasperlen (150212 microns; Sigma) anschließend für fünf min in einer Retsch-Kugelmühle bei 30 Hz aufgeschlossen, bzw. homogenisiert. Nach Inkubation bei RT für 15 min wurden 200 µL Chloroform zugegeben. Die Ansätze wurden anschließend kurz gevortext und zwei min bei RT inkubiert. Nach Zentrifugation (13.000 Upm, 4 °C, 15 min, Beckmann Avanti30 Zentrifuge) wurde die wässrige Phase abgenommen, in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und nach Zugabe von 500 µL Isopropanol 10 min bei RT gefällt. Nach einer erneuten Zentrifugation (13.000 Upm, 4 °C, 10 min, Beckmann Avanti30 Zentrifuge) wurde die pelletierte RNA mit 70% Ethanol gewaschen und erneut zentrifugiert (7.500 g, 4 °C, 5 min, Beckmann Avanti30 Zentrifuge). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet für fünf min bei RT getrocknet, anschließend in 100 µL RNase-freiem H₂O aufgenommen und bei 55 °C resuspendiert. Eine Quantitäts- und Qualitätskontrolle erfolgte durch fotometrische Messung am NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer, sowie einer Analyse auf einem Agilent 2100-BioanalyzerR. Details zum Agilent 2100-Bioanalyzer (siehe Angaben des Herstellers).

RNA-Präparation aus Filamenten auf festen Oberflächen

(Modifiziert nach Schmitt et al. 1990)

Eine Suspension aus SG200 Sporidien wurde auf hydrophobe PS Petrischalen mit einer Sprühkanone (Carl Roth) aufgesprüht und für sechs Stunden bei 28 °C in einer Feuchtekammer inkubiert.

Für die Präparation der RNA aus den entstandenen Filamenten wurde 1,5 mL AE-Phenol-Lösung in eine Petrischale pipettiert, durch Schwenken gleichmäßig verteilt und mit einem Zellschaber die Filamente von der Oberfläche abgelöst. 600 µL der Suspension wurden anschließend in ein Reagiergefäß mit 600 µL AE-Puffer +1% SDS überführt, das Reagiergefäß fest verschlossen und 20 Sekunden kräftig mit dem Vibrax-VXR geschüttelt. Für den Zellaufschluss wurde nun für vier min bei 65 °C und anschließend für vier min bei -80 °C inkubiert. Die Phasentrennung erfolgte durch Zentrifugation (22.000 Upm, 20 min, 4 °C, Heraeus Varifuge 3.0R). 600 µL des wässrigen Überstandes wurden in ein neues Reagiergefäß überführt und mit 600 µL AE-Phenol/Chloroform versetzt, kräftig geschüttelt und 20 min bei 22.000 Upm, 4 °C zentrifugiert (Heraeus Varifuge 3.0R). 400 µL des wässrigen Überstandes wurden in ein RNase freies Reagiergefäß überführt und die RNA wurde durch Zugabe von 40 µL 3M NaAc und 1 mL 100% EtOH maximal 1 h bei -20 °C gefällt. Nach 20 min Zentrifugation bei 13.000 Upm, 4 °C (Heraeus Biofuge pico) wurde das Pellet mit 1 mL 75% EtOH gewaschen, erneut zentrifugiert, bei RT getrocknet, in 20 µL Nuklease-freiem H₂O (Ambion) aufgenommen und für 10 min bei 55 °C resuspendiert. Eine Quantitäts- und Qualitätskontrolle erfolgte durch fotometrische Messung

am NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer sowie durch Analyse auf einem Agilent 2100-Bioanalytiker (siehe Angaben des Herstellers).

AE-Phenol-Lösung

Aqueous Phenol von Carl Roth bezogen, 45 mL in ein 50 mL Reagiergefäß aliquotiert und mit einer Spatelspitze 8-Hydroxy-Chinolin versetzt, mit max. 5 mL AE-Puffer überschichtet

AE-Puffer

AE-Lsg. 1 (50mM Natriumacetat, 10mM Na₂-EDTA)

AE Lsg. 2 (50mM Essigsäure, 10mM Na₂-EDTA)

Beide Lösungen vermischt, bis pH 5,3 erreicht.

AE-Phenol/Chloroform

Aqueous Phenol und Chloroform zu gleichen Teilen gemischt, mit einer Spatelspitze 8-Hydroxy-Chinolin versetzt, mit maximal 5ml AE-Puffer überschichtet

RNA-Isolierung aus pilzlichem Material von der Blattoberfläche (Latex-Methode)

nach (Vranes, 2006)

Diese Methode dient der RNA-Isolierung aus pilzlichem Material von der Blattoberfläche. Infizierte Blätter (i. d. R. das innerste dritte Blatt) wurden ca. 2-3 cm unterhalb

der Injektionsstelle abgeschnitten und mittels doppelseitigem Klebeband (Scotch-Pressure Sensitive Tape) auf einem Objektträger fixiert. Anschließend wurde ein dünner Film aus flüssigem Latex (R.A.H. Limited, Fantasy Liquid Latex, Orion-Fachgeschäft Marburg) mittels einer 10 µl Pipettenspitze aufgebracht und mit einem Haartrockner (Kaltstufe) 1-2 min lang getrocknet. Die Latexschicht wurde mit einer Pinzette vorsichtig abgezogen und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Für einen Ansatz wurde Material von 6-8 Pflanzen zusammengegeben. Das mit Hilfe von flüssigem Stickstoff zu einem feinen Pulver gemörserte Latexmaterial wurde zusammen mit 1 mL RLT- Puffer + β-Mercaptoethanol (RNeasy Mini-Kit, Qiagen) in ein 2 mL Reaktionsgefäß überführt. Nach Zugabe von ca. 0,3 g Glasperlen wurden die Proben mit Hilfe einer Schwingmühle (MM200; Retsch) homogenisiert (5 min, 30 Hz). Der Überstand wurde nach fünfminütiger Zentrifugation bei 13.000 Upm und RT (Biofuge; Heraeus) in ein neues Reaktionsgefäß überführt und das 0,5 fache Volumen an 100% Ethanol zugesetzt. Die weitere Aufreinigung der RNA folgte dem RNeasy Mini Kit-Protokoll (Qiagen) zur Isolierung von Gesamt-RNA aus Pflanzenzellen und filamentösen Pilzen. Alle weiteren Einzelheiten gehen aus dem Herstellerprotokoll hervor.

4.3.2 Handhabung von Nukleinsäuren

Sämtliche *in vitro* Methoden zur Handhabung von Nukleinsäuren wurden, wenn nicht gesondert beschrieben, nach (Sambrook *et al.* 1989) durchgeführt.

Fällung von DNA

Die Reinigung und Konzentrierung von Nukleinsäuren aus wässrigen Lösungen erfolgte durch Fällung. Hierzu wurde die Probe mit 1/10 Volumen 3 M Na-Acetat pH 5,3 und dem 2,5-fachen Volumen an kaltem 100% Ethanol versetzt, gemischt und für 1 h bei -20 °C inkubiert. Das Präzipitat wurde durch 10- bis 20-minütiges Zentrifugieren (13.000 Upm, RT, Heraeus Biofuge 15) pelletiert. Der Niederschlag wurde mit 70% Ethanol gewaschen, um Salze zu entfernen. Nach erneuter kurzer Zentrifugation wurde das Pellet bei RT getrocknet und in einem kleinen Volumen H₂O_{bid.} oder TE-Puffer gelöst.

Phenol/Chloroform-Extraktion von DNA

Proteine und andere Verunreinigungen wurden aus wässrigen DNA-Lösungen durch Extraktion mit Phenol entfernt. Die Probe wurde mit gleichem Volumen TE-Phenol kräftig gemischt. Die Phasentrennung erfolgte durch Zentrifugation (13.000 Upm, 5 min, Heraeus Biofuge 15) und die obere wässrige Phase wurde in ein

neues Reaktionsgefäß überführt. In einem zweiten Schritt wurde die Probe mit dem gleichen Volumen PC ausgeschüttelt (Sambrook *et al.* 1989). Die so gereinigten Nukleinsäuren wurden anschließend mit Ethanol präzipitiert (s.o.).

Konzentrationsbestimmung von DNA

Die Konzentration von Nukleinsäuren wurde fotometrisch bestimmt. Bei einer Wellenlänge von 260 nm und einer Schichtdicke von 1 cm entspricht ein Absorptionswert von 1 einer Konzentration von etwa 50 µg/ml doppelsträngiger DNA und 33 µg/ml einzelsträngiger DNA.

Als Maß für die Reinheit der Desoxyribonukleinsäuren diente der Quotient aus den optischen Dichten bei den Wellenlängen 260 nm und 280 nm. Für reine DNA sollte er bei etwa 1,8 liegen. niedrigere Werte deuten Verunreinigungen mit Proteinen, höhere Werte Verunreinigungen mit Salzen oder Zuckern an. Die Messungen erfolgten an einem Nanodrop-ND1000-Spektrofotometer.

Restriktion von DNA

Zur Spaltung von doppelsträngiger DNA wurden Typ II-Restriktionsendonukleasen unter den vom Hersteller

empfohlenen Pufferbedingungen eingesetzt. Ein analytischer Ansatz enthielt:

0,5 µg	DNA
10 µg	Albumin (falls empfohlen)
0,5 U	Restriktionsenzym
in 20 µl	Restriktionspuffer

Nach Inkubation für 1 h bei 37 °C (bzw. der für das jeweilige Enzym optimalen Temperatur) wurden dem Ansatz 2 µL nativer Auftragspuffer zugesetzt und die Reaktionsprodukte auf Agarosegelen analysiert.

Dephosphorylierung linearer DNA-Fragmente

5'-terminale Phosphatgruppen können mit Hilfe von Alkalischer Phosphatase aus Kälberdarm abgespalten werden. Da DNA-Stränge ohne 5'-terminale Phosphatgruppen nicht religieren können, kann so die Religation von linearisierter Plasmid-DNA verhindert werden. Ein typischer Reaktionsansatz enthielt:

1 µg	Plasmid-DNA
1 U	Alkalische Phosphatase
in 100 µL	Alkalische Phosphatase-Puffer

Der Ansatz wurde 30 min bei 37 °C, anschließend weitere 15 min bei 55 °C inkubiert. Zur Inaktivierung des Enzyms wurde eine Extraktion mit 100 µL PC durchgeführt. Die DNA wurde durch Zugabe von 10 µL Na-Acetat, pH 5,3 und 250 µL Ethanol gefällt, mit 70% Ethanol gewaschen, getrocknet und in TE-Puffer aufgenommen.

Auffüllen von 5'-überhängenden DNA-Fragmentenden

Das Klenow-Fragment der *E. coli* DNA-Polymerase I ist in der Lage, 5'-überhängende DNA-Fragmentenden in Anwesenheit von Desoxyribonukleotiden und Magnesiumionen aufzufüllen und so glatte Enden zu erzeugen. Die Reaktion kann in allen herkömmlichen Restriktionspuffern durchgeführt werden. Dieses Vorgehen ist die Methode der Wahl, um nichtkompatible Fragmentenden ligierbar zu machen.

Ein typischer Reaktionsansatz enthielt:

1 µg	DNA-Fragmente in beliebigem Restriktionspuffer
50 µM	dNTPs
1 U	Klenow-Fragment der <i>E. coli</i> DNA-Polymerase I

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

Ligation von DNA-Fragmenten

Doppelsträngige DNA-Fragmente wurden mit Hilfe der T4 DNA-Ligase kovalent verknüpft. Das zu klonierende Fragment wurde in der Regel in fünffach molarem Überschuss gegenüber der dephosphorylierten, linearisierten Plasmid-DNA eingesetzt. Ein typischer Reaktionsansatz enthielt:

100 ng	linearisierter, dephosphorylierter Vektor
fünffach molarer Überschuss an	linearem Fragment
1 U	T4 DNA-Ligase
in 10 µL	Ligase-Puffer

Der Ansatz wurde entweder 2 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 14 °C inkubiert.

GATEWAY® BP Clonase Reaktion

Die Klonierung von PCR-generierten, attB1 und attB2 flankierten PCR-Produkten wurde mittels Gateway® BP Clonase® II Enzyme Mix (Invitrogen) nach dem Protokoll des Herstellers durchgeführt.

1-7 µL	attB-PCR-Produkt
1 µl	pDONR221 (150 ng/µl)
ad 8 µL	TE Puffer, pH 8.0
2 µl	Clonase II Enzym Mix

Inkubation für 1 – 12 h bei RT.

Für eine Standard-Reaktion erfolgte die Zugabe von 1 µL Proteinase K Lösung und 10 min Inkubation bei 37 °C, anschließend erfolgte die Transformation von 1 µL der Klonasereaktion in *E. coli*.

Für eine „OneTube“-Reaktion erfolgte keine Addition von Proteinase K, stattdessen wurde der Ansatz direkt in eine LR-Reaktion eingesetzt.

GATEWAY® LR Clonase Reaktion

Die Klonierung Fragmenten aus pDONR221 in einen Zielvektor wurde mittels Gateway® LR Clonase® II Enzyme Mix (Invitrogen) nach dem Protokoll des Herstellers durchgeführt.

1 µL	Donorvektor (100 ng/µl) oder
(7 µl	BP-Reaktion)
1 µl	Zielvektor (150 ng/µl)
ad 8 µL	TE Puffer, pH 8.0
2 µl	Clonase II Enzym Mix

Inkubation für 1 – 12 h bei RT, anschließend Zugabe von 1 µL Proteinase K Lösung und 10 min Inkubation bei 37 °C, anschließend erfolgte die Transformation von 1 µL der Klonasereaktion in *E. coli*.

Nicht-denaturierende Agarose-Gelelektrophorese

In einem Agarosegel können Nukleinsäuren im elektrischen Feld entsprechend ihrer Größe aufgetrennt,

identifiziert und isoliert werden (Sambrook *et al.* 1989). In der Regel wurden Gele mit 1 % Agarose hergestellt. Hierfür wurde die entsprechende Menge an Agarose in 1x TAE- oder 0,5x TBE-Puffer aufgekocht, nach Abkühlung auf ca. 60 °C mit Ethidiumbromid versetzt (Endkonzentration 0,5 µg/ml) und in einen Elektrophoreseschlitten gegossen. Nach Erstarren des Gels wurde die Gelkammer mit 1x TAE- bzw. 0,5x TBE-Puffer gefüllt. Die Proben wurden vor dem Auftragen im Verhältnis 10:1 mit nativem Auftragspuffer gemischt. Die Elektrophorese erfolgte bei konstanter Spannung (5-10 V/cm). Die DNA-Banden konnten im UV-Durchlicht (254 nm) mit einer „eagle eye“-Apparatur (Stratagene) bzw. einem E-BOX Video-Dokumentationssystem (Peqlab) detektiert und auf Thermalpapier fotografisch dokumentiert werden.

Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Für die Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wurde das JETSORB®-Kit (Genomed) verwendet. Das Prinzip besteht darin, die DNA unter Hochsalzbedingungen an eine Silikatmatrix zu binden, von Verunreinigungen frei zu waschen und schließlich unter Niedrigsalzbedingungen die DNA von dieser Matrix zu eluieren. Die Isolierung wurde nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Mit dieser Methode konnten DNA-Fragmente einer Länge von 200 bp bis 5 kb aus Agarosegelen zu etwa 80 – 90% isoliert werden.

Transfer von DNA (Southern-Blot)

(Southern 1975)

Der Transfer der aufgetrennten DNA-Fragmente aus einem Agarosegel auf eine Nylonmembran erfolgte durch Kapillar-Blot. Hierbei wird die Transfer-Lösung (0,4 M NaOH) aus einem Pufferreservoir über Kapillarkräfte durch das Gel hindurch in einen auf dem Gel platzierten Stapel Papierhandtücher gesaugt. Die DNA-Fragmente werden durch den Pufferstrom aus dem Gel eluiert und binden an die darüber liegende Nylonmembran. Ein gleichmäßig verteiltes Gewicht auf dem Papierstapel garantiert eine dichte Verbindung zwischen den jeweiligen Lagen des Transfersystems. Vor dem Transfer wurde das Agarosegel 15 min in 0,25 M HCl inkubiert, um einen Teil der Purine abzuspalten, damit ein Transfer großer DNA-Fragmente erleichtert wird. Anschließend wurde das Gel für 15 min in DENAT-Lösung und 15 min in RENAT Lösung inkubiert.

Aufbau des Blots von unten nach oben:

- Whatman 3MM-Brücke zum Pufferreservoir
- Agarosegel
- Nylonmembran (Hybond N+)
- 2 Lagen Whatman 2 MM
- Stapel Papierhandtücher
- Glasplatte
- Gewicht (ca. 500g)

Der Kapillar-Blot erfolgte mindestens vier Stunden oder über Nacht. Anschließend wurde der Filter getrocknet.

Der spezifische Nachweis immobilisierter Nukleinsäuren (DIG-Protokoll):

Genspezifische Sonden wurden durch den Einbau von Digoxigenin-11-dUTP (DIG) in 0,5 – 1 µg Sonden-DNA (in 16 µl DNA + 4 µl DIG High Prime) mit dem DIG High-Prime Kit (Roche) hergestellt. Die Inkubation des Reaktionsansatzes erfolgte bei 37 °C über Nacht. Nach Fällung der Sonden-DNA mit 2,5 µl 4M LiCl und 75 µl EtOH wurde das Pellet im 1 mL Hybridisierungspuffer gelöst und anschließend für 5 min bei 95°C denaturiert. Die Hybond-N+-Membranen (Amersham Pharmacia Biotech) wurden zur Absättigung der unspezifischen Bindungsstellen mit Southern-Hybridisierungspuffer für 20 min bei 65°C präinkubiert. Nach Wechsel der Hybridisierungslösung wurde die denaturierte Sonde zugegeben und über Nacht bei 65°C hybridisiert. Im Anschluss wurden die Filter für je 15 min bei 65°C mit 2xSSPE+0,1%SDS, 1xSSPE+0,1%SDS und 0,1xSSPE+0,1%SDS gewaschen. Für die Detektion wurde die Membran bei Raumtemperatur unter langsamem Schwenken in folgenden Lösungen inkubiert: fünf min DIG-Waschpuffer, 30 min DIG2-Lösung, 30 min DIG2-Antikörper-Lösung (1:15.000 Anti-Digoxigenin-Fab-Fragmente (Roche) in DIG2- Lösung) und zweimal 20 min in DIG-Waschpuffer. Danach wurde die Membran für fünf min in DIG3-Lösung äquilibriert und anschließend für fünf min in Chemilumineszenz-Lösung (1:100 CDP-Star (Roche) in DIG3-Lösung) inkubiert. Die Membran wurde luftblasenfrei in einen Plastikbeutel eingeschweißt und gemeinsam mit einem Film in einer lichtdichten Kassette verschlossen. Nach einer Expositionszeit von durchschnittlich 1-30 min wurde der Film entwickelt. Alternativ wurde die Chemilumineszenzanlage CHEMI-SMART-5100 (Peqlab) zur digitalen Aufnahme des Blots über eine CCD-Kamera durchgeführt. Mit der Software Chemi-Capt konnten digitale Aufnahmen bearbeitet oder für eine weitere Bearbeitung in Photoshop CS2 (Adobe) exportiert werden.

4.3.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR) basierte Techniken

Durch eine PCR bietet sich die Möglichkeit, definierte DNA-Bereiche selektiv zu amplifizieren. Hierfür sind zwei Oligonukleotide (Primer) nötig, von denen einer zum 3'-Bereich der gewünschten Sequenz, der andere zum Gegenstrang des 5'-Bereichs komplementär ist. Alle PCR Reaktionen wurden in einem Peltier Thermal Cycler PTC-200 (MJ Research) durchgeführt.

Standard-DNA-Protokoll

(Nach Innis 1990)

Es wurden folgende Ansätze verwendet:

100 ng	Matritzen-DNA
2 U	Taq-DNA-Polymerase
1 µl	10 mM dNTPs
0,5 µl	je Primer (50 pmol/µl)
in 50 µl	PCR-Puffer

Initiale Denaturierung:	94 °C	/ 5 min
Amplifikation: (30 Zyklen)	94 °C	/ 1 min
	x °C	/ 1 min
	72 °C	/ y min
Finale Elongation:	72 °C	/ 10 min

Die Anlagerungstemperatur x entspricht der niedrigsten Schmelztemperatur der verwendeten Oligonukleotide, die Elongationszeit y entspricht 1 Minute pro 1000 bp des zu amplifizierenden Produkts.

PHUSION®-Polymerase -Protokoll

Für die Amplifikation genomischer Fragmente von *U. maydis* oder die Amplifikation von Fragmenten, welche für Klonierungsschritte benötigt wurden, wurde die PHUSION Polymerase (Finnzymes) verwendet, welche sich durch eine hohe Prozessivität und niedrige Fehleranfälligkeit auszeichnet.

100ng	Matritzen-DNA (genomisch) bzw.
5ng	Matritzen-DNA (Plasmid)
2 U	PHUSION® DNA Polymerase
1 µl	10 mM dNTPs
0,5 µl	je Primer (50 pmol/µl)
in 50 µl	PHUSION®-Puffer

Initiale Denaturierung:	98 °C	/ 30 sec
Amplifikation: (30-33 Zyklen)	98 °C	/ 5 sec
	x °C	/ 15 sec
	72 °C	/ y sec
Finale Elongation:	72 °C	/ 7 min

Die Anlagerungstemperatur x entspricht der niedrigsten Schmelztemperatur der verwendeten Oligonukleotide + 3 °C, die Elongationszeit y entspricht 15 Sekunden pro 1000 bp des zu amplifizierenden Produkts.

PCR-vermittelte sequenzspezifische Mutagenese

Für die PCR-vermittelte sequenzspezifische Mutagenese der NLS Sequenzen von *um04342* wurden zwei sukzessive PCR-Reaktionen nach dem PHUSION®-Polymerase-Protokoll (s.o.) durchgeführt.

