



**Charakterisierung des Proteinkomplexes Clp1 mit bE/bW
und seine Auswirkung auf die pathogene Entwicklung in
*Ustilago maydis***

Zur Erlangung des akademischen Grades eines
DOKTORS DER NATURWISSENSCHAFTEN
(Dr. rer. nat.)

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

genehmigte
DISSERTATION
von
M.Sc. Julia Fortenbacher
aus
Baden-Baden

Dekan:	Prof. Dr. Manfred Wilhelm
Referent:	Prof. Dr. Jörg Kämper
Korreferent:	Prof. Dr. Holger Puchta
Tag der mündlichen Prüfung:	06.12.2019

Die Untersuchungen zur vorliegenden Arbeit wurden zwischen dem 01. April 2016 und dem 30. September 2019 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:11.11.2019

Hiermit erkläre ich, dass ich meine Dissertation mit dem Titel „Charakterisierung des Proteinkomplexes Clp1 mit bE/bW und seine Auswirkung auf die pathogene Entwicklung in *Ustilago maydis*“ selbstständig verfasst, keine anderen als die angegebenen Quellen oder Hilfsmittel verwendet und alle Stellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten Schriften entnommen wurden, als solche kenntlich gemacht habe. Die Regelung zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis im Karlsruher Institut für Technologie (KIT), in gültiger Fassung vom 27.11.2014, habe ich beachtet.

Ort/Datum

Julia Fortenbacher

Abkürzungsverzeichnis

Amp ^R	Ampicilin-Resistenz	Gen ^R	Geneticin-Resistenz
AS	Aminosäure	Hyg ^R	Hygromycin-Resistenz
bE	b-East Allel	IP	Immunopräzipitation
bp	Basenpaare	Kan ^R	Kanamycin-Resistenz
BLAST	basic local alignment searchtool	Kb	Kilobasenpaare
bW	b-West Allel	mCherry	Rot fluoreszierendes Protein
Cbx ^R	Carboxin-Resistenz	Nat ^R	Nourseothricin-Resistenz
ChIP	Chromatinimmuno- präzipitation	NLS	Nuclear localization signal
ChIP-Seq	Chromatinimmuno- präzipitation mit anschließender Sequenzierung	N-terminal	Aminoterminal
CM	Komplex-Medium	OD ₆₀₀	Optische Dichte bei 600 nm
Co-IP	Co-Immunopräzipitation	ORF	Offener Leserahmen
C-terminal	Carboxy-terminal	PEG	Polyethylenglycol
DIG	Digoxigenin	Pxy	Promotor
DMSO	Dimethylsulfoxid	Phleo ^R	Phleomycin-Resistenz
dNTP	Desoxyribonukleosid- triphosphat	RT PCR	Real-time PCR
dpi	Tage nach Infektion	RNase	Ribonuklease
EDTA	Ethylendiamintetra- essigsäure	TE	Tris-HCL / EDTA
f. c.	Finale Konzentration	Tris	Trishydroxymethyl- aminomethan
GFP	Grün fluoreszierendes Protein	Upm	Umdrehungen pro Minute
		V	Volt
		WT	Wildtyp
		Δ	Deletion

Inhaltsverzeichnis

I. Zusammenfassung..... 1

II. Summary..... 2

1 Einleitung 2

1.1 *Ustilago maydis* als Modellorganismus..... 2

1.1.1 Lebenszyklus 3

1.2 Paarungstyp-Loci..... 5

1.2.1 Interzelluläre Erkennung durch den *a*-Locus 5

1.2.2 Pathogene Entwicklung durch den *b*-Locus..... 4

1.3 Die *b*-abhängige Regulation 5

1.3.1 bE/bW Heterodimer als Schaltstelle der pathogenen Entwicklung..... 8

1.3.2 Rbf1 als Masterregulator der *b*-Regulationskaskade 10

1.4 Das Clp1-Protein bei der Pflanzenpenetration 10

1.4.1 Clp1 als Interaktionspartner wichtiger pathogener Faktoren 11

1.4.2 Clp1 nimmt Einfluss auf die UPR 14

1.4.3 Clp1 als Schlüsselprotein bei der Schnallenzellbildung 15

1.5 Zielsetzung dieser Arbeit 18

2 Ergebnisse20

2.1 Genomweiter regulatorischer Einfluss von Clp1 und dem Proteinkomplex aus bE/bW und Clp1 20

2.1.1 Der Proteinkomplex bE/bW mit Clp1 hat einen spezifischen Effekt auf die transkriptionelle Regulation 20

2.1.2 Clp1 nimmt im Proteinkomplex mit bE/bW Einfluss auf die transkriptionelle Regulation des eigenen Promotors 30

2.2 Der zentrale Bereich von Clp1 hat Einfluss auf das Proteinlevel und die Funktion des Proteins 32

2.2.1 Der zentrale Bereich von Clp1 beeinflusst die Proteinabundanz 34

2.2.2 Der zentrale Bereich von Clp1 ist für die bE/bW-Clp1-abhängige transkriptionelle Regulation notwendig 37

2.2.3	Der zentrale Bereich von Clp1 ist notwendig für die indirekte Proteinbindung von Clp1 an die DNA.....	39
2.2.4	Der zentrale Bereich von Clp1 beeinflusst die pathogene Entwicklung in der Pflanze, jedoch nicht das filamentöse Wachstum	44
2.2.5	Die Mutation des ABBA Motivs in Clp1 stört die Interaktion mit dem C-terminalen Ende des Proteinkomplexpartners bW2.....	49
2.2.6	Die Mutation des ABBA Motivs in Clp1 stört die Interaktion mit dem Heterodimer aus bW2 und bE1	51
2.3	C-terminale Bereiche der b-Proteine bE und bW haben Einfluss auf die Interaktion im Proteinkomplex mit Clp1.....	53
2.3.1	C-terminale Verkürzung von bW2 reduziert die Interaktion des bE/bW Heterodimers mit Clp1.....	53
2.3.2	Beide b-Proteine des Heterodimer sind in der Lage, als Einzelproteine mit Clp1 zu interagieren.....	55
2.3.3	Die C-terminalen Verkürzungen beider b-Proteine zeigen eine funktionelle Redundanz für die Interaktion mit Clp1	57
3	Diskussion.....	65
3.1	Der bE/bW-Clp1-Proteinkomplex hat einen gezielten Einfluss auf pathogenitätsrelevante Faktoren.....	66
3.2	Identifizierung eines pathogenitätsrelevanten Motivs in Clp1	73
3.2.1	Das Mitose assoziierte ABBA Motiv hat Einfluss auf die Proteinabundanz von Clp1	74
3.2.2	Das ABBA Motiv ist notwendig für die Interaktion mit dem bE/bW Heterodimer und die Clp1-abhängige Repression.....	76
3.2.3	Das ABBA Motiv ist essentiell für die Proliferation in der Pflanze nach Penetration	77
3.3	Die C-terminalen Enden der b-Proteine bE und bW im Heterodimer zeigen eine redundante Funktion für die Interaktion mit Clp1.....	82
3.3.1	Die C-terminalen Bereiche von bE und bW im Heterodimer zeigen eine funktionelle Redundanz für die Bildung des Proteinkomplexes mit Clp1.....	83

3.3.2	Die C-terminalen Bereiche von bE und bW im Heterodimer zeigen eine funktionelle Redundanz für die weitere pathogene Entwicklung in der Pflanze.	84
3.4	Modell zum Aufbau und Mechanismus des bE/bW-Clp1-Proteinkomplexes	86
4	Material und Methoden	89
4.1	Material und Bezugsquellen	89
4.1.1	Chemikalien	89
4.1.2	Enzyme, Proteine und Antikörper	89
4.1.3	Eingesetzte Kits	90
4.1.4	Puffer und Lösungen	90
4.1.5	Medien	90
4.1.6	Stämme	94
4.1.7	Nukleinsäuren, Oligonukleotide und Plasmide	97
4.1.8	Allgemeine Verbrauchsmaterialien	103
4.2	Mikrobiologische, genetische und zellbiologische Methoden	103
4.3	Mikroskopie und Bildverarbeitung	109
4.3.1	Chlorazol Black E-Färbung	110
4.3.2	WGA-AF488 / Propidium Iodid Färbung	110
4.4	Molekularbiologische Standardmethoden	110
4.4.1	Handhabung von DNA	110
4.4.2	Isolierung von Nukleinsäuren	113
4.4.3	Auftrennung und Nachweis von Nukleinsäuren	115
4.4.4	Proteinpräparation	118
4.5	PCR-Methoden	120
4.5.1	Standard-PCR-Ansätze	120
4.5.2	PCR-Generierung von Gen-Deletions-Konstrukten für <i>U. maydis</i>	122
4.5.3	PCR-Generierung von Fusionskonstrukten für <i>U. maydis</i>	123
4.5.4	DNase I-Behandlung und Reverse Transkription (für Real-time PCR)	123
4.5.5	Real-time PCR (RT PCR)	124

4.6	Biochemische Methoden	124
4.6.1	Co-Immunopräzipitation	124
4.6.2	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese von Proteinen.....	125
4.6.3	Nachweis von immobilisierten Proteinen - Western Blot (Towbin et al., 1979)	126
4.6.4	Chromatin-Isolation und Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP).....	127
4.7	Sequenzanalyse	130
4.7.1	Sequenzierung von Plasmid DNA.....	130
4.7.2	Sequenzierung und Analyse von Chromatin-Immunopräzipitierter DNA	130
4.7.3	Sequenzierung und Analyse von isolierter RNA	131
4.7.4	Sonstige Sequenz- und Strukturanalyse	132
5	Literaturverzeichnis	133
6	Appendix	147

I. Zusammenfassung

Der Übergang vom saprophytischen zum pathogenen Wachstum in dem pflanzenpathogenen Basidiomyceten *Ustilago maydis* wird über eine hierarchische Signalkaskade verschiedener Transkriptionsfaktoren gesteuert. Die Bildung des pathogenen Filaments wird über den heterodimeren Transkriptionsfaktor bE/bW induziert, der vom *b*-Paarungslocus kodiert wird. Allerdings werden nur wenige Gene direkt durch die Bindung des bE/bW-Heterodimers an den Promotor induziert. Die meisten pathogenitätsrelevanten Gene werden über die direkte Induktion des „Masterregulators“ Rbf1 reguliert. Die Expression von bE/bW und die daraus resultierende konsekutive Expression von Rbf1 induziert die Filamentbildung und löst eine Arretierung im G2-Zellzyklus aus. Das ebenfalls *b*-abhängig induzierte *clp1* Gen ist notwendig, um den Zellzyklus zu re-initiiieren und eine Proliferation in der Pflanze zu ermöglichen. Clp1 bindet sowohl an das bE/bW-Heterodimer als auch an Rbf1 und reprimiert dadurch die bE/bW- und Rbf1-abhängige Genexpression. Trotz einer starken bE/bW-abhängigen Induktion von *clp1* auf Transkript-Level zu Beginn der pathogenen Entwicklung, kann das Protein erst bei der Appressorienbildung nachgewiesen werden. Die Erhöhung des Protein-Levels von Clp1 korreliert mit dem Zeitpunkt der Re-Initiation des Zellzyklus während der Pflanzenpenetration.

Die Bindung und Interaktion des bE/bW-Komplexes in Kombination mit Clp1 an den *rbf1* und *clp1* Promotoren wurde mit Hilfe von ChIP-Seq und RNA-Seq Analysen, qRT-PCR, Immunpräzipitation und Hefe-2-Hybrid Experimenten genauer untersucht und der resultierende regulatorische Effekt auf die genomweite Genexpression nachvollzogen. Durch eine systematische Deletion/Mutationsanalyse von Clp1-Domänen konnten Proteinvarianten mit erhöhter Abundanz identifiziert werden. Von besonderem Interesse ist dabei das zentral im Clp1-Protein gelegene ABBA Motiv. Wie bei vielen anderen Zellzyklusregulatoren fungiert das ABBA Motiv im *S. cerevisiae* Protein Clb5 als Zielstelle für den durch Cdc20 vermittelten Abbau. In *U. maydis* führt die Mutation von ABBA zur erhöhten Abundanz des Clp1-Proteins, jedoch geht die von Clp1 vermittelte Repression von *clp1* und *rbf1* im Proteinkomplex mit bE/bW verloren. ChIP-Experimente in Kombination mit der RT-PCR-Analyse zeigen, dass das mutierte Clp1-Protein nicht mehr in der Lage ist in den Promotoren von *rbf1* oder *clp1* an das bE/bW-Heterodimer zu binden. Durch die fehlende Interaktion mit bE/bW kommt es zu keiner Clp1-vermittelten Repression des bE/bW-Komplexes und daraus resultierend, zu einem Block der pathogenen

Entwicklung direkt nach der Pflanzenpenetration. Ein vergleichbarer negativer Effekt auf Genregulation und Virulenz resultiert aus der gleichzeitigen Verkürzung der C-Termini der bE- und bW-Proteine, durch die die Interaktion von Clp1 mit dem bE/bW-Heterodimer verhindert wird. Mit Hilfe von Hefe-2-Hybrid-Assays und komplementären Co-Immünpräzipitationen in *U. maydis* konnte der Aufbau des bE/bW-Clp1-Proteinkomplexes präzisiert werden. Der hypothetische Aufbau zeigt das bE/bW-Heterodimer, das an die DNA bindet und über die C-terminalen Bereiche beider b-Proteine mit jeweils einem Clp1, das in einem Homodimerkomplex auftritt, interagiert. Für die Interaktion sowohl mit bE als auch mit bW ist in den Clp1-Proteinen das ABBA Motiv notwendig.

Der globale Effekt der Clp1-abhängigen Genregulation über bE/bW ist sehr spezifisch und schließt eine geringe Anzahl pathogenitätsrelevanter Gene ein. Die Interaktion von Clp1 mit dem bE/bW-Heterodimer hat keinen Einfluss auf die Bindung des Heterodimers an die DNA. Eine Bindung von Clp1 ohne das bE/bW-Heterodimer ist nach Auswertung der ChIP-Seq Analysen in einigen Promotoren nachweisbar. Clp1 scheint auch in anderen Proteinkomplexen, vermutlich zu späteren Zeitpunkten, während der Etablierung und Proliferation in der Pflanze mit bisher unbekanntem Faktoren an der differentiellen Genregulation beteiligt zu sein.

Die bisherigen Ergebnisse bringen neue Erkenntnisse über die Funktion und Relevanz des zentralen Entwicklungsregulators Clp1, vor allem in Kombination mit dem bE/bW-Heterodimer, weisen jedoch auch weitere Funktionsfelder mit anderen Faktoren und Regulationsmechanismen zu späteren Entwicklungszeitpunkten auf.

II. Summary

The switch from saprophytic to pathogenic growth in the plant pathogenic basidiomycete *Ustilago maydis* is controlled by a hierarchical signaling cascade consisting of various transcription factors. The pathogenic filament is induced via the bE/bW heterodimeric transcription factor encoded by the *b*-mating type locus. Only few genes are directly induced by binding of bE/bW in promoter regions, most genes are activated indirectly via the *b*-dependent induction of the “master regulator” Rbf1. Filament formation and the G2 cell cycle arrest that is linked to the onset of pathogenic development are induced by bE/bW and subsequently by the expression of Rbf1. The directly *b*-induced *clp1* gene is required to release the cell cycle arrest and to enable the proliferation in planta. Clp1 interacts both with the bE/bW-heterodimer and Rbf1, thereby repressing bE/bW- and Rbf1-dependent gene expression. Despite a strong bE/bW-dependent induction of *clp1* at transcript level at the beginning of pathogenic development, the protein can only be detected during appressoria formation. The occurrence of the Clp1-protein correlates with the time of re-initiation of the cell cycle during plant penetration.

By a combination of ChIP-Seq and RNA-Seq analysis, qRT-PCR, immunoprecipitation and yeast-2-hybrid experiments, the binding and interaction of the bE/bW complex with Clp1 at the *rbf1* and *clp1* promoters was investigated in detail and the resulting regulatory effect on genome-wide gene expression was determined. Via a systematic deletional/mutational analysis of Clp1 domains, protein variants with increased abundance were identified. Of particular interest is a so-called ABBA motif located centrally in the Clp1-protein. As in many other cell cycle regulators, the ABBA motif in the *S. cerevisiae* protein Clb5 functions as target site for Cdc20-mediated protein degradation. In *U. maydis* the mutation of ABBA leads to increased abundance of the Clp1-protein, but the repression of *clp1* and *rbf1*, mediated by Clp1 in the protein complex with bE/bW, is abolished. ChIP experiments in combination with RT-PCR analysis show that the mutated Clp1 protein is no longer able to bind to the bE/bW-heterodimer in the promoters of *rbf1* or *clp1*. Due to the lack of interaction with bE/bW, there is no Clp1-mediated repression, with resulting in a hindrance of pathogenic development immediately after plant penetration.

A comparable negative effect on gene regulation and virulence results from the simultaneous deletion of the C-termini of the bE- and bW-protein. By means of yeast-

2-hybrid assays and complementary co-immunoprecipitations in *U. maydis*, a more detailed view of the bE/bW-Clp1 protein complex could be obtained. Our model of the bE/bW-heterodimer implies that the C-terminal regions of both bE- and bW-proteins bind to a homodimeric complex of two Clp1-proteins. For interaction with both bE and bW the ABBA motif in Clp1 is required.

The global effect of Clp1-dependent gene regulation via bE/bW appears very specific and includes a small number of *b*-dependently regulated genes. The interaction of Clp1 with bE/bW has no effect on the binding of the heterodimeric complex to DNA. In addition, ChIP-Seq analyses show binding of Clp1 independently from the presence of bE/bW in some promoters. Clp1 appears to be involved in differential gene regulation with other, currently unknown factors, probably at later stages during establishment and proliferation in planta.

Our results show new insights into the function and relevance of the central development regulator Clp1 in combination with the bE/bW-heterodimer, but also show additional functions with transcriptional regulators thought to be involved in gene regulation at later stages of development.

1 Einleitung

Der Modellorganismus *Ustilago maydis*, ein phytopathogener Brandpilz (Begerow *et al.*, 2006) aus der Klasse der Heterobasidiomyceten, wurde 1754 erstmals als Erreger des Maisbeulenbrandes von Bonnet beschrieben (zusammengefasst in Christensen, 1963). Mit den anderen Vertretern der Ustilaginomycotina zählt *U. maydis* zu der am besten erforschten Gruppe der Pflanzenparasiten. Sein sehr spezifisches Wirtsspektrum umfasst lediglich die beiden Pflanzenarten Mais (*Zea mays*) und Teosinte (*Euchlena Mexicana*).

1.1 *Ustilago maydis* als Modellorganismus

Als Modellorganismus wurde *U. maydis* in den letzten Jahrzehnten vor allem zum Verständnis der Pilz-Pflanzen-Interaktion etabliert und hierbei genauer für die Untersuchung von polarem Wachstum, Mechanismen der Rekombination und der sexuellen Entwicklung verwendet (Bakkeren *et al.*, 2008; Brefort *et al.*, 2009; Holloman *et al.*, 2008; Kämper *et al.*, 2006; Steinberg und Perez-Martin, 2008a, 2008b). Darüber hinaus wird *U. maydis* inzwischen ebenfalls zur Erforschung des Zytoskeletts und intrazellulärem Transport in polaren Zellen eingesetzt (Matei und Doehlemann, 2016). Im Gegensatz zu seinen Verwandten *Ustilago hordei*, *U. niga*, *U. scitaminea*, *U. tritici*, *Sporisorium reilianium* und weiteren Rostpilzen, welche jährlich mehrere Milliarden Dollar Schaden verursachen, hat *U. maydis* als Schädling eine sehr geringe ökonomische Bedeutung (Dean *et al.*, 2012; Martinez-Espinoza *et al.*, 2002).



Abbildung 1: Infizierter Maiskolben mit charakteristischem Tumorgewebe. Die weißen Tumore sind mit schwarzen Teliosporen gefüllt (Bild aufgenommen in Böhl-Iggelheim, September 2017).

1.1.1 Lebenszyklus

Mit seinem dimorphen Lebenszyklus (Abb.2) und seinem haploiden, nicht pathogenen Stadium, in dem *U. maydis* problemlos in Form von Sporidien unter Laborbedingungen angezogen werden kann, ist er ein perfekter Modellorganismus. Ein vollständiger Lebenszyklus kann unter Laborbedingungen innerhalb von drei bis vier Wochen durchlaufen werden (Banuett, 1995). Die Veröffentlichung der Genomsequenzierung (20,5 Mb, Kämper et al., 2006) ist eine der wichtigsten Grundlagen für eine genetische Zugänglichkeit und Manipulation. Durch effiziente homologe Rekombination (Holliday, 1974) und Deletionen im Erbgut ist eine genetische Manipulation einfach durchzuführen. Das gezielte Deletieren von Genen (zusammengefasst in Kronstad et al., 1989) wird unterstützt von Antibiotikaresistenzen sowie von Auxotrophiemarkern als dominante Selektionsmarker (Gold et al., 1994; Keon et al., 1991; Kojic und Holloman, 2000).

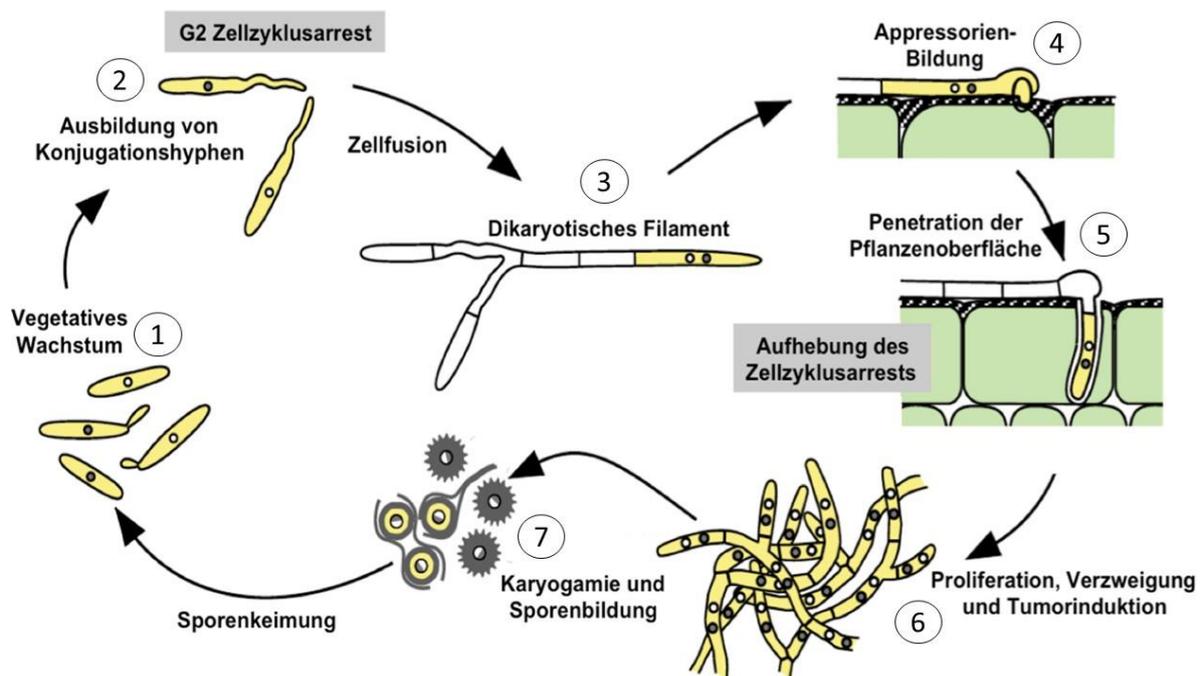


Abbildung 2: Dimorpher Lebenszyklus von *U. maydis*. Links, der saprophytische Teil des dimorphen Lebenszyklus, in dem sich die haploiden Sporidien durch hefeartige Teilung vermehren (1). Vermittelt durch das tetraploide Paarungstyp-Loci-System sind diese in der Lage zu fusionieren (2) und ein pathogenes Dikaryon zu bilden (3). Mit diesem Filament tritt der Pilz in die biotrophe Phase ein (rechts), in welcher die Hyphe mit Hilfe eines Appressorium (4), in die Pflanze eindringen kann ohne diese zu zerstören (5). Durch Proliferation in der Pflanze entstehen die charakteristischen Tumore an allen überirdischen Pflanzengewebe (6). Innerhalb des Tumorgewebes bilden sich Überdauerungsformen (7), die durch Aufplatzen der Tumore freigesetzt werden und den Lebenszyklus von vorne beginnen lassen (Modifiziert nach Kämper et al., 2006).

Der Lebenszyklus von *U. maydis* beginnt mit Sporidien, deren Fusion durch ein Pheromon-Rezeptor-System gesteuert wird, welches nur die Fusion von Zellen mit unterschiedlichen Allelen des *a*-Locus ermöglicht (1) (siehe Abbildung 2). Nach dieser Zell-Zell-Erkennung werden so genannte Konjugationshyphen ausgebildet (2) und ein Heterodikaryon geformt (3) (Bölker *et al.*, 1992; Schulz *et al.*, 1990; Snetselaar und Mims, 1992, 1993). Zeitgleich treten die Zellen in einen Zellzyklusarrest im G2-Stadium, wodurch *U. maydis* in der Lage ist Längenwachstum zu betreiben, aber keine Zellteilung durchzuführen (Garcia-Muse *et al.*, 2003; Sgarlata und Perez-Martin, 2005). Hierbei ist immer nur das apikale Kompartiment, abgeschnürt durch ein Septum, mit Zytoplasma gefüllt (Banuett und Herskowitz, 1994). Nach der Fusion der Zellen steht die weitere sexuelle Entwicklung unter der Kontrolle des zweiten Paarungstyp-Locus. Der multiallelische *b*-Locus kodiert für die Homeodomänenproteine bEast (bE) und bWest (bW) (Gillissen *et al.*, 1992). Für die Vollendung der pathogenen Entwicklung in *U. maydis* ist eine Expression kompatibler Allele dieser Proteine sowohl notwendig als auch ausreichend (Bölker *et al.*, 1995; Kämper *et al.*, 2006). Der andauernde Zellzyklusarrest wird erst zum Zeitpunkt der Pflanzenpenetration aufgehoben, ein bislang unbekanntes Pflanzensignal führt zu einem Anschwellen der Hyphenspitze und Bildung einer Appressorien-ähnlichen Struktur (4) (Brefort *et al.*, 2009; Snetselaar und Mims, 1992, 1993). Das Eindringen der Pilzhyphe wird durch lytische Enzyme ermöglicht, die an der Penetrationsstelle sekretiert werden (5) (Kahmann *et al.*, 2000). Die pflanzliche Plasmamembran umhüllt die eingedrungene intrazelluläre Pilzhyphe und ermöglicht damit eine spezifische biotrophe Interphase, also Interaktionszone zwischen Pilz und Pflanze (Brefort *et al.*, 2009). Die Proliferation durch den reaktivierten Zellzyklus findet anschließend vermehrt in nährstoffreichen Geweben der Pflanze statt (6). Verzweigung des Pilzmyzels und Zellkernverteilung durch spezifische Schnallenzellen sind die Folge (Banuett und Herskowitz, 1996; Scherer *et al.*, 2006). Hypertrophie pflanzlicher Zellen löst ein Anschwellen des Gewebes zu einem tumorartigen Gebilde aus, in denen die Differenzierung der diploiden Brandsporen stattfindet (7) (Banuett und Herskowitz, 1996; Snetselaar und Mims, 1993). Durch Aufplatzen der Tumore werden die Sporen, die als Überdauerungsformen im Boden überleben können, freigesetzt. Erst bei optimalen Bedingungen keimen die Sporen aus und bilden durch Meiose vier haploide Kerne, die in eine Probasidie einwandern. Aus dieser Probasidie werden neue Sporidien abgeschnürt und damit ein erneuter Lebenszyklus eingeleitet (Christensen, 1963).

1.2 Paarungstyp-Loci

Allgemein steuern Paarungstyp-Loci in Pilzen die sexuelle Reproduktion. Unterschieden wird zwischen homothallischen und heterothallischen Spezies. Bei heterothallischen Spezies müssen entgegengesetzte Paarungstypen in den verschmelzenden Geschlechtszellen vorliegen. Zusätzlich kann bei Basidiomyceten zwischen bi- und tetrapolaren Paarungssystemen, in heterothallischen Spezies differenziert werden (Hsueh und Heitman, 2008; Kothe, 1996; Nielsen und Heitman, 2007; Raudaskoski und Kothe). Die beiden Paarungstyp-Loci *a* und *b* in *U. maydis* regulieren und steuern die verschiedenen Stadien der sexuellen Entwicklung (zusammengefasst in Bölker, 2001; Feldbrügge *et al.*, 2004; Kahmann und Kämper, 2004; Kahmann *et al.*, 1996). Diese Kopplung der sexuellen und pathogenen Entwicklung stellt ein allgemeines Kennzeichen der Brandpilze dar (Bakkeren *et al.*, 2008).

Bei *U. maydis* handelt es sich um eine heterothallische Spezies mit einem tetraploiden System (Rowell, 1955). Der biallelische *a*-Locus steuert die Zell/Zell-Erkennung und Fusion der Sporidien über ein Pheromon/Rezeptor-System. Alle weiteren sexuellen und pathogenen Entwicklungen wie das filamentöse Wachstum oder die Sporenbildung werden dann über den multiallelischen *b*-Locus kontrolliert (zusammengefasst in Bölker, 2001).

1.2.1 Interzelluläre Erkennung durch den *a*-Locus

Der biallelische *a*-Locus trägt die Allele *a1* und *a2* (siehe Abbildung 3), welche für das Pheromon Mfa (*mating factor a*) und den Pheromonrezeptor Pra (*pheromon receptor a*) kodieren. Zunächst entstehen die Pheromon-Vorläuferpeptide Mfa1 und Mfa2, bestehend aus 40 bzw. 38 Aminosäuren. Nach ihrer posttranskriptionellen Modifikation entstehen daraus die beiden Pheromone (13 bzw. 9 Aminosäuren), welche am Carboxyterminus farnesyliert und methyliert vorliegen (Spellig *et al.*, 1994). Diese werden von den beiden kompatiblen 7-Transmembranrezeptoren Pra1 bzw. Pra2 perzipiert, die typischerweise an heterotrimere G-Proteine gekoppelt sind (Bölker *et al.*, 1992). Die Rezeptoren weisen in ihren 346 bzw. 357 Aminosäuren hohe Homologien zu Rezeptoren der STE3-Familie anderer Pilze auf (Bölker *et al.*, 1992). Mit diesen Allelen kontrolliert der *a*-Locus, das Pheromon/Rezeptor System, die Zell/Zell-Erkennung der Sporidien zu

Beginn des Lebenszyklus.

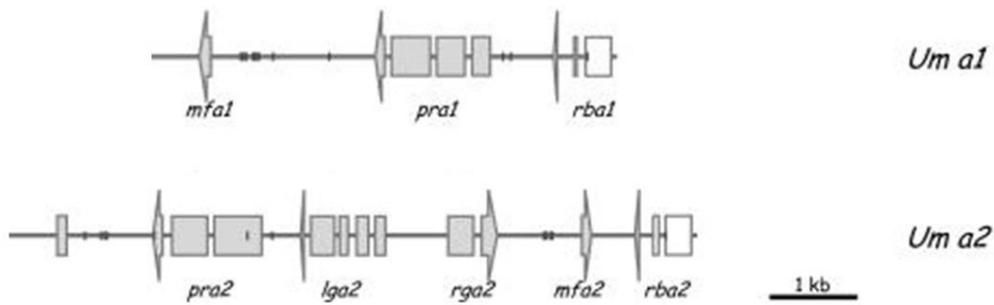


Abbildung 3: Schematische Darstellung des a1- und a2-Locus. Der Genlocus *a1* besteht aus dem Pheromon-Vorläuferprotein *mfa1* und dem Pheromonrezeptor *pra1*. Der *a2*-Locus kodiert für die *a1* kompatiblen Gene *mfa2* und *pra2*, wie auch für die Gene *lga2* und *rga2*, die für kleine mitochondriale Proteine kodieren (Modifiziert nach Schirawski *et al.*, 2005).

Außer den genannten Pheromon- und Rezeptorgen liegen die Gene *lga2* und *rga2* auf dem *a2*-Locus (Urban *et al.*, 1996). *Lga2* und *Rga2* sind für die uniparentale Vererbung der mitochondrialen DNA verantwortlich. Sie regulieren die Fusions- und Spaltungsprozesse der Mitochondrien im entstandenen Dikaryon (Bortfeld *et al.*, 2004; Fedler *et al.*, 2009).

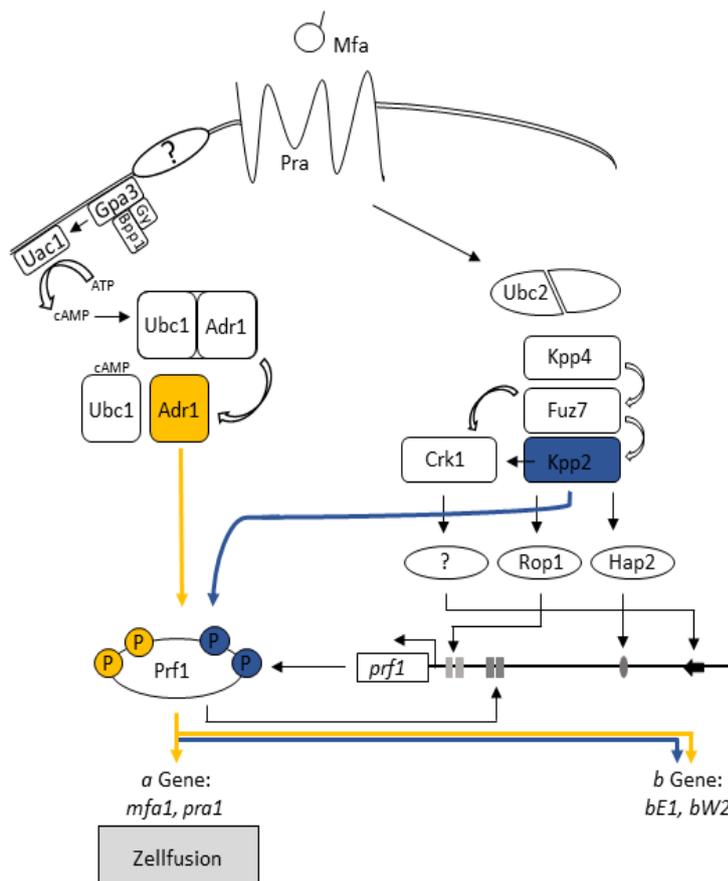


Abbildung 4: Schematische Darstellung der a-vermittelten Pheromonkaskade. Das Pheromon/Rezeptor-System mit Mfa und Pra, aktiviert über das Map-Kinase-System mit Ubc2, Kpp4, Fuz7 und Kpp2, sowie Crk1 den zentralen Transkriptionsfaktor Prf1. Die Kpp2 gesteuerten Proteine Rop1 und Hap2, sowie ein unbekannter Faktor, aktiviert durch Crk1 und Prf1 selbst, binden an den *prf1* Promotor und steuern so dessen Expression. Das durch Phosphorylierung aktivierte Prf1 beeinflusst direkt die Zellfusion der Sporidien, die Bildung des bE/bW-Heterodimer und damit die Aktivierung der b-Regulationskaskade. Dabei ist die Phosphorylierung über die Protein-Kinase-Kaskade (gelb), aktiviert durch äußere Signale, sowohl für die a- als auch für die b-Gene notwendig. Das Signal wird von einem heterotrimeren G-Protein, über die Adenylatzyklase Uac1, an die inhibitorische und katalytische Untereinheit der Proteinkinase weitergegeben. Eine Phosphorylierung durch die Map Kinase Kpp2 hingegen ist nur für die b-Gene wichtig (blau) (Modifiziert nach (Brefort *et al.*, 2009)).

