



**Mechanismus der Clp1-vermittelten  
Inhibition der bW- und Rbf1-Funktion in  
*Ustilago maydis***

Zur Erlangung des akademischen Grades eines

DOKTORS DER NATURWISSENSCHAFTEN

(Dr. rer. nat.)

der KIT-Fakultät für Chemie und Biowissenschaften

des Karlsruher Instituts für Technologie (KIT)

genehmigte

DISSERTATION

von

Benjamin Faist

aus

Achern

KIT-Dekan: Prof. Dr. Willem Klopper

Referent: Prof. Dr. Jörg Kämper

Korreferent: Prof. Dr. Holger Puchta

Tag der mündlichen Prüfung: 27.04.2017

Die Untersuchungen zur vorliegenden Arbeit wurden zwischen dem 01. Juli 2012 und dem 31. März 2016 in der Abteilung Genetik am Institut für Angewandte Biowissenschaften des Karlsruher Instituts für Technologie in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Jörg Kämper durchgeführt.

Vom Fachbereich Biologie  
des Karlsruher Institut für Technologie als Dissertation  
angenommen am:14.03.2017

Hiermit erkläre ich, die Doktorarbeit mit dem Titel „Mechanismus der Clp1-vermittelten Inhibition der bW- und Rbf1-Funktion in *Ustilago maydis*“ selbstständig verfasst und keine anderen als die im Text angegebenen Hilfsmittel verwendet zu haben. Wörtliches oder indirekt übernommenes Gedankengut ist nach bestem Wissen als solches gekennzeichnet worden.

Die Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

Karlsruhe, März 2017

---

Benjamin Faist

## Abkürzungsverzeichnis

<b>Amp</b>	Ampicillin	<b>Nat</b>	Nourseothricin
<b>bE</b>	bEast	<b>mCherry</b>	Rot fluoreszierendes Protein
<b>bp</b>	Basenpaar(e)	<b>NLS</b>	Kernlokalisationssequenz
<b>BSA</b>	Rinder Serumalbumin	<b>N-terminal</b>	aminoterminal
<b>BLAST</b>	basic local alignment searchtool	<b>OD</b>	Optische Dichte
<b>bW</b>	bWest	<b>OD600</b>	Optische Dichte bei 600 nm
<b>Cbx</b>	Carboxin	<b>ORF</b>	Offener Leserahmen
<b>ChIP</b>	Chromatinimmuno- präzipitation	<b>PCR</b>	Polymerase Kettenreaktion
<b>ChIP-Seq</b>	Chromatinimmuno- präzipitation mit anschließender Sequenzierung	<b>PEG</b>	Polyethylenglycol
<b>CM</b>	Komplexmedium	<b>P<sub>xy</sub></b>	Promotor
<b>C-terminal</b>	carboxyterminal	<b>qRT-PCR</b>	Quantitative Realtime PCR
<b>DIG</b>	Digoxigenin	<b>Upm</b>	Umdrehung pro Minute
<b>DMSO</b>	Dimethylsulfoxid	<b>RNase</b>	Ribonuklease
<b>DNA</b>	Desoxyribonuklein-säure	<b>TE</b>	Tris-HCL/EDTA
<b>dNTP (N)</b>	Desoxynukleosid-triphosphat	<b>Tris</b>	Trishydroxymethylaminomethan
<b>EDTA</b>	Ethylendiamintetra- essigsäure	<b>U</b>	Unit (Enzymaktivitätseinheit)
<b>GFP</b>	grün fluoreszierendes Protein	<b>UV</b>	Ultraviolettes Licht
<b>H2Obid.</b>	Zweifach destilliertes Wasser	<b>V</b>	Volt
<b>IP</b>	Immunopräzipitation	<b>Wt</b>	Wildtyp
<b>Kan</b>	Kanamycin		
<b>kb</b>	Kilobasenpaar(e) = 1000 bp		

## Zusammenfassung

Bei dem dimorphen Basidiomyceten *Ustilago maydis* geht die pathogene Entwicklung mit der Koordination und Verknüpfung verschiedener Signalwege einher. Voraussetzung für die sexuelle Entwicklung ist die Möglichkeit der Penetration der Wirtspflanze Mais. Um dies zu gewährleisten, muss zunächst ein filamentöses Dikaryon gebildet werden, was durch die gegenseitige Erkennung und Verschmelzung kompatibler Sporidien ermöglicht wird. Dieser Vorgang wird durch ein Pheromon/Rezeptorsystem vermittelt, welches vom *a*-Kreuzungstyp-Locus kodiert wird. Durch Aktivierung der Pheromon-Signalkaskade kommt es zu einem Zellzyklusarrest in der G2-Phase und der Ausbildung der Konjugationshyphen. Nach der Fusion der Konjugationshyphen ist der durch den *b*-Locus kodierte heterodimere Transkriptionsfaktor bE/bW für die weitere Kontrolle der pathogenen Entwicklung verantwortlich. Die Expression von bE/bW ist notwendig für die Aufrechterhaltung des Zellzyklusarrest und des filamentösen Wachstums. In vorangegangenen Studien konnten 345 b-regulierte Gene identifiziert werden. 90% dieser Gene werden allerdings nicht direkt, sondern über den bE/bW induzierten C2H2-Zinkfinger-Transkriptionsfaktor Rbf1 reguliert. Eines der wenigen direkt durch bE/bW regulierten Gene ist *clp1*. Die Deletion von *clp1* führt dazu, dass in den dikaryotischen Zellen keine Schnallenzellen ausgebildet werden, eine für die Zellteilung typische Struktur, und der Pilz nicht weiter in der Pflanze proliferieren kann. Dabei konnte bisher nicht nachvollzogen werden, wie die Kerne in der Hyphe der Clp1-Deletionsstämme verteilt sind, da eine NLS:GFP-Fusion nicht für die Lokalisation der Kerne ausreicht. Durch Ko-Expression von bE/bW und Clp1 sowie Rbf1 und Clp1 wird der Zellzyklusarrest aufgehoben und das filamentöse Wachstum unterbunden (Scherer *et al.*, 2006; Heimel *et al.*, 2010a).

Clp1 interagiert sowohl mit bW als auch mit Rbf1; die Interaktion mit bW führt zu einem Verlust der b-Funktion, wodurch 95% der b-abhängigen Gene nicht mehr exprimiert werden. Die Ko-Expression von Clp1 mit Rbf1 führt zu einer spezifischen Repression der Gene für das Pheromon und den Pheromonrezeptor, was zu einer Unterdrückung der Pheromonantwort, sowohl auf morphologischer als auch regulatorischer Ebene führt (Heimel *et al.*, 2010a). Clp1 fungiert somit

als Modulator für beide zentralen Transkriptionsfaktoren in der pathogenen Entwicklung.

Ein Aspekt der Arbeit war die Untersuchung der Kernverteilung in der dikaryotischen Hyphe nach der Pflanzenpenetration. In *clp1*-Deletionsstämmen konnten bisher keine Kerne innerhalb der Pflanze beobachtet werden. Durch die Verwendung einer H1:3xmCherry und einer NLS:GFP-Fusion war es möglich die Kerne und deren Migration zu erfassen. Dabei wurde festgestellt, dass die Kerne in den Clp1-Deletionsstämmen im Appressorium verbleiben und die Mitose bereits während der Appressorienbildung startet. Clp1 ist somit nicht nur an der Aufhebung des Zellzyklusarrests beteiligt, sondern scheint eine Rolle bei der Initiierung der Mitose und der damit verbundene Kernwanderung zu spielen. Ein in *M. oryzae* untersuchter Mechanismus, bei dem die Appressorienbildung abhängig vom Eintritt der Kerne in die Mitose ist, kann aufgrund der im Zusammenhang dieser Arbeit gemachten Beobachtungen auf *U. maydis* übertragen werden. Eine weitere Fragestellung der vorliegenden Arbeit war, wie Clp1 als Modulator der Genexpression agieren kann. Eine Möglichkeit für die Clp1-Funktion könnte eine veränderte Bindungsaffinität der Transkriptionsfaktoren durch die Clp1-Interaktion darstellen. Im Laufe der Untersuchungen zeigte sich jedoch, dass Clp1 keinen direkten Einfluss auf die Bindungsaffinität von Rbf1 besitzt. Dies war unabhängig von der Expression des bE/bW-Heterodimers beobachtbar. Gezeigt werden konnte weiterhin, dass die Interaktionen von b, Rbf1 und Clp1 eine komplexe Kombinatorik aufweisen, um die Regulation der verschiedenen Gene zu ermöglichen. Dabei wurde die Hypothese aufgestellt, dass die Inhibition der bE/bW-regulierten Gene möglicherweise durch eine Kombination von Rbf1 mit Clp1 erfolgt. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die Repressorfunktion von Rbf1 in Kombination mit Clp1 indirekt in den Promotorbereichen des  $\alpha$ -Locus wirkt. Durch diesen Ansatz konnten erste Schritte zur Auflösung der komplexen Regulationsmaschinerie durch bE/bW, Rbf1 und Clp1 gesetzt werden.

## INHALTSVERZEICHNIS

<b>1. EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Ustilago maydis .....</b>	<b>1</b>
<b>1.2 Kontrolle der pathogenen Entwicklung durch Paarungstyploci.....</b>	<b>2</b>
1.2.1 Zell-Zellerkennung durch den <i>a</i> -Locus .....	3
1.2.2 Regulation durch den <i>b</i> -Locus .....	5
1.2.3 Die <i>b</i> abhängige Regulationskaskade.....	6
1.2.4 Rbf1 als zentraler Regulator der <i>b</i> -Regulationskaskade.....	7
<b>1.3 Einfluss von Clp1 auf die pathogene Entwicklung.....</b>	<b>9</b>
1.3.1 Die Chromatinimmunopräzipitation.....	14
<b>1.4 Zielsetzung der Arbeit.....</b>	<b>18</b>
<b>2. ERGEBNISSE .....</b>	<b>19</b>
<b>2.1 Clp1 in der biotrophen Wachstumsphase .....</b>	<b>19</b>
<b>2.2 Visualisierung der Zellkerne durch H1:mCherry Fusion.....</b>	<b>19</b>
2.2.1 Beobachtung der Zellkerne im Dikaryon auf- und innerhalb der Pflanze.....	24
2.2.2 Clp1 beeinflusst die Zellmigration vor der Schnallenzellenbildung .....	27
<b>2.3 Clp1 in der saprophytischen Wachstumsphase.....</b>	<b>31</b>
2.3.1 Einfluss von Clp1 auf die Rbf1 Bindung im <i>dik6</i> -Promotor .....	31
2.3.2 Chromatinimmunopräzipitation und Real-Time-PCR-Analyse.....	35
2.3.3 ChIP-Seq – Analyse und Qualitätskontrolle .....	41
2.3.1 Leichte Verschiebung der Rbf1 Bindung im <i>dik6</i> -Promotor .....	47
2.3.2 Rbf1 Bindung und Expressionsdaten im <i>a</i> -Locus zeigen keine Korrelation .....	48
2.3.3 Einfluss von Clp1 auf Rbf1 Bindung bei <i>b</i> /Rbf1 regulierten Genen.....	50
2.3.4 Keine positive Rückkopplung von Rbf1 .....	61
<b>3. DISKUSSION.....</b>	<b>65</b>
<b>3.1 Clp1 in der biotrophen Wachstumsphase .....</b>	<b>65</b>
3.1.1 H1:3mCherry Fusionsprotein ermöglicht Kernlokalisierung in planta .....	65
3.1.2 Einfluss der pathogene Entwicklung durch Clp1 während der Appressorienbildung.....	67
<b>3.2 Clp1 in der saprophytischen Wachstumsphase.....</b>	<b>71</b>
3.2.1 Signifikante ChIP-Seq-Daten .....	71
3.2.2 Mögliche Repressorfunktion durch <i>b</i> , Rbf1 und Clp1 Interaktion.....	73
3.2.3 Indirekte und direkte Repression durch Rbf1-Clp1-Interaktion.....	74
3.2.4 Komplexe Kombinatorik der <i>b</i> , Rbf1 und Clp1 Interaktion.....	77
3.2.5 Rbf1 Regulation .....	83
3.2.6 Die Clp1-abhängige Repression ist nicht auf die Rbf1 Bindung zurückzuführen .....	84
<b>4. MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>87</b>
<b>4.1 Stämme .....</b>	<b>87</b>
4.1.1 Escherichia coli Stamm .....	87
4.1.2 Ustilago maydis Stämme.....	87

<b>4.2</b>	<b>Verwendete Plasmide .....</b>	<b>88</b>
4.2.1	Ausgangsplasmide.....	88
4.2.2	In der Arbeit angefertigte Plasmide .....	89
4.2.3	In dieser Arbeit verwendete Oligonukleotide.....	90
<b>4.3</b>	<b>Material und Bezugsquellen .....</b>	<b>92</b>
4.3.1	Enzyme, Proteine, Antikörper und Nukleinsäuren.....	92
4.3.2	Puffer Lösungen und Medien.....	94
4.3.3	Verwendete Kits .....	99
<b>4.4</b>	<b>Mikrobiologische und biochemische Methoden .....</b>	<b>100</b>
4.4.1	Kultivierung von <i>U. maydis</i> .....	100
4.4.2	Kultivierung von <i>E.coli</i> .....	102
4.4.3	Chromatin Immunopräzipitation Ustilago (ChIP).....	104
<b>4.5</b>	<b>Molekularbiologische Standardmethoden.....</b>	<b>106</b>
4.5.1	Handhabung von Nukleinsäuren .....	106
4.5.2	In vitro-Modifikationen von DNA (Sambrook et al. 1989).....	109
4.5.3	Gelelektrophorese von Nukleinsäuren und Transfer auf Membranen .....	111
4.5.4	Sequenzanalysen.....	113
<b>4.6</b>	<b>PCR-Techniken.....</b>	<b>116</b>
4.6.1	Polymerase-Kettenreaktion (PCR) (Innis und Gelfand, 1990).....	116
4.6.2	Real-Time-PCR (qRT-PCR) .....	117
<b>5.</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>119</b>

## 1. Einleitung

### 1.1 *Ustilago maydis*

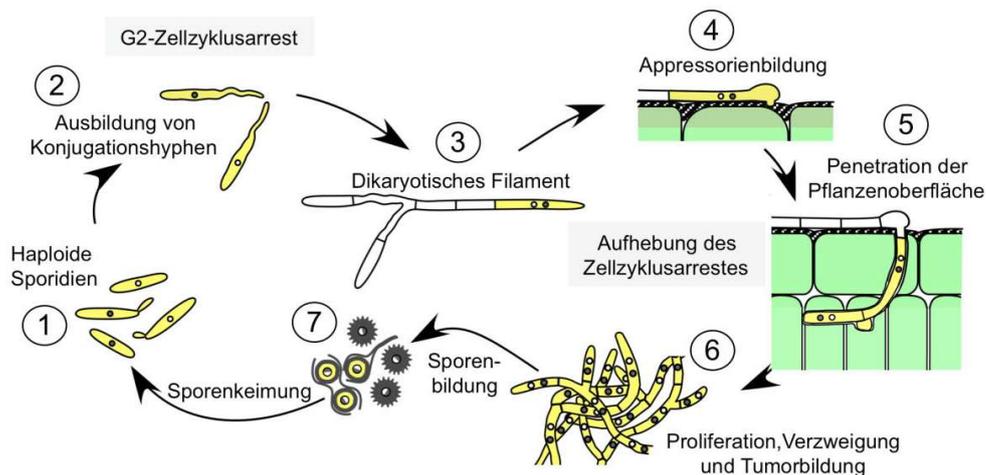
*U. maydis* ist ein phytopathogener Pilz aus der Klasse der Heterobasidiomyceten und gehört zu der Ordnung der Ustilaginales, aus der Familie der Ustilaginaceae. *U. maydis* besitzt ein sehr spezifisches Wirtsspektrum, welches mit Mais (*Zea mays*) und Teosinte (*Euchlena mexicana*), der Wildform des Kulturmaises, nur zwei Pflanzenarten umfasst.

Aufgrund der charakteristischen Symptome bei Infektion der Wirtspflanze wird *U. maydis* auch als Maisbrandpilz bezeichnet. Nach der Infektion treten Chlorosen und Anthocyanosen an der Pflanze auf und es kommt zur Ausbildung von Gallen und Tumoren. Nach Aufbruch des Tumors werden die darin enthaltenen Teliosporen freigesetzt. Die starke Melanisierung der Teliosporen lässt die Pflanze wie verbrannt aussehen. Dennoch ist *U. maydis* ein essbarer Pilz. In Mexiko werden die befallenen Kolben zu „Cuitlacoche“ verarbeitet und gelten dort als Delikatesse.

Eine wichtige Rolle nimmt *U. maydis* als Modellorganismus für die Untersuchung pathogener Organismen ein. *U. maydis* durchläuft einen dimorphen Lebenszyklus (Abb. 1). Der Pilz besitzt eine haploide, saprophytische, nicht pathogene Phase, bei der er sich außerhalb der Pflanzen in Form von Sporidien mittels hefeartiger Knospung vermehren kann. Diese Tatsache lässt eine einfache Kultivierbarkeit unter Laborbedingungen zu.

Um Pflanzen infizieren zu können, müssen kompatible Sporidien eine sogenannte Konjugationshyphne ausbilden. Hierbei kommt es zu einer Zell-Zell-Fusion und zur Bildung eines Heterodikaryons (Snetselaar K.M. und Mims 1992; 1993). Nachdem ein Kreuzungspartner wahrgenommen wurde, kommt es zu einem Zellzyklusarrest im G2-Stadium (Garcia-Muse *et al.*, 2003; Sgarlata und Perez-Martin, 2005), der auch nach der Fusion der Sporidien anhält. Dadurch ist es *U. maydis* nur möglich ein Längenwachstum zu vollziehen, aber keine Zellteilung durchzuführen. Durch Septierung kommt es zur Kompartimentbildung in der Hyphne, wobei nur das apikale Kompartiment mit Zytoplasma gefüllt ist (Banuett und Herskowitz, 1994). Der Zellzyklusarrest wird erst wieder aufgehoben, wenn

die Hyphe die Pflanze an einer geeigneten Stelle penetriert. Zur Penetration werden Appressorien-ähnliche Strukturen ausgebildet (Snetselaar K.M. und Mims 1992; 1993). Durch Sekretion lytischer Enzyme kann der Pilz dann in die Pflanze eindringen (Kahmann *et al.*, 2000). Anschließend kann sich *U. maydis* in der Pflanze verbreiten, wodurch es mit fortschreitender Infektionsdauer zur Ausbildung von Tumoren kommt, in denen die diploiden Teliosporen erzeugt werden. Durch Aufbruch der Tumore werden die Sporen freigesetzt und können durch Wind, Regen oder Insekten verbreitet werden. Die Teliosporen sind die Überdauerungsform des Pilzes, die bei geeigneten Bedingungen auskeimen. Dabei werden durch Meiose vier haploide Kerne erzeugt, die in die Probasidie einwandern. Durch sukzessive Sprossung werden die haploiden Sporidien von der septierten Probasidie abgeschnürt (Christensen, 1963).



**Abbildung 1: Lebenszyklus von *U. maydis*** Schematische Darstellung des dimorphen Lebenszyklus von *U. maydis*. Saprophytische Phase als haploide Sporidien. Nach Erkennung eines Kreuzungspartners wird die Konjugationshyphe ausgebildet. Die anschließende Zell-Zell-Fusion führt zum dikaryotischen Filament. Sobald eine geeignete Stelle auf der Pflanze gefunden wurde, kommt es zur Appressorienbildung und zur Penetration der Pflanze. Nach der Proliferation in der Pflanze werden die Sporen gebildet, aus denen bei der Keimung die haploiden Sporidien hervorgehen (modifiziert nach Kämper *et al.*, 2006).

## 1.2 Kontrolle der pathogenen Entwicklung durch Paarungstyploci

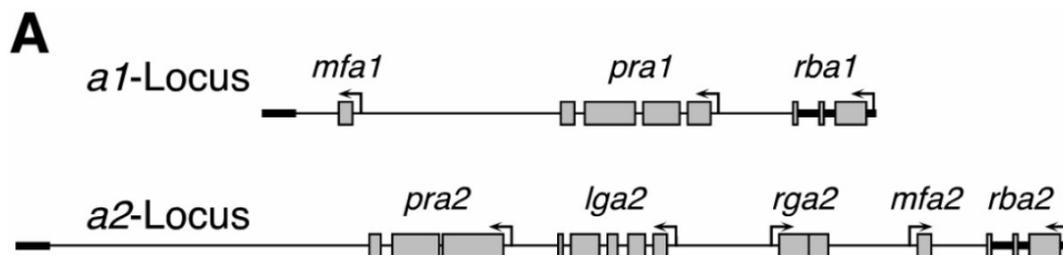
Für die pathogene Entwicklung von *U. maydis* müssen zwei kompatible Sporidien miteinander fusionieren. Für die Erkennung und die anschließende Fusion zur Umstellung von saprophytischer auf biotrophe Lebensweise sind die Paarungstyploci *a* und *b* notwendig. Nur wenn beide Fusionspartner kompatible Allele des biallelischen *a*-Locus und des multiallelischen *b*-Locus aufweisen, ist es dem Pilz

möglich, die Wirtspflanze zu infizieren und die sexuelle Entwicklung zu durchlaufen. Durch das tetrapolare Kreuzungssystem wird gewährleistet, dass sich keine genetisch identischen Partner kreuzen was zur Erhaltung der genetischen Variabilität beiträgt.

### 1.2.1 Zell-Zell-Erkennung durch den $a$ -Locus

Der biallelische  $a$ -Locus ( $a1$  und  $a2$ ) kontrolliert die Zell-Zell-Erkennung und die anschließende Fusion durch ein Pheromon-Rezeptor-System. Hierbei kodieren die Gene des  $a$ -Locus für das Pheromon Mfa (*mating factor a*) und den Pheromonrezeptor Pra (*pheromom receptor a*). Nur Kreuzungspartnern mit unterschiedlichen Allelen ist es möglich, zu fusionieren und die sexuelle Entwicklung zu starten (Bölker *et al.*, 1992).

Die Pheromonvorläufer Mfa1 und Mfa2 bestehen aus 40 bzw. 38 Aminosäuren. Durch posttranslationelle Modifikation entstehen daraus die 13 bzw. 9 Aminosäuren langen Pheromone, die am C-terminalen Ende farnesyliert und methyliert werden (Spellig *et al.*, 1994).



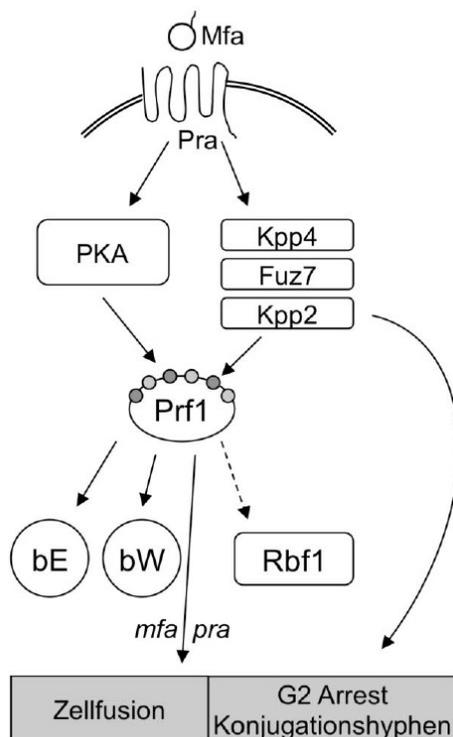
**Abbildung 2: Schematische Darstellung des  $a1$ - und des  $a2$ -Locus.**  $mfa1$  und  $mfa2$  kodieren für die Pheromonvorläufer,  $pra1$  und  $pra2$  kodieren für die Pheromonrezeptoren. Zusätzlich sind im  $a2$ -Locus noch die Gene  $lga2$  und  $rga2$  enthalten, welche für die uniparentale Vererbung mitochondrialer DNA notwendig sind (Abbildung aus Brachmann, 2001).

Die Pheromonrezeptoren Pra1 und Pra2 sind Polypeptide mit 357 bzw. 346 Aminosäuren und besitzen je sieben Transmembrandomänen. Sie zählen zu den STE3-ähnlichen Pheromonrezeptoren, welche an heterotrimere G-Proteine gekoppelt sind (Bölker *et al.*, 1992).

Zusätzlich zu den Pheromon- und Rezeptorgenen beinhaltet der  $a2$ -Locus die Gene  $lga2$  und  $rga2$  (siehe Abb. 2). Diese beiden Gene spielen keine Rolle in der Zell-Zell-Erkennung, sondern sind verantwortlich für die uniparentale Vererbung

mitochondrialer DNA und der Regulation der mitochondrialen Spaltung und Fusion (Fedler *et al.*, 2009; Mahlert *et al.*, 2009).

Nach der Erkennung zweier haploider kompatibler Sporidien durch das Pheromonrezeptorsystem erfolgt eine Arretierung des Zellzyklus in der G2-Phase und es kommt zur Ausbildung der Konjugationshyphen, die entlang des Pheromongradienten aufeinander zuwachsen und anschließend miteinander fusionieren (Garcia-Muse *et al.*, 2003; Snetselaar K. M. *et al.*, 1996; Spellig *et al.*, 1994). Nach Bindung des Pheromons kommt es zur Auslösung einer Signalkaskade, in der die Proteinkinase A und eine Mitogen-aktivierte Protein-Kinase (MAPK) eine zentrale Funktion einnehmen. Über den Transkriptionsfaktor Prf1 (*pheromone response factor 1*) kommt es zur Induktion verschiedener Zielgene in Abhängigkeit seines Phosphorylierungsstatus. Zu diesen Zielgenen gehören *prf1* selbst, die Gene des *a*-Locus *mfa* und *pra*, die Gene des *b*-Locus *bE* und *bW* (Hartmann *et al.*, 1996; Urban *et al.*, 1996) und der C2H2-Zinkfinger-Transkriptionsfaktor Rbf1. Die Regulation von *prf1* erfolgt über die sogenannten PRE-Elemente (*pheromone response elements*), die in den jeweiligen Promotorbereichen der Zielgene liegen. Durch die positive Rückkopplung von *prf1* wird die Pheromonantwort deutlich verstärkt und das polare

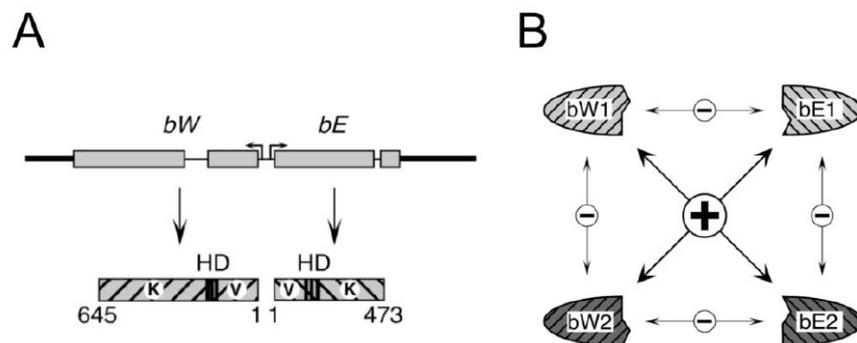


**Abbildung 3: Schematische Darstellung der Pheromonkaskade.** Mfa bindet an den Pheromonrezeptor Pra und löst eine Signaltransduktionskaskade aus. Hierbei sind Kpp4, Fuz7 und Kpp2 Bestandteile der MAPK-Kaskade, welche durch Phosphorylierung von Prf1 eine Signalweiterleitung ermöglichen. Prf1 bindet an die PRE-Elemente und induziert die pathogenitätsrelevanten Zielgene. Der G2-Zellzyklusarrest sowie die Ausbildung der Konjugationshyphen wird unabhängig von Prf1 durch Kpp2 reguliert (Abbildung aus Heimel *et al.*, 2010b).

Wachstum der Konjugationshyphen entlang der Pheromongradienten ist möglich (Hartmann 1997; Snetselaar K. M. *et al.*, 1996). Nach der Fusion der Sporidien kommt es zur Repression von *mfa* und *pra* durch die Bildung eines kompatiblen Heterodimers von *bE* und *bW* (Urban *et al.*, 1996) (Abb. 3).

### 1.2.2 Regulation durch den *b*-Locus

Nach der Fusion zweier kompatibler Sporidien wird die weitere Entwicklung zur biotrophen Lebensweise durch den multiallelischen *b*-Locus reguliert. Mit mindestens 19 verschiedenen Allelen ist hierbei eine hohe genetische Variabilität möglich. Der *b*-Locus besteht aus den Genen *bEast* (*bE*) und *bWest* (*bW*), die durch einen gemeinsamen 200bp großen Promotorbereich divergent transkribiert werden. Die jeweiligen Proteine haben eine Länge von 645 Aminosäuren (*bW*) und 473 Aminosäuren (*bE*). Trotz geringer Sequenzhomologien weisen die beiden Proteine eine strukturelle Ähnlichkeit auf. Die einzelnen Proteine besitzen einen hochvariablen N-terminalen Bereich und einen hochkonservierten C-terminalen Bereich (Gillissen *et al.*, 1992; Kronstad und Leong, 1990; Schulz *et al.*, 1990). Der variable N-Terminus ist für die Heterodimerisierung der *bE*- und *bW*-Proteine verantwortlich. Um dies zu gewährleisten, müssen die jeweiligen Proteine Allele unterschiedlicher Ausprägungen tragen (Kämper *et al.*, 1995). Der C-Terminus enthält das Homeodomänenmotiv, was zur Bindung an die DNA und die anschließende Induktion der pathogenitätsrelevanten Gene benötigt wird. Dabei sind die Domänen beider Proteine (*bE*, *bW*) essenziell (Romeis T. *et al.*, 1997; Schlesinger *et al.*, 1997).



**Abbildung 4: Schematische Darstellung des *b*-Locus in *U. maydis*.** (A) Die genomische Struktur der konvergent transkribierten Gene *bE* und *bW*. K steht für den konservierten Bereich, in dem das Homeodomänenmotiv liegt. V steht für den variablen Bereich, der für die Heterodimerisierung notwendig ist. (B) Darstellung der möglichen Kombinationsmöglichkeiten der *bE* und *bW* Proteine basierend auf unterschiedlichen Allelen (nach Brachmann, 2001).

Für die sexuelle Entwicklung von *U. maydis* ist die Expression des *b*-Heterodimers sowohl notwendig als auch ausreichend. Sporidien die aufgrund unterschiedlicher *a*-Allele fusionieren konnten, sind nur bei kompatiblen *b*-Heterodimeren in der Lage, sich weiterzuentwickeln. Jedoch ist es möglich, durch

das Einbringen von kompatiblen b-Heterodimeren in eine haploide Zelle einen solopathogenen Stamm zu erzeugen, der unabhängig von einer Fusion den Wirt infizieren und den vollständigen Lebenszyklus durchlaufen kann (Bölker *et al.*, 1995; Kämper *et al.*, 2006).

### 1.2.3 Die b abhängige Regulationskaskade

Durch die Expression des b-Heterodimers kommt es zum Wechsel vom saprophytischen Knospenwachstums zum filamentösen Wachstum (Brachmann Andreas, 2001). Gleichzeitig mit der Filamentbildung wird der Zellzyklus Arrest in der G2-Phase eingeleitet. Charakteristisch für das b-filamentöse Wachstum ist ein ausgeprägtes Spitzenwachstum, sowie das Abschnüren leerer septierter Bereiche.

Mithilfe der Microarray-Technologie konnten 345 Gene identifiziert werden, die über den b-Locus reguliert werden. Hierbei kann man zwischen direkter und indirekter Regulation unterscheiden. Zur vereinfachten Veranschaulichung werden die direkt regulierten Gene als Klasse 1 und die indirekt regulierten Gene als Klasse 2 Gene beschrieben (siehe Abb. 6).

Die direkte Regulation erfolgt durch die Bindung von b an konservierte Bindestellen (*bbs*, *b-binding site*) innerhalb des Promotors der Zielgene.

	1	10	26
<i>lga2</i> -154	-CATGATGAGAAGTGTGACAGA----		
<i>frb52</i> -232	-AATGATCAGCAGAAATGACACG----		
<i>clp1</i> -252	TGATGATGAGAGGTTTGACAGATGCG		
<i>clp1</i> -1054	GCGTGATCATGGATGTGACAGCTTCA		
<i>rbf1</i> -1377	-ATTGATTAGGGTCTGACACC----		
<i>rbf1</i> -981	-CTTGATGAGCATGCTGAAGTA----		
<i>rbf1</i> -825	-TGTGATGGCTCGGCTGAGACG----		
Consensus	TGATGAG	GT	TGACA

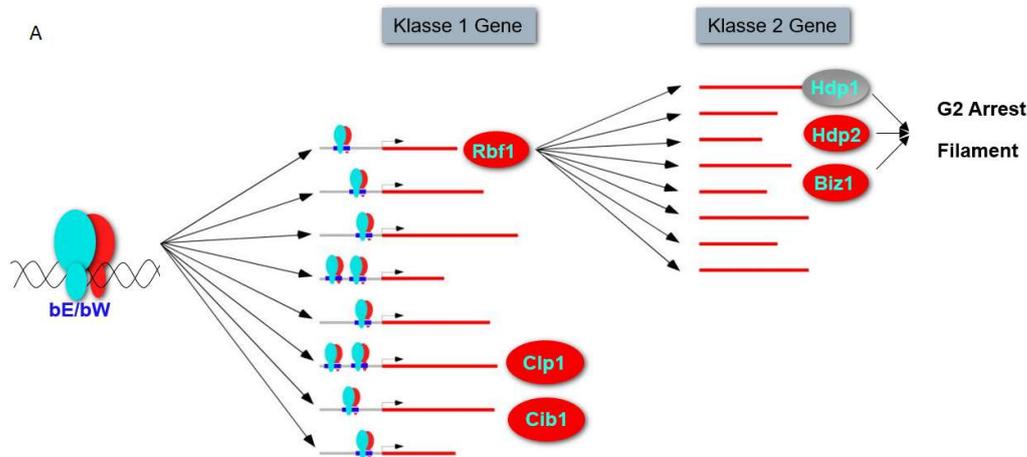
Die *bbs* wurde zuerst im Promotor des *a2*-Locus liegenden Gens *lga2* identifiziert (Romeis T *et al.*, 2000).

**Abbildung 5: Sequenzvergleich von b-Bindestellen in b regulierten Genen.** Die *bbs* kommen in unterschiedlicher Häufigkeit in verschiedenen Genen vor. Aus den konservierten Sequenzmotiven ergibt sich eine Konsensus-Sequenz. Die jeweiligen Positionen sind relativ zum Transkriptionsstart angegeben (aus Romeis *et al.*, 2000; Brachmann *et al.*, 2001; Scherer *et al.*, 2006; Heimel *et al.*, 2010).

Weitere b-Bindestellen konnten unter anderem in den Promotoren der Gene *frb52* und *dik6* nachgewiesen werden (Abb. 5). Bei

*Frb52* handelt es sich um eine putative DNA-Polymerase X (Brachmann A. *et al.*, 2001). *Dik6* ist ein potentielles Siebentransmembranprotein mit bisher unbekannter Funktion (Weinzierl, 2001).

Die Mehrheit der *b*-regulierten Gene besitzt jedoch keine B-Bindestelle und wird indirekt durch weitere Transkriptionsfaktoren reguliert.



**Abbildung 6: Schematische Darstellung der *b*-abhängigen Regulationskaskade.** In der Klasse-1-Kategorie sind alle Gene enthalten, die direkt durch das bE/bW-Heterodimer gebunden und reguliert werden. Die jeweiligen Gene können dabei mehrere *bbs* enthalten. In der Klasse-2-Kategorie sind die Gene enthalten, die indirekt durch *b* reguliert werden. Der Großteil dieser ist dabei abhängig von *rbf1* (Abbildung abgeändert nach Kahmann und Kämper, 2004).

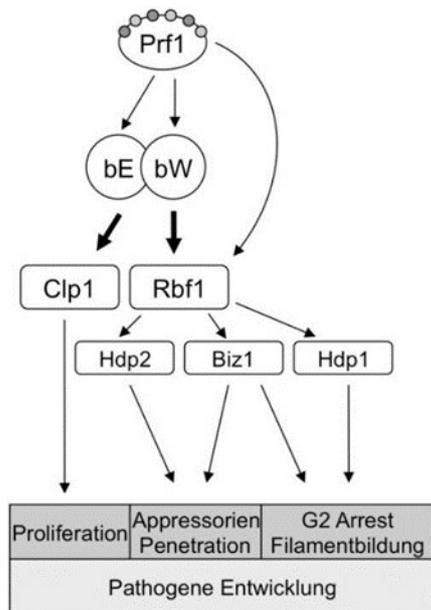
#### 1.2.4 Rbf1 als zentraler Regulator der *b*-Regulationskaskade

Mit 345 differenziell regulierten Genen konnte der *b*-Locus als wichtiges Element der pathogenen Entwicklung identifiziert werden. Jedoch wird nur ein kleiner Teil der Gene direkt durch *b* reguliert. Für die weiterlaufende Regulationskaskade sind weitere Transkriptionsfaktoren notwendig. Die wichtigste Rolle spielt hierbei der C2H2-Zinkfinger-Transkriptionsfaktor Rbf1 (*Regulator of b filament 1*). Über 90 Prozent der *b*-abhängigen Gene werden durch Rbf1 reguliert.

Rbf1 besteht aus 404 Aminosäuren und enthält eine N-terminale Zinkfingerdomäne, eine putative Kernlokalisationssequenz innerhalb der Zinkfingerdomäne und eine C-terminale Glutamin-reiche Sequenz. Die Kernlokalisierung selbst konnte durch eine Rbf1-GFP-Fusion nachgewiesen werden (Heimel *et al.*, 2010b).

Microarray-Analysen zeigten eine frühe Expression von *rbf1* nach *b*-Induktion. Dies impliziert eine direkte Regulation von *Rbf1* durch *b*. Bei der Untersuchung der *rbf1*-Promotorregion konnten drei *bbs* ähnliche Motive gefunden werden. Eine Interaktion des bE-Proteins mit dem *bbs*-Motiv-1377 konnte mithilfe einer quantitativen Chromatinimmunopräzipitation (qChIP) gezeigt werden (Heimel *et al.*, 2010b).

Rbf1 ist sowohl notwendig als auch ausreichend für das *b*-vermittelte, filamentöse Wachstum sowie für die Induktion des G2-Zellzyklusarrests. Rbf1-Deletionstämme weisen keine pathogene Entwicklung mehr auf. Bei Pflanzeninfektionen konnten weder Tumore noch Gallen beobachtet werden. Mikroskopische Untersuchungen der Pflanzenoberfläche zeigten, dass keine zur Penetration benötigten Appressorien gebildet wurden. In axenischer Kultur hat die Rbf1-Deletion keinen Einfluss auf das Wachstum der Zellen.



**Abbildung 7 Schematische Darstellung der *b*-abhängigen Genregulation.** Nach Fusion zweier kompatibler Sporidien kommt es zur Bildung des bE/bW Heterodimers, der für die Regulation der pathogenen Entwicklung notwendig ist. Dieser Transkriptionsfaktor reguliert direkt die Gene *clp1* und *rbf1*. Clp1 ist dabei für die Proliferation in der Pflanze notwendig und Rbf1 wird benötigt um weitere Faktoren Stromabwärts zu regulieren. Relevant für die Appressorienentwicklung ist hierbei das Zusammenwirken von Hdp2 und Biz1. Für die Filamentbildung und den G2-Zellzyklusarrest spielt die Kombination von Biz1 und Hdp1 eine Rolle. Abbildung modifiziert nach (Heimel *et al.*, 2010b).

Die Überexpression von *rbf1* hingegen induziert das filamentöse Wachstum und führt zum Zellzyklusarrest in der G2-Phase (Heimel *et al.*, 2010b). Dies verdeutlicht, dass *rbf1* eine zentrale Rolle in der pathogenen Entwicklung, als Regulator *b*-abhängiger Gene spielt.

Rbf1 ist jedoch nicht der einzige Transkriptionsfaktor der Einfluss auf die pathogene Entwicklung hat. Unterhalb von *b* und *rbf1* gibt es weitere Faktoren, die in die Zellzyklus-

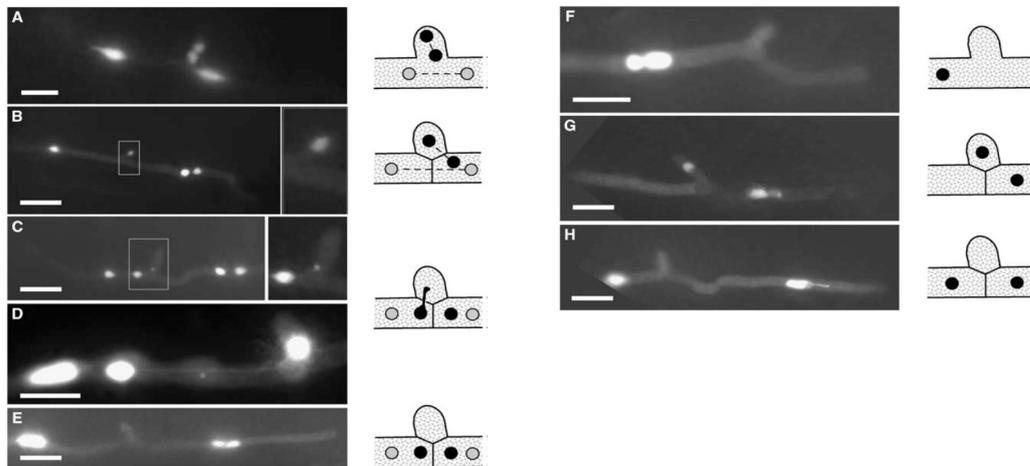
Regulation sowie den Wechsel von saprophytischer zur biotrophen Lebensweise eingreifen. Einer dieser Transkriptionsfaktoren ist Biz1 (*b-induced zinc finger*). Biz1 ist, wie Rbf1, ein C2H2-Transkriptionsfaktor, der das mitotische Zyklus Clb1 reprimiert und dadurch den G2-Zellzyklusarrest nach der Bildung des Heterokaryons einleitet (Flor-Parra *et al.*,

2006). Hdp1 und Hdp2 sind zwei durch Rbf1 induzierte Homeodomänen-Transkriptionsfaktoren, die ebenfalls Einfluss auf den Zellzyklus (Hdp1) (Pothiratana, 2008) und die Appressorienbildung haben (Hdp2) (M. Scherer, pers. Mitteilung). Weitere Faktoren, die im späteren Verlauf der pathogenen Entwicklung innerhalb der Pflanze von Bedeutung sind, befinden sich weiter unten in der *b/rbf*-Regulationskaskade.

### 1.3 Einfluss von Clp1 auf die pathogene Entwicklung

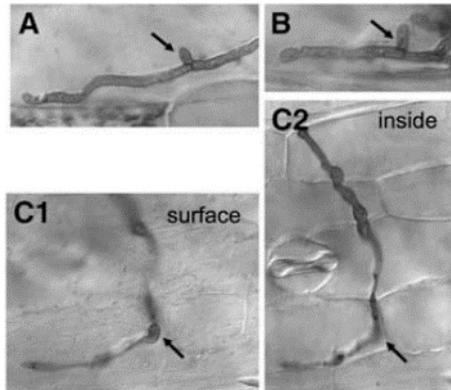
*clp1* (clampless1) ist eines der wenigen von *b* direkt regulierten Gene. Es besitzt zwei putative *bbs*, welche mit Hilfe von *in silico*-Analysen identifiziert werden konnten (Scherer *et al.*, 2006). Die Bindung des b-Heterodimers an die besagten Bindestellen konnte durch eine ChIP-Analyse bestätigt werden (Schuler, 2010). Sowohl in früheren als auch in späteren pathogenen Entwicklungsstadien kommt es zur Expression des *clp1*-Gens.

Das Clp1-Protein aus *U. maydis* besitzt eine 40 prozentige Sequenzhomologie zu Clp1 aus *Coprinopsis cinera*. In diesem Pilz, der ebenfalls zu den Basidiomyceten zählt, ist Clp1 ausreichend und notwendig für die Schnallenzellenbildung (Inada *et al.*, 2001). Die Schnallenzellen sind ein wichtiger Bestandteil für die Kernwanderung, Mitose und den Zellzyklus vieler Basidiomyceten. In *U. maydis* erfolgt die Schnallenbildung während der biotrophen Phase kurz nach der Penetration der Pflanze.



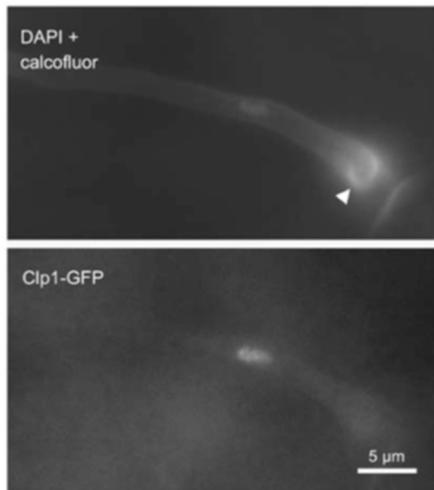
**Abbildung 8: Zellkernverteilung in *U. maydis*.** A-E zeigen die Verteilung der Kerne von zwei zuvor fusionierten Stämmen, die ein NLS-GFP Konstrukt exprimieren. F-H zeigen die Kernverteilung eines solopathogenen Stammes. Rechts daneben ist die schematische Darstellung der Zellkernverteilung zu sehen. Nur ein Kern wird jeweils über die Schnallenzelle auf die beiden Kompartimente verteilt (Abbildung aus Scherer *et al.*, 2006).

Notwendig für den Prozess der Schnallenbildung ist nur der *b*-Locus (Scherer *et al.*, 2006). In *C. cinera* hingegen werden beide Paarungstyploci benötigt. In Abbildung 8 ist dargestellt, wie die Kerne in *U. maydis* durch die Schnallenzellen verteilt werden.



**Abbildung 9: Schnallenzellenbildung in Wt und Clp1 Deletionsmutante.** Die Abbildungen A und B zeigen die Hyphe eines Wt-Stammes innerhalb einer Pflanze. In beiden Fällen sind Schnallenzellen zu beobachten (schwarzer Pfeil). In Abbildung C1 und C2 ist die Hyphe einer Clp1-Deletionsmutante zu sehen. In C1 befindet sich die Hyphe auf der Pflanzenoberfläche. Ein Appressorium (schwarzer Pfeil) hat sich gebildet. In C2 ist die gleiche Hyphe innerhalb der Pflanze zu sehen. Der schwarze Pfeil weist hierbei auf die Penetrationsstelle aus C1 hin. In der Clp1-Deletionsmutante ist keine Ausbildung einer Schnallenzelle zu beobachten (Abbildung aus Scherer *et al.*, 2006).

Mit Hilfe einer NLS-3eGFP-Fusion war es möglich, die Kerne in diesem Zeitraum zu beobachten und die Zellkernverteilung zu visualisieren. Nicht alle Stadien der Verteilung konnten jedoch nachvollzogen werden, da es sich bei *U. maydis* um eine offene Mitose handelt. Während der Mitose werden die Kernporen geöffnet und jegliche frei im Kern vorliegende Proteine können aus dem Kern diffundieren. Zusätzlich kommt es bei *U. maydis* zum Abstreifen der Kernhülle, wodurch auch größere, frei vorliegende Moleküle den Zellkern verlassen können (Straube *et al.*, 2005). Somit können die mit der Zellkernteilung einhergehenden Stadien der Zellkernverteilung nicht mithilfe einer NLS:GFP-Fusion sichtbar gemacht werden. In Clp1-Deletionsstämmen war es nicht möglich, Kerne mit Hilfe der NLS:GFP in innerhalb der Pflanze liegenden Hyphen zu lokalisieren. Bisherige Histon-Marker konnten noch nicht für die Nutzung auf oder innerhalb der Pflanze etabliert werden. In axenischer Kultur hat die Deletion von *clp1* keinen Einfluss auf das Wachstum und den Zellzyklus, ebenso wenig wie auf das filamentöse Wachstum, ausgelöst durch den *a*- bzw. *b*-Locus. Wie bereits erwähnt konnte die Expression des *clp1* Gens in allen Entwicklungsphasen ca. zwei Stunden nach Induktion des b-Heterodimers nachgewiesen werden. Das Clp1-Protein war zunächst jedoch nicht nachweisbar.



**Abbildung 10: Clp1-GFP-Signal in der Hyphe nach Appressorienbildung.** Untersucht wurde ein Stamm, der eine Clp1-GFP-Fusion im nativen Locus enthält. Das erste Bild zeigt eine Hyphe angefärbt mit Calcofluor White (Pilzzellwand) und Dapi (Kern). Der weiße Pfeil markiert ein in Ausbildung befindliches Appressorium. Im unteren Bild ist die gleiche Hyphe im GFP-Kanal zu sehen. Ein deutliches GFP-Signal ist im Kern zu erkennen. In vorherigen Stadien ohne Appressorium konnte keine GFP-Signal festgestellt werden (Abbildung aus Scherer *et al.*, 2006).

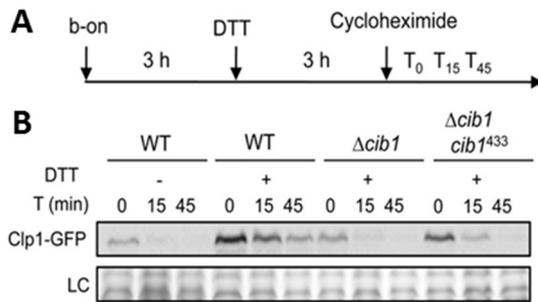
Untersuchungen einer Clp1-3eGFP-Fusion zeigten, dass erst nach Entwicklung der Appressorien ein Signal innerhalb des Zellkerns festgestellt werden konnte (Scherer *et al.*, 2006). In früheren Entwicklungsstadien nach Induktion des *b*-Locus war keine Signaldetektion möglich. Dies gab Anlass zur Annahme, dass das Protein posttranskriptionell modifiziert wird. Weitere Analysen der Clp1-GFP-Fusion konnten aufklären, dass das Protein anfangs gebildet wird, jedoch sehr schnell instabil bzw. abgebaut wird (Heimel *et al.*, 2013). Bislang konnte die Ursache hierfür nicht geklärt werden.