In der ersten Reaktion wurden folgende Subfragmente von *um04342* amplifiziert:

- 1 - 229 bp Fragment mit attB1_um04342 und um04342-dNLS1_5; Annealing-Temperatur 57 °C
- 2 - 3177 bp Fragment mit um04342-dNLS1_5 und um04342_attB2; Annealing-Temperatur 65 °C
- 3 - 1696 bp Fragment mit attB1_um04342 und um04342-dNLS2_5; Annealing-Temperatur 65 °C
- 4 - 1713 bp Fragment mit um04342-dNLS2_5 und um04342_attB2; Annealing-Temperatur 65 °C
- 5 - 2749 bp Fragment mit attB1_um04342 und um04342-dNLS3_5; Annealing-Temperatur 59 °C
- 6 - 660 bp Fragment mit um04342-dNLS3_5 und um04342_attB2; Annealing-Temperatur 65 °C
- 7 - 1485 bp Fragment mit um04342-dNLS1_3 und um04342-dNLS2_5; Annealing-Temperatur 65 °C
- 8 - 1074 bp Fragment mit um04342-dNLS2_3 und um04342-dNLS3_5; Annealing-Temperatur 60 °C

Bei der Mutation einer NLS umfasste das erste PCR Fragment den 5'- und das zweite Fragment den 3'-Bereich der mutierten Sequenz. Für die Mutation aller drei NLS Sequenzen wurden insgesamt vier Subfragmente generiert. Eine schematische Darstellung der verwendeten Oligonukleotide und amplifizierter Subfragmente findet sich in Anhang 6.7. Für die Amplifikation der Subfragmente wurde folgendes Protokoll verwendet:

5ng	Matritzen-DNA (pKPH26)
2 U	PHUSION® DNA Polymerase
1 µl	10 mM dNTPs
0,5 µl	je Primer (50 pmol/µl)
in 50 µl	PHUSION®-Puffer

Initiale Denaturierung:	98 °C	/ 30 sec
Amplifikation: (30 Zyklen)	98 °C x °C 72 °C	/ 5 sec / 15 sec / y sec
Finale Elongation:	72 °C	/ 7 min

Die Anlagerungstemperatur x entspricht der angegebenen Annealing-Temperatur der verwendeten Oligonukleotide, die Elongationszeit y entspricht 15 Sekunden pro 1000 bp des zu amplifizierenden Produkts. Gewonnene Fusionsprodukte wurden Gelelektrophoretisch aufgetrennt und nach Protokoll reisoliert. Die Fusion der generierten Subfragmente zu einem Vollängenkonstrukt wurde ebenfalls über eine PCR-Reaktion vermittelt. Hierfür wurden alle benötigten Subfragmente in äquimolaren Mengen als Template in einer PHUSION®-PCR-Reaktion fusioniert. Für mutNLS1 wurden die Fragmente 1 und 2 eingesetzt, für mutNLS2 wurden die Fragmente 3 und 4 eingesetzt, für mutNLS3 wurden die Fragmente 5 und 6 eingesetzt und für die Fusion von mutNLS123 wurden die Fragmente 1, 6, 7 und 9 eingesetzt. Für die Amplifikation der Subfragmente wurde folgendes Protokoll verwendet:

100ng	pro Subfragment
2 U	PHUSION® DNA Polymerase
1 µl	10 mM dNTPs
0,5 µl	je Primer (50 pmol/µl)
in 50 µl	PHUSION®-Puffer
Initiale Denaturierung:	98 °C / 30 sec
Amplifikation: (30-33 Zyklen)	98 °C / 5 sec 67 °C / 15 sec 72 °C / y sec
Finale Elongation:	72 °C / 7 min

4.3.4 Techniken zur mRNA Analyse

RNA-Aufreinigung nach RNeasy-Protokoll

100 µl gelöste RNA wurde mit 350 µl Puffer RLT und 250 µl 100% EtOH gemischt. Dieser Ansatz wurde auf eine RNeasy-Säule pipettiert und für 15 sec bei 10.000 Upm und RT zentrifugiert. Nach Zugabe von 500 µl Puffer RPE wurde die Säule erneut für 15 sec bei 10.000 Upm und RT zentrifugiert. Dieser Schritt wurde einmal wiederholt. Anschließend wurde die Säule zur Trocknung der Matrix erneut für zwei min bei 10.000 Upm zentrifugiert. Zur Elution der RNA wurden 30 µl RNase-freies Wasser (Ambion) auf die Matrix pipettiert und die Säule für 1 min bei 10.000 Upm zentrifugiert. Das Eluat wurde für eine Wiederholung dieses Schrittes eingesetzt. Diese Methode orientiert sich am Protokoll

Gewonnene PCR Fragmente wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt, nach Protokoll isoliert und dann mittels GATEWAY®-Klonierung in den Vektor pDONR221 kloniert.

QuikChange®-PCR-Mutagenese

Für die sequenzspezifische Mutagenese von Plasmiden wurde das QuikChange® Site-directed Mutagenesis Kit (Stratagene) verwendet. Die Eigenschaften der Mutagenese-Oligonukleotide wurden nach Herstellerangaben gewählt, sämtliche PCR-Reaktionsparameter nach Protokoll durchgeführt (siehe QuikChange® Site-Directed Mutagenesis Kit Instruction Manual, Catalog #200519 Revision A).

Sequenzierung von DNA

Sämtliche Sequenzierungen von DNA wurden vom Sequencing Service Department der Ludwig-Maximilian-Universität München nach dem Cycle, Clean & Run Protokoll durchgeführt. Für Sequenzierungen wurde Plasmid DNA verwendet, die mit dem Roti®-Prep Plasmid MINI Kit (Carl Roth) isoliert wurde.

Es wurden folgende Ansätze verwendet:

150-300 ng	Matritzen-DNA
1 µl	Sequenzieroligo (5 pmol/µl)
ad 7 µL	10 mM Tris/HCl, pH 8,5

Die erhaltenen Sequenz-Rohdaten konnten zur weiteren Bearbeitung in CloneManager 9.0 (Sci-Ed Software) importiert werden.

der Firma Qiagen; die genaue Zusammensetzung der verwendeten Puffer geht aus dem Protokoll hervor.

Ligation eines RNA Oligos an mRNA für die Bestimmung von mRNA Enden

Die Isolierung der cDNAs erfolgte mit dem GeneRacer Kit (Invitrogen) und dem SuperScript III Supermix (Invitrogen) nach Herstellerangaben. Als Matrize wurde RNA aus Tumorgewebe 5 dpi verwendet.

Für die reverse Transkription wurde zunächst die isolierte Gesamt-RNA mit Turbo DNase I (Ambion) behandelt, um DNA-Kontaminationen zu entfernen. Es folgte die Dephosphorylierung:

7 µL	RNA (20 µg/µL)
1 µL	10x CIP Buffer
1 µL	RNase Out (40 U/µL)
1 µL	CIP (10 U/µL)

Der Ansatz wurde für 1 h bei 50 °C inkubiert, es folgte die Zugabe von 90 µL Nuklease-freiem H₂O (Ambion) und 100 µL einer Mischung aus gleichen Teilen Aqueous Phenol (Carl Roth) und Chloroform. Es wurde kräftig gemischt, die Phasentrennung erfolgte durch Zentrifugation (13.000 Upm, 5 min, Heraeus Biofuge 15). Die obere wässrige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Durch Addition von 2 µL Glykogen, 10 µL 3 M NaAc, 220 µL 95% EtOH und eine 10 min Inkubation bei -80 °C wurde die RNA gefällt und durch 10 min Zentrifugation bei 14.000 Upm und 4 °C (Eppendorf Centrifuge 5417R) pelletiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet mit 500 µL 75 % EtOH gewaschen und erneut zentrifugiert. Nach Entfernen des Überstands wurde das Pellet zwei min bei RT getrocknet und in 7 µL Nuklease-freiem Wasser resuspendiert.

Es folgte das Entfernen der 5'-Cap-Struktur der mRNA:

7 µL	dephosphorylierte RNA
1 µL	10x TAP Buffer
1 µL	RNase Out
1 µL	TAP (0,5 U/µL)

Der Ansatz wurde für 1 h bei 37 °C inkubiert, es folgte die Präzipitation der RNA wie zuvor beschrieben. Die präzipitierte RNA wurde in 7 µL Nuklease-freiem Wasser resuspendiert.

Es folgte die Ligation des RNA Oligos:

7 µL dephosphorylierte, decapped-RNA wurde in ein Reaktionsgefäß mit voraliquotiertem RNA-Oligo transferiert, es folgte eine fünf-minütige Inkubation bei 65 °C. Der Ansatz wurde auf 4 °C abgekühlt; es wurden anschließend hinzugefügt:

+1 µL	10x Ligase Buffer
+1 µL	10 mM ATP
+1 µL	RNase Out
+1 µL	T4 RNA Ligase

Der Ansatz wurde 1 h bei 37 °C inkubiert, es folgte eine erneute Präzipitation mit Phenol/Chloroform wie beschrieben, das Pellet wurde in 6 µL Nuklease-freiem Wasser resuspendiert.

Anschließend erfolgte die Erststrangsynthese nach dem SuperScript III Supermix (Invitrogen) Protokoll.

Erststrangsynthese für die Bestimmung von mRNA Enden

Für die Erststrangsynthese wurden nach dem Herstellerprotokoll des SuperScript III Supermix (Invitrogen) vorgegangen.

6 µL	RNA aus der RNA-Oligo-Ligation (s.o.)
1 µL	d(T) Primer (aus RACE Core Kit, Invitrogen)
1 µL	Annealing Buffer

Inkubation für fünf min bei 65 °C, dann

+ 10 µL	2x First Strand Reaction Mix
+2 µL	SuperScript / RNase Out Enzyme Mix

Der Ansatz wurde 1 h bei 50 °C inkubiert, dann folgte eine Hitzeinaktivierung für fünf min bei 85 °C und Abkühlung auf 4 °C. Die Erststrangsynthese der cDNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

Zweitstrangsynthese für die Bestimmung von mRNA Enden

Für die Zweitstrangsynthese der cDNA für die Bestimmung der mRNA Enden wurde eine 2-Step-PCR-Reaktion durchgeführt, dies bedeutet, dass dem Denaturierungs-Schritt direkt der Elongations-Schritt folgt. Drei PCR-Ansätze wurden erstellt:

Amplifikation des 5'-cDNA-Endes

3 µL	GeneRacer 5'-Oligo (10 µM)
1 µL	um04342RACE5' (10 µM)
1 µL	Erststrang-cDNA
10 µL	5x PHUSION Buffer HF
1 µL	10 mM dNTPs
0,5 µL	PHUSION HF Polymerase
ad. 50 µL	H ₂ O bid.

Amplifikation des 3'-cDNA-Endes

3 µL	GeneRacer 3'-Oligo (10 µM)
1 µL	um04342RACE3' (10 µM)
1 µL	Erststrang-cDNA
10 µL	5x PHUSION Buffer HF
1 µL	10 mM dNTPs
0,5 µL	PHUSION HF Polymerase
ad. 50 µL	H ₂ O bid.

Kontrollreaktion

3 µL	um04342RACEctrl_for (10 µM)
1 µL	um04342RACEctrl_rev (10 µM)
1 µL	Erststrang-cDNA
10 µL	5x PHUSION Buffer HF
1 µL	10 mM dNTPs
0,5 µL	PHUSION HF Polymerase
ad. 50 µL	H ₂ O bid.

Reaktionsparameter:

Initiale Denaturierung:	98 °C	/ 30 sec
Amplifikation:	98 °C	/ 30 sec
(30 Zyklen)	72 °C	/ 45 sec
Finale Elongation:	72 °C	/ 7 min

Nach der PCR-Reaktion wurden jeweils 5 µL der drei Reaktionen gelelektrophoretisch aufgetrennt, um den Erfolg der PCR zu überprüfen. Bei den Amplifikationsreaktionen von 5'- und 3'-Enden muss an dieser Stelle noch kein erkennbares Produkt zu sehen sein, das Kontrollfragment aus der Kontrollreaktion war jedoch zu beobachten.

Es folgte eine „Nested-PCR“- um durch Amplifikatinterne Primer eine spezifische Anreicherung der 5'- und 3' Bereiche zu gewährleisten:

Amplifikation des 5'-cDNA-Endes

3 µL	5'-Amplifikation (s.o.)
1 µL	GeneRacer 5'-nested Oligo (10 µM)
1 µL	um04342RACE5'n (10 µM)
10 µL	5x PHUSION Buffer HF
1 µL	10 mM dNTPs
0,5 µL	PHUSION HF Polymerase
ad. 50 µL	H ₂ O bid.

Amplifikation des 3'-cDNA-Endes

3 µL	5'-Amplifikation (s.o.)
3 µL	GeneRacer 3'-nested Oligo (10 µM)
1 µL	um04342RACE3'n (10 µM)
10 µL	5x PHUSION Buffer HF
1 µL	10 mM dNTPs
0,5 µL	PHUSION HF Polymerase
ad. 50 µL	H ₂ O bid.

Reaktionsparameter:

Initiale Denaturierung:	98 °C	/ 30 sec
Amplifikation: (30 Zyklen)	98 °C / 30 sec 72 °C / 45 sec	
Finale Elongation:	72 °C	/ 7 min

Nach der erfolgreichen Amplifikation der 5'- und 3'-cDNA-Enden wurde diese auf einem Agarosegel aufgetrennt, distinkte Banden im Bereich der erwarteten Größe wurden aufgereinigt, in pCRII-TOPO (Invitrogen) kloniert und sequenziert (siehe Anhang 6.8).

4.3.5 Generierung einer cDNA Bank

Reverse Transkription für die Erstellung einer cDNA Bank

(In-Fusion SMARTer Protokoll)

Die Generierung von ds cDNA erfolgte mit dem In-Fusion™ SMARTer™ cDNA Library Construction Kit (Takara Clontech) nach Herstellerangaben. Als Matrize diente die aus Filamenten auf hydrophoben Oberflächen

Reverse Transkription für die Real-Time-PCR

Für die reverse Transkription wurde zunächst die isolierte Gesamt-RNA mit Turbo DNase I (Ambion) behandelt, um DNA-Kontaminationen zu entfernen. Hierbei wurde nach Herstellerprotokoll vorgegangen (siehe Herstellerprotokoll TURBO DNA-free™ Kit). Für die reverse Transkription wurde das ProtoScript AMV First Strand cDNA Synthesis Kit (NEB) nach Herstellerprotokoll verwendet. Für die reverse Transkription von Gesamt-RNA, die aus Pilzkulturen und Tumormaterial extrahiert wurde, wurden 0,5-1 µg DNase-behandelter RNA eingesetzt und zusammen mit Oligo d(T)20-Primern, den entsprechenden Puffern und Enzymgemischen (Details, siehe Herstellerprotokoll) für die Erststrang-cDNA-Synthese bei 50°C für 50 min inkubiert.

Real-Time-PCR (qRT-PCR)

Für Real-time PCR Analysen wurde das MESA GREEN qPCR Master Mix plus for SYBR Assay +Fluorescein Kit (Eurogentech) verwendet und nach Herstellerangaben durchgeführt. Für die PCR Reaktion wurden 2-5 µl der synthetisierten cDNA eingesetzt (s.o.). Die Reaktionen erfolgten auf einem Bio-Rad-iCycler-System unter der Verwendung des folgenden Programms:

Initiale Denaturierung:	95 °C	/ 7 min
Amplifikation: (45 Zyklen)	95 °C / 30 sec 60 °C / 20 sec 72 °C / 40 sec	

Im Anschluß hieran wurde die Spezifität der Amplifikation anhand einer Schmelzkurve am BioRad-iCycler-System überprüft. Zur Kalkulation des CT-Wertes (Threshold Cycle), der den Wert bzw. Zyklus beschreibt, bei dem die Fluoreszenz zum ersten Mal signifikant über die Hintergrundfluoreszenz steigt, wurde die BioRad-Software Version 3.0a verwendet. Die Berechnung der relativen Expressionswerte erfolgte mit dem Program Bio-Rad Gene Expression Macro der Firma Biorad.

isolierte RNA. Diese wurde vor der Synthesereaktion nach dem RNeasy-Protokoll aufgereinigt (s.o.).

Erststrangsynthese:

3,5 µl	RNA (56 ng/µl)
1 µl	3' SMART CDS Primer IIA (12 µM)

Dieser Ansatz wurde für drei min bei 72 °C und für zwei min bei 42 °C inkubiert, anschließend wurden hinzugefügt:

2 µl	First Strand Buffer
0,25 µl	DTT
1 µL	dNTP Mix
1 µL	SMARTer II A Oligonucleotide (12 µM)
0,25 µL	RNase Inhibitor
1 µL	SMARTScribe Reverse Transcriptase (100 U)

Die Erststrangsynthesereaktion wurde anschließend für 90 min bei 42 °C inkubiert und die resultierende ss cDNA anschließend bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

Zweistrangsynthese:

Für die Zweitstrangsynthese wurde nach dem LD („long distance“)-PCR-Protokoll des In-Fusion™ SMARTer™ cDNA Library Construction Kit (Takara Clontech) nach Herstellerangaben verfahren. Es wurden zwei Synthesereaktionen angesetzt:

2 Reaktionsansätze mit jeweils:

2µl	ss cDNA
82 µl	H ₂ O bid.
10 µl	10x Advantage 2 PCR Buffer
2 µl	50x dNTP Mix (10 µM)
2 µL	5' PCR Primer II A
2 µl	50x Advantage 2 Polymerase Mix

Die Parameter für die Amplifikation waren:

Initiale Denaturierung:	95 °C / 1 min
Amplifikation:	95 °C / 15 sec
(15 Zyklen)	65 °C / 30 sec
	68 °C / 6 min
abkühlen auf	4 °C

Nun wurden die Reaktionsansätze aufgeteilt, von beiden Reaktionsgefäßen wurde ein 30 µL Aliquot für die Optimierungsreaktion entnommen, die restlichen 70 µL wurden bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C inkubiert. Für die Optimierungsreaktion wurden 5 µL des 30 µL Ansatzes für eine gelelektrophoretische Analyse entnommen und bei 4 °C inkubiert, die restlichen 25 µL wurden erneut drei Reaktionszyklen unterzogen:

Amplifikation:	95 °C / 15 sec
(3 Zyklen)	65 °C / 30 sec
	68 °C / 6 min
abkühlen auf	4 °C

Wiederum wurden 5 µL für eine gelelektrophoretische Analyse entnommen, die restlichen 20 µL weiteren drei Reaktionszyklen ausgesetzt. Dieser Vorgang wurde solange wiederholt, bis eine Gesamtzahl von 27

Reaktionszyklen erreicht war. Die erhaltenen Proben (jeweils 5 µL der Reaktionen mit 15, 18, 21, 24 und 27 Zyklen) wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt, um eine optimale Anzahl von Reaktionszyklen zu bestimmen (siehe Abbildung 47). Die verbliebenen 70 µL Reaktionsvolumen wurden nun weiteren drei Zyklen der Parameter ausgesetzt, um die optimale Anzahl von 18 Reaktionszyklen zu erreichen. Bis zur weiteren Verwendung wurde diese ds cDNA bei -20 °C aufbewahrt.

ds cDNA Aufreinigung und Größenfraktionierung (CHROMA SPIN™ Säulenaufreinigung)

Für die Aufreinigung und Größenfraktionierung wurden die CHROMA SPIN DEPC-1000 Säulen des In-Fusion™ SMARTer™ cDNA Library Construction Kit (Takara Clontech) nach Herstellerangaben verwendet.

Zuerst wurde die CHROMA SPIN Säule mehrmals invertiert, um die Gelmatrix zu resuspendieren. Die Säule wurde oben und unten geöffnet und in ein 2 mL Reagiergefäß überführt. Es wurde fünf min bei 700 g in einem Ausschwingrotor zentrifugiert (Heraeus Biofuge stratos) um den Äquilibriumspuffer aus der Säulenmatrix zu entfernen, der Durchfluss wurde verworfen. 85 µL der ds cDNA wurden nun auf die Säulenmatrix gegeben und fünf min bei 500 g im Ausschwingrotor zentrifugiert (Heraeus Biofuge stratos). Es folgte die Präzipitation der gereinigten ds cDNA durch Zugabe von 1,5 µL Glykogen (20 µg/µl), 10 µL 3 M NaAc sowie 250 µL eiskaltem 100% EtOH zu dem Säulendurchfluss und einer anschließenden Inkubation bei -20 °C für 1 h. Für die Fällung wurde anschließend 20 min bei 13.000 Upm und RT (Heraeus Biofuge pico) zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde mit 100 µL 70 % EtOH gewaschen, erneut für fünf min bei 13.000 Upm und RT (Heraeus Biofuge pico) zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde 10 min bei RT getrocknet und in 15 µL TE Puffer (pH 8,0) resuspendiert. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte an einem Nanodrop-ND1000-Spektralfotometer. Die aufgereinigte ds cDNA wurde bis zu ihrer weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

In-Fusion Klonierung von SMARTer ds cDNA

Die Klonierung SMART-kompatibler ds cDNA erfolgte mit dem In-Fusion™ SMARTer™ cDNA Library Construction Kit (Takara Clontech) nach Herstellerangaben. Als Empfängervektor diente pKPH44, der zuvor durch Ausschneiden von *gfp* durch NsiI linearisiert wurde.

Eine typische In-Fusion Klonierungsreaktion umfasste:

2 µl	5x In-Fusion Reaction Buffer
2 µl	linearisierter Vektor (150 ng/µl)
3-5 µl	ds cDNA (aufgereinigt, 150 ng/µl)
ad 10 µl	H ₂ O bid.

Nach Mischen der Inhalte wurde 15 min bei 37 °C und 15 min bei 50 °C inkubiert, anschließend wurde die Reaktion auf 4 °C herabgekühlt. Es wurden 90 µL H₂O bid., 1,5 µL Glykogen (20 µg/µl) und 280 µL 100% EtOH hinzugefügt, kurz gevortext und die Fällung wurde für 1-2 h bei -80 °C durchgeführt. Anschließend wurde 20 min bei 13.000 Upm (Heraeus Biofuge pico) zentrifugiert, der Überstand verworfen, das Pellet fünf min bei RT getrocknet und anschließend in 10 µL H₂O bid. resuspendiert. Die Reaktionsprodukte wurden anschließend durch Elektroporation in *E. coli* transformiert.

GATEWAY®-Modifikations-PCR

Für die Modifikation der ds cDNA wurden spezielle Oligonukleotide synthetisiert, welche die Sequenzen der GATEWAY® Klonierungsstellen enthalten. Aufgrund der repetitiven Bereiche der SMART-Klonierungsstellen der cDNA ist die Bindung des Primers 5'SMART attB1 sowohl im 3' als auch im 5' Bereich der ds cDNA möglich. Aus diesem Grund wurde zuerst eine lineare Amplifikation mit dem 3'SMART attB2 Primer durchgeführt, welcher nur im 3'-Bereich der ds cDNA binden kann.

100 ng	ds cDNA aus der Zweitstrang-Synthesereaktion
1 U	PHUSION DNA Polymerase
0,5 µl	10 mM dNTPs
0,5 µl	Oligo(dT)-Primer 3'SMART attB2 (12,5 pmol/µl)
in 25 µl	PHUSION®-Puffer

Initiale Denaturierung:	98 °C	/ 30 sec
Lineare Amplifikation:	98 °C	/ 10 sec
(5 Zyklen)	63 °C	/ 15 sec
	72 °C	/ 90 sec

Anschließend abgekühlt auf 4 °C

An dieser Stelle wurde dem PCR Ansatz der zweite Primer 5'SMART attB1 hinzugefügt (0,5 µl; 12,5 pmol/µl) und so die exponentielle Amplifikation eingeleitet.

Exponentielle Amplifikation:	98 °C	/ 10 sec
(5 Zyklen)	56 °C	/ 15 sec
	72 °C	/ 90 sec
Sofort auf	4 °C	

GATEWAY®-ATG-Mutagenese-PCR

Für die Mutation des ATG Startcodons wurde eine abgewandelte Form der GATEWAY®-Modifikations-PCR angewendet. Als Matrizen-DNA diente die cDNA-Bank im Plasmidhintergrund pDONR221; für die Polymerasereaktion wurde die Phusion® Hot Start High Fidelity Polymerase (Finnzymes) verwendet, um ein 3'-

Exonuklease-vermitteltes Entfernen der mutierten Sequenz im Oligonukleotid durch die Polymerase zu minimieren. Auf den linearen Amplifikationsschritt wurde verzichtet.

Insgesamt 12 Reaktionen á:

35 ng	pDONR221-Genbank
1 U	PHUSION DNA Polymerase
0,5 µl	10 mM dNTPs
0,5 µl	Oligo(dT)-Primer 3'SMART attB2 (50 pmol/µl)
0,5 µl	Primer 5'SMART attB1 (50 pmol/µl)
in 25 µl	PHUSION®-Puffer

Initiale Denaturierung:	98 °C	/ 30 sec
Amplifikation:	98 °C	/ 10 sec
(10 Zyklen)	56 °C	/ 15 sec
	72 °C	/ 90 sec
Sofort auf	4 °C	

Die DNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

Transformation der GATEWAY-modifizierten Genbank in *E. Coli*

Es wurde folgender Reaktionsansatz für die BP Klonierung der cDNA verwendet:

7 µL	GATEWAY-cDNA (70 ng)
1 µL	pDONR221 (150 ng)
2 µL	BP Clonase Mix II

Inkubation geschah ün bei 25 °C, dann folgte Proteinase K inaktivierung nach Protokoll (Invitrogen) und eine Verdünnung durch Addition von 30 µL H₂O bid. Die Transformation der Genbank durch Elektroporation in den *E. coli*-Stamm ElectroMAX™ DH5α-E™ erfolgte wie in 4.2.1 beschrieben. Der komplette Ansatz wurde hierbei in 360 µL elektrokompetente Zellen transformiert, es folgte eine Inkubation in 20 mL S.O.C. für 1 h bei 37 °C, dann wurden weitere 30 mL S.O.C. hinzugegeben und 25 µg/mL Kanamycin eingestellt, anschließend 8 h bei 37 °C schüttelnd inkubiert. Eine Verdünnungsreihe wurde erstellt, der **Titer** von **pDONR221-cDNA-Insert** entsprach **7,5 x 10⁵ cfu**.