Zu Beginn der *a*-Regulationskaskade fusionieren zwei kompatible, haploide Sporidien. Vermittelt durch das Pheromon/Rezeptor-System treten beide Sporidien vor der Fusion in einen G2-Zellzyklusarrest ein und bilden darauf Konjugationshyphen aus um an den Spitzen zu fusionieren (Garcia-Muse *et al.*, 2003; Snetselaar *et al.*, 1996; Spellig *et al.*, 1994).

Durch Bindung des Pheromons Mfa an den Rezeptor Pra wird die Mitogen-aktivierte Protein-Kinase-Kaskade (MAPK-Kaskade) des Pheromon-Signalwegs aktiviert. Über externe Signale wird der Weg über die cAMP-abhängige Protein Kinase A (PKA) Adr1 angesprochen und über beide Wege der Transkriptionsfaktor Prf1 beeinflusst (*pheromon response factor 1*) (Kaffarnik *et al.*, 2003; Urban *et al.*, 1996) (siehe Abbildung 4). Die Transkription von *prf1* ist abhängig von einem Zusammenspiel von mindestens vier Transkriptionsfaktoren, welche von den beiden MAPKs Kpp2 und Crk1 kontrolliert werden (Brefort *et al.*, 2009). Die Faktoren Rob1, Hap2, ein bislang unbekannter Faktor induziert durch Crk1, sowie Prf1 selbst binden an getrennten Elementen im *prf1* Promotor und beeinflussen damit die Expression des Gens (Brefort *et al.*, 2009). Abhängig von seinem Phosphorylierungsstatus reguliert Prf1 die Expression von verschiedenen Zielgenen (Kaffarnik *et al.*, 2003; Zarnack *et al.*, 2008). Für die Induktion der *a*-, sowie der *b*-abhängigen Gene ist die Phosphorylierung durch Adr1, gesteuert durch äußere Signale wie Umweltfaktoren, notwendig. Wohingegen die Phosphorylierung durch Kpp2, gesteuert durch die Weiterleitung des Pheromon-Rezeptor Signals über die MAPK-Kaskade nur für die Induktion der *b*-Gene wichtig ist (Kaffarnik *et al.*, 2003). Prf1 spielt in beiden Entwicklungsstadien von *U. maydis* durch die Regulation der *a*-Locus Gene *mfa1* und *pra1* bei der apathogenen Lebensweise, sowie bei der pathogenen Entwicklung durch die Regulation der *b*-Locus Gene bE und bW und dem folgenden C2H2-Zinkfinger Transkriptionsfaktors Rbf1 eine entscheidende Rolle (Hartmann *et al.*, 1996; Heimel *et al.*, 2010b; Urban *et al.*, 1996; Zarnack *et al.*, 2008). Weitere Faktoren der Pheromonkaskade schlagen einen Bogen zur pathogenen Entwicklung und lassen eine weitere Rolle während dieser vermuten. So weist das mögliche Adaptorprotein Ubc2 eine wichtige N-terminale Domäne auf, die notwendig für die Hyphenfusion, sowie einen basidimyceten-spezifischen C-Terminus, welcher für die pathogene Entwicklung essentiell ist, allerdings für die Fusion keine Relevanz hat (Brefort *et al.*, 2009). Die beiden beschriebenen Domänen in Ubc2 könnten unterschiedliche MAPK-Signal Komplexe steuern, welche sich während der Zellfusion und der pathogenen Entwicklung unterscheiden (Brefort *et al.*,

2009) Diese Ergebnisse lassen auf eine Verknüpfung des Pheromon-Signalweges, des filamentösen Wachstums und der pathogenen Entwicklung über *prf1* (Hartmann *et al.*, 1996) und weitere Faktoren der α -Signalkaskade, schließen. Prf1 hat eine wichtige Funktion im „cross-talk“ zwischen der α - und β -abhängigen Signalkaskade (Feldbrügge *et al.*, 2004).

1.2.2 Pathogene Entwicklung durch den *b*-Locus

Der multiallelische *b*-Locus koordiniert die pathogene und infektiöse Phase in *U. maydis* (Bölker *et al.*, 1995). Der zweite Paarungstyp-Locus steuert die Ausbildung eines stabilen Dikaryons, das filamentöse Wachstum auf der Pflanzenoberfläche, wie auch die Proliferation in der Pflanze (Gillissen *et al.*, 1992; Kämper *et al.*, 1995; Wahl *et al.*, 2010). Der notwendige Transkriptionsfaktor in Form des Heterodimers aus den beiden Proteinen bE und bW wird im *b*-Locus von einer gemeinsamen Promotorregion der *bE*- und *bW*-Gene divergent transkribiert (Gillissen *et al.*, 1992). Nur kompatible Heterodimere von unterschiedlichen Allelen können alle weiteren pathogenen Entwicklungsschritte einleiten (Kämper *et al.*, 1995). Der *b*-Locus liegt hierfür in *U. maydis* in mindestens 19 verschiedenen Allelen vor.

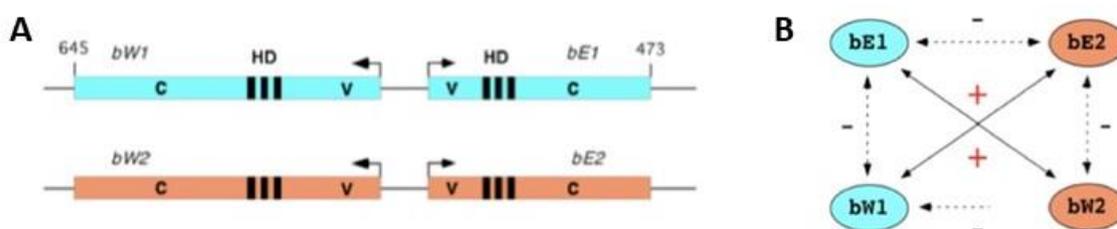


Abbildung 5: Schematische Darstellung des *b*-Locus. In A sind die divergent transkribierten Gene *bE* und *bW* unter einem gemeinsamen Promotor dargestellt. In B ist die mögliche Interaktion der *b*-Proteine dargestellt. Das Heterodimer kann nur bei unterschiedlichen Allelen im *b*-Locus entstehen. (Modifiziert nach (Brachmann, 2001a; Brachmann, 2001b)).

Die beiden Proteine bE und bW weisen einen hochkonservierten C-terminalen Bereich auf, welcher auf Grund der vorhandenen Homeodomänen für die DNA-Bindung verantwortlich ist. Der variable N-terminale Bereich hingegen ist für die Interaktion der beiden Domänen verantwortlich (Kämper *et al.*, 2006) und sichert damit die Selbst-/Nichtselbsterkennung (Kronstad und Leong, 1990; Schulz *et al.*, 1990). Der gebildete

heterodimere Transkriptionsfaktor bE/bW bindet an sequenzspezifische DNA, sogenannte *b*-Bindestellen (*bbs*, *b-binding site*) und aktiviert Zielgene für alle weiteren pathogenen Entwicklungsschritte (Brachmann, 2001a; Heimel *et al.*, 2010b; Romeis *et al.*, 2000). Bei Selbsterkennung wird der Lebenszyklus des entstandenen Dikaryons nicht vollendet. Durch dieses streng gesteuerte Paarungssystem sind genetisch inkompatible Sporen nicht kreuzungsfähig, wodurch die genetische Diversität aufrechterhalten wird.

1.3 Die *b*-abhängige Regulation

Der Übergang von saprophytischer zu biotropher Lebensweise wird durch das entstehende kompatible *b*-Heterodimer gewährleistet. Der G2-Zellzyklusarrest, verstärktes Spitzenwachstum und leere Zellkompartimente durch Septierung sind morphologische Erscheinungen von *b*-induziertem Wachstum in *U. maydis*. Die Anwendung der Microarray-Technologie ermöglichte die genomweite Untersuchung der *b*-vermittelten Genregulation. Insgesamt konnten 345 *b*-regulierte Gene identifiziert werden. Das *b*-Heterodimer bindet genomweit in Promotorregionen an sogenannten *b*-Bindestellen (Brachmann, 2001a; Romeis *et al.*, 2000). Alle Gene, in denen *b*-direkt am Promotor bindet und alleine ausreicht um diese zu regulieren, zählen zur Gruppe der Klasse 1 Gene (Heimel *et al.*, 2010b). Klasse 2 Gene hingegen enthalten keine *bbs* im Promotorbereich und werden damit nicht direkt durch eine Bindung des Heterodimers aktiviert. Diese Erkenntnisse lassen auf eine transkriptionelle, *b*-Heterodimer induzierte Signalkaskade schließen (siehe Abbildung 6).

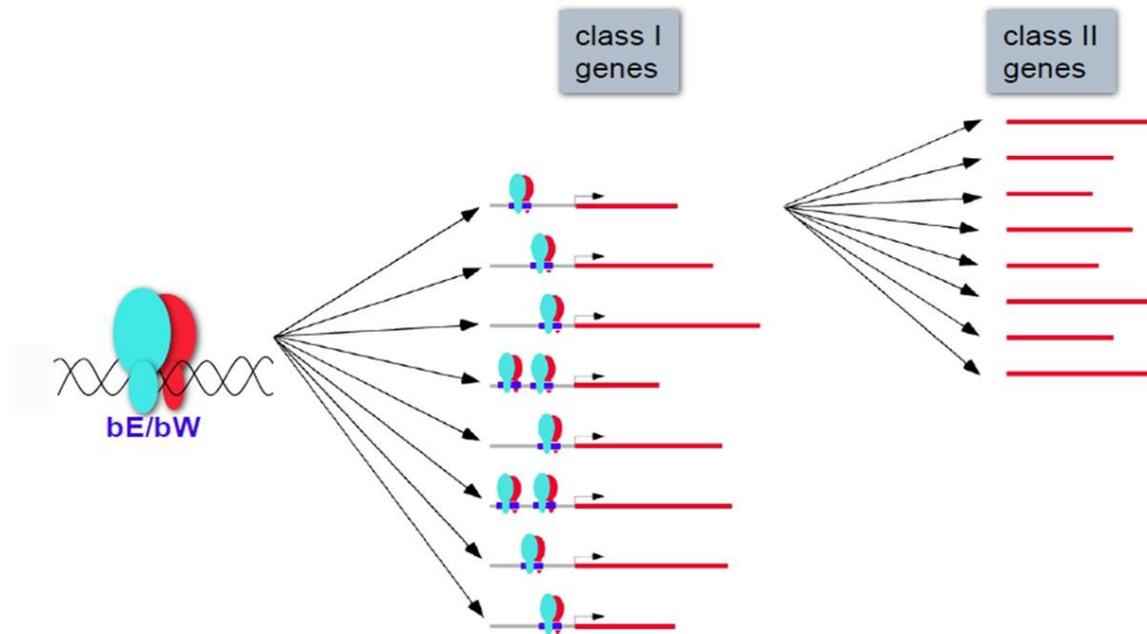


Abbildung 6: Schematische Darstellung der b-induzierten Regulationskaskade. Das funktionelle b-Heterodimer bindet über die Homöodomänen direkt in der Promotorregion von Klasse I Genen an *bbs*, induziert deren Transkription und startet so eine Regulationskaskade. Gene der Klasse II besitzen keine *bbs* im Promotor und werden daher nur indirekt durch das b-Heterodimer reguliert (Kahmann und Kämper, 2004).

Die ersten *bbs* wurden in den Promotoren von *Iga2* (Romeis *et al.*, 2000), von *frb52* (Brachmann, 2001a), sowie *clp1* (*clampless 1*, UMAG_02438 (Scherer *et al.*, 2006)), welches für die Ausbildung von Schnallenzellen und Proliferation in der Pflanze verantwortlich ist (Scherer *et al.*, 2006), identifiziert. Anhand von Microarraydaten konnte neben *clp1* ein weiteres direkt reguliertes pathogen-relevantes Gen *rbf1* (Regulator of *b*-filament 1, UMAG_03172 (Heimel *et al.*, 2010)) identifiziert werden. Über 90% der *b*-abhängig regulierten Gene werden nur indirekt über *b*-gesteuert, durch den direkt *b*-regulierten C2H2-Zinkfinger-Transkriptionsfaktor Rbf1. Unter diesen Genen der Klasse 2 konnten ebenfalls Gene mit hoher Relevanz für die pathogene Entwicklung identifiziert werden. Die Gene *biz1* (UMAG_02549 (Flor-Parra *et al.*, 2006)), *hdp1* (UMAG_12024 (Pothiratana, 2007)) und *hdp2* sind an der Regulation der biotrophen Interaktion beteiligt und damit essentiell für die pathogene Entwicklung (Scherer *et al.*, 2006). Ebenso konnte gezeigt werden, dass pflanzliche Oberflächensignale *b*-induzierte Gene durch die Induktion des bE/bW-Heterodimers beeinflussen. So werden 145, der 206 *b*-abhängig induzierten Gene sowie 78 der 139 *b*-abhängig reprimierten Gene auf der Pflanzenoberfläche in Anwesenheit von *b*-aktiviert bzw. reprimiert (Lanver *et al.*, 2014). Die Hälfte aller differentiell regulierten

Transkriptionsfaktoren in *U. maydis* (28 von 55) werden während des filamentösen Wachstums und der Appressorienbildung aktiviert (Lanver *et al.*, 2014). So auch der C2H2-Transkriptionsfaktor Biz1 (*b-induced zinc finger*), durch den der G2-Zellzyklusarrest nach Bildung des Heterokaryons einleitet wird. Vorangegangene Arbeiten zeigen einen Einfluss auf das mitotische Zyklin Clb1, sowie den Zellzyklusarrest als direkte Konsequenz auf die Repression von *clb1* (Flor-Parra *et al.*, 2006). (siehe Abbildung 7). Das Gen *pcl12* ist ein weiteres in der Literatur beschriebene Gen, dessen Regulation Einfluss auf den G2 Zellzyklusarrest hat. Das Zyklin Pcl12 interagiert mit der Zyklin-abhängigen Kinase Cdk5 mit regulatorischer Funktion während der morphologischen Entwicklung (Castillo-Lluva *et al.*, 2007). Die Expression von *plc12* wird sowohl über den *a*-Locus als auch über den *b*-Locus gesteuert, weist jedoch keine bekannten Bindestellen für *b*-oder Prf1 auf. Vermutet wird ein indirekter Effekt dieser Faktoren, aber eine direkte Regulation von bisher unbekannt Transkriptionsfaktoren der MAPK-Kaskade sowie der *b*-Kaskade (Flor-Parra *et al.*, 2007). Der Homeodomänen-Transkriptionsfaktor Hdp2 beeinflusst die Appressorienbildung, während das filamentöse Wachstum durch die Deletion von *hpd2* nicht beeinflusst wird. Biz1 und Hdp1 sind von großer Bedeutung für die Appressorienbildung und werden durch die beiden Proteine Sho1 und Msb2, mitgesteuert. Die Proteine sind in die Perzeption der hydrophoben Pflanzenoberfläche involviert und fließen nach der Bildung des *bE/bW* Heterodimers in die *b*-Regulationskaskade ein, um die Appressorienbildung zu gewährleisten (Lanver *et al.*, 2014). Desweiteren wird die Expression der MAPK Kpp6 von Rbf1 sowie Sho1 und Msk2 reguliert und steuert durch die positive Rückkopplung auf die MAPK-Kaskade die effektive Penetration der Pflanzenoberfläche (Brachmann *et al.*, 2003; Lanver *et al.*, 2014). Die Rolle der *b*-vermittelten Regulationskaskade wird durch den komplexen Aufbau, das Zusammenspiel von zahlreichen essentiellen Faktoren und den eingebauten Rückkopplungen deutlich. Das perfekte Zusammenspiel und die Rückversicherungen für essentielle Gene zeigt die hohe Relevanz für die Pflanzenpenetration und die folgende pathogene Entwicklung.

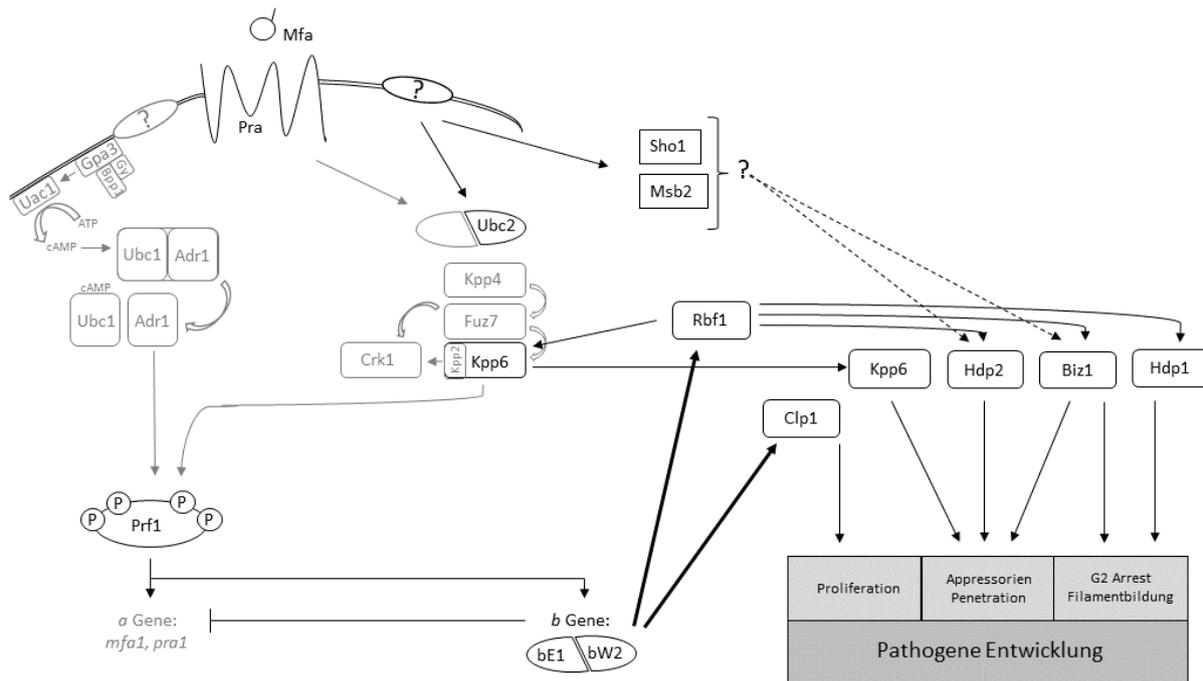


Abbildung 7: Schematische Darstellung der b-abhängigen Signalkaskade. Die b-Regulationskaskade setzt nach der Fusion von Sporidien ein und steuert über das bE/bW-Heterodimer die sexuelle und pathogene Entwicklung. Alle ausgeblendeten Proteine der vorangegangenen a-Kaskade haben keinen Einfluss auf die folgende b-Regulationskaskade. Nur einzelne schwarz dargestellte Proteine in der a-Kaskade greifen in die weitere Regulation ein. Das Heterodimer reguliert direkt Clp1 und Rbf1. Die Gene *hdp1* sowie *biz1* werden Rbf1-abhängig exprimiert, etablieren die Bildung des Filaments und regeln den hier einsetzenden Zellzyklusarrest. Außerdem induziert Rbf1 die Gene *hdp2*, sowie *kpp6*, welche die Appressorienbildung und damit die Penetration der Pflanze, zusammen mit *biz1*, beeinflussen. Die Proteine Sho1 und Msb2 sind in die Perzeption der hydrophoben Pflanzenoberfläche involviert und haben ebenfalls einen noch nicht genau verstandenen Einfluss auf die Expression der Gene *hdp2* und *biz1*, sicher damit jedoch die Appressorienbildung. Das einzige direkt b-induzierte Protein am Ende der Kaskade, Clp1 nimmt Einfluss auf die Proliferation in der Pflanze (Modifiziert nach (Brefort *et al.*, 2009)).

1.3.1 bE/bW Heterodimer als Schaltstelle der pathogenen Entwicklung

Das bE/bW Heterodimer, bestehend aus zwei unterschiedlichen Homeodomänenproteinen, welche im N-terminalen Bereich interagieren, ist durch Induktion von 345 Genen der zentrale Regulator der sexuellen und pathogenen Entwicklung. Um die Funktion der beiden interagierenden Proteine unabhängig von der Heterodimerisierung untersuchen zu können, wurde ein Fusionsprotein erstellt, welches beide Proteine mit einem flexiblen Linker verbindet und die biologische Funktion des b-Heterodimers aufweist (Romeis *et al.*, 1997). Dieses Fusionsprotein wurde für weitere Deletionsstudien verwendet um die für die Funktion notwendigen Regionen innerhalb-des Komplexes besser eingrenzen zu können.

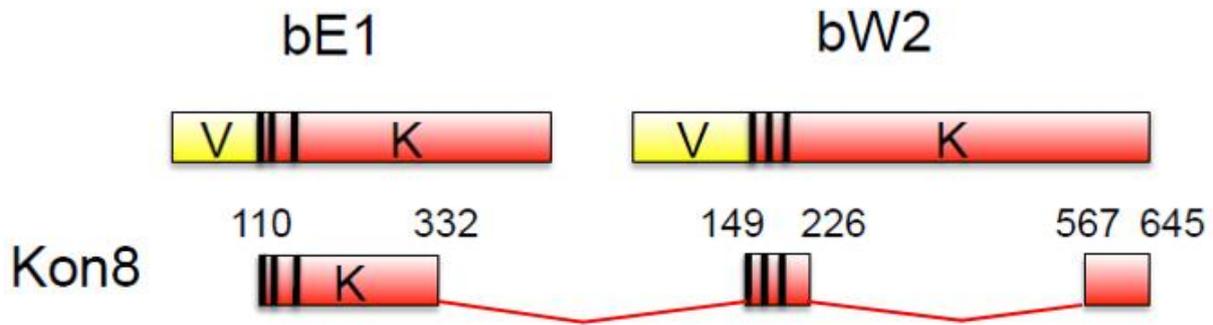


Abbildung 8: Schematische Darstellung des Kon8-Proteins. V: Variabler Bereich, K: konstanter Bereich, |||: Homöodomäne. Das Kon8-Protein besteht aus den beiden DNA bindenden Homöodomänen, jeweils einem kurzen Teil des konstanten Bereichs von bE1 und bW2 und dessen C-terminalem Ende. (Modifiziert nach Heimel, 2010)

Das Deletionskonstrukt Kon8 beinhaltet sowohl für bE als auch bW Bereiche, die für die Funktion unbedingt notwendig sind. Kon8 besteht aus gerade einmal 407 der 997 Aminosäuren des Vollängen-Fusionsproteins und kann alle *b*-abhängigen Funktionen übernehmen (Grandel *et al.*, 2000). Die variablen Elemente der beiden *b*-Proteine sind nicht notwendig für die biologische Funktion des Heterodimers. Eine Verkürzung des bE1-Proteins in *U. maydis*, identisch mit dem in Kon8 deletierten konstanten Bereich des bE1-Proteins, hat keinen Einfluss auf die *b*-abhängige Funktion in einem kompatiblen bE/bW-Heterodimer (Schulz *et al.*, 1990). Ebenso zeigt die Deletion des C-terminalen Endes von bW2 ab-Aminosäure 546 in *U. maydis*, entsprechend dem bW2 Fragment in Kon8, in einem kompatiblen Heterodimer keine Effekte auf die *b*-Funktion (Kämper *et al.*, 1995). Dagegen führt eine weitere Deletion in Kon8 des dem C-terminalen Endes des bW2-Proteins entsprechenden Fragmentes zu einem kompletten Funktionsverlust des Kon8-Proteins (Grandel *et al.*, 2000). Das in Kon8 vorhandene C-terminale Fragment des bW2-Proteins weist eine mögliche transkriptionelle Transaktivator-domäne auf (Mitchell und Tijan, 1989) und ist essentiell für die *b*-vermittelte Funktion des Kon8-Fusionsproteins. Darüber hinaus konnte das C-terminale Ende von bW2 ab-AS 339 in einem Hefe-2-Hybrid Screen als Interaktionspartner des pathogenitäts-relevanten Proteins Clp1 identifiziert werden (Heimel *et al.*, 2010b).

1.3.2 Rbf1 als Masterregulator der *b*-Regulationskaskade

Rbf1 besteht aus 404 Aminosäuren, einer N-terminalen Zinkfingerdomäne und einer C-terminalen glutaminreichen Sequenz. Eine putative Kernlokalisationssequenz in der Zinkfingerdomäne wurde experimentell bestätigt (Heimel *et al.*, 2010). Eine Deletion von *rbf1* führt zu einer fortlaufenden hefeartigen Teilung der Sporidien statt zu polarem Hyphenwachstum, damit einhergehend zum Verlust der Tumorbildung *in planta* (Heimel *et al.*, 2010). Außerdem konnte gezeigt werden, dass *rbf1* notwendig für filamentöses Wachstum sowie den *b*-abhängigen Zellzyklusarrest ist (Heimel *et al.*, 2010). Das Gen *rbf1* selbst zählt zu den Genen der Klasse 1, welche direkt durch Bindung des gebildeten Heterodimers induziert werden. Mittels qChIP Analyse (quantitative Chromatin-Immunopräzipitation) konnte eine Bindung von bE an dem *bbs*-Motiv-1377, einem von drei *bbs*-ähnlichen Motiven im *rbf1* Promotor, bestätigt werden (Heimel *et al.*, 2010). Die Notwendigkeit der *bbs* für die *rbf1*-Funktion und die *in vivo* Bindung des bE/bW-Heterodimers an das Motiv, spricht für eine direkte *b*-Regulation von *rbf1* (Heimel *et al.*, 2010). Fortlaufend aktiviert der Masterregulator Rbf1 Gene der Klasse 2 (siehe Abbildung 6), kontrolliert und reguliert damit 90 % der *b*-abhängigen Gene auf transkriptioneller Ebene und stellt damit den wichtigsten Transkriptionsfaktor für die *b*-Regulationskaskade dar. Zusammengefasst kann Rbf1 eindeutig als zentraler Regulator neben *b*-in der pathogenen Entwicklung von *U. maydis* angesehen werden.

1.4 Das Clp1-Protein bei der Pflanzenpenetration

Das *clp1* Gen stellt neben *rbf1* eines der wenigen direkt *b*-induzierten (*b-only*) Gene dar, welches durch die Bindung des bE/bW-Heterodimers am Promotor induziert wird (Heimel *et al.*, 2010b). Beide *bbs* im *clp1* Promotor konnten sowohl bioinformatisch als auch mittels quantitativer ChIP bestätigt werden (Scherer *et al.*, 2006; Schuler, 2010). Die Expression des *clp1* Gens ist bereits ca. zwei Stunden nach der Induktion des *b*-Heterodimers und damit während der gesamten pathogenen Entwicklung nachweisbar. Der Phänotyp eines *clp1*-Deletionsstammes unterscheidet sich außerhalb-der Pflanze nur minimal vom Wildtyp. Weder das Kreuzungsverhalten, noch das filamentöse Wachstum oder die Appressorienbildung auf der Pflanze sind in Deletionsstämmen beeinflusst. Erst nach der Penetration der Pflanze, zeigen *clp1*-

Deletionsstämme Defizite in der Schnallenzellbildung und damit in der Proliferation der Hyphen *in planta* (siehe Abbildung 9).

Die Annahme einer posttranskriptionellen Regulation von Clp1 konnte mittels eines Clp1:3eGFP-Fusionsproteins bestätigt werden. In frühen Entwicklungsstadien konnte kein Signal detektiert werden, wohingegen Hyphen nach erfolgreicher Penetration der Pflanzenoberfläche stetig ein Zellkernsignal aufwiesen (Scherer *et al.*, 2006). Die Expression des b-Heterodimers ist Voraussetzung einer biotrophen Entwicklung und führt zu einem G2-Zellzyklusarrest (Wahl *et al.*, 2010). Die Clp1 Stabilisierung findet zeitgleich mit der Re-Initiation des Zellzyklus statt, wodurch Clp1 seine postulierten Funktionen erfüllen kann (Scherer *et al.*, 2006).

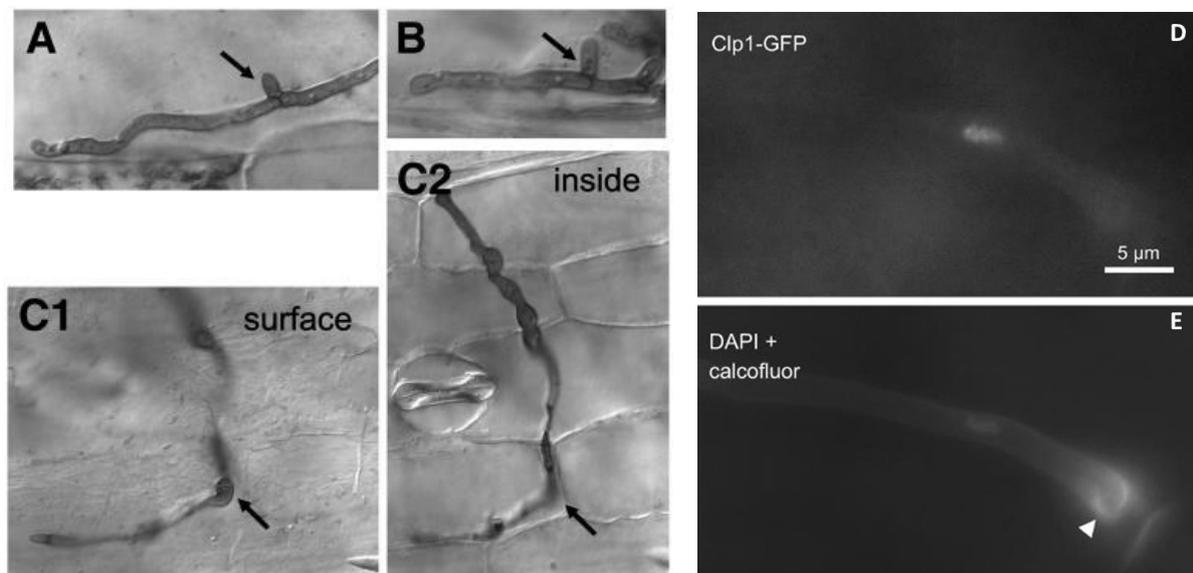


Abbildung 9: Einfluss von Clp1 auf die pathogene Entwicklung während der Pflanzenpenetration. Links: A, B zeigen einen solopathogenen WT-Stamm nach der Penetration der Pflanze. Der schwarze Pfeil zeigt auf eine in der Pflanze gebildete Schnallenzelle. **C1, C2** zeigen einen Clp1 Deletionsstamm während der Penetration. Die schwarzen Pfeile weisen in der Aufnahme auf der Pflanze (**C1**) und in der Pflanze (**C2**) auf dasselbe Appressorium. Der Clp1 Deletionsstamm ist jedoch nicht mehr in der Lage *in planta* zu proliferieren oder Schnallenzellen zu bilden. **Rechts:** Gezeigt ist die Lokalisation eines Clp1:GFP-Fusionskonstruktes (**D**) im Zellkern einer Hyphe während der Appressorienbildung. Die Zellkerne wurden mittels 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) und die Hyphe mit gebildetem Appressorium mit Calcofluor gefärbt (weißer Pfeil, **E**). (Modifiziert nach (Scherer *et al.*, 2006))

1.4.1 Clp1 als Interaktionspartner wichtiger pathogener Faktoren

In einem Screen zu Interaktionspartnern von Clp1 wurden mittels Hefe-2-Hybrid, Co-IP und biomolekularer Fluoreszenzkomplementation (BiFC) die drei Proteine bW, Rbf1 und Cib1 (*Clp1 interacting b-zip transcription factor*) identifiziert (Heimel *et al.*, 2010b). Die Interaktion mit den beiden Transkriptionsfaktoren bW (Bestandteil des b-Heterodimers) und Rbf1 vermittelt einen Einfluss auf transkriptioneller Ebene.

Während die Interaktion von Clp1 mit Rbf1 im Wesentlichen zur Repression von gerade einmal drei Genen führt, *mfa1*, *pra1* und *um03568* (Faist, 2017), beeinflusst die Interaktion von Clp1 mit bW ca. 95% aller b-regulierten Gene (Heimel *et al.*, 2010a). Der reprimierende Effekt auf die Pheromongene *mfa1* und *pra1* schreibt Rbf1 in der Interaktion mit Clp1 eine weitere Funktion als Repressor zu (Heimel *et al.*, 2010b). Clp1 alleine hat keinen Effekt auf *mfa1* oder *pra1* (Heimel *et al.*, 2010b).