Von großer Bedeutung ist die Tatsache, dass es möglich ist, Clp1 zu stabilisieren. *cib1* (*Clp1 interacting bZIP*) spielt hierbei einen entschei-

denden Faktor. *cib1* ist wie auch *clp1* ein durch *b* direkt induziertes Gen. Es kodiert für ein bZip-Transkriptionsfaktor und ist ein Homolog zu Hac1 (Homolog für ATF/CREB 1) in Hefe und dem X-Box-Bindeprotein 1 (XBP1) in Säugetieren (Cox und Walter, 1996; Kawahara *et al.*, 1998; Ruegsegger *et al.*, 2001). Dieser Transkriptionsfaktor ist ein zentraler Regulator für die UPR (*unfolded protein response*) und notwendig für die Stressresistenz des endoplasmatischen Retikulums. Durch die anfängliche Identifikation von Cib1 als Interaktionspartner von Clp1 (Heimel *et al.*, 2010a) konnte ein Einfluss der UPR auf die pathogene Entwicklung ausgemacht werden (Heimel *et al.*, 2013). Diese Interaktion führt zu einer Stabilisation von Clp1 (Abb. 11).

Clp1 besitzt noch weitere Interaktionspartner, deren zentrale Rolle in der pathogenen Entwicklung zu finden ist. Sowohl der Transkriptionsfaktor Rbf1 als auch bW (Bestandteil des b-Heterodimers) interagieren mit Clp1 (Heimel *et al.*, 2010a). In beiden Fällen führt die Clp1-Interaktion zur Repression des filamentösen Wachstums und zur Aufhebung des Zellzyklusarrests. Der Mechanismus selbst ist bisher unbekannt, jedoch konnte schon festgestellt werden, dass die

bW-Clp1-Interaktion und Rbf1-Clp1-Interaktion nicht die gleichen Zielgene beeinflusst.



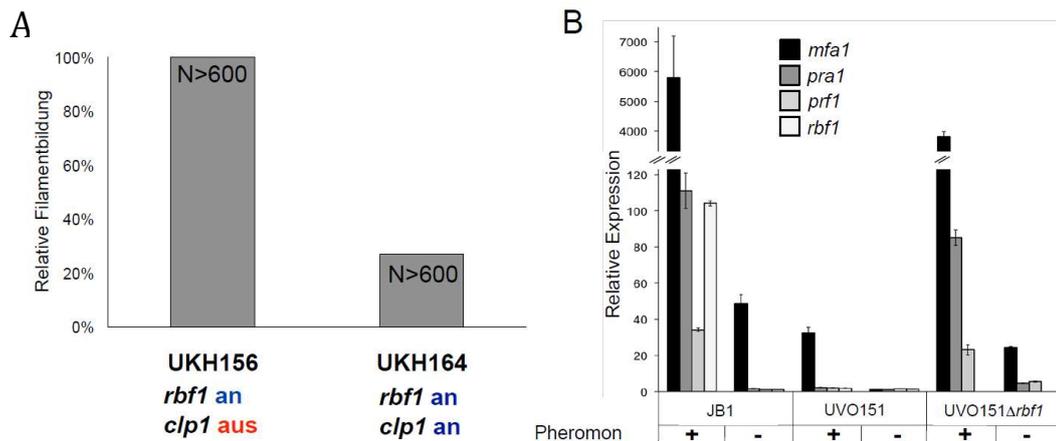
**Abbildung 11: Clp1 wird durch Cib1 stabilisiert.**

A) schematische Darstellung der Versuchsdurchführung.

B) Westernblotanalyse der Clp1-GFP-Fusion unter unterschiedlichen Bedingungen. Ohne DTT-Zugabe (UPR/Cib1 Induktion) kommt es zum raschen Abbau von Clp1-GFP. Mit DTT-Zugabe ist ein Signal selbst nach 45 Minuten noch zu erkennen. Durch die Deletion von Cib1 wird Clp1 wieder instabil. Komplementation mit einem Cib1 ohne Clp1-Interaktionsdomäne (Cib1<sup>433</sup>) führt nicht zur vollständigen Stabilisation von Clp1 (Abbildung aus Heimel *et al.*, 2013).

Bei ca. 95 Prozent der durch *b* regulierten Gene entfällt die Regulation, wenn *clp1* überexprimiert wird (Heimel *et al.*, 2010a). Folglich bleibt die weitere Entwicklung zum Filament und schließlich auch die pathogene Entwicklung aus und der Pilz verbleibt in der saprophytischen Phase seines Lebenszyklus.

Durch die Ko-Expression von Clp1 und Rbf1 ist die Filamentbildung ebenfalls stark verringert, jedoch ist der Haupteinfluss bei der Genregulation auf die Gene des *a*-Locus beschränkt. Wie in Abbildung 12 zu sehen, werden bei Abwesenheit von *b* (JB1= *b*-Deletionsstamm) und Zugabe von Pheromon die *a*-relevanten Gene *mfa1* und *pra1* induziert. Zusätzlich kommt es zur Induktion von *prf1* und *rbf1*. Ohne Pheromonzugabe ist diese Induktion nicht vorhanden. Wird nun in diesem Stamm Clp1 exprimiert (UVO151) bleibt die Pheromonzugabe ohne Auswirkung und es erfolgt keinerlei Induktion. Dieser Prozess ist nur zu beobachten, wenn Rbf1 und Clp1 ko-exprimiert werden. Wird *rbf1* deletiert, hat die *clp1*-Expression keinerlei Einfluss auf die Induktion der *a*-Gene. Dies zeigt, dass Rbf1 in Kombination mit Clp1 nicht mehr als Aktivator dient, sondern zu einem Repressor wird (Heimel *et al.*, 2010a).



**Abbildung 12: Einfluss von Clp1 auf die Pheromonantwort über Rbf1.** A) Relative Filamentbildung nach Induktion von *rbf1* und *clp1*. Ohne *clp1* werden alle Zellen zum filamentösen Wachstum angeregt. Bei Induktion von Clp1 wird das filamentöse Wachstum gehemmt und nur noch ca. 25 Prozent der Zellen bilden Filamente aus. B) Die *clp1*-Expression blockiert die Pheromonantwort in Abhängigkeit von *rbf1*. Bei einem *b*-Deletionsstamm (JB1) kommt es bei Pheromonzugabe zur Induktion der *a* Gene sowie *prf1* und *rbf1*. Wird in diesem Stamm *clp1* überexprimiert (UVO151), bleibt diese Induktion aus. Wird *rbf1* deletiert (UVO151Δ*rbf1*), ist die Pheromonantwort wieder hergestellt (Abbildung aus Heimel, 2010).

Diese Erkenntnisse belegen, dass Clp1 einen entscheidenden Einfluss auf die pathogene Entwicklung hat. Fraglich ist hierbei, wie Clp1 bW und Rbf1 beeinflusst. Da Clp1 keine konservierten Domänen besitzt, konnte bisher keine Prognose hinsichtlich der Mechanik hinter diesen Prozessen erstellt werden. Ein Einfluss von Clp1 auf die Dimer-Bildung von bW und bE konnte mit Hilfe des Kon8-Stammes ausgeschlossen werden. In diesem Stamm wurden die N-terminalen Dimerisierungsdomänen von bW und bE deletiert. Über eine Kinkerregion konnte dann ein künstliches Dimer erzeugt werden. Bei Induktion von dem bE-bW Fusionsprotein kommt es zur Ausbildung von Filamenten. Bei Ko-Expression mit Clp1 bleibt das filamentöse Wachstum aus. Somit verhält sich der Kon8-Stamm genauso wie die Stämme, bei denen die Dimerisierung von bW und bE erfolgen muss. Folglich reprimiert Clp1 die Funktion von bE und bW nicht durch verhindern der Dimerisierung (Heimel *et al.*, 2010a). Da es sich bei Rbf1 und bW um Transkriptionsfaktoren handelt, könnte Clp1 eventuell einen Einfluss auf deren DNA-Bindung haben.

### 1.3.1 Die Chromatin-Immunopräzipitation

Die Chromatin-Immunopräzipitation ist eine Methode zur Detektion von Protein-DNA-Interaktionen *in vivo*. Hierfür werden die zu untersuchenden Zellen zunächst mit Formaldehyd behandelt, um etablierte Interaktionen zu fixieren. Dies gewährleistet unter anderem die feste Bindung der Transkriptionsfaktoren an die spezifischen Bindemotive. Nach der Fixierung wird das Chromatin extrahiert und in kleine Fragmente gebrochen. Die gängigste Methode ist hierbei die Sonifizierung, bei der das Chromatin mit Ultraschall behandelt wird. Um die gewünschten Proteine mit der gebundenen DNA zu erhalten, wird eine Immunopräzipitation mit entsprechenden Antikörpern gegen das Ziel-Protein durchgeführt. Anschließend kann die Fixierung aufgehoben und die angereicherte DNA aufgereinigt werden. Diese DNA kann nun auf putative Bindestellen untersucht werden. Dabei war man zunächst auf Kandidaten-Regionen mit möglichen Bindestellen beschränkt. Diese konnten mit spezifischen Primern mittels PCR analysiert werden (Hecht *et al.*, 1996). Eine weitere Methode war das sogenannte ChIP-Scanning, bei der durch Hinzunahme von Expressionswerten aus Microarray-Analysen systematisch die Promotorbereiche regulierter Gene überprüft werden konnten (Wang *et al.*, 2004; Zeller *et al.*, 2001).

Die erste Möglichkeit auch genomweite Analysen durchzuführen, war die Kombination aus ChIP und DNA-Microarrays. In diesem ChIP-on-Chip-System wird die angereicherte DNA amplifiziert, mit einem Fluoreszenzstoff markiert und mit DNA-Chips hybridisiert (Carey *et al.*, 2009).

Die heute verbreitetste Methode zur genomweiten Analyse von Transkriptionsfaktoren ist die Kombination aus ChIP mit der genomweiten Sequenzierung. Hierbei werden die angereicherten DNA-Fragmente durch Auffüllreaktionen *gebuntet*, *phosphoryliert*, mit Adaptoren ligiert und anschließend über eine PCR-Reaktion zu einer *Library* amplifiziert. Diese kann für die Sequenzierreaktion verwendet werden.

Durch den Vergleich der erhaltenen Sequenzierdaten mit der Genomsequenz kann eine Anreicherung an genau den Stellen festgestellt werden, bei denen die DNA-Fragmente am häufigsten präzipitiert wurden. Durch bioinformatische Analysen ist es möglich, die Signifikanz der Anreicherung zu berechnen und als sogenannte *Peaks* darzustellen (*peak calling*).

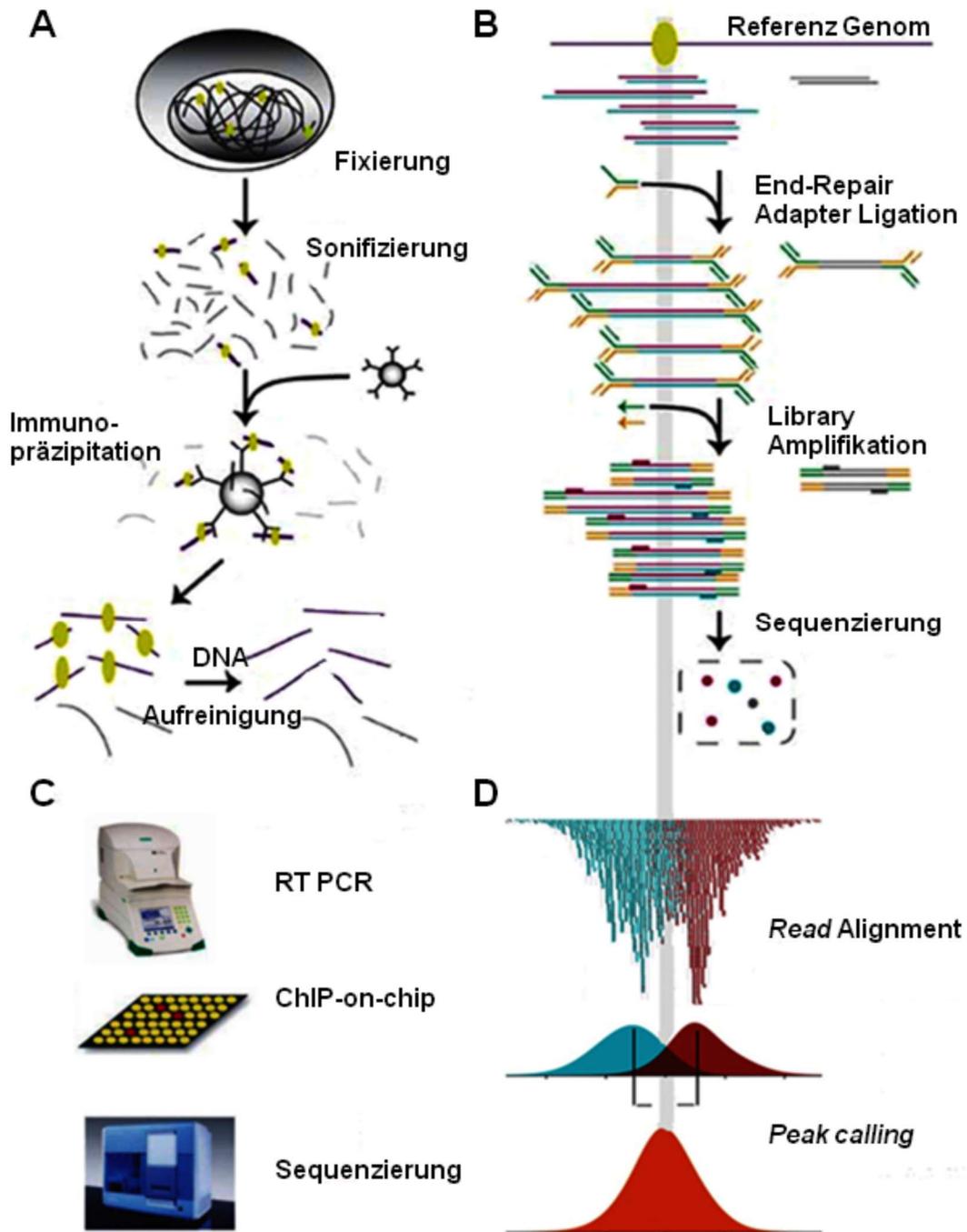
Diese *Peaks* verdeutlichen putative Bindestellen des untersuchten Transkriptionsfaktors. 2007 konnten in HeLa-S3-Zellen erstmals die Binderegionen von STAT1-Zielen (*signal transducers and activators of transcription 1*) vor und nach Interferon  $\gamma$  Stimulation identifiziert werden. Dabei wurden 41582 putative Bindestellen in den induzierten Zellen und 11004 Bindestellen in den nicht induzierten Zellen entdeckt. 71% der bekannten Loci, welche auf Interferon reagieren, konnte mit Hilfe der ChIP-Seq-Analyse gefunden werden (Robertson *et al.*, 2007). Durch den Vergleich aller *Peaks* lässt sich das Bindemotiv des entsprechenden Transkriptionsfaktors ermitteln (Bardet *et al.*, 2013; Barski und Zhao, 2009; Johnson *et al.*, 2007; Rhee und Pugh, 2011). Zusätzlich besteht die Möglichkeit festzustellen, welchen Einfluss Transkriptionsinteragierende Proteine auf deren DNA-Bindung haben.

Des Weiteren ist es möglich, die erhaltenen Sequenzierdaten mit andern Analysen zu kombinieren. Im Falle von Transkriptionsfaktoren bietet sich der Vergleich mit Expressionsanalysen an. Dabei können verschiedene Erkenntnisse gewonnen werden. Beispielsweise ob es sich bei der Aktivierung bzw. Repression des entsprechenden Gens um eine indirekte Regulation handelt. Ist eine Regulation über die Expressionsanalysen gegeben, aber keine Bindung des Transkriptionsfaktors an die Promotorregion zu erkennen, deutet dies auf eine indirekte Regulation durch einen zusätzlichen Faktor hin.

Durch die Kombination von ChIP-Seq-Daten und Expressionsanalysen ist es möglich, den Ursachen von Mutationen in Transkriptionsfaktoren auf den Grund zu gehen. In Zellkulturen konnte der Effekt von Lysin Mutationen in der Untereinheit p65 des Kernfaktors  $\kappa B$  (NF- $\kappa B$ ) mit Hilfe von ChIP-Seq-Analysen erklärt werden. Dabei wurden die Mutation K37Q und K218/221Q eingebracht. Die Expression wurde nach Induktion mit Interleukin-1 $\beta$  in 293-Zellen mit geringem p65-Level gemessen. Dabei wurde festgestellt, dass durch die Mutation K218/221Q 39 von 82-Genen in ihrer Expression reduziert sind. Durch die K37Q-Mutation waren 23 andere Gene betroffen. Ein ähnlicher Effekt wurde erzielt durch die Expression der Lysin Demethylase FBXL11 in den Wildtypstämmen. Folglich ist die Methylierung der Lysine notwendig für die korrekte Expression der Zielgene. Durch die ChIP-Seq-Analyse konnte jedoch festgestellt werden, dass nur die Mutationen K218/212Q zu einer Reduzierung der p65-Affinität an

mehreren Promotoren führt. Die K37Q-Mutationen zeigt dies nicht. Somit konnte gezeigt werden, dass der Einfluss auf verschiedene Gene durch die Methylierung der Lysinreste K37 bzw. K218/21 über unterschiedliche Mechanismen abläuft (Mundade *et al.*, 2014).

Eine weitere Möglichkeit ist die Untersuchung von chromatinmodifizierenden Faktoren. Die Modifizierung von Chromatin durch Acetylierung, Methylierung oder Phosphorylierung spielt eine entscheidende Rolle in der Genexpression. Durch Untersuchung von Histon3 (H3) in unterschiedlichen Methylierungsstadien (pan-H3, H3K4me3, H3K9me3, H3K27me3, H3K36me3, H4K20me3) konnten genomweite Chromatin-Status-Karten in embryonalen Mauszellen generiert werden. Dabei konnte die Veränderung des Chromatin-Status über den gesamten Lebenszeitraum der Mauszellen beobachtet werden. Die H3K4me3- und H3K27me3-Methylierungsstadien zeigten hierbei den größten Effekt auf die allgemeine Genexpression. Die Lysin-36-Methylierung bindet hauptsächlich in kodierenden sowie nicht kodierenden Transkripten und erleichtert somit die Genannotationen (Mikkelsen *et al.*, 2007).



**Abbildung 13: Die Chromatin-Immunopräzipitation und weiterführende Analysemöglichkeiten.** (A) Zusammenfassung der wichtigsten Schritte der Chromatin-Immunopräzipitation. (B) Für die Sequenzierung von angereicherter DNA nötige Aufarbeitungsschritte. (C) Grundlegende Möglichkeiten zur Analyse der durch ChIP aufgereinigten DNA. (D) Essenzielle Schritte der bioinformatischen Datenanalyse von sequenzierter, chromatin-immunopräzipitierter DNA. (A), (B) modifiziert nach Barski und Zhao, 2009; (D) modifiziert nach Valouev *et al.*, 2008.

## 1.4 Zielsetzung der Arbeit

Clp1 ist ein wesentlicher Bestandteil in der Umstellung von saprophytischer zur biotrophen Lebensweise von *U. maydis*. Es ist notwendig für die Schnallenzellenbildung und hat großen Einfluss auf die Hauptfaktoren der pathogenen Entwicklung. Für die ordnungsgemäße Verteilung der Kerne ist die Ausbildung der Schnallenzellen essenziell. Durch das Ausbleiben der Schnallenzellen ist es *U. maydis* nicht möglich, sich weiter in der Pflanze zu profilieren und den Lebenszyklus zu vollenden. In früheren Experimenten konnte in Wildtypstämmen die Kernmigration im Dikaryon innerhalb der Pflanze mit Hilfe einer NLS:GFP-Fusion gezeigt werden. Für Clp1-Deletionsstämmen konnten mit diesem Ansatz keine Kerne innerhalb der Pflanze detektiert werden. Ein Ziel dieser Arbeit war die Lokalisation der Kerne im Clp1-Deletionsstamm auf bzw. innerhalb der Pflanze. Da aufgrund von offener Mitose möglicherweise eine nicht mehr intakte Kernhülle die Detektion der Kerne im Clp1-Deletionsstamm verhindern, wurde im Laufe dieser Arbeit ein H1mCherry-Fusionsprotein generiert. Dies sollte die Lokalisation der Kerne unabhängig des Zustandes der Kernhülle ermöglichen.

Der Einfluss von Clp1 auf Rbf1 und b ist entscheidend für die Entwicklung des Pilzes. Die Interaktion von Clp1 mit Rbf1 und b und dessen Auswirkung konnte bereits gezeigt werden. Fraglich ist der dahinter verborgene Mechanismus. Da Rbf1 und b Transkriptionsfaktoren sind kam es zur Hypothese das Clp1 deren DNA-Bindung verändern könnte. Zunächst wurden ChIP mit Real-Time-Analysen kombiniert um den Einfluss von Clp1 auf eine bereits, von Rbf1 abhängige, bekannte Promotorregion (Dik6) zu untersuchen. Zum einen sollte damit der Einfluss von Clp1 auf die Rbf1-Bindung analysiert werden, zum anderen konnte die Bindung von Rbf1 mit und ohne Ko-Expression von b verglichen werden. Um den Einfluss auf weitere Promotorregionen zu untersuchen, wurden ChIP-Seq-Analysen durchgeführt und die erhaltenen Daten miteinander verglichen.

## 2. Ergebnisse

### 2.1 Clp1 in der biotrophen Wachstumsphase

Die Bildung der Schnallenzellen gewährleistet die korrekte Verteilung der genetisch verschiedenen Kerne während des Wachstums des dikaryotischen Fragments innerhalb der Pflanze. Kontrolliert wird dieser Prozess durch die Paarungstyp-Loci, welche ebenfalls für die Koordination des polaren Wachstums, der Septierung der Hyphe, sowie der Kernwanderung und Kernteilung verantwortlich ist. In *U. maydis* wurde gezeigt, dass das Clp1-Protein notwendig für die Schnallenbildung ist (Scherer *et al.*, 2006) und somit entscheidenden Einfluss auf die Kernverteilung hat.

Die Kernverteilung innerhalb einer Pflanze selbst konnte mit Hilfe einer NLS:GFP-Fusion gezeigt werden. Jedoch konnten die Kerne nur in Wildtyp-Stämmen visualisiert werden. Bei Clp1-Deletionsmutanten waren bisher mit diesem Ansatz keine Kerne nachweisbar. Eine mögliche Erklärung für den Verbleib der Kerne ist die Kopplung von Schnallenzellen und Kernteilung. Da in den Clp1-Mutanten keine Schnallenzellen gebildet werden, ist fraglich wie und ob die Mitose vollzogen wird oder ob die Kerne falsch platziert sind. Da in *U. maydis* die Mitose offen abläuft, ist diese möglicherweise durch die Clp1-Mutation gestört und die Kernmembran kann nicht wieder assembliert werden. Um die Kerne somit sichtbar zu machen, wurde eine Fusion aus Histon H1 und dem Fluoreszenzprotein mCherry angefertigt, welche unabhängig von dem Zustand der Kernmembran bzw. den Kernporen eine Visualisierung der Zellkerne ermöglicht.

### 2.2 Visualisierung der Zellkerne durch H1:mCherry Fusion

Die Fusion aus Histonproteinen und Fluoreszenzproteinen ist in vielen Organismen eine etablierte Methode um Zellkerne mikroskopisch untersuchen zu können. Je nach Organismus wurden unterschiedliche Histonproteine für die Fusion verwendet. Man unterscheidet zwischen fünf Haupt-Histon-Proteinen: H1, H2A, H2B, H3 und H4. Aus den Histonen H2A, H2B, H3 und H4 wird der Nukleosomenkern gebildet, um den sich die DNA in ca. zwei großen Windungen anlegen

kann. Diese Proteine werden als Core-Proteine bezeichnet und sind in der Evolution streng konserviert worden. Das H1-Protein wird benötigt um eine Faser zu erzeugen, die einer Helix aus Nukleosomen entspricht. Diese Struktur ermöglicht die Komprimierung des DNA-Moleküls auf einen Faktor von ca. 40-50. Das H1-Protein ist in seiner Sequenz recht variabel und auch nicht in allen Organismen vorhanden. Die Komprimierung der DNA erreicht ihren Höhepunkt bei der Ausbildung der Chromosomen zur Vorbereitung auf die Mitose. Durch die Fusion von Fluoreszenzproteinen mit den Histonen kann somit die Mitose mikroskopisch untersucht werden, unabhängig davon, ob es sich um eine geschlossene oder offene Mitose handelt.

In *U. maydis* wurde bisher eine Histon-H4-CFP-Fusion verwendet um die Dynamik des Kerns während der Mitose zu veranschaulichen (Straube *et al.*, 2005). Jedoch konnten mit diesem Konstrukt bisher keine Analysen während der pathogenen Entwicklung durchgeführt werden, da die Vitalität der Zellen eingeschränkt ist (Kämper, persönliche Mitteilung).

Innerhalb dieser Arbeit konnte das Histon H1 mit dem Fluoreszenzprotein mCherry fusioniert werden. mCherry ist ein Derivat von RFP mit einer Absorption bei einer Wellenlänge von 587nm und einer Emission bei 610nm. Es ist sehr stabil und weist eine gewisse Resistenz gegen Ausbleichung auf (Shaner *et al.*, 2004). Aufgrund der unterschiedlichen Absorption und Emissionswellenlängen kann mCherry mit GFP ko-exprimiert und für Kolokalisationsanalysen verwendet werden. Um eine optimale Fluoreszenzstärke zu erhalten, wurde das *mCherry*-Gen als 3xmCherry-Variante an das H1 fusioniert. Die Einbringung des Konstruktes erfolgte in den nativen Locus des Gens *umag\_10447*. Das Gen *umag\_10447* kodiert für ein Homolog zu Histon H1 und Histon H1 verwandten Proteinen in anderen Pilzen. In Abbildung 14 ist ein Alignment von H1-Proteinen in weiteren Organismen zu sehen, deren Funktion bereits belegt wurde. Hier zeigen sich deutliche Abweichungen der H1-Histone aus *U. maydis*, Mensch (H1FO), Hefe (HHO1) und *Aspergillus nidulans*.

```

U. maydis umag10447 1 MSAA-----AKPAAKKAATK--KAGSSVSYEAMIKEAILAH
Mensch_H1F0      1 MEN-----STSAPAAPKRAKASKKSTDHPKYSDMTVAATQAE
A. niduans_hhoA  1 MPPK-----KAP----TTAKKAASGPTHTSYRDMIKDAILML
Hefe_HHO1       1 MAPKKSTTKTTSKGGKPAATSKGKERSTSKAAIKKTTAK--KEEASSKSYRELIIEGTLAL

U. maydis umag10447 36 PAEARAGIGRATIKKYIQSHHPETAAGSEATFNTRVNOAITRGAQKKTEVLPK--GPSGK
Mensch_H1F0      40 --KNRAGSSRQSIQKYIKSHYKV--GENA----DSQIKLSIKRLVTTGVLKQTKGVGASGS
A. niduans_hhoA  34 --KERNGSSRQSIKKYVLANNKI--APASQNAFDSQFNKAIKAGVEKGDFTLPK--GTSGP
Hefe_HHO1       59 --KERKSSRFALKKEIKENYPI--V--GSASNFDLYFNNAIKKGVVAGDFEQPK--GPAGA

U. maydis umag10447 94 VKLAPKAKVEKKPAT-----TPIT--TTAAVAKKPAKKVAKKPAAKKPAAKKA
Mensch_H1F0      93 FRLAKSDEPKKSVAFKKTKEIKKVVAT--P--KKAASKPKKAASKAPTKKPKATP-----
A. niduans_hhoA  89 VKLAKKQAPAKPAK-----KPAT--TTKTAAPKKTATKADKAEK--AE-----
Hefe_HHO1       113 VKLAKKKSPEVKKEK-----EVSPKPKQAATSVSATASKAKAASK-----LA

U. maydis umag10447 144 AKKPAKKVASSITTKAKKPA-----KK-----
Mensch_H1F0      143 -VKKA--KKLAATPKKAKKPKTKAKPVKA-----SKPKKAK-----
A. niduans_hhoA  130 -KPKT--KKINAGVKKPAGHPKANTAKPRKA-----STAABAVVDKPKVSVTKSGRK
Hefe_HHO1       156 PKKVVKKKSEFTVTAKKASSESSITTYKEMILKSMFQLNDGKSSRIVLKKYVKDTFSSKLLK

U. maydis umag10447 168 -----VAKPAAKKAAPAKKA-----
Mensch_H1F0      178 -----PVKPKAK-----SSAKVAGKKK-----
A. niduans_hhoA  180 TTTT--AKPTEKATKKTAKNKKA-----
Hefe_HHO1       216 TSSNFDYLFNSAIKKCVENGELVQPKGFSGIIILNKKKVKLST

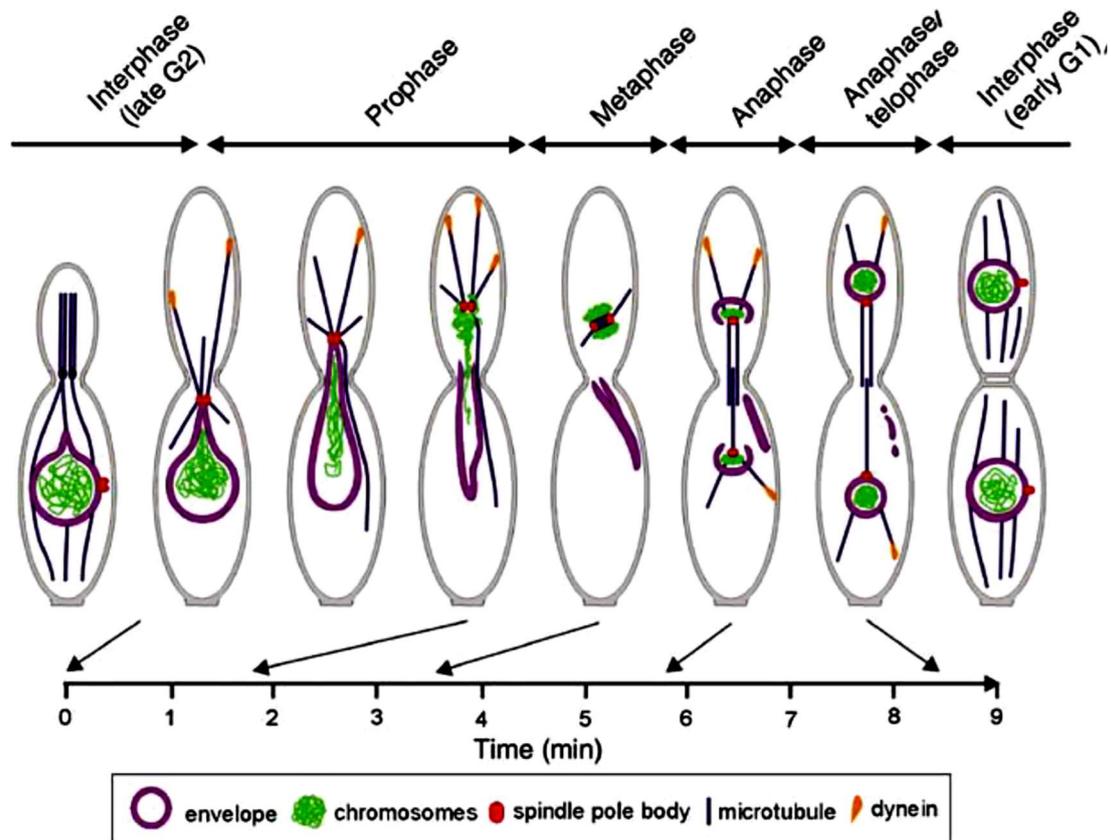
```

**Abbildung 14: Alignment der Histone H1 Homologe verschiedener Organismen.** Das Histone H1 ist weniger stark konserviert als die Histone H2, H3 und H4, welche für die Ausbildung des Nukleosomenkerns verantwortlich sind. Abgebildet ist ein Alignment der Histone H1FO aus Mensch, hhoA aus *Aspergillus nidulans*, HHO1 aus Hefe und dem als putativ beschriebenen H1-Protein, das durch das Gen *umag10447* kodiert. Die schwarz markierten Aminosäuren zeigen identische Aminosäuren in den jeweiligen Organismen an. Die grauen Boxen veranschaulichen eine konservierte Aminosäuresubstitution. Hier wird deutlich dass die H1-Histone in den unterschiedlichen Organismen deutlich voneinander abweichen. Das Alignment wurde mit dem Multiple-Sequence-Aligning-Tool-T-Coffee generiert.

Zusätzlich zur Integration des H1:3xmCherry-Konstruktes wurde ein NLS:3xGFP-Konstrukt-1 in das Genom eingebracht. Es wird reguliert durch den konstitutiv aktiven *hxt1*-Promotor. Er ist sowohl in der saprophytischen als auch in der biotrophen Phase funktionell und stammt vom Gen *hxt1*, welches für den Hexosetransporter Hxt1 in *U. maydis* kodiert. Die beiden Konstrukte wurden in die kompatiblen Wildtypstämme FB1 (*a1 b1*) und FB2 (*a2 b2*) (Banuett und Herskowitz, 1989) eingebracht und resultierten in den Stämmen UBF30 (*a1b1*, *H1::3xmCherry*, *cbx'P<sub>hxt</sub>:NLS::3xGFP cbx<sup>5</sup>*) und UBF31 (*a2b2*, *H1::3xmCherry*, *cbx'P<sub>hxt</sub>:NLS::3xGFP cbx<sup>5</sup>*). Mit Hilfe der beiden Konstrukte konnte die offene Mitose von *U. maydis* visualisiert werden.

Zwischen der Prophase und der Prometaphase, in der die Chromosomen kondensieren und sich die Kernporen auflösen, wandert der Kern von der Mutterzelle in die Tochterzelle. Während dieser Migration des Kerns wird die Kernhülle abgezogen und bleibt in der Mutterzelle zurück. In der Tochterzelle beginnt dann die Ausbildung der Mitosespindeln. In der Anaphase werden die Chromosomen

zu den jeweiligen Polen gezogen, wobei ein Pol in der Mutterzelle zu finden ist. Nach der Aufteilung wird die Kernhülle neu gebildet (Abb. 15) (Straube *et al.*, 2005)

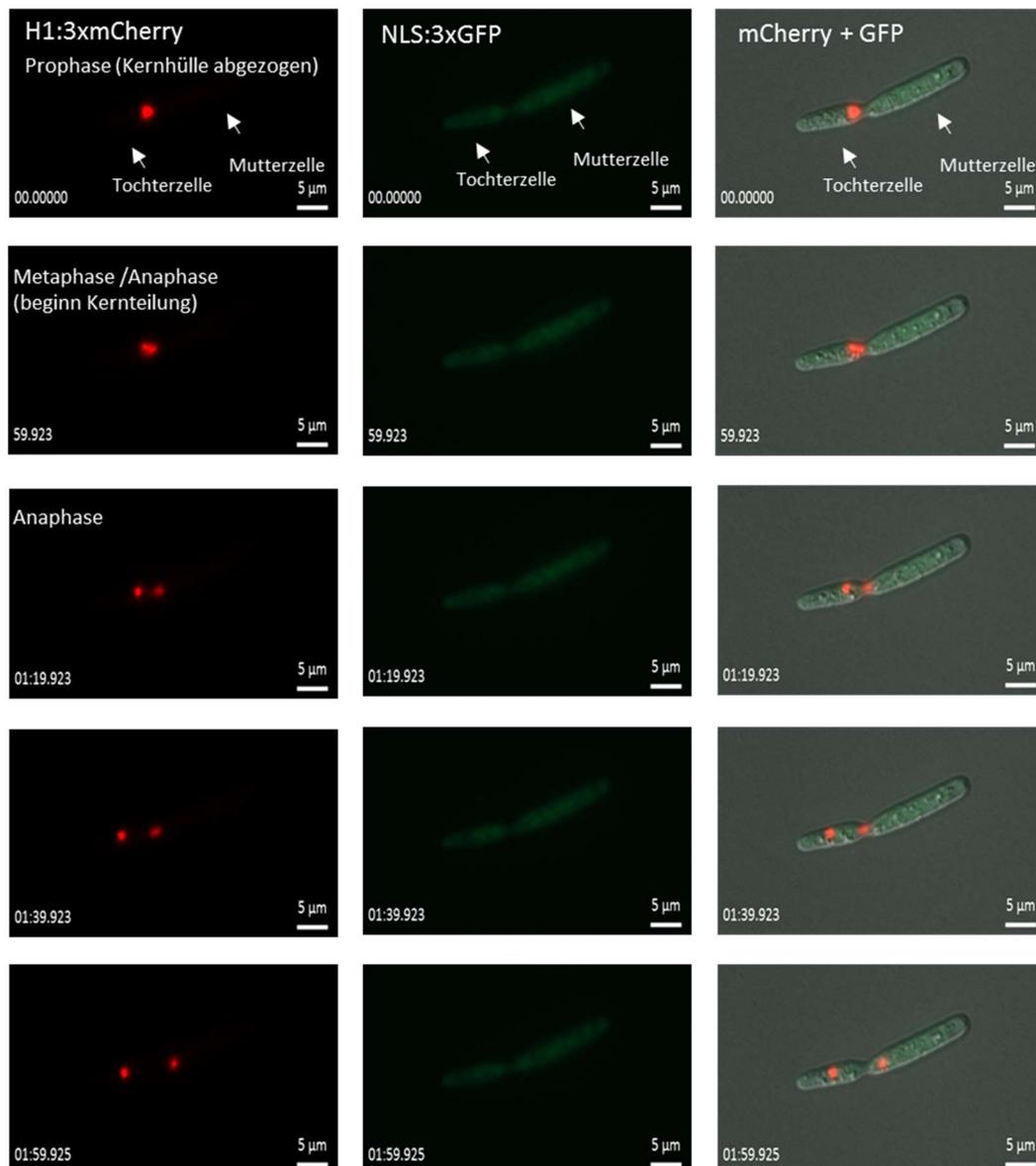


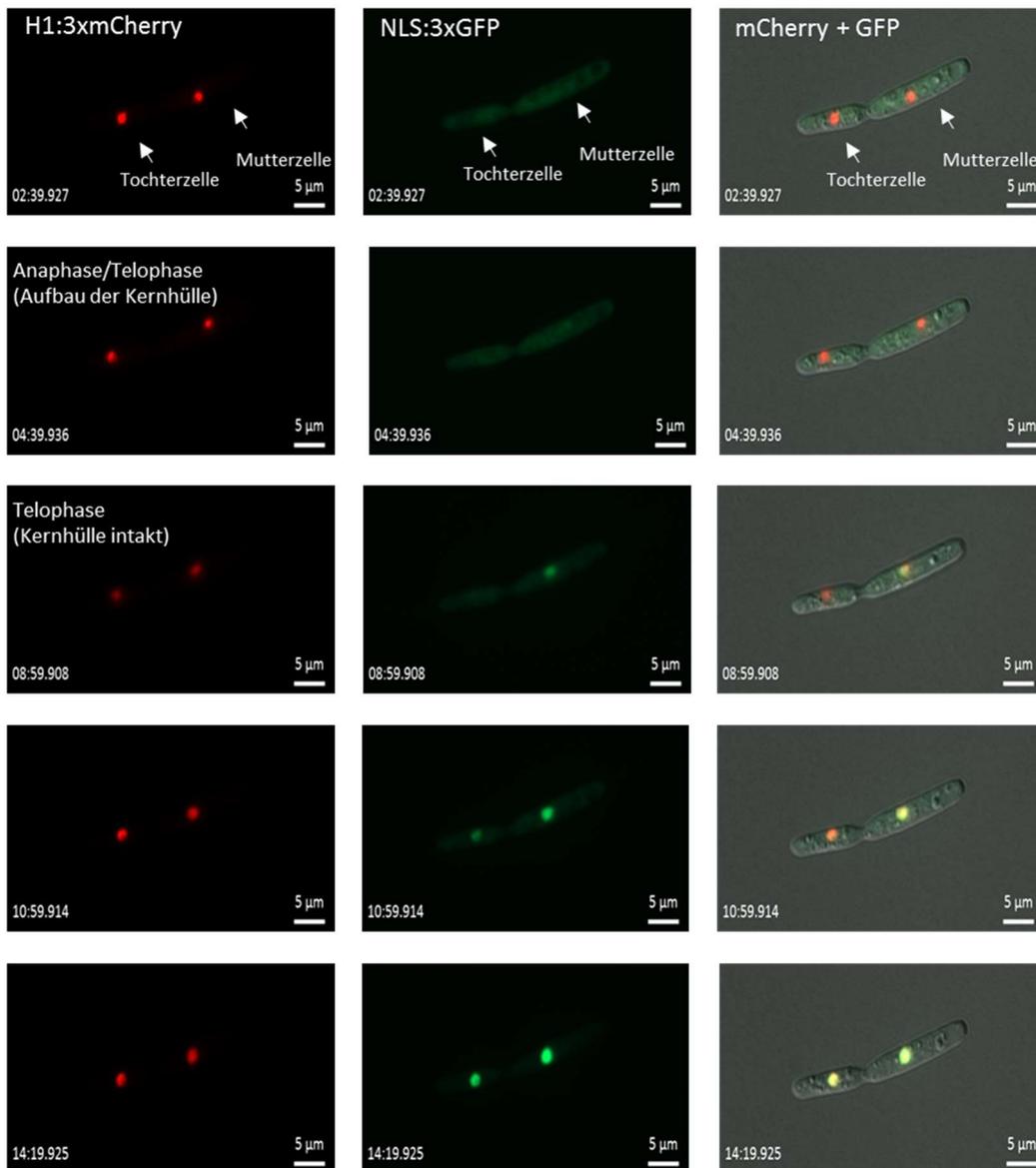
**Abbildung 15: Modell der offenen Mitose in *U. maydis* nach Straube *et al.*, 2005.** Gezeigt sind die einzelnen Stadien des Kernes während der Mitose. In der Interphase befindet sich der Kern in der Mutterzelle. In der Prophase beginnt die Migration des Kernes in die Tochterzelle. Die Kernhülle ist zu dieser Phase bereits permeabel. Im Übergang von Prophase zu Metaphase kommt es zum vollständigen Ablösen der Kernhülle und deren Verbleib in der Mutterzelle. In der Metaphase wird eine kurze Spindel in der Tochterzelle geformt, welche die Chromosomen umgibt. Diese verlängert sich in der Anaphase und zieht die Chromosomen zurück in die Mutterzelle. Zeitgleich beginnt der Wiederaufbau der Kernhülle. In der Telophase ist die Kernhülle wieder vollständig intakt. Die alte Kernhülle wurde wiederverwendet. Im Anschluss kommt es zur Ausbildung des Septums zwischen Mutter- und Tochterzelle (Abbildung aus Straube *et al.*, 2005).

Um die Zellen in der Mitosephase beobachten zu können, wurde eine Übernachtskultur in CM Glukose auf eine  $OD_{600} = 0,125$  eingestellt und für weitere 4h bei 28°C 180upm inkubiert. Nach 4h sind zwei Verdopplungen vollzogen worden. Die Zellen befinden sich in der logarithmischen Wachstumsphase. In Abbildung 16 ist die Mitose in den im Stamm UBF31 (*a2b2*, *H1::3xmCherry*, *cbx'P<sub>hxt</sub>::NLS::3xGFP cbx<sup>5</sup>*) in zeitlicher Auflösung gezeigt. Hierbei befindet sich die Mitose zum Zeitpunkt 0 schon in der Prometaphase. Der Kern befindet sich zu diesem Zeitpunkt bereits in der Tochterzelle und die Kernhülle wurde abgezogen.

Wie zu erkennen, befindet sich das GFP-Signal des NLS:GFP-Fusionsproteins im Zytoplasma und nicht mehr im Kern.

Nach einer Minute beginnt bereits die Verteilung der Kerne auf Mutter und Tochterzelle durch Ausbildung und Verlängerung der Mitosespindel (Metaphase/Anaphase). Bis ca. Minute 4 ist die Kernteilung vollständig vollzogen und der Aufbau der Kernhülle hat begonnen (Anaphase). Im späteren Verlauf kann man erkennen, dass das NLS:3xGFP-Signal aus dem Zytoplasma in den Kern zurück wandert, was darauf schließen lässt, dass die Kernhülle wieder vollständig intakt ist (Telophase). Nach ca. 14 Minuten ist ein starkes GFP-Signal im Kern zu verzeichnen (Film der Mitose auf der beigelegten Daten CD). Durch diese Beobachtungen konnte gezeigt werden, dass das H1:3xmCherry-Fusionsprotein zur Visualisierung der Kerne während der offenen Mitose herangezogen werden kann.





**Abbildung 16: NLS GFP und H1:mCherry ermöglichen die Visualisierung der Mitose und die Permeabilisierung der Kernhülle.** Zu sehen ist der Stamm UBF31 (*a2b2, H1::3xmCherry, cbx<sup>+</sup>P<sub>hxt</sub>::NLS::3xGFP cbx<sup>+</sup>*) in axenischer Kultur während der Mitose. Zum Zeitpunkt 0 ist der Kern bereits in der Tochterzelle und die Kernhülle ist bereits aufgelöst. Zu sehen ist nur das Signal der H1:3mCherry-Fusion im Kern. Ein leichtes GFP-Signal im Zytoplasma ist zu erkennen, was durch das freigewordene NLS:3xGFP verursacht wird. Im weiteren Verlauf ist die Kernteilung und Kernmigration in die Mutterzelle dargestellt. Ab Minute 4 ist die Teilung abgeschlossen und die Kernhülle wird wieder aufgebaut. Nachdem die Kernhülle wieder intakt ist, wandert das GFP-Signal zurück in den Kern. Nach ca. 14 Minuten ist ein starkes GFP-Signal zu beobachten (Film der Mitose auf der beigelegten Daten CD).

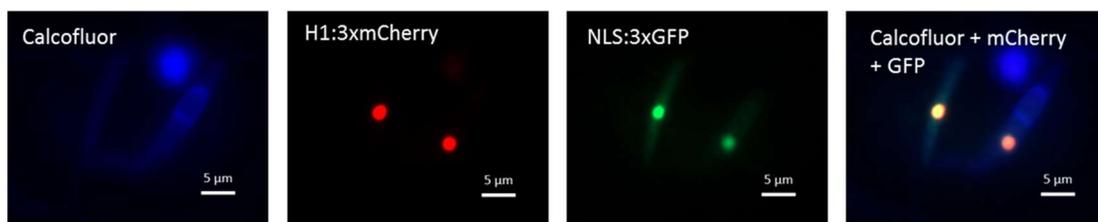
### 2.2.1 Beobachtung der Zellkerne im Dikaryon auf- und innerhalb der Pflanze

Nachdem die Funktionalität der H1:3xmCherry-Stämme UBF30 und UBF31 in der saprophytische Phase gezeigt werden konnte, war der nächste Schritt die Kreuzung und anschließende Infektion von Maispflanzen. Während der saprophytischen Wachstumsphase konnte im Verlauf der Experimente weder ein Defi-

zit in der allgemeinen Vitalität der Zellen, noch signifikante Unterschiede in der Morphologie zu den Wildtypstämmen festgestellt werden.