Es folgte eine Plasmidpräparation der Kultur mittels dem peqGOLD XChange Plasmid Midi Kit (PeqLab) nach Herstellerangaben präpariert, es wurden 100 µL pDONR221-cDNA-Insert Plasmid-DNA mit einer Konzentration von **175 ng/µL** erhalten.

Es wurde folgender Reaktionsansatz für die LR Klonierung der pDONR221-cDNA verwendet:

1 µL	pDONR221-cDNA-Insert Plasmid-DNA (175 ng)
1 µL	pKPH48 (150 ng)
6 µL	TE-Puffer (pH 8,0)
2 µL	LR Clonase Mix II

Inkubation geschah üN bei 25 °C, dann folgte Proteinase K Inaktivierung nach Protokoll (Invitrogen) und eine Verdünnung durch Addition von 30 µL H₂O bid. Die Transformation der Genbank durch Elektroporation in den *E. coli*-Stamm ElectroMAX™ DH5α-E™ erfolgte wie in 4.2.1 beschrieben. Der komplette Ansatz wurde hierbei in 360 µL elektrokompente Zellen transformiert, es folgte eine Inkubation in 20 mL S.O.C. für 1 h bei 37 °C. Es wurde eine Verdünnungsreihe erstellt, um den Titer zu bestimmen, und diese auf dYT-Amp Platten ausplattiert und üN bei 37 °C inkubiert. Es ergab sich für die Plasmidbank **pKPH48-cDNA-Insert** ein **Titer** von **1 x 10⁶**. Die Kultur wurde in 230 mL dYT-Amp überimpft und üN bei 37 °C schüttelnd inkubiert.

Von diesem Ansatz wurden 10 x 1 mL entnommen, in ein Cryo-Röhrchen (Nalgene) überführt und mit NSY-Glyzerin versetzt. Nach einer 15 min Inkubation bei RT wurde diese Stammhaltung mit **KPHECL1** beschriftet, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

Es folgte eine Plasmidpräparation der verbliebenen Kultur mittels dem peqGOLD XChange Plasmid Midi Kit (PeqLab) nach Herstellerangaben präpariert, es wurden 100 µL pDONR221-cDNA-Insert Plasmid-DNA mit einer Konzentration von ~2 µg/µL erhalten.

Diese diente der Transformation in *S. cerevisiae*.

Transformation der mutierten Genbank in *E. Coli*

Es wurde folgender Reaktionsansatz für die BP Klonierung der mutierten cDNA verwendet:

1,25 µL	^Δ ATG-cDNA (150 ng)
1 µL	pDONR221 (150 ng)
2 µL	BP Clonase Mix II

Alle weiteren Schritte wurden analog zur Transformation der GATEWAY-modifizierten Genbank durchgeführt.

Konzentration des präparierten Plasmids **pDONR221-^ΔATG-cDNA-Insert** war 530 ng/µL, der Titer entsprach **1,7 x 10⁷ cfu**.

Konzentration des präparierten Plasmids **pKPH48-^ΔATG-cDNA-Insert** war 2,5 µg/µL, der Titer entsprach **8 x 10⁶ cfu**. Diese wurde für die Transformation in *S. cerevisiae* verwendet. Die Stammhaltung dieses Plasmids trägt den Namen **KPHECL2**.

Transformation der Genbank in *S. cerevisiae*

Transformation der Genbanken in *S. cerevisiae* YHUM0924 geschah wie in 4.2.3 beschrieben.

Die Transformation von **pKPH48-cDNA-Insert** brachte einen **Titer** von **5,8 x 10⁶ cfu**. Die bei -80 °C gelagerte Stammhaltung trägt den Namen **KPHYL1**.

Die Transformation von **pKPH48--^ΔATG-cDNA-Insert** brachte einen **Titer** von **1 x 10⁵ cfu**. Die bei -80 °C gelagerte Stammhaltung trägt den Namen **KPHYL1**.

Erstellung eines Kontrollstammes für die *S. cerevisiae*-Genbank Expression

Für die Kontrolle der Genexpression wurde das Plasmid pKPH124 in den Stammhintergrund YHUM0924 transformiert. Der Resultierende Stamm wurde **KPHY01** genannt.

4.4 Flusskammersystem

4.4.1 Bestimmung der Flussrate der verwendeten Peristaltikpumpe

Die Regelung der Peristaltikpumpe (Pharmacia LKB Pump P-1) geschieht über einen stufenlos verstellbaren Drehregler, dessen Skalenteile von 1-10 reichen. Die Flussrate ist abhängig von der Umdrehungszahl der Peristaltikpumpe, welche über den Drehregler gesteuert wird, sowie vom Innendurchmesser des verwendeten Pumpenschlauchs. Es wurde ein Silikon-Pumpenschlauch mit Außendurchmesser 4 mm, Innendurchmesser 2 mm und 60 Shore Härte (Carl Roth) verwendet. Für jede der 10 Stufen der Peristaltikpumpe wurde nun das gepumpte Wasservolumen über den Zeitraum von 1 min bestimmt. Die erhaltenen Werte wurden in ein Diagramm eingetragen und die volumetrische Flussrate (ml/sec) in Abhängigkeit der eingestellten Stufe wurde ermittelt. Die experimentell bestimmte Änderung der Flussrate zwischen zwei Teilstrichen betrug im Mittel 7,7 $\mu\text{l}/\text{sec}$ mit einer maximalen Flussrate von 77 $\mu\text{l}/\text{sec}$ beim 10. Skalenstrich (siehe Abbildung 37).

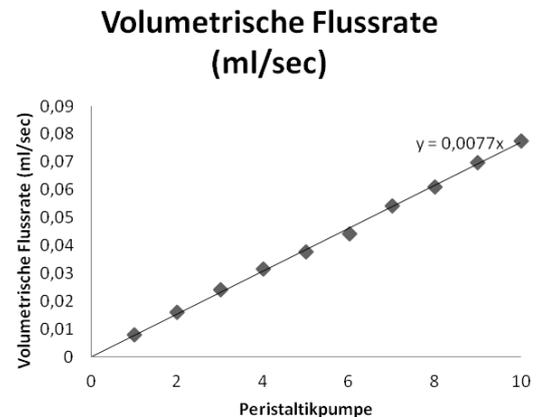


Abbildung 37: Bestimmung der volumetrischen Flussrate in ml/sec in Abhängigkeit der eingestellten Pumpenstufe. Für jede der 10 Pumpenstufen wurde die volumetrische Flussrate durch Bestimmung des in einer Minute gepumpten Volumens an H_2O ermittelt.

4.4.2 Assemblierung des Flusskammersystems

Die kommerziell erhältliche Flusskammer „Parallel Plate Flow Chamber“ (Glycotech) besteht aus einem Kunststoffdeck, welches eine kreisrunde Aussparung für die Bildung des Vakuums, zwei kleine Aussparungen für die Gummidichtung sowie drei Öffnungen besitzt, welche die Applikation bzw. den Ablauf des Mediums sowie das Anlegen des Vakuums ermöglichen. Hinzu kommen vier Gummidichtungen mit unterschiedlich großen Aussparungen, diese stellen den Bereich des laminaren Flusses dar.

Vor der ersten Verwendung wurden die mitgelieferten Schraubverbindungen mit etwas PTFE-Folie (mitgeliefert) umwickelt und in die dafür vorgesehenen Öffnungen im Flusskammerdeck mit moderater Kraft hineingedreht. Die Schraubverbindungen wurden zwischen den Versuchen nicht entfernt.

Für alle Versuche wurde die Gummidichtung D gewählt (Zusammenfassung der Dichtungsgrößen siehe Tabelle 1). Um größtmögliche Sterilität zu gewährleisten, wurden alle Assemblierungsschritte unter einer Sterilbank (Hereaus Herasafe) durchgeführt. Zur Assemblierung des Flusskammersystems wurde die Gummidichtung auf ein ausgebreitetes Präzisionstuch (Kimtech Science) gelegt und die Flusskammer mit moderatem Druck auf die Gummidichtung gepresst, dabei sollten die

Gumminoppen der Gummidichtung in die Aussparungen des Kunststoffdecks einpassen. Die assemblierte Flusskammer wurde umgedreht, mit einem mit 70% EtOH getränkten Präzisionstuch abgewischt.

Nun wurde abhängig von der zu untersuchenden Oberfläche wie folgt verfahren:

(a) Für PS-Adhäsionsversuche wurde die assemblierte Flusskammer einfach mit moderatem Druck in die Aussparung einer sterilen 6-Well-platte (Orange Scientific) eingebracht.

(b) Für PTFE-Adhäsionsversuche wurde ein steriles kreisrundes Stück PTFE vorsichtig mit einer sterilen Pinzette deckend auf die Gummidichtung aufgebracht. Die kreisrunden PTFE-Stücke wurden zuvor aus einer PTFE-Platte (0,25 mm; Norton Fluorplast) mit einem Durchmesser von 3,3 cm ausgeschnitten und zwischen zwei Glasplatten autoklaviert, um eine Verformung zu vermeiden. PTFE-Oberflächen sind sehr Kratzeranfällig, weshalb eine behutsame Handhabung notwendig ist.

Das vollständig assemblierte Flusskammersystem aus Flusskammerdeck und Gummidichtung saß nun auf der gewählten Kunststoffoberfläche (siehe Abbildung 38) und konnte auf dem Mikroskopisch eines inversen Mikroskops (Zeiss Axiovert 135) fixiert werden.

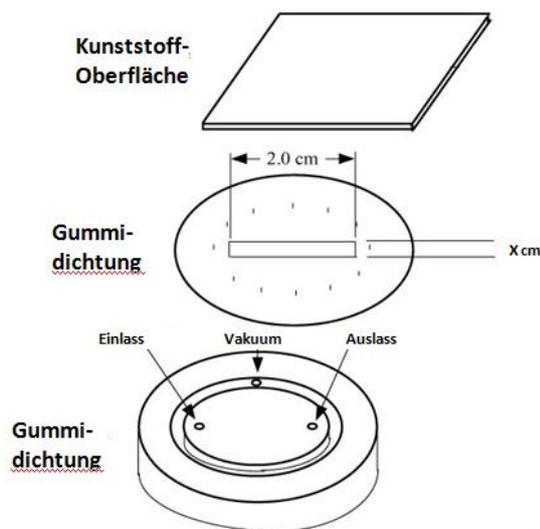


Abbildung 38: Schematische Darstellung der Flusskammer. Die Flusskammer besteht aus dem Flussdeck (unten) mit den Öffnungen für das Vakuum sowie Ein- und Auslass für die entstehende Kammer. Darauf wird die Gummidichtung (mitte) aufgebracht, hierdurch entsteht der als Flusskammer definierte Hohlraum, zum Abschluss des Systems führt eine frei wählbare Kunststoffoberfläche (oben). Die Breite des Hohlraums (x) kann durch Wahl unterschiedlicher Gummidichtungen bestimmt werden.

Über die Schraubverbindungen an der Oberseite des Flussdecks wurden nun die Öffnungen für Ein- und Auslass über ein Schlauchsystem aus Laborschläuchen (Silastic® Laboratory Tubing, Glycotech, 1,58 mm Innendurchmesser, 3,175 mm Außendurchmesser, mitgeliefert) mit Peristaltikpumpe und Abfall verbunden. Für die Verbindung mit der Peristaltikpumpe wurde der Silikonschlauch der Pumpe direkt über den Laborschlauch des Silastic® Laborschlauches gestülpt und mit etwas Parafilm M® abgedichtet, so war kein Verbindungsstück nötig. Die Verbindung zum Abfallgefäß wurde über ein Luer-Lock-Verbindungsstück (Carl-Roth) hergestellt, welches in ein in den Deckel eines 50 mL Reagiergefäßes (Greiner) hineingeschnittenes Loch fixiert wurde. Der Boden des 50 mL Gefäßes wurde ebenfalls entfernt und in eine 1 L Weithalsflasche (Schott) gesteckt. Die Verbindung der Vakuumöffnung der Flusskammer mit der Membran-Vakuumpumpe erfolgte ebenfalls mit einem Silikon-Pumpenschlauch mit Außendurchmesser 4 mm, Innendurchmesser 2 mm und 60 Shore Härte (Carl Roth).

Ein Diagramm des Flusskammersystems findet sich in Abbildung 39.

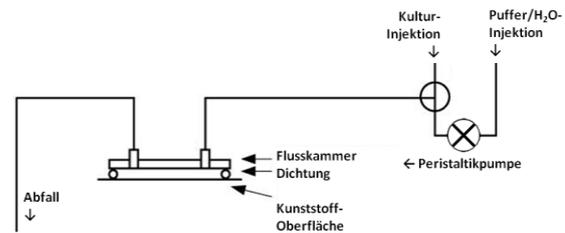


Abbildung 39: Schematische Darstellung des Flusskammersystems. Das offene Pufferreservoir besteht aus einer 25 mL Spritze ohne Kolben und befindet sich am Anfang des Schlauchsystems. Das Schlauchsystem läuft durch eine Peristaltikpumpe, welche den laminaren Fluss erzeugt. Es folgt ein T-Stück mit dem Luer-Lock-Anschluss für die Injektion einer Kultur über eine 1 mL Spritze. Die Flusskammer ist in Abbildung 38 mit ihren Anschlüssen beschrieben. Am Ende des Systems befand sich das Abfallbehältnis.

Nach Anschließen aller Schlauchverbindungen wurde eine 25 mL Spritze (Therumo) ohne Kolben als Pufferreservoir an eine Luer-Lock-Schlauchverbindung (Carl Roth) vor der Peristaltikpumpe angeschlossen und an der Laborbank mit der Öffnung nach oben befestigt. Die Kulturinjektionsstelle wurde mit einem T-Stück-Adapter (Carl Roth) in das Schlauchsystem eingegliedert, hier befand sich ebenfalls ein Luer-Lock-Adapter an dem eine 1 mL Spritze (Braun) mit Kolben befestigt war. Das Pufferreservoir wurde mit H₂O bid. oder PBS gefüllt und durch Betätigen der Peristaltikpumpe das gesamte System mit Flüssigkeit gefüllt. Sollten in der Flusskammer Luftblasen verblieben sein, wurden diese durch Füllung der 1 mL Spritze und kräftigem Durchspülen an der Kulturinjektionsstelle entfernt, hierbei musste jedoch darauf geachtet werden, dass durch die Kulturinjektionsstelle keine neuen Luftblasen in das System gelangten.

Die Flussrate wird durch $\tau_w = \mu \gamma = 6 \mu Q / a^2 b$ bestimmt, durch die Bestimmung der Flussraten ergaben sich für die verwendete Dichtung D Flussraten von 10 – 60 $\mu\text{N}/\text{cm}^2$.

Die Applikation von Kulturen in das System geschah ebenfalls über eine 1 mL Spritze an der Kulturinjektionsstelle, auch hierbei wurde darauf geachtet, dass keine Luft in das System gelangte. Die Durchführung der verschiedenen Flusskammer-Adhäsionsversuche ist in 4.2 beschrieben.

4.5 *in silico*-Methoden

Sequenz- und Strukturanalysen von DNA- und Proteinsequenzen

Zur Sequenzanalyse, Sequenzoptimierung und für Homologievergleiche wurden folgende Programme verwendet:

9aaTAD (Piskacek *et al.* 2007) für die Vorhersage von 9aa-Transaktivierungsdomänen in Proteinsequenzen; letzter Zugriff April 2012 unter <http://www.es.embnnet.org/Services/EMBnetAT/htdoc/9aatad/>

BLAST2 (Altschul *et al.* 1990; Altschul *et al.* 1997) zur Identifizierung ähnlicher Protein- oder DNA-Sequenzen in den öffentlichen Datenbanken; letzter Zugriff April 2012 unter <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

CloneManager 9.0 (Sci-Ed Software) zur Erstellung und Bearbeitung von Plasmid- und genomischen Sequenzen, zum Vergleich von DNA- und Proteinsequenzen und zum Erstellen von Plasmidkarten.

ClustalW2 (Larkin *et al.* 2007; Goujon *et al.* 2010) für die Erstellung von grafischen Sequenzvergleichen auf Aminosäureebene orthologer Proteine; letzter Zugriff April 2012 unter <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>

Jalview 2.7 (Waterhouse *et al.* 2009) für die Analyse von Sequenzvergleichen, die mit ClustalW2 erstellt wurden.

mfold (Zuker 2003) für die Analyse der Sekundärstruktur von Oligonukleotiden; letzter Zugriff April 2012 unter <http://mfold.rna.albany.edu/>

NetNGlyc (Gupta *et al.* 2004) für die Identifizierung putativer N-Glykosylierungsstellen in Proteinsequenzen; letzter Zugriff April 2012 unter <http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>

NetOGlyc (Julenius *et al.* 2005) für die Identifizierung putativer O-Glykosylierungsstellen in Proteinsequenzen; letzter Zugriff April 2012 unter <http://www.cbs.dtu.dk/services/NetOGlyc/>

RADAR (Heger und Holm 2000) für die Identifizierung von Sequenzwiederholungen in Proteinsequenzen; letzter Zugriff April 2012 unter <http://www.ebi.ac.uk/Tools/Radar/>

SecretomeP 2.0 (Bendtsen *et al.* 2004) für die Vorhersage von nicht-konventioneller Sekretion von Peptiden anhand von Aminosäuresequenzen; letzter Zugriff April 2012 unter

<http://www.cbs.dtu.dk/services/SecretomeP/>

SignalP Server 3.0 (Bendtsen *et al.* 2004) und **SignalP Server 4.0** (Petersen *et al.* 2011) zur Identifizierung von Signalsequenzen zur Sekretion bei Proteinsequenzen; letzter Zugriff April 2012 unter <http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>

TargetP 1.1 (Emanuelsson *et al.* 2000) zur Vorhersage der subzellulären Protein-Lokalisierung anhand von Proteinsequenzen; letzter Zugriff April 2012 unter <http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/>

TRUST (Szklarczyk und Heringa 2004) für die Identifizierung von Sequenzwiederholungen in Proteinsequenzen; letzter Zugriff April 2012 unter <http://www.ibi.vu.nl/programs/trustwww/>

Weblogo (Crooks *et al.* 2004) für die Erstellung einer grafischen Darstellung von Aminosäure-Konsenssequenzen; letzter Zugriff April 2012 unter <http://weblogo.berkeley.edu/>

WoLF PSORT (Horton *et al.* 2007) zur Vorhersage der subzellulären Protein-Lokalisierung und Proteindomänen anhand von Proteinsequenzen; letzter Zugriff April 2012 unter <http://wolfsort.org/>

In dieser Arbeit wurden folgende Genomdatenbanken zur Identifizierung von Proteinsequenzen anhand annotierter Funktionen und zur Analyse von DNA- und Proteinsequenzdaten sowie funktioneller Annotationen verwendet:

Candida Genome Database für die Identifizierung von Proteinsequenzen bekannter Funktion; letzter Zugriff April 2012 unter <http://www.candidagenome.org/>

Saccharomyces Genome Database für die Identifizierung von Proteinsequenzen bekannter Funktion; letzter Zugriff April 2012 unter <http://www.yeastgenome.org/>

MIPS Sporisorium reilianum DataBase für die Identifizierung von orthologen Proteinen in *S. reilianum*; letzter Zugriff April 2012 unter <http://mips.helmholtz-muenchen.de/genre/proj/sporisorium/>

MIPS Ustilago maydis DataBase für die Analyse von DNA- und Proteinsequenzdaten sowie funktioneller Annotationen; letzter Zugriff April 2012 unter <http://mips.helmholtz-muenchen.de/genre/proj/ustilago>

5. Literaturverzeichnis

- Aichinger, C.** (2000). Identifizierung pflanzenabhängig-regulierter Gene in *Ustilago maydis*. Unveröffentlichte Dissertation. Ludwig-Maximilian-Universität, München
- Allen, A., E. Islamovic, et al.** (2011). "Transgenic maize plants expressing the Totivirus antifungal protein, KP4, are highly resistant to corn smut." *Plant Biotechnol J* **9**(8): 857-864.
- Altschul, S. F., W. Gish, et al.** (1990). "Basic local alignment search tool." *Journal of molecular biology* **215**(3): 403-410.
- Altschul, S. F., T. L. Madden, et al.** (1997). "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs." *Nucleic acids research* **25**(17): 3389-3402.
- Apoga, D., B. Ek, et al.** (2001). "Analysis of proteins in the extracellular matrix of the plant pathogenic fungus *Bipolaris sorokiniana* using 2-D gel electrophoresis and MS/MS." *FEMS Microbiol Lett* **197**(2): 145-150.
- Aragon, A. D., A. L. Rodriguez, et al.** (2008). "Characterization of differentiated quiescent and nonquiescent cells in yeast stationary-phase cultures." *Molecular biology of the cell* **19**(3): 1271-1280.
- Ausubel, F. M.** (2005). "Are innate immune signaling pathways in plants and animals conserved?" *Nat Immunol* **6**(10): 973-979.
- Ausubel, F. M., R. Brenz, et al.** (1987). *Current Protocols in Molecular Biology*. USA, John Wiley & Sons, Inc.
- Bahar, O., L. De La Fuente, et al.** (2010). "Assessing adhesion, biofilm formation and motility of *Acidovorax citrulli* using microfluidic flow chambers." *FEMS Microbiol Lett* **312**(1): 33-39.
- Banks, G. R., P. A. Shelton, et al.** (1993). "The *Ustilago maydis nar1* gene encoding nitrate reductase activity: sequence and transcriptional regulation." *Gene* **131**(1): 69-78.
- Banuett, F.** (1995). "Genetics of *Ustilago maydis*, a fungal pathogen that induces tumors in maize." *Annu Rev Genet* **29**: 179-208.
- Banuett, F. und I. Herskowitz** (1989). "Different alleles of *Ustilago maydis* are necessary for maintenance of filamentous growth but not for meiosis." *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**(15): 5878-5882.
- Barki, M., Y. Koltin, et al.** (1993). "Isolation of a *Candida albicans* DNA sequence conferring adhesion and aggregation on *Saccharomyces cerevisiae*." *J Bacteriol* **175**(17): 5683-5689.
- Basse, C. W., S. Kolb, et al.** (2002). "A maize-specifically expressed gene cluster in *Ustilago maydis*." *Molecular Microbiology* **43**(1): 75-93.
- Bastidas, R. J., J. Heitman, et al.** (2009). "The protein kinase Tor1 regulates adhesin gene expression in *Candida albicans*." *PLoS Pathog* **5**(2): e1000294.
- Bayly, J. C., L. M. Douglas, et al.** (2005). "Characteristics of Flo11-dependent flocculation in *Saccharomyces cerevisiae*." *FEMS Yeast Res* **5**(12): 1151-1156.
- Becht, P., J. Konig, et al.** (2006). "The RNA-binding protein Rrm4 is essential for polarity in *Ustilago maydis* and shuttles along microtubules." *Journal of cell science* **119**(Pt 23): 4964-4973.
- Begerow, D., M. Stoll, et al.** (2006). "A phylogenetic hypothesis of Ustilaginomycotina based on multiple gene analyses and morphological data." *Mycologia* **98**(6): 906-916.
- Bendtsen, J. D., L. J. Jensen, et al.** (2004). "Feature-based prediction of non-classical and leaderless protein secretion." *Protein engineering, design & selection : PEDS* **17**(4): 349-356.
- Bendtsen, J. D., H. Nielsen, et al.** (2004). "Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0." *Journal of molecular biology* **340**(4): 783-795.
- Berndt, P.** (2009). Identifizierung von Pflanzensignalen, die Differenzierung von *Ustilago maydis* auf der Blattoberfläche induzieren. Unveröffentlichte Dissertation. Fakultät für Biologie, Philipps-Universität, Marburg
- Bester, M. C., D. Jacobson, et al.** (2012). "Many *Saccharomyces cerevisiae* Cell Wall Protein Encoding Genes Are Coregulated by Mss11, but Cellular Adhesion Phenotypes Appear Only Flo Protein Dependent." *G3 (Bethesda)* **2**(1): 131-141.