Die wichtigste Interaktion von Clp1 stellt die Bildung des bE/bW-Clp1-Proteinkomplexes dar. Der Komplex ist dringend notwendig um die pathogene Entwicklung weiter voranzubringen. Das bE/bW-Heterodimer steuert die Ausbildung eines stabilen Dikaryons und das filamentöse Wachstum auf der Pflanzenoberfläche sowie den Eintritt in den G2 Zellzyklusarrest (Gillissen *et al.*, 1992; Kämper *et al.*, 1995). Erst zum Zeitpunkt der Appressorienbildung ist ein stabiles Clp1-Protein detektierbar (Scherer *et al.*, 2006), was die Vermutung nahe legt, dass zu diesem Zeitpunkt der Proteinkomplex aus bE/bW und Clp1 gebildet werden kann. Dieser Komplex hat eine negative Auswirkung auf *b*-abhängig regulierte Gene, blockiert damit alle *b*-abhängigen Funktionen wie das filamentöse Wachstum und den G2 Zellzyklus Arrest (Heimel *et al.*, 2010b). Dieser Effekt ist jedoch nicht direkt *b*-abhängig. Durch den bE/bW-Clp1-Proteinkomplex wird das Gen des Masterregulators Rbf1 als Klasse 1 Gen gedrückt und ist damit der ausschlaggebende Faktor für den resultierenden Verlust der *b*-Funktionen. Denn die Induktion von Rbf1 alleine reicht aus um filamentöses Wachstum, den G2 Zellzyklusarrest sowie die Appressorienbildung einzuleiten (Heimel *et al.*, 2010a). Eine *clp1* Deletion führt zu apathogenen Stämmen, die nach der Appressorienbildung *in planta* nicht mehr proliferieren und damit einhergehend keine notwendigen Schnallenzellen bilden können (Scherer *et al.*, 2006). Daraus lässt sich eine reprimierende Funktion des Proteinkomplexes auf die *b*-abhängige Regulationskaskade, hauptsächlich durch die Repression des Rbf1 Regulators, ableiten, die eine Auswirkung auf die Re-Initiation des Zellzyklus nach Pflanzenpenetration und damit auf die Proliferation in der Pflanze hat. Das durch den Proteinkomplex gedrückte *rbf1* Gen bleibt nach der Pflanzenpenetration weiterhin inaktiv. Eine Expression von Rbf1 *in planta* führt zu einer Blockade in der Zellkernverteilung durch den weiterhin aktiven Zellzyklusarrest (Heimel *et al.*, 2010b). Hingegen konnte mit einer temperatursensitiven *b*-Mutante gezeigt werden, dass das Heterodimer nicht nur die Pathogenität initiiert, sondern auch durch Regulation von sekretierten Proteinen nach Penetration die Pilzvirulenz

beeinflusst und damit die Proliferation *in planta* und die Reproduktion sicherstellt (Wahl *et al.*, 2010). Damit kann ein Regulationszyklus skizziert werden, der eine direkte Aktivierung von *clp1* und *rbf1* über *b*-aufzeigt, um auf der Pflanze alle pathogenitätsrelevanten Funktionen durch *b*-und Rbf1 zu steuern. Durch die verzögerte Stabilisierung von Clp1 kommt es erst zum Zeitpunkt der Pflanzenpenetration zur Bildung des *bE/bW*-Clp1-Proteinkomplexes und damit zur Repression von fast allen direkt *b*-regulierten Genen. Dringend notwendig ist die Repression von *rbf1* für die Re-Initiation des Zellzyklus und die folgende Proliferation in der Pflanze. Die weitere Expression des *b*-Locus und das direkt regulierte *clp1* in der Pflanze ist durch RNA-Seq Daten bestätigt (Lanver *et al.*, 2018), wohingegen die Expression von *rbf1* als vorab-*b*-reguliertes Gen nicht wieder hergestellt wird.

Die beiden Proteine Cib1 und Clp1 weisen nicht nur eine Interaktion auf, sondern auch einen vergleichbaren Deletionsphänotyp in *U. maydis*. Beide Phänotypen zeigen keinen Effekt auf das Wachstum in axenischen Kulturen sowie das filamentöse Wachstum oder die Paarung zweier Sporidien. Die Appressorienbildung und Penetration der Pflanze sind ebenfalls nicht betroffen, hingegen ist die weitere Proliferation in der Pflanze gestört sowie die Bildung von notwendigen Schnallenzellen (Heimel *et al.*, 2010b). Vorangegangene Arbeiten zeigen eine UPR-abhängige (*unfolded protein response*) Stabilisierung von Clp1, unter anderem aufgrund der physischen Interaktion mit dem UPR Regulator Cib1 (Heimel *et al.*, 2013). Da die Interaktion für die pathogene Entwicklung jedoch nicht essentiell ist, muss ein weiterer Mechanismus die Clp1 Stabilisierung beeinflussen. Eine pflanzenspezifische UPR Aktivierung scheint damit die Clp1-Akkumulation mit zu beeinflussen und daraus resultierend die Proliferation in der Pflanze (Heimel *et al.*, 2013).

Nachgewiesen zeigt Clp1 eine 2- bis 6-fach stärkere Bindung zu *bW* oder Cib1 verglichen mit der Bindung zu Rbf1 (Heimel *et al.*, 2010b). Da Clp1 keine konservierten Domänen enthält, ist bisher kein Mechanismus der Interaktion sowie der Repression bekannt. Eine direkte Bindung von Clp1 an die DNA ist auszuschließen (Faist, 2017). Mögliche Mechanismen sind: Die Erkennung von Bindestellen mit unterschiedlich hohen Affinitäten durch die Bindung von Clp1 an Transkriptionsfaktoren (Siggers und Gordân, 2014), die Konformationsänderungen der Transkriptionsfaktoren, die zu veränderter Bindeaffinität führen, die Bindung eines weiteren noch unbekanntem Faktors sowie ein indirekter Einfluss von Clp1. Eine Funktion als Ko-Faktor für *b*-und

Rbf1, der die Transkription hemmt oder mit notwendigen Ko-Faktoren in Konkurrenz steht, ist eine wahrscheinliche Möglichkeit (Faist, 2017).

1.4.2 Clp1 nimmt Einfluss auf die UPR

Die hochkonservierte UPR ist notwendig für die Anpassung an sich verändernde Umweltbedingungen. Der Mechanismus ist in allen untersuchten human- oder phytopathogenen Pilzen als konservierter Regulator der Virulenz nachgewiesen worden (Cheon *et al.*, 2011; Joubert *et al.*, 2011; Richie *et al.*, 2009). Die Verknüpfung zwischen UPR und dem Signalweg der pathogenen Entwicklung in *U. maydis* ist gesteuert durch Protein-Protein Interaktion des UPR Regulators Cib1 und dem Entwicklungsregulator Clp1 (Pinter *et al.*, 2019).

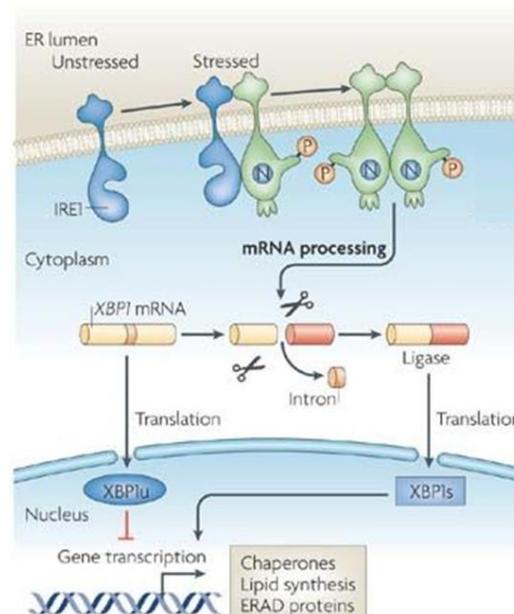


Abbildung 10: Schematische Darstellung des UPR Signalwegs über IRE1 in höheren Eukaryoten. Der konservierte UPR Signalweg startet mit der Oligomerisierung von IRE1 in der ER-Membran. Durch die Transautophosphorylierung der cytoplasmatischen Kinasedomäne in IRE1 kommt es zur Aktivierung der Endoribonukleasedomäne. Sequenzspezifisch schneidet IRE1 ein Intron aus der mRNA von XBP1, in *Saccharomyces cerevisiae* HAC1. Der transkriptionelle Aktivator XBP1, entsteht nach der gespleißten mRNA, wohingegen die ungespleißte mRNA für einen Inhibitor (XBP1u) der UPR kodiert (Modifiziert nach (Ron und Walter, 2007))

Die UPR wirkt ER-Stress, einem Ungleichgewicht zwischen ER-Kapazität und fehlerhafter Proteinfaltung, entgegen. Während des Signalweges, ausgelöst durch externe Stressfaktoren, wird sequenzspezifisch ein Intron aus der konstitutiv exprimierten mRNA des Regulators XBP1 in höheren Eukayoten, HAC1 in

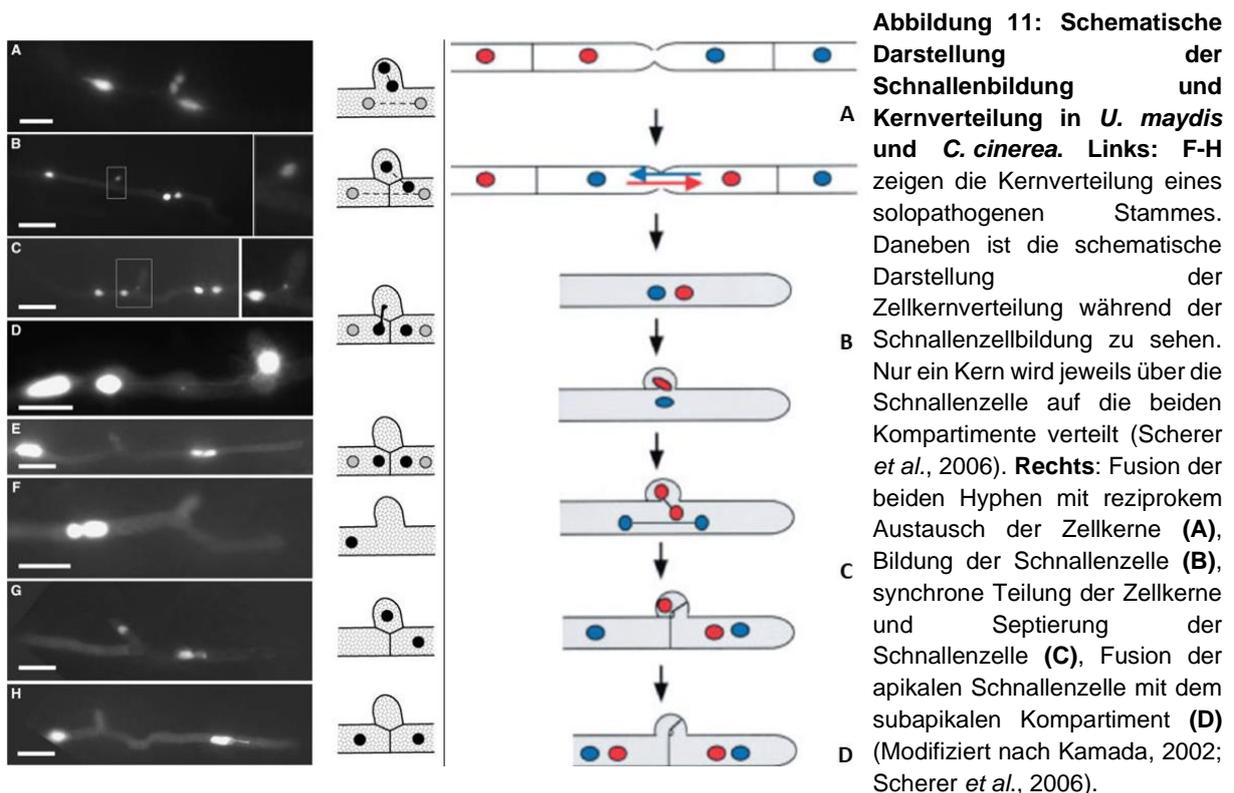
Saccharomyces cerevisiae, Cib1 in *U. maydis*, ausgeschnitten (Ron und Walter, 2007; Walter und Ron, 2011). Die prozessierte mRNA kodiert für den UPR-Regulator, welcher zur Gruppe der bZIP Transkriptionsfaktoren gehört (Sidrauski et al., 1996). Hac1 bindet in *Saccharomyces cerevisiae* an UPRs (*unfolded protein response elements*) von Zielgenen (Mori et al., 1992) und reguliert damit den Sekretionsweg durch Erhöhung der ER-Faltungskapazität, der ER-Expansion sowie der Aktivierung des ER-assoziierten Abbauwegs (ERAD) (Pinter et al., 2019). Die Zellapoptose wird eingeleitet, falls die Homöostase nicht wiederhergestellt werden kann, um toxische Effekte der fehlgefalteten Proteine zu vermeiden (Sano und Reed, 2013).

In *U. maydis* ist die UPR verknüpft mit der pathogenen Entwicklung. Durch die Interaktion der Proteine Cib1 und Clp1 kommt es zu einer verstärkten Akkumulation des stabilen Clp1-Proteins, welches die Re-Initiation von Wachstum und mitotischer Teilung *in planta* auslöst (Heimel et al., 2013). Die *clp1*-abhängige UPR Genexpression steht im Zusammenhang mit der Cib1 Stabilität und dem Phosphorylierungszustand des Proteins (Pinter et al., 2019). Eine zeitgleiche Induktion von *clp1* nimmt Einfluss auf die Lokalisation, die Stabilität und den Phosphorylierungsstatus des Cib1-Proteins. Das Fusionsprotein aus Cib1 und dem Fluoreszenzprotein GFP ist nach *clp1* Induktion zusätzlich zum Zellkern auch im Zytoplasma der Zelle detektierbar (Pinter et al., 2019). Eine höhere Proteinmenge und ein langsamerer Proteinabbau durch zeitgleiche Clp1 Expression bei geringerem *cib1* Transkript lässt auf einen *clp1*-abhängigen posttranskriptionellen Effekt auf Cib1 schließen (Pinter et al., 2019).

1.4.3 Clp1 als Schlüsselprotein bei der Schnallenzellbildung

Das Clp1-Protein ist in *U. maydis* essentiell für die Wiederaufnahme des Zellzyklus, für die Proliferation von dikaryotischen Filamenten in der Pflanze sowie für die Verteilung der Zellkerne während der Zellteilung. Andere Basidiomyceten, wie *Coprinopsis cinerea* besitzen ähnliche Proteine (40 % Sequenzhomologie), welche notwendig und ausreichend für die Bildung der Schnallenzellen in diesen Pilzen sind (Inada et al., 2001). In *U. maydis* findet die Schnallenzellbildung während der biotrophen Phase nach der Penetration der Pflanze statt und nimmt so Einfluss auf die weiteren Schritte der pathogenen Entwicklung. Sie erfolgt analog zur Bildung in *C. cinerea* (siehe Abbildung 11).

Für den Prozess der Schnallenzellbildung sind in *C. cinerea*, anders als in *U. maydis*, beide Paarungstyp-Loci notwendig. In *U. maydis* konnte gezeigt werden, dass der Prozess unabhängig von einem aktiven *a*-Locus ablaufen kann (Scherer *et al.*, 2006). Wie in Abbildung 11 zu sehen, ist die Zellteilung und Schnallenzellenbildung ein sehr komplexer Entwicklungsprozess, der Abläufe im polaren Wachstum, des Zellzyklus, der Kernwanderung und der Septierung koordinieren muss. Die beiden Zellkerne teilen sich zu Beginn in unterschiedliche Richtungen. Einer der beiden teilt sich parallel zur Wuchsrichtung der Hyphe, der zweite in das Primordium (initiale Schnallenzelle) in die gegenläufige Richtung. Zu diesem Zeitpunkt entsteht bereits ein heterodikaryotisches Kompartiment durch die zeitgleich ablaufende Septierung. Die Schnallenzelle verschmilzt, durch Pheromonaustausch vermittelt, mit dem subapikalen Kompartiment. Der heterodikaryotische Zustand im Gesamtfilament ist damit hergestellt. Ob-der mechanistische Ablauf der Schnallenzellbildung identisch zu dem in höheren Basidiomyzeten abläuft, ist bisher ungeklärt.



In vorangegangenen Arbeiten wurde die Zellkernverteilung auf, so wie in der Pflanze mit Hilfe von H1:mCherry, einem NLS:GFP-Fusionsprotein, sowie einer Calcofluorfärbung in WT und $\Delta c/p1$ Stämmen verglichen. Sowohl in einzelnen Sporidien als auch in gebildeten Dikarya lagen die Zellkerne mit beiden Fluoreszenzsignalen vor. Durch die doppelte Visualisierung der Kerne, durch die

Fusion des Histons H1 mit dem Fluoreszenzprotein mCherry zur Visualisierung des Chromatins und dem Fusionsprotein NLS:GFP zur Detektion einer intakten Kernhülle war es möglich, Zellmigration und die Zellkernverteilung auch in der Pflanze zu beobachten. Auf Grund der bei *U. maydis* ablaufenden offenen Mitose können Proteine und auch größere Moleküle den Zellkern problemlos verlassen, da die Kernporen geöffnet und die Kernhülle abgestreift wird (Straube *et al.*, 2005). Wie bereits bekannt (Scherer *et al.*, 2006), bilden *clp1*-Deletionsstämmen weiterhin Appressorien aus, weisen jedoch keine weitere Proliferation in der Pflanze auf.

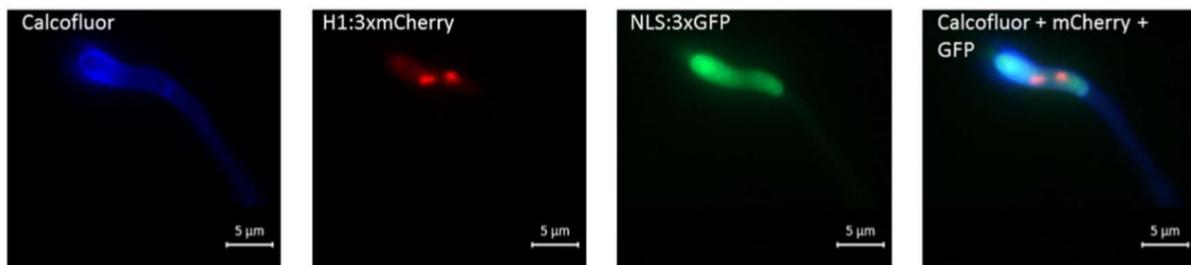


Abbildung 12: Clp1-Mutanten weisen eine permeabilisierte Kernhülle auf. Zu sehen ist ein Dikaryon nach Fusion zweier *clp1*-Deletionsstämmen (UBF37 und UBF38). Links: Zur Visualisierung des Dikaryons auf der Blattoberfläche wurde das Blattmaterial mit Calcofluor White gefärbt. Mitte Links: Die H1:3xmCherry-Fusion zeigt noch ein eindeutiges Kernsignal. Mitte Rechts: Das NLS:3xGFP ist cytoplasmatisch lokalisiert. Das Cytoplasma befindet sich nur im apikalen Bereich der Hyphe und ist durch ein Septum vom Rest getrennt. Rechts: Überlappende Darstellung aller detektierten Kanäle. Das Blattmaterial wurde 72h nach der Infektion fluoreszenzmikroskopisch untersucht. (Faist, 2017)

Während im WT nach 48h Inokulation die meisten Kerne in weiter proliferierte Hyphen innerhalb der Pflanze migriert sind, zeigen die untersuchten *clp1*-Deletionsstämmen vermehrt ein definiertes mCherry-Signal im Kern mit zytoplasmatischem GFP-Signal im Appressorium (siehe Abbildung 12). Die Ergebnisse deuten auf eine permeable Kernhülle hin und legen die Vermutung nahe, dass wie in *M. oryzae* die Appressorienbildung mit dem Beginn der Mitose gekoppelt ist (Saunders *et al.*, 2010). In *clp1*-Deletionsstämmen konnten jedoch keine Zellkerne in Hyphen innerhalb der Pflanze nachgewiesen werden, die Kerne befanden sich weiter auf der Blattoberfläche in den gebildeten Appressorien (Faist, 2017). Mit dieser Beobachtung scheint eine Blockade während der Penetration nach Appressorienbildung in der Migration der Kerne wahrscheinlich. Auch in *M. oryzae* scheint der Eintritt in die Mitose sowohl notwendig als auch ausreichend zu sein um die Appressorienbildung einzuleiten, hingegen scheint der Austritt für die Pflanzeninfektion erforderlich (Saunders *et al.*, 2010).

Auf Grund der späten Stabilisierung von Clp1 zum Zeitpunkt der Appressorienbildung könnte ein früheres Signal das Aufheben des Zyklusarrestes, die Appressorienbildung und damit einhergehend den Beginn der Mitose beeinflussen. Damit wären die permeablen Kerne in den Appressorien in *clp1*-Deletionsstämmen zu erklären. Das Clp1-Protein könnte notwendig für die Kernwanderung vom Appressorium in die infizierende Hyphe sein und damit indirekt Einfluss auf die Mitose und damit die Proliferation in der Pflanze nehmen (Faist, 2017). Oder aber das Clp1-Protein hat Einfluss auf die vollständige Durchführung der Mitose im ausgebildeten Appressorium durch Auslösen eines mitotischen Kontrollpunktes und würde nicht nur die ablaufende Mitose, sondern bei Fehlen auch die Migration der Kerne in die Pflanze beeinflussen (Faist, 2017).

1.5 Zielsetzung dieser Arbeit

Das regulatorische Netzwerk zur Steuerung der pathogenen Entwicklung in *Ustilago maydis* ist ein streng reguliertes Geflecht aus Transkriptionsfaktoren. Durch unterschiedliche Komplexbildungen dieser Faktoren kann der Übergang von saprophytischer zu biotropher Lebensphase über die Genregulation gesteuert werden. So sind das bE/bW Heterodimer und Rbf1 die essentiellen Faktoren für die Filamentbildung und den G2-Zellzyklusarrest auf der Pflanze nach der Fusion zweier kompatibler Sporidien. Ein weiteres direkt *b*-induziertes Gen neben *rbf1* ist *clp1*. Das Gen wird zeitgleich mit *rbf1*, nach Bildung des Heterodimer früh während der Etablierung der pathogenen Entwicklung induziert. Ein stabiles Protein jedoch ist erst zum Zeitpunkt der Appressorienbildung nachweisbar und reprimiert für die Re-Initiation des Zellzyklus und die Proliferation in der Pflanze *b*-abhängige Gene im Proteinkomplex mit bE/bW.

Ziel dieser Arbeit ist es durch die proteininterne Stabilisierung von Clp1 und die resultierende Interaktion mit pathogenitätsrelevanten Faktoren weitere Aufschlüsse über den Stabilisierungseffekt sowie die genauere Funktion des Clp1-Proteins zum Zeitpunkt der Re-Initiation des Zellzyklus zu erhalten. Die Auswirkung von Clp1 auf transkriptioneller Ebene mittels genomweiten RNA-Seq Analysen sowie die Bindeaffinität von Clp1 im Proteinkomplex mit dem bE/bW-Heterodimer und weiteren Faktoren mittels genomweiten ChIP-Seq Analysen können ein genaueres Verständnis zur Feinregulation des transkriptionellen Netzwerkes und den notwendigen

Proteinkomplexen an der DNA liefern, sowie den zugrunde liegenden Mechanismus näher bringen. Um den Repressionsmechanismus des Proteinkomplexes bE/bW-Clp1 genauer verstehen zu können, sollte die Struktur des Proteinkomplexes zwischen dem Heterodimer aus bE und bW und dem Clp1-Protein aufgeschlüsselt werden.

2 Ergebnisse

Das Clp1-Protein aus *Ustilago maydis* ist ein potentiell posttranskriptionell modifiziertes Protein, das eine essentielle Funktion bei der Proliferation in der Pflanze während der pathogenen Entwicklung hat. Es konnte bereits gezeigt werden, dass eine Deletion zu apathogenen Stämmen mit einer gestörten Proliferation *in planta* führt (Scherer *et al.*, 2006). Die ausbleibende Proliferation in der Pflanze nach der Appressorienbildung und Penetration, welche nicht durch die Deletion beeinflusst werden, tritt zusammen mit einer fehlenden oder fehlerhaften Schnallenzellbildung auf (Scherer *et al.*, 2006). Die Feinregulation des gesamten transkriptionellen Netzwerkes, das die pathogene Entwicklung in *U. maydis* steuert, ist zeitlich sehr streng getaktet. So ist eine Stabilisierung des Clp1-Proteins zum Zeitpunkt der Pflanzenpenetration zwingend erforderlich, um mit der Aufhebung des Zellzyklusarrests und der natürlichen Zellkernverteilung über Schnallenzellen eine Proliferation in der Pflanze zu ermöglichen (Scherer *et al.*, 2006). Dies wird über die Repression aller *b*-abhängigen Gene durch den Proteinkomplex aus dem bE/bW-Heterodimer und Clp1 gesteuert (Heimel *et al.*, 2010b). Vorangegangene Arbeiten konnten zeigen, dass die Interaktion mit Clp1 die Bindung der Transkriptionsfaktoren Rbf1 und b an die DNA nicht beeinflusst (Faist, 2017).

2.1 Genomweiter regulatorischer Einfluss von Clp1 und dem Proteinkomplex aus bE/bW und Clp1

2.1.1 Der Proteinkomplex bE/bW mit Clp1 hat einen spezifischen Effekt auf die transkriptionelle Regulation

Die transkriptionelle Regulation während der pathogenen Entwicklung ist gesteuert von vielen Faktoren, deren Feinregulation zeitlich streng getaktet ist. So ist die Interaktion mehrerer Faktoren und ihr zeitliches und räumliches Auftreten von großer Bedeutung. Dies ist auch bei dem in dieser Arbeit genauer betrachteten Proteinkomplex aus dem Heterodimer bE/bW und Clp1 der Fall. Das Heterodimer löst den Übergang in die pathogene Entwicklung aus und induziert durch direkte Bindung an den Promotor das *clp1* Gen bereits sehr früh während der biotrophen Entwicklung. Trotz früher Genexpression ist erst bei der Bildung des Appressoriums auf der Pflanzenoberfläche ein stabiles Clp1-Protein detektierbar. Diese Stabilisierung ist notwendig, um den Proteinkomplex mit bE/bW einzugehen und im Folgenden die

Genregulation weiter zu beeinflussen. In dieser Arbeit wird die Instabilität des Clp1-Proteins durch Überexpression des Gens kompensiert, das in einer Akkumulation von Clp1-Protein resultiert. Die bE/bW-Clp1-abhängige Regulation eines Großteils der *b*-induzierten Gene ist dringend notwendig für die pathogene Entwicklung. Jedoch sind die meisten Gene in der *b*-abhängigen Regulationskaskade über den Masterregulator Rbf1 gesteuert. Das *rbf1* Gen ist genau wie *clp1* ein direkt *b*-induziertes und von bE/bW und Clp1 reprimiertes Gen. Diese Repression ist einer der wichtigsten Schritte während der Etablierung der pathogenen Entwicklung, da Rbf1 eine große Anzahl der Gene in der *b*-abhängigen Regulationskaskade aktiviert (Klasse 2 Gene) und diese durch Repression des *rbf1* Gens bei Stabilisierung des Clp1-Proteins zum Zeitpunkt der Pflanzeninfektion mit beeinflusst werden.

Um den genomweiten Einfluss des bE/bW-Clp1 Komplexes aufzeigen zu können wurden RNA-Sequenzierungen (RNA-Seq Analysen), genauer beschrieben in 4.7.3, in biologischen Triplikaten durchgeführt. Anschließend wurden die differentiell regulierten Gene auf eine Bindespezifität für die Proteine bE/bW sowie Clp1 in den zugeordneten Promotorregionen, mittels Chromatin-Immunopräzipitation mit anschließender Sequenzierung (ChIP-Seq Analysen) untersucht. So konnten Aussagen über die Korrelation zwischen der Bindung des Transkriptionsfaktors bE/bW sowie des Proteins Clp1 und der untersuchten Regulation getroffen und Hypothesen über weitere regulatorische Proteinkomplexe aufgestellt werden.

Alle Stämme in diesem Experiment wurden wie in (4.2) beschrieben mit Hilfe eines Medienwechsels induziert. Die Stämme wurden in Flüssigmedium angeimpft, das reprimierende Bedingungen bot (im Fall des *crg1*-Promotors mit Glukose als einzige Kohlenstoffquelle) und anschließend im gleichen Volumen CM-Medium resuspendiert, welches induzierende Bedingungen bot (im Fall des *crg1*-Promotors Arabinose als einzige Kohlenstoffquelle). Die Kulturen wurden bei 28 °C für 5 h induziert. Durch die Aktivierung des *crg*-Promotors auf Grund der veränderten Kohlenstoffquelle im Medium kommt es zur Induktion, der unter dem Promotor stehenden Gene.

Für die RNA-Seq Analysen wurde die Gesamt-RNA aus den induzierten Stämmen isoliert (4.4.2) und anschließend sequenziert (4.7.3). Die Sequenzierung erfolgte mit einem Kit für Cluster-Generierung im *single-ended* Betrieb. Die *reads* wurden anschließend mit STAR: Version 2.4.1 bzw. mit Subread Version 1.4.3-p1 auf das *U. maydis* Genom aligniert. *Read counts* und RPM (*reads per million*) wurden mit

benutzerdefinierten Python-Skripten berechnet. Differentielle Expression wurde mit DESeq2 (Love *et al.*, 2014) bei einer FDR (*false discovery rate*) *threshold* von 0.015 und einem \log_2FC (*fold change threshold*) von zwei festgelegt.

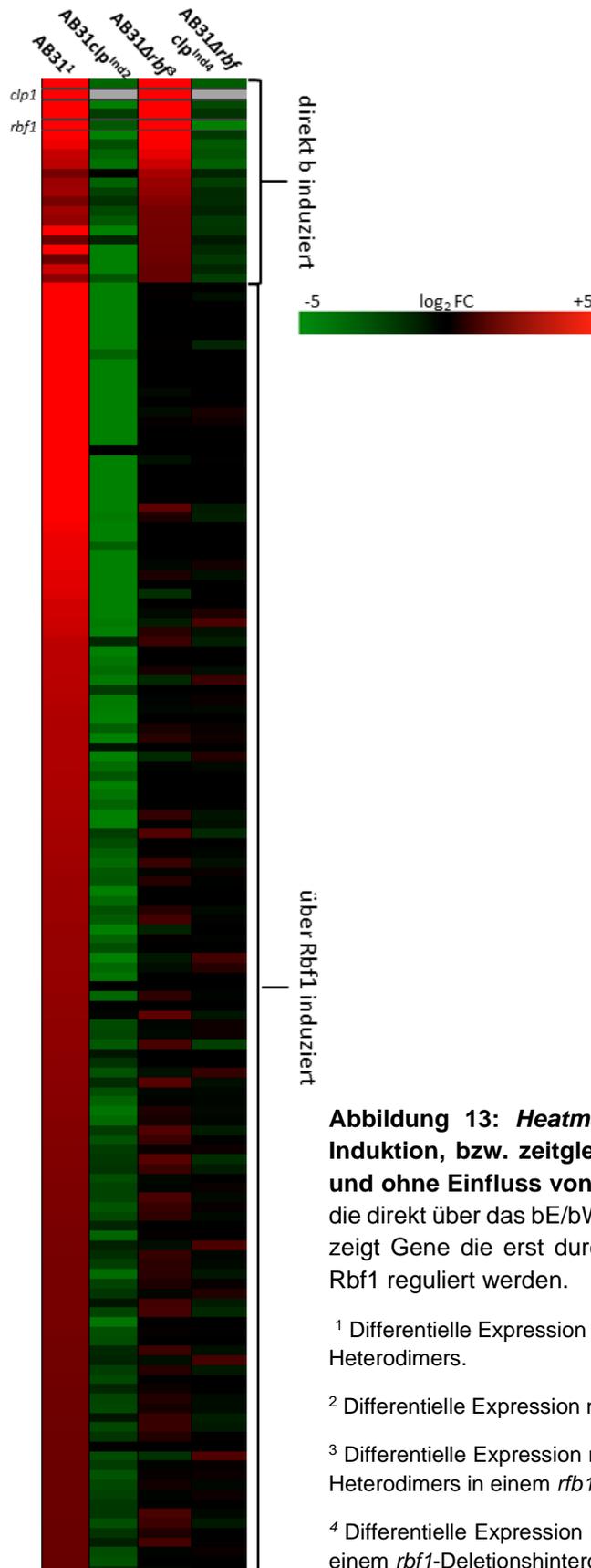


Abbildung 13: Heatmap zur differentiellen Expression nach *b*-Induktion, bzw. zeitgleicher Überexpression von *b*- und Clp1 mit und ohne Einfluss von Rbf1. Der obere Teil der *Heatmap* zeigt Gene die direkt über das bE/bW-Heterodimer induziert werden. Der untere Teil zeigt Gene die erst durch den *b*-abhängig induzierten Masteregulator Rbf1 reguliert werden.

¹ Differentielle Expression nach *b*-Induktion und Bildung eines funktionsfähigen Heterodimers.

² Differentielle Expression nach zeitgleicher Überexpression von *b* und Clp1.

³ Differentielle Expression nach *b*-Induktion und Bildung eines funktionsfähigen Heterodimers in einem *rbf1*-Deletionshintergrund.

⁴ Differentielle Expression nach zeitgleicher Überexpression von *b* und Clp1 in einem *rbf1*-Deletionshintergrund.

In Abbildung 13, Spalte 1 „AB31“, sind differentiell *b*-regulierte Gene ($\log_2FC > 2$) aus dem veränderten Gesamttranskriptom der Grundlinie AB32+ ($a2, \Delta b::P_{crg1}:bW2, P_{crg1}:bE2$) zum Experiment AB31+ ($a2, \Delta b::P_{crg1}:bW2, P_{crg1}:bE1$) aufgelistet (Gesamtliste mit Werten siehe Anhang). In AB32+ wurden durch den Arabinose-induzierbaren *crg*-Promotor *bE2* und *bW2* im nativen Locus induziert. Die exprimierten *bE2*-, und *bW2*-Proteine sind nicht kompatibel und damit nicht in der Lage ein funktionsfähiges Heterodimer zu bilden. Im Stamm AB31+ wurden ebenfalls durch den Arabinose-induzierbaren *crg*-Promotor die beiden Gene *bE1* und *bW2* induziert. Hier sind *bE1* und *bW2* kompatibel und damit in der Lage ein funktionsfähiges Heterodimer zu bilden und *b*-abhängige Gene zu induzieren. Mit einem $\log_2FC > 2$ werden 156 Gene *b*-abhängig induziert. Durch die differentielle Expression der Stämme UDS5 ($a2, \Delta b::P_{crg1}:bW2, P_{crg1}:bE1; rbf1:3xHA$) und UJU81.18 ($a2, \Delta b::P_{crg1}:bW2, P_{crg1}:bE1; rbf1:3xHA; P_{crg1}:clp1$) kann die, durch Überexpression von Clp1 im Stamm UJU81.18 vermittelte, Repression von Genen dargestellt werden. In beiden Stämmen wurde ein funktionsfähiges Heterodimer gebildet, welches in UJU81.18 mit dem, durch Überexpression generierten, Clp1-Protein interagieren und einen regulatorischen Effekt ausüben kann. In Abbildung 13 Spalte 2 „AB31clp^{Ind}“ ist die differentielle Regulation ($\log_2FC < -2$) nach Clp1 Überexpression für alle vorab ermittelten *b*-abhängig induzierten Gene dargestellt. 83 % (131 Gene) der *b*-abhängig induzierten Gene in AB31 werden in AB31clp^{Ind} durch die Überexpression von Clp1 reprimiert. Durch die Überexpression von Clp1 in AB31clp^{Ind} und auch in AB31 Δrbf clp^{Ind} kann kein regulatorischer Effekt von Clp1 in den Auswertungen für das *clp1* Gen selbst gezeigt werden (gekennzeichnet mit grau hinterlegten Flächen in Abbildung 13). Der Masterregulator Rbf1 taucht ebenfalls in der Liste der *b*-abhängig induzierten und *bE/bW*-Clp1-abhängig reprimierten Gene auf (Grau umrandet). Bereits bekannt ist der regulatorische Effekt von Rbf1 auf Gene der Klasse 2, die in der *b*-abhängigen Regulationskaskade induziert werden, jedoch nicht direkt über *b*, sondern über den direkt *b*-induzierten Masterregulator Rbf1.