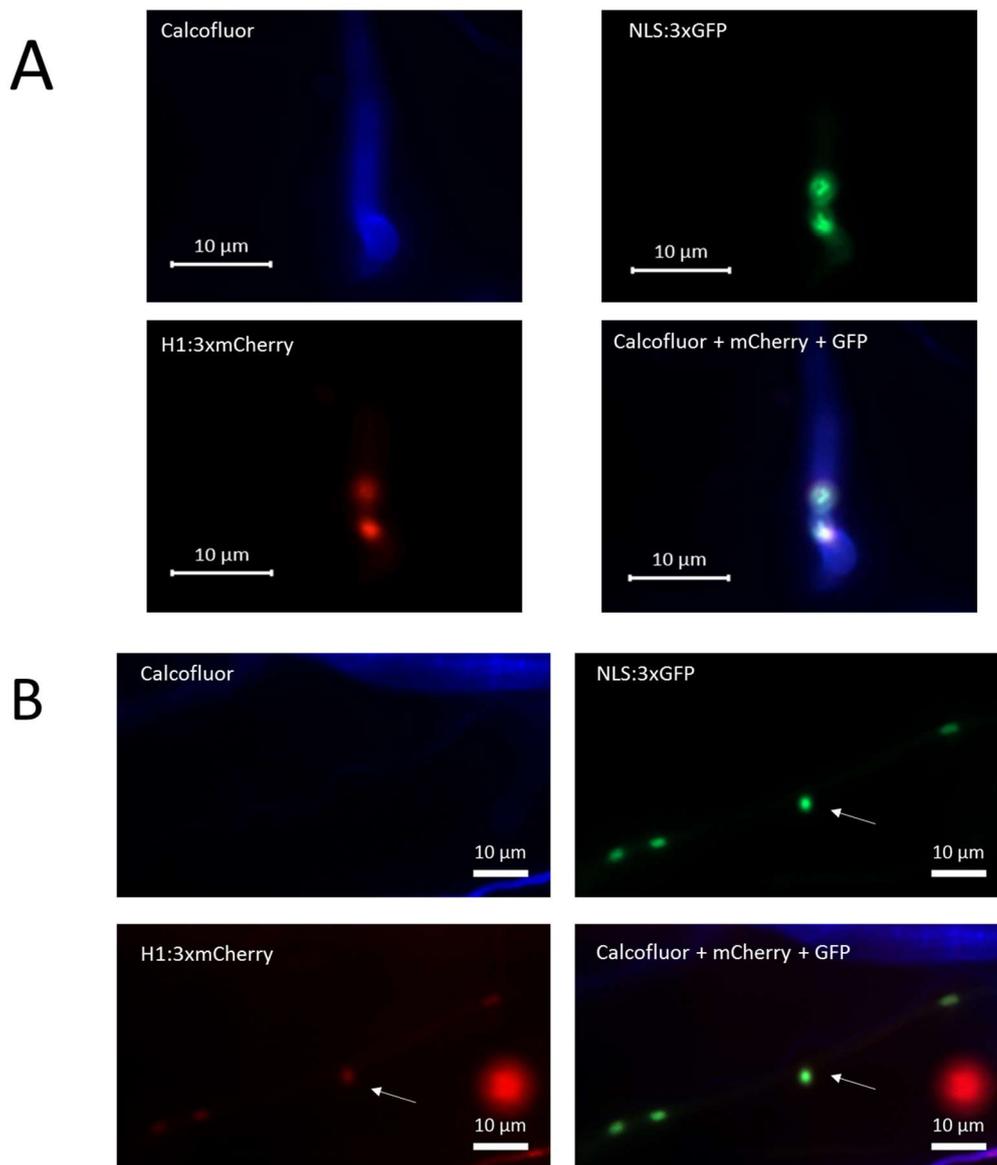
Für die Infektion wurden beide Stämme separat auf eine exponentielle Wachstumsphase herangezogen. Anschließend wurden die Zellkulturen 1:1 gemischt und mit Hilfe einer Kanüle in 7 Tage alte Maispflanzen inokuliert. In einem Zeitraum von 3 Tagen konnten Blattproben von den infizierten Pflanzen entnommen und für die fluoreszenzmikroskopische Analyse vorbereitet werden. Um die Pilzzellen auf der Blattoberfläche sichtbar zu machen, wurde das Blattmaterial mit Calcofluor White gefärbt. Dieser Farbstoff bindet an Cellulose und Chitin und wird somit in die Zellwände des Pilzes und der Pflanze integriert. Der Farbstoff kann allerdings nicht in die Pflanze eindringen und färbt somit nur Blatt- und Pilzmaterial an der Oberfläche an.

In Abbildung 17 sind zwei Sporidien auf der Blattoberfläche zu erkennen, die kurz vor der Fusion stehen. Es ist ein eindeutiges GFP- und mCherry-Signal zu erkennen. Die Aufnahmen wurden 72h nach Inokulation der Maispflanzen gemacht. Dies zeigt, dass kein signifikantes Vitalitätsdefizit durch die Integration der beiden Konstrukte entstanden ist und eine Observierung der Zellkerne auf der Blattoberfläche möglich ist.



**Abbildung 17 H1:mCherry und NLS GFP ermöglicht die Beobachtung der Zellkerne in Sporidien auf der Blattoberfläche 72hpi.** Gezeigt sind Sporidien auf der Blattoberfläche einer Maispflanze, die mit einem Gemisch aus den Stämmen UBF30 und UBF31 infiziert wurden. Die Sporidien stehen kurz vor der Fusion, was an der Ausbildung der Konjugationshyphse zu sehen ist. Beide Fusionsproteine H1:3mCherry und NLS:3xGFP zeigen ein eindeutiges Signal im Kern. Das Blattmaterial wurde 72h nach der Infektion fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Zur Visualisierung der Sporidien wurde das Blattmaterial mit Calcofluor white gefärbt. Größenstandard 5µm.

Auch im weiteren Verlauf der pathogenen Entwicklung war es möglich die Zellkerne weiter zu beobachten. In Abbildung 18 (A) ist eine Hyphe kurz vor der Penetration der Pflanze zu sehen. Die Zellkerne befinden sich kurz vor dem Appressorium. Auch bereits in der Pflanze befindliche Hyphen zeigten deutliche Signale und ermöglichen die weitere Beobachtung der pilzlichen Zellkernmigration innerhalb Pflanze (Abb. 18, B).



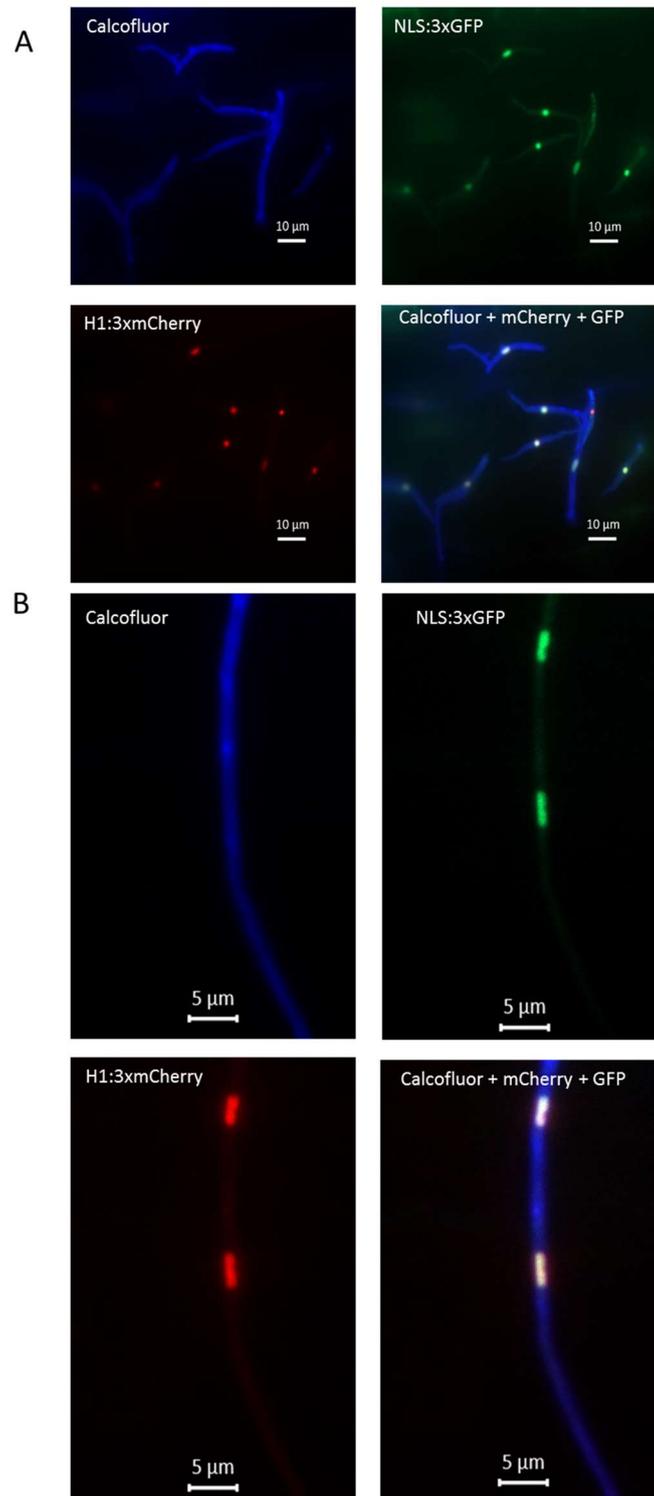
**Abbildung 18: H1:mCherry und NLS GFP ermöglicht die Beobachtung der Zellkerne in Hyphen auf der Blattoberfläche und innerhalb der Pflanze 72hpi. A)** Zu sehen ist ein Dikaryon, welches bereits ein Appressorium ausgebildet hat. Die Kerne befinden sich kurz vor der Migration in das Appressorium und weisen jeweils das Signal der H1:3xmCherry- und der NLS:3xGFP-Fusion auf. Zur Visualisierung des Dikaryons auf der Blattoberfläche wurde das Blattmaterial mit Calcofluor gefärbt. **B)** Zu sehen ist ein Dikaryon innerhalb der Pflanze, erkennbar an der nicht vorhandenen Calcofluor-White-Färbung. Der weiße Pfeil markiert eine mögliche Schnallenzelle, in der sich noch einer der Kerne befindet. Größenstandard 10µm.

### 2.2.2 Clp1 beeinflusst die Zellmigration vor der Schnallenzellenbildung

Die zuvor dargestellten Experimente verdeutlichen, dass mit Hilfe des H1:3xmCherry-Konstruktes die Möglichkeit besteht, Zellmigration innerhalb der Pflanze zu beobachten. In die bereits generierten Stämmen UBF30 und UBF31 wurde nun *clp1* deletiert, was in den Stämmen UBF37 (*a1b1*, *H1::3xmCherry*, *cbx'P<sub>hxt</sub>:NLS::3xGFP cbx<sup>5</sup>, Δclp1*) und UBF38 (*a2b2*, *H1::3xmCherry*, *cbx'P<sub>hxt</sub>:NLS::3xGFP cbx<sup>5</sup>, Δclp1*) resultierte. Mit diesen wurden erneut Pflanzeninfektionen durchgeführt. Wie bereits bekannt (Scherer *et al.*, 2006), bilden diese noch Appressorien aus, sind aber nicht mehr in der Lage Schnallenzellen auszubilden und sich weiter in der Pflanze zu proliferieren. Der Versuchsablauf entsprach den zuvor durchgeführten Infektionsexperimenten. Parallel zu den Clp1-Deletionsmutanten wurden die Wildtypvarianten als Kontrolle verwendet. Es wurde Blattmaterial 24h und 48h nach Inokulation untersucht. Wie zuvor konnten in der Wildtypsituation alle Stadien erneut beobachtet werden. In den Clp1-Deletionsmutanten wurden auf der Blattoberfläche sowohl Sporidien als auch Hyphen mit GFP- und mCherry-Signal identifiziert (siehe Abbildung 19).

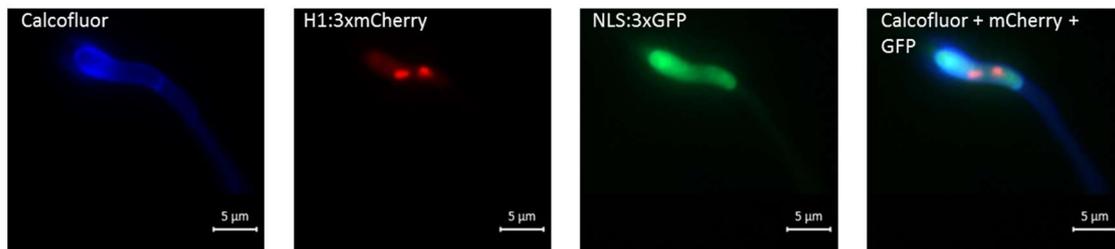
Jedoch konnten in den *Δclp1*-Deletionsstämmen keine Zellkerne innerhalb der Pflanze beobachtet werden. Somit mussten die Kerne bereits zu einem früheren Zeitpunkt in der Kernmigration unterbrochen worden sein.

Da Kerne innerhalb des Dikaryons auf der Blattoberfläche sichtbar waren, lag die Vermutung nahe, dass die Kerne während der Penetration in der Migration blockiert sind. Es konnte beobachtet werden, dass in den meisten Appressorien der Wildtypstämme weder das GFP-Signal noch das mCherry-Signal vorhanden war, was auf bereits weiter gewanderte Kerne in die infizierende Hyphe hindeutet. Anders verhielt es sich bei den Clp1-Deletionsstämmen. Dort war in fast allen Appressorien mindestens noch das mCherry-Signal der H1:3xmCherry-Fusion zu sehen. Dabei konnten verschiedene Stadien beobachtet werden: noch vollständig intakte Kerne zusätzlich mit einem GFP-Signal des NLS:GFP-Fusionsproteins, ein definiertes mCherry-Signal im Kern mit dem GFP-Signal im Zytoplasma des Appressoriums (Abb. 20) oder beide Signale im Zytoplasma des Appressoriums.



**Abbildung 19: Clp1-Deletionstämme und Wildtypstämme zeigen den gleichen Phänotyp auf der Pflanze.** Die Maispflanzen wurden mit einem Gemisch aus den Clp1-Deletionsstämmen UBF37 und UBF38 inokuliert. Das Blattmaterial wurde 72h nach der Infektion mikroskopisch untersucht. **A)** Zu sehen sind einzelne Sporidien auf der Blattoberfläche. Zur Visualisierung der Sporidien wurden diese mit Calcofluor White angefärbt. Sowohl das H1:3xmCherry-Fusionsprotein als auch die NLS:3xGFP-Fusion zeigen ein eindeutiges Signal im Kern. **B)** Hier ist ein Dikaryon gezeigt, das nach Fusion zweier einzelner Sporidien gebildet wird. Auch in diesem Fall sind beide Signale in den Kernen deutlich sichtbar.

Am häufigsten wurde nur das mCherry Signal ohne GFP festgestellt. Dies legt nahe, dass die Kerne in den Appressorien stecken bleiben und nicht in die in der Pflanze befindlichen Hyphe transportiert werden, die Kernmembran jedoch bereits permeabel für das NLS:GFP-Fusionsprotein geworden ist.

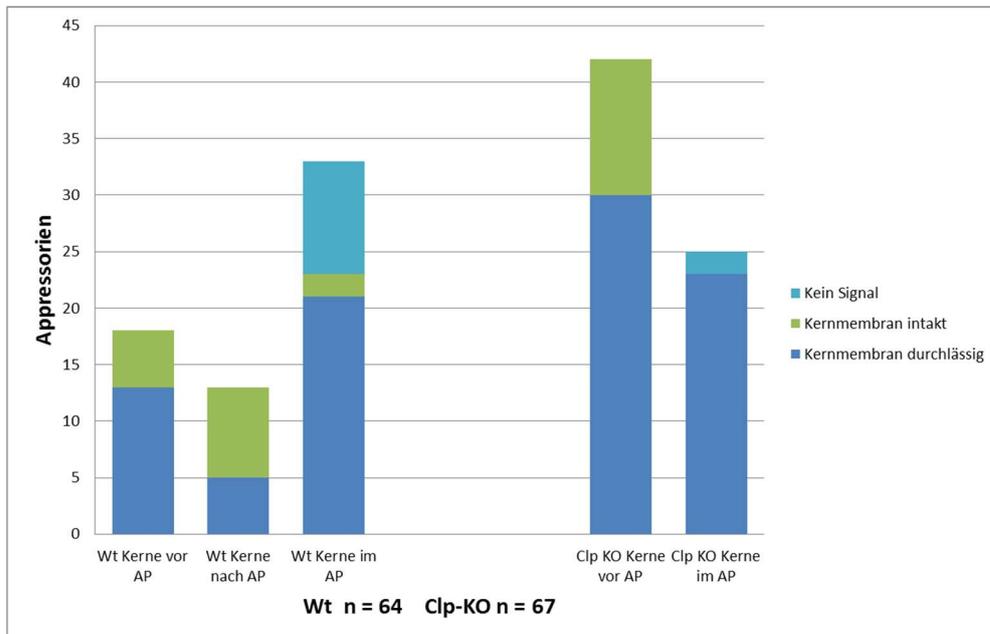


**Abbildung 20: Clp1-Mutanten weisen eine permeabilisierte Kernhülle auf.** Zu sehen ist ein Dikaryon nach Fusion der Clp1-Deletionsstämme UBF37 und UBF38. Das Cytoplasma befindet sich nur im apikalen Bereich der Hyphe und ist durch ein Septum vom Rest der Hyphe getrennt. Die H1:3xmCherry-Fusion zeigt noch ein eindeutiges Kernsignal. Das NLS:3xGFP weist dagegen eine cytoplasmatische Lokalisation auf. Dies deutet auf eine nicht mehr vollständig intakte Kernhülle hin. Das Blattmaterial wurde 72h nach der Infektion fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Zur Visualisierung des Dikaryons auf der Blattoberfläche wurde das Blattmaterial mit Clacofluor White gefärbt.

Da in den Wildtypstämmen nach 48h Inokulation selten weder GFP- noch mCherry-Signale innerhalb der Appressorien zu sehen war, weil die Kerne bereits in weiter proliferierten Hyphen innerhalb der Pflanze migriert waren, wurde das Blattmaterial nach 24h Inokulation auf frisch ausgebildete Appressorien untersucht.

Hierbei wurde festgestellt, dass auch in Wildtypstämmen unterschiedliche Stadien zu beobachten sind. Wie auch in den Clp1-Deletionsstämmen konnten Kerne mit und ohne GFP-Signal beobachtet werden, teilweise mit GFP im Kern, teilweise im Zytoplasma. Interessanterweise traten diese Stadien zu mehreren Zeitpunkten auf: zum einem kurz vor der Migration der Kerne in das Appressorium, während die Kerne innerhalb des Appressoriums waren, und kurz nach dem Appressorium in der bereits penetrierten Hyphe.

Bei 64 untersuchten Appressorien des Wildtypstammes wurden 39 mit bereits aufgelösten Kernporen bzw. abgebauter Kernhülle festgestellt. In den Clp1-Deletionsstämmen waren es 53 von 67 (Siehe Abb. 21). Sowohl in den Wildtypstämmen als auch bei den Clp1-Deletionsstämmen wurden auch Appressorien ohne Signale beobachtet. Dabei handelt es sich um totes Pilzmaterial bzw. im Fall des Wildtypstammes um bereits weiter proliferierte Hyphen innerhalb der Pflanze. Diese Ergebnisse deuten auf einen früheren Beginn der Mitose hin als bisher erwartet.



**Abbildung 21: Unterschiedliche Kernstadien zu verschiedenen Zeitpunkten.** 24h nach der Infektion mit UBF30 + UBF31 (WT, H1:3xmCherry, NLS:3xGFP) und UBF37 + UBF38 (Clp1-Deletion, H1:3xmCherry, NLS:3xGFP) wurde Blattmaterial fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Beobachtet wurden Appressorien auf der Blattoberfläche und das Stadium der Zellkerne. Beim Wildtypstamm konnten drei verschiedene Zeitpunkte festgestellt werden, in denen sich die Zellkerne in unterschiedlichen Stadien befanden: 1. kurz vor der Migration in das Appressorium. 2. direkt hinter der Penetrationsstelle 3. innerhalb des Appressoriums. Die Clp1-Deletionsstämmen wiesen nur zwei Zeitpunkte auf, vor und innerhalb des Appressoriums. Zu diesen Zeitpunkten waren zwei Kernstadien zu beobachten: Kerne mit intakten Kernporen bzw. Kernhülle und Kerne mit aufgelösten Kernporen bzw. Kernhüllen. Zu Kernen mit intakten Poren/Hüllen wurden alle Appressorien gezählt, in denen beide Signale mCherry und GFP im Kern vorzufinden waren. Kerne ohne intakte Poren/Hüllen wiesen nur noch das mCherry-Signal auf. Das GFP-Signal war in diesen Fällen im Cytoplasma lokalisiert oder nicht mehr vorhanden. Innerhalb des Appressoriums wurden im Wt-Stamm vorwiegend permeable Kerne beobachtet (ca. 75%). Im Clp1-Deletionsstamm waren fast nur permeable Kerne vorzufinden (92%). In beiden Stämmen wurden auch Appressorien ohne Signal beobachtet (WT 33%, Clp1-Deletionsstamm 8%). Vor dem Appressorium waren die Verhältnisse zwischen permeablen und nicht permeablen Kernen gleich (Wt 72%, Clp1-Deletionsstamm 71%). Nach dem Appressorium nahm die Anzahl der permeablen Kerne im Wt ab (38%). Im Clp1-Deletionsstamm konnten keine Kerne hinter der Penetrationsstelle beobachtet werden.

Der Einfluss von Clp1 auf die Kernverteilung beruht auf den Interaktionen mit bW und Rbf1. Durch die Überexpression von Clp1 konnte die Funktion des bE/bW-Heterodimers und von Rbf1 reprimiert werden (Heimel *et al.*, 2010a; Scherer *et al.*, 2006). Der molekulare Mechanismus hinter der Interaktion dieser Komponenten konnte bisher nicht aufgelöst werden. Einen möglichen Einblick in diese Mechanik bietet die Überprüfung des Einflusses von Clp1 auf die DNA-Bindung der beiden Transkriptionsfaktoren bE/bW und Rbf1.

### 2.3 Clp1 in der saprophytischen Wachstumsphase

Die Untersuchung der Kernverteilung auf und innerhalb der Pflanze zeigt, dass Clp1 einen entscheidenden Einfluss auf die pathogene Entwicklung hat. Die Tatsache dass das Clp1-Protein erst zum Zeitpunkt der Appressorienbildung stabil und funktionell ist, erschwert die Untersuchung der Clp1-Funktionsweise. Clp1-Deletionsstämme zeigten in axenischer Kultur weder Einfluss auf die Morphologie noch Vitalität der Pilzzellen. Die Überexpression von Clp1 hat jedoch im Zusammenhang mit Rbf1- bzw. b-Expression einen signifikanten Einfluss auf die Morphologie der Zellen. Durch die Clp1-Überexpression erhält man ausreichend funktionelles Protein und hat so die Möglichkeit, dessen Einfluss in axenischer Kultur zu untersuchen. Bereits bekannt ist das Auflösen des durch b und Rbf1 induzierten Zellzyklusarrest und somit die Aufhebung des filamentösen Wachstums (Heimel *et al.*, 2010a). Die Mechanismen hinter der Repression von Rbf1 und b durch Clp1 sind bisher nicht bekannt. Da die Dimerisierung als möglicher Ansatzpunkt der Repression ausgeschlossen werden konnte (Kon8, siehe Einleitung), lag die Vermutung nahe, dass Clp1 einen Einfluss auf die DNA-Bindung von Rbf1 bzw. b hat. Um die Auswirkung von Clp1 auf die DNA-Bindung von Rbf1 zu untersuchen, musste ein Stamm erzeugt werden, in dem Rbf1 und Clp1 unabhängig voneinander induziert werden konnten. Zusätzlich musste die Unabhängigkeit von b gewährleistet werden, indem der b-Lokus deletiert wurde. Im weiteren Verlauf wurde die Expression der induzierten Gene überprüft und die Funktionalität der Proteine mikroskopisch untersucht (Daten nicht gezeigt).

#### 2.3.1 Einfluss von Clp1 auf die Rbf1-Bindung im *dik6*-Promotor

Bereits untersucht wurde die Bindung von Rbf1 innerhalb des *Dik6*-Promotors in Anwesenheit von b. In den in dieser Arbeit generierten Stämmen wurde b deletiert und Rbf1 unter der Kontrolle des *nar1*-Promotors in den b-Locus eingebracht. Um festzustellen ob Rbf1 auch ohne b eine Bindung aufweist, wurden die ChIP-Experimente und Real-Time-PCR-Analysen für den *dik6*-Promotor durchgeführt. Zusätzlich kann durch die induzierbare Clp1-Expression festgestellt wer-

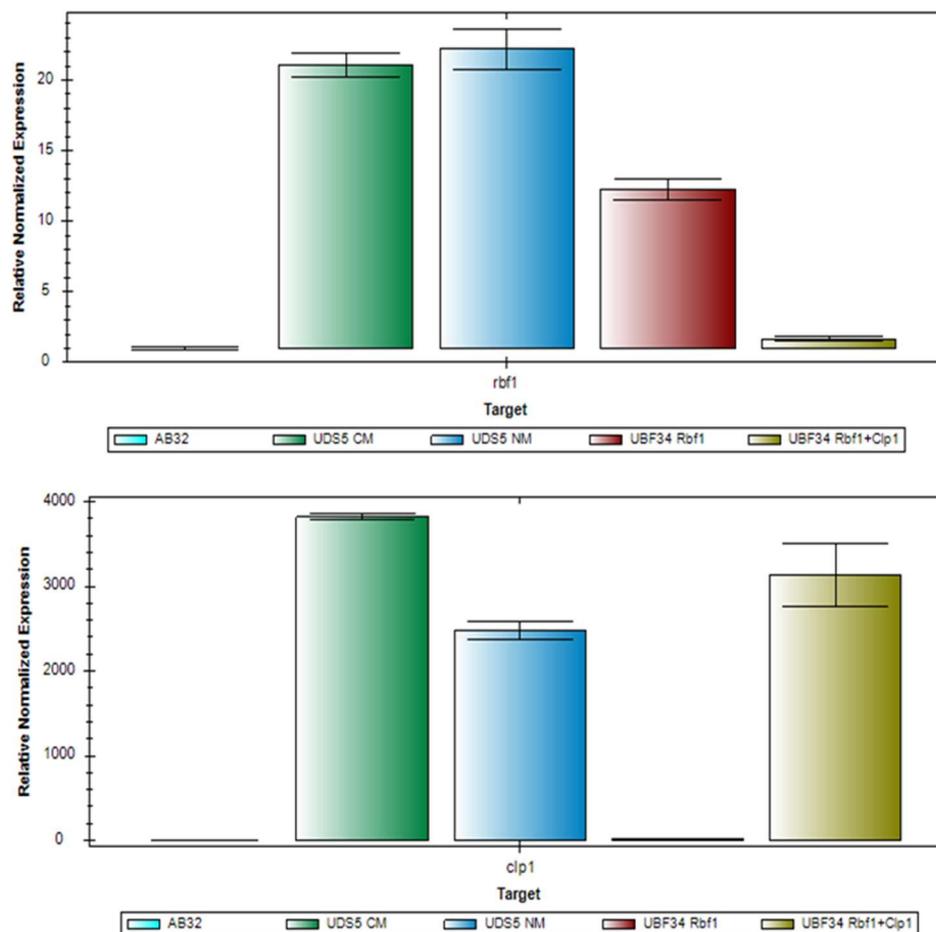
den, ob Clp1 möglicherweise einen Einfluss auf die Bindung von Rbf1 bzw. Rbf1 und b im *dik6*-Promotor besitzt.

Das *dik6*-Gen ist ein *b*-reguliertes Gen (Bohlmann, 1996) das für ein Transmembranprotein kodiert und nach der Bildung des Dikaryons exprimiert wird, jedoch nach der Penetration der Pflanze nicht mehr auf transkriptioneller Ebene detektierbar ist (Weinzierl, 2001). Der Promotor enthält eine konservierte *b*-Bindestelle (*bbs*). Die Bindung eines künstlichen *bE/bW*-Fusionsproteins konnte in Gelretardations-Untersuchungen gezeigt werden (Weinzierl, 2001). Mit Hilfe von Expressionsanalysen konnte jedoch nachgewiesen werden, dass es sich nicht um ein direkt *b*-reguliertes Gen handelt, sondern die Regulation durch Rbf1 erfolgt. Rbf1 ist hierbei sowohl notwendig als auch hinreichend für die *dik6*-Expression. Interessant ist daher die Frage, warum trotz alleiniger Rbf1-Regulation eine *bbs* im Promotor zu finden ist. Der Bereich für die Rbf1-abhängige Expression des *dik6*-Promotors konnte über Promotor-GFP Fusion und entsprechenden Promotorverkürzungen auf einen Bereich von -825 bis -680 ausgehend vom Transkriptionsstart identifiziert werden. Die Bindung von Rbf1 an den *dik6*-Promotor konnte durch Chromatinimmunopräzipitation und anschließender Real-Time-PCR bestätigt werden (Heimel *et al.*, 2010b).

Um den Einfluss von Clp1 auf die Rbf1-Bindung zu untersuchen, wurde zunächst der Stamm UBF34 (*a2 Δb P<sub>nar1</sub>:rbf1 3xHA, cbx'P<sub>crg1</sub>:clp1::3xmyc cbx<sup>5</sup>*) generiert, der ein Rbf1:3HA-Konstrukt trägt. Das Konstrukt wurde über homologe Rekombination in den *b*-Locus integriert und ermöglicht somit gleichzeitig die Deletion von *b*. So kann gewährleistet werden, dass *bE* bzw. *bW* keinen Einfluss auf die Rbf1-Bindung nehmen. Clp1 wurde ektopisch in den *ip*-Locus eingebracht. Durch die zur Selektion verwendete Carboxinkassette kommt es im *ip*-Locus zu einer Punktmutation, die zu einer Carboxinresistenz führt. Im Idealfall kommt es hierbei zu einer einfachen Insertion des gewünschten Gens.

Rbf1 steht unter der Regulation des *nar1*-Promotors, der mithilfe von Nitrat induziert werden kann, und *clp1* unter der Regulation des *crg1*-Promotors, der durch Arabinose als Kohlenstoffquelle induzierbar ist. Somit besteht die Möglichkeit, im gleichen Stamm beide Gene unabhängig voneinander zu exprimieren. Um zu testen ob beide Gene tatsächlich exprimiert werden, wurden vor der ChIP Expressionsanalysen durchgeführt.

Dabei fand unter anderem der Stamm UDS5 ( $a2 \Delta b::P_{crg1}:bW2,E1 rbf1:3xHA$ ) (David Schuler, 2010) Anwendung um die Auswirkung des Nitratminimalmediums auf die Rbf1- und Clp1-Expression zu untersuchen. Der Stamm UDS5 enthält das Rbf1:3HA-Konstrukt im nativen Locus und wird indirekt durch *b* induziert. Der *b*-Locus ist hierbei durch ein Konstrukt ausgetauscht worden, welches compatible *bE/bW*-Gene unter der Regulation des *crg1*-Promotors enthält. Somit kann ein funktionelles *bE/bW*-Heterodimer gebildet werden, um die *b*-Regulationskaskade ohne Fusion zweier Zellen zu starten.



**Abbildung 22: Expressionsanalyse von *rbf1* und *clp1* nach 6h Induktion.** Untersucht wurden die Stämme UDS5 ( $a2 \Delta b::P_{crg1}:bW2,E1 rbf1:3xHA$ ) und UBF34 ( $a2 \Delta b P_{nar1}:rbf1 3xHA, cbx P_{crg1}:clp1::3xmyc cbx5$ ). Als Kontrolle dient der Stamm AB32, der kein kompatibles *b*-Heterodimer bilden kann. Die Induktion des DS5-Stammes wurde zum einen mit Komplex Medium + Arabinose (CM) zum anderen mit Nitratminimalmedium + Arabinose (NM) durchgeführt. In beiden Fällen wird *rbf1* über das *b*-Heterodimer induziert. Der Stamm UBF34 wurde mit Nitratminimalmedium + Glukose (Rbf1:3xHA) und Nitratminimalmedium + Arabinose (Rbf1:3xHA, Clp1:3myc) induziert. Vergleicht man die unterschiedlichen Medien, die für die Induktion des DS5 Stammes verwendet wurde, wird deutlich, dass die *rbf1*-Expression nicht beeinflusst ist. Die Expression von *clp1* in Nitratminimalmedium ist ca. um 1/3 schlechter als im Komplexmedium (CM). Bei der Induktion des UBF34-Stammes wird deutlich, dass bei gleichzeitiger Expression von *clp1* die *rbf1*-Expression deutlich geringer ausfällt. Zur Normalisierung wurde die Kontrollgene *elf2b* und *actin* verwendet.

Die Induktion der Stämme erfolgte für sechs Stunden unter den jeweiligen Bedingungen zur Expression von Rbf1 respektive Rbf1+ Clp1. Dabei konnte festgestellt werden, dass die Rbf1-Induktion nicht durch das Nitratminimalmedium mit Arabinose abhängig ist und Clp1 ca. 1/3 weniger stark exprimiert wird als Clp1 im Komplexmedium (CM) mit Arabinose.

Die *nar1P*-induzierte Expression der im *b*-Locus integrierten *rbf1*-Gens war dabei um das Zweifache geringer als die indirekte Induktion über den *b*-Locus. Die direkte Induktion von Clp1 über den *crg1*-Promotor entspricht in etwa der indirekten Induktion über *b* (Abb. 22). Als Kontrolle diente der Stamm AB32, der ähnlich zu DS5, ein *bE/bW*-Konstrukt unter der Kontrolle des *crg1*-Promotors trägt. Jedoch sind in diesem Fall *bE* und *bW* nicht kompatibel und können kein funktionelles Heterodimer bilden. Somit bleibt die Induktion über *b* aus. Unter diesen Bedingungen konnte die CHIP und die anschließende RT-PCR-Analyse des *dik6*-Promotors durchgeführt werden.

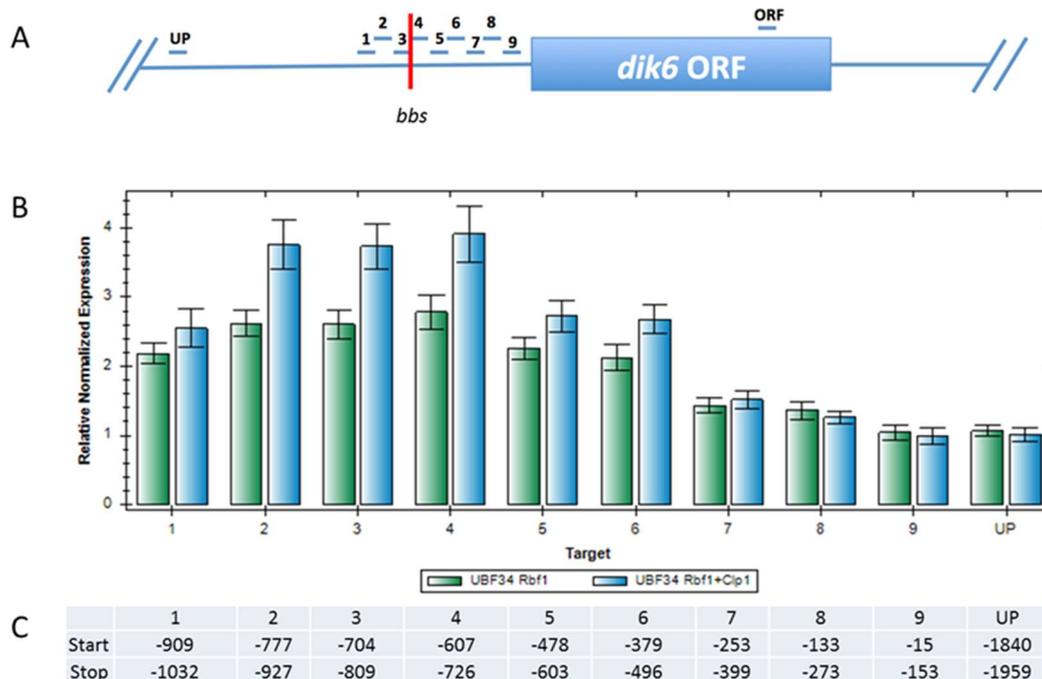
### 2.3.2 Chromatin-Immunopräzipitation und Real-Time-PCR-Analyse

Für die Chromatin-Immunopräzipitation wurde der Stamm UBF34 wie oben beschrieben angezogen und entsprechend für die Real-Time-PCR-Analyse vorbereitet. Zunächst wurden die Zellen nach sechsständiger Induktion fixiert und das Chromatin extrahiert. Anschließend wurde das Chromatin durch eine Ultraschallbehandlung in Fragmente zerteilt. Dabei muss darauf geachtet werden, dass nicht zu große aber auch nicht zu kleine Fragmente entstehen, um ein optimales Ergebnis zu erhalten. Mit kleineren DNA-Fragmenten sinkt die Wahrscheinlichkeit, dass diese Fragmente sowohl die Proteinbindestelle als auch die Bindestellen für die in der PCR-Analyse verwendeten Primer enthalten. Im Rahmen der Masterarbeit von Jonas Ulrich waren die optimalen Bedingungen sowohl für die Real-Time-PCR als auch für die ChIP-Seq-Experimente ermittelt worden. Die Sonifizierung wurde mit Hilfe des Covaris Ultrasonicator S220 Homogenisators durchgeführt. Im Falle der Real-Time-Analysen wurde eine Sonifizierungszeit von 15 Minuten ermittelt, welche Fragmentgrößen von 100 bis 450bp lieferten. Für die ChIP-Seq-Analysen wurden 20 Minuten gewählt, was Fragmentlängen von 50-350 bp ergab (Jonas Ulrich, 2015, Daten nicht gezeigt).

Wie schon erläutert bindet Rbf1 an den *dik6*-Promotor und ist für dessen Regulation verantwortlich (Heimel *et al.*, 2010). Zur Untersuchung der Rbf1-Bindung wurden Primer verwendet, deren PCR-Produkt den *dik6*-Promotor in ca. 100 bis 150bp großen überlappenden Bereiche abdeckt. Zusätzlich wurden zwei Bereiche außerhalb des Promotors als Kontrolle gewählt: zum einen ein Stromaufwärtsliegender (UP) als auch ein stromabwärtsliegender Bereich innerhalb des *dik6*-Leserahmens (ORF). Insgesamt wurden somit 11 Amplikons generiert. Um eventuelle Effizienzunterschiede der Primer zu relativieren, wurde parallel zum immunopräzipitierten Chromatin jeweils eine nicht präzipitierte Probe per Real-Time-PCR analysiert und für die Normalisierung der IP-Werte herangezogen. Als Kontrollgen diente das Haushaltsgen *elF2b*.

Sowohl in der Arbeit von Heimel *et al.*, 2010 als auch in der Masterarbeit von Jonas Ulrich konnte eine maximale Anreicherung zwischen dem 3. und 4. Amplikon (ca. 13-15fach zu *elF2b*) festgestellt werden, welche im Bereich zwischen -607 und -807 relativ zum Transkriptionsstart liegen. In den sich überlappenden Amplikons ist die *bbs* enthalten. Die benachbarten Bereiche nahmen mit zuneh-

mender Entfernung vom Maximum ab. Dies konnte auch für die ChIP des DS5-Stammes im Nitratminimalmedium reproduziert werden (Daten nicht gezeigt). Bei der Durchführung der Real-Time-PCR für den Stamm UBF34 kam es zu der gleichen Verteilung der Amplikons. Jedoch war die Anreicherung selbst deutlich geringer. Dabei gab es kaum einen Unterschied ob Rbf1 alleine oder Rbf1 und Clp1 exprimiert wurden. Das Maximum belief sich auf das 2.5 (Rbf1) bzw. 3.5 fache zum Referenzgen *elf2b* (Abb. 23).

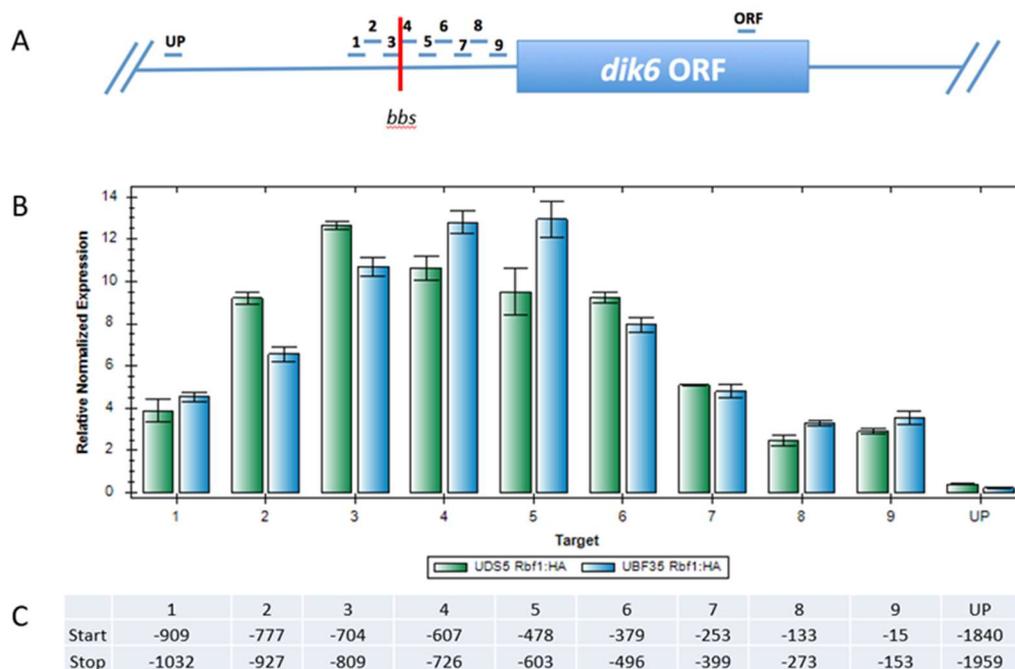


**Abbildung 23: Kein Einfluss von Clp1 auf die DNA-Bindung von Rbf1 in Abwesenheit von b.** Untersucht wurde der Stamm UBF34 (*a2Δb P<sub>nar1</sub>:rbf1 3xHA, cbx'P<sub>crg1</sub>:clp1::3xmyc cbx<sup>5</sup>*) unter zwei verschiedenen Induktionsbedingungen. Zum einen durch alleinige Induktion von Rbf1:3xHA, zum andern durch Co-Induktion von Rbf1:3xHA und Clp1:3xmyc. In beiden Fällen wurde Rbf1:3xHA mit einem HA-Antikörper präzipitiert. **A)** Schematische Darstellung der Amplikons auf dem *dik6*-Promotor, die für die Real-Time-PCR-Analyse verwendet wurden. Der rote Strich markiert die Stelle der *bbs* innerhalb des Promotors. Als Referenzgene wurden das ORF-Amplikon und das Haushaltsgen *elf2b* verwendet. **B)** In beiden Fällen ist eine maximale Anreicherung bei den Amplikons 3 und 4 zu beobachten. Die Anreicherung selbst liegt beim 2,5 bzw. 3,5 fachen der Referenzgene. Es gibt keinen Unterschied in der Bindung von Rbf1 in Anwesenheit von Clp1. Für die Normalisierung wurden die Real-Time-PCR-Ergebnisse der nicht präzipitierten DNA der jeweiligen Konditionen herangezogen. **C)** Start- und Stoppositionen der jeweiligen Amplikons.

Da es sich beim Stamm UBF34 um eine *b*-Deletion handelt lag die Annahme nahe, dass die verringerte Anreicherung möglicherweise mit der Interaktion von Rbf1 mit dem bE/bW-Heterodimer zusammenhängt. Im Stamm UDS5, in dem sowohl *b* als auch Rbf1 exprimiert wird, ist eine deutlich höhere Anreicherung zu erkennen (Abb. 24). Da Clp1 auch mit bW interagiert, kann vermutet werden, dass

eventuell die Kombination aus allen drei Faktoren einen Einfluss auf die Rbf1-Bindung innerhalb des *dik6*-Promotors hat.

Um dies zu überprüfen, wurde in den Stamm UDS5 Clp1 unter der Kontrolle des *crg1*-Promotors in den IP-Locus integriert. Wie zuvor wurden zunächst die Expression der jeweiligen Faktoren überprüft (Daten nicht gezeigt). Untersucht wurden der neu generierte Stamm UBF35 (*a2 Δb::P<sub>crg1</sub>:bW2,E1 rbf1:3xHA, cbx'P<sub>crg1</sub>:clp1::3xmyc cbx<sup>5</sup>*) und der Stamm UDS5 (Rbf1). Sowohl die Anzugsbedingungen als auch die Schritte der ChIP wurden beibehalten.



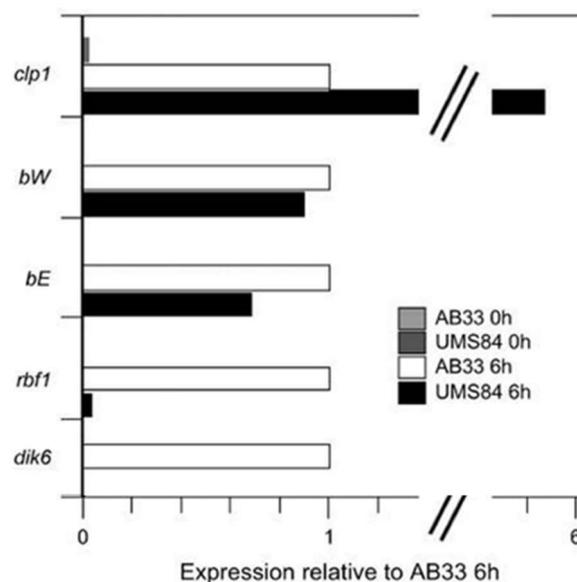
**Abbildung 24: Leichte Verschiebung des Maximums bei Ko-Expression von Rbf1, Clp1 und b.** Untersucht wurde der Stamm UBF35 (*a2 Δb::P<sub>crg1</sub>:bW2,E1 rbf1:3xHA, cbx'P<sub>crg1</sub>:clp1::3xmyc cbx<sup>5</sup>*) und der Stamm UDS5 (*a2 Δb::P<sub>crg1</sub>:bW2,E1 rbf1:3xHA*). Die 6h-Induktion von Rbf1 erfolgte über die Induktion des b-Heterodimers. **A**) Schematische Darstellung der Amplikons auf dem *dik6*-Promotor, die für die Real-Time-PCR-Analyse verwendet wurden. Der rote Strich markiert die Stelle der *bbs* innerhalb des Promotors. Als Referenzgene wurden das ORF-Amplikon und das Haushaltsgen *elf2b* verwendet. **B**) Die Induktion von Clp1 in UBF35 (b, Rbf1:HA, Clp1) erfolgte über den *crg1*-Promotor. In beiden Fällen wurde Rbf1:3xHA mit einem HA-Antikörper präzipitiert. Die Anreicherung im Stamm UDS5 entsprach den Ergebnissen von Heimel und Ulrich. Ein Maximum im Amplikon 3 und 4 mit einer ca. 13-fachen Anreicherung. Im Stamm UBF35 (b, Rbf1:HA, Clp1) kam es zu einer leichten Verschiebung des Maximums auf das Amplikon 4 und 5, jedoch konnte sonst kein weiterer signifikanter Unterschied in der Bindung von Rbf1 in Anwesenheit von Clp1 festgestellt werden. Für die Normalisierung wurden die Real-Time-PCR-Ergebnisse der nicht präzipitierten DNA der jeweiligen Stämme herangezogen. **C**) Start- und Stoppositionen der jeweiligen Amplikons bezogen auf den Transkriptionsstart.

In beiden Fällen war die Verteilung der Anreicherung ähnlich wie in den zuvor durchgeführten Experimenten. Eine leichte Verschiebung des Maximums konnte im Stamm UBF35 vom 3. und 4. Amplikon auf das 4. und 5. Amplikon festgestellt

werden (Abb. 24). Das Maximum lag zwischen 12- und 14-facher Anreicherung, was den Werten aus den Arbeiten von Heimel und Ulrich entspricht.

Somit konnte kein Unterschied in der Anreicherung, zwischen der Expression von Rbf1 und Rbf1 + Clp1, innerhalb des *dik6*-Promotors festgestellt werden. Jedoch scheint es durch die Abwesenheit von b, zu einer insgesamt niederen Anreicherung im Vergleich von UDS5(b, Rbf1:HA) und UBF35(b, Rbf1:HA, Clp1) mit UBF34 ( $\Delta$ b, Rbf1:HA und  $\Delta$ b, Rbf1:HA, Clp1) zu kommen (Vgl. Abb. 23, 24).

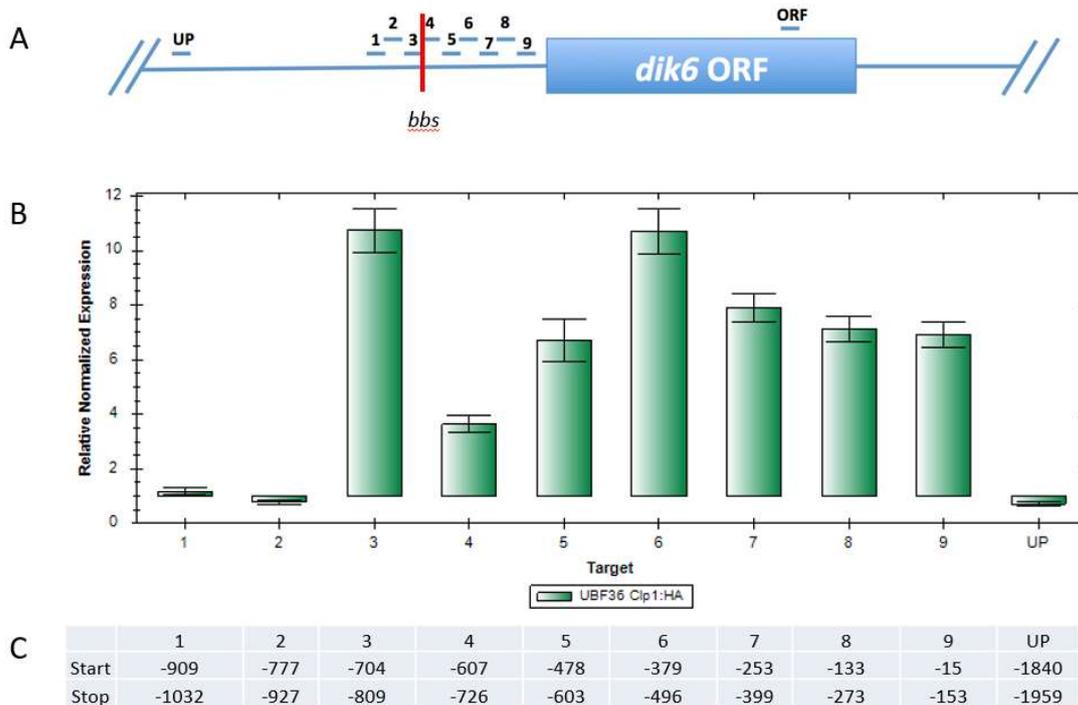
Betrachtet man die Expressionsdaten bei der Ko-Expression von b und Rbf1 und dem Einfluss von Clp1, konnte festgestellt werden, dass die Expression des *dik6*-Gens deutlich verringert ist (Abb. 25 Scherer *et al.*, 2006). Ausschlaggebend ist hierbei die starke Repression von Rbf1, die zur Folge hat, dass auch Dik6 stark reprimiert wird. Somit ist die Repression durch Clp1 indirekt durch die Rbf1-Repression zu erklären. Demzufolge ist fraglich, ob Clp1 auch im *dik6*-Promotor mit Rbf1 interagiert.