- Bestwick, C. S., M. H. Bennett, et al.** (1995). "Hrp Mutant of *Pseudomonas syringae* pv *phaseolicola* Induces Cell Wall Alterations but Not Membrane Damage Leading to the Hypersensitive Reaction in Lettuce." *Plant Physiology* **108**(2): 503-516.
- Block, A., G. Li, et al.** (2008). "Phytopathogen type III effector weaponry and their plant targets." *Curr Opin Plant Biol* **11**(4): 396-403.
- Bölker, M.** (2001). "Ustilago maydis--a valuable model system for the study of fungal dimorphism and virulence." *Microbiology* **147**(Pt 6): 1395-1401.
- Bölker, M., S. Genin, et al.** (1995). "Genetic regulation of mating and dimorphism in *Ustilago maydis*." *Canadian Journal of Botany* **73**(S1): 320-325.
- Bölker, M., M. Urban, et al.** (1992). "The a mating type locus of *U. maydis* specifies cell signaling components." *Cell* **68**(3): 441-450.
- Bottin, A., J. Kämper, et al.** (1996). "Isolation of a carbon source-regulated gene from *Ustilago maydis*." *Mol Gen Genet* **253**(3): 342-352.
- Brachmann, A.** (2001). Die frühe Infektionsphase von *Ustilago maydis*: Genregulation durch das bW/bE-Heterodimer. Unveröffentlichte Dissertation. Fakultät für Biologie, Ludwig-Maximilians-Universität, München
- Brachmann, A., J. König, et al.** (2004). "A reverse genetic approach for generating gene replacement mutants in *Ustilago maydis*." *Mol Genet Genomics* **272**(2): 216-226.
- Brachmann, A., J. Schirawski, et al.** (2003). "An unusual MAP kinase is required for efficient penetration of the plant surface by *Ustilago maydis*." *EMBO J* **22**(9): 2199-2210.
- Brachmann, A., G. Weinzierl, et al.** (2001). "Identification of genes in the bW/bE regulatory cascade in *Ustilago maydis*." *Mol Microbiol* **42**(4): 1047-1063.
- Brandhorst, T. T., M. Wuthrich, et al.** (1999). "Targeted gene disruption reveals an adhesin indispensable for pathogenicity of *Blastomyces dermatitidis*." *J Exp Med* **189**(8): 1207-1216.
- Braun, E. J. und R. J. Howard** (1994). "Adhesion of fungal spores and germlings to host plant surfaces." *Protoplasma* **181**(1): 202-212.
- Brefeld, O.** (1895). Untersuchungen aus dem Gesamtgebiete der Mykologie: die Brandpilze II. (Fortsetzung des V. Heftes) : die Brandkrankheiten des Getreides.
- Brefort, T., G. Döhlemann, et al.** (2009). "Ustilago maydis as a Pathogen." *Annu Rev Phytopathol* **47**: 423-445.
- Brown, D. C. und R. S. Larson** (2001). "Improvements to parallel plate flow chambers to reduce reagent and cellular requirements." *BMC Immunol* **2**: 9.
- Brückner, S. und H. U. Mösch** (2012). "Choosing the right lifestyle: adhesion and development in *Saccharomyces cerevisiae*." *FEMS Microbiol Rev* **36**(1): 25-58.
- Busscher, H. J., G. I. Geertsema-Doornbusch, et al.** (1997). "Adhesion to silicone rubber of yeasts and bacteria isolated from voice prostheses: influence of salivary conditioning films." *J Biomed Mater Res* **34**(2): 201-209.
- Busscher, H. J. und H. C. van der Mei** (1995). "Use of flow chamber devices and image analysis methods to study microbial adhesion." *Methods Enzymol* **253**: 455-477.
- Cadena-Gomez, G. und R. L. Nicholson** (1987). "Papilla formation and associated peroxidase activity: A non-specific response to attempted fungal penetration of maize." *Physiological and Molecular Plant Pathology* **31**(1): 51-67.
- Celio, G. J., M. Padamsee, et al.** (2006). "Assembling the Fungal Tree of Life: constructing the structural and biochemical database." *Mycologia* **98**(6): 850-859.
- Chaky, J., K. Anderson, et al.** (2001). "Surface Hydrophobicity and Surface Rigidity Induce Spore Germination in *Colletotrichum graminicola*." *Phytopathology* **91**(6): 558-564.
- Christensen, J.** (1963). "Corn smut caused by *Ustilago maydis*." *American Phytopathological Society* **2**: 1-41.
- Close, D. C. und C. L. Beadle** (2003). "The ecophysiology of foliar anthocyanin." *The Botanical Review* **69**(2): 149(113).
- Cohen, S. N., A. C. Chang, et al.** (1972). "Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **69**(8): 2110-2114.
- Coll, N. S., P. Epple, et al.** (2011). "Programmed cell death in the plant immune system." *Cell Death Differ* **18**(8): 1247-1256.

- Cormack, B. P., N. Ghorri, et al.** (1999). "An adhesin of the yeast pathogen *Candida glabrata* mediating adherence to human epithelial cells." *Science* **285**(5427): 578-582.
- Crooks, G. E., G. Hon, et al.** (2004). "WebLogo: a sequence logo generator." *Genome research* **14**(6): 1188-1190.
- Crosby, M. A. und E. M. Meyerowitz** (1986). "Drosophila glue gene Sgs-3: sequences required for puffing and transcriptional regulation." *Developmental biology* **118**(2): 593-607.
- Cunnac, S., M. Lindeberg, et al.** (2009). "Pseudomonas syringae type III secretion system effectors: repertoires in search of functions." *Curr Opin Microbiol* **12**(1): 53-60.
- Dangl, J. L. und J. D. Jones** (2001). "Plant pathogens and integrated defence responses to infection." *Nature* **411**(6839): 826-833.
- De Groot, P. W., K. J. Hellingwerf, et al.** (2003). "Genome-wide identification of fungal GPI proteins." *Yeast* **20**(9): 781-796.
- de Jonge, R., H. P. van Esse, et al.** (2010). "Conserved fungal LysM effector Ecp6 prevents chitin-triggered immunity in plants." *Science* **329**(5994): 953-955.
- De Las Penas, A., S. J. Pan, et al.** (2003). "Virulence-related surface glycoproteins in the yeast pathogen *Candida glabrata* are encoded in subtelomeric clusters and subject to RAP1- and SIR-dependent transcriptional silencing." *Genes Dev* **17**(18): 2245-2258.
- Dean, P.** (2011). "Functional domains and motifs of bacterial type III effector proteins and their roles in infection." *FEMS Microbiol Rev* **35**(6): 1100-1125.
- Dean, R., V. A. N. K. JA, et al.** (2012). "The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology." *Mol Plant Pathol*.
- Dean, R. A., N. J. Talbot, et al.** (2005). "The genome sequence of the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*." *Nature* **434**(7036): 980-986.
- Demerec, M., E. A. Adelberg, et al.** (1966). "A proposal for a uniform nomenclature in bacterial genetics." *Genetics* **54**(1): 61-76.
- Dingwall, C. und R. A. Laskey** (1991). "Nuclear targeting sequences--a consensus?" *Trends Biochem Sci* **16**(12): 478-481.
- Djamei, A., K. Schipper, et al.** (2011). "Metabolic priming by a secreted fungal effector." *Nature* **478**(7369): 395-398.
- Dodds, P. N. und J. P. Rathjen** (2010). "Plant immunity: towards an integrated view of plant-pathogen interactions." *Nat Rev Genet* **11**(8): 539-548.
- Doebley, J.** (1992). "Mapping the genes that made maize." *Trends Genet* **8**(9): 302-307.
- Döhlemann, G., S. Reissmann, et al.** (2011). "Two linked genes encoding a secreted effector and a membrane protein are essential for *Ustilago maydis*-induced tumour formation." *Mol Microbiol* **81**(3): 751-766.
- Döhlemann, G., K. van der Linde, et al.** (2009). "Pep1, a secreted effector protein of *Ustilago maydis*, is required for successful invasion of plant cells." *PLoS Pathog* **5**(2): e1000290.
- Dranginis, A. M., J. M. Rauceo, et al.** (2007). "A biochemical guide to yeast adhesins: glycoproteins for social and antisocial occasions." *Microbiol Mol Biol Rev* **71**(2): 282-294.
- Drysdale, C. M., E. Duenas, et al.** (1995). "The transcriptional activator GCN4 contains multiple activation domains that are critically dependent on hydrophobic amino acids." *Molecular and Cellular Biology* **15**(3): 1220-1233.
- Duplessis, S., C. A. Cuomo, et al.** (2011). "Obligate biotrophy features unraveled by the genomic analysis of rust fungi." *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**(22): 9166-9171.
- Eichhorn, H., F. Lessing, et al.** (2006). "A ferroxidation/permeation iron uptake system is required for virulence in *Ustilago maydis*." *Plant Cell* **18**(11): 3332-3345.
- Eisen, M. B., P. T. Spellman, et al.** (1998). "Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns." *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(25): 14863-14868.
- Emanuelsson, O., S. Brunak, et al.** (2007). "Locating proteins in the cell using TargetP, SignalP and related tools." *Nat. Protocols* **2**(4): 953-971.
- Emanuelsson, O., H. Nielsen, et al.** (2000). "Predicting subcellular localization of proteins based on their N-terminal amino acid sequence." *Journal of molecular biology* **300**(4): 1005-1016.
- Epstein, L. und R. Nicholson** (2006). Adhesion and Adhesives of Fungi and Oomycetes. *Biological Adhesives*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2006.

- Fang, W., Y. Pei, et al.** (2007). "A regulator of a G protein signalling (RGS) gene, *cag8*, from the insect-pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* is involved in conidiation, virulence and hydrophobin synthesis." *Microbiology* **153**(Pt 4): 1017-1025.
- Farfsing, J.** (2004). Regulation des Mais-induzierten *mig2*-Genclustern in *Ustilago maydis*. Unveröffentlichte Dissertation. Fachbereich Biologie, Philipps Universität, Marburg
- Fehrenbacher, G., K. Perry, et al.** (1978). "Cell-cell recognition in *Saccharomyces cerevisiae*: regulation of mating-specific adhesion." *J Bacteriol* **134**(3): 893-901.
- Fernandez-Alvarez, A., A. Elias-Villalobos, et al.** (2009). "The O-mannosyltransferase PMT4 is essential for normal appressorium formation and penetration in *Ustilago maydis*." *Plant Cell* **21**(10): 3397-3412.
- Fernandez-Alvarez, A., M. Marin-Menguiano, et al.** (2012). "Identification of O-mannosylated Virulence Factors in *Ustilago maydis*." *PLoS Pathog* **8**(3): e1002563.
- Fichtner, L., F. Schulze, et al.** (2007). "Differential Flo8p-dependent regulation of FLO1 and FLO11 for cell-cell and cell-substrate adherence of *S. cerevisiae* S288c." *Mol Microbiol* **66**(5): 1276-1289.
- Finkernagel, F.** (2007). *in silico*-DNA-Bindemotivsuche in *Ustilago maydis*: DNA-Bindemotiv des *b*-induzierten Transkriptionsfaktors Biz1. Unveröffentlichte Diplomarbeit. Philipps Universität, Marburg
- Flor-Parra, I., M. Vranes, et al.** (2006). "Biz1, a zinc finger protein required for plant invasion by *Ustilago maydis*, regulates the levels of a mitotic cyclin." *Plant Cell* **18**(9): 2369-2387.
- Flor, H. H.** (1955). "Host-parasite interaction in flax rust - its genetics and other implications." *Phytopathology* **45**: 680-685.
- Forrester, J. V. und J. M. Lackie** (1984). "Adhesion of neutrophil leucocytes under conditions of flow." *J Cell Sci* **70**: 93-110.
- Fu, Y., S. G. Filler, et al.** (1998b). "Cloning and characterization of CAD1/AAF1, a gene from *Candida albicans* that induces adherence to endothelial cells after expression in *Saccharomyces cerevisiae*." *Infect Immun* **66**(5): 2078-2084.
- Gale, C. A., C. M. Bendel, et al.** (1998). "Linkage of adhesion, filamentous growth, and virulence in *Candida albicans* to a single gene, INT1." *Science* **279**(5355): 1355-1358.
- Garcia-Pedrajas, M. D., M. Nadal, et al.** (2008). "Sending mixed signals: redundancy vs. uniqueness of signaling components in the plant pathogen, *Ustilago maydis*." *Fungal Genet Biol* **45 Suppl 1**: S22-30.
- Ghezzi, M. C., M. Trancassini, et al.** (1986). "Comparison between adherence of *C. albicans* and *Candida* spp. to human epithelial cells." *Boll Ist Sieroter Milan* **65**(5): 436-439.
- Gillissen, B., J. Bergemann, et al.** (1992). "A two-component regulatory system for self/non-self recognition in *Ustilago maydis*." *Cell* **68**(4): 647-657.
- Glee, P. M., J. E. Cutler, et al.** (2001). "Inhibition of hydrophobic protein-mediated *Candida albicans* attachment to endothelial cells during physiologic shear flow." *Infect Immun* **69**(5): 2815-2820.
- Gold, S. E., G. Bakkeren, et al.** (1994). "Three selectable markers for transformation of *Ustilago maydis*." *Gene* **142**(2): 225-230.
- Golub, T. R., D. K. Slonim, et al.** (1999). "Molecular classification of cancer: class discovery and class prediction by gene expression monitoring." *Science* **286**(5439): 531-537.
- Goujon, M., H. McWilliam, et al.** (2010). "A new bioinformatics analysis tools framework at EMBL-EBI." *Nucleic acids research* **38**(Web Server issue): W695-699.
- Gould, K. S.** (2004). "Nature's Swiss Army Knife: The Diverse Protective Roles of Anthocyanins in Leaves." *J Biomed Biotechnol* **2004**(5): 314-320.
- Guillemot, G., G. Vaca-Medina, et al.** (2006). "Shear-flow induced detachment of *Saccharomyces cerevisiae* from stainless steel: influence of yeast and solid surface properties." *Colloids Surf B Biointerfaces* **49**(2): 126-135.
- Guldal, C. G. und J. Broach** (2006). "Assay for adhesion and agar invasion in *S. cerevisiae*." *J Vis Exp*(1): 64.
- Guo, B., C. A. Styles, et al.** (2000). "A *Saccharomyces* gene family involved in invasive growth, cell-cell adhesion, and mating." *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(22): 12158-12163.
- Gupta, R., E. Jung, et al.** (2004). Prediction of N-glycosylation sites in human proteins.
- Guthrie, C. und G. R. Fink** (2004). *Guide to Yeast Genetics and Molecular and Cell Biology*, Academic Press.
- Halme, A., S. Bumgarner, et al.** (2004). "Genetic and epigenetic regulation of the FLO gene family generates cell-surface variation in yeast." *Cell* **116**(3): 405-415.

- Hamer, J. E., R. J. Howard, et al.** (1988). "A mechanism for surface attachment in spores of a plant pathogenic fungus." *Science* **239**(4837): 288-290.
- Hampel, M.** (2012). Funktionelle Charakterisierung der Plp1- und Plp3-Effektoren aus *Ustilago maydis*. Unveröffentlichte Masterarbeit. Karlsruhe Institute of Technology, Karlsruhe
- Hartmann, A.** (persönliche Kommunikation). oma Promoter, minimal mfa1 promoter fragment.
- Heath, M. C., Z. L. Nimichuk, et al.** (1997). "Plant nuclear migrations as indicators of critical interactions between resistant or susceptible cowpea epidermal cells and invasion hyphae of the cowpea rust fungus." *New Phytologist* **135**(4): 689-700.
- Heger, A. und L. Holm** (2000). "Rapid automatic detection and alignment of repeats in protein sequences." *Proteins* **41**(2): 224-237.
- Heimel, K., M. Scherer, et al.** (2010). "The Transcription Factor Rbf1 Is the Master Regulator for Mating Type Controlled Pathogenic Development in *Ustilago maydis*." *PLoS Pathog* **6**(8): e1001035.
- Heitman, J., N. R. Movva, et al.** (1991). "Targets for cell cycle arrest by the immunosuppressant rapamycin in yeast." *Science* **253**(5022): 905-909.
- Hoffman, C. S. und F. Winston** (1987). "A ten-minute DNA preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformation of *Escherichia coli*." *Gene* **57**(2-3): 267-272.
- Hofmeister, W.** (1867). Die Lehre von Pflanzenzellen. Leipzig, Wilhelm Engelmann.
- Holliday, R.** (1966). "Studies on mitotic gene conversion in *Ustilago*." *Genet Res* **8**(3): 323-337.
- Holliday, R.** (1974). *Ustilago maydis*. *Handbook of Genetics, Vol. 1*. R. C. King. New York, Plenum Press. **1**: 575-595.
- Holloman, W. K., J. Schirawski, et al.** (2008). "The homologous recombination system of *Ustilago maydis*." *Fungal Genet Biol* **45** Suppl 1: S31-39.
- Horst, R. J., G. Doehlemann, et al.** (2010). "A model of *Ustilago maydis* leaf tumor metabolism." *Plant Signal Behav* **5**(11): 1446-1449.
- Horton, P., K. J. Park, et al.** (2007). "WoLF PSORT: protein localization predictor." *Nucleic acids research* **35**(Web Server issue): W585-587.
- Hoyer, L. L., C. B. Green, et al.** (2008). "Discovering the secrets of the *Candida albicans* agglutinin-like sequence (ALS) gene family--a sticky pursuit." *Med Mycol* **46**(1): 1-15.
- Hoyer, L. L., T. L. Payne, et al.** (1998). "*Candida albicans* ALS3 and insights into the nature of the ALS gene family." *Curr Genet* **33**(6): 451-459.
- Hoyer, L. L., S. Scherer, et al.** (1995). "*Candida albicans* ALS1: domains related to a *Saccharomyces cerevisiae* sexual agglutinin separated by a repeating motif." *Mol Microbiol* **15**(1): 39-54.
- Huckelhoven, R., J. Fodor, et al.** (1999). "Hypersensitive cell death and papilla formation in barley attacked by the powdery mildew fungus are associated with hydrogen peroxide but not with salicylic acid accumulation." *Plant Physiol* **119**(4): 1251-1260.
- Innis, M. A.** (1990). PCR protocols: a guide to methods and applications. San Diego, Academic Press.
- Ito, H., Y. Fukuda, et al.** (1983). "Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations." *Journal of bacteriology* **153**(1): 163-168.
- Jia, Y., S. A. McAdams, et al.** (2000). "Direct interaction of resistance gene and avirulence gene products confers rice blast resistance." *EMBO J* **19**(15): 4004-4014.
- Jones, E. B. G.** (1994). "Fungal adhesion." *Mycol. Res.* **98**(9): 961-981.
- Jones, J. D. und J. L. Dangl** (2006). "The plant immune system." *Nature* **444**(7117): 323-329.
- Jones, M. J. und L. Epstein** (1990). "Adhesion of Macroconidia to the Plant Surface and Virulence of *Nectria haematococca*." *Appl Environ Microbiol* **56**(12): 3772-3778.
- Julenius, K., A. Molgaard, et al.** (2005). "Prediction, conservation analysis, and structural characterization of mammalian mucin-type O-glycosylation sites." *Glycobiology* **15**(2): 153-164.
- Kahmann, R. und J. Kämper** (2004). "*Ustilago maydis*: how its biology relates to pathogenic development." *New Phytologist* **164**(1): 31-42.
- Kale, S. D.** (2012). "Oomycete and fungal effector entry, a microbial Trojan horse." *New Phytol* **193**(4): 874-881.
- Kale, S. D., B. Gu, et al.** (2010). "External Lipid PI3P Mediates Entry of Eukaryotic Pathogen Effectors into Plant and Animal Host Cells." *Cell* **142**(2): 284-295.
- Kale, S. D. und B. M. Tyler** (2011). "Entry of oomycete and fungal effectors into plant and animal host cells." *Cell Microbiol* **13**(12): 1839-1848.