Um den Einfluss des Transkriptionsfaktors Rbf1 auszuschließen und nur die direkt *b*-induzierten Gene ermitteln zu können, wurden die differentiell exprimierten Gene ($\log_2FC > 2$) zwischen den Gesamttranskriptomen der Stämme AB32+ ($a2, \Delta b::P_{crg1}:bW2, P_{crg1}:bE2$) und UJU1.14 ($a2, \Delta b::P_{crg1}:bW2, P_{crg1}:bE1:3xHA; \Delta rbf1$) aufgelistet und in Abbildung 13, Spalte 3 „AB31 $\Delta rbf1$ “ dargestellt. Ein indirekter Effekt lediglich durch die Induktion oder Repression von *rbf1* und dessen Auswirkung auf die

weitere Regulationskaskade kann in den direkt *b*-induzierten Genen ausgeschlossen werden. Lediglich 13 % (21 Gene) der *b*-abhängig induzierten Gene aus AB31 sind weiterhin in AB31 Δ *rbf1* differentiell reguliert und damit direkt *b*-induziert. Durch die differentielle Expression ($\log_2FC < -2$) der Stämme UJU1.14 (*a2* Δ *b*::*P_{crg1}*:*bW2*, *P_{crg1}*:*bE1*:3xHA, Δ *rbf1*) und UJU79.7 (*a2* Δ *b*::*P_{crg1}*:*bW2*, *P_{crg1}*:*bE1*; Δ *rbf1*, *P_{crg1}*:*clp1*) kann der reprimierende Effekt durch die Überexpression von Clp1 in einem *rbf1*-Deletionshintergrund ermittelt werden. In beiden Stämmen wird ein funktionsfähiges Heterodimer gebildet, welches in UJU79.7 mit dem Clp1-Protein nach Überexpression interagieren und einen regulatorischen Effekt ausüben kann. 57 % (12 Gene) der direkt *b*-abhängig induzierten Gene, werden in der Folge durch Überexpression von Clp1 reprimiert. Die grau umrandeten Felder stehen in Abbildung 13 für das *rbf1* Gen. Die, trotz *rbf1* Deletion, berechneten Werte können durch eine unvollständige Deletion des ORFs erklärt werden. Es werden die ersten 547 bp (entspricht 36 von 404 AS) des Transkriptes abgelesen, welche ausreichen um generierte *reads* auf das *U. maydis* Genom zu alignieren und Werte zu berechnen. Ein funktionelles Protein wird jedoch nicht translatiert.

Die über RNA-Seq bestätigten, durch bE/bW und Clp1 differentiell regulierten Gene wurden mit Hilfe von FIMO Abfragen auf das Auftreten der konservierten Bindesequenz für das b-Heterodimer (*bbs*) (Jonas Ulrich, persönliche Mitteilung) in den zugeordneten Promotorbereichen abgeglichen. Alle 156 *b*-abhängig induzierten und bE/bW-Clp1-abhängig reprimierten Gene, bzw. die zugeordneten Promotorregionen, wurden auf eine konservierte *bbs* mittels FIMO Abfrage überprüft und in Tabelle 1 Spalte „*bbs*“, bei Anwesenheit mit Blau gekennzeichnet (Gesamtliste siehe Anhang). Die genaue Zuordnung von Genen zu den zugehörigen Promotorregionen ist in 4.7.2 beschrieben.

Weiter wurden alle verifizierten durch bE/bW und Clp1 differentiell regulierten Gene mittels ChIP-Seq Analysen auf eine tatsächliche Bindung der Faktoren bE/bW und Clp1 in den zugeordneten Promotorbereichen untersucht. Für die durchgeführte ChIP-Seq Analyse, genauer beschrieben in 4.6.4, wurde das Gesamtchromatin der induzierten Stämme fixiert und isoliert. Für die Chromatin-Immunopräzipitation wurde das mittels Sonifizierung fragmentierte Chromatin (100-300 bp) mit HA-Antikörpern gekoppelt an magnetischen Beads immunopräzipitiert. Die anschließende Sequenzierung wurde, wie in 4.7.2 beschrieben, mittels *single-ended* Illumina

Sequenzierung durchgeführt und die resultierenden *reads* auf das *U. maydis* Genom aligniert. Die visualisierten *Peaks*, in Abbildung 14 an zwei exemplarischen Promotoren gezeigt, wurden mit dem Generic Genome Browser Version 2.33 generiert. Mit PeakZilla wurde für beide biologischen Duplikate unabhängig ein *peak calling* durchgeführt und damit ein *Peak score* (*pz-score*) ermittelt. Es wurden nur *Peaks*, die in beiden Duplikaten identifiziert wurden und jeweils einen *pz-score* von ≥ 102 für bE:HA in UJF104 und ≥ 169 für Clp1:HA in UJU82.8 sowie ≥ 80 in UDS1 aufwiesen für weitere Analysen verwendet.

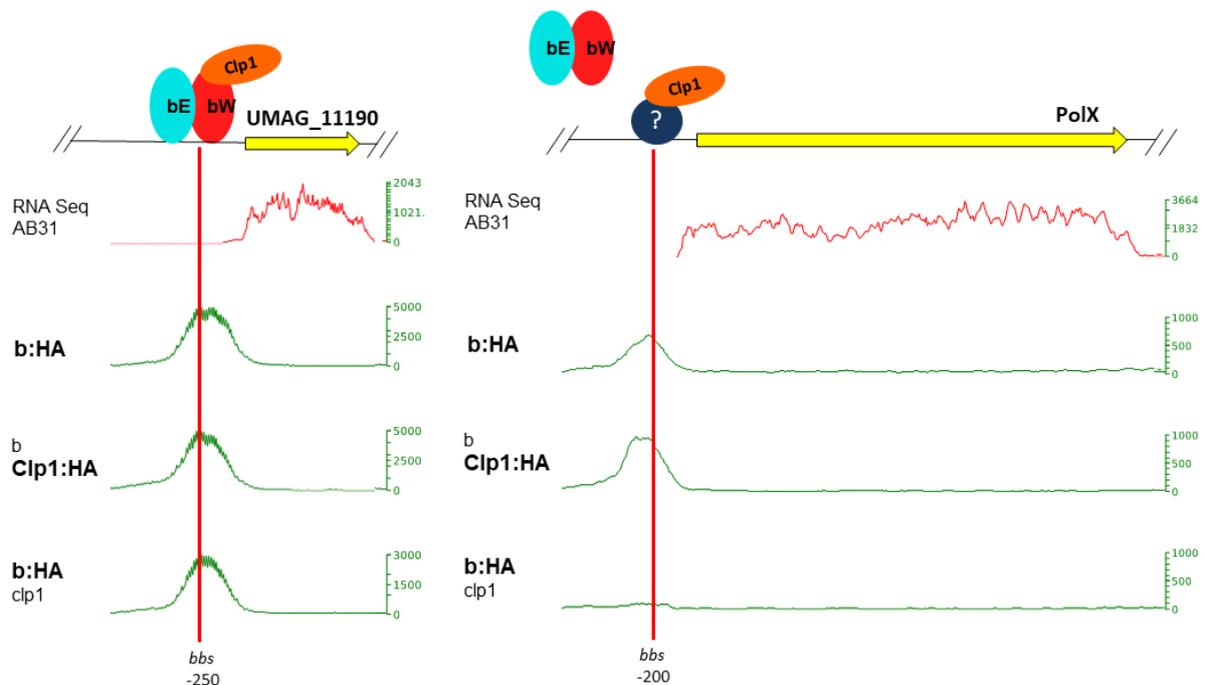


Abbildung 14: Visuelle Darstellung von Reads und Bindestellen der ChIP-Seq Analysen von UDS1 (b:HA), UJU82.8 (b-Clp1:HA) und UJF104 (b:HA clp1) in exemplarischen Promotoren. Reads wurden mit Bowtie2 version 2.0.0-beta7 (Langmead und Salzberg, 2012b) auf das *Ustilago maydis* Genom (Ensembl Genomes 33 (Kersey *et al.*, 2018)) aligniert. Zur visuellen Darstellung der Reads wurde der Generic Genome Browser Version 2.33 verwendet. Peak-Profile sind repräsentiert durch global normalisierte *Read-counts* aller ChIP-Seq Experimente. Positionen der mittels FIMO Abfrage ermittelten *bbs* sind mit rotem Strich durch alle Experimente im Promotor markiert und durch gezeigte Proteinkomplexe in den Promotorregionen über den Tracks gekennzeichnet. **Links:** Die Promotorregion von *UMAG_11190* stellt exemplarisch einen Promotor mit Bindung des Proteinkomplexes aus bE/bW und Clp1 dar. **Rechts:** Die Promotorregion von *PolX* (*UMAG_01262*) stellt exemplarisch einen Promotor mit Bindung des Clp1-Proteins, ohne Heterodimer dar, bei gleichzeitiger Induktion der Gene. Er stellt eine Besonderheit dar und zeigt einen Einfluss der Überexpression von Clp1 auf die Bindung von bE/bW. Im Stamm UDS1 (b:HA), in dem nur *b*-induziert wird, ist ein deutlicher *Peak*, für die Bindung von bE/bW an die DNA zu erkennen. Im Stamm UJF104 (b:HA clp1) ist durch Überexpression des Clp1-Proteins, keine Bindung des Heterodimers an der *bbs* mehr nachweisbar. Die Bindung von Clp1 muss über einen noch unbekanntem Faktor (Markiert mit „?“) ablaufen und das bE/bW Heterodimer verdrängen.

Die in diesem Versuchsaufbau verwendeten Stämme sollen das Zusammenspiel des Proteinkomplexes bE/bW und Clp1 sowie das Auftreten der Proteine außerhalb des Proteinkomplexes genauer aufklären. So kann gezeigt werden, ob die Bindung des bE/bW Heterodimers durch die Überexpression von Clp1 beeinflusst wird, ob das bE/bW Heterodimer immer in Verbindung mit Clp1 an der DNA zu finden ist, und ob das Clp1-Protein ausschließlich mit dem Heterodimer interagiert, oder aber auch ohne das b-Protein mit anderen Faktoren Proteinkomplexe bilden und an die DNA binden kann.

Tabelle 1: Heatmap zur differentiellen Expression nach b-Induktion, bzw. zeitgleicher Überexpression von b und Clp1 mit und ohne Einfluss von Rbf1. Zuordnung von signifikanten Peaks der ChIP-Seq Analyse nach Immunopräzipitation mit Clp1 und bE1 zu direkt b-regulierten Genen mit Überprüfung der konservierten bbs im Promotor.

Gene ¹	AB31 ²	AB31clp ^{Ind3}	AB31Δrbf ⁴	AB31Δrbf clp ^{Ind5}	b-peak (AB31clp ^{Ind6})	clp-peak (AB31clp ^{Ind7})	bbs ⁸	b-peak (AB31) ⁹
UMAG_11190	9,75	-4,01	9,70	-3,57				
UMAG_02438	9,46	3,69*	9,67	3,81*				
UMAG_01375	8,73	-5,40	8,25	-2,81				
UMAG_11413	6,95	-2,39	6,84	-1,99				
UMAG_03172	6,17	-3,45	6,07**	-5,69**				
UMAG_01234	10,17	-6,20	5,38	-2,21		***		
UMAG_03541	4,69	-3,04	4,93	-3,41				
UMAG_12256	3,89	-3,89	4,57	-3,20				
UMAG_01374	3,70	-4,42	3,97	-3,73				
UMAG_06350	2,35	0,07	3,30	-1,29				
UMAG_11514	3,02	-3,78	3,01	-2,37				
UMAG_06125	3,15	-2,59	2,90	-1,57				
UMAG_11191	2,39	-1,82	2,56	-1,63				
UMAG_04503	3,13	-2,78	2,31	-1,31				
UMAG_12189	2,88	-3,42	2,30	-2,12				
UMAG_05104	5,71	-5,84	2,25	-1,96				
UMAG_04275	2,06	-1,33	2,24	-0,92				
UMAG_01262	7,16	-6,14	2,22	-1,60				
UMAG_04667	2,04	-5,40	2,13	-2,11				
UMAG_00235	4,04	-5,16	2,02	-1,46				
UMAG_00374	2,75	-3,32	2,00	-2,37				

¹ Genbezeichnung in *U. maydis*. ² Differentielle Expression nach b-Induktion und Bildung eines funktionsfähigen Heterodimers. ³ Differentielle Expression nach zeitgleicher Überexpression von b und Clp1. ⁴ Differentielle Expression nach b-Induktion und Bildung eines funktionsfähigen Heterodimers in einem *rbf1*-Deletionshintergrund. ⁵ Differentielle Expression nach zeitgleicher Überexpression von b und clp1 in einem *rbf1*-Deletionshintergrund. ⁶ Signifikante b-peaks der ChIP-Seq Analyse nach Immunopräzipitation mit bE1:HA bei zeitgleicher Überexpression von b und Clp1 in UJF104 mit pz-score ≥ 102 (Gelb). ⁷ Signifikante clp1-peaks der ChIP-Seq Analyse bei zeitgleicher Überexpression von b und Clp1 nach Immunopräzipitation mit Clp1:HA in UJU82.8 mit pz-score ≥ 169 (Gelb). ⁸ Konservierte b-Bindestelle (bbs), ermittelt über FIMO (*Find Individual Motif Occurrences*) Abfrage (*p-value* $< 10^{-4}$, Blau). Als Input diente eine FASTA-Datei aller Promotorbereiche, bestehend aus je 328 bp langen Sequenzen um die Maxima der signifikanten Peaks (*cookie cuts*). ⁹ Signifikante b-peaks der ChIP-Seq Analyse nach Immunopräzipitation mit bE1:HA ohne zusätzliche *clp1* Induktion in UDS1 mit pz-score ≥ 80 (Gelb). * Werte für zusätzlich induziertes *clp1*, die nicht in die Auswertung einbezogen werden können. ** Werte für *rbf1* Gen trotz *rbf1* Deletion können durch eine unvollständige Deletion des ORFs erklärt werden. Es werden weiterhin 547 bp des ORFs amplifiziert, was jedoch gerade einmal 36 AS der 404 AS des Rbf1-Proteins entspricht und damit kein funktionsfähiges Protein ermöglicht. Die 547 bp des ORFs reichen aus um generierte reads auf das *U. maydis* Genom zu alignieren und Werte zu berechnen. *** Markiert ein clp-peak im Promotor des Gens *UMAG_01234*, der unter die gesetzte pz-score Grenze fällt, jedoch nach visueller Auswertung als signifikant eingeordnet wurde.

Durch Auswertung der ChIP-Seq Analyse der Duplikate von UJF104 ($a2 \Delta b::P_{crg1}:bW2$, $P_{crg1}:bE1:3xHA$, $P_{crg1}:clp1$) ist es möglich, durch Induktion der *b*-Locus-Gene mit 3xHA-markiertem bE1 in einem funktionsfähigen Heterodimer und Überexpression von Clp1, die Bindung des Heterodimers an die DNA in Anwesenheit von Clp1 zu ermitteln. Durch Auswertung der ChIP-Seq Analyse des Stamms UJU82.8 ($a2 \Delta b::P_{crg1}:bW2$, $P_{crg1}:bE1$, $P_{crg1}:clp1:3xHA$) ist es möglich, durch Induktion der *b*-Locusgene und gleichzeitiger Überexpression des 3xHA-markierten Clp1-Proteins, die indirekte Bindung von Clp1 über einen DNA bindenden Faktor an die DNA zu analysieren. Um einen Vergleich der Heterodimerbindung bei Überexpression und ohne zusätzliche Expression von Clp1 erstellen zu können, wurde zusätzlich mit dem Stamm UDS1 ($a2 \Delta b::P_{crg1}:bW2$, $P_{crg1}:bE1:3xHA$) die Bindung des Heterodimers ohne Überexpression von Clp1 in denselben Promotoren verglichen.

Mit Gelb-gekennzeichnet sind signifikante *Peaks*, die nach gefilterten Listen in beiden unabhängigen Duplikaten vorkommen. Die nach der ChIP-Seq Analyse ermittelten signifikanten *Peaks* für eine Bindung des Heterodimers in den, den Genen zugeordneten Promotoren sind in Tabelle 1, Spalte 6 „b-peak AB31clp^{Ind}“ aufgelistet. In ca. 25 % (5 Gene) der direkt *b*-abhängig induzierten Gene in AB31 Δrbf ist auch nach ChIP-Seq Analysen eine Bindung des Heterodimers im Promotor nachweisbar und stimmen mit den in Spalte „bbs“ gezeigten konservierten *bbs* nach FIMO Abfrage überein. Vergleicht man die Bindung des Heterodimers in AB31clp^{Ind} (b-peak AB31clp^{Ind}) mit der Bindung nach ChIP-Seq Analyse in AB31 (b-peak AB31clp) in Tabelle 1, kann der Einfluss der Überexpression von Clp1-Protein auf die Bindung des Heterodimers aufgezeigt werden. Ein Unterschied ist in lediglich zwei Promotoren zu sehen: In den Promotorbereichen zu den Genen *UMAG_01262* und *UMAG_01234* ist eine Bindung des Heterodimers ohne zusätzliche Clp1 Expression nachweisbar, nach Clp1 Überexpression jedoch nicht mehr. Das Gen *UMAG_01262* kodiert für das Protein PolX, eine DNA-Polymerase X, deren Induktion sowohl über *b* als auch *Rbf1* bereits gezeigt wurde (Heimel *et al.*, 2010b). Die Gene *UMAG_11413* und *UMAG_11191* fallen beide durch den gesetzten $\log_2FC \leq -2$ aus der Liste der signifikant regulierten Gene heraus. Da sie jedoch nur sehr knapp mit einem \log_2FC von -1,99 bzw. -1,63 aus der Liste fallen und eine konservierte *bbs* nach FIMO Abfrage sowie eine Bindung von bE und Clp1 nach ChIP-Seq Analysen aufweisen, scheint hier ein regulatorischer Effekt nach Überexpression von Clp1 sehr wahrscheinlich.

Signifikante *Peaks* für eine indirekte Bindung des Clp1-Proteins über DNA-bindende Faktoren an der DNA sind in Tabelle 1, in Spalte 7 „*clp1-peak* AB31*clp*^{Ind⁴}“ mit Gelb gekennzeichnet. Fast 30 % (6 Gen) der bE/bW-Clp1-abhängig reprimierten Gene in AB31Δ*rbf1* *clp*^{Ind} zeigen eine Clp1 Bindung in den zugeordneten Promotorbereichen. An 5 dieser Promotoren kann eine gemeinsame Bindung von Clp1 mit dem Heterodimer beobachtet werden. Zu diesen 5 Genen zählt das Gen für den Masterregulator *rbf1*, das Gen für *clp1* selbst, sowie *UMAG_11190* und *UMAG_11413*, die beiden am stärksten *b*-abhängig induzierten Gene, sowie *UMAG_11191*, welches divergent mit *UMAG_11190* von derselben Promotorregion reguliert wird. An diesen Promotoren bindet das Clp1-Protein über das bE/bW Heterodimer im Komplex an die DNA.

Hingegen konnte bei der Auswertung der ChIP-Seq Analysen für die Stammhintergründe UJF104 und UJU82.8, in denen die bE Bindung bzw. Clp1 Bindung bei gleichzeitiger Überexpression beider Proteine untersucht wurde, keine Bindung des Heterodimers an die DNA ohne Bindung des Clp1-Proteins über das bE/bW Heterodimer am selben Promotorfragment gezeigt werden. Sobald das Clp1-Protein überexprimiert wird, ist das Heterodimer immer mit einem über das Heterodimer an die DNA bindenden Clp1-Protein nachweisbar. Eine Bindung von Clp1 unabhängig von der Bindung des Heterodimers, wurde in 7 Promotoren nachgewiesen. Die in Tabelle 2 aufgelisteten Gene zeigen einen signifikanten *Peak* in beiden biologischen Duplikaten nach der Immunopräzipitation mit Clp1, jedoch keinen signifikanten *Peak* nach Immunopräzipitation mit bE1.

Tabelle 2: Heatmap zur differentiellen Expression nach *b*-Induktion, bzw. zeitgleicher Überexpression von *b* und *clp1* mit und ohne Einfluss von *Rbf1*. Zuordnung von signifikanten *Peaks* der ChIP-Seq Analyse nach Immunopräzipitation mit Clp1 und bE1 zu direkt *b*-regulierten Genen mit Überprüfung der konservierten *bbs* im Promotor.

Gene ¹	AB31 ²	AB31clp ^{Ind 3}	AB31Δ <i>rbf</i> ⁴	AB31Δ <i>rbf</i> clp ^{Ind 5}	<i>b</i> -peak (AB31clp) ⁶	<i>clp</i> -peak (AB31clp) ⁷	<i>bbs</i> ⁸
UMAG_04114	1,33	-0,76	0,60	-1,38			
UMAG_06075	0,52	-0,72	0,15	-1,38			
UMAG_06076	0,06	0,56	0,60	-1,38			
UMAG_11558	1,23	-1,77	0,53	0,00			
UMAG_05422	1,84	-2,76	1,57	-1,38			
UMAG_01262	7,16	-6,14	2,22	-0,88			
UMAG_00576	1,56	-1,20	0,36	0,49			

¹ Genbezeichnung in *U. maydis*. ² Differentielle Expression nach *b*-Induktion und Bildung eines funktionsfähigen Heterodimers. ³ Differentielle Expression nach zeitgleicher Überexpression von *b* und Clp1. ⁴ Differentielle Expression nach *b*-Induktion und Bildung eines funktionsfähigen Heterodimers in einem *rbf1*-Deletionshintergrund. ⁵ Differentielle Expression nach zeitgleicher Überexpression von *b* und Clp1 in einem *rbf1*-Deletionshintergrund. ⁶ Signifikante *b*-peaks der ChIP-Seq Analyse nach Immunopräzipitation mit bE1:HA bei zeitgleicher Überexpression von *b* und Clp1 in UJF104 mit pz-score ≥ 102 (Gelb). ⁷ Signifikante *clp1*-peaks nach ChIP-Seq Analyse bei zeitgleicher Überexpression von *b* und Clp1 nach Immunopräzipitation mit Clp1:HA in UJU82.8 mit pz-score ≥ 169 (Gelb). ⁸ Konservierte *b*-Bindestelle (*bbs*), ermittelt über FIMO (*Find Individual Motif Occurrences*) Abfrage (*p*-value $< 10^{-4}$, Blau). Als Input diente eine FASTA-Datei aller Promotorbereiche, bestehend aus je 328 bp langen Sequenzen um die Maxima der signifikanten *Peaks* (*cookie cuts*).

Lediglich eines der sieben in Tabelle 2, Spalte 2 „AB31“ aufgelisteten Gene, *UMAG_01262*, welches für die DNA-Polymerase X kodiert, zeigt eine differentielle Regulation nach *b*-Induktion, bzw. gleichzeitiger Überexpression von *b* und Clp1 in Anwesenheit von *rbf1* im genomischen Hintergrund (Tabelle 2, Spalte 2 „AB31“ und Spalte 3 „AB31clp^{Ind}“). Bereits in Heimel *et al.*, 2010b konnte gezeigt werden, dass sowohl *b* als auch *Rbf1* ausreichend sind für eine Induktion von PolX. Darüber hinaus ist eine *Rbf1*-Bindestelle korrelierend mit der *bbs* im Promotor von PolX bestätigt (Faist, 2017). Im *rbf1*-Deletionshintergrund ist der regulatorische Effekt jedoch kaum noch nachweisbar (Tabelle 2, Spalte 4 „AB31Δ*rbf1*“ und Spalte 5 „AB31Δ*rbf1* clp1^{Ind}“). Trotz konservierter *bbs* im Promotorbereich ist hier nur ein signifikanter Clp1 Peak nachweisbar und keine bE Bindung bei gleichzeitiger Überexpression von *b* und Clp1. Alle anderen Gene (6 Gene) zeigen keinen signifikanten regulatorischen Effekt in den hier dargestellten Auswertungen der durchgeführten RNA-Seq Analysen. Sie werden weder durch *b*-Induktion in AB31 noch in AB31Δ*rbf1* induziert. Einen regulatorischen Effekt durch die Überexpression von Clp1 ist ebenfalls nicht nachweisbar.

2.1.2 Clp1 nimmt im Proteinkomplex mit bE/bW Einfluss auf die transkriptionelle Regulation des eigenen Promotors

Neben dem Gen *rbf1*, welches für den Masterregulator der pathogenen Entwicklung kodiert, ist auch *clp1* ein interessantes direkt *b*-reguliertes Gen mit pathogenitätsrelevanter Funktion. Durch die Überexpression von Clp1 unter einem nicht-nativen Promotor in den untersuchten Stämmen in den durchgeführten RNA-Seq Analysen konnte das unter dem nativen *clp1*-Promotor stehende Gen nicht auf den Effekt von Clp1 untersucht werden. Die transkriptionelle Regulation des nativen *clp1* vermittelt durch die Überexpression von Clp1 konnte mit Hilfe einer Real-time PCR Analyse aufgezeigt werden. Hierfür war es nötig, das unter dem nativen Promotor regulierte *clp1* von dem ektopisch induzierbaren *clp1*, für die Überexpression, unterscheiden zu können. Es wurde der Einfluss eines ektopisch integrierten, induzierbaren HA-markierten *clp1* Gens auf die bE/bW und Clp1 vermittelte Repression des nativen *clp1* Gens untersucht. Mit einem *rbf1* Deletionsstamms konnte gezeigt werden, dass die Regulation von *clp1* unabhängig von Rbf1 abläuft.

Mit spezifischen Primerpaaren (siehe Abbildung 15) war es möglich, das native *clp1* durch Primerbindung in der 3'UTR vom ektopisch integrierten HA-markierten *clp1* Gen durch Primerbindung im HA-Tag zu unterscheiden. Ein Standard Primerpaar im ORF von *clp1* ermöglicht die Ermittlung der Gesamttranskriptmenge beider *clp1* Gene. Durch Medienwechsel (siehe 4.2) wurde der Stamm AB31 (*a2 Δb::P_{crg1}:bW2, P_{crg1}:bE1*) als Kontrolle der *b*-vermittelten Induktion des nativen *clp1* Gens untersucht. Durch den Arabinose-induzierbaren *crg*-Promotor wurden kompatible *b*-Gene transkribiert und in der Folge der direkt *b*-induzierte native *clp1* Promotor aktiviert. Im Stamm UJU71.7 (*a2 Δb::P_{crg1}:bW2, P_{crg1}:bE1, ip'(P_{crg1}:clp1:3xHA)ip^s*) kommt es zusätzlich zur Induktion der kompatiblen *b*-Gene zu einer Überexpression von Clp1:HA. Durch erhöhte Transkriptmenge, kommt es zu Akkumulation von Clp1:HA-Protein, durch das ein regulatorischer Effekt von Clp1 nachweisbar gemacht werden konnte. Mit dem Stamm UJF29 (*a2 Δb::P_{crg1}:bW2, P_{crg1}:bE1, Δrbf, ip'(P_{crg1}:clp1:3xHA)ip^s*) konnte der regulatorische Effekt von Clp1 durch Überexpression unabhängig von Rbf1 betrachtet werden. Ein indirekter Effekt von Clp1 auf den nativen *clp1* Promotor, lediglich durch die bE/bW und Clp1-abhängige Repression von Rbf1, ist damit ausgeschlossen.

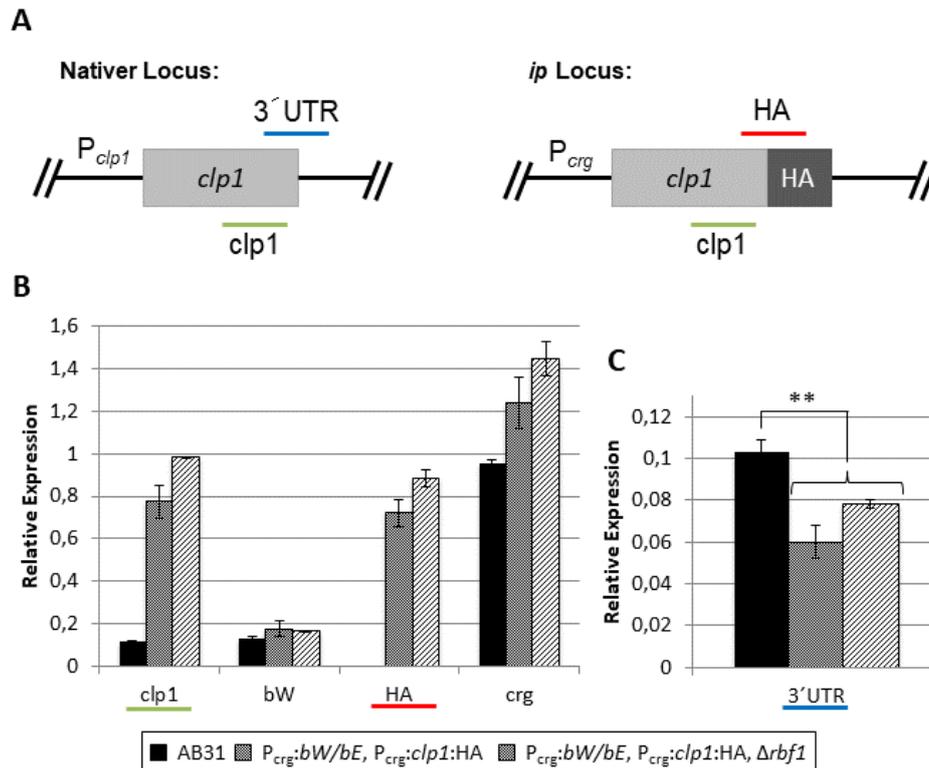


Abbildung 15: RT-PCR Analyse zeigt reprimierenden Effekt von Clp1 im bE/bW-Clp1-Proteinkomplex auf den *clp1* Promotor. **A:** Dargestellt ist der native *clp1* Locus, sowie das eingebrachte, induzierbare *clp1*:HA Konstrukt im spezifischen *ip* Locus. Gekennzeichnet sind die Amplifikate der in dieser RT verwendeten Primerpaare, um das nativ induzierte *clp1*, von dem zusätzlich eingebrachten *clp1*, gekoppelt mit HA, zu unterscheiden. Sowie ein allgemeines *clp1* Amplifikat, dass die Gesamtmenge an *clp1* Transkript von beiden im Genom befindlichen Genen darstellen kann. **B:** Angegeben sind die Expressionswerte für *bW*, *crg* und HA (Rot), um die Induktion der *crg*-Promotoren vor *b* sowie *clp1* im *ip* Locus zu überprüfen. Außerdem die Gesamttranskriptmenge (Grün) von beiden im Genom befindlichen *clp1* Genen. **C:** Angegeben ist die Genexpression im nativen *clp1* Locus (Blau), wobei ein spezifisch in der *clp1* 3'UTR Region bindender Primer verwendet wurde. Alle Stämme (AB31 *a2* $\Delta b::P_{crg1}:bW2, P_{crg1}:bE1$; UJU71.7 *a2* $\Delta b::P_{crg1}:bW2, P_{crg1}:bE1$, *ip*^r($P_{crg1}:clp1:3xHA$)*ip*^s; UJF29 *a2* $\Delta b::P_{crg1}:bW2, P_{crg1}:bE1, \Delta rbf$, *ip*^r($P_{crg1}:clp1:3xHA$)*ip*^s) sind 6 Stunden durch Medienwechsel induziert. Die Genexpression aller Stämme wurde zum Haushaltsgen Aktin normalisiert. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung (SD), zwischen den drei unabhängig induzierten biologischen Replikaten dar. Für die statistische Auswertung wurde ein *Student'scher* t-Test mit zweiseitiger Verteilung und zwei Stichproben bei gleicher Varianz aller getesteten Stämme zum Stamm AB31 durchgeführt (** $p \leq 0,01$).

Die in Abbildung 15 dargestellte Real-time PCR Analyse zeigt einen Effekt von Clp1 auf die Regulation des eigenen Promotors. In Abbildung 15, A sind schematisch die beiden *clp1* Gene in den unterschiedlichen Genloci dargestellt. Es ist das *clp1* Gen im natürlichen Locus unter dem nativen *clp1* Promotor (P_{clp1}) sowie das im *ip* Locus integrierte *clp1* Gen mit HA-Markierung unter dem Arabinose-induzierbaren *crg*-Promotor (P_{crg}) gezeigt. In Abbildung 15 B dargestellt, ist die Transkriptmenge von *bW*, wie auch der zusätzlichen Induktionskontrolle *crg* in allen für den Vergleich eingesetzten Stämmen ähnlich. Ein Einfluss, durch unterschiedliche b-Level auf die Induktion des direkt *b*-regulierten nativen *clp1* Promotor ist damit ausgeschlossen. Die

zusätzliche, ektopische Induktion des HA-markierten *clp1* wurde mit einem spezifisch im HA-Tag bindenden Primer nachgewiesen (HA). Die Expressionslevel in den beiden Stämmen mit zusätzlich induzierbarem HA-markiertem *clp1* sind ebenfalls vergleichbar. Die Gesamtmenge an *clp1* Transkript (Clp1) ist in den beiden Stämmen mit zusätzlich induziertem *clp1* mit 0,8 bzw. 1, 8-10 mal höher verglichen mit 0,1 für das nur über *b*-induzierte native *clp1* im AB31 Stamm. Der Effekt auf den nativen Locus ist in Abbildung 15 C dargestellt. Ein spezifischer in der 3'UTR bindende Primer bestimmt den Anteil an nativem *clp1*. Vergleicht man die *b*-vermittelte Induktion des nativen *clp1* (0,1) in AB31 mit den Transkriptmengen in den Stämmen mit zusätzlich induziertem *clp1* (0,06 bzw. 0,08), ist ein signifikanter Effekt auf den nativen *clp1* Promotor nachweisbar. Bei einer erhöhten Expression von Clp1 ist ein reprimierender Effekt auf den nativen Locus, auch im getesteten *rbf1*-Deletionshintergrund, zu sehen. Rfb1 hat damit keinen Einfluss auf die Clp1 vermittelte Repression des *clp1* Gens, da der Effekt sich in Verbindung mit den Chip-Seq Daten aus 2.1.1 ausschließlich auf eine Repression durch den Proteinkomplex aus bE/bW und Clp1 zurückführen lässt.