**Abbildung 25: Ausschnitt aus den Expressionsdaten der am meist herunterregulierten Gene nach Clp1-Expression.** Der Stamm AB33 enthält ein kompatibles b-Heterodimer induzierbar durch den *nar1*-Promotor was zur Induktion von Rbf1 führt. Der Stamm UMS84 enthält zusätzlich ein über den *crg1*-Promotor induzierbares Clp1. Zu sehen ist die Expression von *clp1* *bE* und *bW* sowie *dik6* nach 0h und 6h Induktion. Die *dik6*-Induktion geht nach Clp1-Expression deutlich nach unten (Abb. modifiziert nach Scherer *et al.*, 2006).

Um dies zu adressieren, wurden ChIPs mit Clp1 selbst durchgeführt. Dabei sollte festgestellt werden, ob über Clp1 die Rbf1-Bindung im *dik6*-Promotor nachweisbar ist. Im späteren Verlauf der Arbeit wurden die ChIPs mit Clp1 auch für Sequenzier-Experimente herangezogen, um eventuell weitere durch Clp1 besetzte

Promotorregionen im *U. maydis* Genom zu identifizieren. Somit kann der mögliche Einfluss von Clp1 auf die Rbf1-Bindung genomweit näher beleuchtet werden. Für die Immunopräzipitation von Clp1 wurde in den Stamm AB31 ein Clp1-3xHA-Fusionsprotein in den IP-Locus, unter der Kontrolle des *crg1*-Promotors, integriert (UBF36 (*a2Δb::P<sub>crg1</sub>:bW2,E1, cbx<sup>+</sup>P<sub>crg1</sub>:clp1::3xHA cbx<sup>5</sup>*)). Wie zuvor wurden die gleichen Bedingungen sowohl für das Wachstum als auch für die ChIP verwendet. Der erste Schritt war, zu überprüfen, ob mit der Präzipitation von Clp1:3HA ein ähnliches Anreicherungsmuster wie Rbf1 bzw. überhaupt eine Anreicherung am *dik6*-Promotor feststellbar ist. Die Real-Time-Analyse zeigte, dass eine Anreicherung zu sehen war, jedoch mit leicht verändertem Muster. Im Amplikon 1 und 2 kam es kaum zu einer Anreicherung. Eine maximale Anreicherung um das 11-fache zum *elf2b*-Gen konnte in den Amplikons 3 und 6 festgestellt werden. Die Amplikons 4 und 5 wiesen nur eine Anreicherung um das 4- bis 8-fache auf. Die Amplikons 7 bis 9 lagen bei einer 6- bis 7-fachen Anreicherung (Abb. 26). Somit konnte gezeigt werden, dass eine Anreicherung der DNA-Fragmente im *dik6*-Promotor über Clp1 möglich war. Da Clp1 keine konservierten Domänen besitzt, die DNA-Bindung prognostizieren, ist die Anreicherung sehr wahrscheinlich durch die Interaktion mit Rbf1 bzw. b erreicht worden bzw. durch zusätzliche Transkriptionsfaktoren.



**Abbildung 26: Anreicherung im *dik6*-Promotor nach Präzipitation von Clp1:3xHA.** Untersucht wurde der Stamm UBF36 ( $a2\Delta b::P_{crg1}:bW2,E1, cbxP_{crg1}:clp1::3xHA cbx^5$ ). Die Induktion von *b* und *clp1* erfolgte über den *crg1*-Promotor. *rbf1* wurde indirekt über das b-Heterodimer induziert. **A)** Schematische Darstellung der Amplikons auf dem *dik6*-Promotor, die für die Real-Time-PCR Analyse verwendet wurden. Der rote Strich markiert die Stelle der *bbs* innerhalb des Promotors. Als Referenzgene wurden das ORF Amplikon und das Haushaltsgen *elf2b* verwendet. **B)** Clp1:3xHA wurde mit einem HA-Antikörper präzipitiert. Ein Maximum der Anreicherung konnte in den Amplikons 3 und 6 festgestellt werden. Diese betrug ca. das zehnfache zu den Referenzgenen *elf2b* und dem *dik6\_ORF*-Amplikon. Im Amplikon 1 und 2 war keine Anreicherung zu erkennen. Die restlichen Amplikons erreichten eine Anreicherung von 3,5 bis ca. 8. Somit ist es möglich, mit Clp1:3xHA-DNA-Fragmente zu präzipitieren. Eine DNA-Bindung von Clp1 selbst ist damit jedoch nicht erwiesen. Für die Normalisierung wurden die Real-Time-PCR-Ergebnisse der nicht präzipitierten DNA herangezogen. **C)** Start- und Stoppositionen der jeweiligen Amplikons bezogen auf den Transkriptionsstart.

Jedoch kann bisher nicht ausgeschlossen werden, dass Clp1 selbst DNA-bindende Eigenschaften besitzt. Durch die Analysen der Rbf1-Bindung an den *dik6*-Promotor konnte kein signifikanter Einfluss durch Clp1 festgestellt werden. Dies war unabhängig der *b*-Expression zu beobachten. Die bisher bekannten Expressionsdaten zeigen, dass Clp1 jedoch großen Einfluss auf die *b*-abhängige Regulation hat. Clp1 interagiert sowohl mit *b* als auch mit Rbf1. Bei Ko-Expression von *b*, Rbf1 und Clp1 kommt es zu Repression von 95% der *b*-abhängigen Gene. Betrachtet man Rbf1 ohne *b*-Expression beschränkt sich der Clp1-Einfluss auf den *a*-Locus (Heimel *et al.*, 2010b). Somit kann nicht ausgeschlossen werden, dass Clp1 deren Bindung in anderen Promotorbereichen nicht beeinflusst. Um dies auf genomweiter Ebene zu untersuchen, wurden mit den in dieser Arbeit generierten Stämmen UBF34 ( $\Delta b$ , Rbf1:HA und  $\Delta b$ , Rbf1:HA, Clp1) und UBF35 (*b*, Rbf1:HA, Clp1) ChIP-Seq-Analysen durchgeführt. Mit Hilfe dieser Daten soll er-

mittelt werden, ob die Expressionsdaten durch einen Einfluss von Clp1 auf die DNA-Bindung von Rbf1 bzw. *b* erklärbar sind. Zusätzlich wurde mit dem Stamm UBF36 (*b*, Rbf1, Clp1:HA) ebenfalls ChIP-Seq-Experimente durchgeführt um die Korrelation von Clp1 mit den Rbf1-Bindestellen zu untersuchen.

### 2.3.3 ChIP-Seq – Analyse und Qualitätskontrolle

Die durchgeführten Real-Time-Analysen der ChIP zeigten, dass in allen untersuchten Bedingungen eine Bindung von Rbf1 bzw. Clp1 vorhanden ist. Dabei kam es zu keiner Veränderung der Rbf1-Bindung wenn Clp1 ko-exprimiert wurde. Lediglich ein Unterschied in der Anreicherung durch Rbf1 konnte in den Stämmen mit und ohne *b*-Locus identifiziert werden. Mit der ChIP von Clp1 konnten DNA-Fragmente des *dik6*-Promotors gezogen werden, was mit hoher Wahrscheinlichkeit durch eine Interaktion von Clp1 mit Rbf1, mit *b* oder mit Rbf1 und *b* zustande kommt. Um dies genauer zu analysieren, müssten Clp1-ChIPs mit *b*-Deletionsstämmen durchgeführt werden, in denen Rbf1 und Clp1 exprimiert werden.

Für die ChIP-Seq wurden die gleichen Wachstums und Induktionsbedingungen gewählt. Lediglich die Sonifizierungszeit wurde auf 20 Minuten erhöht um kleinere Fragmentlängen von ca. 100-300bp zu erhalten. Diese Fragmentgröße ist optimal für die 50bp großen *Reads* der Sequenzierung und ermöglicht eine höhere Auflösung als die Real-Time-Analysen. Zur Überprüfung einer erfolgreichen ChIP mit den 20min.-Proben wurden nochmals die Amplikons 3 und 4 des *dik6*-Promotors in Relation zu dessen ORF mittels Real-Time-PCR auf deren Anreicherung untersucht (Daten nicht gezeigt).

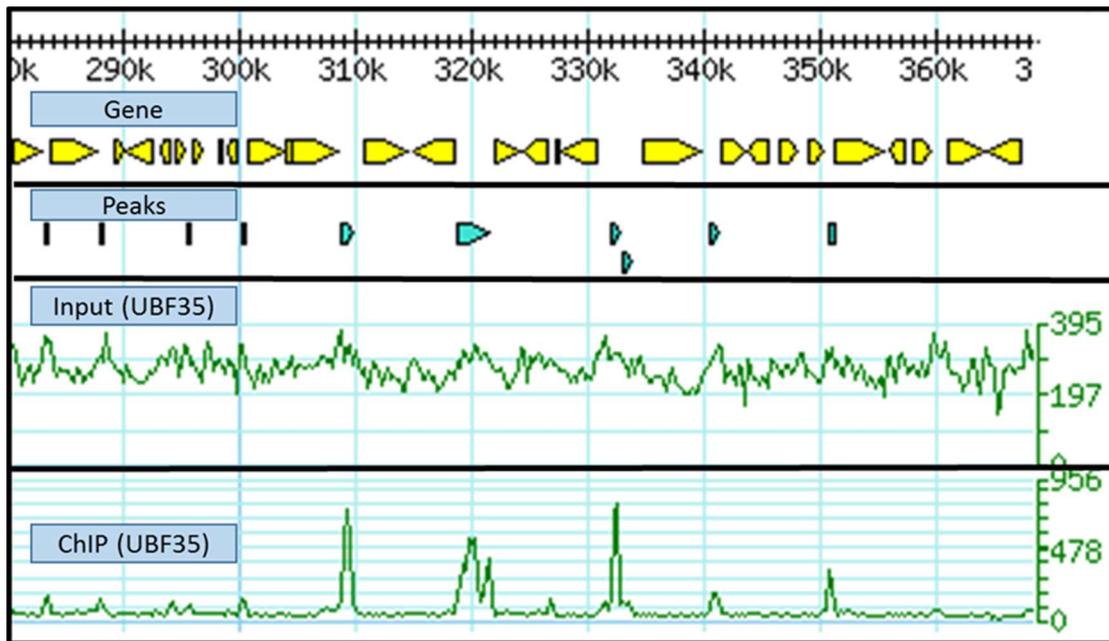
Nach Aufreinigung der DNA und der Konzentrationsbestimmung mit dem Qbit®-dsDNA-HS-Assay-Kit von Invitrogen wurden die Proben an das Institut für Toxikologie und Genetik (ITG) des KIT weitergeleitet. Dort wurde die *Library*-Konstruktion und die anschließende Sequenzierung von Olivier Armant und Victor Gourain mit Hilfe des TrueSeq-ChIP-Sample-Prep-Kit von Illumina durchgeführt.

Insgesamt wurden 4 ChIP-Proben und 3 Input-Kontrollen sequenziert. Die Anzahl der Stämme entsprach der Anzahl für die Real-Time-Analysen. Die Induk-

tion der jeweiligen Komponenten erfolgte über 6h. Im Stamm UBF34 (*a2 Δb P<sub>nar1</sub>:rbf1 3xHA, cbx'P<sub>crg1</sub>:clp1::3xmyc cbx<sup>5</sup>*) wurde Rbf1 über das HA-Tag präzipitiert. Dabei wurde einmal nur Rbf1:3xHA und in einem zweiten Ansatz Rbf1:3xHA und Clp1:3xmyc induziert. Im Stamm UBF35 (*a2 Δb::P<sub>crg1</sub>:bW2,E1 rbf1:3xHA, cbx'P<sub>crg1</sub>:clp1::3xmyc cbx<sup>5</sup>*) ist Rbf1 ebenfalls über ein HA-Tag präzipitiert worden. Im Vergleich zum Stamm UBF34 ist hier das native Rbf1 mit einer HA-Fusion versehen worden und wird indirekt über b induziert. Clp1 wurde simultan über den *crg1*-Promotor induziert. Zum Vergleich des Stammes UBF35 wurde eine zuvor durchgeführte CHIP-Seq-Analyse des Stammes UDS5 (*a2 Δb::P<sub>crg1</sub>:bW2,E1 rbf1:3xHA*) von Jonas Ulrich verwendet. Hierbei ist Rbf1:3xHA ohne Clp1-Expression präzipitiert worden. Für eine CHIP-Seq mit Clp1 wurde im Stamm UBF36 (*a2 Δb::P<sub>crg1</sub>:bW2,E1, cbx'P<sub>crg1</sub>:clp1::3xHA cbx<sup>5</sup>*) Clp1 mit einem 3xHA-Tag präzipitiert. Dabei sind alle drei Komponenten b, Rbf1 und Clp1 gleichzeitig induziert worden. Als Inputkontrollen fand, wie für die Real-Time-PCR-Analysen, die nicht präzipitierte DNA der jeweiligen Stämme Verwendung. Diese wurden durchgeführt, um unspezifische Anreicherungen zu identifizieren und somit falsch positive Peaks zu erkennen (Abb. 27). Eine Zusammenfassung der jeweiligen CHIP-Seq-Ansätze und deren Inputkontrollen ist in Tabelle 1 zu sehen. Zur vereinfachten Darstellung werden im weiteren Verlauf der Arbeit die Stämme mit Kürzel und den entsprechenden exprimierten Proteine respektive deletierte Proteine in Klammern aufgelistet. Dabei sind die Proteine, welche zur Präzipitation verwendet wurden, mit dem jeweiligen Tag versehen (Bsp. UBF34 Δb, Rbf1:HA, Clp1).

**Tabelle 1: Übersicht der durchgeführten CHIP-Seq-Ansätze.** Für die Inputkontrolle wurde DNA unpräzipitierten Chromatins der jeweiligen Stämme verwendet.

Stamm	Exprimierte Gene	Präzipitiertes Protein	Inputkontrolle
UBF34	<i>rbf1</i>	Rbf1:3xHA	x
UBF34	<i>rbf1, clp1</i>	Rbf1:3xHA	x
UBF35	<i>b, rbf1, clp1</i>	Rbf1:3xHA	x
UBF36	<i>b, rbf1, clp1</i>	Clp1:3xHA	-
UDS5 (Jonas Ulrich)	<i>b, rbf1</i>	Rbf1:3xHA	x



**Abbildung 27** Übersicht Input und ChIP Proben (UBF35 b, Rbf1:HA, Clp1). Zu sehen ist ein zufälliger Ausschnitt aus dem Genom mit einer Länge von ca. 100k bp. Die gelben Pfeile zeigen die Gene, die auf das Referenzgenom von *Ustilago maydis* annotiert sind (Pedant). Hierbei wurde bei gleichzeitiger Expression von Rbf1 und Clp1, Rbf1 über ein HA-Tag präzipitiert (ChIP(UBF35)). Die Inputkontrolle (Input(UBF35)) zeigt ein relativ gleichmäßiges Rauschen und bildet eine Basislinie zwischen einem Wert von 180-390. Teilweise können höhere Werte durch unspezifische Bindungen auftauchen. In der Chip Probe sind Anreicherungen basierend auf dem Referenzgenom zu beobachten. Die Peaks (Türkise Pfeile) zeigen die Anreicherungen in Relation zur Inputkontrolle an und sind somit als putative Bindestellen zu betrachten (MACS2). Alle hier gezeigten Peaks befinden sich in intergenischen Regionen.

Da bei der Durchführung der ChIP-Seq mit dem Stamm UBF34 in den beiden verschiedenen Ansätzen (Rbf1:HA und Rbf1:HA, Clp1) keine offensichtlichen Unterschiede in den Inputkontrollen zu erkennen waren, wurde für den Stamm UBF36 keine zusätzliche Inputkontrolle verwendet, denn es handelt sich um den gleichen Stammhintergrund wie der von UBF35 (b, Rbf1:HA, Clp1). Somit konnte dessen Inputkontrolle für die Normalisierung des Stammes UBF36 (b, Rbf1, Clp1:HA) herangezogen werden.

Die bioinformatische Arbeit zur Analyse der ChIP-Seq-Daten wurde von Florian Finkernagel vom Institut für Molekularbiologie und Tumorforschung der Philipps-Universität Marburg durchgeführt. Mittels Bowtie (Langmead *et al.*, 2009) wurden die *Reads* der Sequenzierung der ChIP-Probe und der Input-Kontrollen auf das *U. maydis*-Referenzgenom (MumDB, Kämper *et al.*, 2006) aligniert.

Der Tabelle 2 sind die Statistiken und die Qualitätskontrolle der einzelnen Sequenzierproben zu entnehmen. Der PF-Wert gibt dabei an, wie viele Nukleotide

einer internen Kontrolle während der Übertragung auf ein Chromatogramm standhalten. Der *Mean Quality Score* (MQS) gibt die Wahrscheinlichkeit eines fehlerhaft annotierten Nukleotids an. Dabei handelt es sich um einen logarithmischen Wert der wiedergibt, wie viele Basen möglicherweise falsch detektiert wurden. Ein MQS von 10 entspricht einer Sequenziergenauigkeit von 90%, da 1 von 10 Basen falsch annotiert wurde. Im Falle der hier Sequenzierten Proben liegt der MQS durchschnittlich bei ca. 36,6, was einer Genauigkeit von ca. 99,9% entspricht (Ewing *et al.*, 1998).

**Tabelle 2: Qualitätskontrolle der ChIP-Seq-Proben**

Probe	Yield (Mbases)	% PF	Reads	Mean Quality Score
UBF34 (Rbf1:HA)	1.499	89,81	33.380.290	36,62
UBF34 ( $\Delta$ b, Rbf1:HA) Input	4.669	89,22	104.667.268	36,67
UBF34 (Rbf1 HA, Clp1)	1.308	89,23	29.318.724	36,53
UBF34 ( $\Delta$ b, Rbf1:HA, Clp1) Input	6.087	89,06	136.707.462	36,67
UBF35 (b, Rbf1:HA, Clp1)	1.539	89,32	34.291.679	36,48
UBF35 (b, Rbf1:HA, Clp1) Input	4.890	89,16	108.897.554	36,51
UBF36 (b, Rbf1, Clp1;HA)	996	89,29	22.200.075	36,32

Die einzelnen ChIP-Proben wurden mit den jeweiligen Inputkontrollen normalisiert, um mögliche Bindestellen herauszufiltern. Mit MACS2 (Zhang *et al.*, 2008) konnten die putativen Bindestellen vorhergesagt und mit rohen, sowie auf gleiche Gesamtzahl an alignierten Sequenzen normalisierten Sequenzahlen annotiert werden (Tabelle 2).

**Tabelle 3: Putative Rbf1 Bindestellen**

Probe	Bindestellen	Bindestellen (fold enrichment >0.5)	ORF Annotationen	% Übereinstimmung mit DS5	% Übereinstimmung mit UBF34 Rbf1
UDS5 (b, Rbf1:HA)	2686	1797	79	-	83
UBF34 (Rbf1:HA)	2643	2101	63	83	-
UBF34 ( $\Delta$ b, Rbf1:HA, Clp1)	3310	2777	76	99,5	95
UBF35 (b, Rbf1:HA, Clp1)	2770	2124	71	-	-

Für die einzelnen Stämme/Bedingungen konnte folgende Anzahl an Rbf1-Bindestellen ermittelt werden: UBF34 ( $\Delta$ b, Rbf1:HA) 2643; UBF34 ( $\Delta$ b, Rbf1:HA, Clp1) 3310; UBF35 (b, Rbf1:HA, Clp1) 2124. Für den Stamm UBF36 (b, Rbf1,

Clp1:HA) wurden 3987 *peaks* für Clp1 ermittelt. In zuvor durchgeführten ChIP-Seq-Experimenten mit dem Stamm UDS5(b, Rbf1:HA) konnten 2686 putative Rbf1-Bindestellen identifiziert werden (Jonas Ulrich, 2015). Zur weiteren Eingrenzung der Bindestellen wurde der *log-fold-enrichment-over-IgG*-Wert miteinbezogen. Hierbei handelt es sich um den Wert der Anreicherung, der nach der Normalisierung durch die Inputkontrolle entsteht. Bereits in der Arbeit von Jonas Ulrich konnten durch visuelle Inspektion (Generic Genome Browser version 2.33) falsch positive Bindestellen mit einem Anreicherungswert von unter 0,5 aussortiert werden. Dabei schränkte sich die Liste der Rbf1-Bindestellen auf 1797 *peaks* ein. Um die Listen vergleichbar zu machen, wurden auch die in UBF34/35 und 36 gefundenen Bindestellen mit einem Wert von unter 0,5 aussortiert. Daraus ergab sich folgende Anzahl an Bindestellen: UBF34 ( $\Delta$ b, Rbf1:HA) 2101; UBF34 ( $\Delta$ b, Rbf1:HA, Clp1) 2777; UBF35 (b, Rbf1:HA, Clp1) 2124. Die Aussortierung der Bindestellen mit einem Wert von unter 0,5 wirkt sich besonders auf die durch den Stamm UBF36 ermittelten Clp1-Bindestellen aus. Von den 3987 *peaks* können nur 187 einen Wert von über 0,5 vorweisen. Dieses Ergebnis könnte bereits ein Indiz dafür sein, dass Clp1 nur indirekt an den jeweiligen Promotorbereichen zu finden ist und nicht selbst an DNA binden kann. Aufgrund des indirekten Nachweises von Clp1 über die Interaktion mit b oder Rbf1 waren geringere Werte zu erwarten.

Des Weiteren wurden die Listen auf Bindestellen überprüft, die innerhalb des ORFs eines Gens liegen. Dabei wurden für UBF34 ( $\Delta$ b, Rbf1:HA) 63, für UBF34 ( $\Delta$ b, Rbf1:HA, Clp1) 76 und für UBF35 (b, Rbf1:HA, Clp1) 71 Bindestellen identifiziert. Durch visuellen Abgleich konnte festgestellt werden, dass es sich hierbei überwiegend um eine falsche Annotation handelt, da diese *peaks* in den meisten Fällen nur eine Überlappung in einen ORF zeigen. Die Maxima und somit die eigentlichen Bindestellen liegen jedoch innerhalb der Promotorregion. Dies wurde auch für die Bindestellen in UDS5 (b, Rbf1:HA) festgestellt (Jonas Ulrich, 2015). Somit sind in allen entstandenen Listen die falsch annotierten Bindestellen nicht aussortiert worden. Folglich sind fast alle gefundenen *peaks* innerhalb von Promotorregionen zu finden und sind daher als spezifische Bindestellen einzustufen. Für die Lokalisation der Bindestellen wurden die nächstgelegene Transkripte als Anhaltspunkt gewählt. Dabei ist jedoch nicht zwischen Promotor bzw. Termina-

torregion unterschieden worden, was bedeutet, dass das ermittelte Transkript nicht zwangsweise auch das regulierte Gen ist. Dennoch wird damit ein Vergleich der Listen ermöglicht. 83% der in UDS5 (b, Rbf1:HA) entdeckten Bindestellen sind auch in UBF34 ( $\Delta$ b, Rbf1:HA) zu finden. Vergleicht man die Bindestellen von UDS5 (b, Rbf1:HA) mit den Bindestellen aus UBF34 ( $\Delta$ b, Rbf1:HA, Clp1) kommt man auf einen Wert von 99,5%. Die Gemeinsamkeit von UBF34 ( $\Delta$ b, Rbf1:HA) und UBF34 ( $\Delta$ b, Rbf1:HA, Clp1) liegt bei 95%.

Aufgrund unvorhergesehener technischer Schwierigkeiten bei der bioinformatischen Analyse konnte für UBF35 (b, Rbf1:HA, Clp1) und UBF36 (b, Rbf1, Clp1:HA) kein Vergleich mit UDS5 (b, Rbf1:HA) bzw. UBF34 ( $\Delta$ b, Rbf1:HA) durchgeführt werden. Jedoch sind ähnlich hohe Werte von über 90% zu erwarten.

Durch den Vergleich der Listen untereinander wird deutlich, dass eine hohe bis sehr hohe Gemeinsamkeit in den Bindestellen festzustellen ist. Jedoch lässt dieser Vergleich keine exakte Aussage über den Einfluss von Clp1 auf die Bindung von Rbf1 zu, da es auch bei Wiederholungen von CHIP-Seq-Experimenten bereits zu einer Varianz in den Bindestellen kam (Daten nicht gezeigt). Um einen besseren Einblick in das Bindungsverhalten von Rbf1 zu erhalten, müssen die bereits ermittelten Genexpressionsdaten für b, Rbf1 und Clp1 berücksichtigt werden. Dabei wurden die Ergebnisse aus Arrayanalysen herangezogen, in denen Genexpression nach b und Rbf1-Induktion sowie b-Induktion mit Rbf1-Deletion untersucht wurden (Heimel *et al.*, 2010b). Zusätzlich wurden Real-Time-Analysen bei gleichzeitiger Induktion von b, Rbf1, und Clp1 verwendet (Scherer *et al.*, 2006).

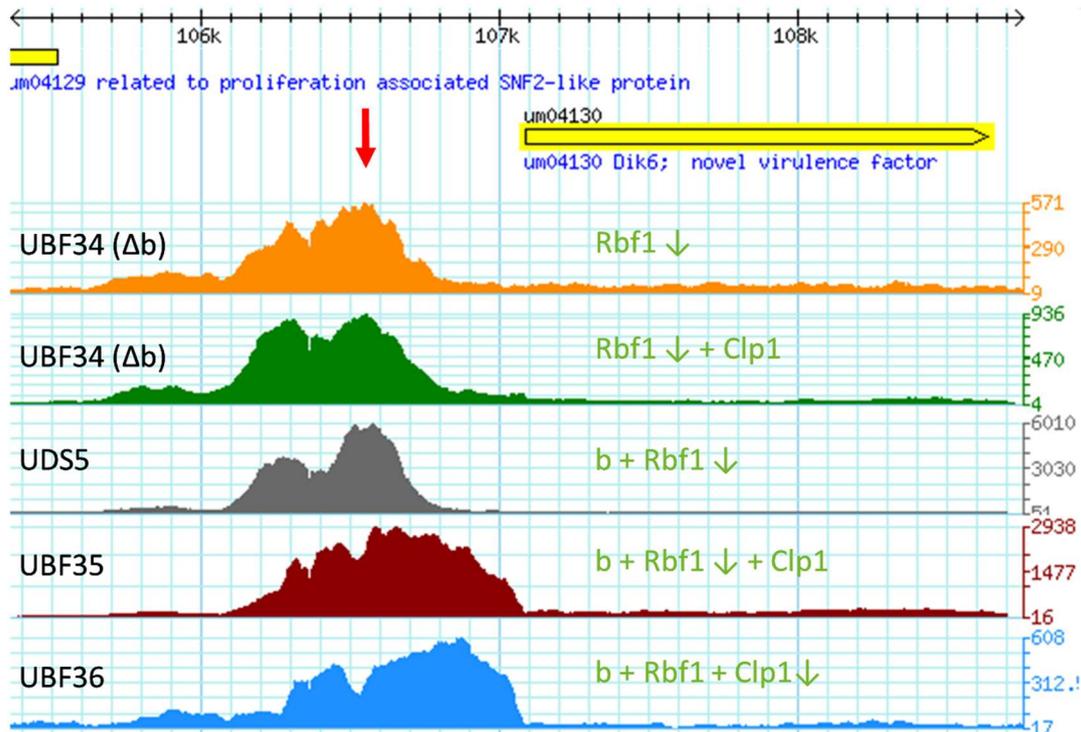
Im weiteren Verlauf der Arbeit wurden Gene betrachtet, die durch *clp1*-Expression deutlich in ihrer eigenen Expression beeinflusst wurden. Die für diese Arbeit angefertigten Abbildungen zeigen dabei die Anreicherungen ohne Normalisierung durch die Inputkontrolle. Bei allen gezeigten *peaks* handelt es sich um putative Bindestellen, deren *IgG*-Wert über 0,5 liegt. In Fällen, in denen die Normalisierung durch die Kontrolle keine Anreicherung voraussagt, aber eine Anreicherung zu sehen ist, wurde die Inputkontrolle in der jeweiligen Abbildung mit einbezogen.

### 2.3.1 Leichte Verschiebung der Rbf1 Bindung im *dik6*-Promotor

Durch die Real-Time-Analyse des *dik6*-Promotors konnte kein signifikanter Einfluss von Clp1 auf die Rbf1-Bindung festgestellt werden. Lediglich eine leichte Verschiebung des Maximums konnte in Anwesenheit von b (UBF35 (b, Rbf1:HA, Clp1)) verzeichnet werden. Mit Hilfe der CHIP-Seq-Analyse konnte ein etwas genauerer Einblick in die Bindungsaffinität von Rbf1 am *dik6*-Promotor ermöglicht werden. In Abbildung 28 sind die Ergebnisse der CHIP-Seq im Bereich des *dik6*-Promotors zu sehen. Wie auch in den Real-Time-Analysen ist beim Vergleich der Stämme UBF34 ( $\Delta$ b, Rbf1:HA) und UBF34 ( $\Delta$ b, Rbf1:HA, Clp1) keine Änderung in der Rbf1-Bindung, bei gleichzeitiger Expression von Clp1, zu erkennen. Beim Vergleich von UBF34 (Rbf1:HA) und Rbf1:HA, Clp1) mit dem Stamm UDS5 (b, Rbf1:HA) zeigt sich eine insgesamt höhere Anreicherung und es kommt zur Ausprägung von zwei definierten Maxima. Dabei ist das Maximum, welches näher am Transkriptionsstart liegt, deutlich stärker ausgeprägt. Da in diesem Bereich auch die bekannte bbs zu finden ist (roter Pfeil, Abb. 28), kann diese Ausprägung durch die Interaktion von b und Rbf1 erklärt werden.

Betrachtet man nun den Stamm UBF35 (b, Rbf1:HA, Clp1) im Vergleich zu UDS5(b, Rbf1:HA) ist zu erkennen, dass es zu einer leichten Verschiebung in Richtung Transkriptionsstart gekommen ist. Die beiden Maxima im Stamm UBF35 zeigen, ungleich von UDS5, gleich hohe Maxima. Zusätzlich ist der zweite *Peak* deutlich breiter. Da in diesem Fall alle drei Komponenten exprimiert wurden, kommt dieses Anreicherungsmuster sehr wahrscheinlich durch Interaktion von b, Rbf1 und Clp1 zustande. Bestätigt wird das ganze durch die durchgeführte CHIP-Seq mit dem Stamm UBF36 (b, Rbf1 Clp1:HA). Hier ist die gleiche Verteilung wie bei UBF35 (b, Rbf1:HA, Clp1) zu erkennen, jedoch weniger stark ausgeprägt. Ohne b-Expression ist keine Verschiebung durch Clp1-Expression erkennbar (Vgl. UBF34 ( $\Delta$ b, Rbf1:HA) mit UBF34 ( $\Delta$ b, Rbf1:HA, Clp1), Abb. 28).

Obwohl die verringerte Expression von *dik6* über die Repression von Rbf1 durch Clp1 vermittelt wird, bindet Rbf1 in allen Fällen an den Promotor. Dies deutet möglicherweise auf eine zusätzliche Funktion durch die b-, Rbf1- und Clp1-Interaktion hin.



**Abbildung 28: Leichte Verschiebung der Rbf1-Bindestelle bei Ko-Expression von b, Rbf1 und Clp1.** Gezeigt werden die erhaltenen Peaks aus den ChIP-Seq-Daten des *dik6*-Promotors der Stämme UBF34 UDS5 (Ulrich, 2015), UBF35 und UBF36. Die jeweils induzierten Gene stehen in grüner Schrift neben den Peaks. Rbf1 im Stamm UBF34 wurde hierbei über den *nar1*-Promotor induziert, Clp1 über den *crg1*-Promotor. In den Stämmen UDS5, UBF35/36 wurde b über den *crg1*-Promotor induziert und somit Rbf1 indirekt über b. Clp1 wurde über den *crg1*-Promotor, zusätzlich zur Induktion durch b, überexprimiert. Der grüne Pfeil markiert das Protein, mit dem die ChIP durchgeführt wurde. Die Induktion erfolgte über 6h. Im UBF34-Stamm kann kein Unterschied in der Rbf1-Bindung durch die Anwesenheit von Clp1 festgestellt werden. Vergleicht man den Stamm UDS5 und UBF35, ist eine leichte Verschiebung der Peaks in Richtung Transkriptionsstart zu erkennen. Diese Verschiebung spiegelt sich auch im Stamm UBF36 wieder. Diese Verschiebung beruht voraussichtlich auf der Interaktion von Clp1 mit Rbf1 und bW. Gleichzeitig weist der zweite Peak eine geringere Anreicherung in den Stämmen UBF34, UBF35 und UBF36 im Vergleich zu dem Stamm UDS5 auf. Der rote Pfeil markiert die bbs innerhalb des *dik6*-Promotors.

### 2.3.2 Rbf1-Bindung und Expressionsdaten im *a*-Locus zeigen keine Korrelation

Durch die Ko-Expression von Rbf1 und Clp1 konnte der Haupteinfluss bei der Veränderung der Genexpression auf den *a*-Locus beschränkt werden. Dabei waren hauptsächlich zwei Gene betroffen. Zum einen das Gen *mfa1*, was für das Pheromon zur Zell-Zell-Erkennung kodiert, zum anderen das Gen *pra1*, welches für den Pheromonrezeptor kodiert. *mfa1* zeigt hierbei die größte Veränderung mit einer 37-fachen Verringerung in seiner Expression. Mit einer 4,7-fachen Verringerung liegt *pra1* an zweiter Stelle (siehe Tabelle 4, Heimel *et al.*, 2010b). Da *mfa1* und *pra1* ohne Pheromoninduktion nicht durch b bzw. Rbf1 beeinflusst werden, bezieht sich die Änderung der Expression nur auf die basale Expression.

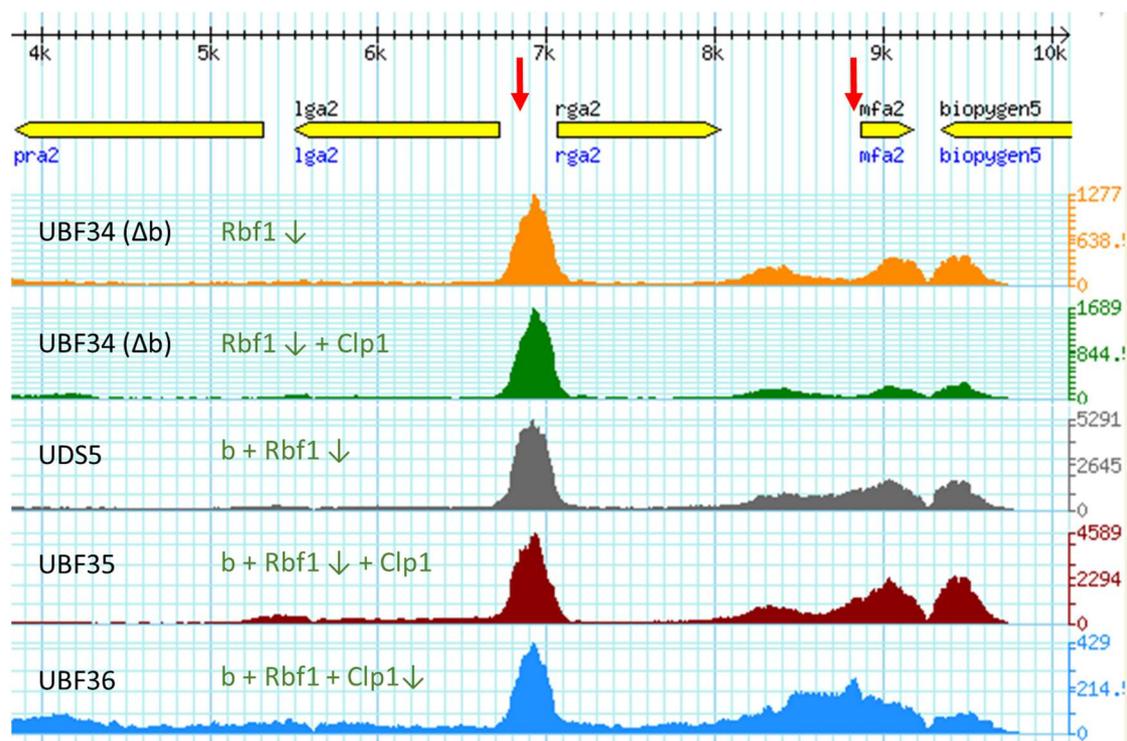
Einen weitaus stärkeren Effekt der Rbf1-abhängigen Clp1-Repression konnte bei Pheromonbehandlung gezeigt werden. Dabei war der reprimierende Effekt von Clp1 nur in Anwesenheit von Rbf1 zu beobachten (siehe Einleitung, Abb. 12) In den hier durchgeführten ChIP-Seqs-Experimenten wurden keine Pheromonbehandlungen durchgeführt.

**Tabelle 4: Differentielle Genexpression nach Ko-expression von Clp1 und Rbf1,  $\Delta b$ . Arraydaten der Stämme UKH156 ( $a1 \Delta b::Pnar1:rbf1$ ) und UKH164 ( $a1 \Delta b::Pnar1:rbf1, Pcr1:clp1$ ) (modifiziert nach Heimel *et al.*, 2010b).**

Gene	Name	Annotation	UKH156 mean	UKH164 mean	fold change	difference of means
Umag_02438	<i>clp1</i>	related to <i>clp1</i> , essential for A-regulated sexual development	8,3	4402,5	498,91	4568,55
Umag_03568		related to regulatory protein alcR	104,5	292,8	2,15	163,95
Umag_02383	<i>pra1</i>	$a2$ -pheromone receptor Pra1	512,85	127,3	-4,03	-385,55
Umag_02382	<i>mfa1</i>	$a1$ -specific pheromone (mating factor $a1$ )	3551,7	82,9	-37,51	-3478,5

Für die ChIP-Seq-Analysen wurden Stämme mit dem Paarungstypolokus *a2* untersucht. Da es sich bei *mfa1/2* und *pra1/2* jeweils um das Pheromon bzw. den Pheromonrezeptor handelt, kann davon ausgegangen werden, dass die Regulation in *a1*- und *a2*-Stämmen gleich abläuft. Somit ist es möglich die DNA-Bindung von Rbf1 im *a2*-Stamm mit den Expressionsdaten des *a1*-Stammes zu vergleichen. Betrachtet man nun die Bindeaffinität von Rbf1 im *a*-Locus (Abb. 29) kann zunächst festgestellt werden, dass Rbf1 unabhängig der Anwesenheit von *b* keine Bindestelle vor *pra2* besitzt. Die prominenteste Bindestelle ist in der Promotorregion von *lga2* bzw. *rga2* lokalisiert. Die Expression von *lga2* ist jedoch ohne *b*-Expression nicht durch die Rbf1- und Clp1-Ko-Expression beeinflusst. Vor *mfa2* sind zwar leichte Anreicherungen zu erkennen, diese konnten jedoch als nicht signifikant eingestuft werden. Somit ist die ermittelte Repression von *mfa1* indirekt durch Ko-Expression von Rbf1 und Clp1 verursacht. Bei beiden Rbf1-Bindestellen zeigt sich eine Korrelation mit der *bbs* (roter Pfeil, Abb. 29). Vergleicht man den Stamm UBF34 ( $\Delta b, Rbf1:HA$ ) mit UBF34 ( $\Delta b, Rbf1:HA, Clp1$ ) und UDS5 (*b, Rbf1, Rbf1:HA*) mit UBF35 (*b, Rbf1:HA, Clp1*) wird deutlich, dass die Expression von Clp1 keinen Einfluss auf die DNA-Bindung von Rbf1 hat. Gleich-

zeitig ist kaum ein Unterschied in der Bindung in An- bzw. Abwesenheit von *b* zu erkennen. Rbf1 bindet, wie bereits im *dik6*-Promotor zu beobachten, unter allen untersuchten Bedingungen. Eine verringerte Bindungsaffinität in UBF34 ( $\Delta b$ ) verglichen zu UDS5 und UBF35 ist, wie bereits im *dik6*-Promotor zu erkennen, auf die Abwesenheit von *b* zurückzuführen. Dies zeigt, dass die erhaltenen Expressionsdaten nicht im Zusammenhang mit der direkten Rbf1-Bindung innerhalb der jeweiligen Promotorregionen stehen. In dem Stamm UBF36, bei welchem Clp1 für die ChIP verwendet wurde, korrelieren die *Peaks* mit den Rbf1-Bindestellen und der *bbs*.

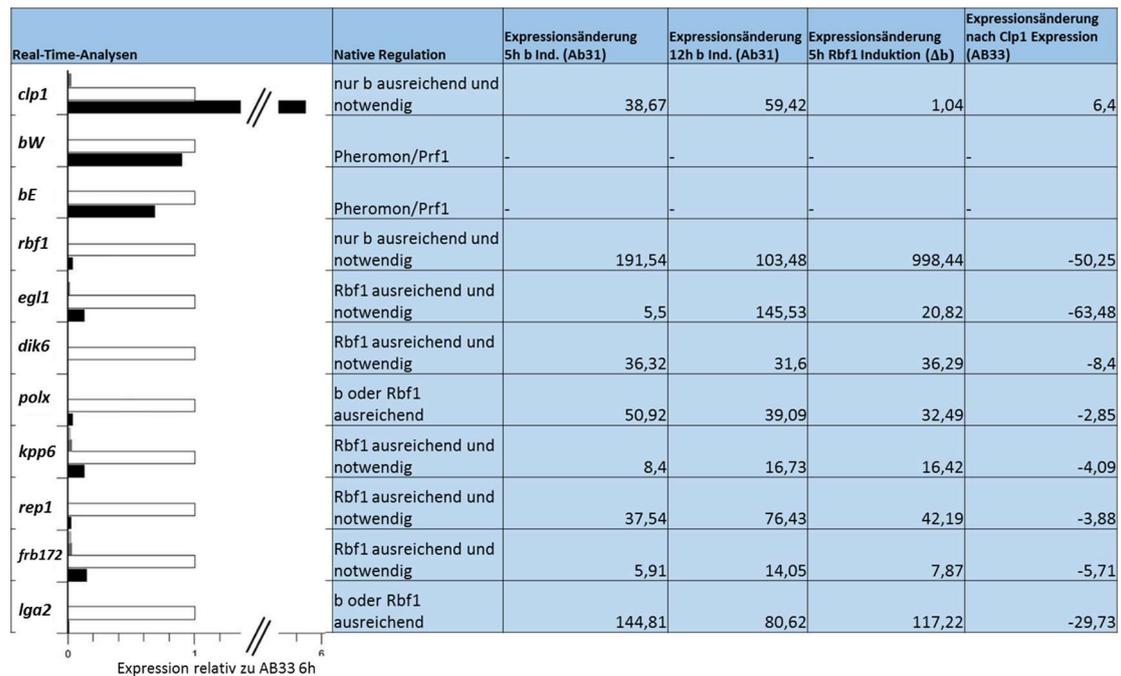


**Abbildung 29: *pra2* weist keine Rbf1-Bindestelle auf und Clp1 zeigt keinen Einfluss auf die Rbf1-Bindung in *lga2*.** Abgebildet sind die erhaltenen Peaks aus den ChIP-Seq-Daten des *a2*-Locus der Stämme UBF34, UDS5 (Ulrich, 2015), UBF35 und UBF36. Die jeweils induzierten Gene stehen in grün neben den Peaks. Der grüne Pfeil markiert das Protein mit dem die ChIP durchgeführt wurde. Die Induktion erfolgte über 6h. Im UBF34-Stamm kann kein Unterschied in der Rbf1-Bindung durch die Anwesenheit von Clp1 festgestellt werden. Ebenso verhält es sich, wenn man den Stamm UDS5 und UBF35 vergleicht. Ein Unterschied in der Anreicherung lässt sich nur im Vergleich von UBF34 mit UDS und UBF35 feststellen. Dieser ist wahrscheinlich auf die Abwesenheit von *b* zurückzuführen. Die roten Pfeile markieren die *bbs* im *rga2/lga2*-Promotor sowie im *mfa1*-Promotor.

### 2.3.3 Einfluss von Clp1 auf Rbf1-Bindung bei *b*/Rbf1-regulierten Genen

In Abwesenheit von *b* konnte keine direkte Relation zwischen der DNA-Bindung von Rbf1 und den Expressionsdaten von (Heimel *et al.*, 2010a) ermittelt werden.

Somit lässt sich der Einfluss von Clp1 auf die Expression nicht über Bindungsänderungen von Rbf1 erklären. In Anwesenheit von b hat Clp1 einen weitaus größeren Einfluss auf die Genexpression der pathogenitätsrelevanten Faktoren. Ca. 95% der b-regulierten Gene sind bei Ko-Expression von b, Rbf1 und Clp1 in ihrer Expression reduziert (Scherer *et al.*, 2006). Diese Repression kann in den meisten Fällen durch die stark reduzierte Rbf1-Expression erklärt werden und ist somit ein indirekter Effekt.

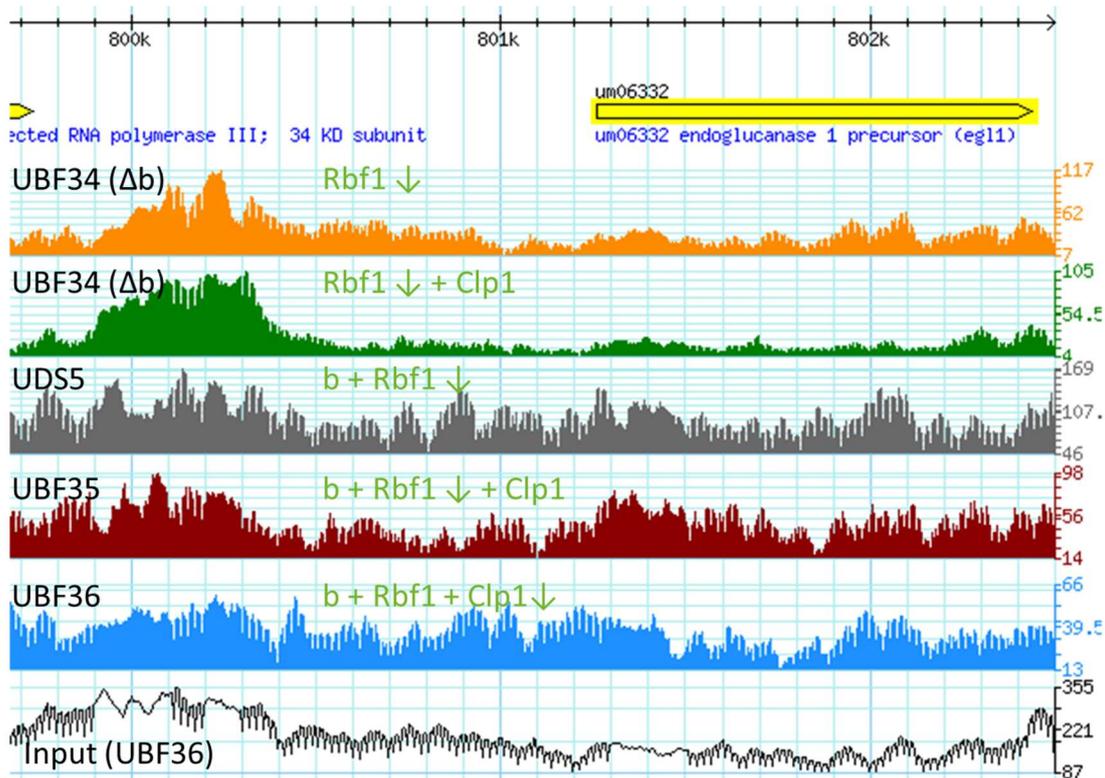


**Abbildung 30: Expressionsdaten herunterregulierter Gene nach Clp1-Expression.** Bereits durch Real-Time-Analysen konnte ein Einfluss auf die Expression von Clp1 auf verschiedene Gene erkannt werden (Scherer *et al.*, 2006). Dabei wurden die Stämme AB33 und UMS84 nach 0 und 6h Induktion untersucht. AB33 enthält ein kompatibles b-Heterodimer induzierbar durch den *nar1*-Promotor, was zur Induktion von Rbf1 führt. Der Stamm UMS84 enthält zusätzlich ein über den *crg1*-Promotor induzierbares Clp1. In der daneben aufgeführten Tabelle ist die jeweilige native Regulation der untersuchten Gene aufgeführt, die durch Arrayanalysen des Stammes AB31 festgestellt werden konnten. AB31 enthält ein kompatibles b-Heterodimer induzierbar durch den *crg1*-Promotor. Anbei sind die jeweiligen Expressionsänderungen nach 5 und 12h b-Induktion, sowie alleiniger Rbf1-Induktion angegeben (Heimel *et al.*, 2010b). In der letzten Spalte sind die Expressionsänderungen aufgeführt, die in einem Clp1-Array ermittelt werden konnten (nicht veröffentlichter Datensatz, Heimel). Hier wurde die Expression des Stammes AB33 mit und ohne Clp1-Expression untersucht. In allen Fällen konnte im Clp1-Array die Repression durch Clp1 bestätigt werden. Beachtet man jedoch, dass die native Regulation in den meisten Fällen eine Notwendigkeit von Rbf1 aufweist, könnte die Repression auf die deutlich verringerte Rbf1-Expression zurückzuführen sein.

Es konnte jedoch bereits im *dik6*-Promotor festgestellt werden, das Rbf1 unter jeglichen Bedingungen gebunden hat, sowohl in Abwesenheit als auch in Anwesenheit von Clp1 und b. Eine mögliche Kombination aus b, Rbf1 und Clp1 in anderen Bereichen des Genoms können somit nicht völlig ausgeschlossen werden. Um dies zu überprüfen, wurden zunächst Gene untersucht, welche sowohl in Real-Time-Analysen (Scherer *et al.*, 2006), als auch in Array-Analysen (unveröffent-

lichter Datensatz, Heimel) durch die Clp1-Ko-Expression als herunterreguliert ermittelt werden konnten. Dabei wurde auch die jeweilige Abhängigkeit von b und Rbf1 berücksichtigt (Abb. 30). Zur Übersichtlichkeit wurden nicht von allen Genen die ChIP-Seq-Daten aufgeführt, da teilweise gleiche Bindungsmuster zu sehen waren. Die Abbildungen der hier nicht gezeigten Promotorbereiche sind im Anhang zu finden. *egl1* codiert für den Vorläufer der Endoglucanase 1. Rbf1 ist für die Induktion von *egl1* sowohl notwendig als auch ausreichend (Heimel *et al.*, 2010b).