- Kämper, J., R. Kahmann, et al.** (2006). "Insights from the genome of the biotrophic fungal plant pathogen *Ustilago maydis*." *Nature* **444**(7115): 97-101.
- Kämper, J., M. Reichmann, et al.** (1995). "Multiallelic recognition: nonself-dependent dimerization of the bE and bW homeodomain proteins in *Ustilago maydis*." *Cell* **81**(1): 73-83.
- Kaur, R., R. Domergue, et al.** (2005). "A yeast by any other name: *Candida glabrata* and its interaction with the host." *Curr Opin Microbiol* **8**(4): 378-384.
- Keen, N. T.** (1990). "Gene-for-gene complementarity in plant-pathogen interactions." *Annu Rev Genet* **24**: 447-463.
- Keon, J. P., G. A. White, et al.** (1991). "Isolation, characterization and sequence of a gene conferring resistance to the systemic fungicide carboxin from the maize smut pathogen, *Ustilago maydis*." *Curr Genet* **19**(6): 475-481.
- Khang, C. H., R. Berruyer, et al.** (2010). "Translocation of *Magnaporthe oryzae* effectors into rice cells and their subsequent cell-to-cell movement." *Plant Cell* **22**(4): 1388-1403.
- Khang, C. H., S. Y. Park, et al.** (2008). "Genome organization and evolution of the AVR-Pita avirulence gene family in the *Magnaporthe grisea* species complex." *Mol Plant Microbe Interact* **21**(5): 658-670.
- Kleemann, J., L. J. Rincon-Rivera, et al.** (2012). "Sequential Delivery of Host-Induced Virulence Effectors by Appressoria and Intracellular Hyphae of the Phytopathogen *Colletotrichum higginsianum*." *PLoS Pathog* **8**(4): e1002643.
- Kloppholz, S., H. Kuhn, et al.** (2011). "A secreted fungal effector of *Glomus intraradices* promotes symbiotic biotrophy." *Curr Biol* **21**(14): 1204-1209.
- Klosterman, S. J., M. H. Perlin, et al.** (2007). "Genetics of morphogenesis and pathogenic development of *Ustilago maydis*." *Adv Genet* **57**: 1-47.
- Kobayashi, O., H. Suda, et al.** (1996). "Molecular cloning and analysis of the dominant flocculation gene FLO8 from *Saccharomyces cerevisiae*." *Mol Gen Genet* **251**(6): 707-715.
- Kobayashi, O., H. Yoshimoto, et al.** (1999). "Analysis of the genes activated by the FLO8 gene in *Saccharomyces cerevisiae*." *Curr Genet* **36**(5): 256-261.
- Koga, H. und O. Nakayachi** (2004). "Morphological studies on attachment of spores of *Magnaporthe grisea* to the leaf surface of rice." *Journal of General Plant Pathology* **70**(1): 11-15.
- Kojic, M. und W. K. Holloman** (2000). "Shuttle vectors for genetic manipulations in *Ustilago maydis*." *Can J Microbiol* **46**(4): 333-338.
- Kosugi, S., M. Hasebe, et al.** (2009). "Six classes of nuclear localization signals specific to different binding grooves of importin alpha." *J Biol Chem* **284**(1): 478-485.
- Kronstad, J. W. und S. A. Leong** (1990). "The b mating-type locus of *Ustilago maydis* contains variable and constant regions." *Genes Dev* **4**(8): 1384-1395.
- Kronstad, J. W., J. Wang, et al.** (1989). "Isolation of metabolic genes and demonstration of gene disruption in the phytopathogenic fungus *Ustilago maydis*." *Gene* **79**(1): 97-106.
- Ku, et al.** (1996). Characterization of the PRY Genes: Yeast homologs of the plant PR-1 proteins.
- Kutsuna, N. und S. Hasezawa** (2002). "Dynamic organization of vacuolar and microtubule structures during cell cycle progression in synchronized tobacco BY-2 cells." *Plant Cell Physiol* **43**(9): 965-973.
- Langner, T.** (2010). Funktionelle Charakterisierung der Pst1- und Pst2-Effektoren aus *Ustilago maydis*. Unveröffentlichte Diplomarbeit. Fakultät für Chemie und Biowissenschaften, Karlsruher Institut für Technologie, Karlsruhe
- Lanver, D.** (2010a). Appressorienbildung von *Ustilago maydis* auf hydrophoben Oberflächen: Regulation durch Membranproteine. Unveröffentlichte Dissertation. Philipps Universität, Marburg
- Lanver, D., A. Mendoza-Mendoza, et al.** (2010b). "Sho1 and Msb2-related proteins regulate appressorium development in the smut fungus *Ustilago maydis*." *Plant Cell* **22**(6): 2085-2101.
- Larkin, M. A., G. Blackshields, et al.** (2007). "Clustal W and Clustal X version 2.0." *Bioinformatics* **23**(21): 2947-2948.
- Laue, H., A. Schenk, et al.** (2008). The Distribution of Multiple Exopolysaccharides in *Pseudomonas syringae* Biofilms. *Pseudomonas syringae Pathovars and Related Pathogens - Identification, Epidemiology and Genomics*. M. Fatmi, A. Collmer, N. Sante Iacobellis et al, Springer: 147-156.
- LeBaron, R. G., K. I. Bezverkov, et al.** (1995). "Beta IG-H3, a novel secretory protein inducible by transforming growth factor-beta, is present in normal skin and promotes the adhesion and spreading of dermal fibroblasts in vitro." *The Journal of investigative dermatology* **104**(5): 844-849.

- Li, F. und S. P. Palecek** (2003). "EAP1, a *Candida albicans* gene involved in binding human epithelial cells." *Eukaryot Cell* **2**(6): 1266-1273.
- Li, W., B. Wang, et al.** (2009). "The Magnaporthe oryzae avirulence gene AvrPiz-t encodes a predicted secreted protein that triggers the immunity in rice mediated by the blast resistance gene Piz-t." *Mol Plant Microbe Interact* **22**(4): 411-420.
- Lindquist, W.** (1952). "Cell surface constituents and yeast flocculation." *Nature* **170**(4326): 544-545.
- Lipka, V., J. Dittgen, et al.** (2005). "Pre- and postinvasion defenses both contribute to nonhost resistance in Arabidopsis." *Science* **310**(5751): 1180-1183.
- Liu, Y., M. Schiff, et al.** (2005). "Autophagy regulates programmed cell death during the plant innate immune response." *Cell* **121**(4): 567-577.
- Lo, W. S. und A. M. Dranginis** (1996). "FLO11, a yeast gene related to the STA genes, encodes a novel cell surface flocculin." *J Bacteriol* **178**(24): 7144-7151.
- Lo, W. S. und A. M. Dranginis** (1998). "The cell surface flocculin Flo11 is required for pseudohyphae formation and invasion by *Saccharomyces cerevisiae*." *Mol Biol Cell* **9**(1): 161-171.
- Loza, L., Y. Fu, et al.** (2004). "Functional analysis of the *Candida albicans* ALS1 gene product." *Yeast* **21**(6): 473-482.
- Luna, E., V. Pastor, et al.** (2011). "Callose deposition: a multifaceted plant defense response." *Mol Plant Microbe Interact* **24**(2): 183-193.
- Lyssenko, N. N., W. Hanna-Rose, et al.** (2007). "Cognate putative nuclear localization signal effects strong nuclear localization of a GFP reporter and facilitates gene expression studies in *Caenorhabditis elegans*." *BioTechniques* **43**(5): 596-600.
- Mackey, D. und A. J. McFall** (2006). "MAMPs and MIMPs: proposed classifications for inducers of innate immunity." *Molecular Microbiology* **61**(6): 1365-1371.
- Martineau, C. N., R. Melki, et al.** (2010). "Swa2p-dependent clathrin dynamics is critical for Flo11p processing and 'Mat' formation in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*." *FEBS Lett* **584**(6): 1149-1155.
- Martinez-Espinoza, A. D., M. D. Garcia-Pedrajas, et al.** (2002). "The Ustilaginales as plant pests and model systems." *Fungal Genet Biol* **35**(1): 1-20.
- Martinez, P., A. C. Codon, et al.** (1995). "Physiological and molecular characterization of flor yeasts: polymorphism of flor yeast populations." *Yeast* **11**(14): 1399-1411.
- McHale, L., X. Tan, et al.** (2006). "Plant NBS-LRR proteins: adaptable guards." *Genome Biol* **7**(4): 212.
- Mendoza-Mendoza, A., P. Berndt, et al.** (2009). "Physical-chemical plant-derived signals induce differentiation in *Ustilago maydis*." *Mol Microbiol* **71**(4): 895-911.
- Miki, B. L., N. H. Poon, et al.** (1982). "Possible mechanism for flocculation interactions governed by gene FLO1 in *Saccharomyces cerevisiae*." *J Bacteriol* **150**(2): 878-889.
- Mill, P. J.** (1964). "The Nature of the Interactions between Flocculent Cells in the Flocculation of *Saccharomyces Cerevisiae*." *J Gen Microbiol* **35**: 61-68.
- Mitsubishi, N., T. Shimada, et al.** (2000). "Characterization of organelles in the vacuolar-sorting pathway by visualization with GFP in tobacco BY-2 cells." *Plant Cell Physiol* **41**(9): 993-1001.
- Moss, M. S., B. Sissen, et al.** (1999). "Adhesion of nonmetastatic and highly metastatic breast cancer cells to endothelial cells exposed to shear stress." *Biorheology* **36**(5-6): 359-371.
- Müller, O., R. Kahmann, et al.** (2008b). "The secretome of the maize pathogen *Ustilago maydis*." *Fungal Genet Biol* **45 Suppl 1**: S63-70.
- Müller, O., P. H. Schreier, et al.** (2008a). "Identification and characterization of secreted and pathogenesis-related proteins in *Ustilago maydis*." *Mol Genet Genomics* **279**(1): 27-39.
- Mumberg, D., R. Muller, et al.** (1994). "Regulatable promoters of *Saccharomyces cerevisiae*: comparison of transcriptional activity and their use for heterologous expression." *Nucleic Acids Res* **22**(25): 5767-5768.
- Mumberg, D., R. Muller, et al.** (1995). "Yeast vectors for the controlled expression of heterologous proteins in different genetic backgrounds." *Gene* **156**(1): 119-122.
- Munro, C. A., S. Bates, et al.** (2005). "Mnt1p and Mnt2p of *Candida albicans* are partially redundant alpha-1,2-mannosyltransferases that participate in O-linked mannosylation and are required for adhesion and virulence." *J Biol Chem* **280**(2): 1051-1060.
- Mur, L. A., P. Kenton, et al.** (2008). "The hypersensitive response; the centenary is upon us but how much do we know?" *J Exp Bot* **59**(3): 501-520.

- Nicholson, R. L., H. Yoshioka, et al.** (1988). "Preparation of the infection court by *Erysiphe graminis*: II. Release of esterase enzyme from conidia in response to a contact stimulus." *Experimental Mycology* **12**(4): 336-349.
- Nobile, C. J., H. A. Schneider, et al.** (2008). "Complementary adhesin function in *C. albicans* biofilm formation." *Curr Biol* **18**(14): 1017-1024.
- Nürnberg, T., F. Brunner, et al.** (2004). "Innate immunity in plants and animals: striking similarities and obvious differences." *Immunol Rev* **198**: 249-266.
- Odenbach, D., B. Breth, et al.** (2007). "The transcription factor Con7p is a central regulator of infection-related morphogenesis in the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*." *Mol Microbiol* **64**(2): 293-307.
- Ohm, R. A., J. F. de Jong, et al.** (2010). "Genome sequence of the model mushroom *Schizophyllum commune*." *Nature biotechnology* **28**(9): 957-963.
- Pascholati, S. F., H. Deising, et al.** (1993). "Cutinase and non-specific esterase activities in the conidial mucilage of *Colletotrichum graminicola*." *Physiological and Molecular Plant Pathology* **42**(1): 37-51.
- Pascholati, S. F., H. Yoshioka, et al.** (1992). "Preparation of the infection court by *Erysiphe graminis* f. sp. hordei: cutinase is a component of the conidial exudate." *Physiological and Molecular Plant Pathology* **41**(1): 53-59.
- Petersen, T. N., S. Brunak, et al.** (2011). "SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions." *Nat Methods* **8**(10): 785-786.
- Piskacek, S., M. Gregor, et al.** (2007). "Nine-amino-acid transactivation domain: establishment and prediction utilities." *Genomics* **89**(6): 756-768.
- Puhalla, J. E.** (1968). "Compatibility reactions on solid medium and interstrain inhibition in *Ustilago maydis*." *Genetics* **60**(3): 461-474.
- Reynolds, T. B. und G. R. Fink** (2001). "Bakers' yeast, a model for fungal biofilm formation." *Science* **291**(5505): 878-881.
- Roberts, B. L., W. D. Richardson, et al.** (1987). "The effect of protein context on nuclear location signal function." *Cell* **50**(3): 465-475.
- Romeis, T., A. Brachmann, et al.** (2000). "Identification of a target gene for the bE-bW homeodomain protein complex in *Ustilago maydis*." *Mol Microbiol* **37**(1): 54-66.
- Roy, A., C. F. Lu, et al.** (1991). "The AGA1 product is involved in cell surface attachment of the *Saccharomyces cerevisiae* cell adhesion glycoprotein a-agglutinin." *Mol Cell Biol* **11**(8): 4196-4206.
- Ruel, J., J. Lemay, et al.** (1995). "Development of a parallel plate flow chamber for studying cell behavior under pulsatile flow." *ASAIO J* **41**(4): 876-883.
- Ruthardt, N., N. Gulde, et al.** (2005). "Four-dimensional imaging of transvacuolar strand dynamics in tobacco BY-2 cells." *Protoplasma* **225**(3-4): 205-215.
- Samaranayake, L. P. und T. W. MacFarlane** (1981). "The adhesion of the yeast *Candida albicans* to epithelial cells of human origin in vitro." *Arch Oral Biol* **26**(10): 815-820.
- Samaranayake, L. P. und T. W. MacFarlane** (1982). "Factors affecting the in-vitro adherence of the fungal oral pathogen *Candida albicans* to epithelial cells of human origin." *Arch Oral Biol* **27**(10): 869-873.
- Sambrook, J., E. F. Fritsch, et al.** (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbour, New York, Cold Spring Harbour Laboratory Press.
- Sambrook, J., E. F. Fritsch, et al.** (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual*, Cold Spring Harbor Laboratory.
- Scherer, M., K. Heimel, et al.** (2006). "The Clp1 protein is required for clamp formation and pathogenic development of *Ustilago maydis*." *Plant Cell* **18**(9): 2388-2401.
- Schirawski, J., G. Mannhaupt, et al.** (2010). "Pathogenicity Determinants in Smut Fungi Revealed by Genome Comparison." *Science* **330**(6010): 1546-1548.
- Schmitt, M. E., T. A. Brown, et al.** (1990). "A rapid and simple method for preparation of RNA from *Saccharomyces cerevisiae*." *Nucleic acids research* **18**(10): 3091-3092.
- Scholze, H. und J. Boch** (2011). "TAL effectors are remote controls for gene activation." *Curr Opin Microbiol* **14**(1): 47-53.
- Schornack, S., M. van Damme, et al.** (2010). "Ancient class of translocated oomycete effectors targets the host nucleus." *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**(40): 17421-17426.

- Schulz, B., F. Banuett, et al.** (1990). "The b alleles of *U. maydis*, whose combinations program pathogenic development, code for polypeptides containing a homeodomain-related motif." *Cell* **60**(2): 295-306.
- Schuster, M., S. Treitschke, et al.** (2012). "Myosin-5, kinesin-1 and myosin-17 cooperate in secretion of fungal chitin synthase." *The EMBO journal* **31**(1): 214-227.
- Skibbe, D. S., G. Doehlemann, et al.** (2010). "Maize tumors caused by *Ustilago maydis* require organ-specific genes in host and pathogen." *Science* **328**(5974): 89-92.
- Smukalla, S., M. Caldara, et al.** (2008). "FLO1 is a variable green beard gene that drives biofilm-like cooperation in budding yeast." *Cell* **135**(4): 726-737.
- Sorgo, A. G., C. J. Heilmann, et al.** (2010). "Mass spectrometric analysis of the secretome of *Candida albicans*." *Yeast* **27**(8): 661-672.
- Southern, E. M.** (1975). "Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis." *Journal of molecular biology* **98**(3): 503-517.
- Spanu, P. D., J. C. Abbott, et al.** (2010). "Genome expansion and gene loss in powdery mildew fungi reveal tradeoffs in extreme parasitism." *Science* **330**(6010): 1543-1546.
- Spellig, T., A. Bottin, et al.** (1996). "Green fluorescent protein (GFP) as a new vital marker in the phytopathogenic fungus *Ustilago maydis*." *Mol Gen Genet* **252**(5): 503-509.
- Spellig, T., E. Regenfelder, et al.** (1994). "Control of mating and development in *Ustilago maydis*." *Antonie Van Leeuwenhoek* **65**(3): 191-197.
- Staab, J. F. und P. Sundstrom** (1998). "Genetic organization and sequence analysis of the hypha-specific cell wall protein gene HWP1 of *Candida albicans*." *Yeast* **14**(7): 681-686.
- Stanley, M. S., M. E. Callow, et al.** (2002). "Inhibition of fungal spore adhesion by zosteric Acid as the basis for a novel, nontoxic crop protection technology." *Phytopathology* **92**(4): 378-383.
- Steinberg, G. und J. Perez-Martin** (2008). "*Ustilago maydis*, a new fungal model system for cell biology." *Trends Cell Biol* **18**(2): 61-67.
- Stratford, M.** (1989). "Evidence for two mechanisms of flocculation in *Saccharomyces cerevisiae*." *Yeast* **5 Spec No**: S441-445.
- Sudbery, P.** (2011). "Fluorescent proteins illuminate the structure and function of the hyphal tip apparatus." *Fungal Genet Biol* **48**(9): 849-857.
- Sundstrom, P.** (2002). "Adhesion in *Candida* spp." *Cell Microbiol* **4**(8): 461-469.
- Szklarczyk, R. und J. Heringa** (2004). "Tracking repeats using significance and transitivity." *Bioinformatics* **20 Suppl 1**: i311-317.
- Taketo, A.** (1988). "DNA transfection of *Escherichia coli* by electroporation." *Biochimica et biophysica acta* **949**(3): 318-324.
- Teertstra, W. R., H. J. Deelstra, et al.** (2006). "Repellents have functionally replaced hydrophobins in mediating attachment to a hydrophobic surface and in formation of hydrophobic aerial hyphae in *Ustilago maydis*." *Microbiology* **152**(Pt 12): 3607-3612.
- Teertstra, W. R., P. Krijgheld, et al.** (2011). "Absence of repellents in *Ustilago maydis* induces genes encoding small secreted proteins." *Antonie Van Leeuwenhoek* **100**(2): 219-229.
- Teunissen, A. W. R. H. und H. Y. Steensma** (1995). "The dominant flocculation genes of *Saccharomyces cerevisiae* constitute a new subtelomeric gene family." *Yeast* **11**(11): 1001-1013.
- Thomas, C., S. Tholl, et al.** (2009). "Actin bundling in plants." *Cell Motil Cytoskeleton* **66**(11): 940-957.
- Timpel, C., S. Strahl-Bolsinger, et al.** (1998). "Multiple functions of Pmt1p-mediated protein O-mannosylation in the fungal pathogen *Candida albicans*." *J Biol Chem* **273**(33): 20837-20846.
- Timpel, C., S. Zink, et al.** (2000). "Morphogenesis, adhesive properties, and antifungal resistance depend on the Pmt6 protein mannosyltransferase in the fungal pathogen *Candida albicans*." *J Bacteriol* **182**(11): 3063-3071.
- Tsuchimori, N., L. L. Sharkey, et al.** (2000). "Reduced virulence of HWP1-deficient mutants of *Candida albicans* and their interactions with host cells." *Infect Immun* **68**(4): 1997-2002.
- Tsukuda, T., S. Carleton, et al.** (1988). "Isolation and characterization of an autonomously replicating sequence from *Ustilago maydis*." *Mol Cell Biol* **8**(9): 3703-3709.
- Tucker, S. L. und N. J. Talbot** (2001). "Surface attachment and pre-penetration stage development by plant pathogenic fungi." *Annu Rev Phytopathol* **39**: 385-417.
- Usami, S., H. H. Chen, et al.** (1993). "Design and construction of a linear shear stress flow chamber." *Ann Biomed Eng* **21**(1): 77-83.

- van den Burg, H. A., S. J. Harrison, et al.** (2006). "Cladosporium fulvum Avr4 protects fungal cell walls against hydrolysis by plant chitinases accumulating during infection." *Mol Plant Microbe Interact* **19**(12): 1420-1430.
- van Esse, H. P., J. W. Van't Klooster, et al.** (2008). "The Cladosporium fulvum virulence protein Avr2 inhibits host proteases required for basal defense." *Plant Cell* **20**(7): 1948-1963.
- Van Mulders, S. E., E. Christianen, et al.** (2009). "Phenotypic diversity of Flo protein family-mediated adhesion in Saccharomyces cerevisiae." *FEMS Yeast Res* **9**(2): 178-190.
- Verstrepen, K. J. und G. R. Fink** (2009). "Genetic and epigenetic mechanisms underlying cell-surface variability in protozoa and fungi." *Annual review of genetics* **43**: 1-24.
- Villa, F., D. Albanese, et al.** (2010). "Hindering biofilm formation with zosteric acid." *Biofouling* **26**(6): 739-752.
- Villa, F., B. Pitts, et al.** (2011). "Efficacy of zosteric acid sodium salt on the yeast biofilm model Candida albicans." *Microb Ecol* **62**(3): 584-598.
- Virag, A. und S. D. Harris** (2006). "The Spitzenkörper: a molecular perspective." *Mycological Research* **110**(1): 4-13.
- Virji, M.** (2009). "Ins and outs of microbial adhesion." *Top Curr Chem* **288**: 139-156.
- Vollmeister, E., K. Schipper, et al.** (2012). "Microtubule-dependent mRNA transport in the model microorganism Ustilago maydis." *RNA Biol* **9**(3).
- Vranes, M.** (2006). Transkriptom-Analyse der frühen Infektionsphase von Ustilago maydis: Identifikation neuer pathogenitätsrelevanter Gene. Unveröffentlichte Dissertation. Philipps Universität, Marburg
- Wahl, R., K. Wippel, et al.** (2010). "A novel high-affinity sucrose transporter is required for virulence of the plant pathogen Ustilago maydis." *PLoS Biol* **8**(2): e1000303.
- Wang, J., D. W. Holden, et al.** (1988). "Gene transfer system for the phytopathogenic fungus Ustilago maydis." *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**(3): 865-869.
- Waterhouse, A. M., J. B. Procter, et al.** (2009). "Jalview Version 2--a multiple sequence alignment editor and analysis workbench." *Bioinformatics* **25**(9): 1189-1191.
- Wösten, H., O. De Vries, et al.** (1993). "Interfacial Self-Assembly of a Fungal Hydrophobin into a Hydrophobic Rodlet Layer." *Plant Cell* **5**(11): 1567-1574.
- Wösten, H. A.** (2001). "Hydrophobins: multipurpose proteins." *Annu Rev Microbiol* **55**: 625-646.
- Wösten, H. A., F. H. Schuren, et al.** (1994). "Interfacial self-assembly of a hydrophobin into an amphipathic protein membrane mediates fungal attachment to hydrophobic surfaces." *EMBO J* **13**(24): 5848-5854.
- Xiang, T., N. Zong, et al.** (2008). "Pseudomonas syringae effector AvrPto blocks innate immunity by targeting receptor kinases." *Curr Biol* **18**(1): 74-80.
- Yanisch-Perron, C., J. Vieira, et al.** (1985). "Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors." *Gene* **33**(1): 103-119.
- Zahiri, A., K. Heimel, et al.** (2010). "The Ustilago maydis forkhead transcription factor Fox1 is involved in the regulation of genes required for the attenuation of plant defenses during pathogenic development." *Mol Plant Microbe Interact* **23**(9): 1118-1129.
- Zara, S., A. T. Bakalinsky, et al.** (2005). "FLO11-based model for air-liquid interfacial biofilm formation by Saccharomyces cerevisiae." *Appl Environ Microbiol* **71**(6): 2934-2939.
- Zhang, M., D. Bennett, et al.** (2002). "Maintenance of mating cell integrity requires the adhesin Fig2p." *Eukaryot Cell* **1**(5): 811-822.
- Zuker, M.** (2003). "Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction." *Nucleic acids research* **31**(13): 3406-3415.
- Zupan, J., J. Mavri, et al.** (2009). "Quantitative cell wall protein profiling of invasive and non-invasive Saccharomyces cerevisiae strains." *J Microbiol Methods* **79**(3): 260-265.
- Zupan, J. und P. Raspor** (2010). "Invasive growth of Saccharomyces cerevisiae depends on environmental triggers: a quantitative model." *Yeast* **27**(4): 217-228.

6. Anhang

6.1 Initiale Beobachtungen von Adhäsionsvorgängen von *Ustilago maydis*

Initiale Untersuchungen zur Adhäsion von *Ustilago maydis* beschäftigten sich mit der Zell-Zell-Anhaftung von Sporidien sowie der Substratanhaftung an hydrophile Agar-Oberflächen.

6.1.1 Zell-Zell-Anhaftung ist bei *U. maydis*-Sporidien nicht zu beobachten

Saccharomyces cerevisiae zeigt in flüssigen Wachstumsmedien natürlicherweise sexuelle und auch vegetative Zell-Zell-Anhaftung auf, welche je nach Wachstumsbedingungen mehr oder weniger stark ausgeprägt sind (Zusammengefasst in Brückner und Mösch 2012). Mikroskopische Analysen von Zellen des *S. cerevisiae* Stammhintergrundes $\Sigma 1278b$ zeigen die Bildung von kleineren Zellaggregaten unter normalen Wachstumsbedingungen (siehe Abbildung 40A und 40B). Es wird diskutiert, dass die Bildung solcher Zellaggregate ähnlich der Bildung von Biofilmen einen Schutz gegenüber Toxinen und antibiotischer Substanzen vermitteln kann (Smukalla *et al.* 2008).