2.2 Der zentrale Bereich von Clp1 hat Einfluss auf das Proteinlevel und die Funktion des Proteins

In vorangegangenen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass ein zentraler Bereich des 446 AS langen Clp1-Proteins einen Einfluss auf die Proteinabundanz aufweist. In Trognitz, 2014 wurde mit Hilfe von Clp1:GFP-Fusionskonstrukten mit C-, sowie N-terminalen Verkürzungen von Clp1, die Proteinstabilität durch mikroskopische Auswertung der GFP-Signale analysiert. Ein stabiles GFP-Signal konnte detektiert werden, sobald über C-, oder N-terminale Verkürzungen der zentrale Proteinbereich deletiert wurde. Anschließend wurde eine interne Deletion des potentiell destabilisierenden Bereiches (AS 213 - 279) in einem Clp1:GFP-Fusionskonstrukt durchgeführt und ein positiver Effekt auf die Stabilität ermittelt. Weiter wurde ein GFP-Fusionsprotein mit dem 66 AS langen ermittelten Proteinfsegment erstellt und ein negativer Effekt auf die GFP Stabilität mikroskopisch bestätigt (Trognitz, 2014). Um den für die Destabilisierung verantwortliche Bereich weiter einzugrenzen, wurde der zentrale Proteinabschnitt genauer betrachtet und kleinere Bereiche innerhalb dieses Abschnittes im Clp1-Protein deletiert, sowie nach interessanten und für den destabilisierenden Effekt relevanten Domänen untersucht.

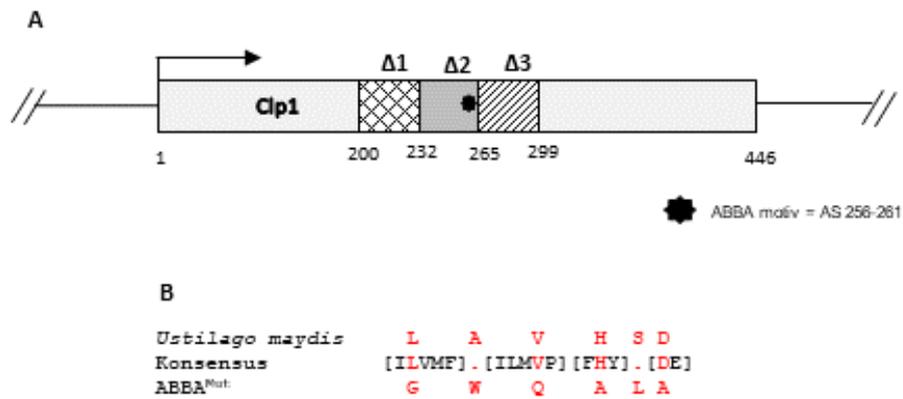


Abbildung 16: Struktur des *clp1* Gens. **A:** Schematische Darstellung des *clp1* Locus. Eingezeichnet sind die drei in dieser Arbeit untersuchten Deletionsbereiche $\Delta 1$, $\Delta 2$ und $\Delta 3$, sowie das ABBA Motiv. **B:** Gezeigt ist der in der Literatur angegebene Konsensus für das bearbeitete ABBA Motiv, sowie die in *Ustilago maydis* vorkommenden Aminosäuren für das ABBA Motiv und die eingebrachte mutierte Sequenz.

Hierfür wurde der zentrale potentiell destabilisierende Bereich (AS 200 - 299) für weitere Deletionsanalysen nochmals in drei Bereiche unterteilt. Die entsprechenden Deletions-Derivate sind in Abbildung 16 dargestellt. Deletionsbereich 1 ($\Delta 1$) entspricht einer Deletion der AS 200 bis 232, Deletionsbereich 2 ($\Delta 2$) zeigt einer Deletion der AS 233 bis 265, Deletionsbereich 3 ($\Delta 3$) entspricht einer Deletion der AS 266 bis 299. Des Weiteren wurde eine Motivsuche mit ELM (*The eukaryotic linear motif resource for functional sites in proteins*) durchgeführt, um für die Funktion der Proteinstabilisierung relevante Motive in dem angegebenen Bereich zu finden.

Das bioinformatisch postulierte ABBA Motiv im Clp1-Protein (AS 256 – 261; p -value = $3,8 \times 10^{-4}$) von *U. maydis* weist eine konservierte Aminosäuresequenz (LAVHSD, Abbildung 16) auch in den nahen Verwandten auf (Abbildung 17). Das ABBA Motiv ist in Eukaryoten durch den Konsensus [FILV]x[ILV][FHY]x[DE] definiert (Di Fiore *et al.*, 2015).

Ustilago maydis	T	E	I	F	L	S	A	N	K	D	Y	L	L	S	Q	V	I	P	G	Q	P	L	P	E	T	V	P	I	D	V	T	D	L	V	S	T	L	Q	R	P	P	T	H	L	A	V	H	S	D	R	E	A	A	T	L	Y	A	I	H	
Sporisorium reilianum	T	E	T	F	L	N	A	N	R	D	Y	L	L	S	C	I	V	P	G	E	P	L	P	E	T	I	P	L	D	V	T	E	W	I	S	T	L	Q	R	P	P	T	H	L	A	V	H	S	D	S	E	A	A	T	L	Y	A	V	H	
Sporisorium scitamineum	T	E	T	F	L	N	A	N	R	D	Y	L	L	S	R	I	V	P	G	E	P	L	P	E	S	I	P	L	D	V	T	E	W	V	S	T	L	Q	R	P	P	T	H	L	A	V	H	S	D	S	E	A	A	T	L	Y	A	V	H	
Ustilago trichophora	T	L	N	F	L	D	A	N	R	D	N	I	M	A	S	V	I	P	G	Q	S	L	P	E	S	V	P	L	D	V	T	A	W	V	D	T	F	O	R	P	P	T	H	L	A	V	H	S	D	S	E	A	A	T	L	Y	A	V	H	
Ustilago esculenta	T	L	N	F	L	E	V	N	R	V	N	I	M	A	N	V	L	P	G	E	S	L	P	E	S	V	P	L	D	V	T	C	W	I	E	S	E	F	O	R	P	P	T	H	L	A	V	H	S	D	S	E	A	A	T	L	Y	A	V	H
Sporisorium graminicola	T	E	T	F	L	H	A	N	K	H	F	L	L	S	Q	I	L	P	G	E	P	L	P	E	R	I	P	L	D	V	T	E	W	V	S	T	L	Q	P	P	T	H	L	A	V	H	S	D	S	E	A	A	T	L	Y	A	V	H		
Ustilago bromivora	T	S	T	F	L	H	A	N	G	E	T	I	T	A	H	V	K	P	G	Q	S	L	P	V	S	V	P	V	D	V	T	A	L	I	N	T	L	Q	V	P	P	T	H	L	A	V	H	S	D	N	E	E	A	K	L	Y	V	V	H	
Ustilago hordei	T	S	T	F	L	H	A	N	G	E	T	I	T	A	H	V	K	P	G	Q	S	L	P	V	S	V	P	V	D	V	T	A	L	I	N	T	L	Q	V	P	P	T	H	L	A	V	H	S	D	N	E	E	A	K	L	Y	A	V	H	

Abbildung 17: Multiples Alignment von Clp1 im Bereich des ABBA Motives von *Ustilago maydis* und verwandten Arten. Das Alignment zeigt eine stark konservierte Region im Bereich des ABBA Motives im Clp1-Protein von *Ustilago maydis* und homologen Proteinen von nahen Verwandten. Der sechs Aminosäuren lange Konsensus des ABBA Motives liegt stark konserviert vor.

Erstmals wurde das ABBA Motiv bioinformatisch als SLiM (*short linear motif*) in Cyclin A, BUBR1, BUB1 und Acm1 (ABBA), als Mediator für die Bindung zwischen mitotischen Regulatoren und den APC/C Co-Aktivatoren Cdc20 und Cdh1, beschrieben (Di Fiore et al., 2015).

2.2.1 Der zentrale Bereich von Clp1 beeinflusst die Proteinabundanz

Um den vermuteten destabilisierenden Effekt der untersuchten Bereiche ($\Delta 1$, $\Delta 2$ und $\Delta 3$) sowie der eingebrachten Mutation (ABBA^{Mut}) auf das Clp1-Protein zu überprüfen, wurden die Gene für GFP-Fusionsproteine mit den Clp1-Deletions-Varianten in den *clp1* Locus eingebracht und unter dem nativen Promotor von *clp1* induziert. Um den Einfluss der Deletions-Varianten auf die Proteindegradation zu untersuchen, wurde eine Zeitreihe durchgeführt. Für dieses Experiment wurden die Stämme UJF75 (*a2 Δb ::P_{crg1}:bW2, P_{crg1}:bE1, clp1::GFP*), UJF79 (*a2 Δb ::P_{crg1}:bW2, P_{crg1}:bE1, clp1 $\Delta 2$::GFP*), UJF83 (*a2 Δb ::P_{crg1}:bW2, P_{crg1}:bE1, clp1 $\Delta 3$::GFP*), UJF84 (*a2 Δb ::P_{crg1}:bW2, P_{crg1}:bE1, clp1 $\Delta 1$::GFP*) und UJF125 (*a2 Δb ::P_{crg1}:bW2, P_{crg1}:bE1, clp1_ABBA^{Mut}::GFP*) mit einem nativen Volllängen-Clp1, den drei internen Deletionen oder dem mutierten ABBA Motiv in Clp1 (siehe Abbildung 16), verwendet. Über einen Medienwechsel (siehe 4.2) wurden die kompatiblen *b*-Gene induziert und daraus resultierend die Clp1:GFP-Fusionen unter dem direkt *b*-induzierten nativen Promotor von *clp1*. Nach 6 Stunden wurde 100 $\mu\text{g/ml}$ Cycloheximid zugegeben, um die ribosomale Proteinbiosynthese zu hemmen und in der folgenden Zeitreihe die Proteinstabilisierung beurteilen zu können. Zeitgleich mit der Cycloheximidzugabe wurde die Probe zum Zeitpunkt 0 genommen (T_0), anschließend nach 15 (T_{15}) und 45 (T_{45}) Minuten. Alle Proben wurden mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Westernblot analysiert.

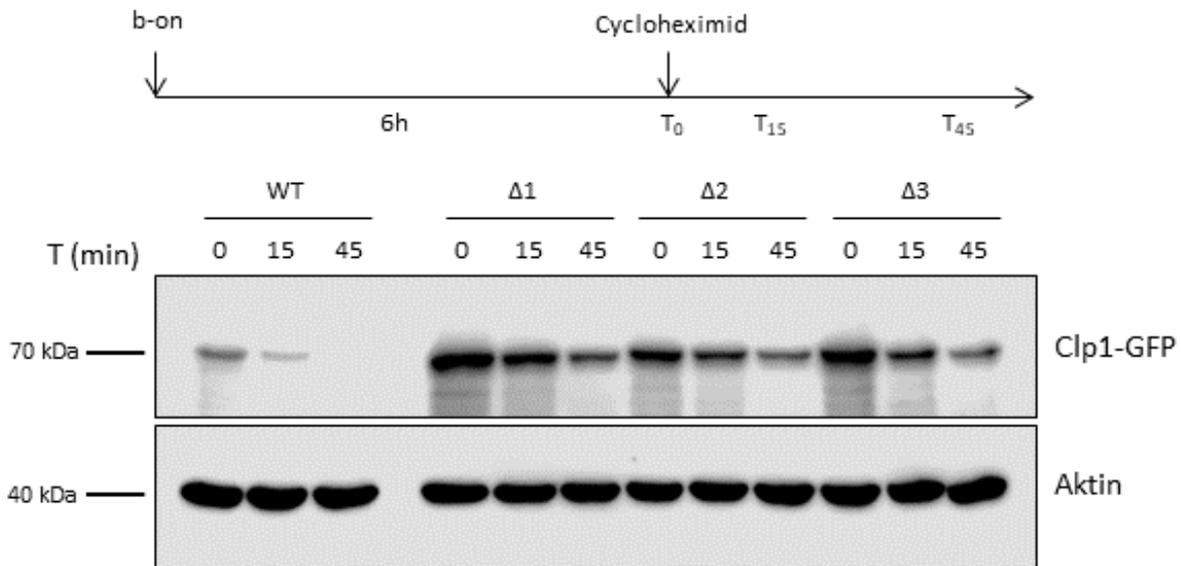


Abbildung 18: Proteinabbau von Clp1 nach Cycloheximidbehandlung ist in allen Clp1-Deletions-Varianten vergleichbar. Die GFP-Fusionsproteine mit den Clp1-Deletions-Varianten wurden in den nativen Locus von *clp1* eingebracht. Nach 6 Stunden *b*-Induktion, respektive Aktivierung des *b*-regulierten nativen Promotors von *clp1* durch Medienwechsel bei $OD_{600} = 0,8$ wurden die Stämme mit 100 $\mu\text{g/ml}$ Cycloheximid behandelt, um die ribosomale Proteinbiosynthese zu hemmen. Die Proben wurden 0, 15 und 45 Minuten nach Cycloheximidbehandlung entnommen. Der Clp1:GFP Abbau wurde mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Westernblot analysiert und mittels GFP Antikörpers detektiert. Als Ladekontrolle und zur Normalisierung der Bandenstärke wurde Aktin ebenfalls detektiert. Nach Auswertung von 3 biologischen Replikaten konnte kein signifikanter Unterschied in der Abbaurrate der Deletionsstämme (UJF 84 *a2 Δb::P_{crg1}:bW2, P_{crg1}:bE1, clp1Δ1:GFP*, UJF79 *a2 Δb::P_{crg1}:bW2, P_{crg1}:bE1, clp1Δ2:GFP* und UJF83 *a2 Δb::P_{crg1}:bW2, P_{crg1}:bE1, clp1Δ3:GFP*) im Vergleich zum WT (UJF75 *a2 Δb::P_{crg1}:bW2, P_{crg1}:bE1, clp1:GFP*) gezeigt werden. Dasselbe Resultat konnte ebenfalls für den Stamm mit eingebrachter Mutation (UJF125 *a2 Δb::P_{crg1}:bW2, P_{crg1}:bE1, clp1_ABBA^{Mut}:GFP*) gezeigt werden (Ergebnis nicht dargestellt).

Wie in Abbildung 18 zu sehen, ist mehr Clp1:GFP-Protein in den Stämmen mit eingebrachten Deletionen im Clp1-Protein nachweisbar. Zu allen getesteten Zeitpunkten T_0 , T_{15} und T_{45} ist in den gezeigten Stämmen mit eingebrachten Deletionsbereichen ($\Delta 1$, $\Delta 2$ und $\Delta 3$) eine erhöhte Proteinmenge im Vergleich zum WT detektierbar. Durch die Auswertung der Bandenstärke (4.6.3) in biologischen Triplikaten und die Normalisierung über das gezeigte Aktinsignal, konnte jedoch kein signifikanter Unterschied in der Abbaugeschwindigkeit der unterschiedlichen Stämme nachgewiesen werden. Ein vergleichbares Ergebnis konnte auch für den Stamm mit eingebrachter Mutation (ABBA^{Mut}) gezeigt werden (Ergebnis nicht dargestellt). Weitergehende Analysen zur Expression der GFP-Fusionsproteine mit den Clp1-Deletions-Varianten unter dem nativen *clp1* Promotor zeigen einen steigenden Effekt auf die *clp1* Transkriptmenge in den Deletionsstämmen sowie dem Mutationsstamm

nach *b*-Induktion (Abbildung 20). Das erhöhte Proteinlevel könnte daher lediglich ein Resultat der erhöhten Transkriptmenge sein.

Um einen regulatorischen Effekt auf den nativen Promotor auszuschließen wurden die GFP-Fusionsproteine mit den Clp1-Deletions-Varianten unter einem konstitutiv aktiven Promotor exprimiert. Eine vergleichbare Transkriptmenge von *clp1* durch den konstitutiven Promotor wurde mittels Real-time PCR Analyse in den Stämmen mit unterschiedlichen Clp1-Deletions-Varianten überprüft und in Abbildung 19 dargestellt. Die Proteinproben wurden über die OD₆₀₀ normalisiert und mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Western Blot analysiert.

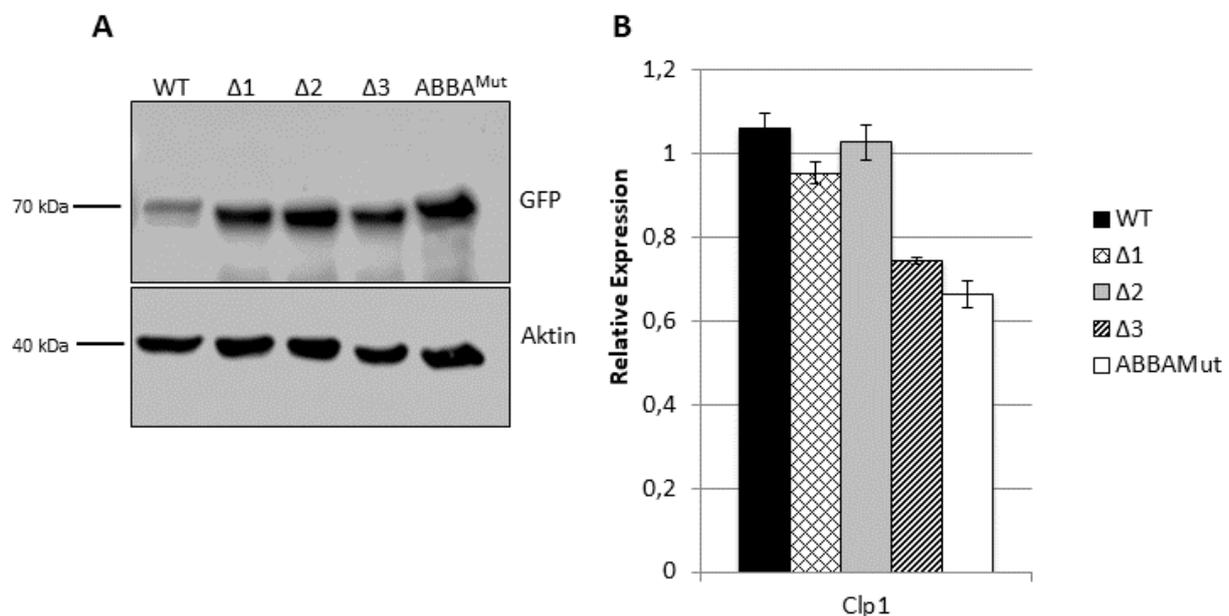


Abbildung 19: Proteininstabilisierung durch eingebrachte Deletionen bzw. Mutation von Clp1, bei vergleichbarer Transkriptmenge. **A:** Westernblot, der unterschiedlichen Clp1-Varianten mit C-terminaler GFP-Fusion unter einem konstitutiv aktiven Promotor. Der WT (UJF110 *a2 Δb::P_{crg1}:bW2, P_{crg1}:bE1, ip'(P_{otef}:clp1:GFP)ip^s*) zeigt eine deutlich schwächere Proteinbande, als die Stämme mit internen Deletionen (UJF114 *a2 Δb::P_{crg1}:bW2, P_{crg1}:bE1, ip'(P_{otef}:clp1Δ1:GFP)ip^s*, UJF 117 *a2 Δb::P_{crg1}:bW2, P_{crg1}:bE1, ip'(P_{otef}:clp1Δ2:GFP)ip^s* und UJF119 *a2 Δb::P_{crg1}:bW2, P_{crg1}:bE1, ip'(P_{otef}:clp1Δ3:GFP)ip^s*) oder Mutation (UJF152 *a2 Δb::P_{crg1}:bW2, P_{crg1}:bE1, ip'(P_{otef}:clp1_ABBA^{Mut}:GFP)ip^s*) in Clp1, bei vergleichbarem Aktinsignal. Der Westernblot wurde mit einem GFP Antikörper gegen die Fusionsproteine entwickelt. **B:** Gezeigt sind die Clp1 Expressionswerte relativ zum Haushaltsgen eIF2b. Alle Stämme zeigen eine vergleichbare Clp1 Expression.

Wie in Abbildung 19 zu sehen, ist bei einer vergleichbaren Genexpression (B) ein deutlich höheres Proteinlevel in Abbildung 19 A in allen gezeigten Deletionsstämmen (Δ1, Δ2 und Δ3) sowie in dem verwendeten Mutationsstamm (ABBA^{Mut}) detektierbar, verglichen zu dem mitgeführten Wildtypstamm, der ein Fusionsprotein aus dem Vollängen-Clp1-Protein mit Fluoreszenzprotein GFP trägt (WT).

2.2.2 Der zentrale Bereich von Clp1 ist für die bE/bW-Clp1-abhängige transkriptionelle Regulation notwendig

Wie bereits mehrfach beschrieben, ist die Interaktion der Proteine bE/bW und Clp1 notwendig, um einen regulatorischen Effekt auszuüben. Die meisten direkt *b*-abhängig induzierten Gene werden im Laufe der pathogenen Entwicklung durch die Bindung des bE/bW Heterodimers in Verbindung mit Clp1 reprimiert. Zu diesen Genen zählen auch der Masterregulator der pathogenen Entwicklung *rbf1*, sowie *clp1* selbst. Die Repression des Transkriptionsfaktors Rbf1 ist einer der wichtigsten regulatorischen Effekte während der Etablierung der pathogenen Entwicklung, da durch die direkte Repression des Regulators über bE/bW und Clp1 die weitere Induktion der Klasse 2 Gene über Rbf1 verhindert wird.

Um den Einfluss der eingebrachten Clp1-Varianten auf die transkriptionelle Regulation von direkt *b*-regulierten Genen zu untersuchen, wurden GFP-Fusionsproteine mit den Clp1-Deletions-Varianten (WT, $\Delta 1$, $\Delta 2$, $\Delta 3$ und ABBA^{Mut}) in den *clp1*-Locus eingebracht. Über Medienwechsel (siehe 4.2) wurde das bE/bW Heterodimer induziert und folglich die über den direkt *b*-induzierten, nativen *clp1* Promotor regulierten Clp1-Varianten. Mittels Real-time PCR Analyse wurde der Einfluss der verschiedenen Clp1-Deletions-Varianten auf die direkt *b*-induzierten Gene *rbf1* und *clp1* in den Stämmen UJF75 (*a2* $\Delta b::P_{crg1}:bW2$, $P_{crg1}:bE1$, *clp1:GFP*), UJF 84 (*a2* $\Delta b::P_{crg1}:bW2$, $P_{crg1}:bE1$, *clp1* $\Delta 1:GFP$), UJF79 (*a2* $\Delta b::P_{crg1}:bW2$, $P_{crg1}:bE1$, *clp1* $\Delta 2:GFP$), UJF83 (*a2* $\Delta b::P_{crg1}:bW2$, $P_{crg1}:bE1$, *clp1* $\Delta 3:GFP$) und UJF125, sowie UJF126 (beide *a2* $\Delta b::P_{crg1}:bW2$, $P_{crg1}:bE1$, *clp1*_ABBA^{Mut}:*GFP*) überprüft. Als Kontrollstamm wurde eine Deletion des kompletten ORFs von *clp1* in UMS12 (*a2* $\Delta b::P_{crg1}:bW2$, $P_{crg1}:bE1$, $\Delta clp1$) mitgeführt. Durch die direkt *b*-abhängige Induktion des *clp1* Promotors und die Überexpression von bE/bW durch den *crg*-Promotor, kommt es ebenfalls zu einer erhöhten *clp1* Induktion und damit zur Akkumulation von Clp1-Protein, dass einen regulatorischen Effekt nachweisbar macht.

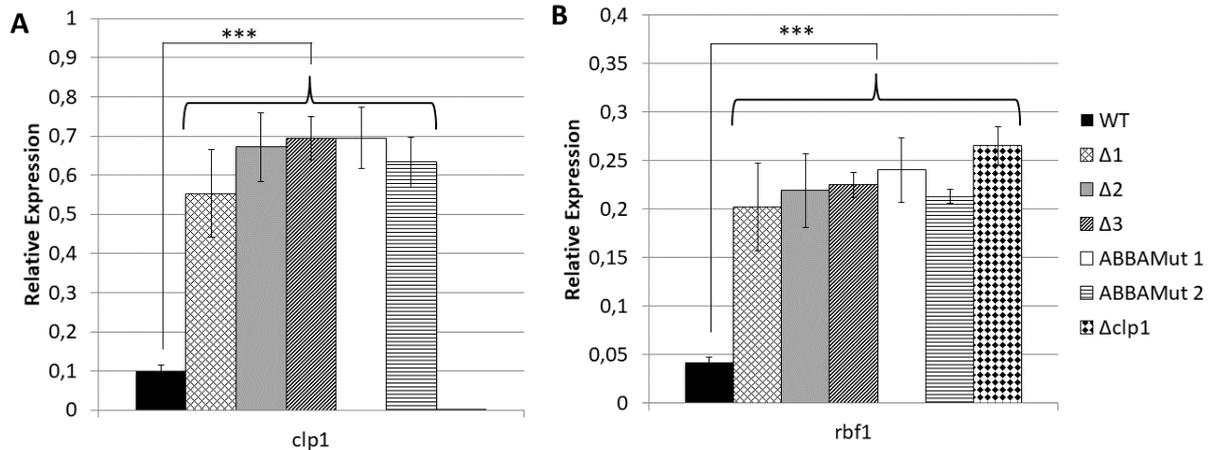


Abbildung 20: RT-PCR Analyse zeigt fehlenden repressorischen Effekt von Clp1 in Stämmen mit Clp1-Deletions-Varianten auf die Genexpression von *clp1* und *rbf1*. Untersuchung der relativen Genexpression von *clp1* (A) und *rbf1* (B) in 6 Stunden *b*-induzierten Stämmen, mit unterschiedlichen Clp1-Deletions-Varianten in Locus. Der WT (UJF75 *a2 Δb::P_{crp1}:bW2, P_{crp1}:bE1, clp1::GFP*) Stamm enthält ein Vollängen-Clp1-Protein, die in dieser Arbeit erstellten Stämme tragen interne Deletionen (UJF 84 *a2 Δb::P_{crp1}:bW2, P_{crp1}:bE1, clp1Δ1::GFP*, UJF79 *a2 Δb::P_{crp1}:bW2, P_{crp1}:bE1, clp1Δ2::GFP* und UJF83 *a2 Δb::P_{crp1}:bW2, P_{crp1}:bE1, clp1Δ3::GFP*), sowie eine Mutation im ABBA Motiv des Clp1-Proteins. Als Kontrollstamm wurde ein bereits bestehender Stamm UMS12 (*a2 Δb::P_{crp1}:bW2, P_{crp1}:bE1, Δclp1*) mit einer Deletion des kompletten *clp1* ORFs verwendet. Dargestellt ist der Mittelwert aus drei unabhängig induzierten Versuchsreihen. Die beiden Stämme mit der Mutation (UJF125, UJF126; beide *a2 Δb::P_{crp1}:bW2, P_{crp1}:bE1, clp1_ABBA^{Mut}::GFP*) stellen biologische Duplikate dar. Alle Stämme (jedes Replikat) wurden zum Haushaltsgen Aktin normalisiert. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung (SD) zwischen den drei unabhängig induzierten Replikaten dar. Für die statistische Auswertung wurde ein *Student'scher* t-Test mit zweiseitiger Verteilung und zwei Stichproben bei gleicher Varianz aller getesteten Stämme zum WT durchgeführt (***) $p \leq 0,008$

Wie in Abbildung 20 zu sehen, zeigen die Real-time PCR Ergebnisse für die beiden direkt *b*-abhängig induzierten sowie *bE/bW* und Clp1-abhängig reprimierten Gene, *clp1* und *rbf1*, eine vergleichbare Tendenz. In Abbildung 20 links ist die relative Expression von *clp1* jeweils zum Haushaltsgen Aktin dargestellt. Der in schwarz dargestellte WT mit einem Vollängen-Clp1 zeigt eine deutlich geringere Expression als alle getesteten Clp1-Varianten ($\Delta 1$, $\Delta 2$, $\Delta 3$ und ABBA^{Mut}). Alle Stämme mit interner Deletion oder eingebrachter Mutation in Clp1 zeigen eine 5 bis 7 mal höhere Expression des *clp1* Gens nach 6 Stunden Induktion über *b* und weisen damit einen signifikanten Unterschied auf. Der Kontrollstamm $\Delta clp1$ weist wie erwartet keine *clp1* Expression auf. In Abbildung 20 rechts ist ein vergleichbares Expressionsmuster für das *rbf1* Gen zu sehen. Auch hier zeigt der in schwarz dargestellte WT mit einem Vollängen-Clp1-Protein eine deutlich geringere relative Expression verglichen zu allen getesteten Clp1-Deletions-Varianten. Der Kontrollstamm mit Deletion des kompletten ORFs von *clp1* zeigt eine ähnliche Expression wie die in dieser Arbeit erstellten Stämme mit internen Deletionen oder Mutation im ABBA Motiv im Clp1-Protein ($\Delta 1$, $\Delta 2$, $\Delta 3$ und ABBA^{Mut}). Die Clp1-Deletions-Varianten, sowie der Kontrollstamm $\Delta clp1$

haben eine 3 bis 5 fach höhere *rbf1* Expression verglichen zum WT nach 6 Stunden Induktion und weisen damit einen signifikanten Unterschied auf.

2.2.3 Der zentrale Bereich von Clp1 ist notwendig für die indirekte Proteinbindung von Clp1 an die DNA

Die in Abschnitt 2.2.2 ermittelte fehlende transkriptionelle Regulation nach Einbringen der internen Deletionen oder der Mutation im ABBA Motiv von Clp1, lassen auf einen Funktionsverlust der Clp1 Repression schließen. Im nächsten Experiment, einer quantitativen ChIP Analyse, wurde die Bindung der b-Proteine und des Clp1-Proteins mit den eingebrachten Clp1-Deletions-Varianten quantitativ überprüft. Ein Verlust der transkriptionellen Regulation geht sehr oft mit der fehlenden Bindung an den zu regulierenden Promotorregionen einher. Die Induktion der Stämme und die Fixierung und Isolierung des Chromatins wurde, wie in 4.6.4 beschrieben, auch für die quantitative ChIP Analyse durchgeführt. Das fixierte Chromatin wurde isoliert und mittels Ultraschallbad in ca. 250 bp große DNA Abschnitte zerkleinert. Das identische, präparierte Chromatin wurde parallel in eine Präzipitation mit bE sowie eine Präzipitation mit Clp1 eingesetzt. Nach der durchgeführten Chromatin-Immunpräzipitation wurde das angereicherte Chromatin aufgereinigt und in einer Real-time PCR eingesetzt. Die Promotorbereiche der beiden Gene *clp1* und *rbf1* wurden genauer analysiert. Wie in Abbildung 21 am Beispiel des *rbf1* Promotors dargestellt, wurde als Negativkontrolle und damit Sicherung einer spezifischen Anreicherung ein Primerpaar verwendet, das ein Amplifikat am Ende des *rbf1* ORF generiert. Das gekennzeichnete Primerpaar *bbs* amplifiziert ein ca. 100 bp langen Bereich des *rbf1* Promotors, der die Bindestelle des bE/bW Heterodimers enthält sowie die indirekte Bindung von Clp1 an der DNA abdeckt.

Für diesen und weitere Versuche wurden ausschließlich Stämme mit interner Deletion 3 sowie mit mutiertem ABBA Motiv verwendet. Der Stamm mit mutiertem ABBA Motiv stellt die kleinste Veränderung im Vergleich zum nativen Clp1-Protein mit aussagekräftigem Effekt dar. Der Stamm mit der internen Deletion 3 wurde als Representant für alle internen Deletionen in den Versuchsteilen überprüft. Es wurden die Stämme UJF167 (*a2 Δb::P_{crp1}:bW2, P_{crp1}:bE1:3xHA, Δclp1::gen^R; ip'(P_{otef}:clp1Δ3:GFP)ip^S*), UJF168 (*a2 Δb::P_{crp1}:bW2, P_{crp1}:bE1:3xHA, Δclp1::gen^R; ip'(P_{otef}:clp1_ABBA^{Mut})ip^S*) und UJF170 (*a2 Δb::P_{crp1}:bW2, P_{crp1}:bE1:3xHA,*

$\Delta clp1::gen^R$; $ip^r(P_{otef}:clp1:GFP)ip^s$ als Kontrollstamm verwendet. Die GFP-Fusionsproteine mit den Clp1-Deletions-Varianten wurden unter einem konstitutiven Promotor exprimiert und anschließend mit GFP-gekoppelten Beads immunopräzipitiert. In allen Stämmen war jeweils ein HA-markiertes bE1-Fusionsprotein unter einem induzierbaren *crg*-Promotor für eine weitere Immunopräzipitation eingebracht. Mit dieser zusätzlichen IP kann ein Einfluss der Deletion oder Mutation im Komplexbpartner Clp1 auf die Bindung des bE/bW Heterodimers überprüft werden.

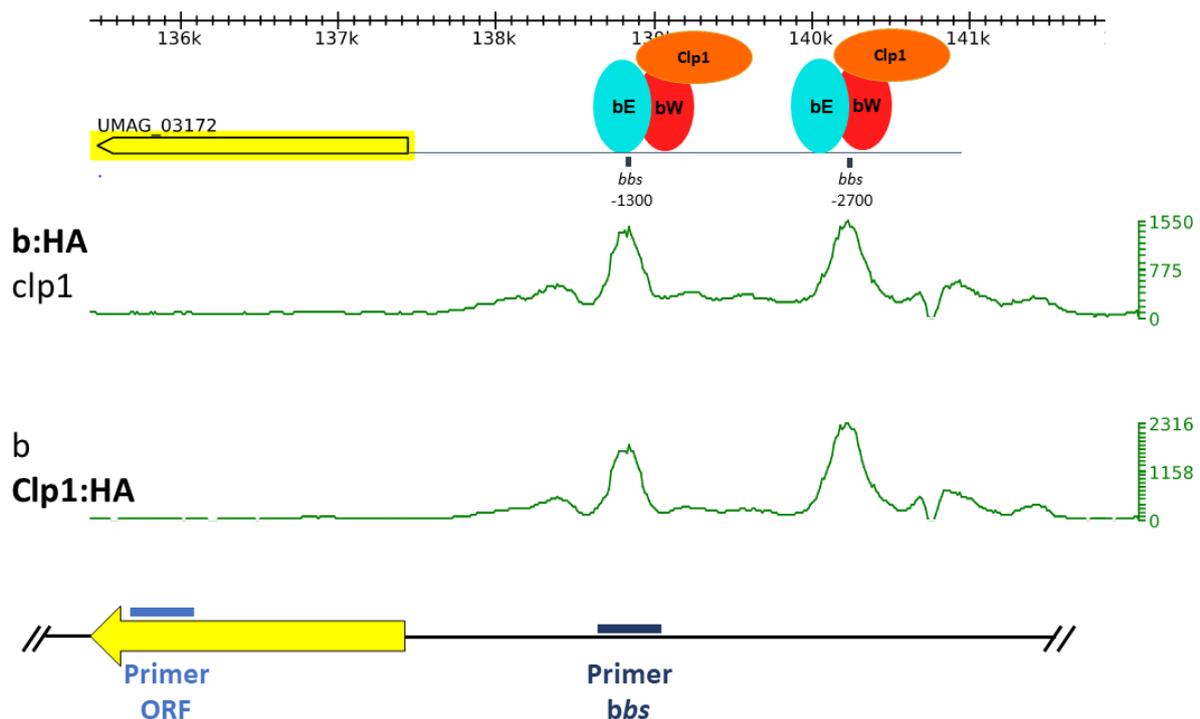


Abbildung 21: Schematische Darstellung der Amplifikate der verwendeten Primerpaare und *bbs* für quantitative ChIP-Seq Analyse. Graphisch dargestellt ist ein ChIP-Seq Datensatz nach b (b:HA) und Clp1 (Clp1:HA) Immunopräzipitation am *rbf1* Promotor. Schematisch angezeigt sind die anhand der Daten ermittelten Bindestellen des bE/bW-Clp1-Proteinkomplexes im *rbf1* Promotor. Unter dem Datensatz dargestellt ist der in der quantitativen ChIP-Seq Analyse amplifizierte Bereich durch das Primerpaar *bbs* (Dunkelblau), direkt an der, mittels FIMO Abfrage, ermittelten *bbs* im Promotorbereich und der amplifizierte Bereich durch das Primerpaar ORF (Hellblau) als Kontrollprimer für eine spezifische Anreicherung.