Die Deletion von *egl1* hat keinen Einfluss auf die pathogene Entwicklung (Schauwecker *et al.*, 1995). Betrachtet man die ChIP-Seq-Daten von Rbf1 innerhalb des *egl1*-Promotors stellt man fest, dass keine Anreicherung festzustellen ist (Abb. 31). Dabei spielt es keine Rolle, ob b exprimiert wird (UBF35 (b, Rbf1:HA, Clp1), UDS5 (b, Rbf1:HA)) oder nicht (UBF34 ( $\Delta$ b, Rbf1:HA)). Da keine Bindung von Rbf1 zu erkennen ist, schließt sich auch ein direkter Einfluss von Clp1 aus. Durch den UBF36-(b, Rbf1, Clp1:HA)-Stamm konnte auch gezeigt werden, dass Clp1 nicht in diesem Promotorbereich bindet. Folglich scheint die Regulation von *egl1* von einer weiteren Komponente, welche durch Rbf1 reguliert wird, abzuhängen. Da die alleinige Rbf1-Expression ausreicht, ist auch keine direkte Bindung von b notwendig. Es konnte keine bbs innerhalb des *egl1*-Promotors festgestellt werden. Anhand der Arraydaten war es möglich zu zeigen, dass *egl1* zu einem der stärksten herunterregulierten Genen nach Clp1-Expression gehört (Abb. 30, -63,48 *fold-change*). Drei weitere Gene wiesen noch höhere Werte auf. Die beiden am stärksten reprimierten Gene sind *umag\_11886* (-221,13 *fold-change*), ein bisher charakterisiertes Gen, bei dem Rbf1 ausreichend und notwendig für die Induktion ist und das Gen *umag\_01957* (-123,93 *fold-change*), welches für ein mögliches Vorläuferprotein einer Mannosyl-oligosaccharide alpha-1,2-mannosidase kodiert (Pedant, Helmholtz München Datenbank), jedoch weder Rbf1- noch b-abhängig ist. In beiden Fällen sind keinerlei Anreicherungen durch Rbf1 oder Clp1 in den jeweiligen Promotorbereichen zu verzeichnen. Das am drittstärksten reprimierte Gen ist *lga2*.

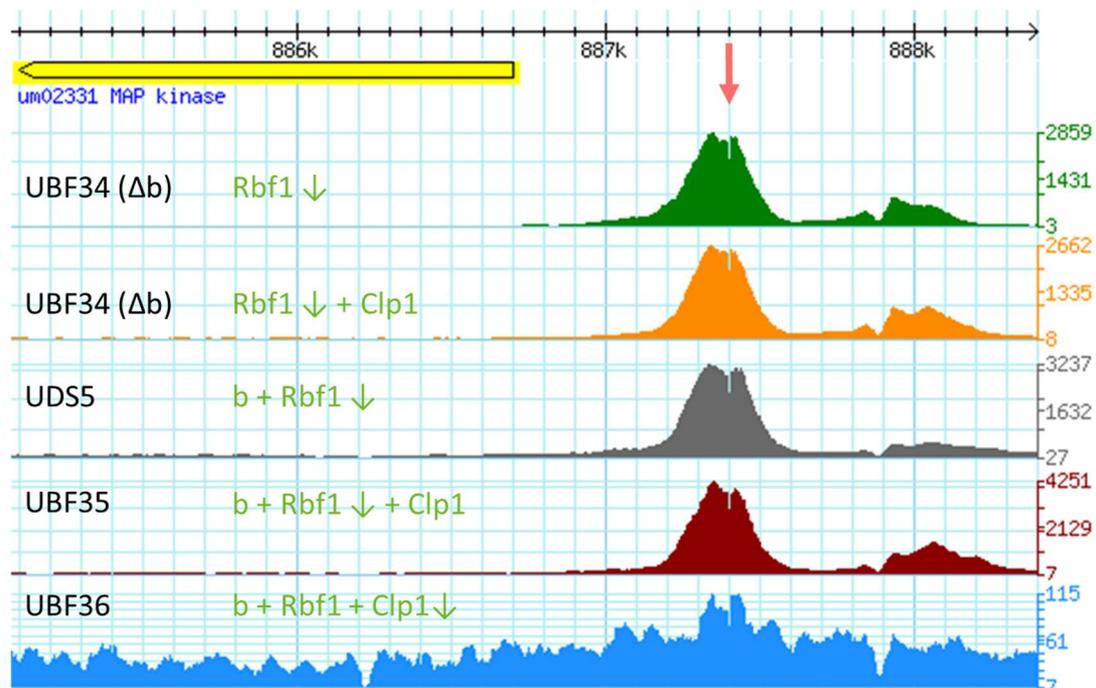


**Abbildung 31: Rbf1 bindet nicht im Rbf1-induzierten Gen *egl1* (Rbf1 notwendig und ausreichend).** Gezeigt werden die erhaltenen Peaks aus den ChIP-Seq-Daten des *egl1*-Promotors der Stämme UBF34, UDS5 (Ulrich, 2015), UBF35 und UBF36. Die jeweils induzierten Gene stehen in grün neben den Peaks. Der grüne Pfeil markiert das Protein, mit dem die ChIP durchgeführt wurde. Die Induktion erfolgte über 6h. In allen untersuchten Stämmen ist keine Anreicherung in der Promotorregion zu erkennen. Folglich wird *egl1* nicht direkt durch Rbf1 reguliert. Auch die Anwesenheit von Clp1 (UBF34 Rbf1+Clp1 und UBF35) zeigt keine Änderung in der Rbf1-Bindung. Anders als in vorherig untersuchten Genen ist hier keine bbs vorzufinden.

In der Promotorregion des *frb172*-Gens (*umag\_04771*) (Homolog zu Kha1 aus *Schizosaccharomyces pombe*), welches für einen putativen Kalium-Ionen/Protonen-Austauscher kodiert (Homolog zu Kha1 aus *Schizosaccharomyces pombe*, Brachmann *et al.*, 2001), war ebenfalls keine Bindung von Rbf1 oder Clp1 zu erkennen (Abb. 45, Anhang). Wie auch bei *egl1* ist bei *frb172* Rbf1 notwendig und ausreichend.

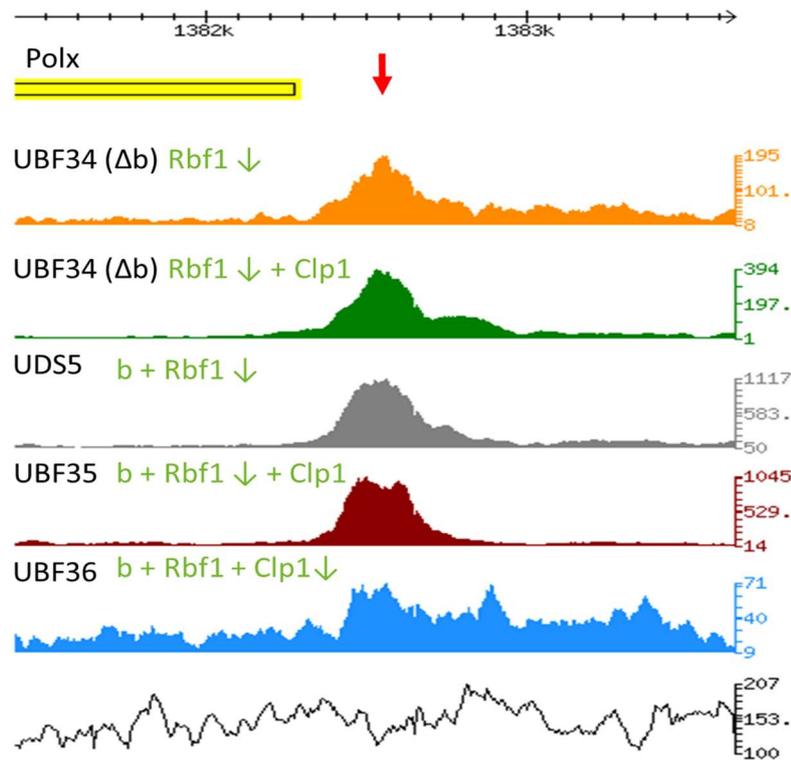
*kpp6* kodiert für eine MAP-Kinase, die eine Rolle in der Kreuzung und der pathogenen Entwicklung spielt (Brachmann A. *et al.*, 2003). Wie auch *egl1* ist für die *kpp6*-Induktion Rbf1 notwendig und ausreichend (Heimel *et al.*, 2010b). Betrachtet man die ChIP-Seq-Daten im Promotorbereich von *kpp6* zeigt sich eine eindeutige Anreicherung im Bereich von -500 bis -850 relativ zum Transkriptionsstart. Dabei ist kein Unterschied in den Stämmen UBF34 (Δb, Rbf1:HA) UBF35 (b, Rbf1:HA, Clp1) und UDS5 (b, Rbf1:HA) festzustellen (Abb. 32). Dies zeigt erneut,

dass unabhängig von *b* kein signifikanter Unterschied in der Rbf1-Bindung zu erkennen ist. Gleichzeitig hat die Clp1-Expression ebenfalls keinen Einfluss auf die DNA-Bindung. Dies wird zusätzlich noch durch die Abwesenheit von Clp1 in dieser Promotorregion bestätigt (UBF36). Die Bindung von Rbf1 an den *kpp6*-Promotor deutet im Vergleich zu *egl1* auf eine direkte Regulation hin. Da die Rbf1-Induktion von *kpp6* ausreichend ist, ist eine direkte Bindung von *b* nicht notwendig. Jedoch konnte ein *bbs*-ähnliches Motiv in der Promotorregion ausgemacht werden. Dieses liegt auf der Position -720 und korreliert mit der Rbf1 Bindestelle. Somit kann eine *b*-Bindung nicht ausgeschlossen werden.



**Abbildung 32: Clp1 weist keine Bindung in der Promotorregion von *kpp6* auf (Rbf1 notwendig und ausreichend).** Abgebildet sind die erhaltenen Peaks aus den ChIP-Seq-Daten des *kpp6*-Promotors der Stämme UBF34, UDS5 (Ulrich, 2015), UBF35 und UBF36. Die jeweils induzierten Gene stehen in grün neben den Peaks. Der grüne Pfeil markiert das Protein, mit dem die ChIP durchgeführt wurde. Die Induktion erfolgte über 6h. In allen Stämmen kommt es, wie in den Genen des *a*-Locus, zu einer Bindung von Rbf1. Der Stamm UBF36 zeigt jedoch keine Anreicherung durch Clp1 in den Bindestellen von Rbf1. Wie zuvor in anderen Promotorregionen beschrieben, kommt es auch hier zu keiner Änderung des Bindungsverhaltens von Rbf1 durch Clp1-Induktion (vgl. UBF34 Rbf1 mit UBF34 Rbf1+Clp1 und UDS5 mit UBF35). Der hellrote Pfeil markiert ein *bbs*-ähnliches Bindemotiv.

Das Gen *rep1* zeigt ein ähnliches Bindungsmuster. Es kodiert ein Vorläuferprotein für die Repellent-Proteine Rep1-11. Rbf1 ist notwendig und ausreichend für die Induktion. Wie auch bei *kpp6* ist die direkte *b*-Bindung nicht notwendig. Es konnte jedoch auch ein *bbs*-ähnliches Bindemotiv in der Promotorregion von *rep1* festgestellt werden (Abb. 46, Anhang).

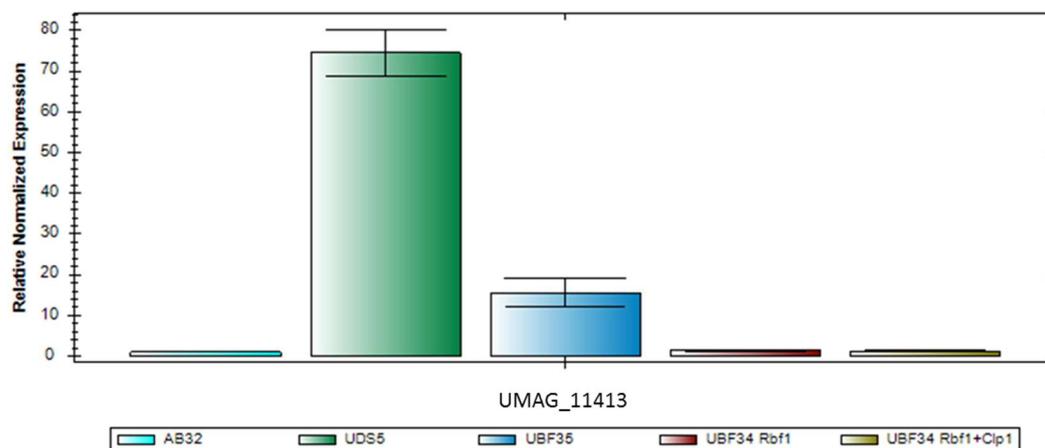


**Abbildung 33: Clp1 zeigt möglicherweise Einfluss auf Rbf1-Bindung im *polx* Promotor (b oder Rbf1 ausreichend).** Abgebildet sind die erhaltenen Peaks aus den ChIP-Seq-Daten des *polx*-Promotors der Stämme UBF34, UDS5 (Ulrich, 2015), UBF35 und UBF36. Die jeweils induzierten Gene stehen in grün neben den Peaks. Der grüne Pfeil markiert das Protein, mit dem die ChIP durchgeführt wurde. Die Induktion erfolgte über 6h. Die Anreicherung durch Rbf1 im Stamm UBF34 ( $\Delta b$ , Rbf1:HA) ohne Clp1-Induktion ist nicht als signifikant einzustufen. Mit der Clp1-Induktion entspricht die Anreicherung jedoch dem Kriterium einer putativen Bindestelle. Dies deutet möglicherweise auf ein Rbf1-Bindestelle mit verringerter Bindeaffinität hin, die durch Konformationsänderungen von Rbf1 durch Clp1 gebunden werden können. Der Stamm UBF36 zeigt keine Anreicherung durch Clp1 in den Bindestellen von Rbf1. Der rote Pfeil markiert ein bbs-Bindestmotiv.

Das Gen *polx* kodiert für die DNA-Polymerase X. Sowohl Rbf1 als auch b sind ausreichend für die Induktion (Heimel *et al.*, 2010b). Eine zu der Rbf1-Bindestelle korrelierende bbs konnte im Promotor von *polx* identifiziert werden (Abb. 33). In der Promotorregion von *polx* zeigt sich zum ersten Mal ein Einfluss von Clp1 auf die Rbf1-Bindung, jedoch nicht wie zu erwarten durch Verhindern der Bindung, sondern durch eine erhöhte Bindungsaffinität. Im Stamm UBF34 ohne Clp1 ( $\Delta b$ , Rbf1:HA) entspricht die Anreicherung nicht dem Kriterium einer putativen Bindestelle, da die Basislinie der Inputkontrolle auf ähnlich hohem Niveau liegt. Anders verhält es sich mit dem Stamm UBF34 mit Clp1 ( $\Delta b$ , Rbf1:HA, Clp1). Hier ist die Anreicherung hoch genug, um als Bindestelle gewertet zu werden. In Anwesenheit von b (UDS5, UBF35) sind deutliche Anreicherungen durch Rbf1 zu

verzeichnen. Im Vergleich von UDS (b, Rbf1:HA) und UBF35 (b, Rbf1:HA, Clp1) zeigt Clp1 keinen Einfluss auf die Rbf1-Bindung. Zusätzlich ist, wie im Fall von *kpp6*, keine Anreicherung über Clp1 zu erkennen.

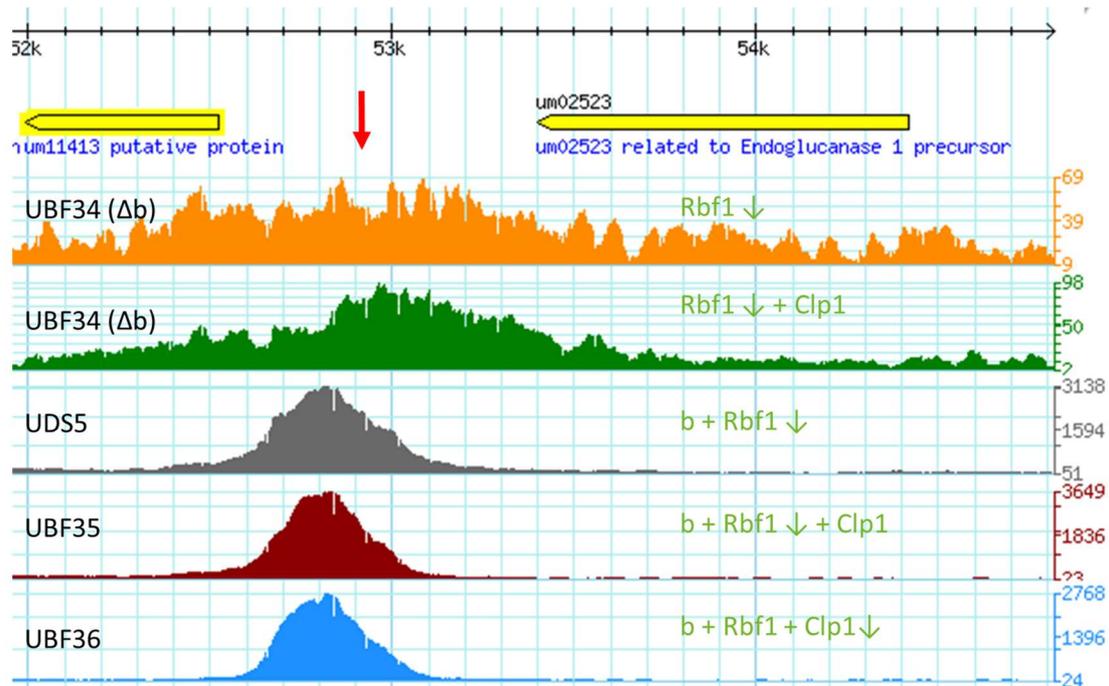
Dass Rbf1-Bindestellen nicht immer mit putativen bzw. verifizierten bbs assoziiert sind, zeigt sich am Beispiel eines direkt b-induzierten Gens. *umag\_11413* ist ein bisher nicht charakterisiertes Gen und bisher noch als putatives Protein gelistet. Die Expressionsanalyse (Abb. 34) zeigt, dass Rbf1 alleine nicht zur Induktion von *umag\_11413* ausreicht. Durch Ko-Expression mit Clp1 kommt es zu einer ca. 4.5-fach verringerten Expression von *umag\_11413*.



**Abbildung 34: Real-Time-Analyse des Gens *umag\_11413* (nur b reguliert).** Abgebildet ist die Expression des direkt b-regulierten Gens *umag\_11413* nach 6h Induktion. Der Stamm AB32 dient hierbei als Negativkontrolle. UDS5 zeigt die Expression nach der b-Induktion. Im Stamm UBF35 ist zusätzlich Clp1 exprimiert und zeigt eine Repression der *umag\_11413*-Expression. Im Stamm UBF34 ( $\Delta b$ ) ist keine Induktion zu beobachten. Dies zeigt, dass Rbf1 alleine nicht ausreichend ist, um *umag\_11413* zu exprimieren.

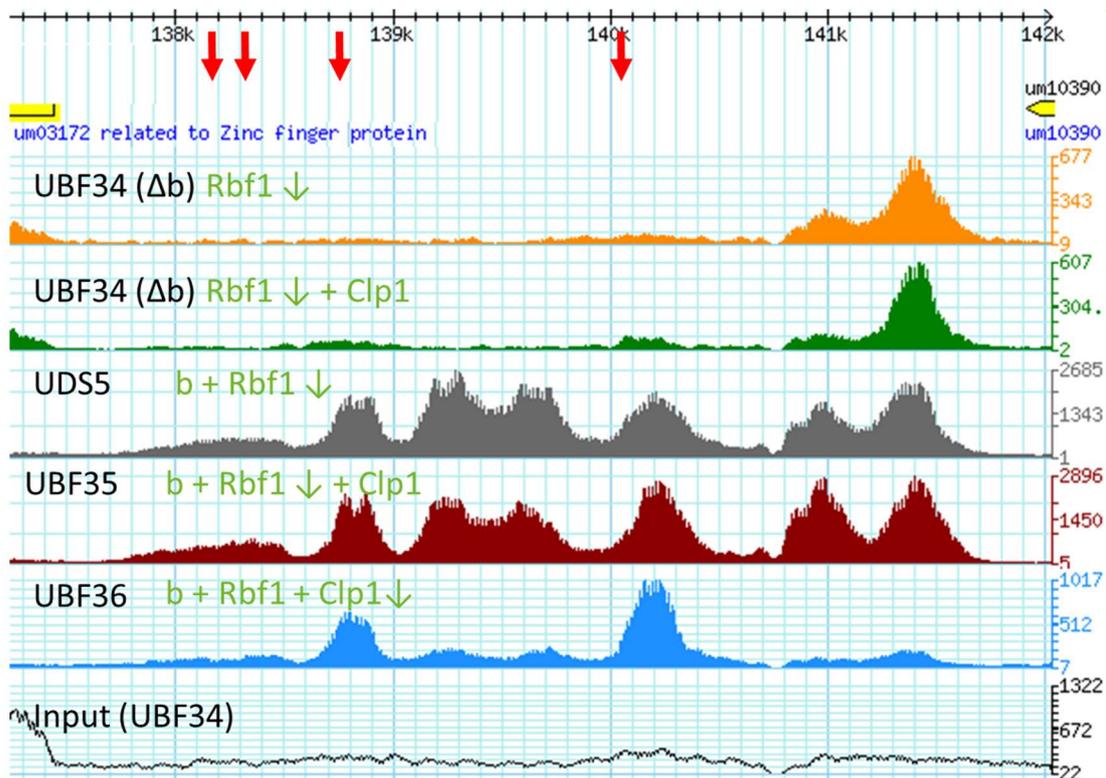
Betrachtet man die ChIP-Seq-Daten wird deutlich, dass in Abwesenheit von b keine Rbf1-Bindung vorhanden ist, was bei einem direkt durch b-induzierten Gen zu erwarten war. In Anwesenheit von b konnte mit Rbf1 jedoch eine Anreicherung festgestellt werden. Im Stamm UBF36 (b, Rbf1, Clp1:HA) konnte bei der Präzipitation mit Clp1 ebenfalls eine Anreicherung gezeigt werden. Rbf1 ist der Masterregulator der b-abhängigen Regulationskaskade und gehört zu den wenigen direkt b-regulierten Genen. Die Expressionsanalysen zeigten, dass Rbf1 nach Clp1-Expression stark reprimiert wird (Abb. 30 Scherer *et al.*, 2006). In der ChIP-Seq-Analyse konnte eine Bindung von Rbf1 im eigenen Promotor in allen untersuchten Stämmen gezeigt werden. Jedoch wurden im Vergleich zu den vorheri-

gen Promotorregionen deutliche Unterschiede in den einzelnen Datensätzen festgestellt. Im Stamm UBF34 ( $\Delta b$ , Rbf1:HA) beschränkt sich die Rbf1-Bindung auf eine sehr weit vom Transkriptionsstart entfernte Stelle (ca. 4kb). Bei den Stämmen UDS5 (b, Rbf1:HA) und UBF35 (b, Rbf1:HA, Clp1) sind noch fünf zusätzliche Bindestellen zu beobachten.



**Abbildung 35 In Abwesenheit von b kommt es zu keiner Bindung von Rbf1 im *umag\_11413*-Promotor.** Gezeigt werden die erhaltenen Peaks aus den ChIP-Seq-Daten des *umag\_11413*-Promotors der Stämme UBF34, UDS5 (Ulrich, 2015), UBF35 und UBF36. Die jeweils induzierten Gene stehen in grün neben den Peaks. Der grüne Pfeil markiert das Protein, mit dem die ChIP durchgeführt wurde. Die Induktion erfolgte über 6h. *umag\_11413* ist ein direkt b-reguliertes Gen, wodurch eine Bindung von Rbf1 nicht notwendig ist. Bei Abwesenheit von b (UBF34) zeigt sich auch, dass Rbf1 nicht im Promotor bindet. Anders verhält es sich bei der Anwesenheit von b (UDS5, UBF35). Dort konnte die Bindung von Rbf1 in der Promotorregion gezeigt werden. Zusätzlich bindet auch Clp1 (UBF36) in diesem Bereich. Die somit erhaltenen Bindestellen im Stamm UDS5 und UBF35 sind demnach auf die Interaktion von Rbf1 mit b zurückzuführen und nicht auf die eigene Möglichkeit DNA zu binden. Folglich dürfte in diesem Bereich keine Rbf1-Bindemotiv vorhanden sein. Der rote Pfeil markiert die Stelle der bbs.

Da Rbf1 ein direkt b-reguliertes Gen ist, sind bbs in der Promotorregion zu finden. Insgesamt sind es vier bbs-Motive (Abb. 36, rote Pfeile). Dabei konnte die Bindung von b an die bbs -1377 über ChIP bereits verifiziert und als funktionell eingestuft werden (Heimel *et al.*, 2010b). Die vierte Bindestelle wurde im Rahmen dieser Arbeit an der Stelle -2791 entdeckt und kann bisher nur als putative Bindestelle eingestuft werden. Jedoch korrelieren die bbs -1377 und -2791 sowohl mit Rbf1-Bindestellen als auch mit den zwei Clp1-Bindestellen.

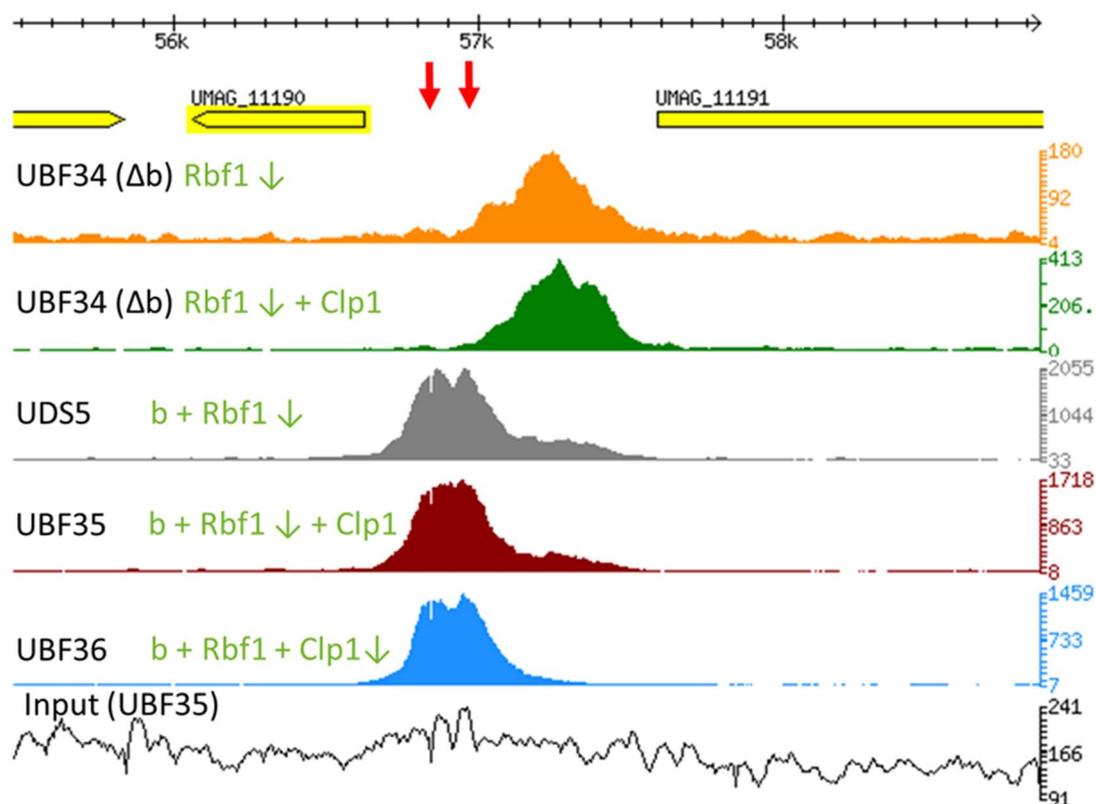


**Abbildung 36 Das direkt b-regulierte Gen Rbf1 besitzt möglicherweise einen Rückkopplungsmechanismus.** Abgebildet sind die erhaltenen Peaks aus den ChIP-Seq-Daten des *rbf1*-Promotors der Stämme UBF34, UDS5 (Ulrich, 2015), UBF35 und UBF36. Die jeweils induzierten Gene stehen in grün neben den Peaks. Der grüne Pfeil markiert das Protein, mit dem die ChIP durchgeführt wurde. Der gelbe Balken links steht für den N-terminalen Bereich von Rbf1. Die Induktion erfolgte über 6h. Der Rbf1-Promotorbereich zeigt eine Variation von allen zuvor überprüften Genen. Bei Anwesenheit von b (UDS5 und UBF35) sind 6 Rbf1-peaks in der Promotorregion zu erkennen. Ohne b (UBF34) ist nur noch ein dominantes Maximum zu verzeichnen. Die stärksten Anreicherungen durch Clp1 (UBF36) überlappen mit 2 der 4 bbs (rote Pfeile bei 138,75 und 140,05), was eine höhere Affinität von Clp1 an b als an Rbf1 vermuten lässt. Wie bei *umag\_11413* handelt es sich bei Rbf1 um ein direkt durch b induziertes Gen. 4 der 6 erhaltenen peaks sind daher nur durch die Interaktion von Rbf1 mit b zu erklären. Die beiden zusätzlichen b-unabhängige Rbf1-peaks könnten eine mögliche Grundlage für einen Rückkopplungsmechanismus von Rbf1 sein. Clp1 hat wie bei den zuvor untersuchten Genen keinen Einfluss auf die Rbf1-Bindung.

Durch die Bindestellen-Kombination in Rbf1 könnte man vermuten, dass in diesem Fall Clp1 eine höhere Interaktions-Affinität zu b als zu Rbf1 besitzt und nicht mit beiden Transkriptionsfaktoren gleichzeitig interagiert. Um dies zu überprüfen, wäre ein Stamm notwendig, in dem b deletiert wurde und mit Clp1 präzipitiert wird. Wie auch in vorherig untersuchten Promotorregionen ist kein Einfluss von Clp1 auf die DNA-Bindung von Rbf1 zu beobachten. Da Rbf1 selbst für die Induktion der meisten Gene notwendig und ausreichend ist, sind diese bereits durch verringerte Rbf1-Expression weniger stark exprimiert. Bereits bei zwei direkt b-regulierten Genen (*rbf1* und *umag\_11413*) konnte festgestellt werden, dass es in den ChIPs von Rbf1 und Clp1 zu Anreicherungen in den Promotorregionen gekommen ist.

Für Rbf1 konnte durch den Vergleich der Stämme UBF34 ( $\Delta b$ , Rbf1:HA) und UBF34 ( $\Delta b$ , Rbf1:HA, Clp1) mit UDS5 (b, Rbf1:HA) und UBF35 (b, Rbf1:HA, Clp1) gezeigt werden, dass Rbf1 selbst keine Bindestelle besitzt und die erhaltenen Anreicherungen nur bei Anwesenheit von b zustande gekommen sind. Die Anreicherung durch Clp1 ist nur durch Interaktion mit Rbf1 oder b zu erklären (Abb. 33 und 34).

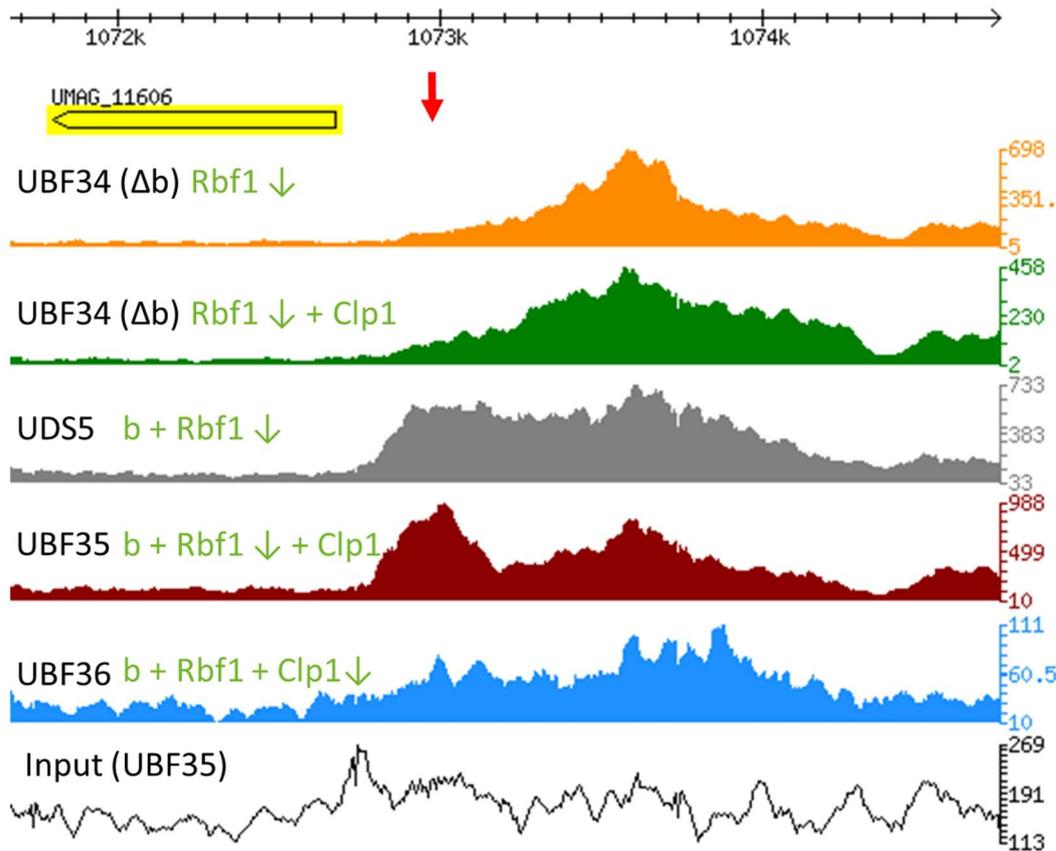
Möglicherweise kommt es durch Interaktion von Rbf1 und Clp1 zur Unterdrückung der b-Funktion in den entsprechenden Promotoren. Um zu zeigen, dass Clp1 in Kombination mit Rbf1 einen Einfluss auf b besitzt, wurden weitere Promotorbereiche von direkt b-regulierten Genen auf Anreicherungen durch Rbf1 und Clp1 untersucht.



**Abbildung 37 Anreicherung von Rbf1 und Clp1 im direkt b-regulierten Gen *umag\_11190*.** Gezeigt sind die erhaltenen Peaks aus der ChIP-Seq-Daten des *umag\_11190*-Promotors der Stämme UBF34, UDS5 (Ulrich, 2015), UBF35 und UBF36. Die jeweils induzierten Gene stehen in grün neben den Peaks. Der grüne Pfeil markiert das Protein mit dem die ChIP durchgeführt wurde. Die Induktion erfolgte über 6h. In Abwesenheit von b (UBF34) ist ohne Clp1 Induktion kein signifikanter Peak von Rbf1 zu verzeichnen (Vgl. mit Input). Mit Clp1 Induktion (UBF36 + Clp1) scheint die Rbf1 Anreicherung jedoch signifikant zu sein. In Anwesenheit von b (UDS5, UBF35) konnte eine Anreicherung von Rbf1 in der Promotorregion gezeigt werden. Eine Verschiebung des Maximums Richtung Transkriptionsstart ist durch die Interaktion mit b zu erklären und der daraus deutlich stärkeren Anreicherung. Zusätzlich bindet auch Clp1 (UBF36) in diesem Bereich. Die Bindung von Rbf1 in Anwesenheit von Clp1 könnte auf eine niederaffine Bindestelle hindeuten, die nur zur Rbf1 Bindung durch Clp1 Interaktion führt. Die roten Pfeile markieren die Stelle der zwei bbs an Position -349 und -208.

Wenn in allen nur durch b-induzierten Genen, Anreicherungen durch Rbf1 und Clp1 in den Promotorbereichen gezeigt werden können, ist es sehr wahrscheinlich, dass die Rbf1/Clp1-Interaktion einen direkten Einfluss auf b besitzt.

Insgesamt sind zwölf direkt b-abhängige Gene identifiziert worden (Heimel *et al.*, 2010b). Jedoch konnten nur bei zwei weiteren Genen ein Einfluss durch Clp1 festgestellt werden, die beiden nicht charakterisierten Gene *umag\_11190* und *umag\_11606*. In den Clp1-Array Daten (unveröffentlichter Datensatz, Heimel) konnte eine Expressionsänderung von -4,11 für *umag\_11606* und eine Expressionsänderung von -2,66 verzeichnet werden. Die Expressionsänderungen von *rbf1* und *umag\_11413* liegen bei -50,25 und 7,96. Schon hier wird deutlich, dass der Haupteinfluss von Clp1 auf die Rbf1 Expression liegt. Betrachtet man nun die Promotorregion von *umag\_11190*, sind bei Anwesenheit von b Anreicherungen durch Rbf1 (UBF35, UDS5) und Clp1 (UBF36) zu erkennen. Interessanterweise ist für UBF34 ( $\Delta b$ , Rbf1:HA) keine signifikante Anreicherungen zu verzeichnen, jedoch aber im Stamm UBF34 ( $\Delta b$ , Rbf1:HA, Clp1) mit Clp1 Expression. Dies deutet auf eine mögliche Rbf1-Bindestelle hin, die nur durch Interaktion mit Clp1 zur Rbf1-Bindung führt. In diesem Fall wäre das erste Mal ein Einfluss von Clp1 auf die Rbf1-Bindung festzustellen. Da jedoch *umag\_11190* direkt b-reguliert ist und nicht durch Rbf1 induziert werden kann, ist dieser Einfluss wahrscheinlich nicht relevant. Stamm UBF34 ( $\Delta b$ , Rbf1:HA, Clp1) (Abb. 37,S.59). In der Promotorregion von *umag\_11606* konnte unter allen Bedingungen eine Anreicherung durch Rbf1 gezeigt werden. Clp1 wies jedoch keine Anreicherung auf. Somit ist bei *umag\_11606*, anders als bei den anderen direkt b-regulierten Genen *umag\_11413*, *rbf1* und *umag\_11190*, eine eindeutige Rbf1-Bindestelle vorhanden (Abb. 38, S.61) und keine Clp1-Interaktion zu verzeichnen. In den restlichen acht nicht durch Clp1 beeinflussten, direkt b-regulierten Genen sind keinerlei Anreicherungen vorhanden (Daten nicht gezeigt).

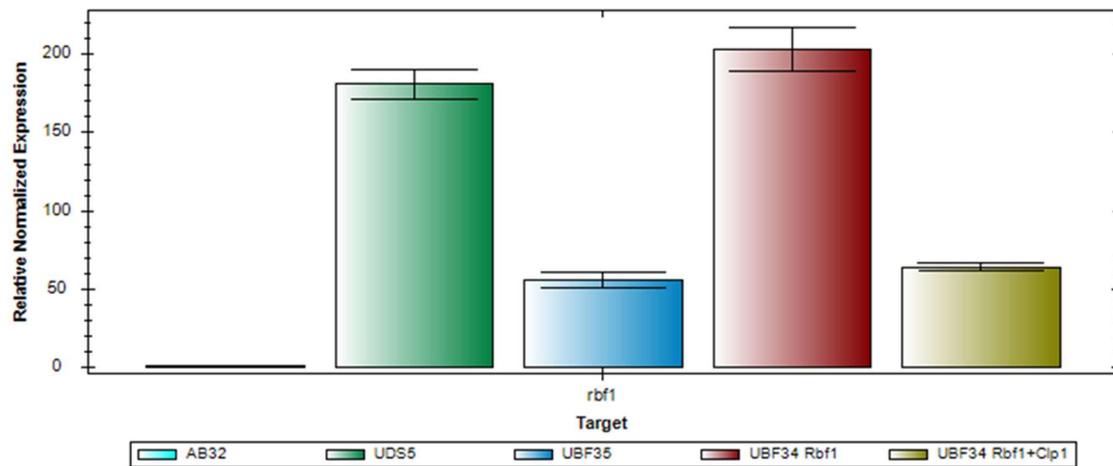


**Abbildung 38 Keine Anreicherung von Clp1 im direkt b-regulierten Gen *umag\_11606*.** Gezeigt sind die erhaltenen Peaks aus der ChIP-Seq-Daten des *umag\_11606*-Promotors der Stämme UBF34, UDS5 (Ulrich, 2015), UBF35 und UBF36. Die jeweils induzierten Gene stehen in grün neben den Peaks. Der grüne Pfeil markiert das Protein mit dem die ChIP durchgeführt wurde. Die Induktion erfolgte über 6h. In allen Fällen konnte eine Anreicherung durch Rbf1 gezeigt werden. Clp1 weist in diesem Fall keine Anreicherung auf. Der rote Pfeil markiert die Stelle der bbs an der Position -283.

### 2.3.4 Keine positive Rückkopplung von Rbf1

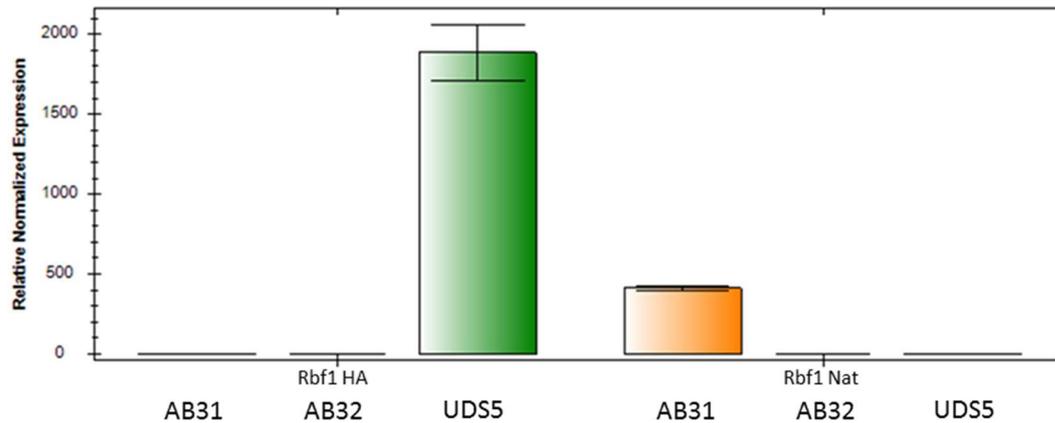
Bereits in der Arbeit von Jonas Ulrich (2015) konnte festgestellt werden, dass Rbf1 im eigenen Promotor bindet. Die Bindung im eigenen Promotor wirft die Frage auf, ob es sich hierbei, ähnlich wie bei *pfr1*, um einen positiven Rückkopplungsmechanismus handeln könnte. Denn betrachtet man die Expression von Rbf1 in den unterschiedlichen Stämmen, fällt auf, dass sowohl mit b als auch ohne b die Rbf1-Induktion nach Clp1-Induktion herunterreguliert wird. In Abb. 39 wird die Expression von Rbf1 in den Stämmen AB32 (*a2 Δb::P<sub>crg1</sub>:bW2,E2*), UDS5 (b, Rbf1:HA, Clp1) und UBF34 (Rbf1:HA und Rbf1:HA, Clp1) und UBF35 (b, Rbf1:HA, Clp1) gezeigt. AB32 dient hierbei als Negativkontrolle, da es ein inkompatibles bE/bW-Heterodimer exprimiert, was keine Rbf1-Induktion zur Folge hat. Im Stamm UBF34 wurde, wie für die ChIP-Analysen, einmal Rbf1 alleine und

einmal Rbf1 und Clp1 exprimiert. Durch den Vergleich von UDS mit UBF35 erkennt man eine ca. 3fach geringere Expression von Rbf1. Ähnlich verhält es sich im Stamm UBF34 nach Ko-Expression von Rbf1 und Clp1.



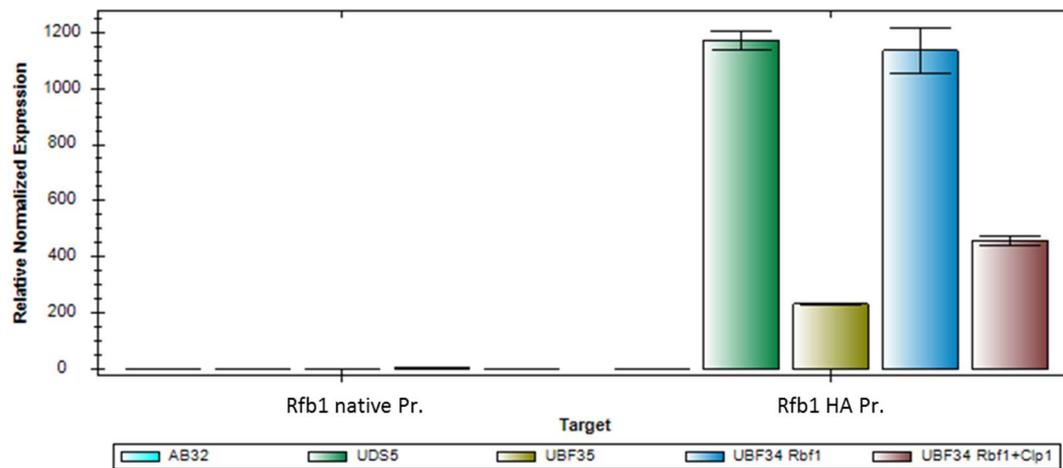
**Abbildung 39: Rbf1-Expression verringert nach Clp1-Expression.** Gezeigt wird die Expression von Rbf1 in Abhängigkeit der Clp1-Expression nach 6h Induktion. AB32 dient hierbei als Negativkontrolle. UDS5 zeigt die Rbf1-Expression nach Induktion des b-Heterodimers. In UBF35 wird zusätzlich *clp1* exprimiert. Der Stamm UBF34 ( $\Delta b$ ) zeigt die Rbf1-Expression bei Abwesenheit eines b-Heterodimers, einmal mit Clp1-Induktion (UBF34 Rbf1), einmal ohne Clp1-Induktion (UBF34 Rbf1+Clp1). Sowohl bei An- als auch bei Abwesenheit von b ist die Rbf1-Expression durch die gleichzeitige Clp1-Expression negativ beeinflusst.

Der Unterschied in den Stämmen UDS5/UBF35 und UBF34 besteht jedoch darin, dass die Rbf1-Induktion einmal direkt über den künstlich eingebrachten *crg1*-Promotor erfolgt (UBF34) und einmal über den nativen Promotor von Rbf1 durch b. Ist Rbf1 in der Lage sich selbst zu aktivieren, kann in diesem Fall die verringerte Rbf1-Expression in den Stämmen mit *crg1*-Induktion von *rbf1* erklärt werden. Dabei müsste die Rbf1-Rückkopplung zu einer ähnlich starken Induktion von Rbf1 führen, wie die b-Induktion. Durch Expression von Clp1 käme es somit zu der bisher gezeigten Repression von *rbf1*.



**Abbildung 40 Expression von *rbf1* mit und ohne HAFusion unterscheidbar.** Gezeigt wird die *rbf1*-Expression unter Verwendung zweier unterschiedlicher Primerpaare nach 6h Induktion. Rbf1 HA ist ein Primerpaar, welches nur die Expression von Rbf1 mit HA-Fusion zeigen kann. Das Rbf1-nat-Primerpaar ermöglicht die Detektion der Rbf1-Expression mit nativem Terminator. Zur Überprüfung der Funktionalität wurden die Stämme AB31, AB32 und UDS5 verwendet. AB32 dient hierbei als Negativkontrolle. Im Stamm AB31 (Rbf1 mit nativem Terminator) konnte eine Expression nur mit Hilfe des „nat.“-Primerpaares festgestellt werden. Im Stamm UDS5 (Rbf1 mit HA-Fusion) wurde die Expression nur mit dem „HA“-Primerpaar gezeigt. Dies ermöglicht die Unterscheidung von Rbf1 mit und ohne HA-Fusion im Stamm UBF34 (siehe Abb. 39). Die Negativkontrolle (AB32) zeigt in keinem der beiden Fälle eine Expression von Rbf1.

Um zu überprüfen, ob Rbf1 seine eigene Expression induzieren kann, wurde die Induktion des nativen *rbf1*-Gens nach Induktion einer ektopischen, durch den *crg1*-Promotor induzierbaren *rbf1:HA* Kopie (UBF34) untersucht.



**Abbildung 41 Keine positive Rückkopplung von *rbf1* durch Rbf1.** Abgebildet ist die *rbf1*-Expression unter Verwendung zweier unterschiedlicher Primerpaare nach 6h Induktion. Rbf1-HA ist ein Primerpaar, welches nur die Expression von Rbf1 mit HA-Fusion zeigen kann. Das Rbf1-native Primerpaar ermöglicht die Detektion der Rbf1-Expression mit nativem Terminator. Der Stamm AB32 dient als Negativkontrolle. Die Stämme UDS5 und UBF35 besitzen jeweils ein Rbf1 mit HA-Fusion. Folglich kann die Expression nur über das „HA“-Primerpaar detektiert werden. Im Stamm UBF34 ist sowohl Rbf1 im nativen Locus als auch ein ektopisch integriertes Rbf1 mit HA-Fusion vorhanden. Die Rbf1-Expression konnte jedoch nur mit dem „HA“-Primerpaar detektiert werden. Somit besitzt Rbf1 trotz vorhandener Rbf1-Bindestelle in der Promotorregion (Abb. 36) keine positive Rückkopplung bei Abwesenheit von b.