Mikroskopische Untersuchungen von *U. maydis*-Sporidien in Flüssigkulturen zeigen keine vergleichbare Zell-Zell-Adhäsion (siehe Abbildung 36C). Aufgrund dessen wurde sich in den Folgeexperimente auf die Untersuchung der Substratanhaftung von Sporidien und Filamenten. Es ist unklar ob durch eine Pheromoninduktion kompatibler *U. maydis* Stämme in Flüssigkultur eine Zell-Zell-Adhäsion der Sporidien erreicht werden kann, dies wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht.

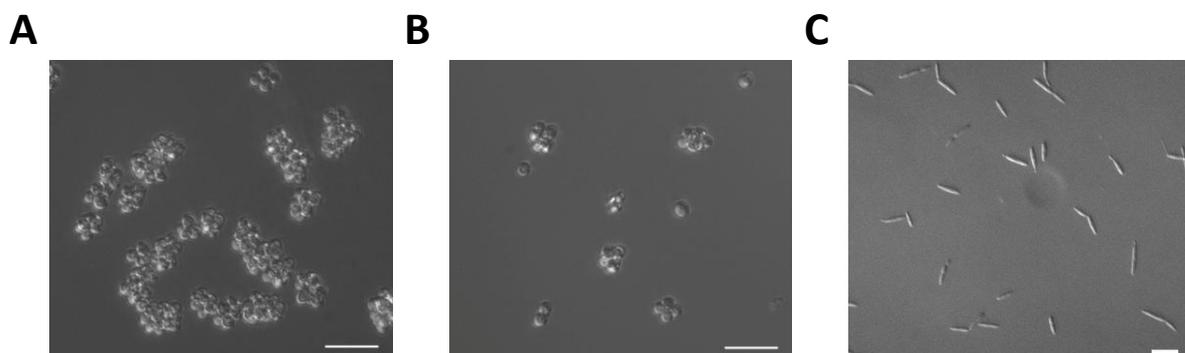


Abbildung 40: Zell-Zell-Adhäsion von *S. cerevisiae* und *U. maydis* in axenischer Kultur. (A) *S. cerevisiae* ($\Sigma 1278b$) Zellen in YEPD-Medium, alle beobachteten Zellen sind in kleineren Zellaggregaten assoziiert. (B) *S. cerevisiae* ($\Sigma 1278b$) Zellen in YEPD-Medium nach kurzer Sonifizierung, die Zellaggregate wurden teilweise aufgebrochen, es sind Einzelzellen und kleinere Aggregate zu beobachten. (C) *U. maydis* Sporidien in YL-Medium zeigen keine Zell-Zell-Anhaftung, es sind lediglich Einzelzellen zu beobachten. Maßstabsbalken: 20 μ m.

6.1.2 *U. maydis*-Sporidien zeigen in einem klassischen Agar-Adhäsionstest eine starke Substratanhaftung

Bereits 1978 wurden Waschtests beschrieben, die eine einfache Untersuchung der Adhäsion von *S. cerevisiae* an die Agaroberfläche von Wachstumsmedien ermöglichen (Fehrenbacher *et al.* 1978). Bis heute haben sich solche Agar-Adhäsionstests zur phänotypischen Charakterisierung von *S. cerevisiae* bewährt (Guldal und Broach 2006; Zupan *et al.* 2009; Martineau *et al.* 2010; Zupan und Raspor 2010). Viele pathogene Pilze lassen sich ebenfalls auf Festmedien kultivieren, Agar-Adhäsionstests werden bei solchen jedoch selten durchgeführt. Die hydrophile Agaroberfläche ist in ihren Eigenschaften stark unterschiedlich zu deren natürlichen Substraten, daher wurden für Pathosysteme wirtsnahe Adhäsionssysteme entwickelt. So werden beispielsweise HeLa- oder Epithelzellkulturen für Adhäsionsuntersuchungen bei humanpathogenen Pilzen wie *Candida albicans* und *Candida glabrata* verwendet (Samaranayake und MacFarlane 1981; Samaranayake und MacFarlane 1982; Ghezzi *et al.* 1986). Für phytopathogene Pilze wird die Adhäsion an hydrophobe Oberflächen wie Plastik untersucht. Der phytopathogene Pilz *U. maydis* zeigt ebenfalls Agar-Adhäsion auf (Abbildung 41). Diese wurde im Rahmen dieser Arbeit jedoch nicht genauer untersucht, da keine Gemeinsamkeiten zur hydrophoben Blattoberfläche bestehen.

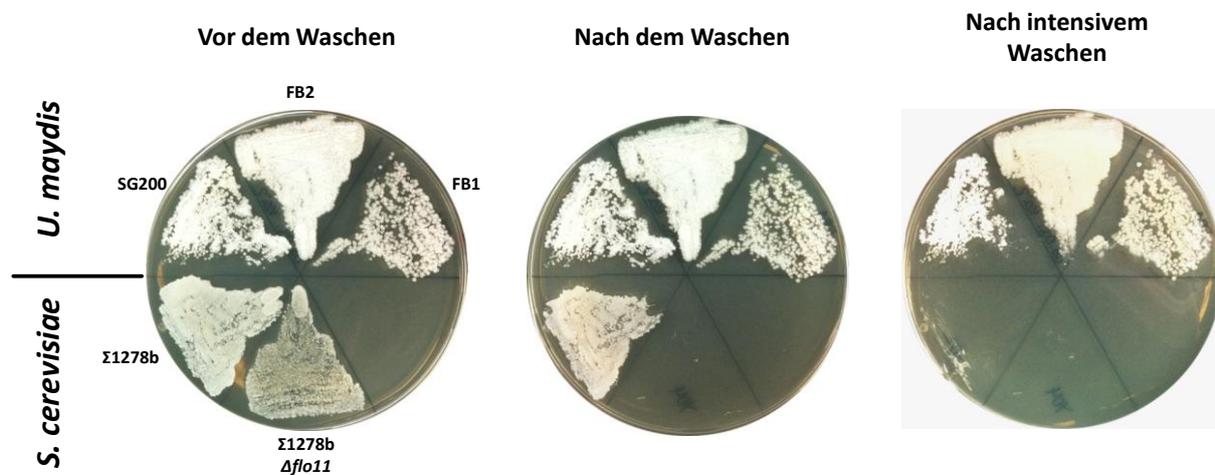


Abbildung 41: Agar-Adhäsionstest für *S. cerevisiae*- und *U. maydis*-Stämme. Nach zweitägiger Inkubation bei 28°C auf PD Vollmedium wurde eine Agarplatte mit *S. cerevisiae* und *U. maydis* einem mittelstarkem Wasserfluss (mitte) und anschließend mit starkem Wasserfluss überspült (rechts). *flo11Δ* Mutanten von *S. cerevisiae* zeigen die schwächste Agar-Adhäsion, *S. cerevisiae* Wildtypzellen können hingegen nur mit starken Scherkräften abgespült werden. Die unter den gewählten Bedingungen beobachtete Agar-Adhäsion aller hier getesteten *U. maydis* führte nicht zu einem Abspülen der Zellen von der Agaroberfläche.

6.2 Die Rolle pathogenitätsrelevanter Transkriptionsfaktoren in der Oberflächenadhäsion

Die schlechte Adhäsion der *U. maydis*-Sporidien und die starke Anhaftung von Filamenten ist ein Hinweis auf die enge Verknüpfung von Adhäsion und der Bildung von Filamenten. Sollte die Expression von Adhäsinen pathogenitätsspezifisch induziert sein, könnten einer oder mehrere der in der *b*-Regulationskaskade involvierten Transkriptionsfaktoren einen direkten oder indirekten Einfluss auf die Adhäsionsexpression nehmen. Daher wurden Deletionsstämme der an der *b*-Regulationskaskade beteiligten Transkriptionsfaktoren Rbf1, Biz1 und Hdp2 auf eine Änderung der Adhäsionsfähigkeiten hin untersucht. Für komparative Analysen wurden SG200 Δ *rbf1*-, SG200 Δ *biz1*- und SG200 Δ *hdp2*-Derivate verwendet, welche eine Integration von *P_{oma}:cfp* oder *P_{oma}:yfp* in den *ip*-Lokus tragen und so fluoreszenzmikroskopische Vergleiche ermöglichen. Für Flusskammer-Adhäsionstests wurden die Ausgangsstämme SG200 Δ *rbf1*, SG200 Δ *biz1* und SG200 Δ *hdp2* verwendet (Flor-Parra *et al.* 2006; Heimel *et al.* 2010 und Scherer, nicht publiziert).

Im komparativen Filament-Adhäsionstest wurde zunächst die Änderung der Filamentadhäsion zwischen Mutanten- und Wildtypstämmen auf einer PTFE-Oberfläche nach 24 Stunden Adhäsionszeit und intensivem Waschen für 15 Minuten bestimmt. In den durchgeführten Experimenten waren in allen Fällen nur sehr kurze Filamente zu beobachten, die Filamentlänge betrug meist nicht mehr wie 20 μ m (Daten nicht gezeigt). Eine Abschwächung der Filamentadhäsion war Transkriptionsfaktor-unabhängig stets bei CFP-markierten Derivaten zu beobachten (siehe Abbildung 42A). Komparative Analysen der Initialanhaftung von Sporidien zeigten keine Änderung des Adhäsionsverhaltens von SG200 Δ *rbf1*-cfp oder SG200 Δ *rbf1*-yfp. Eine verringerte Adhäsion von SG200 Δ *biz1*-cfp sowie SG200 Δ *hdp2*-cfp konnte beobachtet werden. Allerdings war ebenfalls eine geringere Adhäsion von SG200cfp im Vergleich zu SG200 Δ *biz1*-yfp zu beobachten (siehe Abbildung 42B). Dies ist ein weiterer Hinweis darauf, dass die verwendeten CFP- und YFP-markierten Stämme Unterschiede im Adhäsionsverhalten aufzeigen, die nicht auf die Deletion eines Transkriptionsfaktors zurückzuführen sind. Die verminderte Adhäsionsfähigkeit von Stämmen trat vielmehr nur in CFP-markierten Stämmen auf.

Durch Analysen der Sporidienadhäsion in Flusskammeradhäsionstests konnten keine Änderungen des Adhäsionsverhaltens von SG200 Δ *rbf1* und SG200 Δ *hdp2* im Vergleich zu SG200 gezeigt werden. SG200 Δ *biz1*-Sporidien hafteten etwas weniger stark als die anderen untersuchten Stämme. Mit Bezug auf die große Standardabweichung der ermittelten relativen Adhäsionswerte ist diese Änderung jedoch statistisch nicht signifikant (Abbildung 42C). Mit den verfügbaren Adhäsionstests konnte der Einfluss der untersuchten Transkriptionsfaktoren in der Sporidien- oder Filamentadhäsion nicht zweifelsfrei geklärt werden.

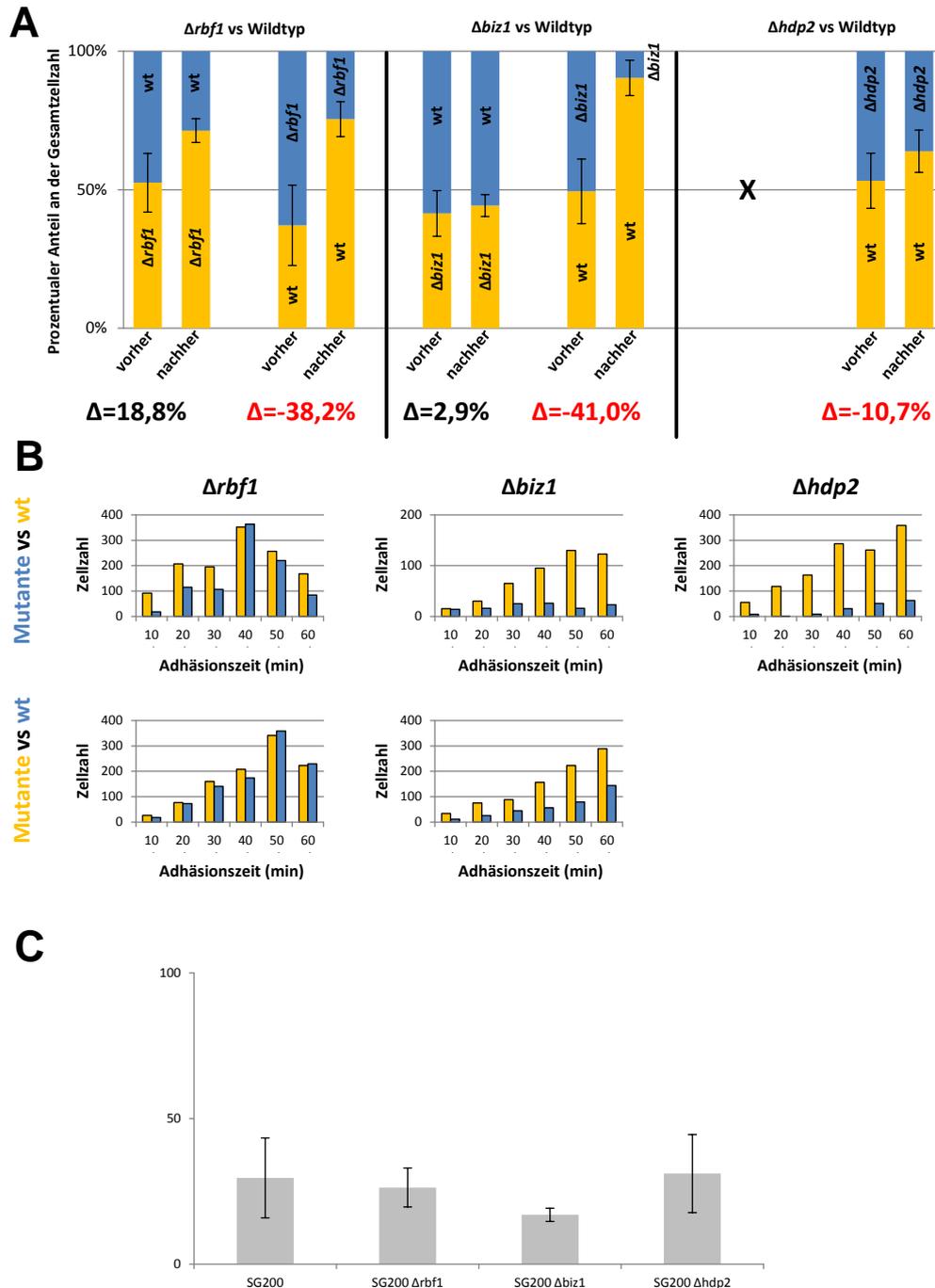


Abbildung 42: Adhäsion von Deletionsmutanten pathogenitätsrelevanter Transkriptionsfaktoren. (A) Komparativer Filament-Adhäsionstest für die Stämme SG200 $\Delta rbf1$, SG200 $\Delta biz1$ und SG200 $\Delta hdp2$ (CFP-markierte Derivate in blau, YFP-markierte Derivate in gelb) nach 15 minütigem Waschen von 24 h alten Filamenten auf einer PTFE-Oberfläche. Das Sporidienverhältnis vor Applikation und das Filamentverhältnis nach dem Waschvorgang wurde über Auszählung der CFP- und YFP-Signale von 10 zufällig gewählten fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen (2,4 mm²) mittels Pixcavator (Student Edition) bestimmt. Zellzahlen variierten zwischen 900-1100 ausgezählten Sporidien und 900-1200 ausgezählten Filamenten. Für SG200 $\Delta hdp2$ konnte aus technischen Gründen nur ein CFP-markiertes Derivate untersucht werden. Die absolute Änderung des Verhältnisses (Δ) ist in Prozent in schwarz für positive und rot für negative Änderungen dargestellt. (B) Komparativer Adhäsionstest für die initiale Anhaftung von *U. maydis*-Sporidien der Stämme SG200 $\Delta rbf1$, SG200 $\Delta biz1$ und SG200 $\Delta hdp2$ (CFP-markierte Derivate in blau, YFP-markierte Derivate in gelb) Bestimmung absoluter Sporidienzahlen mittels einer repräsentativen mikroskopischen Aufnahme (2,4 mm²) und Pixcavator (Student Edition). (C) Flusskammeradhäsionstest mit SG200 $\Delta rbf1$ -, SG200 $\Delta biz1$ - und SG200 $\Delta hdp2$ -Sporidien; Bestimmung der relativen Anzahl adhärenter Zellen auf einer Fläche von 0,455 mm² nach 1 h Ruhe und 15 min andauernder Scherkräft von 25 μ N/cm². Angaben in Prozent.

6.3 Strukturanalysen identifizierter putativer Adhäsine

Das Vorhandensein eines Signalpeptids für die Sekretion wurde mittels SignalP 4.0 Analyse (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) überprüft. Proteinsequenzen ohne identifizierbares Signalpeptid wurde mittels SecretomeP 2.0 Analyse (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SecretomeP/>) auf die Möglichkeit einer unkonventionellen Sekretion überprüft.

Zur Bestimmung Adhäsın-typischer Strukturen wurden die Aminosäuresequenzen der Adhäsinkandidaten mittels einer RADAR Analyse (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/Radar/>) auf das Vorhandensein von Aminosäure-Sequenzwiederholungen überprüft. Bei Proteinsequenzen von einer Länge von über 1000 Aminosäuren wurden zuerst die 1000 N-terminalen Aminosäuren und dann die 1000 C-terminalen Aminosäuren analysiert und die Ergebnisse verglichen. Die Analyse der Glykosylierungsstellen wurde mittels der Algorithmen NetNGlyc für die Identifizierung putativer N-Glykosylierungsstellen (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>) und NetOGlyc für die Identifizierung putativer O-Glykosylierungsstellen (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetOGlyc/>) durchgeführt.

Tabelle 8: Zusammenfassung der Strukturanalysen putativer Adhäsine.

MUMDB ^a	Sekretion ^b	RADAR Sequenzwiederholungen ^c	N-Glykosylierung Anzahl Glykosylierungsstellen (Threshold 0,5) ^d	O-Glykosylierung (Threshold 0,5) ^e
um00286		4x148aa	5	+-
um02104		2x29aa	1	+-
um02717		6x28aa	2	+
um10417		3x15aa	8	+-
um00466	SP	3x42aa	0	-
um00480	SP	2x16aa	7	++
um01204	SP	-	1	+
um01513	SP	4x128aa*	1	++
um02865	SP	2x65	5	-
um03065	SP	10x48aa	1	+-
um03664	UKS	2x65	0	+-
um04211	UKS	3x34aa	2	++
um04248	SP	8x24aa	3	+-
um04385	SP	2x24	3	+-
um05104	SP	13x25aa	3	+-
um05704	SP	2x38?	0	+
um06120	SP	2x37	12	+-

^a Accession-Nummer des MIPS (Stand Februar 2012).

^b Vorhandensein eines Signalpeptids (SP) in SignalP 4.0 Analysen (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) bzw. die Möglichkeit unkonventioneller Sekretion (UKS) durch eine NN-Score von über 0,5 in Analysen mit SecretomeP 2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SecretomeP/>).

^c Anzahl von Sequenzwiederholungen ermittelt durch RADAR-Analysen (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/Radar/>).

^d Anzahl der putativen N-Glykosylierungsstellen, ermittelt durch NetNGlyc 1.0 Analysen (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>) bei einem Grenzwert von 0,5.

^e Vorhersage O-glykosylierter Bereiche, ermittelt durch NetOGlyc 3.1 Analysen (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetOGlyc/>) bei einem Grenzwert von 0,5. ++ entspricht einer sehr starken Glykosylierung, + entspricht einer starken Glykosylierung, +- entspricht vereinzelten glykosylierten Bereichen und - entspricht keinen identifizierbaren O-Glykosylierungsstellen. Nicht sekretierte Proteine sind in *grau* dargestellt.

6.4 Die generierten Adhäsionsfaktor-Deletionsstämme zeigen keine Änderungen der Hydrophobizität von Hyphen

Eine Änderung der Hydrophobizität pilzlicher Zellwände könnte eine Änderung hydrophober Wechselwirkungen mit einer Kontaktoberfläche zur Folge haben und hierdurch Adhäsionsvorgänge beeinflussen. Zur Bestimmung von Änderungen der Hydrophobizität von *U. maydis* Filamenten wurden Wasserkontaktwinkel-Untersuchungen von Kolonien mit *fuz*⁺ Phänotyp nach (Teertstra *et al.* 2006) analysiert. SG200 Derivate wie SG200cfp und SG200yfp zeigen auf aktivkohlehaltigen Platten stark filamentöses Wachstum, erscheinen daher flauschig („fuzzy“ oder *fuz*⁺). Die Deletionsmutanten wurden auf PD Aktivkohle appliziert, nach dreitägiger Inkubation bei 28°C zeigten alle Stämme wie erwartet den *fuz*⁺ Phänotyp. Zur Bestimmung des Wasserkontaktwinkels wurden 10µl H₂O bid. auf die Kolonien gegeben. Ab einem Wasserkontaktwinkel von 90° gilt eine Oberfläche als Hydrophob. SG200 Wildtypstämme zeigen einen Wasserkontaktwinkel von über 90° auf, sind also superhydrophob (siehe Abbildung 36 für eine Klassifizierung von Hydrophobizität). Alle in dieser Arbeit untersuchten Deletionsstämme von Adhäsionskandidaten zeigen einen vergleichbar großen Wasserkontaktwinkel von über 90° auf, somit ist die Hydrophobizität aller beobachteten Stämme in etwa gleich groß (Abbildung 43). Auf eine exakte Bestimmung des Wasserkontaktmittels mit einem Goniometer wurde verzichtet.



Abbildung 43: Indirekte Bestimmung der Hydrophobizität dikaryotischer Filamente der erstellten Deletionsmutanten von *U. maydis*. Zur Analyse der Wasserkontaktwinkel wurde ein Wassertropfen von 10µl auf 4 Tage alte dikaryotische Filamente der Deletionsstäme auf PD Aktivkohleplatten appliziert und jeweils ein Foto gemacht. Bei einem Wasserkontaktwinkel von über 90°C gilt eine Oberfläche als hydrophob. Alle Stämme zeigen eine vergleichsweise starke Hydrophobizität, weshalb keine Wasserkontaktwinkelmessungen durchgeführt wurden.

6.5 Konstruktion eines GATEWAY®-kompatiblen Expressionssystems zur heterologen Expression in *S. cerevisiae*

6.5.1 Klonierung eines binären Vektors für die induzierbare Expression von Fremdgenen in *S. cerevisiae*

Als Vektor für die Propagierung einer Genbank sowohl in *Escherichia coli* als auch *Saccharomyces cerevisiae* wurde das Plasmidsystem nach (Mumberg *et al.* 1994; Mumberg *et al.* 1995) verwendet. Zur kontrollierbaren Expression der inserierten Fremdgene wurde p416GalL als Grundplasmid gewählt. Das p416 Grundgerüst trägt die Zentromer-autonome Replikationssequenz CEN6_ARS4 und den Auxotrophiemarker *URA3* für die Propagierung in *S. cerevisiae*, zusätzlich sind für die prokaryotische Propagation der pUC Replikationsursprung und das Ampizillinresistenzgen *amp* auf dem Plasmid lokalisiert. In p416GalL sind zusätzlich das große *GAL1*-Promotorfragment *GALL* sowie der *CYC1* flankierend zur Klonierungsstelle positioniert. Durch Linearisierung des p416GalL Vektors und Integration der GATEWAY® Kasette B wurde der Vektor pKPH48 generiert, der die GATEWAY®-vermittelte gerichtete Integration von kompatiblen DNA-Fragmenten ermöglicht (siehe Abbildung 44).