In Abbildung 22 und Abbildung 23 dargestellt ist die quantitative ChIP am *clp1* bzw. *rbf1* Promotor, durchgeführt mit zwei unabhängig präparierten und immunopräzipitierten Chromatinproben des selben Stammhintergrundes (I und II). In beiden Abbildungen ist jeweils links in den Diagrammen die Bindung von bE1:HA am Promotor nach Präzipitation mit HA dargestellt. In beiden Abbildungen jeweils rechts ist die indirekte Bindung von Clp1:GFP über das bE/bW Heterodimer an den Promotor

nach Präzipitation mit GFP gezeigt. Die Normalisierung über das Haushaltsgen Aktin eliminiert kleine Schwankungen auf Grund von RT-Effizienz oder der eingesetzten DNA Menge zwischen den einzelnen Proben. Alle Angaben zeigen die relative Anreicherung der durchgeführten IP zum eingesetzten Extrakt vor der Immunopräzipitation (Input). Die Induktionskontrolle zu allen Stämmen ist in Abbildung 41 im Anhang dargestellt.

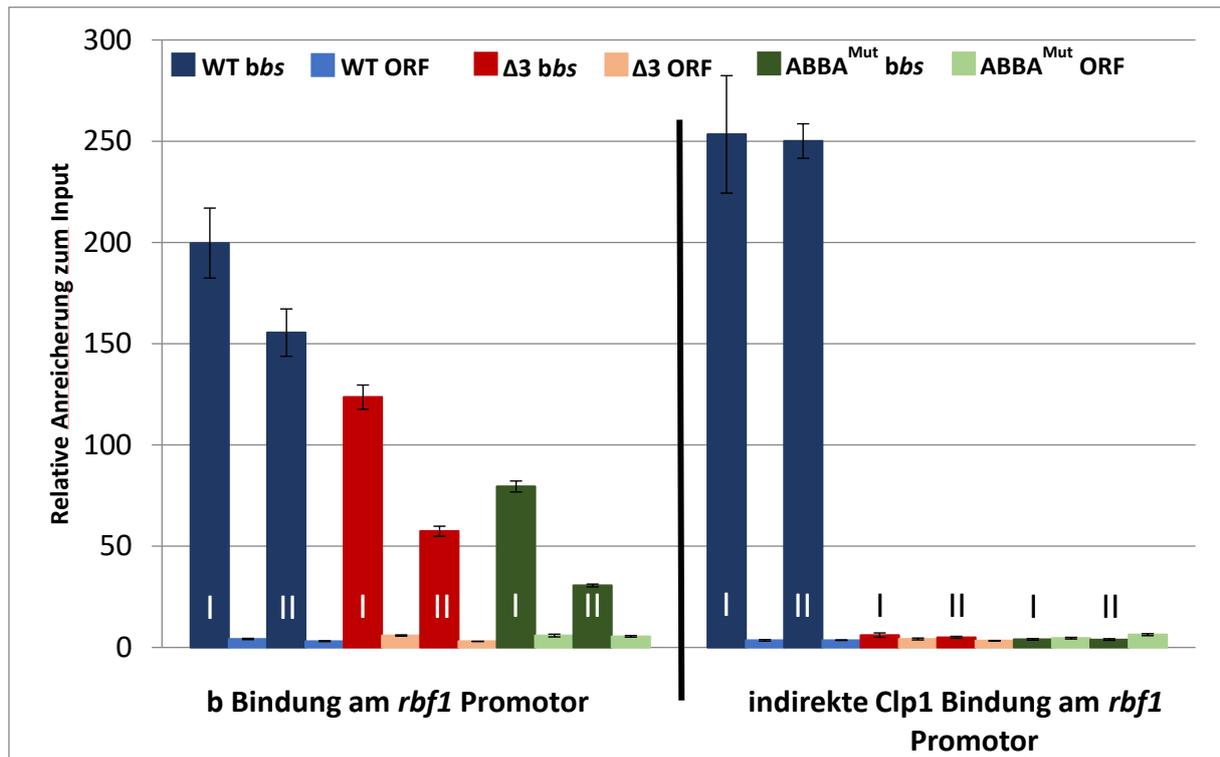


Abbildung 22: Quantitative ChIP-Seq Analyse zeigt eine fehlende Bindung von Clp1 über b an die DNA in den Stämmen mit Clp1-Deletions-Varianten im *rbf1* Promotorbereich. Angegeben ist die relative Anreicherung der durchgeführten IP zum Extrakt vor der Immunopräzipitation (Input), die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung zweier technischer Replikate in der Real-time PCR Auswertung. Dargestellt sind zwei unabhängig induzierte und immunopräzipitierte Versuchsreihen, gekennzeichnet mit I und II. Verwendet wurde der Kontrollstamm UJF170 ($a2 \Delta b::P_{crg1}:bW2, P_{crg1}:bE1:3xHA, \Delta clp1::gen^R; ip'(P_{otef}:clp1:GFP)ip^S$), die Stämme UJF167 ($a2 \Delta b::P_{crg1}:bW2, P_{crg1}:bE1:3xHA, \Delta clp1::gen^R; ip'(P_{otef}:clp1\Delta 3:GFP)ip^S$) mit interner Deletion 3 im Clp1-Protein und UJF168 ($a2 \Delta b::P_{crg1}:bW2, P_{crg1}:bE1:3xHA, \Delta clp1::gen^R; ip'(P_{otef}:clp1_ABBA^{Mut})ip^S$) mit eingebrachter Mutation im ABBA Motiv von Clp1. Links, die Bindung von bE1:HA am *rbf1* Promotor. Rechts, die indirekte Bindung von Clp1:GFP über das bE/bW Heterodimer an den *rbf1* Promotor. Die verwendeten Stämme tragen ein HA-markiertes bE1 und ein GFP-Tag an der jeweiligen Clp1-Variante, um mit demselben aufbereiteten Chromatin beide Immunopräzipitationen durchführen zu können. Der Kontrollstamm trägt die Vollängen-Clp1:GFP-Fusion, der Stamm Δ3 die interne Deletion 3 in Clp1 fusioniert an GFP und der Stamm ABBA^{Mut} die Mutation im ABBA Motiv in Clp1 fusioniert an GFP. Das bE1-Protein ist in allen Stämmen unverändert. Das verwendete Primerpaar *bbs* amplifiziert einen ca. 100 bp großen Bereich des *rbf1* Promotors, der die Bindestelle des bE/bW Heterodimers enthält und ebenfalls einen signifikanten Clp1 *Peak* abdeckt. Die Kontrollprimer ORF amplifizieren einen Bereich am Ende des *rbf1* ORF, welcher durch das Scheren des Chromatins in ca. 250 bp große Fragmente und folgende Präzipitation nicht angereichert werden kann (siehe Abbildung 21).

In Abbildung 22 ist das Ergebnis der quantitativen ChIP am *rbf1* Promotor mit denselben Stammhintergründen wie in Abbildung 23 dargestellt. Das Ergebnis zeigt ein vergleichbares Muster. In keiner der getesteten Varianten ist eine Anreicherung von unspezifisch präzipitierter DNA in der Real-time PCR Analyse mit den ORF Primern nachweisbar. Sowohl der Kontrollstamm mit dem Vollängen-Clp1-Protein als auch die Stämme, die die Clp1-Varianten mit der internen Deletion 3 bzw. dem mutierten ABBA Motiv tragen, zeigen eine signifikante Bindung von bE1:HA an der *bbs* (Abbildung 22, Links). Die Replikate untereinander zeigen eine leichte Schwankung von ca. 50 %. Ausgehend vom Kontrollstamm ist eine leichte Abnahme der Anreicherung des *bbs* Bereiches zu den Replikaten mit der internen Deletion 3 im Clp1-Protein ($\Delta 3$) und der ABBA Mutation in Clp1 ($ABBA^{Mut}$) nachweisbar. Rechts in Abbildung 22 ist die indirekte Bindung von Clp1 über das bE/bW Heterodimer an die DNA im Promotor von *rbf1* dargestellt. Hier zeigen die beiden Kontrollstämme eine deutliche Anreicherung des *bbs* Bereiches von 250 fach zum Input. Alle anderen Stämme, sowohl beide Replikate der Deletion 3 ($\Delta 3$), als auch die Stämme mit eingebrachter Mutation im ABBA Motiv ($ABBA^{Mut}$) zeigen einen kompletten Verlust der indirekten Clp1 Bindung im *rbf1* Promotor. Die Anreicherung des *bbs* Bereiches detektiert über die Amplifikate der *bbs* Primer sind in diesen Stämmen vergleichbar mit der Anreicherung der Negativkontrolle detektiert über die Amplifikate der ORF Primer.

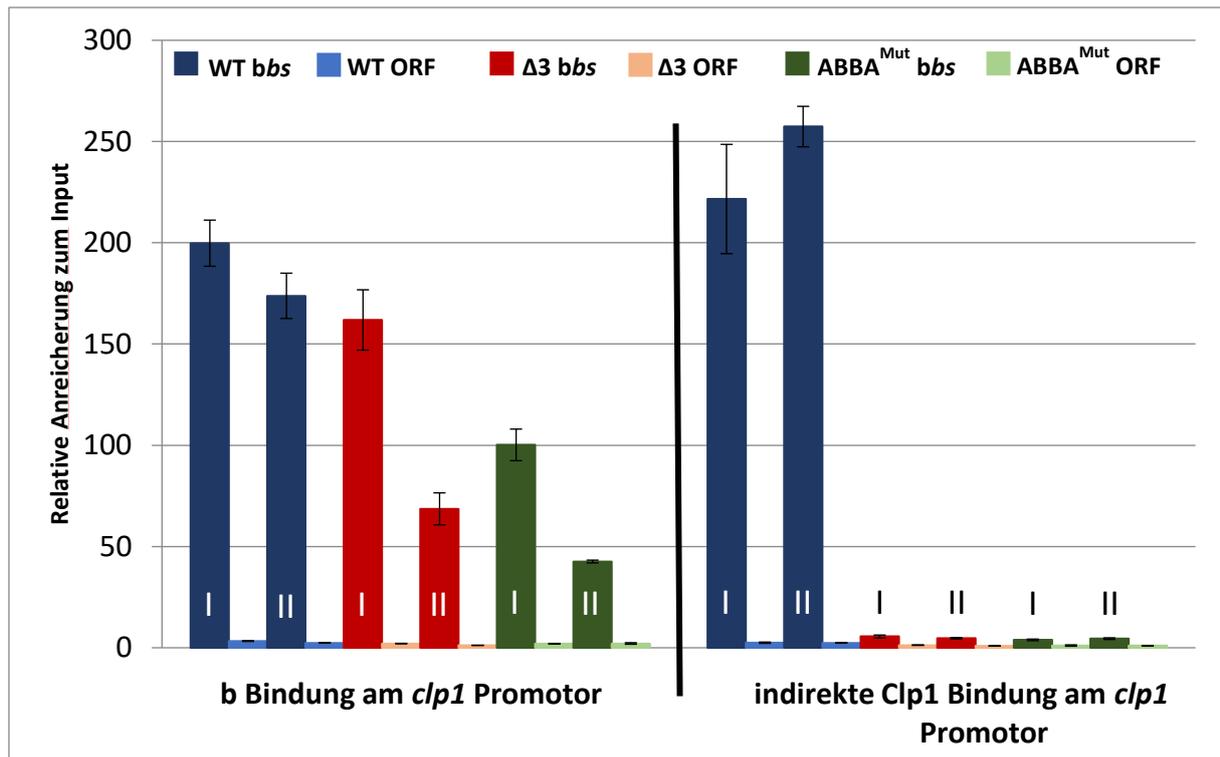


Abbildung 23: Quantitative ChIP-Seq Analyse zeigt eine fehlende Bindung von Clp1 über b an die DNA in den Stämmen mit Clp1-Deletions-Varianten im *clp1* Promotorbereich. Angegeben ist die relative Anreicherung zum Extrakt vor der Immunopräzipitation (Input), die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung zweier technischer Replikate in der Real-time PCR Auswertung. Dargestellt sind zwei unabhängig induzierte und immunopräzipitierte Versuchsreihen, gekennzeichnet mit I und II. Verwendet wurde der Kontrollstamm UJF170 (*a2 Δb::P_{crg1}:bW2, P_{crg1}:bE1:3xHA, Δclp1::gen^R; ip'(P_{otef}:Clp1:GFP)ip^S*), die Stämme UJF167 (*a2 Δb::P_{crg1}:bW2, P_{crg1}:bE1:3xHA, Δclp1::gen^R; ip'(P_{otef}:Clp1Δ3:GFP)ip^S*) mit interner Deletion 3 im Clp1-Protein und UJF168 (*a2 Δb::P_{crg1}:bW2, P_{crg1}:bE1:3xHA, Δclp1::gen^R; ip'(P_{otef}:Clp1_ABBA^{Mut})ip^S*) mit eingebrachter Mutation im ABBA Motiv von Clp1. Links, die Bindung von bE1:HA am *clp1* Promotor. Rechts, die indirekte Bindung von Clp1:GFP über das Heterodimer an den *clp1* Promotor. Die verwendeten Stämme tragen ein HA-markiertes bE1 und ein GFP-Tag an der jeweiligen Clp1-Variante, um mit demselben aufbereiteten Chromatin beide Immunopräzipitationen durchführen zu können. Der Kontrollstamm trägt die Vollängen-Clp1:GFP-Fusion, der Stamm Δ3 die interne Deletion 3 in Clp1 fusioniert an GFP und der Stamm ABBA^{Mut} die Mutation im ABBA Motiv in Clp1 fusioniert an GFP. Das bE1-Protein ist in allen Stämmen unverändert. Das verwendete Primerpaar *bbs* amplifiziert einen ca. 100 bp großen Bereich des *clp1* Promotors, der die Bindestelle des bE/bW Heterodimers enthält und ebenfalls einen signifikanten Clp1 *Peak* abdeckt. Die Kontrollprimer ORF amplifizieren einen Bereich am Ende des *clp1* ORF, welcher durch das Scheren des Chromatins in ca. 250 bp große Fragmente und folgende Präzipitation nicht angereichert werden kann (siehe Abbildung 21).

Wie in Abbildung 23 dargestellt, ist in keiner der getesteten Varianten eine Anreicherung von unspezifisch präzipitierter DNA in der Real-time PCR Analysen mit den ORF Primern nachweisbar. Sowohl der Kontrollstamm mit dem Vollängen-Clp1-Protein als auch die Stämme, die die Clp1-Varianten mit der internen Deletion 3, bzw. dem mutierten ABBA Motiv tragen, zeigen eine signifikante Bindung von bE1:HA an der *bbs*. Die Replikate der Real-time PCR Analyse untereinander zeigen eine leichte Schwankung von ca. 60 %. Ausgehend vom WT ist eine leichte Abnahme zum Stamm mit interner Deletion 3 (Δ3) und der ABBA Mutation (ABBA^{Mut})

in Clp1 in beiden durchgeführten Replikaten nachweisbar. Rechts in Abbildung 23 ist die indirekte Bindung von Clp1 über das Heterodimer an die DNA im *clp1* Promotor dargestellt. Hier zeigen die beiden Replikate der Kontrollstämme eine deutliche Anreicherung des *bbs* Bereiches von 200 bis 250 fach zum Extrakt vor der Immunopräzipitation (Input). Alle anderen Stämme sowohl beide Replikate mit der internen Deletion 3 im Clp1-Protein ($\Delta 3$) als auch die Stämme mit eingebrachter Mutation im ABBA Motiv von Clp1 (ABBA^{Mut}) zeigen einen kompletten Verlust der indirekten Clp1 Bindung im *clp1* Promotor. Die Anreicherung des *bbs* Bereiches detektiert über die Amplifikate der *bbs* Primer sind in diesen Stämmen vergleichbar mit der Anreicherung der Negativkontrolle detektiert über die Amplifikate der ORF Primer.

2.2.4 Der zentrale Bereich von Clp1 beeinflusst die pathogene Entwicklung in der Pflanze, jedoch nicht das filamentöse Wachstum

Die in dieser Arbeit erstellten Clp1-Deletions-Varianten zeigen in 2.2.2 einen vergleichbaren Effekt auf die Genregulation wie der Kontrollstamm UMS12 mit kompletter Deletion des *clp1* Gens. Bereits gezeigt wurde auch der Einfluss einer kompletten *clp1* Deletion auf die Proliferation in der Pflanze und daraus resultierend auf die Pflanzeninfektion sowie der fehlende Effekt auf das filamentöse Wachstum und die Appressorienbildung vor der Pflanzenpenetration (Scherer *et al.*, 2006). Die Auswirkung der Clp1-Deletions-Varianten auf die pathogene Entwicklung in der Pflanze wurde im nächsten Versuchsteil anhand eines Tests auf filamentöses Wachstum, Pflanzeninfektionen und mikroskopischen Auswertungen von Blattmaterial genauer bestimmt.

In beiden Versuchsreihen wurde der solopathogene Stamm SG200 (*a1 mfa2 bE1bW2*) als Positivkontrolle eingesetzt. Dieser Stamm benötigt keinen kompatiblen Partner, um filamentös zu wachsen oder die Pflanze zu infizieren, da er sowohl einen kompatiblen *a*- als auch *b*-Locus besitzt. Alle dargestellten Deletions- und Mutationsstämme wurden in diesen genetischen Hintergrund eingebracht. Die verwendeten Stämme UJF131 (*a1 mfa2 bE1bW2; H1:mcherry:Nat; clp1:GFP*), UJF135 (*a1 mfa2 bE1bW2; H1:mcherry:Nat; clp1 Δ 1:GFP*), UJF137 (*a1 mfa2 bE1bW2; H1:mcherry:Nat; clp1 Δ 2:GFP*), UJF138 (*a1 mfa2 bE1bW2; H1:mcherry:Nat; clp1 Δ 3:GFP*) und UJF141 (*a1 mfa2 bE1bW2; H1:mcherry:Nat; clp1_ABBA^{Mut}:GFP*) tragen die Clp1-Deletions-Varianten im nativen *clp1*-Locus. Für die Untersuchung auf filamentöses Wachstum sowie für die Pflanzeninfektion wurden dieselben Stämme verwendet. Für den Test

auf filamentöses Wachstum wurden die Stämme in Vollmedium angezogen, über die OD_{600} normalisiert und je 3 μ l auf eine aktivkohlehaltige Vollmediumplatte getropft. Die gezeigten Bilder in Abbildung 24 wurden nach 2 Tagen Inkubation bei 28°C gemacht.

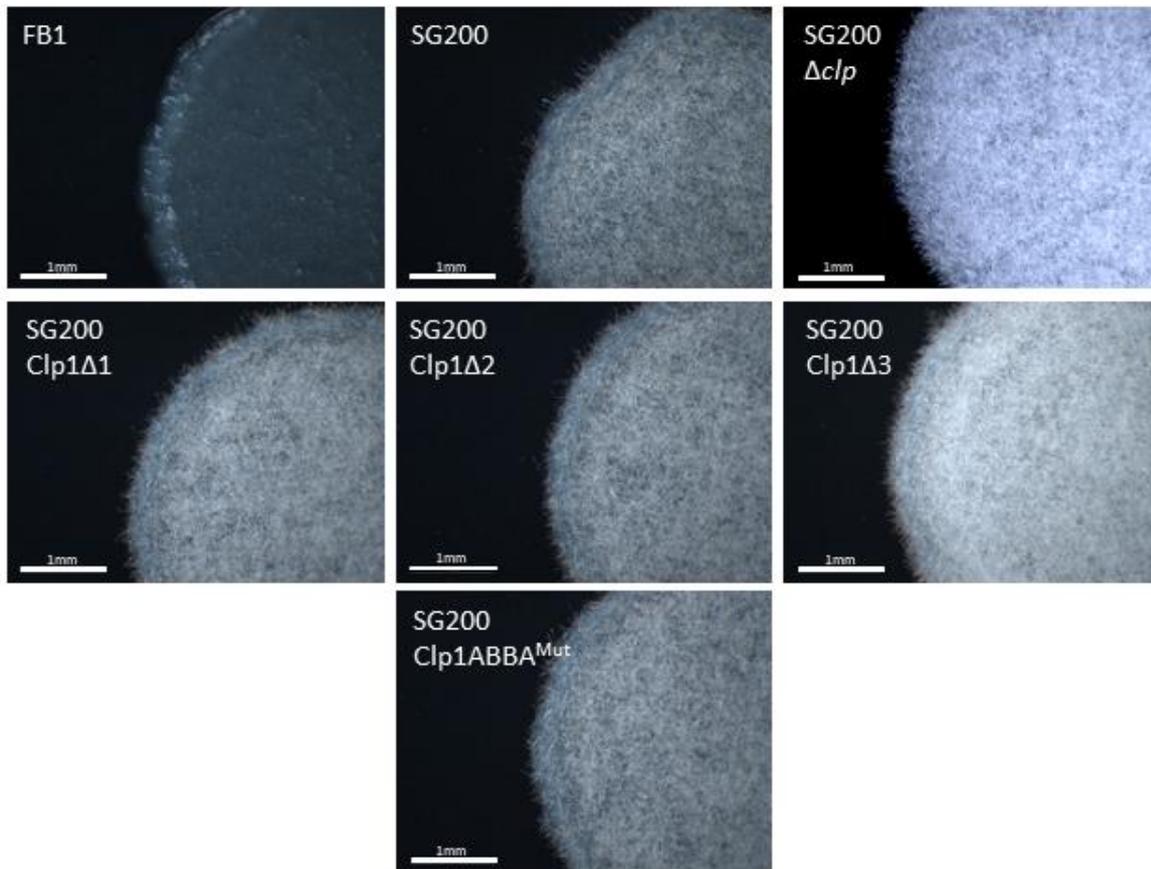


Abbildung 24: Deletionen und Mutation in Clp1 haben keinen Einfluss auf das filamentöse Wachstum. Alle dargestellten Stämme wurden über die optische Dichte normalisiert, auf aktivkohlehaltigen Platten getropft und nach 2 Tagen ausgewertet. **FB1** (*a1b1*), der Stamm ohne kompatible b-Proteine weist kein filamentöses Wachstum auf aktivkohlehaltigen Platten auf. Der dargestellte Stamm **SG200**, UJF131 (*a1 mfa2 bE1bW2; H1:mcherry:Nat; clp1::GFP*) wächst wie erwartet deutlich filamentös auf den verwendeten aktivkohlehaltigen Platten. Der Stamm **SG200 Δ clp1** (UMS76 *a1 mfa2 bE1bW2, Δ clp1::eGFP*) zeigt ein vergleichbares filamentöses Wachstum wie die gezeigte Positivkontrolle SG200. Alle getesteten Stämme mit internen Deletionen **SG200Clp1 Δ 1/ Δ 2/ Δ 3** (UJF135 *a1 mfa2 bE1bW2; H1:mcherry:Nat; clp1 Δ 1::GFP*; UJF137 *a1 mfa2 bE1bW2; H1:mcherry:Nat; clp1 Δ 2::GFP*; UJF138 *a1 mfa2 bE1bW2; H1:mcherry:Nat; clp1 Δ 3::GFP*) oder Mutation **SG200Clp1ABBA^{Mut}** (UJF141 *a1 mfa2 bE1bW2; H1:mcherry:Nat; clp1_ABBA^{Mut}::GFP*) in Clp1 wachsen vergleichbar filamentös wie der Stamm mit Deletion des kompletten ORFs des *clp1* Gens (Δ clp1) und zeigen denselben Phänotyp wie die Positivkontrolle.

Für die Untersuchung des filamentösen Wachstums wurde als Negativkontrolle der Stamm FB1 (*a1b1*) mitgeführt. Dieser Wildtypstamm benötigt einen kompatiblen Partner um filamentös wachsen zu können. Als Positivkontrolle wurde der Stamm UJF131 (*a1 mfa2 bE1bW2; H1:mcherry:Nat; clp1::GFP*) (SG200) verwendet. Als Vergleichsstamm wurde der bereits in Scherer *et al.*, 2006 veröffentlichte Stamm, mit einer kompletten Deletion des *clp1* Gens (SG200 Δ clp1) genutzt.

Wie in Abbildung 24 dargestellt, weist die Negativkontrolle (FB1) kein filamentöses Wachstum auf der verwendeten aktivkohlehaltigen Platte auf. SG200 wächst deutlich filamentös, ebenso der Vergleichsstamm SG200 Δ *clp1*. Alle in dieser Arbeit angefertigten Stämme (SG200*Clp1* Δ 1/ Δ 2/ Δ 3/ ABBA^{Mut}) zeigen ein vergleichbares filamentöses Wachstum untereinander sowie mit der Positivkontrolle SG200 und dem Vergleichsstamm SG200 Δ *clp1*.

Im nächsten Experiment wurden dieselben Stämme wie im vorangegangenen Versuchsaufbau in die Pflanzeninfektion eingebracht, um Aussagen auf den Einfluss der *Clp1*-Deletions-Varianten auf die weitere pathogene Entwicklung in der Pflanze treffen zu können.

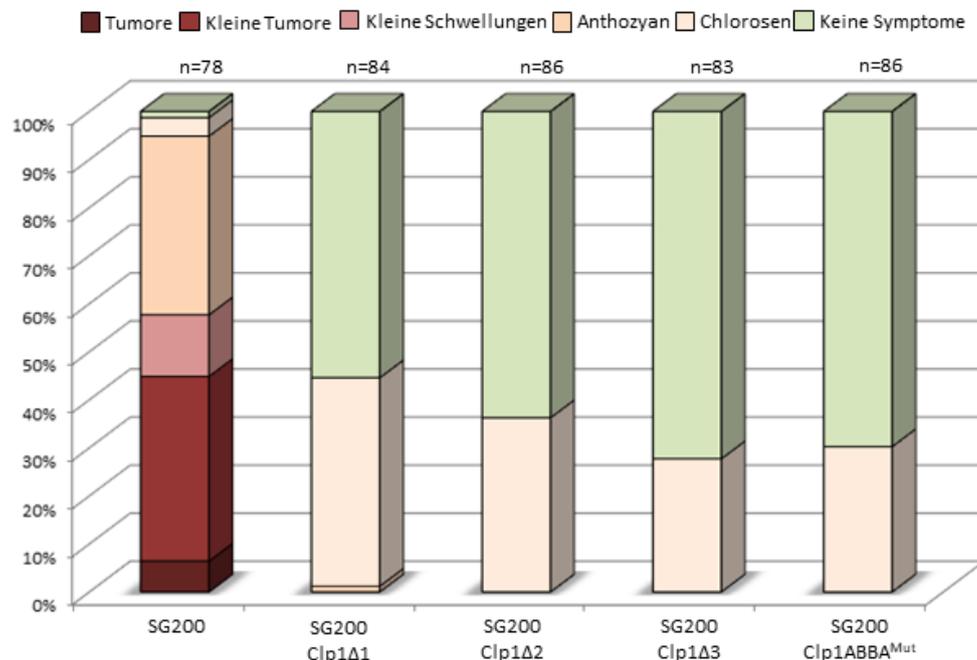


Abbildung 25: Deletionen und Mutation in *Clp1* führen zu Apathogenität. Der haploid pathogene Stamm SG200 bildet den genetischen Hintergrund aller hier verwendeten Stämme. Alle gezeigten Versuchsansätze wurden in 7 Tage alte Maissetzlinge mit einer Spritze injiziert. 7 Tage nach Infektion wurden Infektionssymptome ausgewertet, wie in der Legende angegeben. Die gesamte Anzahl an verwendeten Pflanzen ist mit n über den einzelnen Balken angegeben. Alle Stämme mit einer Deletion (UJF135 *a1 mfa2 bE1bW2; H1:mcherry:Nat; clp1* Δ 1:*GFP*; UJF137 *a1 mfa2 bE1bW2; H1:mcherry:Nat; clp1* Δ 2:*GFP*; UJF138 *a1 mfa2 bE1bW2; H1:mcherry:Nat; clp1* Δ 3:*GFP*) oder einer eingebrachten Mutation im ABBA Motiv (UJF141 *a1 mfa2 bE1bW2; H1:mcherry:Nat; clp1_ABBA*^{Mut}:*GFP*) zeigen einen kompletten Verlust der Pathogenität, verglichen mit der gezeigten Positivkontrolle SG200 (UJF131 *a1 mfa2 bE1bW2; H1:mcherry:Nat; clp1*:*GFP*).

Die Pflanzeninfektion, in Abbildung 25 dargestellt, zeigt einen deutlichen Effekt in allen Deletionsstämmen und dem Mutationsstamm (SG200*Clp1* Δ 1/ Δ 2/ Δ 3 und ABBA^{Mut}). Alle getesteten Stämme weisen lediglich Chlorosen auf und über 50% der Pflanzen zeigen keine Symptome. Eine vergleichbare Infektion konnte für *clp1*-

Deletionsstämme gezeigt werden (Scherer *et al.*, 2006). Die zeitgleich infizierte Positivkontrolle SG200 zeigt eine normale Virulenz mit ca. 50% Tumorbildung.

Um eine genauere Aussage über den Effekt der internen Deletionen und der ABBA Mutation in Clp1 auf die Infektion des Pilzes treffen zu können, wurde die Proliferation von *U. maydis* in der Pflanze mikroskopisch untersucht. Hierfür wurde direkt unter der Inokulationsstelle Pflanzenmaterial 3 Tag nach Infektion (dpi) entnommen und die Hyphen mit Chlorazol Black E-Lösung angefärbt. Die Pflanzen für die mikroskopische Auswertung wurden zeitgleich mit der Pflanzeninfektionsstudie inokuliert und zeigen die identischen Stämme wie der Test auf filamentöses Wachstum (Abbildung 24) und die Infektion (Abbildung 25).

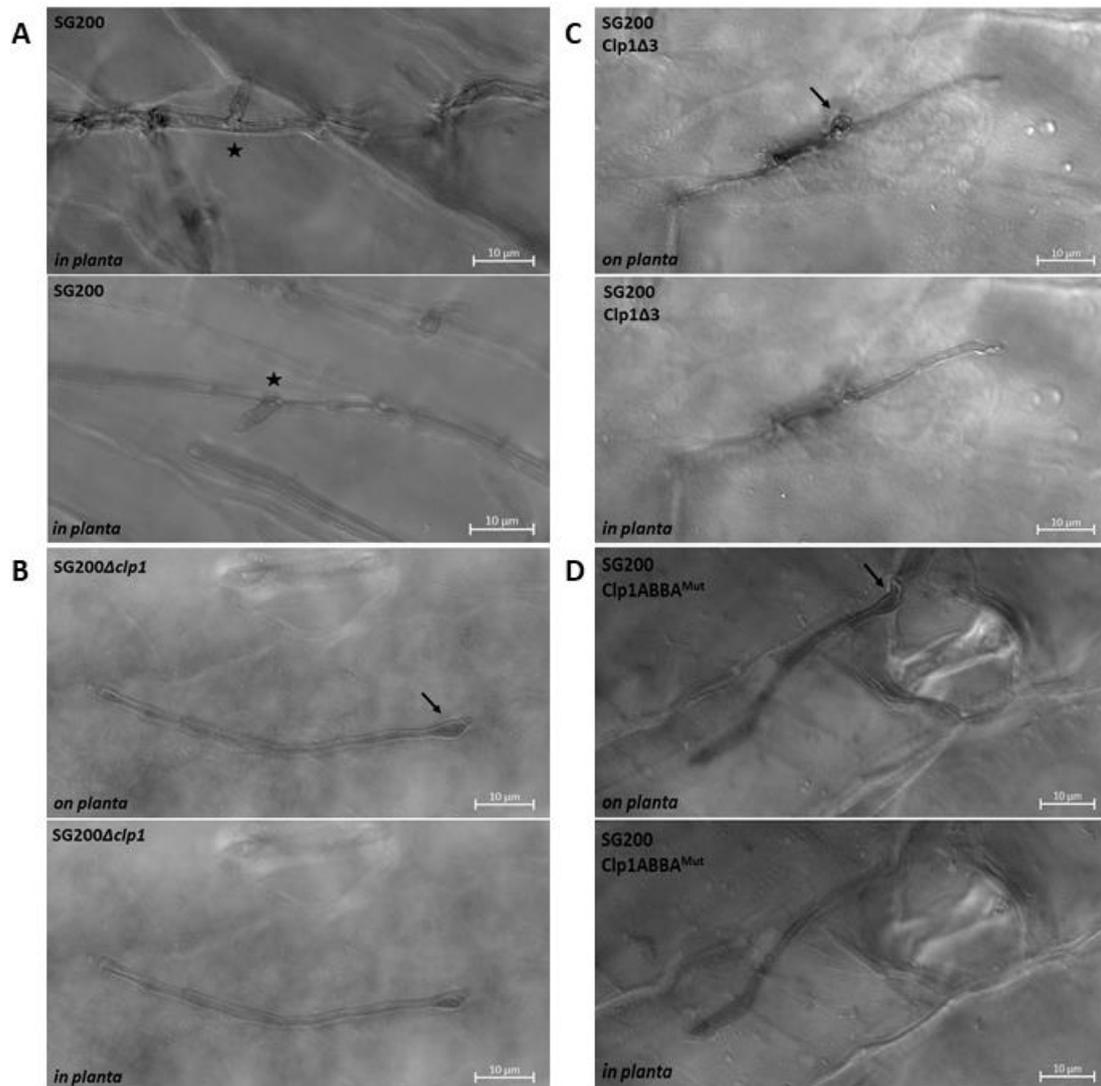


Abbildung 26: Untersuchung des Wachstumsverhaltens von Clp1-Varianten mit interner Deletion oder Mutation innerhalb der Pflanze. Das Blattmaterial wurde 3 Tage nach der Inokulation entnommen, mit Chlorazol Black E-Lösung gefärbt und anschließend mikroskopisch untersucht. Gezeigt ist die Positivkontrolle SG200 (UJF131 *a1 mfa2 bE1bW2; H1:mcherry:Nat; clp1::GFP*) mit normaler Schnallenzellbildung (Stern) in der Pflanze (A). Die Deletion des gesamten ORFs von *clp1* in SG200 Δ *clp1* (UMS76 *a1 mfa2 bE1bW2, \Delta clp1::eGFP*) zeigt eine normale Appressorienbildung (Pfeil) auf der Pflanze und schnell endendem Wachstum in der Pflanze (B). Die Stämme SG200Clp1 Δ 3 (UJF138 *a1 mfa2 bE1bW2; H1:mcherry:Nat; clp1\Delta 3::GFP*) und SG200Clp1ABBA^{Mut} (UJF141 *a1 mfa2 bE1bW2; H1:mcherry:Nat; clp1_ABBA^{Mut}::GFP*) stehen stellvertretend für alle anderen Deletionsstämme (C, D) und zeigen ebenfalls eine normale Appressorienbildung (Pfeil) auf der Pflanze, jedoch keine Schnallenzellbildung sondern ein schnell endendes Wachstum innerhalb der Pflanze nach Penetration, vergleichbar mit dem Stamm SG200 Δ *clp1*.