Die Differenzierung der beiden *rbf1*-Transkripte erfolgte dabei über HA-Tag, das in dem eingebrachten Konstrukt und dem nativen c-terminalen Bereich des nativen Rbf1 zu finden ist. Dafür wurden spezifische Primer generiert, die im weiteren Verlauf für den HA-Tag als „HA“-Primerpaar und für das native Transkript als „natives“ Primerpaar bezeichnet werden. Um die Funktionalität der Primer zu gewährleisten, wurden zunächst die Stämme AB31 (*a2 Δb::P<sub>crg1</sub>:bW2,E1*) mit Rbf1 im nativen Locus ohne HA Fusion, AB32 (nicht induzierbares *b*) und der Stamm UDS5 (Rbf1 im nativen Locus mit HA-Fusion) nach 6stündiger Induktion auf

Rbf1-Expression mit den beiden verschiedenen Primerpaaren untersucht. Die abgebildeten Ergebnisse (Abb. 40) bestätigen die zu erwarteten Expressionen. In der Negativkontrolle AB32 konnte unabhängig des gewählten Primerpaares keinerlei Expression festgestellt werden. Im Stamm AB31 ist eine Expression nur unter Verwendung des „nativen Primerpaares“ zu detektieren. Im Stamm UDS5 hingegen wurde Rbf1-Expression nur mit dem „HA-Primerpaar“ nachgewiesen.

Somit besteht die Möglichkeit zwischen Rbf1 im nativen Locus ohne HA-Fusion und Rbf1 mit HA-Fusion zu unterscheiden. Dies ermöglicht die Untersuchung der möglichen positiven Rückkopplung von Rbf1 im Stamm UBF34. Die Induktion erfolgte wie bei den CHIP Analysen in 6h. In keinem der Fälle konnte mit dem „nativen“ Primerpaar eine Expression nachgewiesen werden. Da UDS5 und UBF35 eine 3xHA-Fusion im nativen Locus besitzen, war dies zu erwarten. Bei UBF34 wäre bei positiver Rückkopplung ein Expressionsnachweis über das „native“ Primerpaar zu erwarten gewesen. Mit dem „HA“-Primerpaar konnte das bereits bekannte durch Clp1 hervorgerufene Rbf1-Expressionsmuster bestätigt werden. Folglich unterliegt Rbf1 keiner positiven Rückkopplung. Fraglich bleibt der Einfluss von Clp1 auf den *crg1*-Promotor.

### 3. Diskussion

#### 3.1 Clp1 in der biotrophen Wachstumsphase

Eines der Hauptziele der vorliegenden Arbeit bestand darin, den Verbleib der Zellkerne in den Clp1-Deletionsmutanten während der Pflanzeninfektion zu ergründen. In den Wildtypstämmen konnte bereits gezeigt werden, dass die Zellkerne nach der Penetration der Pflanze mit Hilfe eines NLS:GFP-Konstruktes lokalisiert werden können. Des Weiteren ist es möglich, die Kernverteilung über die Schnallenzellen visuell nachzuvollziehen. Im späteren Verlauf der pathogenen Entwicklung sind die Kerne in den profilierenden Hyphenzellen weiterhin zu erkennen (Scherer *et al.*, 2002).

Die Deletion von Clp1 führt zu apathogenen Stämmen. Diese sind noch in der Lage, Appressorien auszubilden und bis zu einem gewissen Grad in die Pflanze einzudringen. Es kommt jedoch nicht zur Ausbildung der Schnallenzellen und somit kann keine ordentliche Verteilung der Zellkerne vollzogen werden. Folglich kann die Hyphe nicht weiterwachsen und die weitere Proliferation innerhalb der Pflanze kommt zum Erliegen. Anders als in den Wildtypstämmen konnten mit einer NLS:GFP-Fusion keine Kerne innerhalb der in der Pflanze befindlichen Hyphe detektiert werden (Scherer *et al.*, 2006).

##### 3.1.1 H1:3mCherry-Fusionsprotein ermöglicht Kernlokalisierung in planta

Eine Vermutung, warum die Zellkerne in den Clp1-Deletionsstämmen nicht innerhalb der Pflanze lokalisiert werden konnten, ist in der Art der Mitose begründet, die *Ustilago maydis* durchläuft. Hierbei handelt es sich um eine offene Mitose, bei der die Kernporen abgebaut und im späteren Verlauf die Kernhülle abgestreift wird (Straube *et al.*, 2005). Durch die entstandene Permeabilität des Kerns können Proteine, die keine Assoziation zu Mitose-abhängigen Prozessen besitzen, nicht im Kern verbleiben. Die NLS:3xGFP-Fusion wird zwar in den Kern transportiert, liegt aber frei im Kern vor und verteilt sich aufgrund des permeablen Kerns während der Mitose im Zytoplasma der Zelle.

Da keine Schnallenzellen im Clp1-Deletionsstamm ausgebildet werden, wurde vermutet, dass die Kerne mit der Mitose bereits begonnen haben, diese jedoch nicht vollständig durchführen können und in einer Phase stecken bleiben, in der die Kerne bereits die Kernporen abgebaut haben. Dies würde erklären, warum in  $\Delta clp1$ -Hyphen nach der Pflanzenpenetration keine Kernlokalisierung mit der NLS:3xGFP-Fusion möglich ist.

Ein standardmäßiges Verfahren zur Lokalisation von Kernen und der Beobachtung von Mitose ist in fast allen Organismen die Fusion eines Fluoreszenzproteins mit einem Histon. In *U. maydis* wurde bereits eine Fusion aus dem Histon4 und dem CFP etabliert (Straube *et al.*, 2005). Jedoch war dieses Konstrukt bisher auf die saprophytische Phase von *U. maydis* beschränkt, da die Expression des Markers sehr instabil ist (Kämper, persönliche Mitteilung).

Im Rahmen dieser Arbeit konnte ein H1:3xmCherry-Fusionsprotein generiert werden, welches stabil exprimiert wird und auch in der biotrophen Phase funktionell ist. Durch die Kombination aus H1:mCherry und NLS:GFP war es möglich, die offene Mitose in axenischer Kultur zu beobachten und so die grundlegende Funktionalität der H1:mCherry-Fusion nachzuweisen (Abb. 16). Durch die Beobachtung des Hyphenwachstums innerhalb der Pflanze konnte die Funktionalität von H1:mCherry auf und innerhalb der Pflanze gezeigt werden (Abb. 17, 18).

Die Etablierung einer H1:mCherry-Fusion, die in allen Stadien von *U. maydis* funktionell ist, ermöglicht neue Ansätze zur Untersuchung der Kernverteilung in der Pflanze. Eine Möglichkeit der Verwendung von H1-Fusionsproteinen ist die Untersuchung der Priorität der Kernverteilung nach Kreuzung zweier kompatibler Sporidien. Durch die Verwendung unterschiedlicher Fluoreszenzproteine in den für die Kreuzung vorgesehenen Stämmen kann ermittelt werden, ob es eine Präferenz gibt, welcher Kern zuerst in das Dikaryon einwandert. Erste Ansätze dazu wurden bereits in einer Bachelorarbeit (Isa Remdt, 2013) durchgeführt. Dabei wurden die Stämme FB1 und FB2 in Flüssigkultur angezogen und miteinander gekreuzt. Der Stamm FB1 enthielt eine H1:mCherry-Fusion, der Stamm FB2 eine H1:GFP-Fusion. Die Kernpräferenz wurde dabei nicht ermittelt, jedoch konnten im Anfangsstadium der Kreuzung die Kerne noch durch ein rotes und grünes Signal unterschieden werden. Nach längerer Inkubationszeit kam es dann zu einer Mischung aus beiden Fluoreszenzsignalen.

Zusätzlich zu Kernverteilungsstudien können mit der H1:mCherry-Fusion einfache Kolokalisationsexperimente durchgeführt werden. Dabei lassen sich sowohl Faktoren in axenischer Kultur als auch pathogenitätsrelevante Faktoren auf und innerhalb der Pflanze überprüfen.

Mit dem Nachweis der Funktionalität von H1:3xmCherry in der biotrophen Phase konnten die Untersuchungen auf den Verbleib der Kerne in den Clp1-Deletionsstämmen durchgeführt werden.

### **3.1.2 Einfluss der pathogene Entwicklung durch Clp1 während der Appressorienbildung**

Ein wichtiger Prozess zur Umstellung von der saprophytischen zur biotrophen Lebensphase ist der Übergang vom hefeartigen Wachstum zum filamentösen Wachstum. In den Sporidien bzw. Hyphen in und auf der Pflanze in den Wildtypstämmen UBF30 (a1b1, H1:3xmCherry,  $P_{hxt1}$ : NLS:3xGFP) und UBF31 (a2b2, H1:3xmCherry,  $P_{hxt1}$ :NLS:3xGFP) waren Kerne zu erkennen, die sowohl das mCherry-Signal als auch das GFP-Signal aufwiesen (Abb. 17). Zum Teil war es möglich, Kerne innerhalb der Pflanze im Dikaryon zu erkennen (Abb. 18). Die Clp1-Deletionsstämme UBF37 ( $\Delta$ Clp1 a2b2, H1:3xmCherry,  $P_{hxt1}$  NLS:3xGFP) und UBF38 ( $\Delta$ Clp1 a2b2, H1:3xmCherry,  $P_{hxt1}$ :NLS:3xGFP) wiesen auf der Pflanzenoberfläche den gleichen Phänotyp auf. Sowohl in einzelnen Sporidien als auch in Dikarya liegende Kerne zeigten beide Fluoreszenzsignale (Abb. 19). Es konnten jedoch wie zuvor keine Kerne in den Hyphen innerhalb der Pflanze festgestellt werden.

Da sich die Kerne auf der Blattoberfläche befanden, musste die Kernwanderung in einem Stadium zwischen Ausbildung des Dikaryons und der Penetration der Pflanze unterbrochen worden sein. Dies grenzt den möglichen Checkpunkt für die Kernmigration auf die Appressorien ein. Sowohl in den Wildtypstämmen als auch in den Clp1-Deletionstämmen waren Kerne in den Appressorien zu beobachten. Es konnte jedoch festgestellt werden, dass die Kerne in vielen Fällen nicht mehr beide Fluoreszenzsignale zeigten. Unterschiedliche Kombinationen von GFP-Signal und mCherry-Signal wiesen dabei auf bereits permeable Kern-

membranen hin. Dabei waren Kerne kurz vor, im und kurz nach dem Appressorium zu erkennen (Abb. 20, 21).

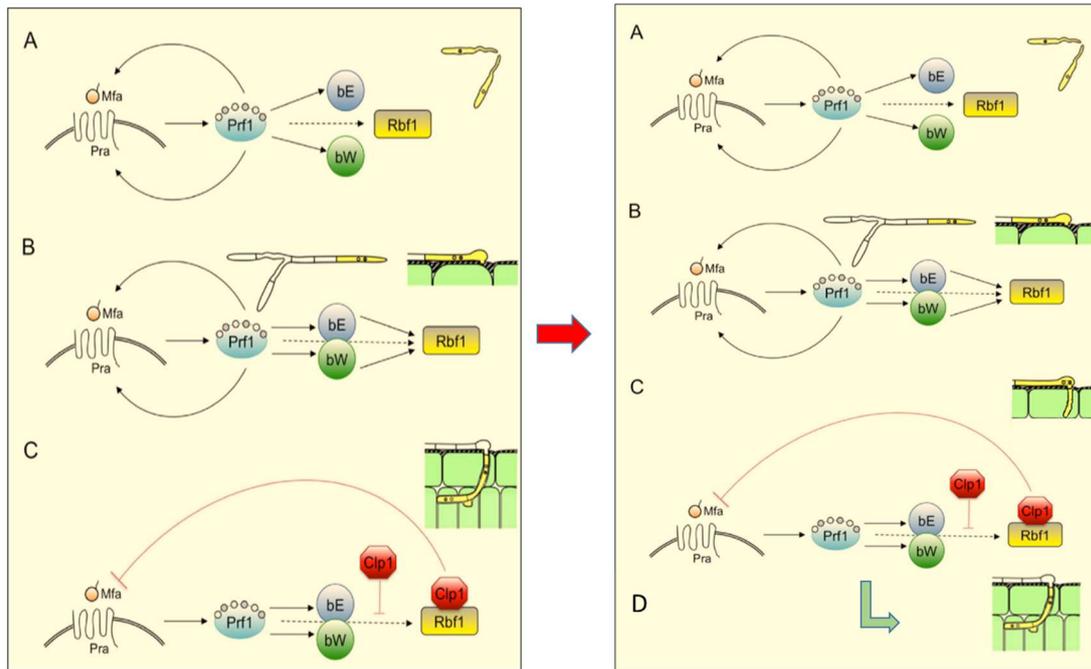
Eine Möglichkeit zur Erklärung der permeablen Kernhüllen ist ein mit der Appressorienbildung einhergehende Beginn der Mitose. Mitose vor und während der Appressorienbildung konnte bereits in anderen Pflanzenpathogenen untersucht werden. In dem Reispathogen *Magnaporthe oryzae* (Ascomycet) ist die Mitose eine Voraussetzung zur Ausbildung des Appressoriums. Dabei beginnt die Mitose kurz nach der Keimung der Konidien auf dem Reisblatt. Einer der neu entstandenen Kerne wandert dabei zur Spitze des Keimfadens, wo währenddessen die Bildung des Appressoriums beginnt. Der zweite Kern wandert zurück in die Konidie, welche im späteren Verlauf durch Apoptose degradiert wird (Saunders *et al.*, 2010b; Veneault-Fourrey *et al.*, 2006).

In *U. maydis* konnte Clp1 während der Appressorienbildung zum ersten Mal durch eine Clp1:GFP-Fusion im Zellkern lokalisiert werden (Scherer *et al.*, 2006). Durch die Stabilisierung über Cib1 kann Clp1 seine Funktion als Repressor des b-Heterodimers übernehmen (Heimel *et al.*, 2015). Folglich muss in den Wildtypstämmen bereits zu diesem Zeitpunkt der Zellzyklusarrest aufgelöst sein. Da der Arrest in der G2-Phase eingetreten ist, ist die logische Schlussfolgerung bei Aufhebung des Arrestes der unmittelbare Beginn der Mitose einhergehend mit der Penetration der Pflanze. Demzufolge müssten die Mitose und die Appressorienbildung, wie in *M. oryzae*, gekoppelt sein. Damit lässt sich auch die Beobachtung der permeablen Kernhüllen im bzw. kurz vor dem Appressorium in den Wildtypstämmen nachvollziehen.

Da zuvor angenommen wurde, dass die Kerne in *U. maydis* erst zum Zeitpunkt der Schnallenzellenbildung die Mitose beginnen, stellt dieses Szenario die Funktionsweise von Clp1 als Faktor der Schnallenzellenbildung und der Aufhebung des Zellzyklusarrests in Frage. Damit wäre das Ausbleiben der Schnallenzellen in den Clp1-Deletionstämmen nicht mehr der Grund für den Wachstumsstopp, sondern ein Symptom der zuvor ausgebliebenen Zellkernteilung.

In den Clp1-Deletionsmutanten weisen, wie in den Wildtypstämmen, die Kerne auch permeable Kernmembranen auf. Allerdings konnte Kerne nie innerhalb der Pflanze beobachtet werden. Bezogen auf die Mitose bzw. die Kernwanderung ergeben sich zwei Möglichkeiten für die Funktionsweise von Clp1. Zum einen

kann Clp1 einen direkten Einfluss auf die vollständige Durchführung der Mitose haben, welcher durch Abwesenheit von Clp1 in einer Blockierung der Mitose selbst endet und somit die Auswanderung des Kerns verhindert. Zum anderen kann der umgekehrte Fall eintreffen, indem Clp1 notwendig für die Kernwanderung vom Appressorium in die infizierende Hyphe ist und dadurch indirekten Einfluss auf die Mitose als auch die weitere Proliferation innerhalb der Pflanze hat. Diese Funktionsweise kann jedoch nur auf die dikaryotische Phase beschränkt werden. In der saprophytischen Wachstumsphase kommt es zu keiner Expression von Clp1. Clp1 kann somit auch keinen Einfluss auf die Mitose ausüben. Hinsichtlich des Zellzyklusarrests in der dikaryotischen Wachstumsphase müsste dessen Aufhebung bereits durch die Appressorienbildung initiiert worden sein und nicht alleine in Abhängigkeit von der Clp1 stehen. Somit kann es in den Clp1-Deletionsstämmen zu permeablen Kernen in den Appressorien kommen. Ein möglicher Ansatz um dies zu bestätigen, lässt sich aus den Untersuchungen der Appressorienbildung in *M. oryzae* ableiten. Hier konnte gezeigt werden, dass der Eintritt in die mitotische Phase notwendig und ausreichend ist, um die Appressorienentwicklung zu ermöglichen. Die Blockierung des Zellzyklusarrests vor dem Eintritt in die mitotische Phase war ausreichend, um die Ausbildung der Appressorien zu verhindern (Veneault-Fourrey *et al.*, 2006). Das Gen *BIM1* in *M. oryzae* ist ein Homolog zu dem Gen *bimE7* aus *Aspergillus nidulans*, welches bei Deletion zum Arrest des Zellzyklus in der Pre-Anaphase führt und sich somit bereits in der mitotischen Phase befindet. Mit Hilfe einer temperatursensitiven Mutante, in dem das *BIM1*-Gen bei einer Temperatur von 29°C nicht mehr funktionsfähig ist, konnte gezeigt werden, dass die Mitose blockiert wird bzw. die Kernmigration in *M. oryzae* gestört war. Die Appressorienbildung war davon jedoch nicht beeinflusst (Saunders *et al.*, 2010a). Sollte in *U. maydis* ein ähnlicher Mechanismus vorhanden sein, kann damit sowohl die noch vorhandene Appressorienausbildung, als auch die permeablen Kerne innerhalb der Appressorien der Clp1-Deletionsstämme erklärt werden.



**Abbildung 42: Der Einfluss von Clp1 auf Rbf1 und b beginnt während der Appressorienbildung. Das linke Schaubild zeigt das bisherige ABC Modell. (A)** Die Konjugationshyphenbildung und die Zellfusion werden durch den a-Locus gesteuert. Die posttranslationelle Aktivierung des Prf1-Transkriptionsfaktors durch Phosphorylierung konservierter Serin und Threoninreste führt zu einer erhöhten Expression von *mfa* und *pra* und damit zur autokrinen Stimulation. Die Expression von *bE*, *bW* und *rbf1* erlaubt nach der Zellfusion ein schnelles Umschalten der Entwicklungsprogramme. **(B)** Das filamentöse Wachstum, die Aufrechterhaltung des G2-Zellzyklusarrestes und die Appressorienbildung wird durch den b-Locus in Abhängigkeit von Rbf1 gesteuert. **(C)** Nach der Penetration der Pflanzenoberfläche erfolgt die Clp1-vermittelte Repression der a- und b-abhängigen Signalwege, was zu einer verminderten Expression von *rbf1* führt und die Aufhebung des Zellzyklusarrestes ermöglicht (Abb. und Bildbeschreibung aus Heimel, 2010). **Das rechte Schaubild zeigt das neue Modell: (A) und (B)** sind hier identisch. **(C)** Während der Appressorienbildung kommt es zur Aufhebung des Zellzyklusarrestes, welcher durch die Clp1-vermittelte Repression der a- und b-abhängigen Signalwege, begünstigt wird. Zusätzlich gewährleistet Clp1 die Migration der Zellkerne aus dem Appressorium in die in der Pflanze befindlichen Hyphe. **(D)** Proliferation innerhalb der Pflanze.

Durch diese Erkenntnis erhält Clp1 eine veränderte Bedeutung hinsichtlich der pathogenen Entwicklung. Da Clp1 bereits vor der möglichen Schnallenzellenbildung in den Entwicklungsprozess eingreift, ist die Notwendigkeit von Clp1 für die Ausbildung der Schnallenzelle weder gegeben noch ausgeschlossen. Zusätzlich ist die Aufhebung des Zellzyklusarrestes in der dikaryotischen Phase wahrscheinlich durch weitere Faktoren, welche bereits während der Appressorienbildung aktiv sind, eingeleitet und findet bereits zu einem früheren Zeitpunkt statt als zunächst angenommen. Clp1 würde die Aufhebung des Zellzyklus-Arrestes in diesem Fall nur noch durch die Repression von b und Rbf1 begünstigen, aber sie nicht selbst hervorrufen. Somit kann das bisherige Modell der Clp1-Funktionsweise leicht modifiziert werden (Abb. 42).

### 3.2 Clp1 in der saprophytischen Wachstumsphase

Das Hauptziel dieser Arbeit bestand darin, den Mechanismus hinter der Clp1-abhängigen Repression der b- und Rbf1-Funktion zu ergründen. Da es sich in beiden Fällen um Transkriptionsfaktoren handelt, lag die Vermutung nahe, dass der Einfluss von Clp1 über die DNA-Bindung erklärbar ist. Um dieser Annahme nachzugehen, wurden zunächst ChIP- und Real-Time-Analysen kombiniert, um die Rbf1-Bindung in der bereits bekannten, von Rbf1-abhängigen, Promotorregion des *dik6*-Gens zu analysieren. Dabei wurde die Bindung unter unterschiedlichen Bedingungen überprüft:

1. Expression von Rbf1 ohne b und Clp1
2. Expression von Rbf1 und Clp1 ohne b
3. Expression von Rbf1 und b ohne Clp1
4. Expression von Rbf1, b und Clp1

Die Daten für die Expression von Rbf1 und b ohne Clp1 wurden mit dem Stamm UDS5 ( $\Delta b::P_{crg1}:bW2,E1$  *rbf1:3xHA*) generiert und stammen aus der Masterarbeit von Jonas Ulrich (2015). Um einen genomweiten Überblick zu erhalten, wurden im weiteren Verlauf der Arbeit ChIP-Seq-Analysen unter den gleichen Bedingungen durchgeführt.

#### 3.2.1 Signifikante ChIP-Seq-Daten

Durch die erhaltenen Ergebnisse der Real-Time-Analysen können erste Indizien hinsichtlich des Zusammenspiels von b, Rbf1 und Clp1 und deren Bindung in der *dik6*-Promotorregion gesammelt werden. Hier konnte bereits festgestellt werden, dass Clp1 keinen Einfluss auf die Rbf1-Bindung besitzt. Dies war unabhängig von der b-Expression zu beobachten. Vergleicht man die beiden Real-Time-Analysen zur Bindung von Rbf1 im *dik6*-Promotor untereinander, deuten die Ergebnisse auf eine stärkere Anreicherung bei Anwesenheit von b hin. Hier hatten der Stamm UBF34 ( $\Delta b$ , Rbf1:HA und  $\Delta b$ , Rbf1:HA, Clp1) eine maximale Anreicherung von 3-4 gegenüber der input-Kontrolle, wohingegen die Stämme UDS5 (b, Rbf1:HA) und UBF35 (b, Rbf1:HA, Clp1) eine Anreicherung von 12-14 erreichten. Da es sich um zwei unabhängig durchgeführte Analysen handelt, kann dies

jedoch zunächst nur spekuliert werden. Erklärbar wäre die erhöhte Anreicherung durch die Interaktion von Rbf1 mit b und einer damit verbundenen erhöhten Affinität des Komplexes. Tatsächlich ist im Maximum der Rbf1-Bindung eine bbs zur Bindung des bE/bW-Heterodimers vorhanden, was dieses Modell unterstützen würde (Abb. 23, 24).

Da Clp1 keinen Einfluss auf die Rbf1-Bindung im *dik6* Promotor aufwies, war der nächste Schritt die genomweite Überprüfung der Anreicherungen durch Rbf1 und Clp1.

Um aussagekräftige Ergebnisse für die ChIP-Seq-Experimente erhalten zu können, spielen mehrere Faktoren eine wichtige Rolle. Ein zentraler Aspekt in der ChIP ist das Vorkommen von Eu- und Heterochromatin. Euchromatin liegt in einer lockeren Form vor und ermöglicht so den einfacheren Zugang der Transkriptionsfaktoren an bestimmte Gene. Die Chromatinregionen mit vielen *house-keeping*-Genen erscheinen somit meist in Form des Euchromatins. Heterochromatin ist hingegen dicht gepacktes Chromatin, was zur Folge hat, dass die darin enthaltenen Gene weitgehend inaktiv bleiben. Eu- und Heterochromatin sind wichtige Zustände, die in der Epigenetik eine grundlegende Funktion besitzen. Im Zusammenhang mit ChIP-Seq-Analysen haben diese beiden Zustände einen Einfluss bei der Sonifizierung. Locker vorliegendes Chromatin ist einfacher zu zerbrechen, als dicht gepacktes Chromatin. Dadurch kann es bei einer IP zu einer ungleichen Verteilung an angereicherter DNA kommen (Auerbach *et al.*, 2009). Ein weiterer Faktor ist die Librarykonstruktion für die Sequenzierung, die aus der sonifizierten und aufgereinigten DNA hergestellt wird, bei der durch die Amplifikation der DNA-Fragmente Artefakte entstehen können.

Um diese möglichen Fehlerquellen zu verhindern, gibt es mehrere Möglichkeiten für die Kontroll-Experimente: zum einen die Sequenzierung der Input-DNA, die vor der Immunopräzipitation entnommen wird, zum zweiten die sogenannte „Mock“-Kontrolle – hierbei wird eine IP ohne Antikörper durchgeführt – und zum dritten die Sequenzierung der DNA einer unspezifischen IP. Dabei wird eine IP mit einem Protein durchgeführt, das nicht in der DNA Bindung oder Chromatinmodifikation involviert ist.

In allen drei Fällen sind unspezifische Anreicherungen festzustellen, die dann mit der eigentlichen ChIP verglichen werden können. So können falsch positive Bin-

destellen ausgeschlossen werden. In der vorliegenden Arbeit wurde als Kontrolle die Input-DNA verwendet.

Alle durchgeführten ChIPs mit UBF34 ( $\Delta b$ , Rbf1:HA), UBF35 (b, Rbf1:HA, Clp1) und UBF36 (b, Rbf1, Clp1:HA) lieferten Daten in hoher Qualität. Wichtigstes Qualitätsmerkmal ist der *Mean Quality Score*, der in allen durchgeführten Sequenzierungen über einem Wert 36 liegt, was einer Genauigkeit von ca. 99.9% entspricht (Ewing *et al.*, 1998). Zusätzlich wurde nur ein geringer Prozentsatz an *peaks*, die innerhalb eines ORFs liegen, festgestellt. Durch visuellen Abgleich konnten von diesen, im ORF liegend beschriebenen *peaks* der Großteil als falsch annotiert ausgeschlossen werden, da sich die Maxima dieser *peaks* in der Promotorregion befanden und nur eine Überlappung in den ORF vorlag.

Durch den Vergleich der Peaklisten von UBF34 ( $\Delta b$ , Rbf1:HA), UBF34 ( $\Delta b$ , Rbf1:HA, Clp1) mit der zuvor erstellten Liste von UDS5 (b, Rbf1:HA) zeigt sich auch, dass die Lage der Rbf1-Bindestellen reproduzierbar waren. Es konnte eine Übereinstimmung von 83% beim Vergleich zwischen UDS5 und UBF34 Rbf1 ermittelt werden. Beim Vergleich von UDS5 mit UBF34 Rbf1+Clp1 konnte 99% Übereinstimmung gezeigt werden. Im Vergleich zwischen UBF34 Rbf1 und UBF34 Rbf1 + Clp1 liegt der Wert bei 95%.

Diese Werte lassen jedoch keine Aussage darüber zu, ob Clp1 einen Einfluss auf das Bindevverhalten von Rbf1 hat. Bereits der Vergleich zweier unabhängig voneinander durchgeführter ChIP-Seq-Analysen unter gleichen Bedingungen zeigt Varianzen in den erhaltenen Bindestellen auf. Für genauere Untersuchungen wurden die Expressionsanalysen von b, Rbf1 und Clp1 mit berücksichtigt.

### 3.2.2 Mögliche Repressorfunktion durch b-, Rbf1- und Clp1-Interaktion

Beim Vergleich der ChIP-Seq-Daten mit den Ergebnissen der Real-Time-Analyse innerhalb des *dik6*-Promotors zeigt sich, dass in beiden Fällen die Rbf1-Bindung sowohl unabhängig (UBF34) als auch abhängig (UBF35) von b reproduziert werden konnten (Abb. 23, 24, 28). Durch die Ko-Expression von Clp1 konnte bei Abwesenheit von b kein signifikanter Unterschied in der Rbf1-Bindung an die DNA festgestellt werden. Bei Anwesenheit von b war eine leichte Verschiebung in Richtung Transkriptionsstartpunkt zu verzeichnen.

Bisherige Erkenntnisse zeigten, dass die massive Repression von Rbf1, hervorgerufen durch die simultane Clp1-Expression, nicht nur verantwortlich für die Repression von *dik6* ist, sondern auch für den Großteil der sonstigen Rbf1-abhängigen Gene. Durch die stark verringerte Rbf1-Konzentration kommt es zu weniger DNA-Bindung in den entsprechenden Promotorbereichen und bei zu geringer Bindungsaffinität folglich auch zu keiner Expression. Bei der ChIP wurden bestehende Proteinbindungen mit der DNA fixiert, um somit die entsprechende DNA Region zu erfassen.

In den ChIP-Seq-Analysen des *dik6*-Promotors konnte festgestellt werden, dass eine erhöhte Bindungsaffinität von Rbf1 bei Anwesenheit von *b* vorliegt als ohne *b*-Expression. Dies lässt sich durch Interaktion von Rbf1 mit *b* und der eigenen Bindung von *b* in diesem Promotorbereich erklären. Im Vergleich von UBF34 ( $\Delta b$ , Rbf1:HA) und UBF34 ( $\Delta b$ , Rbf1:HA, Clp1) zeigt Clp1 keinen Einfluss auf die Rbf1-Bindung. Fraglich ist hierbei, wie trotz deutlich geringerer Expression von Rbf1 (Abb. 22), dennoch eine nahezu gleiche Anreicherung möglich ist (Abb. 23 und 28). Bei geringerer Rbf1-Konzentration wäre eine geringere Anreicherung durch Rbf1 zu erwarten. Möglicherweise handelt es sich bei der im *dik6*-Promotor gefundenen Rbf1-Bindestellen um eine hochaffine DNA-Bindestelle. Dies würde erklären, dass bereits eine geringe Proteinkonzentration ausreicht, um diese zu sättigen.

Da die Rbf1-Bindung in allen Bedingungen nachgewiesen werden konnte, stellt sich die Frage welcher Mechanismus hinter der Repression von *dik6* steht. Da Rbf1 eine Bindung trotz geringer Konzentration eingeht, ist die verringerte Expression nicht durch unterbundene Bindung von Rbf1 zu erklären. Somit muss die Kombination aus *b*, Rbf1 und Clp1 eine reprimierende Funktion auf die kombinatorische Transkriptionskontrolle von *b* und Rbf1 im *dik6*-Promotor besitzen. Dies kann durch die Untersuchung weiterer Promotorbereiche überprüft werden.

### 3.2.3 Indirekte und direkte Repression durch Rbf1-Clp1-Interaktion

Bei der Untersuchung des Einflusses von Clp1 auf Rbf1 wurden Stämme mit einer *b*-Deletion verwendet, um die Unabhängigkeit von *b* zu gewährleisten (UKH154, UKH164, UMS83) (Heimel *et al.*, 2010a). Der Phänotyp durch Ko-

Expression von *b* und *Clp1*, sowie *Rbf1* und *Clp1* führte zu einem ähnlichen Phänotyp. Filamentöses Wachstum, ausgelöst durch *b* respektive *Rbf1*, wurde durch *Clp1* reprimiert und der G2-Zellzyklusarrest aufgehoben. Allerdings konnte ein essenzieller Unterschied in der Genexpression festgestellt werden. Werden *b* und *Clp1* ko-exprimiert, werden 95% der *b*-abhängigen Gene herunter reguliert. Bei der *Rbf1*- und *Clp1*-Ko-Expression ohne *b* waren nur drei Gene signifikant beeinflusst: *mfa1*, *pra1* und *um03568*. *Pra1* ist bei Expression von *b* und *Rbf1* nach 5h nur schwach induziert und bei alleiniger *Rbf1*-Expression nicht exprimiert. *Mfa1* wird ohne Pheromon-Behandlung nicht durch *b* bzw. *Rbf1* beeinflusst (Heimel *et al.*, 2010a). Somit handelt es sich in diesem Fall um die Repression der Basalexpression. *mfa1* ist bei Ko-Expression von *Rbf1* und *Clp1* am stärksten reprimiert, mit einer 37fachen Verringerung. *pra1* weist nur eine vierfach verringerte Expression bei Ko-Expression von *Rbf1* und *Clp1* auf. Durch Pheromoninduktion kommt es zu einer starken *pra1*-Expression und einer sehr starken *mfa*-Expression. Der Effekt der *Rbf1*- und *Clp1*-Ko-Expression ist hierbei deutlich verstärkt und drückt die pheromoninduzierte Expression auf das Level der Basalexpression zurück. Ohne *Rbf1*-Expression hat *Clp1* in diesem Fall keine reprimierenden Eigenschaften (siehe Einleitung Abb. 12, Heimel, 2010).

Im *a*-Locus konnte eine *Rbf1*-Bindung nur im *lga2*-Promotor festgestellt werden. Folglich ist sowohl die *mfa1* als auch die *pra1* Repression indirekt durch *Rbf1/Clp1*-Expression verursacht. *Rbf1* ist ausreichend für die *lga2* Expression, wird aber bei Abwesenheit von *b* nicht durch die *Rbf1/Clp1*-Expression beeinflusst.

Da keine der herunter regulierten Gene eine *Rbf1*-Bindung aufweist, kann die *Clp1*-Funktion in diesem Fall nicht eindeutig klassifiziert werden. Demzufolge sind keine neuen Erkenntnisse für *Rbf1* als aktiver Repressor (Heimel *et al.*, 2010a) festzustellen. Die Tatsache, dass *Rbf1*, bei Abwesenheit von *b*, durch Interaktion mit *Clp1* auch als Repressor agieren kann, hat einen großen Einfluss auf die Morphologie von *U. maydis*. Allerdings ist dieser Einfluss auf molekularer Ebene betrachtet auf zwei Gene beschränkt. Der Einfluss von *Clp1* bei Anwesenheit von *b* ist auf molekularer Ebene deutlich stärker ausgeprägt. Ca. 95% der *b*-regulierten Gene sind durch Ko-Expression von *Clp1* herunter reguliert. Im wei-

teren Verlauf der Arbeit wurde deshalb die Rbf1-Bindung an b-regulierten Genen untersucht, die bei Ko-Expression von b, Rbf1 und Clp1 stark reprimiert sind. Besonders interessant sind hierbei zunächst die direkt b-regulierten Gene *rbf1*, *umag\_11413*, *umag\_11190* und *umag\_11606*. In allen Fällen konnte eine Anreicherung von Rbf1 bei Anwesenheit von b festgestellt werden. Alle vier Gene sind durch die Ko-Expression von Clp1 herunter reguliert. Rbf1 ist hierbei das mit Abstand am stärksten beeinflusste Gen. In den Promotorregionen von *rbf1* und *umag\_11413* wurde keine direkte Rbf1-Bindung festgestellt, die gleichzeitig mit der bbs und der Clp1-Anreicherung korrelieren. Diese Beobachtung ist in einem direkt b-regulierten Gen zu erwarten. Etwas anders verhält es sich im Fall von *umag\_11190*. Dort konnte im Stamm UBF34 ( $\Delta b$ , Rbf1:HA) keine signifikante Anreicherung festgestellt werden. Bei Ko-Expression mit Clp1 (UBF34 ( $\Delta b$ , Rbf1:HA, Clp1)) ist jedoch eine Anreicherung zu verzeichnen, die dem Kriterium einer putativen Rbf1-Bindestelle entspricht. Dies zeigt, wie im Fall von *polx*, einen möglichen Einfluss von Clp1 auf die Rbf1-Bindeaffinität. Auszuschließen ist, dass Clp1 selbst an der DNA bindet und Rbf1 dadurch eine Anreicherung zeigt, da im Stamm UBF36 (b, Rbf1, Clp1:HA) Clp1 an dieser Position keine Anreicherung hat. Eine mögliche Erklärung wäre das Konzept von hoch und niedrig affinen Bindestellen (zusammengefasst in Siggers und Gordan 2014). Handelt es sich hier um eine nieder affine Bindestelle kann die Bindeaffinität so gering sein, das es nicht ausreicht, um eine signifikante Anreicherung von Rbf1 alleine zu gewährleisten. Clp1 könnte hier zu einer Konformationsänderung bei Rbf1 führen, was die Bindeaffinität erhöht. Da Rbf1 weder notwendig noch ausreichend für die Induktion von *umag\_11190* ist, ist die Rbf1-Bindung an sich nicht relevant (siehe *umag\_11413* und *rbf1*). Eine andere Möglichkeit wäre die DNA-Bindung eines weiteren Transkriptionsfaktors, der sowohl mit Rbf1 als auch Clp1 interagiert und so zur Anreicherung durch Rbf1 führt. Die leicht in Richtung Transkriptionsstart verschobene Anreicherung durch Rbf1 in den Stämmen UDS5 (b, Rbf1:HA) und UBF35 (b, Rbf1:HA, Clp1) korreliert mit der Clp1-Anreicherung im Stamm UBF36 (b, Rbf1, Clp1:HA). Somit konnte bereits in drei von vier Fällen eine Beteiligung von Rbf1 und Clp1 in direkt b-regulierten Genen gezeigt werden, was eine mögliche Repressoreigenschaft von Rbf1 auf b durch Interaktion mit Clp1 unterstreicht.

Eine Ausnahme bildet hier das Gen *umag\_11606*. In diesem Fall konnte keine Anreicherung über Clp1 erzielt werden, was folglich als nicht vorhandene Interaktion von Rbf1 mit Clp1 zu werten ist. Ein weiterer Unterschied ist die Tatsache, dass eine eindeutige Rbf1 Bindestelle vorhanden ist. Bei *umag\_11606* handelt es sich um das am schwächsten durch Clp1 beeinflusste direkt b-regulierte Gen (*fold-change* -2,66, Clp1-Array). Dadurch erfolgt der Einfluss von Clp1 möglicherweise indirekt, womit keine b-, Rbf1- und Clp1-Interaktion und damit einhergehende repressive Eigenschaft von Rbf1/Clp1 notwendig ist.

### 3.2.4 Komplexe Kombinatorik der b-, Rbf1- und Clp1-Interaktion

Sowohl im *dik6*-Promotor als auch in den Genen des *a*-Locus konnte kein signifikanter Einfluss der Clp1-Expression auf die Rbf1-Bindung festgestellt werden. Lediglich eine leichte Verschiebung des Maximums bei der Ko-Expression von b, Rbf1 und Clp1 war im *dik6*-Promotor zu verzeichnen. Der Vergleich der Stämme UBF34 (a2 Δb P<sub>nar1</sub>:Rbf1:3xHA; P<sub>crg1</sub>:Clp1::3xmyc) mit UBF35 (a2 Δb::P<sub>crg1</sub>:bW2,E1 *rbf1*:3xHA P<sub>crg1</sub>:*clp1*:3xmyc) bzw. UDS5 (a2 Δb::P<sub>crg1</sub>:bW2,E1 *rbf1*:3xHA) zeigt meist eine niedrigere Anreicherung von Rbf1 innerhalb der jeweiligen Promotorregion. Grund für die erhöhte Anreicherung in den Stämmen mit b-Expression, im Vergleich zu Stämmen ohne b-Expression, ist mit hoher Wahrscheinlichkeit die Interaktion von b mit Rbf1.

Um einen tieferen Einblick in das Bindeverhalten von Rbf1 zu erhalten, wurden weitere Gene untersucht, die durch Clp1-Expression reprimiert wurden. Durch die Feststellung der möglichen reprimierenden Funktion eines b-, Rbf1-, Clp1-Komplexes im *dik6*-Promotor können die folgenden Promotorregionen auf diesen Aspekt hin erörtert werden.

Einerseits gibt es b- bzw. Rbf1-induzierte Gene, die keinerlei Anreicherung von Rbf1 oder Clp1 in ihrer Promotorregion besitzen. Dazu gehören *egl1* und *frb172*. *frb172* gehört aufgrund der Abwesenheit einer bbs und damit wohl auch einer Bindung des bE/bW-Heterodimers, zu den indirekt regulierten Genen und wird durch Downstream-Komponenten der b-Regulationskaskade induziert. Obwohl *egl1* das gleiche Bindungsmuster zeigt, kann es nicht in die gleiche Kategorie wie *frb172* eingeteilt werden, da *egl1* immer induziert wird, sobald es zum filamentö-

sen Wachstum kommt, unabhängig der b-abhängigen Regulationskaskade (persönliche Mitteilung Jörg Kämper).

Im Promotorbereich der Gene *kpp6* und *rep1* konnte jeweils eine Anreicherung von Rbf1 bei An- und Abwesenheit von b festgestellt werden. Zusätzlich besitzen beide Gene mindestens eine bbs bzw. ein bbs-ähnliches Motiv in der Promotorregion, welche mit den Rbf1-*peaks* überlappen. Allerdings kommt es in diesen Fällen zu keiner Anreicherung über Clp1:3xHA.

Im Promotorbereich von *polx* (*umag\_01262*) konnte ein Einfluss von Clp1 auf die Rbf1-Bindung bei Abwesenheit von b festgestellt werden. Ohne Clp1-Expression (UBF34 ( $\Delta b$ , Rf1HA) war die Anreicherung von Rbf1 nicht hoch genug, um als putative Bindestelle gewertet zu werden. Mit Clp1-Expression kam es zu einer ausreichend hohen Anreicherung. Wie bereits zuvor für *umag\_11190* gezeigt, könnte dies zunächst auf eine nieder affine Bindungsstelle von Rbf1 hinweisen, die in Kombination mit Clp1 von Rbf1 gebunden werden kann. Da jedoch Clp1 in diesem Bereich keine Anreicherung aufweist (UBF36 (b, Rbf1, Clp1:HA), kann auch hier die gezeigte Anreicherung nicht von Clp1 hervorgerufen sein. Möglich wäre jedoch, dass die Clp1-Anreicherung aufgrund einer zu schwachen Interaktion mit Rbf1 nicht detektiert werden kann. Da Clp1 DNA selbst nicht binden kann, ist die Anreicherung nur durch Interaktion mit Rbf1 bzw. b möglich. Eine andere Erklärung für das gezeigte Bindemuster wäre, dass ein weiterer DNA-bindender Faktor, der mit Rbf1 interagiert, zu der Anreicherung führt. Anders als in *umag\_11190* ist Rbf1 ausreichend für die Induktion von *polx*.

Wie zuvor bereits gezeigt, sind im Promotor von *lga2* und *dik6* sowohl bei An- als auch bei Abwesenheit von b Anreicherungen mit Rbf1 und Clp1 zu erkennen (Abb. 29 und 28). Das Gen *umag\_11413* ist ein direkt b-reguliertes Gen und zeigt eine Rbf1-Anreicherung nur bei Anwesenheit von b. Zusätzlich kann eine Anreicherung über Clp1 nachgewiesen werden. In Tabelle 5 sind nochmal alle Kombinationen zusammengefasst.

Tabelle 5: Zusammenfassung der Rbf1- und Clp1-Peaks

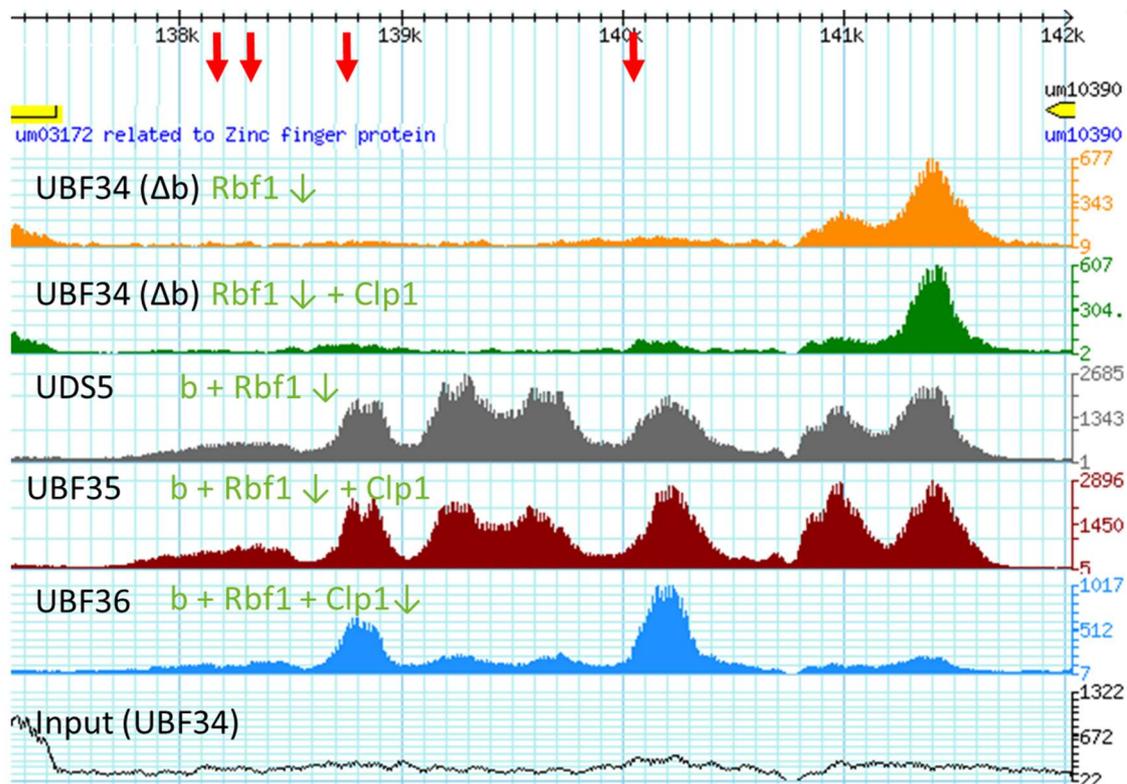
Gene	Rbf1 peak		Clp1 peak	bbs
	b/b+Clp1	$\Delta b/ \Delta b+Clp1$		
<i>egl1+frb172</i>	-/-	-/-	-	-
<i>kpp6 + rep1+umag_11606</i>	+/+	+/+	-	+
<i>lga2 + dik6</i>	+/+	+/+	+	+
<i>umag_11413</i>	+/+	-/-	+	+
<i>umag_11190</i>	+/+	-/+	+	+
<i>polx</i>	+/+	-/+	-	+

Betrachtet man das Gen *umag\_11413* wird zunächst Folgendes deutlich: Die Tatsache, dass *umag\_11413* allein durch b induziert wird, zeigt bereits, dass eine Rbf1-Bindung nicht zwingend notwendig ist. Anhand der UDS5-Daten (Jonas Ulrich 2015) konnte jedoch gezeigt werden, dass eine Rbf1-Bindung vorhanden ist. Anhand des Vergleichs mit den Daten des UBF34-( $\Delta b$ )-Stammes zeigt sich aber, dass Rbf1 alleine keine Bindung in dieser Promotorregion eingeht (Abb. 35). Dies deutet darauf hin, dass die zuvor erhaltene Anreicherung durch die Interaktion von Rbf1 mit b zustande gekommen ist und Rbf1 selbst keine Bindestelle bzw. kein Bindemotiv in diesem Bereich besitzt. Somit müssen Bindestellen, die im Stamm UDS5 bzw. UBF35 gefunden worden sind immer mit den Bindestellen aus UBF34 verglichen werden, um Rbf1-Bindestellen herausfiltern zu können, die unabhängig der b-Bindung sind. Durch eine bereits durchgeführte ChIP-Seq mit b konnte dessen Bindung in dem *umag\_11413*-Promotor bestätigt werden (Jonas Ulrich, persönliche Mitteilung). Bei der ChIP-Seq mit Clp1 wurde ebenfalls eine Anreicherung an gleicher Position festgestellt. Da Clp1 selbst wohl keine DNA binden kann, ist diese Anreicherung durch die Interaktion mit Rbf1 und b zu erklären.

Für die Induktion von *kpp6* und *rep1* ist Rbf1 notwendig und ausreichend. In beiden Genen konnte eine Rbf1-Bindung mit und ohne b gezeigt werden. Demnach handelt es sich hierbei um direkt regulierte Gene. Ungewöhnlich ist dabei das Ausbleiben einer Anreicherung im Stamm UBF36 (Clp1). Da in den zuvor gezeigten Promotorregionen die Anreicherungen von Clp1 mit den Rbf1-Anreicherungen korrelierten, konnte der direkte Einfluss für die jeweilige Gen-

expression nachvollzogen werden. In diesem Fall ist fraglich, wie und ob Clp1 als Inhibitor agieren kann. Möglich wäre der Einfluss von Ko-Aktivatoren oder zusätzlich notwendiger Transkriptionsfaktoren, die wiederum durch die b-, Rbf1- und Clp1-Kombination reprimiert werden, was zusätzlich impliziert, dass Clp1 immer nur an b/Rbf1-Komplexe bindet.

Die Interaktion von Clp1 sowohl mit Rbf1 als auch mit bW konnte bereits mit einem Hefe-Zwei-Hybrid-System verifiziert werden (Heimel *et al.*, 2010). Warum scheint jedoch in diesem Fall Clp1 nicht mit Rbf1 bzw. b zu interagieren? Durch die Untersuchungen der Promotorbereiche von *dik6* oder *lga2*, sowie *umag\_11413* konnte gezeigt werden, dass alle drei Komponenten (b, Rbf1, Clp1) an einer Stelle lokalisiert sein können. Hierbei müsste geklärt werden, welche Interaktion präferiert wird. Betrachtet man den Rbf1-Promotorbereich kann ein mögliches Interaktionsmodell generiert werden. Zum verbesserten Verständnis wird die Rbf1-Promotorregion mit den erhaltenen ChIP-Seq-Daten nochmals aufgezeigt (Abb. 43).