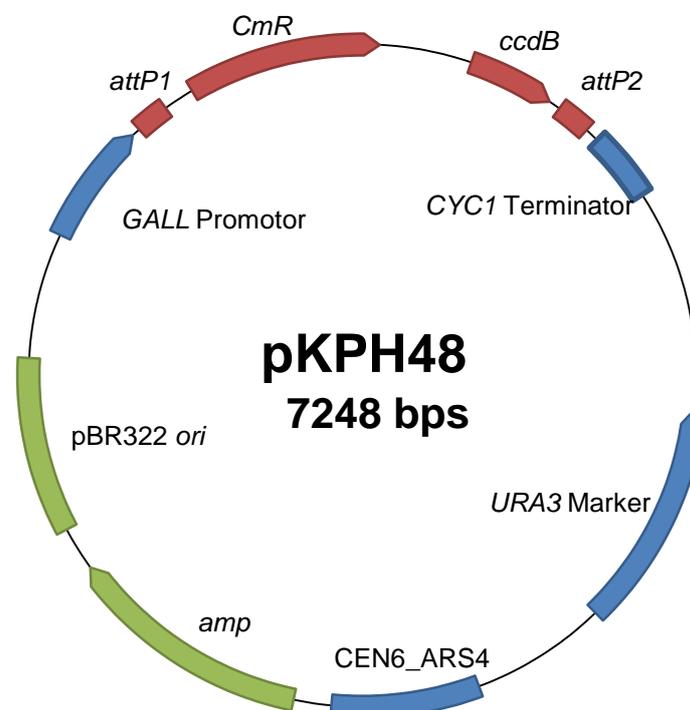


Abbildung 44: Vektorkarte des Expressionsvektors pKPH48. **Blau:** Die für die Propagierung und Expression in *S. cerevisiae* relevanten Sequenzabschnitte umfassen die autonome Replikationssequenz CEN6_ARS6, den *URA3*-Auxotrophiemarker, die *CYC1*-Terminatorsequenz sowie das durch Galaktose induzierbare *GAL1*-Promotorfragment *GALL*. **Grün:** Die für die Propagierung in *E. coli* relevanten Sequenzabschnitte umfassen den pBR322 Replikationsursprung sowie das Ampicillin-Resistenzgen *amp*. **Rot:** Die in die multiple Klonierungsstelle eingebrachte GATEWAY®-Kasette mit dem Chloramphenicolresistenz-vermittelnden *CmR* und dem Selbstmorden *ccdB* sowie den flankierenden *attP1* und *attP2*-Stellen, welche die sequenzspezifische *in vitro* Rekombination ermöglichen.

6.5.2 Überprüfung der Galaktose-induzierten Genexpression eines in pKPH48 inserierten *gfp*-Gens

Zur Überprüfung der induzierbaren Expression des konstruierten pKPH48 Vektors durch Galaktose wurde der Stamm YHUM0924 mit dem Plasmid pKPH48 transformiert. Zur Propagierung des extrachromosomalen Plasmids wurde der so erhaltene Stamm KPHY05 auf SD –Uracil Medium kultiviert und nur für Induktionsversuche in YEPD Vollmedium überführt. Für die Expressionskontrolle wurde KPHY05 wurde in YEPD +2% Glukose Medium angezogen. Bei dem GalL-Promotor handelt es sich um ein größeres Fragment des Gal1-Promotors, der durch Anwesenheit von Glukose aktiv reprimiert wird. Eine Überführung in Galaktose-haltiges Medium führt mit der Zeit zur Aktivierung der Expression des enthaltenen *gfp*, während eine Überführung in Glukose-haltiges Medium keine Änderungen hervorruft (siehe Abbildung 45).

Zur Bestimmung des Anteils aktiv *gfp*-exprimierender Zellen nach einer längeren Induktionsphase, wie sie bei der Induktion der Ganbank auftreten würde, wurden Zellen des Stammes KPHY05 für 14 Stunden in YEPD +2% Glukose Medium herangezogen. Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen der Zellen zeigte GFP Signale bei etwa 75% der beobachteten Zellen. Die Stärke des GFP Signales war nicht in allen Zellen gleich stark, dies könnte bedeuten, dass eine Teilpopulation durch Verlust des Plasmids keine aktive *gfp*-Expression, sondern lediglich einige nach der Zellteilung verbliebene GFP Moleküle der Mutterzelle im Zytoplasma aufweist. Dies war doch zu vernachlässigen, da über 50% mittel- bis sehr starke Fluoreszenz aufwiesen. Ebenso würde in einer Anreicherungsreihe, die eine sukzessive Folge von funktioneller Isolierung durch Adhäsion und anschließender Selektion auf Plasmid-DNA darstellt, eine Subpopulation ohne Plasmid-DNA aus der Population entfernt werden.

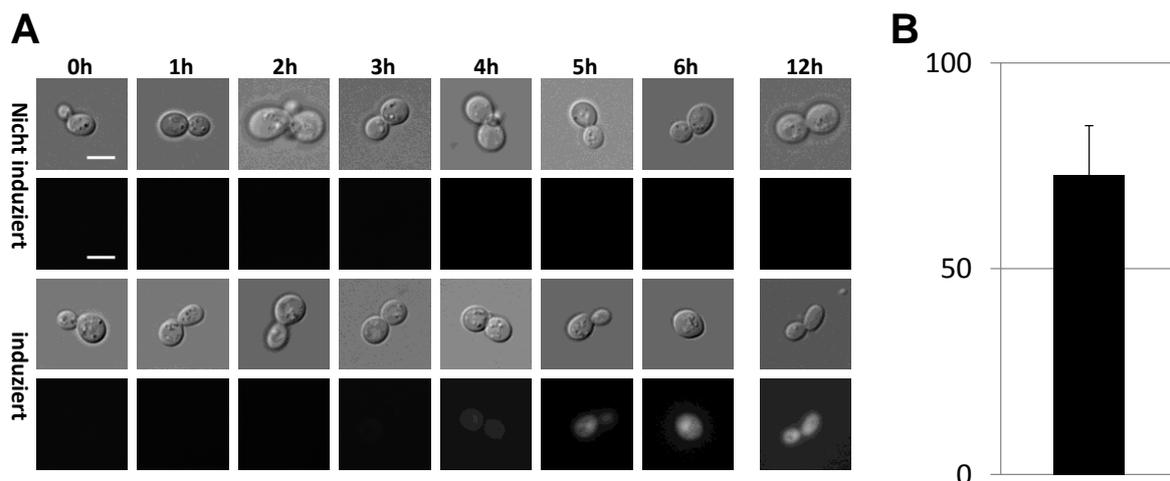


Abbildung 45: GFP-Expression des pKPH124-tragenden Stammes KPHY01 nach Induktion mit Galaktose. (A) Mikroskopische Analyse der GFP Expression von KPHY01 nach Induktion durch 2% Galaktose-haltiges Medium; für die fluoreszenzmikroskopische Aufnahme wurde eine konstante Belichtungszeit von 500ms gewählt. (B) Prozentualer Anteil fluoreszenter Hefezellen nach 14 Stunden Inkubation.

6.6 Generierung einer *U. maydis*-Genbank für die heterologe Expression in *S. cerevisiae*

6.6.1 Isolierung von mRNA aus *Ustilago maydis*-Filamenten

Ustilago maydis-RNA wurde aus frühen Filamenten auf hydrophober Oberfläche gewonnen. Um eine ausreichende Menge RNA zu erhalten, wurden Filamente auf Polystyrol-Kulturschalen anstelle von Polytetrafluorethylen aufgesprüht. Polystyrol-Kulturschalen erlaubten eine einfachere Handhabung des toxischen Phenols und ermöglichten die Präparation einer größeren Zahl von Filamenten als mit den uns verfügbaren PTFE-Materialien. Insgesamt wurden 32 PS-Kulturschalen mittels eines Sprühgeräts mit einer SG200 Sporidiensuspension benetzt, 6 Stunden in einer Feuchtekammer bei 28°C inkubiert und die mRNA der jungen Hyphen mittels einer modifizierten AE-Phenol-Extraktion gewonnen (siehe Material & Methoden 4.3.1). Es wurden 12 Pools á 20 µL RNA-Suspension gewonnen, die Quantitäts- und Qualitätskontrolle erfolgte durch fotometrische Messung am NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer sowie durch Analyse auf einem Agilent 2100-Bioanalytiker. 5 Pools zeigten keine Degradierung der mRNA auf (siehe Abbildung 46), diese wurden vereint, aufgereinigt und in die cDNA-Synthese eingesetzt.

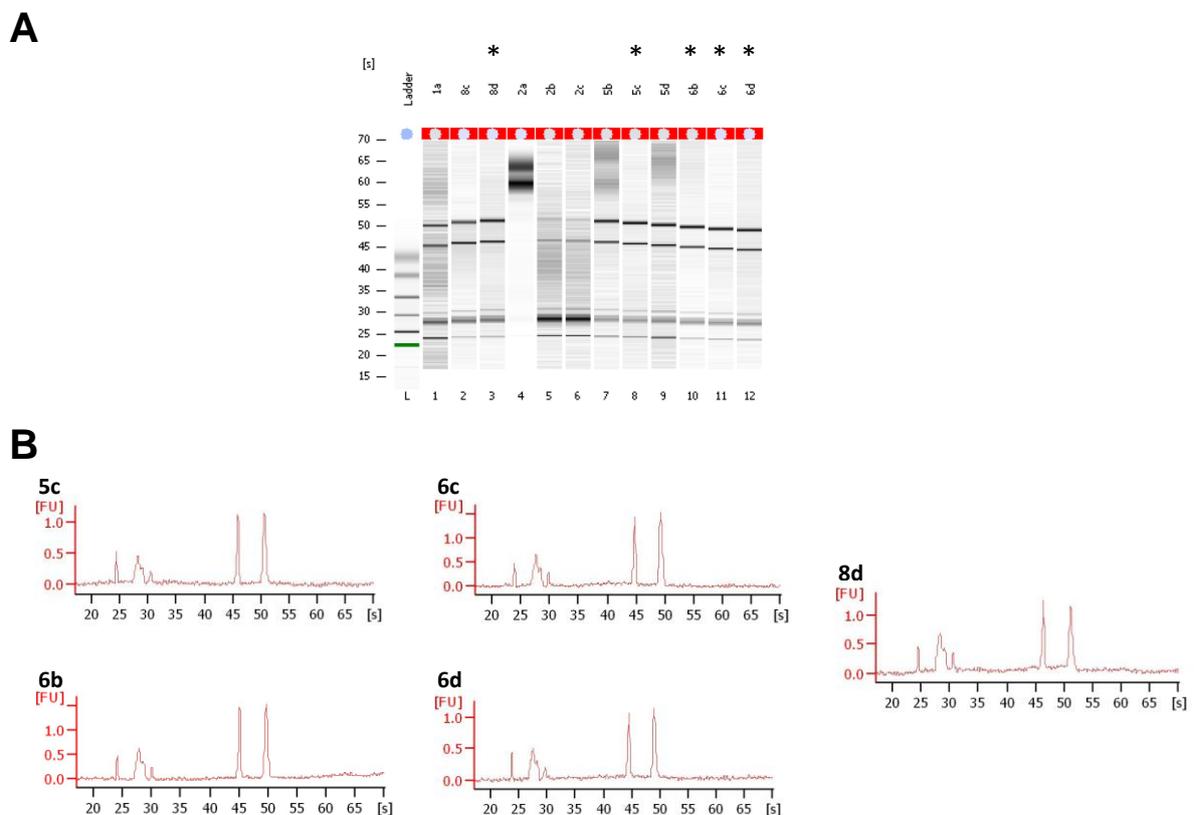


Abbildung 46: Überprüfung der Qualität isolierten mRNA. (A) Analyse der isolierten mRNA mittels BioAnalytiker, ausgewählte mRNA Proben ohne Degradierung sind mit * markiert. (B) Chromatographische Auftrennung der ausgewählten mRNA Proben.

6.6.2 Transkription von cDNA und Klonierung der Genbank

Die cDNA Synthese wurde mit dem Clontech In-Fusion™ SMARTer™ cDNA Library Construction Kit (Cat. No. 634929) durchgeführt. Mit diesem System synthetisierte doppelsträngige cDNA ist von SMARTer™-Klonierungsstellen flankiert, die eine erfolgreiche Klonierung in den von uns generierten Vektor pKPH44, ein Derivat von p416GALL (siehe 4.1.3) durch *in vitro*-Klonierung gewährleisten sollen. Es stellte sich jedoch heraus, dass durch die geringe Effizienz der In-Fusion-Klonierung die Klonierung der vollständigen cDNA-Reaktion lediglich einen Titer der resultierenden Genbank von 2×10^4 cfu erreichen würde. Für eine cDNA-Bank mit einer statistisch sicheren Abdeckung aller exprimierten Gene ist dieser Titer zu gering. Daher erfolgte eine Modifizierung der cDNA für das GATEWAY®-Klonierungssystem der Firma Invitrogen. Die GATEWAY-Modifikations-PCR ist in 4.3.5 beschrieben. Die modifizierte cDNA wurde mittels GATEWAY® *in vitro*-Klonierung in den ENTRY Vektor pDONR221 überführt. Als Endvektor für die Genbank diente der p416-basierte binäre Vektor pKPH48 (CENP_ARS, *ura3*, *P_{GALL}::MCS::T_{cyc}*). Durch Inserierung der GATEWAY® Kassette B in die EcoRI-Schnittstelle von pKPH29 entstand der GATEWAY®-kompatible pKPH48. Mittels *in vitro*-GATEWAY®-Klonierung wurde die Genbank aus dem Vektor pDONR221 in den Zielvektor pKPH48 transferiert. (Eine Zusammenfassung aller Ergebnisse der Genbankerstellung mit Qualitätskontrollen findet sich in Anhang 45). Die im pKPH48 enthaltene Genbank wurde nun in *S. cerevisiae* transformiert. Erhaltene Hefeklone wurden auf Festmedium angezogen, abgeschwämmt und vereinigt. Diese Grundkultur wurde für alle folgenden Experimente verwendet.

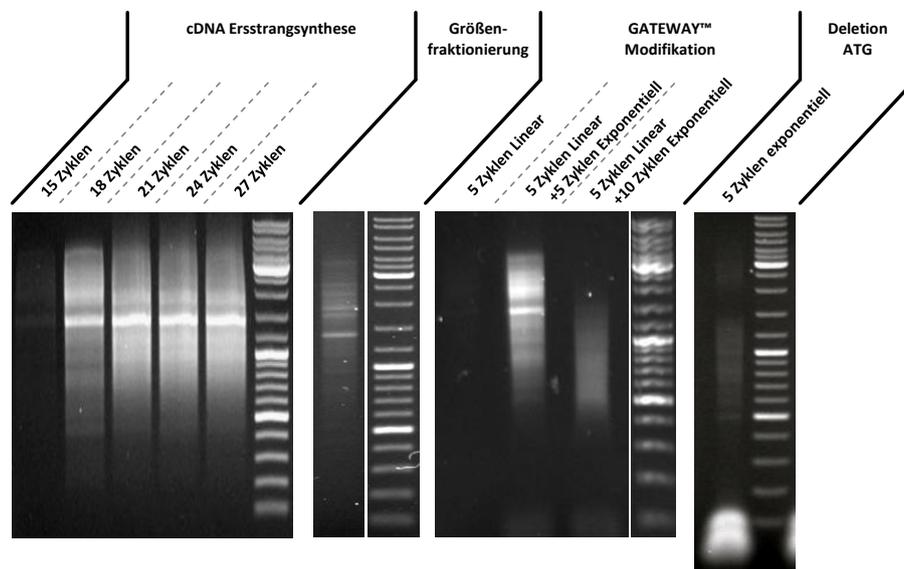


Abbildung 47: Generierung der cDNA Bank. (I) cDNA Erststrangsynthese mit dem In-Fusion SMARTer cDNA Library Construction Kit mittels des Primers 3' SMART CDS Primer II A, Anzahl der Zyklen hat Auswirkung auf die Größenverteilung der cDNA, 18 Zyklen wurden als optimal determiniert; (II) Gesamt ds cDNA nach Größenfraktionierung mit CHROMA SPIN™-1000 DEPC Säule; (III) Ergebnis der cDNA-Modifizierung für GATEWAY® Kompatibilität, nach 5 Zyklen linearer Amplifizierung ist kein Produkt sichtbar, nach weiteren 5 Zyklen mit beiden Oligonukleotiden ist modifizierte cDNA mit einem der ursprünglichen cDNA vergleichbaren Größenverhältnis zu erkennen, nach 10 exponentiellen Zyklen hingegen verschiebt sich das Größenverhältnis (IV) PCR-vermittelte Deletion des ATG Startcodons der cDNA

6.6.3 Erste heterologe Expressionsreihen führen zu keiner Anreicherung adhärenter *S. cerevisiae*-Klone

Für die Bestimmung der relativen Adhäsion von *S. cerevisiae*-Stämmen wurde für jede Anreicherungsreihe eine Wildtyp-Kontrolle durchgeführt. Hierfür wurde der Stamm YHUM0909 (Sigma1278b; *ura3-52*) mit einer OD_{600} von 0,4 in PBS in die Flusskammer appliziert und unter denselben Bedingungen behandelt wie die Genbank-Anreicherungen (drei Stunden Inkubation bei RT, 10 oder 15 Minuten spülen mit einer Scherkraft von $25 \mu\text{N}/\text{cm}^2$ oder $38 \mu\text{N}/\text{cm}^2$). Mikroskopische Aufnahmen vor und nach dem Spülvorgang ermöglichten die Bestimmung des Prozentsatzes anhaftender Wt-Hefezellen. Die in den Selektionsreihen bestimmten Prozentsätze wurden jeweils mit dem ermittelten Wt-Prozentsatz in Relation gesetzt.

Es wurden zwei unabhängige Selektionsreihen der cDNA-Bank durchgeführt, die Genexpression wurde jeweils durch 14 stündige Galaktoseinduktion wie zuvor beschrieben durchgeführt. Zellen wurden in die Flusskammer mit einer OD_{600} von 0,4 in PBS appliziert und drei Stunden ruhend gelassen. Anschließend wurde mit einer Scherkraft von $25 \mu\text{N}/\text{cm}^2$ für 10 Minuten gewaschen und der prozentuale Anteil adhärierender Zellen bestimmt. Dieser Vorgang wurde je Oberfläche viermal wiederholt, anschließend wurden die Oberflächen mit SD Agar ohne Uracil überzogen und drei Tage bei 28°C inkubiert. Resultierende Kolonien dienten als Grundlage für eine zweite Selektionsreihe mit einer Scherkraft von $25 \mu\text{N}/\text{cm}^2$ für 15 Minuten und einer folgenden dritten Selektionsreihe mit einer Scherkraft von $38 \mu\text{N}/\text{cm}^2$ für 15 Minuten. Für Polystyrolanreicherungen wurden zwei weitere Selektionsreihen mit $38 \mu\text{N}/\text{cm}^2$ und 15 Minuten durchgeführt. Für PTFE-Anreicherungen wurde je Selektionsreihe eine nicht-induzierte Kontrolle zur Überprüfung unspezifischer Adhäsionen mitgeführt.

In Abbildung 48 sind die relativen Adhäsionsänderungen der Selektionsreihen aufgeführt. Auf PS sind wie zuvor beschrieben starke Schwankungen zwischen identischen Experimenten zu erkennen. Doch auch in PTFE-Anreicherungsreihen zeigen sich teils starke Schwankungen im Adhäsionsverhalten bei vergleichbaren experimentellen Bedingungen. In den letzten Selektionen ist zudem zu erkennen, dass es nicht zu einer effizienten Anreicherung adhäsiver Hefezellen gekommen ist.

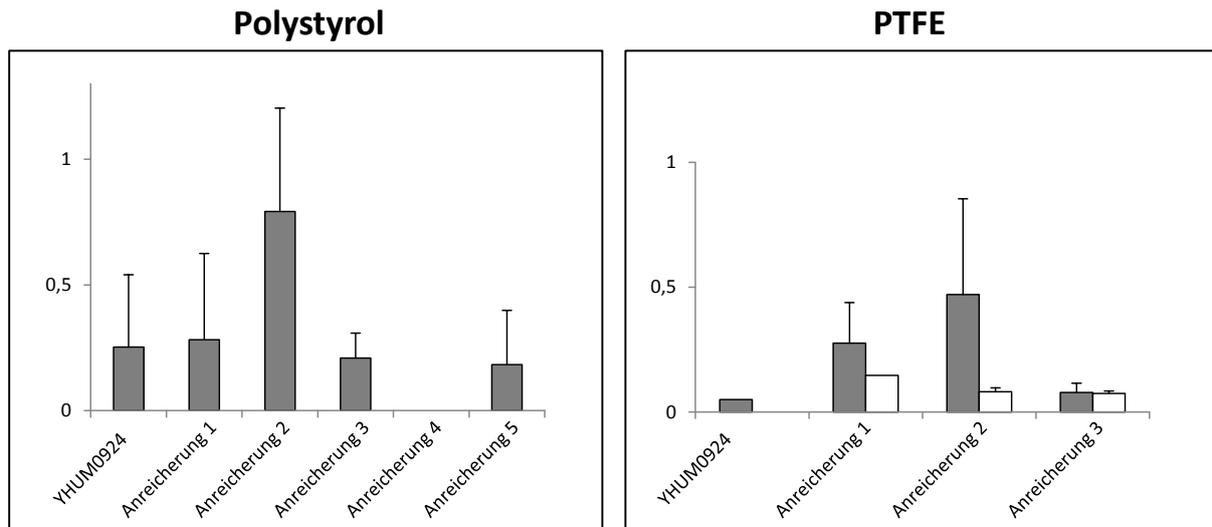


Abbildung 48: Anreicherungsreihen der Genbank auf Polystyrol und Polytetrafluorethylen. Dargestellt sind relative Änderungen des Adhäsionsverhaltens der Genbank im Vergleich zum Wt; angezeigt sind jeweils die Mittelwerte aus zwei bis vier biologischen Replikaten. Links: Anreicherungsreihen mit der Genbank unter induzierten Bedingungen auf Polystyrol. Als Negativkontrolle wurde die relative Adhäsion von YHUM0924 bestimmt. Die Anreicherungen 1, 2 und 5 zeigten starke Schwankungen in der relativen Adhäsion in biologischen Replikaten, Selektion 4 ist nicht angezeigt, näheres hierzu im Text. Die Selektionen 1, 3 und 5 zeigten im Vergleich zu YHUM0924 keine Anreicherung adhäsiver Zellen. Die in den Selektionen 2 und 4 beobachteten Anreicherungen sind statistisch nicht signifikant. Rechts: Anreicherungsreihen mit der Genbank unter induzierten Bedingungen auf PTFE. Als Negativkontrolle wurde die relative Adhäsion von YHUM0924 bestimmt. Für die PTFE-Anreicherungsreihen wurde jeweils eine (Anreicherung 1) oder zwei (Anreicherungen 2 und 3) zusätzliche nicht-induzierte Kontrollanreicherungen durchgeführt (weiß) und der ermittelten relativen Adhäsion induzierter Zellen (grau) gegenübergestellt. Die Anreicherungen 1 und 2 ließen eine Anreicherung adhärenter Zellen vermuten, diese ist jedoch statistisch nicht signifikant. Anreicherung 3 zeigte im Vergleich zu YHUM0924 keine Anreicherung adhäsiver Zellen, somit hat keine Anreicherung adhäsiver Hefen stattgefunden.