Die mikroskopische Auswertung der Clp1-Varianten mit internen Deletionen oder der Mutation des ABBA Motives zeigen alle einen vergleichbaren Wachstumsphänotyp auf (*on planta*) und in der Pflanze (*in planta*). In Abbildung 26 ist die untersuchte Proliferation der Stämme in der Pflanze abgebildet. Der solopathogene Kontrollstamm SG200 (A) zeigt eine normale Schnallenzellbildung in der Pflanze. Nicht dargestellt ist die normale Ausbildung von Appressorien. Der Vergleichsstamm SG200 Δ *clp1* (B)

zeigt auf der Pflanze eine normale Appressorienbildung vergleichbar mit dem Kontrollstamm. In der Pflanze ist jedoch ein sehr schnell endendes filamentöses Wachstum zu beobachten. Es können keine Schnallenzellen und damit einhergehend auch keine weitere Proliferation in der Pflanze beobachtet werden. Die beiden Stämme SG200Clp1 Δ 3, mit interner Deletion der Region 3 und SG200Clp1ABBA^{Mut}, mit einer Mutation des ABBA Motivs im Volllängen-Clp1-Protein, sind stellvertretend für alle weiteren Clp1-Deletions-Varianten (SG200Clp1 Δ 1 und Δ 2) dargestellt. Alle Clp1-Deletions-Varianten zeigen in der mikroskopischen Auswertung denselben Wachstumsphänotyp in der Pflanze. Sie sind noch in der Lage Appressorien auf der Pflanzenoberfläche zu bilden und die Pflanze zu penetrieren. In der Pflanze ist jedoch in keinem Stamm eine weitere Proliferation der Pilzhyphen zu beobachten. Die Hyphen bleiben kurz nach Penetration der Pflanze stecken und das Wachstum endet. Eine Proliferation in der Pflanze oder die Bildung von Schnallenzellen wurde nicht beobachtet.

2.2.5 Die Mutation des ABBA Motivs in Clp1 stört die Interaktion mit dem C-terminalen Ende des Proteinkomplexpartners bW2

Eine der wichtigsten und für die pathogene Entwicklung entscheidendsten Funktionen des stabilisierten Clp1-Proteins zum Zeitpunkt der Pflanzeninfektion ist die Interaktion mit dem Heterodimer bE/bW und die daraus resultierende Repression *b*-abhängiger Gene. In dieser Arbeit wurde bereits die fehlende Repression der Gene *clp1* und *rbf1* nach Mutation des ABBA Motivs in Clp1 gezeigt (2.2.2) und die vermutete fehlende indirekte Bindung von Clp1 über das bE/bW Heterodimer an die DNA der Promotorregionen nach Einbringen der Mutation im ABBA Motiv nachgewiesen (2.2.3). Mit Hilfe des Hefe-2-Hybrid Systems kann durch gezielte Deletionsderivaten von Proteinen und Einsetzen von Proteinfragmenten eine spezifische Aussage über die Interaktionsstellen in den beiden Proteinen bW2 und Clp1 getroffen werden, um die fehlende indirekte Bindung des Clp1-Proteins an die DNA, auf eine gestörte Interaktion der beiden Proteinkomplexpartner bE/bW und Clp1 zurückführen zu können. Bereits gezeigt wurde eine Interaktion zwischen dem C-terminale Ende (AS 567-645) von bW2 und Clp1 im Hefe-2-Hybrid System. Aufgrund seiner Selbstaktivierung in Hefe wurde das C-terminalen Ende von bW2 als potentielle Transaktivierungsdomäne diskutiert (Heimel, 2010). Diese Hypothese wird durch die essentielle Funktion des C-terminalen Endes von bW2 im Kon8-Fusionsprotein gestützt. Das Kon8-Protein enthält alle

essentiellen Bereiche (407 der 997 AS) der beiden b-Proteine in einem Fusionsprotein, das die komplette b Funktion übernehmen kann (1.3.1). In *U. maydis* kommt es zum kompletten Funktionsverlust aller *b*-vermittelten Prozesse bei Deletion des C-terminalen Endes von bW2 im Kon8-Protein (Grandel *et al.*, 2000).

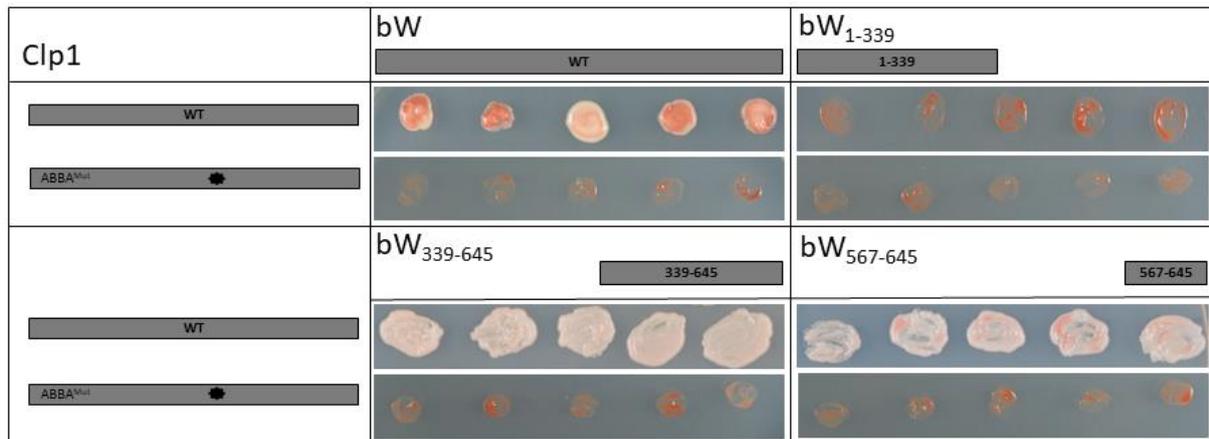


Abbildung 27: Bestimmung der Clp1 und bW2 Interaktionsbereiche mittels Hefe-2-Hybrid System. Im Hefe-2-Hybrid System wurden die beiden Proteine Clp1 und bW2 auf ihre Interaktionsregionen näher untersucht. In den pGBKT7 Vektor (Clontech) wurde Clp1 in der Volllänge und als Volllänge mit Mutation im ABBA Motiv eingebracht. Das bW2-Protein wurde ebenfalls in der Volllänge sowie in den Fragmenten bW₂₁₋₃₃₉ (AS 1-339), bW₂₃₃₉₋₆₄₅ (AS 339-645) und bW₂₅₆₇₋₆₄₅ (AS 567-645) in den kompatiblen pGAD (Clontech) Vektor eingebracht und cotransformiert. Die Transformanten wurden auf die Plasmidaufnahme überprüft (SD -leu -trp) und anschließend auf Selektionsmedium (SD -ade – his -leu -trp) überstrichen um für 3 Tage bei 28°C auf die Interaktion der Proteine zu selektieren. Als Positivkontrolle wurden die beiden Volllängenproteine Clp1 und bW2 verwendet. Zusätzlich wurden die Vektoren pGBKT7-p53 und pGADT7-7 (Clontech) als Positivkontrolle und die Vektorkombination pGBKT7-Lam und pGADT7-T als Negativkontrolle mitgeführt (nicht gezeigt). (Modifiziert nach Baumann, 2019; Heinen, 2019)

Wie in Abbildung 27 zu sehen und bereits in Baumann, 2019 und Heinen, 2019 gezeigt, ist eine direkte Interaktion der beiden Volllängenproteine bW2 und Clp1 sowie eine Interaktion des Clp1-Volllängenproteins mit den beiden C-terminalen Fragmenten bW₂₅₆₇₋₆₄₅ (AS 567-645) und bW₂₃₃₉₋₆₄₅ (AS 339-645) mittels Hefe-2-Hybrid Assay nachweisbar. In allen drei Fällen geht diese Interaktion verloren, sobald die Mutation des ABBA Motives in das Clp1-Protein eingebracht wurde. Keine Interaktion konnte zwischen dem N-terminalen Fragment von bW₂₁₋₃₃₉ (AS 1-339) und dem Clp1-Volllängenprotein nachgewiesen werden. Ebenfalls konnte eine fehlende Interaktion zwischen dem N-terminalen bW2 Fragment und dem Clp1-Protein mit eingebrachter ABBA Mutation bestätigt werden. Damit ist dem mutierten Clp1-Protein im zentralen ABBA Motiv keine Interaktion mehr mit einem der getesteten bW2 Fragmenten möglich.

2.2.6 Die Mutation des ABBA Motivs in Clp1 stört die Interaktion mit dem Heterodimer aus bW2 und bE1

Um die Auswirkung der ABBA Mutation im Clp1-Protein nicht nur im artifizialen Hefe-2-Hybrid System untersuchen zu können, wurde die Interaktion zwischen Clp1 und dem b-Heterodimer in *U. maydis* mittels Co-Immunopräzipitation verifiziert. Die Clp1-Deletions-Varianten mit mutiertem ABBA Motiv im Clp1-Protein sowie mit interner Deletion 3 in Clp1 wurden auf ihre Interaktion mit dem Heterodimer bE/bW untersucht. Mit dem HA-markierten bE1-Protein als Bestandteil des Heterodimers wurde die Immunopräzipitation durchgeführt. Nach Auftrennung der Proteine über SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese wurden die GFP-Fusionsproteine mit den Clp1-Deletions-Varianten mittels Western Blot Analyse mit einem GFP Antikörper nachgewiesen. Hierfür wurden die Stämme UJF164 ($a2 \Delta b::P_{crg1}:bW2, P_{crg1}:bE1, \Delta clp1::gen^R, ip^r(P_{otef}:clp1:GFP)ip^s$), UJF165 ($a2 \Delta b::P_{crg1}:bW2, P_{crg1}:bE1, \Delta clp1::gen^R, ip^r(P_{otef}:clp1\Delta 3:GFP)ip^s$) und UJF172 ($a2 \Delta b::P_{crg1}:bW2, P_{crg1}:bE1, \Delta clp1::gen^R, ip^r(P_{otef}:clp1_ABBA^{Mut}:GFP)ip^s$) als Kontrollstämme ohne HA-markiertes b-Protein eingesetzt. Die Stämme UJF170 ($a2 \Delta b::P_{crg1}:bW2, P_{crg1}:bE1:3xHA, \Delta clp1::gen^R, ip^r(P_{otef}:clp1:GFP)ip^s$), UJF 167 ($a2 \Delta b::P_{crg1}:bW2, P_{crg1}:bE1:3xHA, \Delta clp1::gen^R, ip^r(P_{otef}:clp1\Delta 3:GFP)ip^s$) und UJF168 ($a2 \Delta b::P_{crg1}:bW2, P_{crg1}:bE1:3xHA, \Delta clp1::gen^R, ip^r(P_{otef}:clp1_ABBA^{Mut}:GFP)ip^s$) tragen das für die Immunopräzipitation relevanten HA-markierten bE1-Protein. Über einen Medienwechsel (siehe 4.2) wurde der *b*-Locus in allen Stämmen induziert. Die GFP-markierten Clp1-Varianten aus dem Vollängen-Clp1-Protein, der internen Deletion 3 ($\Delta 3$) oder dem mutierten ABBA Motiv ($ABBA^{Mut}$) wurden im *ip*-Locus unter einem konstitutiv aktiven Promotor exprimiert.

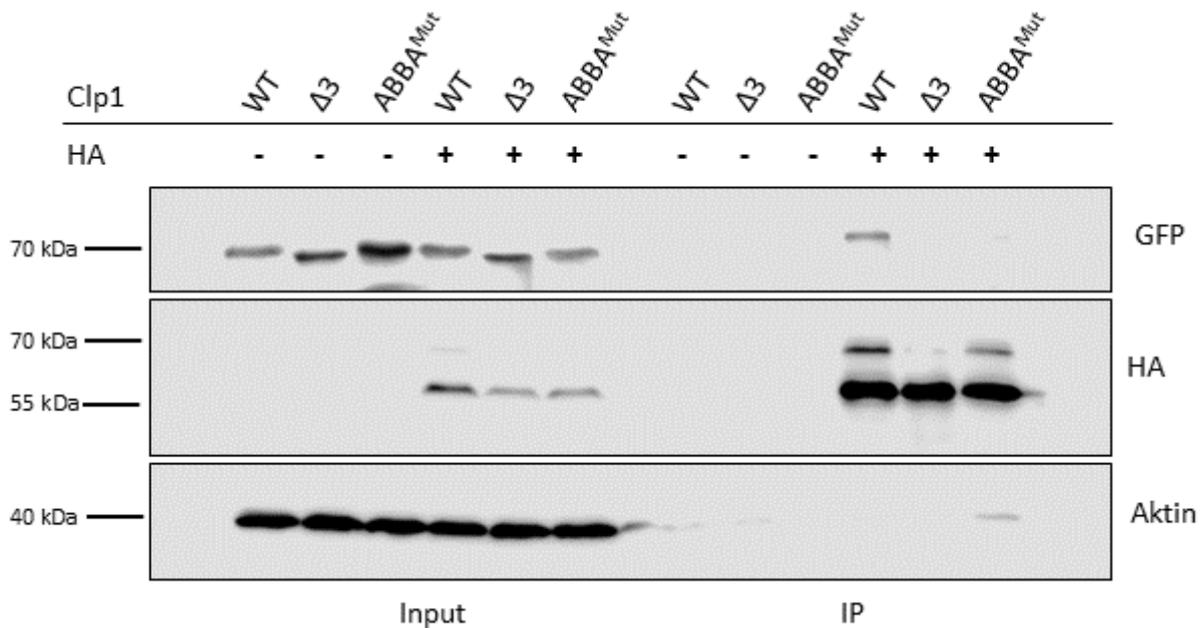


Abbildung 28: Co-Immunopräzipitation mit HA-markiertem bE1 im Heterodimer und GFP-markierten Clp1-Varianten zeigt lediglich im WT eine Interaktion. Gezeigt ist die Co-IP mit den Stämmen UJF170 (*a2 Δb::P_{crg1}:bW2, P_{crg1}:bE1:3xHA, Δclp1::gen^R, ip'(P_{otef}:clp1:GFP)ip^s*), UJF 167 (*a2 Δb::P_{crg1}:bW2, P_{crg1}:bE1:3xHA, Δclp1::gen^R, ip'(P_{otef}:clp1Δ3:GFP)ip^s*) und UJF168 (*a2 Δb::P_{crg1}:bW2, P_{crg1}:bE1:3xHA, Δclp1::gen^R, ip'(P_{otef}:clp1_ABBA^{Mut}:GFP)ip^s*) mit einem HA-markiertem bE1 (+) im b-Heterodimer und den GFP-markierten Clp1-Varianten Volllängen-Clp1 (WT), der internen Deletion 3 (Δ3) und dem mutierten ABBA Motiv (ABBA^{Mut}) im Clp1-Protein. Die Kontrollstämme UJF164 (*a2 Δb::P_{crg1}:bW2, P_{crg1}:bE1, Δclp1::gen^R, ip'(P_{otef}:clp1:GFP)ip^s*), UJF165 (*a2 Δb::P_{crg1}:bW2, P_{crg1}:bE1, Δclp1::gen^R, ip'(P_{otef}:clp1Δ3:GFP)ip^s*) und UJF172 (*a2 Δb::P_{crg1}:bW2, P_{crg1}:bE1, Δclp1::gen^R, ip'(P_{otef}:clp1_ABBA^{Mut}:GFP)ip^s*) tragen dieselben GFP-Fusionsproteine mit Clp1-Varianten allerdings keinen für die Immunopräzipitation nötigen HA-Tag am bE1-Protein (-). Links ist der Extrakt vor der Immunopräzipitation (Input) zu sehen, rechts die IP. Das Aktin Signal dient als Ladekontrolle im Input und Kontrolle einer spezifischen Interaktion zwischen den Proteinen bE1:HA und Clp1:GFP in der IP.

Die unter einem konstitutiv aktiven Promotor exprimierten GFP-Fusionsproteine der Clp1-Varianten zeigen in Abbildung 28 ein vergleichbares Proteinlevel im Extrakt vor der Immunopräzipitation (Input). Die Kontrollstämme, ohne HA-markiertes bE1 (HA-) im Heterodimer, weisen wie erwartet keine Bande nach HA Detektion sowohl im Input als auch in der IP auf. Eine deutliche Anreicherung von HA-markiertem bE1-Protein (HA+) nach der IP ist in allen HA-markierten Stämmen zu erkennen. Die dargestellten Aktin Signale können als Ladekontrolle der Inputproben und als Kontrollen für eine spezifische Interaktion zwischen den Proteinen bE1 und Clp1 in den gezeigten IP Proben gedeutet werden. Wie in Abbildung 28 eindeutig zu erkennen, ist die Interaktion der Proteine bE1 und Clp1 nur mit dem Volllängen-Clp1 (WT) nachweisbar. Bei der in Clp1 eingebrachten internen Deletion 3 (Δ3) kann keine Interaktion mit dem bE1-Protein im Heterodimer gezeigt werden und keine GFP Bande detektiert werden. Die sehr schwache GFP Bande im Stamm mit mutiertem ABBA Motiv (ABBA^{Mut}) nach

IP ist sehr viel schwächer als die leichte Aktin Bande im selben Stamm und kann daher als unspezifisch und damit als fehlende Interaktion interpretiert werden.

2.3 C-terminale Bereiche der b-Proteine bE und bW haben Einfluss auf die Interaktion im Proteinkomplex mit Clp1

Der C-terminale Bereich des bW2-Proteins spielt sowohl als Proteinfragment für die Interaktion mit Clp1 im Hefe-2-Hybrid System als auch in *U. maydis* als Bestandteil des Kon8-Fusionsproteins mit essentieller Funktion für die *b*-vermittelten Prozesse eine wichtige Rolle. Ob der C-terminale Bereich des bW2-Proteins nun ausreichend oder auch notwendig für die Interaktion mit Clp1 im Heterodimer ist, wurde mit Hilfe einer Co-Immunopräzipitation in *U. maydis* festgestellt. Eine mögliche Verbindung zwischen der essentiellen Funktion für alle *b*-abhängigen Prozesse und der Interaktion mit Clp1 in derselben Proteinregion von bW2 kann durch genauere Betrachtung der *b*-vermittelten pathogenen Entwicklung aufgeklärt werden.

2.3.1 C-terminale Verkürzung von bW2 reduziert die Interaktion des bE/bW Heterodimers mit Clp1

In Kämper *et al.*, 1995 wurde der C-terminale Bereich (78 AS) des bW2-Proteins als potentielle Transaktivierungsdomäne beschrieben. Die Deletion der entsprechenden Domäne verhindert die Selbstaktivierung des Gesamtproteins in den durchgeführten Hefe-2-Hybrid Assays. Der C-Terminus von bW alleine ist für eine Aktivierung im Hefe-2-Hybrid Assay nicht ausreichend (Brenner, 2019). Für eine Interaktion mit dem Komplexpartner Clp1 ist der C-terminale Bereich des bW2-Proteins im Hefe-2-Hybrid System notwendig (Abbildung 27) (Heimel, 2010).

Um die Notwendigkeit des C-terminalen Endes des bW2-Proteins für die Interaktion mit Clp1 in *U. maydis* nachweisen zu können, wurde eine Co-Immunopräzipitation durch Baumann, 2019 durchgeführt. Durch Verkürzung des C-terminalen Endes von bW2 sollte nun überprüft werden, ob dieser Bereich auch notwendig ist, um im Heterodimer in *U. maydis* mit dem Clp1-Protein zu interagieren. Mit dem HA-markierten bW2-Protein sowie der verkürzten Version des bW2-Proteins ($\Delta 567$) als Bestandteil des Heterodimers wurde die Immunopräzipitation durchgeführt. Nach Auftrennung der Proteine über SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese wurden das

Volllängen-Clp1:Myc-Fusionsprotein mittels Western Blot Analyse mit einem Myc Antikörper nachgewiesen. Für diesen Versuchsaufbau wurden die Stämme UBL6 ($a2 \Delta b::P_{crg1}:bW2:3xHA$, $P_{crg1}:bE1$, $ip^r(P_{crg1}:clp1:3xmyc)ip^s$) und UBL8 ($a2 \Delta b::P_{crg1}:bW2_{\Delta 567}:3xHA$, $P_{crg1}:bE1$, $ip^r(P_{crg1}:clp1:3xmyc)ip^s$) und als Negativkontrolle UBL15 ($a2 \Delta b::P_{crg1}:bW2$, $P_{crg1}:bE1$, $ip^r(P_{crg1}:clp1:3xmyc)ip^s$) verwendet. Die b-Verkürzung ab AS567 entspricht einer Deletion des Bereiches mit zugesprochener transaktivierender Funktion in bW2, die für eine Interaktion mit Clp1 im Hefe-2-Hybrid Versuch dringend notwendig ist. Durch einen Medienwechsel (siehe 4.2) kommt es zeitgleich zur Induktion der kompatiblen b-Locus Gene mit HA-markierten bW2 Varianten und des Myc-markieren Clp1-Proteins.

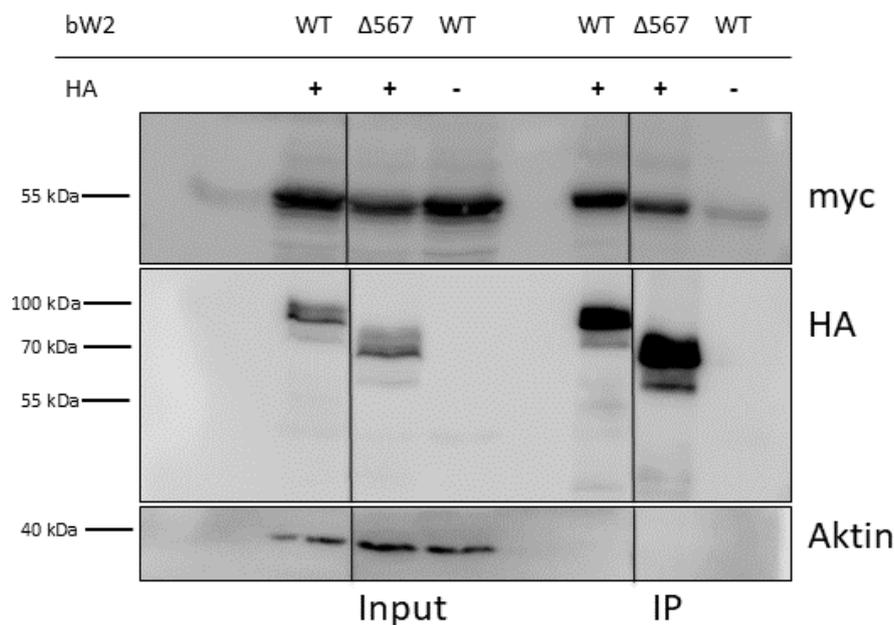


Abbildung 29: Co-Immunopräzipitation mit HA-markierter bW2 Verkürzung im Heterodimer und myc-markiertem Clp1 zeigt eine reduzierte Interaktion. Gezeigt ist die Co-IP mit den Stämmen UBL6 ($a2 \Delta b::P_{crg1}:bW2:3xHA$, $P_{crg1}:bE1$, $ip^r(P_{crg1}:clp1:3xmyc)ip^s$), UBL8 ($a2 \Delta b::P_{crg1}:bW2_{\Delta 567}:3xHA$, $P_{crg1}:bE1$, $ip^r(P_{crg1}:clp1:3xmyc)ip^s$) mit einem HA-markierten (+) bW2 Volllängenprotein (WT) im bE/bW Heterodimer sowie einer Verkürzung ab AS567 ($\Delta 567$) und der Negativkontrolle UBL15 ($a2 \Delta b::P_{crg1}:bW2$, $P_{crg1}:bE1$, $ip^r(P_{crg1}:clp1:3xmyc)ip^s$) mit einem Volllängen-bW2-Protein (WT), jedoch keiner HA-Fusion (-). Alle Stämme besitzen ein induzierbares Clp1:myc-Protein. Links ist der Extrakt vor der Immunopräzipitation (Input) zu sehen, rechts die IP. Das Aktin Signal dient als Ladekontrolle im Input und Kontrolle einer spezifischen Interaktion zwischen den Proteinen bW und Clp1 in der IP. Für eine bessere Übersicht wurden Spuren aus dem Blot entfernt und die Schnittstellen mit schwarzen Strichen im Blot markiert. Alle gezeigten Banden stammen vom demselben Westerblot. (Modifiziert nach Baumann, 2019)

Wie von Baumann, 2019 bereits gezeigt wurde kann mittels Co-Immunopräzipitation noch immer eine Interaktion der HA-markierten bW2 Variante mit verkürztem C-terminalem Ende in UBL8 ($a2 \Delta b::P_{crg1}:bW2_{\Delta 567}:3xHA$, $P_{crg1}:bE1$,

ip'(P_{crg1}:clp1:3xmyc)ip^s) mit dem Myc-markierten Clp1-Protein nachgewiesen werden (Abbildung 29). Verglichen zum mitgeführten Volllängen-bW2-Protein in UBL6 (*a2 Δb::P_{crg1}: bW2:3xHA, P_{crg1}:bE1, ip'(P_{crg1}:clp1:3xmyc)ip^s*) ist bei vergleichbarer Anreicherung des bW2-Proteins nach Immunopräzipitation und ebenfalls ähnlichen Clp1 Konzentrationen im Extrakt vor der Immunopräzipitation (Input), bei der bW2 Verkürzung ab AS567 ($\Delta 567$) ein schwächeres Clp1:myc Signal nach der durchgeführten IP nachweisbar. Die Negativkontrolle mit vergleichbarem Clp1:myc Signal im Input, jedoch keinem HA-markierten bW2-Protein für die Immunopräzipitation, zeigt nach der IP lediglich ein sehr schwache Bande. Die Kontrolle auf unspezifische Bindung mittels Aktin Antikörper zeigt ebenfalls kein Signal nach der IP sowie eine ähnliche Ladekontrolle im Input.

2.3.2 Beide b-Proteine des Heterodimer sind in der Lage, als Einzelproteine mit Clp1 zu interagieren

In dieser Arbeit konnte die Notwendigkeit des C-terminale Bereich des bW2-Proteins für die Interaktion mit Clp1 im Hefe-2-Hybrid System gezeigt werden (2.2.5). In 2.3.1 konnte trotz Verkürzung des C-terminalen Endes von bW2 im Heterodimer noch eine Interaktion mit dem Clp1-Protein mittels Co-Immunopräzipitation in *U. maydis* nachgewiesen werden. Der entscheidende Unterschied dieser beiden Experimente ist die Bildung des Heterodimers bei der Co-IP in *U. maydis* verglichen mit dem Einzelprotein bW2 im Hefe-2-Hybrid System. Dass Clp1 in der Lage ist im Heterodimer mit beiden b-Proteinen zu interagieren und daher auch bei Verkürzung des Interaktionsbereiches im bW2-Protein weiter über das native, Volllängen-bE1-Protein mit dem Heterodimer interagiert kann, wurde in Brenner, 2019 mit einer weiteren Co-IP in *U. maydis* gezeigt. Im verwendeten Stammhintergrund AB32 (*a2, Δb::P_{crg1}:bW2, P_{crg1}bE2*) wurden die beiden *b*-Gene ebenfalls durch einen Medienwechsel (siehe 4.2) über den Arabinose-induzierbaren *crg* Promotor angeschaltet. Die beiden translatierten Proteine bW2 und bE2 sind jedoch nicht kompartibel und können somit kein Heterodimer bilden. In dieser Co-Immunopräzipitation von bE2 oder bW2 mit Clp1 ist damit eine Aussage über die Interaktion der Einzelproteine bW sowie bE mit dem zusätzlich exprimierten Clp1-Protein möglich. Mit den HA-markierten Proteinen bW2 oder bE2, als Einzelprotein und nicht als Bestandteil des Heterodimers, wurde die Immunopräzipitation durchgeführt. Nach Auftrennung der Proteine über SDS-

Polyacrylamid-Gelelektrophorese wurden das Vollängen-Clp1:Myc-Fusionsprotein mittels Western Blot Analyse mit einem Myc Antikörper nachgewiesen. Für die IP wurden der Stamm UTaB23 ($a2, \Delta b::P_{crg1}:bW2, P_{crg1}:bE2, ip^-(P_{crg1}:clp1:3xmyc)ip^s$) als Negativkontrolle ohne HA-markiertes b-Protein verwendet und die Stämme UTaB28 ($a2, \Delta b::P_{crg1}:bW2, P_{crg1}:bE2:3xHA, ip^-(P_{crg1}:clp1:3xmyc)ip^s$), sowie UTaB29 ($a2, \Delta b::P_{crg1}:bW2:3xHA, P_{crg1}:bE2, ip^-(P_{crg1}:clp1:3xmyc)ip^s$) mit jeweils einem HA-markierten bW2-, bzw. bE2-Protein.

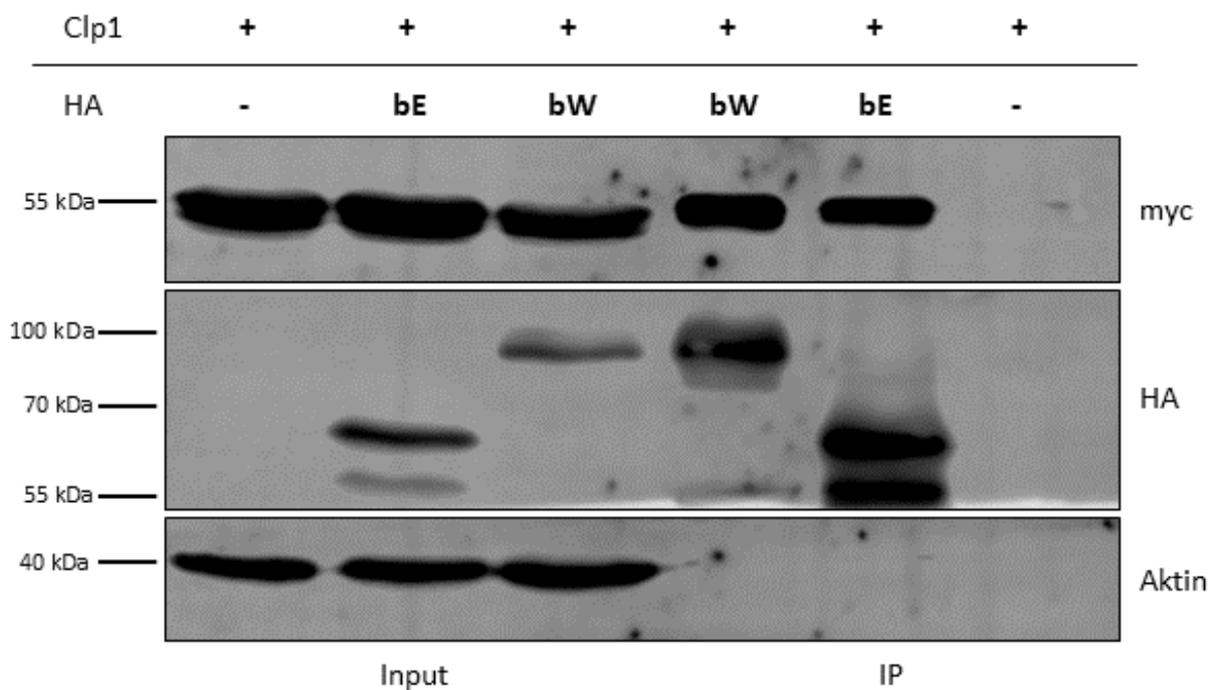


Abbildung 30: Co-Immunopräzipitation mit HA-markierten bW2 und bE2 Einzelproteinen und myc-markiertem Clp1 zeigt eine Interaktion mit beiden b-Proteinen. Gezeigt ist die Co-IP mit den Stämmen UTaB23 ($a2, \Delta b::P_{crg1}:bW2, P_{crg1}:bE2, ip^-(P_{crg1}:clp1:3xmyc)ip^s$), UTaB28 ($a2, \Delta b::P_{crg1}:bW2, P_{crg1}:bE2:3xHA, ip^-(P_{crg1}:clp1:3xmyc)ip^s$), UTaB29 ($a2, \Delta b::P_{crg1}:bW2:3xHA, P_{crg1}:bE2, ip^-(P_{crg1}:clp1:3xmyc)ip^s$) mit einem HA-markierten bW2-Vollängenprotein (bW) oder bE2-Vollängenprotein (bE), welche kein b-Heterodimer bilden können. Die Negativkontrolle trägt kein HA-markiertes b-Protein (-). Alle Stämme besitzen ein induzierbares *clp1:myc* Gen (+). Links ist der Input zu sehen, rechts die IP. Das Aktin Signal dient als Ladekontrolle im Input und Kontrolle einer spezifischen Interaktion zwischen den Proteinen b und Clp1 in der IP (Brenner, 2019).