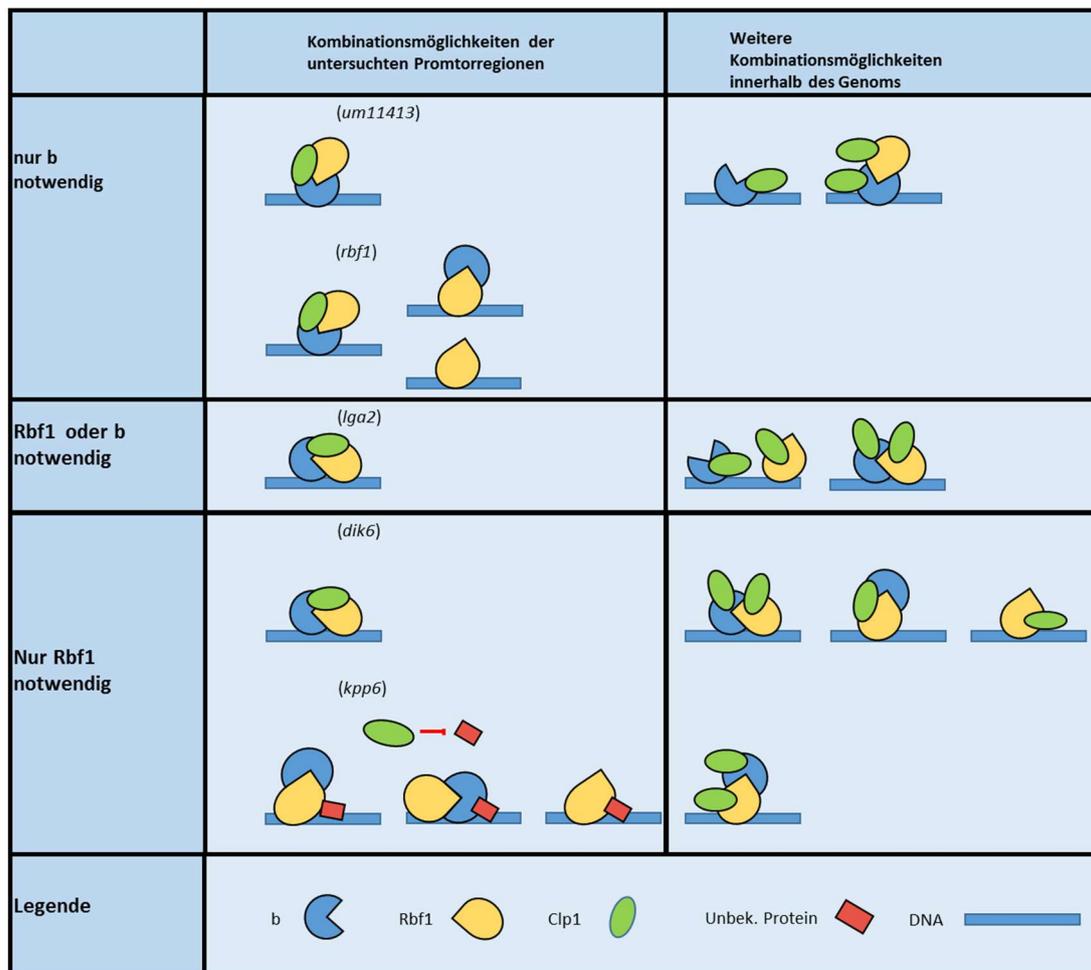


**Abbildung 43: Clp1-Interaktion mit b stärker als mit Rbf1?** Gezeigt werden die erhaltenen *peaks* aus den ChIP-Seq-Daten des *rbf1*-Promotors der Stämme UBF34, UDS5 (Ulrich, 2015), UBF35 und UBF36. Die Bezeichnungen der jeweils induzierten Gene stehen in grüner Schrift neben den *peaks*. Der grüne Pfeil markiert das Protein, mit dem die ChIP durchgeführt wurde. Der gelbe Balken links steht für den N-terminalen Bereich von Rbf1. Die Induktion erfolgte über 6h. Deutliche Anreicherungen von Clp1 konnten nur in den Bereichen der beiden bbs Motive an den Stellen -1377 und -2791 (138.7 und 140,05) festgestellt werden. Dies deutet möglicherweise auf höhere Bindeaffinität von Clp1 an b als an Rbf1 hin.

Betrachtet man die Anreicherungen in dem Stamm UBF34( $\Delta b$ ) ist nur ein dominanter *peak* mit ca. 4 kb Abstand zum eigentlichen Rbf1-Transkriptionsstart zu sehen. Sobald *b* mit exprimiert wird (UDS5, UBF35) sind insgesamt sechs *peaks* zu beobachten. Dabei korrelieren zwei *peaks* an den Stellen -1377 und -2791 mit den *bbs*. Für diese beiden *bbs* konnte auch hier eine *b*-Bindung nachgewiesen werden (Jonas Ulrich, persönliche Mitteilung). Auch die Clp1-Anreicherungen aus dem Stamm UBF36 stimmen mit diesen beiden *peaks* überein. Die kleineren Clp1-*peaks* zwischen den *bbs* -1377 und -2791 korrelieren zwar mit dem Rbf1-*peak* vom UBF34-Stamm, wurden aber im Vergleich mit dem Input als nicht signifikant anerkannt. Diese Beobachtung könnte ein Indiz für eine mögliche höhere Affinität von Clp1 an *b* als an Rbf1 sein. Dies könnte jedoch nur durch weitere ChIP-Seq-Experimente mit *b*-Deletionsstämmen ermittelt werden.

Das gleichzeitige Auftreten von *b* und Rbf1 innerhalb einer Promotorregion kann durch zwei mögliche Ursachen erklärt werden. Zum einen können *b* und Rbf1 Bindemotive innerhalb des Promotors besitzen, so dass beide direkt an die DNA binden. Zum anderen kann die Interaktion von *b* mit Rbf1 eine Anreicherung durch beide Komponenten ermöglichen, unabhängig welche davon bindet.

Im Fall von *umag\_11413* geht alleine *b* eine Bindung im Promotor ein. Eine Anreicherung mit Rbf1 ist nur durch dessen Interaktion mit *b* möglich. Da Clp1 keine DNA-Bindedomäne trägt, ist dessen Lokalisation in den untersuchten Promotorregionen höchstwahrscheinlich durch die Interaktion mit *b* oder Rbf1 zu erklären. Die Abbildung 44 zeigt eine Zusammenstellung der bisher bekannten Kombinationsmöglichkeiten basierend auf den ChIP-Daten sowie den bisher bekannten *bbs*. Zusätzlich sind auf der Grundlage der bisher bekannten Möglichkeiten Prognosen für weitere Kombinationsmöglichkeiten abgebildet.



**Abbildung 44: Kombinationen aus b-, Rbf1- und Clp1-Bindung / Interaktion unabhängig der Regulation.** Abgebildet sind die bisher untersuchten Promotorregionen und die möglichen Kombinationen aus b-, Rbf1- und Clp1-Bindung bzw. -Interaktion. Zur besseren Veranschaulichung wurden die jeweiligen Gene anhand der Expressionsdaten (Heimel *et al.*, 2010b) in Notwendigkeit von b bzw. Rbf1 unterteilt. Links sind die jeweils möglichen Kombinationen anhand der ChIP-Seq-Daten sowie den bekannten bbs abgebildet. Rechts werden weitere theoretische Kombinationsmöglichkeiten gezeigt, die auf den gefundenen Möglichkeiten der jeweiligen Kategorie basieren. Dabei wurde in Betracht gezogen, dass Clp1 möglicherweise auch nicht mit Rbf1 und b gleichzeitig interagieren kann. Bei *umag\_11413* und *Rbf1* handelt es sich um direkt b-regulierte Gene. Dennoch konnte bei *rbf1* auch eine direkte Rbf1-Bindung festgestellt werden. Da mit Clp1 an diesen Bindestellen keine Anreicherung feststellbar war, besteht die Möglichkeit, dass Rbf1 alleine oder in Interaktion mit b binden kann. *lga2* kann durch b oder Rbf1 induziert werden. Aufgrund der nahe liegenden bbs in den gefundenen Rbf1-Bindestellen ist eine gleichzeitige Bindung und Interaktion von Rbf1 und b sehr wahrscheinlich. Für *dik6* und *kpp6* ist Rbf1 ausreichend und notwendig. Dennoch konnte bei *dik6* eine bbs nahe des Rbf1-Maximums festgestellt werden. Bei *kpp6* wurde keine Anreicherung über Clp1 erzielt. Dies kann durch die Repression von *rbf1* zustande kommen. Eine weitere mögliche Erklärung ist die Repression eines unbekannten Proteins, was für die Expression von *kpp6* notwendig ist. Da Rbf1 mit und ohne b bindet und nur ein bbs ähnliches Motiv gefunden wurde, sind alle Kombinationen von Rbf1 mit und ohne b möglich. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurde auf die Abbildung weiterer möglicher Kombinationen, in denen Clp1 nicht beteiligt ist, verzichtet.

Um die Kombinationsmöglichkeiten einzuschränken und zu spezifizieren, sind zusätzliche ChIP-Seq-Experimente mit b, sowie wie die Klärung der genauen Interaktion von Clp1, Rbf1 und b notwendig.

Dass hier nur ein kleiner Teil eines großen Netzwerkes für Genregulation beleuchtet wird, zeigt sich durch Vergleiche mit bisherig durchgeführten Expressi-

onsanalysen in anderen Organismen. In Hefe konnte bereits eine Datenbank erstellt werden, welche für die Analyse der kombinatorischen Genexpression von hohem Wert ist. Über 2500 kooperative Transkriptionsfaktorpaare konnten durch 17 verschiedenen Algorithmen in diese Datenbank eingebettet werden und ermöglichen die Identifikation weiterer Transkriptionsfaktoren sowie entsprechender Zielgene (Wu *et al.*, 2016).

In *U. maydis* sind bereits weitere Transkriptionsfaktoren bekannt die durch Rbf1 reguliert werden. Dass auch hier ein großes komplexes Netzwerk an kooperativen Transkriptionsfaktoren zu finden sein muss, zeigt sich bereits durch die Untersuchung der beiden Transkriptionsfaktoren b und Rbf1.

### 3.2.5 Rbf1 Regulation

Rbf1 ist als Masterregulator der b-abhängigen Regulationskaskade der wichtigste Faktor für die pathogene Entwicklung. Es konnte gezeigt werden, dass sehr viele putative Bindestellen von Rbf1 im gesamten Genom von *Ustilago* zu finden sind, weitaus mehr Bindestellen als zuvor vermutet aufgrund der Anzahl an Rbf1 regulierten Genen. Die bisher interessantesten Bindestellen liegen im Promotor von Rbf1 selbst. Hier war die Variation des Bindungsmusters am höchsten (siehe Abb. 43). Zunächst gab es die Annahme, dass Rbf1 einen positiven Rückkopplungsmechanismus besitzt und sich selbst induzieren kann, da bereits in den ChIP-Seq-Ergebnissen mit dem Stamm UDS5 (Jonas, Ulrich 2015) eine Bindung von Rbf1 gezeigt werden konnte. In dieser Arbeit war es möglich, die direkte Rbf1-Bindung ohne Einfluss von b zu zeigen. Die Rbf1-Bindestelle korrelierte hierbei nicht mit den bbs. Da eine direkte Rbf1-Bindung vorhanden ist, war ein Rückkopplungsmechanismus nicht auszuschließen. Jedoch konnte mit Hilfe eines Real-Time-Experimentes keine positive Rückkopplung bei Abwesenheit von b nachgewiesen werden (Abb. 41). Dies schließt jedoch noch keinen Einfluss von Rbf1 auf seine eigene Expression aus wenn b exprimiert wird.

In Rbf1 sowie in fast allen weiteren untersuchten Promotorregionen wurden bei Anwesenheit von b kein Einfluss durch die Clp1 Expression festgestellt und die Peakmuster waren nahezu identisch (Vgl. der Stämme UDS5(b, Rbf1:HA) und UBF35 (b, Rbf1:HA, Clp1)). Dennoch ist Rbf1 eines der am stärksten herunterre-

gulierten Gene nach Clp1 Expression. Wie bereits zuvor beschrieben kann in fast allen direkt b-regulierten Genen eine Interaktion von Rbf1, b und Clp1 durch das entsprechende Bindeverhalten vermutet werden. Da Rbf1 in Kombination mit Clp1 in Abwesenheit von b als Repressor für *mfa2* fungiert, kann dies möglicherweise auf die Regulation der direkten b-Zielgene übertragen werden.

Eine weitere Möglichkeit der Clp1 hervorgerufenen Repression von *rbf1* ist eine allgemeine Blockade der Transkriptionsfaktoren-Maschinerie. Wie bereits zuvor beschrieben ist zu erwarten, dass in *U. maydis* ein Netzwerk an Transkriptionsfaktoren für die Genregulation verantwortlich ist. Wie auch in Hefe konnte für das Pflanzenpathogen *Fusarium graminearum* ein globales Netzwerk der Genregulation gezeigt werden. Das Netzwerk ist hierbei in Module unterteilt, welche für spezifische Funktionen notwendig sind, wie DNA-Replikation, Zellzyklus, Stressantwort etc. Dabei wurde zwischen *F. graminearum* spezifischen Regionen und Kernregionen, welche in anderen nahen verwandten Spezies zu finden sind, unterschieden (Guo *et al.*, 2016). Falls in *U. maydis* ähnliche regulatorische Strukturen zu finden sind, hat Clp1 möglicherweise einen Einfluss auf den für Rbf1 notwendigen regulatorischen Bereich und fungiert nicht als direkter Repressor.

Epigenetisch betrachtet könnte es durch die Clp1-Expression auch zur Modifikation der Chromatinstruktur kommen und so zu einer Gen-Stillegung, die die Expression von Rbf1 verringert. Dies ist aufgrund fehlender Untersuchungen jedoch rein spekulativ.

### **3.2.6 Die Clp1-abhängige Repression ist nicht auf die Rbf1 Bindung zurückzuführen**

Aufgrund der untersuchten Promotorelemente kann ausgeschlossen werden, dass die Clp1-abhängige Repression in Zusammenhang mit einem Einfluss auf die Rbf1-Bindung gebracht werden kann. Zwei Einflüsse von Clp1 konnten gezeigt werden: zum einen, dass es im *dik6*-Promotor durch die Clp1 Expression zu einer Verschiebung des Peakusters bei Anwesenheit von b kommt; zum anderen, dass mögliche Rbf1-Bindestellen mit schwacher Bindeaffinität vorliegen,

und die Rbf1-Bindung nur im Zusammenhang mit der Clp1-Interaktion zu Stande kommt. Somit stellt sich die Frage, welcher Mechanismus hinter der Repression durch Clp1 verborgen liegt. In den meisten Fällen konnte eine Anreicherung von Clp1 korrelierend mit den erhaltenen Rbf1-*peaks* und den bbs festgestellt werden, was einen direkten Einfluss von Clp1 auf b als Transkriptionsfaktor vermuten lässt. So kann Clp1 möglicherweise als Ko-Faktor für b und Rbf1 agieren, der entweder die Transkription selbst hemmt oder mit notwendigen Ko-Faktoren konkurriert.

Durch die Betrachtung der drei Komponenten b, Rbf1 und Clp1 werden drei der wichtigsten Faktoren für die pathogene Entwicklung untersucht, welche weitreichenden Einfluss auf viele weitere pathogenitätsrelevanten Faktoren besitzen. Im Laufe der Arbeit war es möglich, einige neue Erkenntnisse über die einzelnen Komponenten zu gewinnen. Durch die Untersuchung der Kernmigration in den Pflanzenhyphen konnte Clp1 eine neue Bedeutung in der biotrophen Phase der Pilzentwicklung gewinnen. Clp1 ist mit hoher Wahrscheinlichkeit in der Mitose bzw. der Kernmigration involviert. Vergleiche mit Mechanismen aus *M. oryzae* deuten zusätzlich darauf hin, dass *U. maydis* eine Kopplung von Mitose und Appressorienbildung durchläuft.

Mit Hilfe der ChIP-Seq-Analysen konnten direkte Rbf1-Bindestellen identifiziert werden und in vielen Fällen eine mögliche Interaktion mit b an entsprechenden Promotorregionen nachvollzogen werden. Durch die Analyse verschiedener Promotorbereiche Rbf1- und b-abhängiger Gene war es möglich, einen ersten Einblick in die komplexe Kombinatorik aus b, Rbf1 und Clp1 zu erhalten. Eine mögliche Repressorfunktion durch Interaktion von Rbf1 und Clp1 muss hierbei noch weiter untersucht werden.

Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass ein doppeltes System für die Genregulation aufgrund der Expression von Clp1 vorhanden ist. Der direkte Effekt von Clp1 ist die Repression der *rbf1*-Expression, wodurch die Rbf1 Konzentration deutlich herabgesenkt wird und so die Expression Rbf1-abhängiger Gene negativ beeinflusst wird. Trotz der geringeren Rbf1-Konzentration nach Clp1-Expression ist die Höhe der Anreicherung durch Rbf1 in den jeweiligen Promotorregionen nicht geringer als ohne Clp1-Expression. Hier tritt dann das zweite Regulationssystem in Kraft, in dem Clp1 auch in den Promotorbereichen der meisten Rbf1-

abhängigen bzw. b-abhängigen Gene zu finden ist und hier einen direkten Einfluss auf die Genexpression ausüben kann. Promotorbereiche ohne Anreicherungen von Clp1 werden hierbei mit hoher Wahrscheinlichkeit indirekt durch Clp1 beeinflusst.

Die Untersuchung der b und Rbf1-abhängigen Genregulation im Hinblick auf das Bindungsverhalten von Rbf1 eröffnet weitere Schritte in der Analyse von Transkriptionsfaktoren weiter unten in der b-abhängigen Regulationskaskade. Zudem konnte gezeigt werden, dass es in *U. maydis* möglich ist Transkriptionsfaktor interagierende Komponenten (Clp1) für ChIP-Seq-Experimente heranzuziehen.

## 4. Material und Methoden

Die Beschreibung der angewandten Methoden wurde im Fall von standardmäßig angewandten Verfahren aus der allgemeinen Methodensammlung der AG Kämpfer wörtlich übernommen.

### 4.1 Stämme

#### 4.1.1 *Escherichia coli* Stamm

Für sämtliche Klonierungen wurde der *Escherichia coli*-Stamm TOP10 der Firma Invitrogen mit folgendem Genotyp verwendet F- mcrA  $\Delta$ (mrr-hsdRMS-mcrBC)  $\phi$ 80lacZ $\Delta$ M15  $\Delta$ lacX74 nupG recA1 araD139  $\Delta$ (ara-leu)7697 galE15 galK16 rpsL(StrR) endA1  $\lambda$ - Die Nomenklatur von *E. coli*-Stämmen richtet sich nach Demerec, 1966.

#### 4.1.2 *Ustilago maydis* Stämme

##### Ausgangsstämme

Stamm	Genotyp	Resistenz**	Referenz
FB1	<i>a1b1</i>	-	(Banuett und Herskowitz, 1989)
FB2	<i>a2b2</i>	-	(Banuett und Herskowitz, 1989)
AB31	<i>a2 <math>\Delta</math>b::P<sub>crg1</sub>:bW2,E1</i>	P	(Brachmann <i>et al.</i> , 2001)
AB32	<i>a2 <math>\Delta</math>b::P<sub>crg1</sub>:bW2,E2</i>	P	(Brachmann <i>et al.</i> , 2001)
UDS5	<i>a2 <math>\Delta</math>b::P<sub>crg1</sub>:bW2,E1 rbf1:3xHA</i>	P, H	(Heimel <i>et al.</i> , 2010b)

---

\*\*Abkürzungen: C, Cbx<sup>R</sup>; P, Phleomycin<sup>R</sup>, H, Hygromycin<sup>R</sup>, N, Nourseothrycin<sup>R</sup>

---

In dieser Arbeit hergestellte Stämme

Stamm	Genotyp/Lokus	I*	Resistenz**	Ausgangsstamm
UBF27	<i>a1b1, H1::3xmCherry</i>	-	H	FB1
UBF28	<i>a2b2, H1::3xmCherry</i>	-	H	FB2
UBF30	<i>a1b1, H1::3xmCherry, cbx'P<sub>hxt</sub>:NLS::3xGFP cbx<sup>5</sup></i>	m	H,C	UBF27
UBF31	<i>a2b2, H1::3xmCherry, cbx'P<sub>hxt</sub>:NLS::3xGFP cbx<sup>5</sup></i>	m	H,C	UBF28
UBF37	<i>a1b1, H1::3xmCherry, cbx'P<sub>hxt</sub>:NLS::3xGFP cbx<sup>5</sup>, Δclp1</i>	m	H,C, N	UBF30
UBF38	<i>a2b2, H1::3xmCherry, cbx'P<sub>hxt</sub>:NLS::3xGFP cbx<sup>5</sup>, Δclp1</i>	m	H,C, N	UBF31
UBF33	<i>a2 Δb P<sub>nar1</sub>:rbf1 3xHA</i>	-	H	FB2
UBF34	<i>a2 Δb P<sub>nar1</sub>:rbf1 3xHA, cbx'P<sub>crg1</sub>:clp1::3xmyc cbx<sup>5</sup></i>	m	H, C	UBF33
UBF35	<i>a2 Δb::P<sub>crg1</sub>:bW2,E1 rbf1:3xHA, cbx'P<sub>crg1</sub>:clp1::3xmyc cbx<sup>5</sup></i>	m	P,H,C	UDS5
UBF36	<i>a2 Δb::P<sub>crg1</sub>:bW2,E1, cbx'P<sub>crg1</sub>:clp1::3xHA cbx<sup>5</sup></i>	m	P,H,C	AB31

\*Abkürzungen: I bezeichnet die Kopienzahl der integrierten Plasmide: „e“ steht für einfache Integration und „m“ für multiple Integration der Plasmide in den *cbx*-Locus, - steht für nicht nachgewiesen

\*\*Abkürzungen: C, Cbx<sup>R</sup>; P, Phleomycin<sup>R</sup>, H, Hygromycin<sup>R</sup>, N, Nourseothricin<sup>R</sup>

## 4.2 Verwendete Plasmide

### 4.2.1 Ausgangsplasmide

Name	Resistenzmarker <i>E.coli</i> / <i>U. maydis</i>	Referenz	Anmerkung
pRU11	Amp <sup>R</sup> /CBX <sup>R</sup>	Brachmann <i>et al.</i> , 2001	<i>crg1</i> -kontrollierte Expression
pGBKT7-Clp1	Kan <sup>R</sup>	Heimel <i>et al.</i> , 2010	Hefe 2 Hybrid Vektor mit ORF Sequenz von <i>clp1</i>
pCR2.1 TOPO	Amp <sup>R</sup>	Invitrogen	Klonierung von PCR Produkten
pRU4_Rbf1		Heimel	Integration von Rbf1 in den Cbx Locus unter der Kontrolle des <i>nar1</i> -Promotors
pVV17	Amp <sup>R</sup> /Kan <sup>R</sup> /Hyg <sup>R</sup>	Kämper, 2004	b-Knockout
pUDS3	Amp <sup>R</sup> /Hyg <sup>R</sup>	Heimel <i>et al.</i> , 2010	Klonierungsvektor mit Rbf1:3xHA Knock-in Konstrukt
pUDS14	Amp <sup>R</sup> /Hyg <sup>R</sup> /CBX <sup>R</sup>	Schuler 2013	GFP-Reporter für hxt1

pMS76	Amp <sup>R</sup> /CBX <sup>R</sup>	Scheerer <i>et al.</i> , 2006	Promotorstudie NLS:3xGFP Fusion unter der Kontrolle des <i>mig2.5</i> - Promotors
pUMA741	Amp <sup>R</sup> /Nat <sup>R</sup>	Plasmidsammlung Ustilago Research Community Heinrich Heine Universität	Knock-in mit c-terminaler 3xGFP Fusion und Nourse- othricin Kasette
pUMA792	Amp <sup>R</sup> /Hyg <sup>R</sup>	Plasmidsammlung Ustilago Research Community Heinrich Heine Universität	Knock-in mit c-terminaler 3x HA Fusion und Hygro- mycin Kasette
pUMA795	Amp <sup>R</sup> /CBX <sup>R</sup>	Plasmidsammlung Ustilago Research Community Heinrich Heine Universität	Knock-in mit c-terminaler 3x myc Fusion und Carbo- xin Kasette
pUMA1056	Amp <sup>R</sup> /Hyg <sup>R</sup>	Plasmidsammlung Ustilago Research Community Heinrich Heine Universität	Knock-in mit c-terminaler 3x mCherry Fusion und Hygromycin Kasette

#### 4.2.2 In der Arbeit angefertigte Plasmide

Alle Klonierungsschritte wurden durch Restriktionsanalyse überprüft.

**pBF9** - Plasmid zur Integration von Clp1 in den *cbx*-Locus. Das 1,3 kb große Clp1-Fragment wurde aus dem Vektor pGBKT7-Clp1 mit den Restriktionsenzymen Nde1 und Not1 herausgeschnitten. wurde in den 8kb großen Nde1/Not1 geöffneten pRU11 Vektor eingefügt.

**pBF10** - Plasmid zur Integration von Clp1:3x myc in den CBX-Locus. Das 3x myc Fragment wurde aus dem Vektor pUMA795 mit Sfi1 und Not1

ausgeschnitten. Der Vektor pBF9 wurde dann mit Sfi1 und Not1 geöffnet.

**pBF13** - Plasmid zur Fusion von 3x mCherry in den nativen Locus. Enthält 1kb des H1-Promotors, ein 5,2kb 3xmCherry-Hyg<sup>R</sup> Sfi1 Fragment (aus pUMA56) und ein 1kb umfassenden Bereich stromabwärts des Histon Gens im pCR2.1 TOPO Rückrat

**pBF14** - Plasmid zur Integration einer NLS:3xGFP Fusion in den CBX Locus unter dem *hxt1*-Promotor.

Beinhaltet ein PCR Produkt des *hxt1*-Promotors aus dem Plasmid UDS14 mit Xba1 und Nco1- Schnittstellen (Primerpaar: phxt1\_xba1\_for und phxt1\_rev). Aus dem pMS76 Vektor wurde das *mig2.5* Promotorfragment mit Xba1 und Nco1 ausgeschnitten und das 7kb große Vektrofragment für die Ligation mit dem *hxt1*-Promotorfragment verwendet.

**pBF11** - Zwischenprodukt für die Integration von Rbf1:3xHA in den pVV17. Das Bamh1/Not1 geschnittenes Fragment aus pDS3, welches den C-terminalen Bereich von Rbf1:3xHA und den Nos-Terminator beinhaltet wurde mit dem 6,5kb großen, Bamh1/Not1 geschnittenen pRU4\_Rbf1 Vektorfragment ligiert.

**pBF12** - Plasmid zur Deletion von b und gleichzeitigen Integration von Rbf1:3HA unter der Kontrolle des *nar1*-Promotors. Rbf1:3HA wurde inklusive *nar1*-Promotor mit Not1/Bgl2 als 3,4kb großes Fragment aus pBF11 geschnitten und die Enden geblunted. Als Vektor diente der Stu1 blund aufgeschnittene Vektor pVV17.

**pBF22** - Plasmid zur Integration von Clp1:3xHA in den CBX Locus unter der Kontrolle des *crg1*-Promotors. Die 3xmyc Sequenz aus dem Vektor pBF9 wurde über Sfi1 und Afl2 ausgeschnitten und mit dem Sfi1/Afl2 geschnittenen 3xHA Fragment aus pUMA792 ersetzt.

#### 4.2.3 In dieser Arbeit verwendete Oligonukleotide

Name	Nukleotidsequenz 5' → 3'	
<b>Dik6-Promotor Analyse</b>		
Pdik6_1_F	TTCCGTTGATCCTCCTCAGATACG	(1)
Pdik6_1_R	GCAAGGATGCTTTGATCATCTCAGG	(1)
Pdik6_2_F	CCTGAGATGATCAAAGCATCCTTGC	(1)
Pdik6_2_R	GGCACGCTGTCCTGGTGACAT	(1)
Pdik6_3_F	ATGTCACCAGGACAGCGTGCC	(1)
Pdik6_3_R	CGTGACGACAATCGTGAATCACGA	(1)
Pdik6_4_F	TCGTGATTCACGATTGTTCGTCACG	(1)
Pdik6_4_R	GCATTGTTCAAATGTACGTGGTGTG	(1)
Pdik6_5_F	CACACCAGTACATTTGAACAATGC	(1)

Pdik6_5_R	GTCGAGCGTCAGCTGGCTGAA	(1)
Pdik6_6_F	TTCAGCCAGCTGACGCTCGAC	(1)
Pdik6_6_R	CGGAAGGTTACACCGTGCAAGC	(1)
Pdik6_7_F	GCTTGCACGGTGTAACCTTCCG	(1)
Pdik6_7_R	CCTGACAACATTACCGTTTGAAGA	(1)
Pdik6_8_F	TCTTCAAACGGTGAATGTTGTCAGG	(1)
Pdik6_8_R	GGTATATATGCTTCAGCTTGGCTTGC	(1)
Pdik6_9_F	GCAAGCCAAGCTGAAGCATATATACC	(1)

Name	Nukleotidsequenz 5' → 3'	
Pdik6_9_R	GGATCGAATGGCTGTCTGTATCGC	(1)
Pdik6_up_F	CCATGATGCGGGAGTAGACACT	(1)
Pdik6_up_R	ATCGCGCTCCAGTGACAAGA	(1)
Pdik6_ORF_F	TTGTTCCACCCATCCTTCACGC	(1)
Pdik6_ORF_R	GCAAGGATGCTTTGATCATCTCAGG	(1)

**qRT-PCR**

RT_eIF2b_f	ATCCCGAACAGCCCAAAC	(2)
RT_eIF2b_r	ATCGTCAACCGCAACCAC	(2)
RT_actin_f	CATGTACGCCGGTATCTCG	(2)
RT_actin_r	CTCGGGAGGAGCAACAATC	(2)
RT_rbf1-F	AGTACGAGCTACGACGGATTC	(3)
RT_rbf1-R	GGGTAGGTGTTGGACACATTC	(3)
Rbf1_RT_ausRbf_for	AACGCTTGAGCTCGTACC	
Rbf1_RT_ausNosT_rev	CTAATAGTCGGGCACG	
Rbf1_RT_ausLocus_rev	AAGGATGCGATTCCAGG	
RT_clp1_Kai_for	GTCAGTTCGTTTGCGCCTAC	(1)
RT_Clp1_Kai_rev	GCATCGTCTCGTGCAACTTC	(1)
um_11413_RT_for	TCTTTGCTCGCATTCC	
um_11413_RT_rev	TTGCGGTCGTTGATGTC	

**b-KO, Rbf1 Knock-IN**

LB1	GAAGCTAGCGGAAAAGTGGGTGAG	(1)
LB2	CACGGCCTGAGTGGCCGACTTTGAAAGCGCCACTG	(1)
RB1	GTGGGCCATCTAGGCCGATTCAGTGATACGTTTAG	(1)
RB2	CCGTAGTTGTGCGAGAGCAGAGG	(1)

**Histon mCherry Fusion**

LB_H1_for	GCGCCAGAAGAAGACCTTTG
LB_H1_sfi1_rev	GGCCGCGTTGGCCGCTGCCTTCTTGGCGGGG
LB_H1_nested_for	GGCCAAGGTCGAGAAGAAGC

RB_H1_f_neu	GTTGGCCTGAGTGGCCTTCCGGCTTAGGCTGCTTC
Rb_H1_r_neu	TGTTGATCGAATCCAGGGAAGC
RB_H1_nested_rev	CCTTCACGCTTCGTGCTTTG
<b>NLS:3xGFP</b>	
phxt1_xba1_for	GTTTCTAGAAAGCTTGGCATCTCGTACGC
phxt1_rev	GTTCCATGGTGAAAGAGAGAGAGAGC
Name	Nukleotidsequenz 5' → 3'
<b>Clp1:3xmyc</b>	
Clp_sfi1_for	GGCCTGAGTGGCCGCTTATCGTATGGTGCCTCTCAG
Clp_sfi_rev	GGCCGCGTTGGCCGCTCGAGTTTGGTGGATTGGAGCTT
<b>Clp1 Deletion</b>	
clp1-lb1	CACGGCCTGAGTGGCCTCGTCGCTGCCGAACACGTA (4)
clp1-lb2	GGCACGCTCGTACCCGGCCGCCAC (4)
clp1-rb1	GTGGGCCATCTAGGCCGCGATTCAGCGACGCATAC (4)
clp1-rb2	GTCTGATTAACCTCGGAATGAGCGG (4)
Clp1_KO-nest-for	CACCCTGCTAATGAAGTACG
Clp1_KO-nest-rev	TCACAGAGTTCAGGGATAGG

(1) – Heimel *et al.*, 2010b), (2) – Laborbestand AG-Kämper, (3) – Chet Pothirata-  
na, (4) – Scherer *et al.*, 2006

### 4.3 Material und Bezugsquellen

#### 4.3.1 Enzyme, Proteine, Antikörper und Nukleinsäuren

##### Enzyme, Proteine, Antikörper

Name	Bezugsquelle
Albumin	Sigma, New England Biolabs
Antartic Phosphatase	New England Biolabs
Anti-Digoxigenin, konjugiert mit alkali- scher Phosphatase	Roche
Lysozym	Boehringer
Novozym 234	Novo Nordisc
Phusion DNA Polymerase	New England Biolabs
Restriktionsenzyme	New England Biolabs
RibonukleaseA	Boehringer

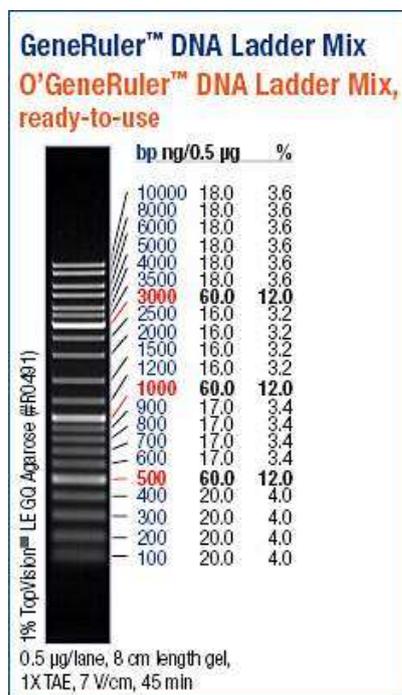
---

T4 DNA-Ligase	New England Biolabs
Taq DNA Polymerase	a.Brachmann und G. Weinzierl
PfuTurbo DNA polymerase	
Phusion Hotstart 2 DNA Polymerase	Biozym Finnzymes

---

Nukleinsäuren

Für die Herstellung von CM-Medium (siehe 5.1.10) wurde Herings-SpermaDNA (Sigma) verwendet.. Als DNA-Größenstandard für die Agarose- Gelelektrophorese wurde ein GeneRuler DNA Ladder Mix (Fermentas) verwendet:



Hersteller: Fermentas GmbH, Katalog Nr.: SM0331

Im Text verwendete Größenangaben in kb geben annähernde, über Restriktionsverdau ermittelte Fragmentgrößen wieder.

Sonstige Materialien

Filterpapier 3MM (Whatman), Glasperlen 150-212 microns (Sigma), Nylonmembran Roti®-Nylon Plus (Roth), Papierfilter (S&S 595), 1,5 ml- und 2 ml-Reaktionsgefäße (Greiner), 0,2 ml PCR- Reaktionsgefäße (Biozym), Petrischalen (Greiner), 15 ml und 50 ml PPN-Röhrchen (Greiner), 1,5 ml Polystyrol-Küvetten (Roth), 0,20 µm Sterilfilter (Roth), Thermalpapier (Hitachi).

### 4.3.2 Puffer Lösungen und Medien

#### *Puffer und Lösungen*

<b>Bezeichnung</b>	<b>Rezept</b>
Adenin-Lösung	10 mg/L Adeninhemisulfat in H <sub>2</sub> Obid., sterilfiltriert 3-Aminotriazol-Lösung 100 mM in H <sub>2</sub> Obid. Gelöst Ampicillin-Lösung 10 mg/L Ampicillin in H <sub>2</sub> Obid., sterilfiltriert Anodenpuffer 1 300 mM Tris-Cl, pH 10,4 15 % (v/v) Methanol H <sub>2</sub> Obid.
Anti-DIG-Alkalische Phosphatase Anti-DIG-Alkalische Phosphatase	1:10.000 in DIG 2 (s.u.)
Auftragspuffer für DNAGElektrophoresen (nativ, 6x)	50 % (w/v) Sukrose 0,25 % (w/v) Bromphenolblau 0,25 % (w/v) Xylencyanol FF in TE-Puffer (s.u.)
CDP-Star-Lösung 1:100 CDP-Star in DIG 3 (s.u.)	
DENAT-Lösung	1,5 M NaCl 0,4 M NaOH in H <sub>2</sub> Obid.
DIG 1	0,1 M Maleinsäure 0,15 M NaCl in H <sub>2</sub> Obid., pH 7,5
DIG 2	10 % (v/v) Blockierungslösung (10x blocking reagent (Roche)) in DIG 1 (s.o.)
DIG 3	0,1 M Maleinsäure 0,1 M NaCl 0,05 M MgCl <sub>2</sub> in H <sub>2</sub> Obid., pH 9,5
DIG-Waschpuffer 0,3 % (v/v)	Tween-20 in DIG 1 (s.o.)
EDTA-Lösung	0,5 M Na <sub>2</sub> -EDTA*2 H <sub>2</sub> O in H <sub>2</sub> Obid.; pH-Wert mit NaOH auf 8,0 einstellen und autoklavieren
Heparin-Lösung 15 mg/L	Heparin in H <sub>2</sub> Obid., sterilfiltriert
Hygromycin-Lösung	50 mg/ml in PBS-Puffer (s.u.), sterilfil-

	triert
Kanamycin-Lösung	10 mg/ml Kanamycinsulfat in H <sub>2</sub> O bid., sterilfiltriert
Ligase-Puffer (10x)	100 mM MgCl <sub>2</sub> 500 mM Tris-Cl, pH 7,5 100 mM DTT 10 mM ATP in H <sub>2</sub> O bid.
Lysispuffer ( <i>Ustilago</i> -DNA)	1 % (w/v) SDS 50 mM Tris-Cl, pH 7,5 50 mM Na <sub>2</sub> -EDTA, pH 8,0 in H <sub>2</sub> O bid.
Lysozym-Lösung	10 mg/ml Lysozym 10 mM Tris-Cl, pH 8,0 in H <sub>2</sub> O bid.
Minilysat(III)-Lösung	1 g M Na-Acetat, pH 4,8 in H <sub>2</sub> O bid.
Phenol-Chloroform	50 % Phenol 50 % Chloroform mit TE-Puffer überschichten
RENAT-Lösung	1,5 M NaCl 282 mM Tris-Cl 218 mM Tris-Base in H <sub>2</sub> O bid.
Rnase A-Lösung	10 mg/ml Rnase A 15 mM NaCl 10 mM Tris-Cl, pH 8,0 in H <sub>2</sub> O bid.
Salzsäure (0,25 M)	5 ml 37 % HCl in 1 L H <sub>2</sub> O bid.
SCS-Puffer	Lösung 1: 20 mM Natriumcitrat*2 H <sub>2</sub> O 1 M Sorbitol Lösung 2: 20 mM Zitronensäure*H <sub>2</sub> O 1 M Sorbitol Mit H <sub>2</sub> O bid. Ansetzen; Lösung 1 vorlegen und so lange Lösung 2 zugeben, bis pH 5,8 erreicht ist, autoklavieren.
Southern-Hybridisierungspuffer	500 mM Natriumphosphatpuffer, pH 7,0 7 % (w/v) SDS in H <sub>2</sub> O bid.
Southern-Waschpuffer	500 mM Natriumphosphatpuffer, pH 7,0 1 % (w/v) SDS in H <sub>2</sub> O bid.
SSC-Puffer (20x)	1 g M NaCl

	0,3 M Na-Citrat*2 H <sub>2</sub> O in H <sub>2</sub> Obid., pH-Wert mit HCl auf 7,0 einstellen
STC-Puffer	10 mM Tris-Cl, pH 7,5 100 mM CaCl <sub>2</sub> 1 M Sorbitol in H <sub>2</sub> Obid., sterilfiltriert
STC/PEG	60 % (v/v) STC-Puffer (s.o.) 40 % (w/v) PEG-4000 sterilfiltriert
STET-Puffer	10 mM Tris-Cl, pH 8,0 100 mM NaCl 1 mM Na <sub>2</sub> -EDTA 5 % (v/v) Triton X-100 in H <sub>2</sub> Obid.
Taq PCR-Puffer (10x)	100 mM Tris-Cl, pH 8,3 500 mM KCl 15 mM MgCl <sub>2</sub>
TBE-Puffer (5x)	500 mM Tris-Borat, pH 7,9 10 mM Na <sub>2</sub> -EDTA in H <sub>2</sub> Obid.
TE (10x)	100 mM Tris-Cl, pH 7,9 10 mM Na <sub>2</sub> -EDTA in H <sub>2</sub> Obid
Tris-HCl-Lösung (1 M)	806 mM Tris-Cl 194 mM Tris-Base in H <sub>2</sub> Obid. Ansetzen, pH-Wert auf 7,5 einstellen und autoklavieren

*U. maydis* Medien

<b>Bezeichnung</b>	<b>Rezept</b>
CM-Festmedium (Banuett und Herskowitz, 1989; Holliday, 1974)	1,5 g NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> 2,5 g Casaminosäuren 0,5 g Heringssperma DNA 1 g Hefeextrakt 10 ml Vitamin-Lösung (s.u.) 62,5 ml Salz-Lösung (s.u.) 0,5 ml Spurenelement-Lösung (s.u.) 20 g Bacto Agar mit H <sub>2</sub> Obid. Auf 980 ml auffüllen Nach dem Autoklavieren 2 % (v/v)

	50 % Glukose (1 % f.c.) zufügen und mit NaOH auf pH 7,0 einstellen.
CM-Flüssigmedium (Banuett und Herskowitz, 1989; Holliday, 1974)	1,5 g NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> 2,5 g Casaminosäuren 0,5 g Heringssperma DNA 1 g Hefeextrakt 10 ml Vitamin-Lösung (s.u.) 62,5 ml Salz-Lösung (s.u.) 0,5 ml Spurenelement-Lösung (s.u.) mit H <sub>2</sub> O bid. Auf 980 ml auffüllen Nach dem Autoklavieren 2 % (v/v) 50 % Glukose oder 4 % (v/v) 25 % Arabi- nose (1 % f.c.) zufügen und mit NaOH auf pH 7,0 einstellen.
Salz-Lösung (Holliday, 1974)	8 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 6 g Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 1 g MgSO <sub>4</sub> * 7 H <sub>2</sub> O mit H <sub>2</sub> O bid. Auf 1L auffüllen und sterilfiltrieren
NSY-Glyzerin (Einfriermedium)	8 g Nutrient Broth 1 g Hefeextrakt 5 g Sukrose 800 ml 87 % Glyzerin mit H <sub>2</sub> O bid. Auf 1L auffüllen und autoklavieren
Spurenelement-Lösung (Holliday, 1974)	60 mg H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> 191 mg MnCl <sub>2</sub> 400 mg ZnCl <sub>2</sub> 47 mg NaMoO <sub>4</sub> * 2 H <sub>2</sub> O 140 mg FeCl <sub>3</sub> * 6 H <sub>2</sub> O 557 mg CuSO <sub>4</sub> * 5 H <sub>2</sub> O mit in H <sub>2</sub> O bid. Auf 1L auffüllen und sterilfiltrieren
PD-Festmedium	24 g Potato Dextrose Broth 20 g Bacto Agar mit H <sub>2</sub> O bid. Auf 1L auffüllen und autoklavieren
Regenerationsagarlight (Schulz <i>et al</i> , 1990)	a) Top-Agar: 15 g (w/v) Bacto-Agar 182,2 g (w/v) Sorbitol 10 g (w/v) Hefeextrakt 4 g (w/v) Bacto Pepton 4 g (w/v) Sukrose mit H <sub>2</sub> O bid. Auf 1L auffüllen und

	<p>autoklavieren  b) Bottom-Agar  wie a), zusätzlich Antibiotikum zugeben  (s.u.)</p>
<p>YEPSlight-Flüssigmedium  (Tsukuda <i>et al.</i> 1988)</p>	<p>10 g Hefeextrakt  4 g Bacto Pepton  4 g Sukrose  mit H<sub>2</sub>O bid. auf 1L auffüllen und autoklavieren</p>
<p>Glutamin-Minimalmedium  (Scherer <i>et al.</i>, 2006)</p>	<p>62,5 mL Salz-Lösung (s.u.)  30 mM L-Glutamin  mit H<sub>2</sub>O 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%) bzw. jeweils angegebenen Zucker hinzugefügt.</p>
<p>Nitrat-Minimalmedium</p>	<p>62,5 mL Salz-Lösung (s.u.)  0,3% (w/v) KNO  mit H<sub>2</sub>O 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%) bzw. jeweils angegebenen Zucker hinzugefügt.</p>

Hygromycin-, Carboxin und Nourseothricin haltige Medien wurden nach dem Autoklavieren auf ca. 60°C abgekühlt und die sterilen Lösungen wurden zugegeben. Für Platten betrug die Endkonzentration von Hygromycin 200 µg/ml, von Nourseothricin 50µg/ml und von Carboxin 2 µg/ml

E.coli Medien

<b>Bezeichnung</b>	<b>Rezept</b>
YT-Festmedium (Sambrook <i>et al.</i> 1989)	5 g Hefeextrakt 5 g NaCl 15 g Bacto Agar mit H <sub>2</sub> O bid. auf 1L auffüllen und autoklavieren
dYT-Flüssigmedium (Sambrook <i>et al.</i> , 1989)	16 g Bacto Trypton 10 g Hefeextrakt 5 g NaCl mit H <sub>2</sub> O bid. auf 1L auffüllen und autoklavieren

Ampicillin- bzw. Kanamycinhaltige Medien wurden nach dem Autoklavieren und Abkühlen auf ca. 60°C mit steriler Ampicillin-Lösung (10 mg/ml) (Endkonzentration 100 µg/ml), bzw. steriler Kanamycin-Lösung (10 mg/ml) (Endkonzentration 40 µg/ml) versetzt

**4.3.3 Verwendete Kits**

In dieser Arbeit wurden die Kits JETSORB (Genomed) zur Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen, TOPO TA Cloning Kit (Invitrogen) zur Klonierung von DNA-Fragmenten, Qiaprep Miniprep Kit und Qiagen Plasmid Midi Kit zur Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*, DIG High-Prime Kit (Roche) zur Herstellung DIG-markierter Sonden für den Southern- Blot, Stratagene Quick-change Site-Directed Mutagenesis Kit zur Erzeugung von Punktmutationen in Plasmiden, sowie Quiaquick PCR Purification Kit (Quiagen) zur Aufreinigung von Plasmiden vor der Sequenzierung verwendet.

## 4.4 Mikrobiologische und biochemische Methoden

### 4.4.1 Kultivierung von *U. maydis*

*U. maydis*-Stämme wurden entweder als Schüttelkulturen bei 180 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

Die Zelldichte von Flüssigkulturen wurde photometrisch in einem LKB Biochrom Photometer bei 600 nm bestimmt. Dabei entspricht OD600 = 1 im Verhältnis zum Leerwert des jeweiligen Kulturmediums je nach verwendetem Stamm und Wachstumsstadium etwa  $1-5 \times 10^7$  Zellen/ml Kultur.

#### Transformation von *U. maydis* (Gillissen et al. 1992a; Schulz et al. 1990a)

Von einer auf Platte wachsenden Kultur wurde eine 4 ml YEPS-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 (10-45 min) wurden 10 ml SCS zugegeben und die Protoplasten durch zehnminütige 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 Vo-

lumen 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. 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 Carboxin-Bottom-Agarplatte ausgestrichen. Nach 2 bis 5 Tagen Inkubation bei 28°C wurden die gewachsenen Kolonien mit Zahnstochern auf CM-Platten, die Carboxin enthielten, vereinzelt.

#### Induktion von *Rbf1*, *Clp1* und *b*

Die entsprechenden Stämme wurden von einer Glycerinkultur auf eine CM Glukose Platte ausgestrichen und für 24-48h bei 28°C inkubiert. Von diesen Platten wurde eine Vorkultur in dem entsprechenden Medium angeimpft. Für die Induktion des *nar1*-Promotors wurde die Kultur in Glutaminminimalmedium angezogen um eine vorzeitige Induktion zu vermeiden. Die Hauptkultur wuchs bis auf eine OD von 0,6-0,8. Nach Zentrifugation bei 3500 Upm für 5 Minuten wurde der Überstand abgenommen und die Kultur mit dem zur Induktion notwendigen Medium einmal gewaschen. Dann wurde die Kultur für 6h im Induktionsmedium bei 28°C 180 Upm inkubiert. Der *nar1*-Promotor wurde mit Nitratminimalmedium induziert und der *crp1*-Promotor durch Austausch von Glukose zu Arabinose als Kohlenstoffquelle

#### Pflanzeninfektion

Für Pathogenitätstests wurde eine Spritzinfektion verwendet, bei der 300 µl einer Pilzsuspension in das Innere des Blattwirtels sieben Tage alter Maispflanzen (Early Golden Bantam) injiziert wurden. Die entsprechenden Stämme wurden in YEPSL Flüssigmedium bis zu einer OD<sub>600</sub>: 0,8 angezogen, durch Zentrifugation (3000 Upm, 5 min, RT) pelletiert und in H<sub>2</sub>O bid. aufgenommen (OD<sub>600</sub>: 3,0). Die kompatiblen Stämme wurden vor der Infektion 1:1 gemischt. Für die Mikroskopie wurden Blattproben nach 24h und 48h entnommen.