6.6.4 Sequenzanalysen zeigen das Vorhandensein eines zusätzlichen Startcodons in der cDNA

Um weiterhin zu überprüfen, ob die nach der letzten Runde der Anreicherungsreihen adhärierenden Hefen zufällige oder Fremdgen-vermittelte Adhäsion aufzeigten, wurden exemplarisch 50 Klone der PS-Anreicherungsreihe und 100 Klone der PTFE-Anreicherungsreihe durch Vereinzelung isoliert, die enthaltene Plasmid-DNA präpariert und die enthaltene cDNA durch Sequenzierung analysiert. Es zeigte sich, dass mit einzelnen Ausnahmen alle sequenzierten cDNAs ein zusätzliches ATG Startcodon im 5'-Bereich der cDNA enthielten (siehe Abbildung 49A). Weitere Analysen offenbarten, dass die Lage des ATGs mit der im cDNA Synthese Kit enthaltenen Sequenz des RNA Oligonukleotids für die cDNA-Amplifikation enthalten war. Hierbei handelte es sich um den Bereich der Oligonukleotidsequenz, die aus patentrechtlichen Gründen nicht beschrieben war (Abbildung 49B). Die erstellte Genbank ist somit nicht zur Expression der enthaltenen cDNA geeignet.

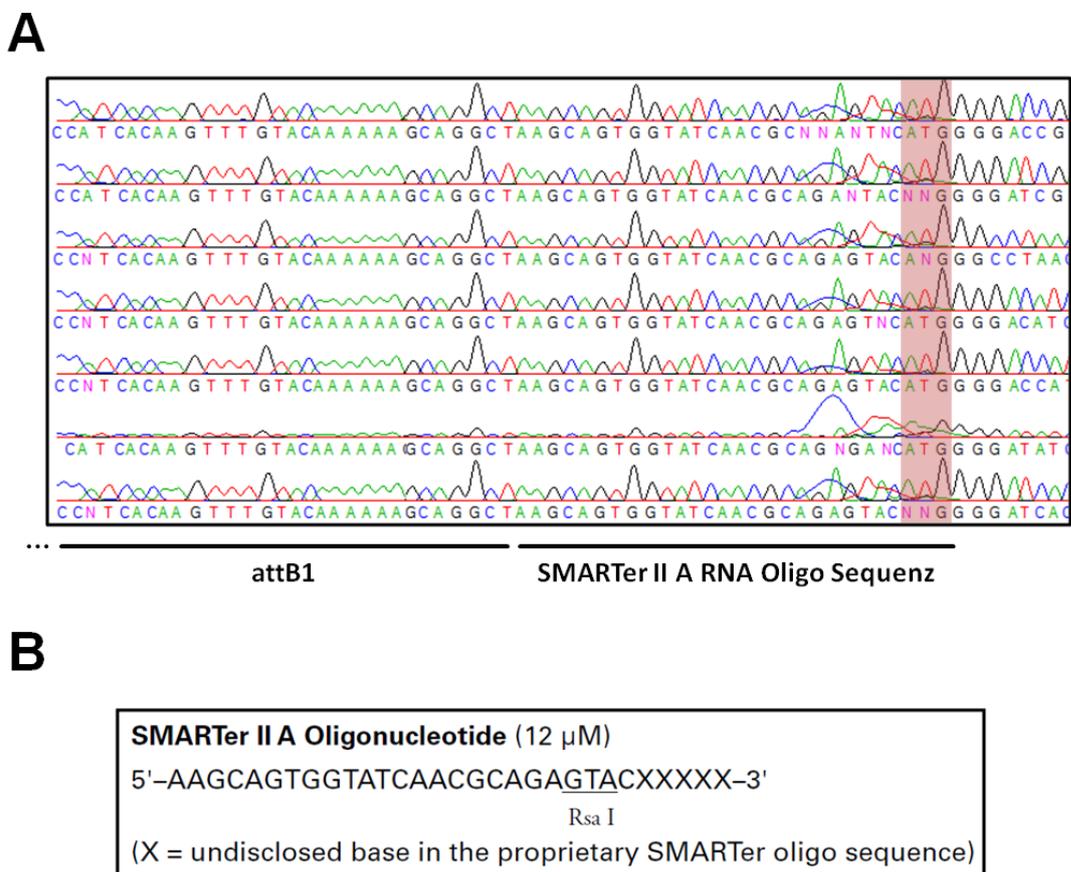


Abbildung 49: Auszug von Sequenzanalysen isolierter Klone und modifizierter Genbank. (A) Exemplarische Sequenzvergleiche isolierter Klone, markiert sind die PCR generierte attB1 Stelle, die verbleibende SMARTer II A RNA Oligonukleotidsequenz, die ein Startcodon vor die klonierte cDNA addiert (B) Auszug aus der Gebrauchsanweisung des SMARTer cDNA Library Construction Kit (User Manual Cat. No. 634929 von März 2010). Das ATG Startcodon ist in der Sequenz nicht angegeben.

6.6.5 PCR-vermittelte Mutagenese ermöglicht die Verwendung der erstellten cDNA-Bank

Um eine Verwendung der erstellten cDNA Bank für Adhäsion-Anreicherungsexperimente zu ermöglichen, wurde das ATG Startcodon mittels PCR-vermittelter Mutagenese der gesamten Plasmid-DNA-Population verändert. Nach erfolgreicher Mutagenese und Klonierung wurde eine Genbank mit einem Titer von $1,7 \times 10^7$ Klonen in pDONR221 erzeugt. Die erfolgreiche Mutagenese wurde mittels Sequenzierung von Stichproben überprüft. Etwa 50% der Klone wurden erfolgreich mutagenisiert und besaßen kein Nonsense-Startcodon (Abbildung 50). Dies entspricht einem effektiven Titer von $8,5 \times 10^6$ Klonen. Durch Klonierung in p416GW konnte eine cDNA Expressionsbank mit einem Titer von $1,5 \times 10^7$ bzw. einem effektiven Titer von $0,75 \times 10^6$ gewonnen werden.

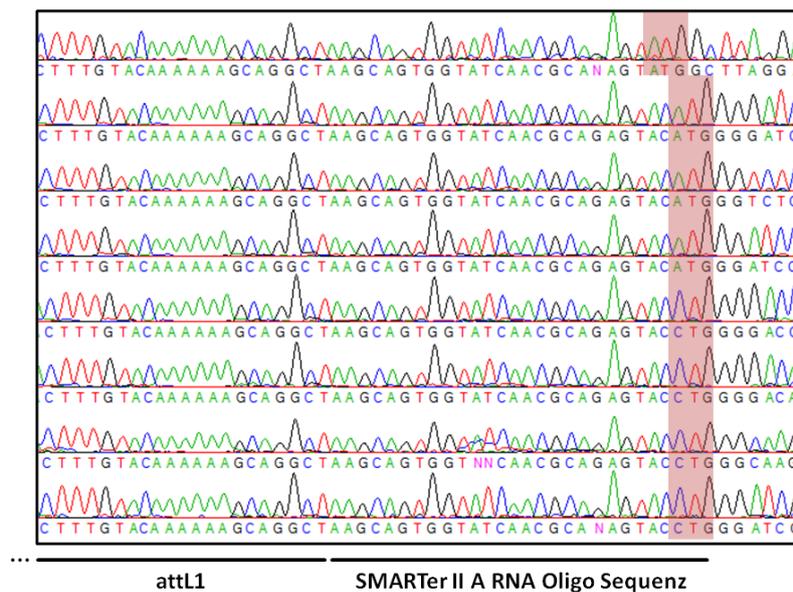


Abbildung 50: Exemplarische Sequenzanalyse der mutagenisierten cDNA Bank in pDONR221. Chromatografische Darstellung des Bereichs um die SMARTer II A RNA Oligonukleotidsequenz; in vier der acht analysierten Sequenzen wurde das ATG erfolgreich zu CTG mutiert. Daher sollten ca. 50% der Klone kein vorzeitiges ATG Startcodon besitzen und eine induzierbare Expression des korrekten Leserahmens aufzeigen. Sequenz 1 zeigt zusätzlich eine Leserastermutation

6.7 Mutagenese von Kernlokalisierungssequenzen von *um04342*

Ausgehend von dem Plasmid pKPH26 wurden Subfragmente von *um04342* amplifiziert. Für die Mutagenese von NLS1 wurden die PCR-Produkte aus einer (attB1_um04342 + um04342-dNLS1_3) und einer (um04342-dNLS1_5 + um04342_attB2) PCR Reaktion als Template für die Amplifikation des Volllängenkonstruktes mittels der Nukleotide attB1_um04342 + um04342_attB2 eingesetzt.

Für die Mutagenese von NLS2 wurden die PCR-Produkte aus einer (attB1_um04342 + um04342-dNLS2_3) und einer (um04342-dNLS2_5 + um04342_attB2) PCR Reaktion als Template für die Amplifikation des Volllängenkonstruktes mittels der Nukleotide attB1_um04342 + um04342_attB2 eingesetzt.

Für die Mutagenese von NLS3 wurden die PCR-Produkte aus einer (attB1_um04342 + um04342-dNLS3_3) und einer (um04342-dNLS3_5 + um04342_attB2) PCR Reaktion als Template für die Amplifikation des Volllängenkonstruktes mittels der Nukleotide attB1_um04342 + um04342_attB2 eingesetzt.

Für die Mutagenese von NLS123 wurden vier PCR-Produkte generiert, verwendete Primerkombinationen umfassen (attB1_um04342 + um04342-dNLS1_3), (um04342-dNLS1_5 + um04342-dNLS2_3), (um04342-dNLS2_5 + um04342-dNLS3_3) und (um04342-dNLS3_5 + um04342_attB2). Alle vier Subfragmente dienten in einer zweiten PCR Reaktion als Template für die Amplifikation des Volllängenkonstruktes mittels der Nukleotide attB1_um04342 + um04342_attB2.

Alle generierten Endkonstrukte wurden über GATEWAY®-BP-Klonierung in den Vektor pDONR221 kloniert und durch Restriktion und Sequenzierung überprüft. Für die Überprüfung der Klone durch Restriktion wurde in jede mutierte NLS-Sequenz eine Schnittstelle eingefügt. Die Mutation der NLS1 führte eine SfiI-Schnittstelle in die mutierte Sequenz ein, die Mutation der NLS2 eine NotI-Schnittstelle und die Mutation von NLS3 ebenfalls eine NotI-Schnittstelle.

Eine schematische Zusammenfassung aller durch PCR-Reaktionen generierten Subfragmente und der verwendeten Oligonukleotide für die Amplifikation findet sich in Abbildung 51.

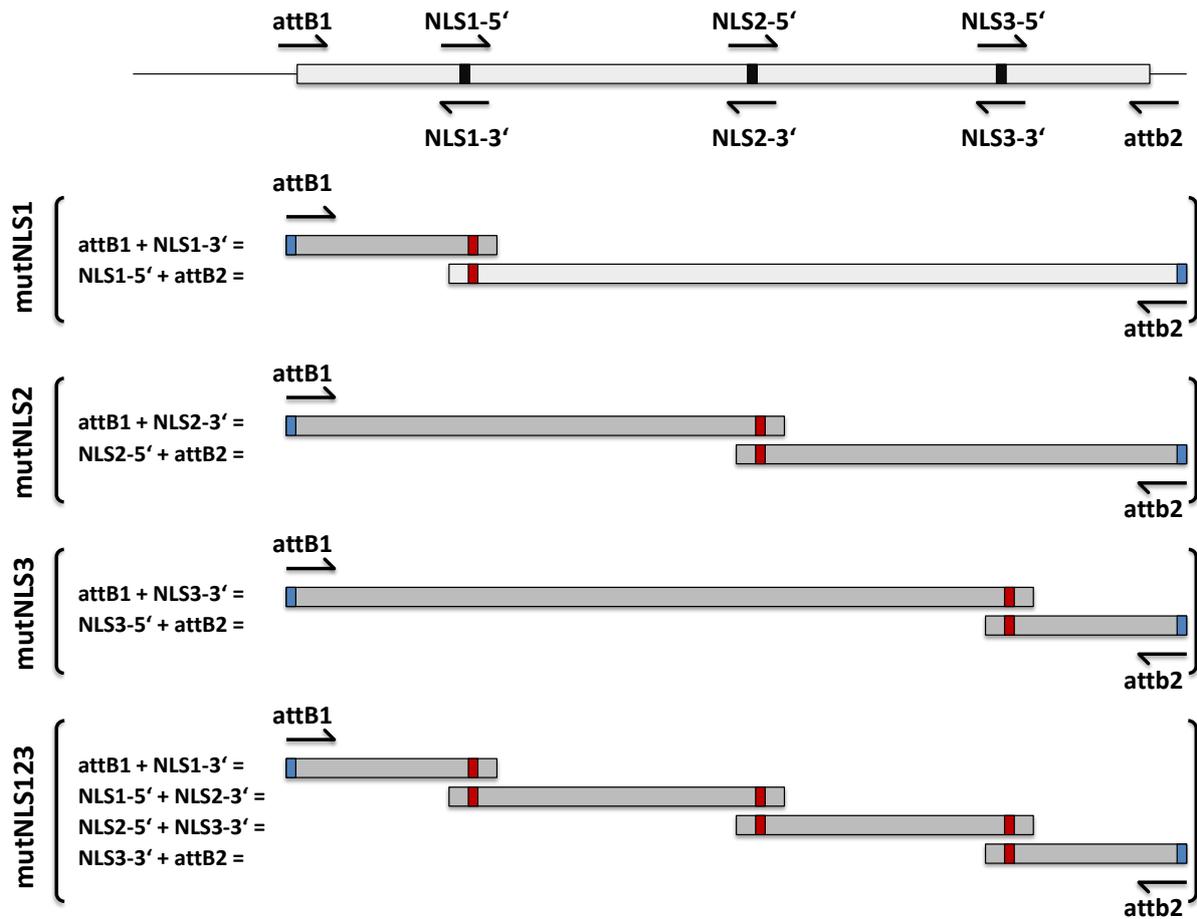


Abbildung 51: Schematische Darstellung der generierten PCR Fragmente zur Mutagenese der NLS Sequenzen. Dargestellt ist die Ausgangssequenz (oben) sowie die PCR-generierten Subfragmente. Mutierte NLS-Sequenzen sind in rot dargestellt, attB-Klonierungsstellen in blau. Die in eine Gesamtkonstrukt-PCR eingesetzten Subfragmente sind jeweils in Klammern eingefasst.

6.8 Amplifikation der Enden der *um04342* mRNA (5'- und 3'-RACE)

Folgende Sequenzen wurden durch die Sequenzierung der 5'- und 3'-Enden der mRNA von *um04342* erhalten:

5'-RACE: 707 bp; der grau markierte Bereich entspricht dem chromosomalen Bereich von Chromosom 04, Position 562360 bis 562855 (Identitiy = 79%) und somit nicht dem 5'-Bereich des genomischen Lokus von *um04342*. Unterstrichen ist der Bereich, der dem annotierten ORF des Gens *um11789* entsprechen würde. Die 5'-RACE muss somit erneut druchgeführt werden, um den tatsächlichen 5'-Bereich der *um04342* mRNA zu bestimmen.

GGACTGACATGGACTGAAGGAGTAGAAAGCAACGTCGCTATGAACGCTTGGCTGCCA
CAAGCCAGTTATCCCTGTGGTAACTTTTCTGACACCTCTAGCTTCAAACTCCGAAGGTCTA
AAGGATCGATAGGCCACGCTTTCACGGTTCGTATTCGTACTGGAAATCAGAATCAAACGA
GCTTTTACCCTTTTGTTCACACGAGATTTCTGTTCTCGTTGAGCTCATCTTAGGACACCTG
CGTTATCTTTAACAGATGTGCCGCCCCAGCCAAACTCCCCACCTGACAATGTCTTCCGCC
CGGATCGGCCCGGCGAGGCCGGGCCTTGGAGCCAAAAGGAGGGGCGGTGCCCCGCTTCC
GACCCACGGAATAAGTAAAATAACGTTAAAAGTAGTGGTATTTCACTTGCGCCCGGAGGC
TCCCACCTTATCCTACACCTCTCAAGTCATTTACAAAAGTCGGACTAGAGTCAAGCTCAAC
AGGGTCTTCTTTCCCGCTGATTCCGCCAAGCCCGTTCCCTTGGCTGTGGTTTCGCTGGAT
 AGTAGACAGGGACAGTGGGAATCTCGTTAATCCATTCATGCGCGTCACTAATTAGATGAC
 GAGGCATTTGGCTACCTTAAGAGAGTCATAGTTACTCCCGCCGTTTACCCGCGCTTGGTTG
 AATTTCTTCACTTTGACATTCAGTGTCCCTCGTGCTCCAGTCGA

3'-RACE: 198 bp des 3'-Bereichs im genomischen Lokus von *um04342*. Unterstrichen ist der Bereich, der dem 3'-Ende von *um04342* entspricht, in grau der Poly-A-Bereich und die angrenzende RACE-Primer-Sequenz.

↓ *um04342* ORF ↓

STOP ↓

GTGGTGGTGTCTGCTGCTACCATGACATTTAACGGTATCGGTAAAGACCACCTCTCTCTGCG
CTTCCCCGCACGCCTCCCTCTTTTGATAACGTCCTCCTTACATGCTAGGCTACGTCTGTTGC
GTGTCGATCAGATCACACAGGTCCTAGATATCCACTATCTTTTCACATTCGCTCCGTTTTC
TTTCCATCTTGACCAAACAATGTCACACACCACTGTCAATTTTTCTTGGCTACCAGCTTAAA
 AAAAAAAAAAAAAAAAAACACTGTCATGCCGTTACGTAGCG

6.9 Digitale Datensätze

Auf der beiliegenden DVD befinden sich folgende digitalen Datensätze:

- I. Expressionsdaten sekretierter Proteine mit Sequenzwiederholungen nach (Müller *et al.* 2008b)
- II. Expressiondaten identifizierter Adhäsinhomologe
- III. Datensätze und mikroskopische Aufnahmen für Adhäsionsanalysen mit *U. maydis*
- IV. Datensätze und mikroskopische Aufnahmen für Adhäsionsanalysen mit *S. cerevisiae*
- V. Sequenzierdaten der 166 isolierten Klone aus der ersten Anreicherungsreihe
- VI. Sonstige Sequenzierdaten

Danksagung

Zuallererst möchte ich mich bei Jörg Kämper für die letzten fünf Jahre bedanken, für die Übernahme als Diplomand und Doktorand, für die Mitnahme nach Karlsruhe, für die Möglichkeit, während meiner Dissertation an einem spannenden Projekt zu arbeiten und für die wissenschaftliche Betreuung und auch alles nich-wissenschaftliche Miteinander.

Danke auch an Reinhard Fischer für die Übernahme des Koreferendums. Und natürlich sowohl an Reinhard Fischer wie auch Natalia Requena, da ihr mich und die anderen Kämpers an „eurer“ Westhochschule mit offenen Armen empfangen habt und mir während meiner Zeit als Doktorand stets mit Rat und Tat zur Seite gestanden seid.

Ein weiterer Dank geht an Regine Kahmann aus Marburg für die unpublizierte Proteinsequenz von Uh06791, Karen Snetselaar aus Philadelphia (USA) für die unpublizierten elektronenmikroskopischen Aufnahmen und Stefan Brückner und Hans-Ulrich Mösch aus Marburg für die *S. cerevisiae*-Stämme YHUM0909 und YHUM0924.

Mein größter Dank gilt meinen Eltern Gernot und Cornelia, die mich stets auf meinen Wegen unterstützt haben, ob nun finanziell oder seelisch, und ohne die ich und diese Arbeit nie zustande gekommen wären. Ich danke euch für die Liebe und Geduld, die ich in all den Jahren durch euch erfahren durfte.

Ebenso danke ich meinem Bruder Markus, der immer ein offenes Ohr oder auch mal eine offene Tür für mich hatte. Ich hoffe, dass wir in absehbarer Zeit wieder einmal mehr miteinander unternehmen können.

Ein ganz großer Dank geht an all meine Mitstreiter, die ich in den letzten Jahren das Glück hatte kennenzulernen, allen voran natürlich Miro. Ohne dich wäre ich vermutlich nicht, wo ich heute bin, und wenn ich jemanden den Titel „my Brother-from-another-mother“ verleihen würde, dann sicherlich dir. Auch Anna danke ich an dieser Stelle herzlich, danke dass du schon so manches bereits verloren geglaubte Experiment in deinen glücklichen Händen doch noch zum Erfolg gebracht hast. Danke an Nikola, für die gemeinsamen Jahre, in denen wir von „den zwei Jungen“ zu „den zwei Alten“ wurden, während wir „füßelten“ oder vielleicht auch einfach nur „Die Dinos“ schauten. Und selbstverständlich danke ich auch herzlich allen anderen „Kämpers“ und „Ex-Kämpers“, Ramon, „Jung-Prof“ Kai und Al für die chaotische Zeit in unserer Anfangsphase, David, Thorsten, Sebastian und natürlich auch Sarah fürs mitmachen und mitlachen, und den „Ehren-Kämpers“ Silke, Christian, Nina und Matthias.

Zuletzt möchte ich mich bei all denen bedanken, die mich in den letzten Jahren begleitet und unterstützt haben. Vielen Dank an Kadda und an Margot für mein „zweites Zuhause“. Danke an Marcus und Holger für eine ereignisreiche Zeit außerhalb des Labors, und danke an alle „Bieberer“ sowie den ganzen Rest meiner Familie, die ich an dieser Stellen aus Platzgründen nicht einzeln nennen kann.

Liste der wissenschaftlichen Veröffentlichungen

Zum Zeitpunkt der Abgabe der Dissertation lag keine Autorenschaft bei einer wissenschaftlichen Veröffentlichung vor.

Konferenzbeiträge

Adhesion of *Ustilago maydis* at the onset of pathogenic development (Münster 2009)

- 09/2009 Poster: Molecular Biology of Fungi, 9th VAAM-Symposium, Marburg
- 04/2011 Poster: Annual Conference of the Association for General and Applied Microbiology (VAAM), Karlsruhe
- 03/2011 Poster: 26th Fungal Genetics Conference, ASilomar Conference Center, Pacific Grove, USA (CA)
- 09/2011 Poster: Molecular Biology of Fungi, 10th VAAM-Symposium, Marburg
- 04/2011 Poster: Annual Conference of the Association for General and Applied Microbiology (VAAM), Karlsruhe

Lebenslauf

Personalien:

Kai Patrick Hofmann

geboren am 23. Juni 1983 in Gießen, Hessen

Schulbildung:

1989 – 1994 Gesamtschule Biebertal

1994 – 2002 Gymnasium der Herderschule Gießen

Abschluss: Abitur mit der Gesamtnote 1,2

Zivildienst:

2002 – 2003 Zivildienst in der Individuellen Schwerstbehindertenbetreuung bei Kindern

Studium:

2003-2005 Grundstudium an der Philipps-Universität Marburg

2005-2008 Hauptstudium an der Philipps-Universität Marburg

Abschluss: Diplom in Biologie mit der Gesamtnote 1,2

Promotion:

2008 – 2012 Doktorarbeit am Karlsruher Institut für Technologie (KIT) zum Thema „Die Rolle sekretierter Proteine zu Beginn der pathogenen Entwicklung von *Ustilago maydis*“.

Betreuer: Prof. Dr. Jörg Kämper

Sonstiges:

2011 Erhalt eines „Abschlussstipendiums“ nach dem Landesgraduier-
förderungsgesetz

Erklärung

Der experimentelle Teil der vorliegenden Arbeit wurde in der Abteilung Genetik des Instituts für Angewandte Bioswissenschaften (IAB) am Karlsruher Institut für Technologie (KIT) in der Zeit von November 2008 bis Mai 2012 durchgeführt.

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe. Wörtlich oder inhaltlich übernommene Stellen wurden als solche kenntlich gemacht.

Weiterhin habe ich die Regeln zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis im Karlsruher Institut für Technologie (KIT) in der gültigen Fassung vom 09. Juli 2010 und die der universität Karlsruhe vom 15. Januar 2002 beachtet.

Ort, Datum

Kai Patrick Hofmann