### Calcofluor-Färbung

20-50 µl Zellen (auch *on planta*) 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 (pH 7,2) gewaschen.

### Mikroskopie und Bildverarbeitung

Die zellmorphologische Betrachtung von *U. maydis* erfolgte an einem Lichtmikroskop (Axiophot oder AxioImager Z1, ZEISS) mittels Nomarski-Optik. 3,5 µl einer exponentiell wachsenden Kultur (OD<sub>600</sub>: 0,3-0,5 ) wurden zur Analyse auf Agarose-beschichtete Objektträger getropft. Pflanzenproben wurden mit PBS + 0,1% Triton x überschichtet. Für die Fluoreszenz-Mikroskopie wurden Filter mit folgendem Anregungs- und Emissionsspektrum eingesetzt: GFP, 450-490 nm und 515-565 nm. mCherry, 587 nm und 610 nm. Digitale Aufnahmen wurden mit einer hochauflösenden einer AxioCam MRm (Zeiss) aufgenommen und durch die Axiovision-Software (Zeiss) gesteuert wurde. Die Nachbearbeitung der Bilder (Bildausschnitt, Kontrastverstärkung, Maßstabsskalierung) erfolgte mit der Axiovision-Software (Zeiss).

#### **4.4.2 Kultivierung von *E.coli***

*E.coli*-Stämme wurden entweder als Schüttelkulturen bei 200 Upm oder auf Festmedien unter aeroben Bedingungen bei 37°C kultiviert. Übernachtskulturen wurden entweder aus bei -80°C gelagerten Glycerinkulturen oder von bewachsenen YT/Amp-Platten, die weniger als einen Monat bei 4°C gelagert waren, angeimpft.

### Bestimmung der Zelldichte

Die Zelldichte von Bakterienkulturen wurde photometrisch in einem LKB Biochrom Photometer bei 600 nm bestimmt. Dabei entspricht  $OD_{600} = 1$  im Verhältnis zum Leerwert des jeweiligen Kulturmediums etwa  $1 \times 10^9$  Zellen/ml Kultur.

### Transformation von *E.coli*

Transformation von  $CaCl_2$ -behandelten *E. coli* modifiziert nach (Cohen *et al.* 1972). Zur Herstellung Transformations-kompetenter Bakterienzellen wurden 200 ml dYT-Medium 1:200 mit einer frischen DH5 $\alpha$ -Übernachtskultur angeimpft und bis zu einer  $OD_{600} = 0,5-0,8$  bei 37°C und 200 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  $CaCl_2$ -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  $CaCl_2$ -Lösung, die 15 % (v/v) Glycerin enthielt, resuspendiert. Die Zellsuspension wurde zu je 200  $\mu$ l aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

Zur Transformation wurden die Zellen auf Eis aufgetaut, jeweils 50  $\mu$ l mit 10  $\mu$ l 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  $\mu$ l dYT-Medium versetzt und 30 min bei 1400 Upm und 37°C in einem Eppendorf-Wärmeblock inkubiert. 200  $\mu$ l des Transformationsansatzes wurde auf YT-Platten mit 100  $\mu$ g/ml Ampicillin ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Auf diese Weise konnte eine Transformationsrate von  $10^7$  Transformanten pro 1  $\mu$ g eingesetzter Plasmid-DNA erreicht werden.

### 4.4.3 Chromatin Immunopräzipitation Ustilago (ChIP)

#### Fixierung und Lyse der Zellen

Die 6h induzierte Kultur wurde in 50ml Aliquots aufgeteilt. Eine 15 minütige Fixierung der Zellen erfolgte durch Tropfenweise Zugabe von 1,35ml Formaldehyd (37%) unter ständigem Rühren bei Raumtemperatur. Zum Abstoppen der Reaktion wurden 2,5 ml einer 2,5M Glycinlösung hinzugegeben und für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zentrifugation der Zellen bei 3500 Upm sind die Zellen 3 mal mit TBS gewaschen worden. Das gewonnene Zellpellet konnte dann mit flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert werden.

Zur Weiterverarbeitung wurde das Zellpellet in 1.5ml FA Lyse Puffer inklusive eines Proteaseinhibitors (Roche, Complete) gelöst. Mit Hilfe einer Zelmühle (Retsch MM200) konnten die Zellen bei 25Hz für 5 min im Schockgefrorenen Zustand aufgebrochen werden.

#### Sonifizierung und Chromatinisolation

Das erhaltene Zellpulver wurde auf Eis aufgetaut und zur Trennung von löslichen Proteinen von fixiertem Chromatin bei 14000 Upm, 4°C für 15 min abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 1ml FA Lyse Puffer resuspendiert und konnte so für die anschließende Sonifizierung verwendet werden. Zur Sonifizierung des Chromatins wurde der Covaris Ultrasonicator S220 am ITG (Institute of Toxicology and Genetics) mit folgenden Einstellungen verwendet.

Average Incident Power (Watt) 7

Peak Incident Power (Watt) 140

Duty Factor (percent) 5

Cycles/Burst (count) 200

Um die Zelltrümmer von dem in Lösung befindlichen Chromatin zu trennen wurde das sonifizierte Material bei 1400 Upm, 4°C für 15 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt.

### Immunopräzipitation

Zur Vorbereitung der Immunopräipitation wurden 30ul anti-HA-Agarose Lösung (Sigma) 3 mal mit Fa Lyse Puffer + Proteasinihibitor gewaschen. Im Anschluss wurden 400-800ul der Chromatinlösung über Nacht bei 4°C auf einem Rotationsrad inkubiert. 50ul der Chromatinlösung dienten als Inputkontrolle.

Nach der Inkubation wurden folgende Waschschrirte (je 500ul) durchgeführt.

3x FA Lyse Puffer + Proteasinhitor

2x FA Lyse Puffer mit hoher Salzkonzentration (500mM NaCl)

2x CHIP Wash Puffer

1x TE

Die Waschschrirte erfolgten jeweils für 5 min bei 4°C auf dem Rotationsrad und 1min Zentrifugation bei 700Upm.

Die Agarose wurden nach den Waschschrirten in 500ul TE aufgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Dadurch wird gewährleistet, dass kein unspezifisch an das Röhrchen gebundenes Chromatin in die Analyse mit einbezogen wird. Um keine Agarose zu verlieren, wurde das alte Reaktionsgefäß mit 500ul TE gewaschen und die Lösungen vereint.

FA-Lysepuffer

50 mM HEPES-KOH; pH 7,5

150 mM NaCl

1 mM EDTA

1% Triton-X-100

0,1% (w/v)Natriumdeoxycholat

0,1% SDS

FA-Lysis Buffer high Salt

50 mM HEPES-KOH; pH 7,5

500 mM NaCl

1 mM EDTA

1% Triton-X-100

0,1% (w/v)Natriumdeoxycholat

0,1% SDS

ChIP Waschpuffer	ChIP Elutionspuffer
10 mM Tris-Cl, pH 7,5	50mM Tris-Cl, pH 7,5
250 mM LiCl	1 mM EDTA
1 mM EDTA	1% SDS
0,5 % Nonidet P40	
0,5 % Natriumdeoxycholat	

## 4.5 Molekularbiologische Standardmethoden

### 4.5.1 Handhabung von Nukleinsäuren

#### Fällung von DNA

Die Reinigung und Konzentrierung von Nukleinsäuren aus wässrigen Lösungen erfolgte durch Fällung. Hierzu wurde die Probe mit 1/2 Volumen 30 %ige Peglösung mit 750 mM NaCl versetzt und bei 15 min Raumtemperatur inkubiert. Das Präzipitat wurde durch 15 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 H<sub>2</sub>O bid. oder TE-Puffer gelöst.

#### Konzentrationsbestimmung von DNA

Die Konzentration von Nukleinsäuren wurde photometrisch bestimmt. Bei einer Wellenlänge von 260 nm und einer Schichtdicke von 1 cm entspricht ein Absorptionswert von 1 einer Konzentration von etwa 50 µg/ml doppelsträngiger DNA und 33 µg/ml einzelsträngiger DNA. 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 in einem Nanodrop ND1000 UV-Spektrophotometer (Peqlab)

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 sec bei 13.000 Upm (RT, Heraeus Biofuge 15) pelletiert. Das Zellpellet wurde in 300 µl STET resuspendiert, nach Zugabe von 30 µl Lysozym-Lösung kräftig geschüttelt und anschließend 60 sec bei 95°C in einem Eppendorf-Heizblock inkubiert. Die lysierten Zellen und die denaturierte genomische DNA wurden 15 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 30 µl 3 M Na-Acetat, pH 5,3 und 500 µl Isopropanol bei RT für 5 min und anschließender Zentrifugation für 15 min bei 13.000 Upm (Heraeus Biofuge 15). Das Pellet wurde mit 70 % Ethanol gewaschen und nach Trocknung in 100 µl TE-Puffer mit 40 µg/ml RNase A aufgenommen. Isolierung von genomischer DNA aus *U. maydis* (Hoffman and Winston, 1987) Für die Isolierung genomischer DNA wurden zunächst 2 ml einer *U. maydis* Übernachtskultur, die in 3-5 ml YEPSlight-Medium angezogen wurde, abzentrifugiert (2 min, 13.000 Upm, Raumtemperatur, Heraeus Biofuge pico) und der Überstand abgenommen. Zum Pellet wurden 400 µl Lysis-Puffer, 500 µl Phenol/Chloroform sowie 300 mg Glasperlen gegeben. Das Gemisch wurde für 6-10 min auf hoher Stufe auf einem Vibrax-Schüttler geschüttelt, um die Zellen aufzuschließen. Zur Phasentrennung wurde dann 15 min bei 13.000 Upm (Raumtemperatur, Heraeus Biofuge pico) zentrifugiert. Von der wässrigen Phase im Überstand wurden ca. 400 µl in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt, 1 ml 100 % Ethanol zugesetzt und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach 5-minütiger Zentrifugation bei 13.000 Upm (Raumtemperatur, Heraeus Biofuge pico) wurde das Pellet ca. 5 min bei Raumtemperatur getrocknet und in 50 µl TE-Puffer mit 50 µg/ml RnaseA aufgenommen. Anschließend wurde die DNA bei 50°C und 850 Upm für 15- 30 min in einem Eppendorf-Thermomixer gelöst. Zur Qualitätskontrolle wurde 1 µl der genomischen DNA auf ein 0,8 %iges Agarosegel aufgetragen und analysiert.

RNA-Isolierung aus *Ustilago maydis* Flüssigkulturen (Trizol)

Diese Methode orientiert sich am Protokoll der Trizol Herstellerfirma (Invitrogen) und wurde zur Präparation von Gesamt-RNA aus *Ustilago maydis* Flüssigkulturen verwendet. Es wurde ausschließlich Nuklease-freies Verbrauchsmaterial verwendet. 50 ml Zellkultur (auch induzierte Kulturen) wurden in CM-Medium bis zu einer OD600 = 0,5 angezogen und pelletiert (3.500 Upm, 5 min, RT, Heraeus Multifuge 4 KR). Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in flüssigem Stickstoff schockgefroren (ggf. wurde das Pellet bei -80°C gelagert). Auf das tiefgefrorene Pellet wurden 2 ml Trizol (Invitrogen) pipettiert, dieser Ansatz kurz gevortext und nach Zugabe von ca. 300 mg Glasperlen (150-200 µm Ø) wurden die Zellen in einer Kugelmühle (Retsch) bei 30 Hz aufgeschlossen. Der Zellaufschluss wurde in zwei frische 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt, um die Glasperlen aus dem Ansatz zu entfernen.

Nach fünf-minütiger Inkubation bei RT wurden pro Ansatz (ein ml Trizol) 200 µl Chloroform zugesetzt, kurz gevortext und drei Minuten bei RT inkubiert. Nach Zentrifugation (15 min, 13.000 Upm, RT, Heraeus Biofuge pico) wurde die wässrige Phase abgenommen, in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und nach Zugabe von 500 µl Isopropanol für mindestens zehn Minuten bei RT gefällt. Nach erneuter Zentrifugation (15 min, 13.000 Upm, RT, Heraeus Biofuge pico) wurde die pelletierte RNA mit 75% Ethanol gewaschen und erneut zentrifugiert (5 min, 13.000 Upm, RT, Heraeus Biofuge pico). Der Überstand wurde verworfen und das RNA-Pellet wurde für fünf Minuten bei RT getrocknet, anschließend in 50 µl Nuklease-freiem Wasser (Ambion) aufgenommen und für zehn Minuten bei 55°C in einem Eppendorf-Heizblock gelöst. Eine Qualitäts- und Quantitätskontrolle erfolgte durch photometrische Messung am NanoDrop ND-1000 Spektrophotometer sowie durch Analyse auf einem Agilent 2100-Bioanalyzer (siehe Angaben des Herstellers).

#### 4.5.2 In vitro-Modifikationen von DNA (Sambrook et al. 1989)

##### 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

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 Alkalischer Phosphatase 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 Antarctic Phosphatase (NEB) 10 µl Alkalische Phosphatase-Puffer. Der Ansatz wurde 15 min bei 37°C inkubiert. Zur Inaktivierung des Enzyms wurde es 20 min bei 65°C inkubiert.

##### 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 *E. coli* DNA-Polymerase I

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

#### Entfernen von 5'- und 3'-überhängenden DNA-Fragmentenden

Die Mungbohnen Nuklease (Mung Bean Nuclease, New England Biolabs) ist in der Lage, 5'- und 3'-überhängende DNA-Fragmentenden zu degradieren und so glatte Enden zu erzeugen. Die Reaktion kann in den meisten Restriktionspuffern vorzugsweise jedoch im mitgelieferten Mung Bean Nuclease Puffer durchgeführt werden. Dieses Vorgehen ist die Methode der Wahl, um nichtkompatible Fragmentenden mit 3'-Überhang ligierbar zu machen. Ein typischer Reaktionsansatz enthielt:

500 ng DNA-Fragmente in Mung Bean Nukleasepuffer  
1 U Mung Bean Nuklease

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

#### Ligation von DNA-Fragmenten

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: 30-50 ng linearisierter, dephosphorylierter Vektor fünffach molarer Überschuss an linearem Fragment 1U T4 DNA-Ligase, 2 µl Ligase-Puffer, mit H<sub>2</sub>O bid auf 20 µl aufgefüllt. Der Ansatz wurde entweder 1-4 h bei Raumtemperatur oder über Nacht inkubiert.

### **4.5.3 Gelelektrophorese von Nukleinsäuren und Transfer auf Membranen**

#### *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 0,8 % Agarose hergestellt. Hierfür wurde die entsprechende Menge an Agarose in 0,5xTBE-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 0,5xTBE-Puffer gefüllt. Die Proben wurden vor dem Auftragen im Verhältnis 10:1 mit nativem Auftragspuffer gemischt. Die Elektrophorese erfolgte bei konstanter Spannung (90-130 V). Die DNA-Banden konnten im UV-Durchlicht (254 nm) Die DNABanden konnten im UV-Durchlicht (Wellenlänge - 254 nm) mit einem E-BOX Videodokumentationssystem (Peqlab) detektiert und auf Thermalpapier photographisch dokumentiert werden.

#### *Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen*

Für die Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wurde der JETSORB®-Kit (Genomed) verwendet. Das Prinzip besteht darin, die DNA unter Hochsalzbedingungen an eine Silikatmatrix zu binden, von Verunreinigungen freizuwaschen 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 und Nachweis von DNA auf Membranen (Southern, 1975)

Transfer von DNA (Southern Blot) Der Transfer der in einem 0,8 %-igem Agarosegel aufgetrennten, mit Restriktionsenzymen verdauten DNA-Fragmente auf eine Nylonmembran erfolgte durch Kapillar-Blot. Hierbei wird die Transferlösung (20x SSC-Puffer) 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, positiv geladene Nylonmembran. Ein gleichmäßig verteiltes Gewicht auf dem Papierstapel garantiert eine dichte Verbindung zwischen den jeweiligen Lagen des Transfersystems. Vor dem Transfer wurde das Agarosegel 20 min in 0,25 M HCl inkubiert, um einen Teil der Purine abzuspalten. So wird der Transfer großer DNA-Fragmente erleichtert. Anschließend wurde das Gel erst 20 min in DENAT-Lösung, dann weitere 20 min in RENAT-Lösung gewaschen. Der Aufbau des Blots von unten nach oben geschah folgendermaßen:

Whatman 3MM-Brücke zum Pufferreservoir

Agarosegel

Nylonmembran (Roti®-Nylon Plus)

drei Lagen Whatman 3MM

Stapel Papierhandtücher

Glasplatte

Gewicht (ca. 500 g)

Der Kapillar-Blot erfolgte über Nacht. Anschließend wurde die Membran bei Raumtemperatur getrocknet und die DNA wurde in einem UV Stratalinker 1800 (Stratagene) für 1 min pro Seite auf der Membran fixiert. Herstellung einer DNA-Hybridisierungssonde Das Herstellen der Hybridisierungssonden erfolgte mittels DIG High-Prime Markierung von PCR-Produkten. Dazu wurde je 1 µg der DNA, welche aus dem Gemisch aus den PCR-Produkten der linken und rechten Flanke des Gens besteht, in einem Gesamtvolumen von 6,6 µl H<sub>2</sub>O bid. für 10 min bei 99°C denaturiert. Anschließend wurden je 1 µl NEB labeling buffer, 1 µl 10 % BSA, 1 µl Dig-dNTP-Mix und 0,4 µl Klenow DNA Polymerase (NEB) zugegeben

und der Ansatz wurde über Nacht bei 37°C inkubiert, um die Markierung der DNA mit Digoxigenin-Molekülen zu gewährleisten. Die Reaktion wurde mit Hitzeinaktivierung bei 65°C für 10 min gestoppt. Direkt im Anschluss wurden die Sonden mit 1,3 µl 4 M LiCl und 37,5 µl reinem Ethanol für 2 h bzw. über Nacht bei -20°C gefällt. Spezifischer Nachweis von an Membranen gebundener DNA Vor der Hybridisierung wurde die Membran für 15-30 min bei 65°C in 40 ml Southern-Hybridisierungspuffer prähybridisiert, um eine unspezifische Bindung der Sonden-DNA an die Membran zu verhindern. Währenddessen wurde die Sonde für 15 min bei 13.000 Upm (Heraeus Biofuge pico) abzentrifugiert, das Pellet in 1 ml Southern-Hybridisierungspuffer resuspendiert und für 5-10 min bei 99°C denaturiert. Die so behandelte Sonde wurde zu 15 ml vorgewärmten Southern-Hybridisierungspuffer gegeben. Die Hybridisierung erfolgte bei 65 °C über Nacht im Hybridisierungssofen und unterlag stringenten Bedingungen, da nur komplementäre, homologe Sonden eingesetzt wurden. Auf die Hybridisierung folgten mehrere Waschschrirte für jeweils 15 min bei Raumtemperatur mit je 20 ml 2xSSPE-, 1xSSPE-, 0,1x SSPE- und DIG-Waschpuffer. Nach diesen Waschschrirten wurde eine 30- minütige Blockierungsreaktion mit DIG 2-Puffer durchgeführt, um eine unspezifische Bindung des anti-DIG-Antikörpers an die Membran zu vermeiden. Erst dann wurde die Membran für mindestens 1 h mit 10 ml Alkalische Phosphatase konjugierter anti-DIG-Antikörperlösung (1:5000 bis 1:7500 in DIG 2) inkubiert. Die Membran wurde daraufhin für zwei mal 15 min mit je 50 ml DIG-Waschpuffer gewaschen und für 15 min mit 40 ml DIG 3- Puffer äquilibriert. Nach 5-minütiger Inkubation mit 10 ml CDP-Star-Lösung konnte das Fluoreszenzsignal dann mit Hilfe einer Chemilumineszenzdetektier- Apperatur (Vilber) fotografiert. Die Belichtungszeit betrug zwischen 10 sec und fünfzehn min.

#### **4.5.4 Sequenzanalysen**

##### Sequenzierung von Plasmid DNA

DNA wurde zum Sequenzieren zum Sequencing Service of the Department of

Biology Genomics Service Unit (GSU) in München geschickt. Vor der automatischen Sequenzierung wurde die DNA per Peq-Fällung aufgereinigt und die DNA-Konzentration wurde bestimmt (s.o.). Je Sequenzierreaktion wurden 100-300 ng DNA in einem Gesamtvolumen von 7 µl benötigt. Als Sequenzierungsprimer wurden je 3,5 pmol des Oligonukleotids pGAD\_DS\_for verwendet. Das restliche Volumen wurde mit EB Puffer aufgefüllt. Die erhaltenen Sequenzrohdaten konnten zur weiteren Bearbeitung in das Programm Clone Manger 9 exportiert werden. Zur Sequenzanalyse und für Homologievergleiche wurden folgende Programme benutzt.

- BLAST 2 (Altschul *et al.* 1990; Altschul *et al.* 1997) zur Identifikation ähnlicher Proteine oder DNA-Sequenzen in öffentlichen Datenbanken
- Sequencher (Genecodes) zur Bearbeitung von Sequenzrohdaten und zum Vergleich von DNA-Sequenzen
- Clone Manger 9 zur Erstellung und Bearbeitung von Plasmiden und genomischen Sequenzen

### Sequenzierung von Chromatin-Immunopräzipitierter DNA

Die Sequenzierung von immunopräzipitierter DNA wurde durch die *Next Generation Sequencing and Genomics facility* des Karlsruher Institut für Technologie am *Institute of Toxicology and Genetics* (ITG) von Olivier Armant und Victor Gourain durchgeführt. Dazu wurde eine multiplex *paired end Library* (2x 50 bp) mit dem Truseq ChIP Kit (Illumina) erstellt und mit dem HiSeq 1000 Sequencing System (Illumina) sequenziert.

### Sequenzanalyse der Chromatin-Immunopräzipitierten DNA

Die Datenanalyse der Sequenzierdaten wurde in Kooperation mit (von) Florian Finkernagel vom *Department of Mathematics and Computer Science* der Philipps-Universität Marburg durchgeführt. Dabei wurden die Reads der Sequenzierung

der ChIP-Probe und der Input-Kontrolle mittels Bowtie (Langmead *et al.*, 2009) auf das *Ustilago maydis* Referenzgenom (MumDB) aligniert. Dabei waren maximal zwei Fehlpaarungen in den ersten 28 bp und eine maximale Fehlpaarungs-Qualitätssumme von 70 zugelassen. Nur eindeutig positionierbare Sequenzpaare wurden ausgegeben. Putative Bindestellen wurden mit MACS2 (Zhang *et al.*, 2008) vorhergesagt und mit rohen und auf gleiche Gesamtzahl an alignierten Sequenzen normalisierten Sequenzanzahlen annotiert. Zur Sequenzanalyse wurden 300 bp, d.h. je 150 bp upstream und downstream um die Maxima der vorhergesagten Bindestellen, extrahiert und mit MEME ((Machanic und Bailey, 2011) analysiert. Die Zuordnung von Bindestellen zu Rbf1 regulierten Genen erfolgte manuell über visuelle Inspektion im Genombrowser.

#### Sonstige Sequenz- und Strukturanalyse

Folgende Programme wurden für die Sequenz- und Strukturanalyse von DNA- und Proteinsequenzen oder zur weiteren Verarbeitung von Rohdaten verwendet:

**ApE – „A Plasmid Editor“** zur Erstellung und Bearbeitung von Plasmid- und genomischen Sequenzen, zum Erstellen von Oligonukleotiden und Zeichnen von Plasmidkarten.

**FunCat** zur Klassifizierung von Proteinen in funktionelle Kategorien (<http://mips.helmholtzmuenehen.de/genre/proj/ustilago>)

**MFOLD (Zuker, 2003)** (<http://www.bioinfo.rpi.edu/applications/mfold/>) zur Bestimmung von Sekundärstrukturen in qPCR-Amplifikaten und mRNAs.

**Multiple Sequence Aligning Tool T-Coffee**

<http://tcoffee.crg.cat/apps/tcoffee/do:regular>

**Multiple Sequence Aligning formatting Tool Boxshade**

[http://www.ch.embnet.org/software/BOX\\_form.html](http://www.ch.embnet.org/software/BOX_form.html)

Die folgende Datenbank wurden zur Identifizierung von orthologen Proteinsequenzen anhand annotierter Funktionen und zur Analyse von DNA- und Proteinsequenzdaten verwendet.

**Pedant 3 Database (ehemals MUMDB):**

<http://pedant.gsf.de/pedant3htmlview/pedant3view?Method=analysis&Db=p3t237631> Ust maydi v2GB

## 4.6 PCR-Techniken

### 4.6.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR) (Innis und Gelfand, 1990)

Die PCR bietet die Möglichkeit, definierte DNA-Bereiche selektiv zu amplifizieren. Nötig sind hierfür zwei Primer, von denen einer zum 3'-Bereich der gewünschten Sequenz, der andere zum Gegenstrang des 5'-Bereiches komplementär ist. Die Reaktionen wurden in einem Peltier Thermal Cycler PTC-100 (MJ Research) durchgeführt. Das optimale Temperaturprofil der Reaktion hängt von der Matrize und besonders von den benutzten Primern ab. Die PCR-Amplifikationen der zur Konstruktion der Plasmide notwendigen Sequenzen wurden unter Verwendung der Phusion DNA-Polymerase (New England Biolabs) durchgeführt.

Es wurde folgender Ansatz gewählt:

10-100 ng Matrizen DNA

2 U Phusion DNA-Polymerase

1 µl 10 mM dNTPs

1 µl je Primer (50 pmol/µl)

in 10 µl Phusion PCR-Puffer (New England Biolabs)

auf 50 µl mit ddH<sub>2</sub>O aufgefüllt

PCR Programm:

98°C/30 sec – [98°C/10 sec – 60-69°C/30 sec – 72°C/15s – 3min] x 30 – 72°C/5 min

Annealingtemperatur und Elongationszeiten wurde für die entsprechenden Primer und Matrizen DNA angepasst.

#### **4.6.2 Real-Time-PCR (qRT-PCR)**

##### *DNaseI-Behandlung und Reverse Transkription*

Vor der reversen Transkription wurde die isolierte Gesamt-RNA zunächst mit Turbo DNase I (Ambion) behandelt, um DNA-Kontaminationen zu entfernen. Hierbei wurde nach Herstellerangaben vorgegangen (siehe Herstellerprotokoll Turbo DNA-free™ Kit). Die reverse Transkription wurde mit Hilfe des RevertAid™ First Strand cDNA Synthese Kit (Fermentas/Thermo) nach Herstellerprotokoll durchgeführt. Für die reverse Transkription von Material und Methoden 85 Gesamt-RNA, die aus *Ustilago maydis* Flüssigkulturen extrahiert wurde, wurden 0,5-1 µg DNase-behandelter RNA eingesetzt und zusammen mit Oligo(dT)<sub>20</sub>-Primern, den entsprechenden Puffern und Enzymgemischen (Details, siehe Herstellerangaben) für die Erststrang-cDNA-Synthese bei 50°C für 50 Minuten inkubiert.

##### *Real-Time-PCR*

Für Real-time PCR Analysen wurde das MESA GREEN qPCR Master Mix plus for SYBR Assay +Fluorescein Kit (Eurogentech) verwendet und nach Herstellerangaben durchgeführt. Für die PCR Reaktion wurden 2-5 µl der synthetisierten cDNA bzw 0,5-1 µl der durch CHIP aufgereinigten DNA eingesetzt. Die Reaktionen erfolgten auf einem Bio-Rad-iCycler-System unter der Verwendung des folgenden Programms:

Initiale Denaturierung: 95 °C / 7 min

Amplifikation: 95 °C / 30 sec

(45 Zyklen) 60 °C / 20 sec

72 °C / 40 sec

Im Anschluss hieran wurde die Spezifität der Amplifikation anhand einer Schmelzkurve am BioRad CFX96 -System überprüft. Zur Kalkulation des CT-Wertes (Threshold Cycle), der den Wert bzw. Zyklus beschreibt, bei dem die Fluoreszenz zum ersten Mal signifikant über die Hintergrundfluoreszenz steigt, wurde die

BioRad-Software Version 3.0a verwendet. Die Berechnung der relativen Expressionswerte erfolgte mit dem Programm Bio-Rad Gene Expression Macro der Firma Biorad.

## 5. Literaturverzeichnis

- AUERBACH RK, EUSKIRCHEN G, ROZOWSKY J, LAMARRE-VINCENT N, MOQTADERI Z, LEFRANCOIS P, STRUHL K, GERSTEIN M UND SNYDER M.** (2009). Mapping Accessible Chromatin Regions Using Sono-Seq. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106:14926-14931.
- BANUETT F UND HERSKOWITZ I.** (1989). Different *a* Alleles of *Ustilago Maydis* Are Necessary for Maintenance of Filamentous Growth but Not for Meiosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 86:5878-5882.
- BANUETT F UND HERSKOWITZ I.** (1994). Identification of Fuz7, a *Ustilago Maydis* Mek/Mapkk Homolog Required for *a*-Locus-Dependent and -Independent Steps in the Fungal Life Cycle. *Genes & Development* 8:1367-1378.
- BARDET AF, STEINMANN J, BAFNA S, KNOBLICH JA, ZEITLINGER J UND STARK A.** (2013). Identification of Transcription Factor Binding Sites from Chip-Seq Data at High Resolution. *Bioinformatics* 29:2705-2713.
- BARSKI A UND ZHAO K.** (2009). Genomic Location Analysis by Chip-Seq. *Journal of Cellular Biochemistry* 107:11-18.
- BOHLMANN R.** (1996). Isolierung Und Charakterisierung Von Filamentspezifisch Exprimierten Genen Aus *Ustilago Maydis*. Ludwig-Maximilian-Universität.
- BÖLKER M, GENIN S, LEHMLER C UND KAHMANN R.** (1995). Genetic Regulation of Mating, and Dimorphism in *Ustilago Maydis*. *Canadian Journal of Botany* 73:320-325.
- BÖLKER M, URBAN M UND KAHMANN R.** (1992). The *a* Mating Type Locus of *U. Maydis* Specifies Cell Signaling Components. *Cell* 68:441-450.
- BRACHMANN A.** (2001). Die Frühe Infektionsphase Von *Ustilago Maydis*: Genregulation Durch Das Bw/Be-Heterodimer. München, Ludwig-Maximilians-Universität. Ludwig-Maximilians-Universität.
- BRACHMANN A, SCHIRAWSKI J, MÜLLER P UND KAHMANN R.** (2003). An Unusual Map Kinase Is Required for Efficient Penetration of the Plant Surface by *Ustilago Maydis*. *EMBO J* 22:2199-2210.
- BRACHMANN A, WEINZIERL G, KÄMPER J UND KAHMANN R.** (2001). Identification of Genes in the Bw/Be Regulatory Cascade in *Ustilago Maydis*. *Molecular Microbiology* 42:1047-1063.
- CAREY MF, PETERSON CL UND SMALE ST.** (2009). Chromatin Immunoprecipitation (Chip). *Cold Spring Harb Protoc* 2009:pdb prot5279.

- CHRISTENSEN JJ.** (1963). Corn Smut Induced by *Ustilago Maydis*. *Amer Phytopathol Soc Monogr* 2.
- COX JS UND WALTER P.** (1996). A Novel Mechanism for Regulating Activity of a Transcription Factor That Controls the Unfolded Protein Response. *Cell* 87:391-404.
- EWING B, HILLIER L, WENDL MC UND GREEN P.** (1998). Base-Calling of Automated Sequencer Traces Using Phred. I. Accuracy Assessment. *Genome Research* 8:175-185.
- FEDLER M, LUH KS, STELTER K, NIETO-JACOBO F UND BASSE CW.** (2009). The A2 Mating-Type Locus Genes *Lga2* and *Rga2* Direct Uniparental Mitochondrial DNA (Mtdna) Inheritance and Constrain Mtdna Recombination During Sexual Development of *Ustilago Maydis*. *Genetics* 181:847-860.
- FLOR-PARRA I, VRANES M, KÄMPER J UND PEREZ-MARTIN J.** (2006). Biz1, a Zinc Finger Protein Required for Plant Invasion by *Ustilago Maydis*, Regulates the Levels of a Mitotic Cyclin. *Plant Cell* 18:2369-2387.
- GARCIA-MUSE T, STEINBERG G UND PEREZ-MARTIN J.** (2003). Pheromone-Induced G2 Arrest in the Phytopathogenic Fungus *Ustilago Maydis*. *Eukaryotic Cell* 2:494-500.
- GILLISSEN B, BERGEMANN J, SANDMANN C, SCHRÖER B, BÖLKER M UND KAHMANN R.** (1992). A Two-Component Regulatory System for Self/Non-Self Recognition in *Ustilago Maydis*. *Cell* 68:647-657.
- GUO L, ZHAO G, XU JR, KISTLER HC, GAO L UND MA LJ.** (2016). Compartmentalized Gene Regulatory Network of the Pathogenic Fungus *Fusarium Graminearum*. *New Phytologist* 211:527-541.
- HARTMANN HA.** (1997). Die Pheromonantwort in *Ustilago Maydis*: Kontrolle Von Zellfusion Und Pathogenität. phd-thesis. Ludwig-Maximilians-Universität.
- HARTMANN HA, KAHMANN R UND BÖLKER M.** (1996). The Pheromone Response Factor Coordinates Filamentous Growth and Pathogenicity in *Ustilago Maydis*. *EMBO J* 15:1632-1641.
- HECHT A, STRAHL BOLSINGER S UND GRUNSTEIN M.** (1996). Spreading of Transcriptional Repressor Sir3 from Telomeric Heterochromatin. *Nature* 383:92-96.
- HEIMEL K, FREITAG J, HAMPEL M, AST J, BÖLKER M UND KÄMPER J.** (2013). Crosstalk between the Unfolded Protein Response and Pathways That Regulate Pathogenic Development in *Ustilago Maydis*. *Plant Cell* 25:4262-4277.
- HEIMEL K, SCHERER M, SCHULER D UND KÄMPER J.** (2010a). The *Ustilago Maydis* Clp1 Protein Orchestrates Pheromone and B-Dependent Signaling Pathways to

Coordinate the Cell Cycle and Pathogenic Development. *The Plant Cell* 22:2908-2922.

**HEIMEL K, SCHERER M, VRANES M, WAHL R, POTHIRATANA C, SCHULER D, VINCON V, FINKERNAGEL F, FLOR-PARRA I UND KÄMPER J.** (2010b). The Transcription Factor Rbf1 Is the Master Regulator for B-Mating Type Controlled Pathogenic Development in *Ustilago Maydis*. *PLoS Pathogens* 6:e1001035.

**JOHNSON DS, MORTAZAVI A, MYERS RM UND WOLD B.** (2007). Genome-Wide Mapping of in Vivo Protein-DNA Interactions. *Science* 316:1497-1502.

**KAHMANN R, STEINBERG G, BASSE C UND KÄMPER J.** (2000). *Ustilago Maydis*, the Causative Agent of Corn Smut Disease. Pages 347-371 in Kronstad JW, ed. Fungal Pathology. *Dordrecht: Kluwer Academic Publishers*.

**KÄMPER J, et al.,** (2006). Insights from the Genome of the Biotrophic Fungal Plant Pathogen *Ustilago Maydis*. *Nature* 444:97-101.

**KÄMPER J, REICHMANN M, ROMEIS T, BÖLKER M UND KAHMANN R.** (1995). Multiallelic Recognition: Nonspecific Dimerization of the Be and Bw Homeodomain Proteins in *Ustilago Maydis*. *Cell* 81:73-83.

**KAWAHARA T, YANAGI H, YURA T UND MORI K.** (1998). Unconventional Splicing of Hac1/Ern4 Mrna Required for the Unfolded Protein Response. Sequence-Specific and Non-Sequential Cleavage of the Splice Sites. *Journal of Biological Chemistry* 273:1802-1807.

**KRONSTAD JW UND LEONG SA.** (1990). The B Mating-Type Locus of *Ustilago Maydis* Contains Variable and Constant Regions. *Genes & Development* 4:1384-1395.

**MAHLERT M, VOGLER C, STELTER K, HAUSE G UND BASSE CW.** (2009). The A2 Mating-Type-Locus Gene *Lga2* of *Ustilago Maydis* Interferes with Mitochondrial Dynamics and Fusion, Partially in Dependence on a Dnm1-Like Fission Component. *Journal of Cell Science* 122:2402-2412.

**MIKKELSEN TS, et al.,** (2007). Genome-Wide Maps of Chromatin State in Pluripotent and Lineage-Committed Cells. *Nature* 448:553-560.

**MUNDADE R, OZER HG, WEI H, PRABHU L UND LU T.** (2014). Role of Chip-Seq in the Discovery of Transcription Factor Binding Sites, Differential Gene Regulation Mechanism, Epigenetic Marks and Beyond. *Cell Cycle* 13:2847-2852.

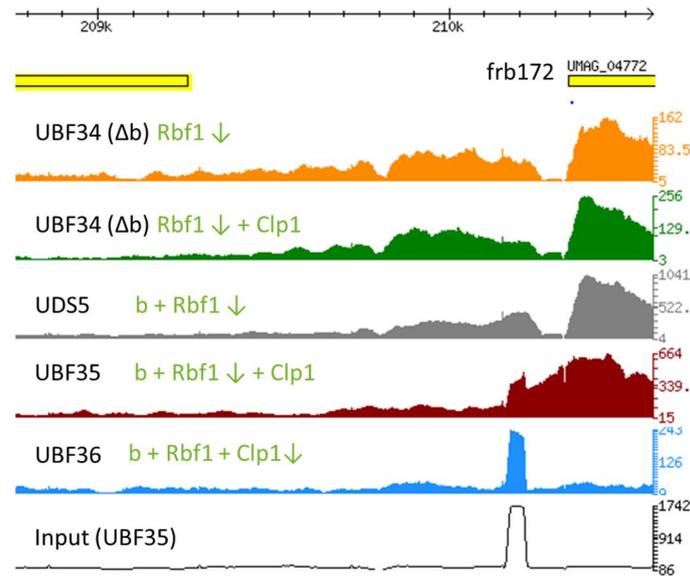
**POTHIRATANA C.** (2008). Functional Characterization of the Homeodomain Transcription Factor Hdp1 in *Ustilago Maydis*. Philipps-University Marburg.

**RHEE HS UND PUGH BF.** (2011). Comprehensive Genome-Wide Protein-DNA Interactions Detected at Single-Nucleotide Resolution. *Cell* 147:1408-1419.

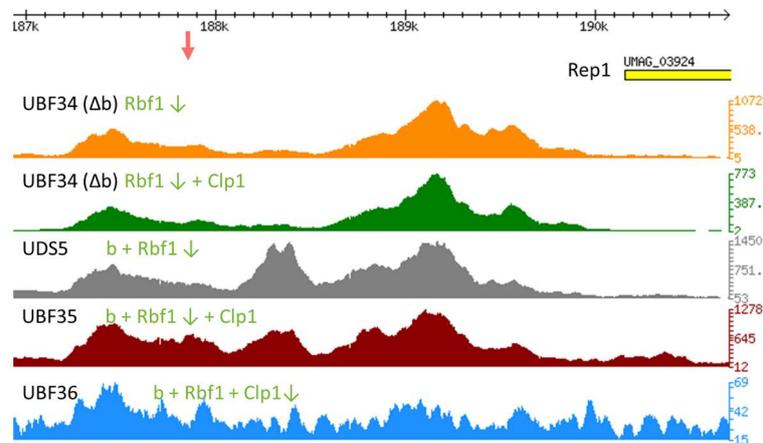
- ROBERTSON G, et al.,** (2007). Genome-Wide Profiles of Stat1 DNA Association Using Chromatin Immunoprecipitation and Massively Parallel Sequencing. *Nat Methods* 4:651-657.
- ROMEIS T, BRACHMANN A, KAHMANN R UND KÄMPER J.** (2000). Identification of a Target Gene for the Be/Bw Homeodomain Protein Complex in *Ustilago Maydis*. *Molecular Microbiology* 37:54-66.
- ROMEIS T, KÄMPER J UND KAHMANN R.** (1997). Single-Chain Fusions of Two Unrelated Homeodomain Proteins Trigger Pathogenicity in *Ustilago Maydis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:1230-1234.
- RUEGSEGGER U, LEBER JH UND WALTER P.** (2001). Block of Hac1 Mrna Translation by Long-Range Base Pairing Is Released by Cytoplasmic Splicing Upon Induction of the Unfolded Protein Response. *Cell* 107:103-114.
- SAUNDERS DG, AVES SJ UND TALBOT NJ.** (2010a). Cell Cycle-Mediated Regulation of Plant Infection by the Rice Blast Fungus. *Plant Cell* 22:497-507.
- SAUNDERS DG, DAGDAS YF UND TALBOT NJ.** (2010b). Spatial Uncoupling of Mitosis and Cytokinesis During Appressorium-Mediated Plant Infection by the Rice Blast Fungus Magnaporthe Oryzae. *Plant Cell* 22:2417-2428.
- SCHERER M, HEIMEL K, STARKE V UND KÄMPER J.** (2006). The Clp1 Protein Is Required for Clamp Formation and Pathogenic Development of *Ustilago Maydis*. *Plant Cell* 18:2388-2401.
- SCHERER M, WEI H, LIESE R UND FISCHER R.** (2002). Aspergillus Nidulans Catalase-Peroxidase Gene (Cpea) Is Transcriptionally Induced During Sexual Development through the Transcription Factor Stua. *Eukaryotic Cell* 1:725-735.
- SCHLESINGER R, KAHMANN R UND KÄMPER J.** (1997). The Homeodomains of the Heterodimeric Be and Bw Proteins of *Ustilago Maydis* Are Both Critical for Function. *Molecular and General Genetics* 254:514-519.
- SCHULZ B, BANUETT F, DAHL M, SCHLESINGER R, SCHÄFER W, MARTIN T, HERSKOWITZ I UND KAHMANN R.** (1990). The B Alleles of *U. Maydis*, Whose Combinations Program Pathogenic Development, Code for Polypeptides Containing a Homeodomain-Related Motif. *Cell* 60:295-306.
- SGARLATA C UND PEREZ-MARTIN J.** (2005). The Cdc25 Phosphatase Is Essential for the G2/M Phase Transition in the Basidiomycete Yeast *Ustilago Maydis*. *Molecular Microbiology* 58:1482-1496.
- SHANER NC, CAMPBELL RE, STEINBACH PA, GIEPMANS BN, PALMER AE UND TSIEN RY.** (2004). Improved Monomeric Red, Orange and Yellow Fluorescent Proteins Derived from Discosoma Sp. Red Fluorescent Protein. *Nature Biotechnology* 22:1567-1572.

- SIGGERS T UND GORDAN R.** (2014). Protein-DNA Binding: Complexities and Multi-Protein Codes. *Nucleic Acids Res* 42:2099-2111.
- SNETSELAAR KM, BÖLKER M UND KAHMANN R.** (1996). *Ustilago Maydis* Mating Hyphae Orient Their Growth toward Pheromone Sources. *Fungal Genetics and Biology* 20:299-312.
- SNETSELAAR KM UND MIMS CW.** (1992). Sporidial Fusion and Infection of Maize Seedlings by the Smut Fungus *Ustilago Maydis*. *Mycologia* 84:193-203.
- SNETSELAAR KM UND MIMS CW.** (1993). Infection of Maize Stigmas by *Ustilago Maydis*: Light and Electron Microscopy. *Phytopathology* 83:843.
- SPELLIG T, BÖLKER M, LOTTSCHEICH F, FRANK RW UND KAHMANN R.** (1994). Pheromones Trigger Filamentous Growth in *Ustilago Maydis*. *EMBO J* 13:1620-1627.
- STRAUBE A, WEBER I UND STEINBERG G.** (2005). A Novel Mechanism of Nuclear Envelope Break-Down in a Fungus: Nuclear Migration Strips Off the Envelope. *EMBO J* 24:1674-1685.
- URBAN M, KAHMANN R UND BÖLKER M.** (1996). Identification of the Pheromone Response Element in *Ustilago Maydis*. *Molecular and General Genetics* 251:31-37.
- VALOUEV A, JOHNSON DS, SUNDQUIST A, MEDINA C, ANTON E, BATZOGLU S, MYERS RM UND SIDOW A.** (2008). Genome-Wide Analysis of Transcription Factor Binding Sites Based on Chip-Seq Data. *Nat Methods* 5:829-834.
- VENEAULT-FOURREY C, BAROOAH M, EGAN M, WAKLEY G UND TALBOT NJ.** (2006). Autophagic Fungal Cell Death Is Necessary for Infection by the Rice Blast Fungus. *Science* 312:580-583.
- WANG JC, DERYNCK MK, NONAKA DF, KHODABAKHSH DB, HAQQ C UND YAMAMOTO KR.** (2004). Chromatin Immunoprecipitation (Chip) Scanning Identifies Primary Glucocorticoid Receptor Target Genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101:15603-15608.
- WEINZIERL G.** (2001). Isolierung Und Charakterisierung Von Komponenten Der B-Vermittelten Regulationskaskade in *Ustilago Maydis*. Philipps-Universität marburg.
- WU WS, HSIEH YC UND LAI FJ.** (2016). Ycrd: Yeast Combinatorial Regulation Database. *PLoS One* 11:e0159213.
- ZELLER KI, HAGGERTY TJ, BARRETT JF, GUO Q, WONSEY DR UND DANG CV.** (2001). Characterization of Nucleophosmin (B23) as a Myc Target by Scanning Chromatin Immunoprecipitation. *Journal of Biological Chemistry* 276:48285-48291.

## Anhang:



**Abbildung 45: Rbf1 bindet nicht im Rbf1 induzierten Gen *frb172* (Rbf1 notwendig und ausreichend).** Gezeigt werden die erhaltenen Peaks aus den ChIP-Seq-Daten des *frb172*-Promotors der Stämme UBF34, UDS5 (Ulrich, 2015), UBF35 und UBF36. Die jeweils induzierten Gene stehen in grün neben den Peaks. Der grüne Pfeil markiert das Protein, mit dem die ChIP durchgeführt wurde. Die Induktion erfolgte über 6h. In allen untersuchten Stämmen ist keine Anreicherung in der Promotorregion zu erkennen. Folglich wird *frb172* nicht direkt durch Rbf1 reguliert. Auch die Anwesenheit von Clp1 (UBF34 Rbf1+Clp1 und UBF35) zeigt keine Änderung in der Rbf1-Bindung. Es ist keine bbs vorhanden.



**Abbildung 46: Clp1 weist keine Bindung in der Promotorregion von *rep1* auf (Rbf1 notwendig und ausreichend).** Gezeigt werden die erhaltenen Peaks aus den ChIP-Seq-Daten des *rep1*-Promotors der Stämme UBF34, UDS5 (Ulrich, 2015), UBF35 und UBF36. Die jeweils induzierten Gene stehen in grün neben den Peaks. Der grüne Pfeil markiert das Protein, mit dem die ChIP durchgeführt wurde. Die Induktion erfolgte über 6h. In allen Stämmen kommt es wie in den Genen des *a*-Locus zu einer Anreicherung durch Rbf1. Die Anreicherung im Stamm UBF34 zeigt, dass es sich um eine direkte Rbf1-Bindung handelt. Der Stamm UBF36 zeigt jedoch keine Anreicherung durch Clp1 in den Bindestellen von Rbf1. Wie zuvor in anderen Promotorregionen beschrieben kommt, es auch hier zu keiner Änderung des Bindungsverhaltens von Rbf1 durch Clp1-Induktion (vgl. UBF34 Rbf1 mit UBF34 Rbf1+Clp1 und UDS5 mit UBF35). Es konnte ein bbs-ähnliches Motiv an Position -2371 lokalisiert werden (hellroter Pfeil).

**Daten CD:**

- 1, Digitale Version der Dissertation
2. Film der in Abbildung 16 dargestellten Mitose

## **Danksagung**

Zunächst möchte ich mich bei Jörg bedanken, der mir diese Arbeit ermöglicht hat. Danke für Deine Unterstützung und die Geduld, die Du mir entgegen gebracht hast. Vielen Dank auch für die Möglichkeit, an dem Mexiko-Workshop teilzunehmen, was für mich eine besondere Erfahrung war.

Natürlich auch Danke für alle Aktionen außerhalb des Laboralltags, wie unser schon traditionelles Grünkohllessen und jegliche Grillaktionen.

Bedanken möchte ich mich auch bei Herrn Prof. Dr. Holger Puchta, der nach dem Zweitgutachten meiner Diplomarbeit auch das Zweitgutachten meiner Dissertation übernommen hat. Ein Dank geht auch an Oliver Armand und Victor Gourain, die es mir ermöglicht haben, die ChIP-Seq-Experimente zu verwirklichen und stets Hilfsbereit bei eventuellen Fragen waren. Ein besonderer Dank geht an Florian Finkernagel für die bioinformatische Auswertung der ChIP-Seq-Ergebnisse.

Einen ganz herzlichen Dank an alle ehemaligen und derzeitigen Mitstreiter im Kämperlabor. Danke an Miro, David, Bebbi, Nikola, Kai1 und Kai2, die mir bereits während der Diplomarbeit zu Seite standen. Danke an Thes, Jonas, Niko, Julia für die tolle Arbeitsatmosphäre während meiner Doktorarbeit. Ich hatte eine sehr schöne Zeit mit euch allen und bin froh euch alle kennengelernt zu haben.

Ein großes Dankeschön geht an meine Familie, meine Eltern und meine Geschwister, die mich über meine gesamten Lehrjahre unterstützt haben und immer ein offenes Ohr für meine Sorgen hatten. Besonders möchte ich mir hier bei Christine und Benjamin bedanken, die mich in einer schweren Zeit wieder aufgebaut und in die richtige Bahn gebracht haben. Ohne euch hätte ich das nicht geschafft.