Wie in Brenner, 2019 bereits gezeigt wurde, ist eine Interaktion von beiden Einzelproteinen bW2 und bE2 mit dem Clp1-Protein in einer Co-IP nachweisbar (Abbildung 30). In dem verwendeten Stamm AB32 ($a2, \Delta b::P_{crg1}:bW2, P_{crg1}:bE2$) können die exprimierten b-Proteine kein Heterodimer bilden. Der dargestellte Westernblot zeigt eine Interaktion von Clp1 mit beiden einzelnen inkompatiblen b-Proteinen. Sowohl nach der IP mit HA-markiertem bW2 also auch nach der IP mit HA-

markiertem bE2 ist eine deutliche Clp1:myc Bande zu sehen. Die Negativkontrolle mit vergleichbarem Clp1:myc Signal im Input jedoch keinem HA-markierten b-Protein für die Immunopräzipitation zeigt kein Clp1:myc Signal nach der IP. Die Kontrolle auf unspezifische Bindung mittels Aktin Antikörper zeigt ebenfalls kein Signal nach der IP.

2.3.3 Die C-terminalen Verkürzungen beider b-Proteine zeigen eine funktionelle Redundanz für die Interaktion mit Clp1

Bisher konnte in dieser Arbeit die Notwendigkeit des C-terminalen Endes von bW2 im Hefe-2-Hybrid System für die Interaktion mit Clp1 bestätigt werden, dagegen wurde lediglich eine reduzierte Interaktion mit Clp1 bei Verkürzung des C-terminalen Bereiches von bW2 im Heterodimer in *U. maydis* nachgewiesen. Die Hypothese zu einer möglichen ausgleichenden Funktion des zweiten nativen, Vollängen-b-Proteins im Heterodimer konnte in einer Co-IP mit den Einzelproteinen bE und bW, welche beide in der Lage sind mit dem Clp1-Protein zu interagieren weiter gefestigt werden. Ebenfalls bestärkt wird die Hypothese durch die bereits bekannten Ergebnisse aus Kämper *et al.*, 1995 und Schulz *et al.*, 1990. Hier wurde gezeigt, dass eine Deletion des C-terminalen Bereiches im bW2-Protein mit nativem, Vollängen-bE1-Protein im Heterodimer, genau wie eine Deletion des C-terminalen Bereiches im bE1-Protein mit nativem, Vollängen-bW2-Protein im Heterodimer in *U. maydis*, keinen Effekt auf die *b*-vermittelten Funktionen hat. Alle bisherigen Ergebnisse sprechen für eine Redundanz der C-terminalen Bereiche der beiden b-Proteine im Heterodimer. Weitere Erkenntnisse aus Grandel *et al.*, 2000, in dem das voll funktionsfähige Kon8-Fusionsprotein etabliert wurde, stützen ebenfalls die Theorie der redundanten Funktion der C-terminalen Enden von bE und bW. Der untersuchte C-terminale Bereich des bW2-Proteins, ist Bestandteil des Kon8-Fusionsproteins, das C-terminale Ende des bE1-Proteins ist im entwickelten Fusionsprotein mit voller *b*-vermittelten Funktion nicht enthalten. Eine Deletion des C-terminalen Bereiches von bW2 im Kon8-Protein führt zum kompletten Funktionsverlust, da die Redundanz des C-terminalen Bereiches von bW2 durch das fehlende C-terminale Ende des bE1-Proteins im entwickelten Kon8-Protein nicht gegeben ist.

Für die *b*-abhängige Funktion ist vor allem die Interaktion mit dem stabilen Clp1-Protein während der Pflanzenpenetration notwendig, um im Proteinkomplex bE/bW mit Clp1 Gene zu reprimieren und damit die Re-Initiation des Zellzyklus auszulösen und die

Proliferation in der Pflanze zu ermöglichen. Diese Interaktion mit dem Clp1-Protein konnte trotz Verkürzung des bW2-Proteins um den, im Hefe-2-Hybrid System ermittelten, notwendigen Bereich des bW2-Proteins in einer Co-IP gezeigt werden (2.3.1). Außerdem konnte die Interaktion von Clp1 nicht nur mit dem Heterodimer sondern auch mit den beiden einzelnen b-Proteinen bW und bE, bestätigt werden (2.3.2) (Brenner, 2019).

Auf Grund dieser Ergebnisse verschärft sich die Hypothese, dass die C-terminale Verkürzung eines b-Proteins im Heterodimer funktionell ausgeglichen werden kann, auch in Bezug auf die Bildung des Proteinkomplexes bE/bW mit Clp1.

Um den Einfluss der C-terminalen Verkürzungen und die mögliche funktionelle Redundanz auf die weitere pathogene Entwicklung überprüfen zu können, wurden Tests auf filamentöses Wachstum und Pflanzeninfektionen durchgeführt. Die verwendeten Stämme RK1607 (*a1 ΔbW1, bE1*) und RK1722 (*a2 bW2, ΔbE2*) tragen nur ein *b*-Gen im *b*-Locus. Somit kann nach Fusion der Sporidien nur eine Kombinationsmöglichkeit des Heterodimers entstehen und die C-terminalen Verkürzungen in *b*-Gene eingebracht werden, die nach Fusion sicher Bestandteil des Heterodimers sind. Sowohl die *a*-Locusgene als auch die noch im Genom befindlichen Gene für die *b*-Proteine sind kompatibel und können sowohl die *a*-Pheromonkaskade als auch die *b*-vermittelte Kaskade durchlaufen. Durch Kreuzungen der Stämme können Heterodimere forciert werden, die bei Kreuzung der beiden Ausgangsstämme beide nativen, Vollängen-*b*-Proteine tragen. Es können Heterodimere entstehen mit einem verkürzten *b*-Protein und einem kompatiblen, nativen Vollängen-Protein. Durch Kreuzung der beiden erstellten Stämme resultieren Heterodimere mit C-terminalen Verkürzungen beider *b*-Proteine.

Für den Test auf filamentöses Wachstum wurden die Stämme in Vollmedium angezogen, über die OD₆₀₀ normalisiert und je 3 µl auf eine aktivkohlehaltige Vollmediumplatte getropft. Die gezeigten Bilder in Abbildung 31 wurden nach 2 Tagen Inkubation bei 28°C gemacht. Die Kreuzung der Stämme RK1607 (*a1 ΔbW1, bE1*) und RK1722 (*a2 bW2, ΔbE2*) wurde als Positivkontrolle verwendet. Die Kreuzungen der Stämme RK1607 (*a1 ΔbW1, bE1*) mit UJF174 (*a2 bW2_{ΔAS567}::gen^R, ΔbE2::hyg^R*) und RK1722 (*a2 bW2, ΔbE2*) mit UMH1 (*a1 ΔbW1::hyg^R, bE1_{ΔAS332}::gen^R*) enthalten jeweils ein Vollängen-*b*-Protein und ein verkürztes *b*-Protein im Heterodimer. Bei der Kreuzung der Stämme UJF174 (*a2 bW2_{ΔAS567}::gen^R, ΔbE2::hyg^R*) mit UMH1 (*a1*

$\Delta bW1::hyg^R$, $bE1_{\Delta AS332}::gen^R$) kann nur ein Heterodimer mit sowohl verkürztem bW-Protein als auch verkürztem bE-Protein entstehen.

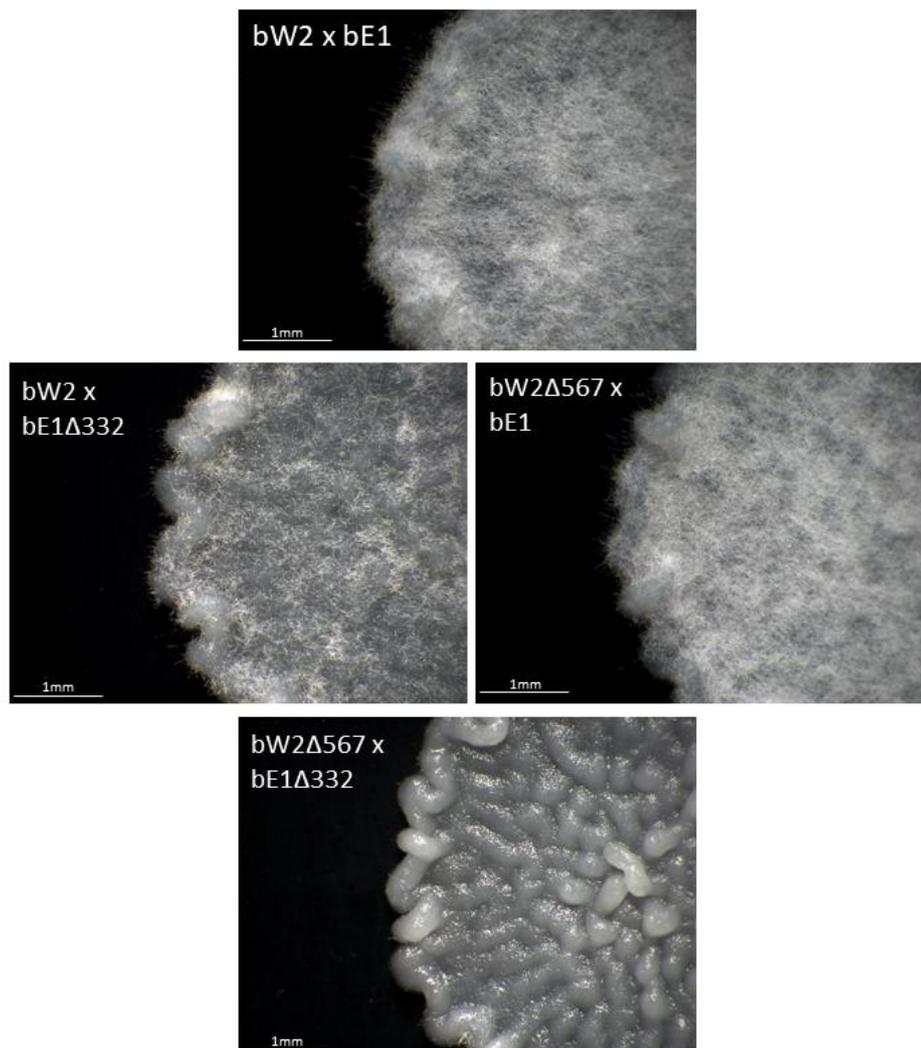


Abbildung 31: Verkürzte b-Proteine haben Einfluss auf das filamentöse Wachstum. Alle dargestellten Stämme wurden über die optische Dichte normalisiert, auf aktivkohlehaltige Platten getropft und nach 2 Tagen ausgewertet. Die Kreuzung der Stämme RK1607 ($a1 \Delta bW1$, $bE1$) und RK1722 ($a2 bW2$, $\Delta bE2$) bildet die Positivkontrolle und zeigt ein funktionsfähiges Heterodimer durch deutliches filamentöses Wachstum auf der aktivkohlehaltigen Platte ($bW2 \times bE1$). Die Kreuzungen der Stämme RK1722 ($a2 bW2$, $\Delta bE2$) mit UMH1 ($a1 \Delta bW1::hyg^R$, $bE1_{\Delta AS332}::gen^R$) ($bW2 \times bE1\Delta332$) und RK1607 mit UJF174 ($a2 bW2_{\Delta AS567}::gen^R$, $\Delta bE2::hyg^R$) ($bW2\Delta567 \times bE1$), mit jeweils einem volllängen und einem verkürzten b-Protein im Heterodimer, wachsen ebenfalls deutlich filamentös. Dagegen zeigt die Kreuzung der Stämme UJF174 ($a2 bW2_{\Delta AS567}::gen^R$, $\Delta bE2::hyg^R$) mit UMH1 ($a1 \Delta bW1::hyg^R$, $bE1_{\Delta AS332}::gen^R$) ($bW2\Delta567 \times bE1\Delta332$) mit Verkürzungen sowohl im bW als auch im bE-Protein des nach Fusion gebildeten Heterodimers, kein filamentöses Wachstum mehr.

Für den in Abbildung 31 dargestellten Test auf filamentöses Wachstum wurden Kreuzungen von zwei im *a*-Locus sowie *b*-Locus kompatiblen Stämmen durchgeführt. Als Positivkontrolle ($bW2 \times bE1$) wurden die beiden Stämme RK1607 ($a1 \Delta bW1$, $bE1$) und RK1722 ($a2 bW2$, $\Delta bE2$) auf aktivkohlehaltige Vollmediumplatte getropft. Beide

Stämme besitzen nur noch ein Gen im *b*-Locus, was nach Fusion der Sporidien nur eine Kombination für das entstehende Heterodimer ermöglicht. Durch das auftretende filamentöse Wachstum ist gleichzeitig die Funktion des entstehenden Heterodimers im gebildeten Heterokaryon sichergestellt. Die beiden Stammkombinationen *bW2* x *bE1Δ332* und *bW2Δ567* x *bE1* zeigen Kreuzungen mit jeweils einem WT Stamm und einem Stamm mit verkürztem *b*-Protein. Beide Kreuzungen weisen ein vergleichbares filamentöses Wachstum auf aktivkohlehaltigen Platten auf wie der gezeigte WT. Daraus resultierend, scheint die Verkürzung eines *b*-Proteins nicht auszureichen, um die gesamte Funktion des Heterodimers zu stören. Dagegen zeigt die Kreuzung *bW2Δ567* x *bE1Δ332* keinen Ansatz von filamentösem Wachstum. Die C-terminale Verkürzung beider im Heterodimer befindlichen *b*-Proteine scheint die *b*-Funktion komplett zu zerstören.

Um den weiteren Effekt der *b*-Verkürzungen auf die pathogene Entwicklung untersuchen zu können wurden dieselben Stämme wie im vorangegangenen Versuchsaufbau nun in die Pflanzeninfektion eingebracht und die pathogene Entwicklung auf und in der Pflanze mikroskopisch genauer betrachtet.

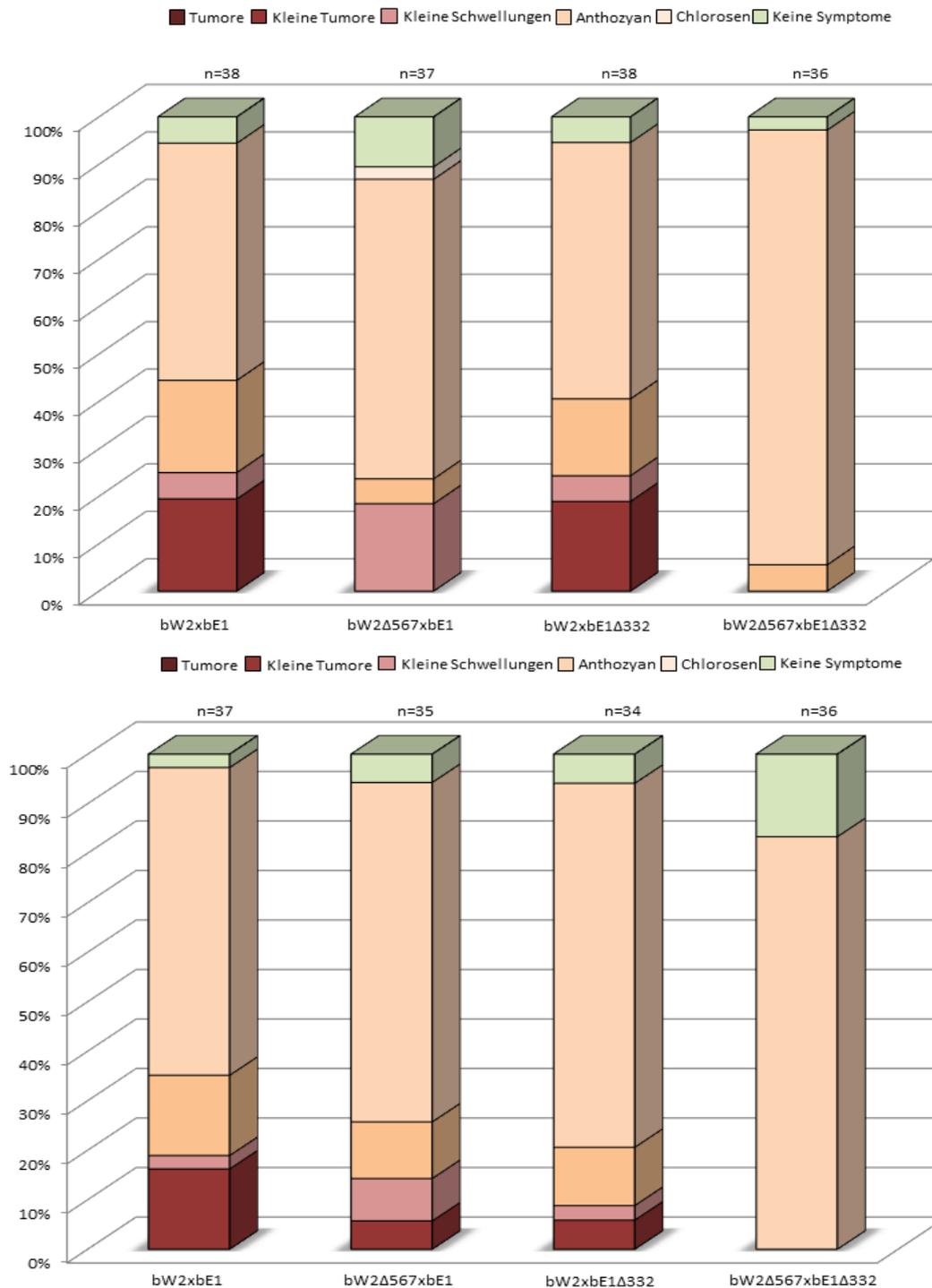


Abbildung 32: C-terminale Verkürzungen in b-Proteinen können im Heterodimer bei Pflanzeninfektionen kompensiert werden. Gezeigt sind zwei unabhängige Infektionen, alle gezeigten Versuchsansätze wurden in 7 Tage alte Maissetzlinge infiziert. 10 Tage nach Infektion wurden Infektionssymptome ausgewertet, wie oben in der Legende angegeben. Die gesamte Anzahl an verwendeten Pflanzen in den 2 unabhängigen Experimenten ist mit n über den einzelnen Balken angegeben. Die Kreuzung der Positivkontrolle, RK1607 ($a1 \Delta bW1$, $bE1$) und RK1722 ($a2 bW2$, $\Delta bE2$) verursacht die stärksten Infektionssymptome in der Pflanze. Die beiden Kreuzungen RK1722 ($a2 bW2$, $\Delta bE2$) mit UMH1 ($a1 \Delta bW1::hyg^R$, $bE1_{\Delta AS332}::gen^R$) und RK1607 mit UJF174 ($a2 bW2_{\Delta AS567}::gen^R$, $\Delta bE2::hyg^R$) mit jeweils einem volllängen und einem verkürzten b-Protein im Heterodimer zeigen etwas schwächere Symptome, aber sind noch in der Lage kleine Tumore zu bilden. Nur die Kreuzung der Stämme UJF174 ($a2 bW2_{\Delta AS567}::gen^R$, $\Delta bE2::hyg^R$) mit UMH1 ($a1 \Delta bW1::hyg^R$, $bE1_{\Delta AS332}::gen^R$) mit beiden C-terminal verkürzten b-Proteinen im Heterodimer verursachen kaum Symptome einer Infektion an den ausgewerteten Pflanzen.

Wie in Abbildung 32 zu sehen, zeigt die Kreuzung der WT Stämme RK1607 und RK1722 in beiden unabhängigen Infektionen, mit gerade einmal 20 % Tumorbildung und 55 % Anthozyanbildung eine recht schwache Infektion für eine Positivkontrolle. Durch die Kreuzung dieser Stämme kann nur eine Kombinationsmöglichkeit für ein b-Heterodimer auftreten, da beide eingesetzten Stämme nur ein *b*-Gen im *b*-Locus tragen und eine C-terminale Verkürzung kann gezielt in ein b-Protein eingebracht werden, das nach Fusion der Sporidien sicher Bestandteil des b-Heterodimers ist. Die beiden Kreuzungen bW2 x bE1 Δ 332 und bW2 Δ 567 x bE1, die jeweils ein volllängen und ein C-terminal verkürztes b-Protein im Heterodimer tragen, zeigen noch deutliche Pathogenitätssymptome in beiden unabhängigen Infektionen. Vergleicht man jedoch diese beiden Kreuzungen in Infektion 1 (Abbildung 32, oben) ist ein Unterschied zwischen den Infektionen zu sehen. So scheint die C-terminale Verkürzung des bW-Proteins im Heterodimer in der Kreuzung bW2 Δ 567 x bE1 deutlich relevanter für die pathogene Entwicklung in der Pflanze zu sein als die C-terminale Verkürzung des bE-Proteins in der Kreuzung bW2 x bE1 Δ 332. Nach der Infektion mit der Kreuzung mit verkürztem bE-Protein tritt noch immer eine normale und kleine Tumorbildung mit knapp 20 % auf, dagegen sind in der Kreuzung mit verkürztem bW-Protein unter 20 % und nur noch kleine Tumorbildungen nachweisbar. In Infektion 2 (Abbildung 32, unten) hingegen sehen die beiden Kreuzungen bW2 x bE1 Δ 332 und bW2 Δ 567 x bE1 sehr ähnlich aus und zeigen jeweils eine Tumorbildung von 15 % bis 20 %. Lediglich die Kreuzung bW2 Δ 567 x bE1 Δ 332 mit C-terminalen Verkürzungen beider b-Proteine im Heterodimer zeigt in beiden unabhängigen Infektionen keine Symptome, die auf eine pathogene Entwicklung hinweisen. Die auftretende Anthozyanbildung von fast 90 % lässt jedoch auf erste Abwehrreaktionen der Pflanze schließen.

Um die Morphologie der Hyphen auf (*on planta*) und in der Pflanze (*in planta*) genauer untersuchen zu können wurde infiziertes, gefärbtes Pflanzenmaterial mikroskopisch untersucht. Hierfür wurde direkt unter der Inokulationsstelle Pflanzenmaterial 3 Tag nach Infektion (dpi) entnommen und der Pilz mit Chlorazol Black E-Lösung angefärbt. Weiteres Blattmaterial wurde mit WGA-AF488 zur Visualisierung der Pilzhyphe und Propidium Iodid (PI) zum Anfärben der pflanzlichen Zellwand behandelt. Die Pflanzen für die mikroskopische Auswertung wurden zeitgleich mit der Pflanzeninfektionsstudie inokuliert und zeigen die identischen Stämme wie das filamentöse Wachstum und die Pathogenitätsstudie.

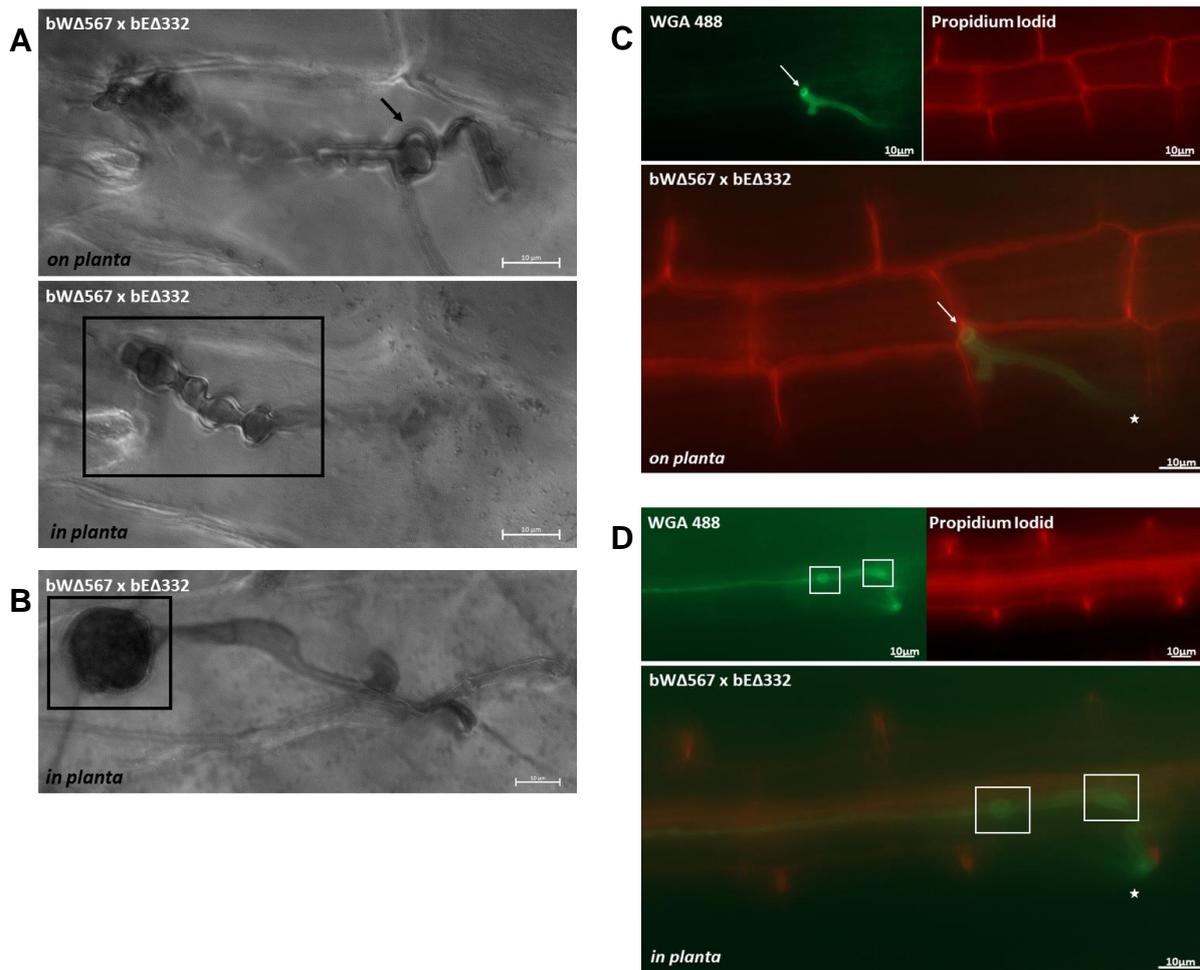


Abbildung 33: Untersuchung des Wachstumsverhaltens von Kreuzungen mit C-terminalen Verkürzungen beider b-Proteine im Heterodimer innerhalb der Pflanze. In allen gezeigten mikroskopischen Aufnahmen ist die Kreuzung $bW\Delta 567 \times bE\Delta 332$ gezeigt. Das Blattmaterial wurde 3 Tage nach der Inokulation entnommen, mit Chlorazol Black E (A, B) oder mit WGA-AF488 und Propidium Iodid (PI) (C, D) gefärbt und anschließend mikroskopisch untersucht. Gezeigt sind Pilzhypen auf der Pflanze (*on planta*) und in der Pflanze (*in planta*). Mit Pfeilen sind Appressorien gezeigt. Mit schwarzem Kasten ist die abnormale Morphologie in der Pflanze gekennzeichnet (A, B). WGA-AF488-PI Färbung zeigt die Pilzhyphe in Grün und die Pflanzenzellwand in Rot auf der Pflanze (C) und in der Pflanze (D). Mit einem Stern in beiden Bildern ist die Aus-, bzw. Eintrittsstelle der Hyphe in die nächste Ebene markiert. Mit einem weißen Kasten sind morphologische Auffälligkeiten der filamenteös wachsenden Hyphe in der Pflanze gekennzeichnet.

In Abbildung 33 ist die mikroskopische Untersuchung der Kreuzung $bW\Delta 567 \times bE\Delta 332$ dargestellt. Nur bei dieser Kreuzung konnte eine fehlende Virulenz in der vorangegangenen Pflanzeninfektion nachgewiesen werden. Aus diesem Grund wurde Blattmaterial dieser Kreuzung mit Chlorazol Black E-Lösung oder WGA-AF488 / PI-Lösung gefärbt um den genaueren Effekt auf die Morphologie und die Entwicklung der Pilzhyphe sichtbar zu machen. In Abbildung 33 A und B sind morphologische Besonderheiten dargestellt. Auf der Pflanze in Abbildung 33 A ist ein gebildetes Appressorium zu sehen (Pfeil), in der Pflanze dann jedoch ein sehr

abnormales, stark verdicktes Wachstum mit mehreren direkt nacheinander auftretenden Wucherungen. In Abbildung 33 B ist ebenfalls ein Morphologiedefekt, eine knöllchenartige Struktur, in der Pflanze gezeigt. Beide Hyphenphänotypen in der Pflanze sind vergleichbar mit Kreuzungen aus Heimel *et al.*, 2010b in welcher die Gene *rfb1* und *clp1* dauerhaft in der Pflanze exprimiert wurden. In Abbildung 33 C und D ist die WGA-AF488 / PI Färbung dargestellt und zeigt dieselbe Pilzhyphe sowohl auf als auch in der Pflanze. In rot ist die Pflanzenzellwand dargestellt, in grün die Pilzhyphe. In Abbildung 33 C ist die Pilzhyphe auf der Pflanze zu sehen, mit einem Pfeil ist das gebildete Appressorium markiert, mit einem Stern die Aus-, bzw. Eintrittsstelle der Hyphe aus bzw. in die andere Fokusebene. In Abbildung 33 D befindet sich die Hyphe im Inneren der Pflanze und wächst von der mit Stern markierten Stelle filamentös weiter in die Pflanze. Durch weiße Kästen derselben Abbildung sind morphologische Besonderheiten herausgearbeitet. Die Pilzhyphe wächst zwar filamentös in der Pflanze, weist jedoch mehrfach verdickte und knöllchenartige Strukturen im Filament auf. Eine weitere Proliferation in der Pflanze mit verzweigtem Hyphenwachstum oder die Bildung von Schnallenzellen konnte nicht beobachtet werden.

3 Diskussion

In dieser Arbeit wurde das Zusammenspiel der pathogenitätsrelevanten Faktoren bE/bW und Clp1 genauer betrachtet und deren Einfluss auf die Feinregulation der Genexpression während der Etablierung der pathogenen Entwicklung mittels genomweiter RNA-Seq und CHIP-Seq Analysen untersucht.

Das bE/bW Heterodimer wird nach Fusion zweier kompatibler Sporidien gebildet und etabliert durch Aktivierung der *b*-abhängigen Regulationskaskade den Eintritt in die pathogene Entwicklungsphase durch Initiation eines G2-Zellzyklusarrests. Zu den direkt *b*-induzierten Genen zählen der Transkriptionsfaktor Rbf1 und der Entwicklungsregulator Clp1 (Heimel *et al.*, 2010b). Der Transkriptionsfaktor Rbf1 gilt als Masterregulator der pathogenen Entwicklung, da 90 % aller Gene in der *b*-Kaskade über Rbf1 reguliert werden. Das *clp1* Gen wird ebenfalls direkt zu Beginn der biotrophen Entwicklung transkribiert, ist jedoch anfangs nicht als stabiles Protein nachweisbar. Erst während der Appressorienbildung, kurz vor der Pflanzenpenetration, ist ein stabiles Protein detektierbar (Scherer *et al.*, 2006). Zu diesem Zeitpunkt ist auch die Funktion von Clp1 als Interaktionspartner des Heterodimers bE/bW von essentieller Bedeutung. Durch die Interaktion von Clp1 mit dem bE/bW-Komplex wird die aktivierende Wirkung von bE/bW auf direkt *b*-induzierte Gene, wie z.B. den Transkriptionsfaktor Rbf1, aufgehoben. Diese Repression hat Auswirkungen auf eine Vielzahl von Folgegenen, die durch ausbleibende Induktion von Rbf1 nicht weiter induziert werden. Die Auswirkung dieses regulatorischen Effektes ist essentiell, da die Re-Initiation des Zellzyklus daran gekoppelt ist und nur so die Hyphe nach Appressorienbildung innerhalb der Pflanze proliferieren kann.

Im Focus dieser Arbeit stehen genomweite Funktionsanalysen des bE/bW-Clp1-Proteinkomplexes, sein Aufbau sowie der Mechanismus der Repression. Weiterhin wird der stabilisierende Effekt auf den Komplexpartner Clp1 untersucht.

3.1 Der bE/bW-Clp1-Proteinkomplex hat einen gezielten Einfluss auf pathogenitätsrelevante Faktoren.

Unterschiedliche Entwicklungsstadien verlangen eine differenzierte Regulation gewebe- oder zeitspezifischer Gene. So ist es auch bei *U. maydis*, der für einen Wechsel vom saprophytischen zum biotrophen Lebensstil eine stadienspezifische differentielle Genregulation zwingend benötigt.

Die Auswirkung des bE/bW-Clp1-Proteinkomplexes auf die genomweite Genregulation wurde mit RNA-Seq Analysen genauer betrachtet. Die Auswertungen der RNA-Seq Analysen zeigen einen sehr spezifischen Effekt von Clp1 als reprimierenden Faktor während der Genregulation. Es konnte bestätigt werden, dass der generelle *b*-abhängige Effekt der Geninduktion zum Großteil über den direkt *b*-abhängig induzierten Masterregulator Rbf1 abläuft. Nur 13 % (21 Gene) der *b*-abhängig induzierten Gene werden auch in Abwesenheit von Rbf1 weiterhin durch *b*-Induktion aktiviert. 87 % (135 Gene) der Gene der *b*-Regulationskaskade werden durch den Transkriptionsfaktor Rbf1 induziert. Der regulatorische Effekt von Clp1 auf die 21 direkt *b*-induzierten Gene beschränkt sich auf 12 Gene und damit auf 57 %. Bei fünf dieser Gene konnte neben einer Bindung von Clp1 und bE/bW im Promotorbereich mittels ChIP-Seq Analyse auch eine konservierte *bbs* mittels FIMO Abfrage nachgewiesen werden. Zu diesen Genen zählen unter anderem *rbf1* und *clp1*. Damit konnte der reprimierende Effekt von Clp1 durch direkte Bindung im Promotorbereich an das bE/bW Heterodimer auf fünf regulierte Gene zusammengefasst werden. Die Notwendigkeit der Repression von Clp1 für die weitere pathogene Entwicklung steht jedoch außer Frage. Alleine durch die Repression von *rbf1*, die zwingend erforderlich für die Re-Initiation des Zellzyklus ist, hat der Proteinkomplex aus bE/bW und Clp1 eine entscheidende Kontrollfunktion, die essentiell für die Kolonisierung der Pflanze ist. Eine vergleichbare Relevanz hat die Repression von *clp1* selbst. Die Repression zum Zeitpunkt der Stabilisierung stellt ein Gleichgewicht her, um durch das Ausbleiben der Komplexbildung von bE/bW und Clp1 die Expression von *clp1* in der Pflanze zu ermöglichen. Dies dient als Voraussetzung für die weitere Propagation nach der Penetration. Wie genau diese Regulation abläuft und wie das ebenfalls bE/bW-Clp1-abhängig regulierte *rbf1* Gen in der Pflanze weiter reprimiert bleibt, wohingegen *clp1* erneut induziert wird, ist bisher nicht verstanden.

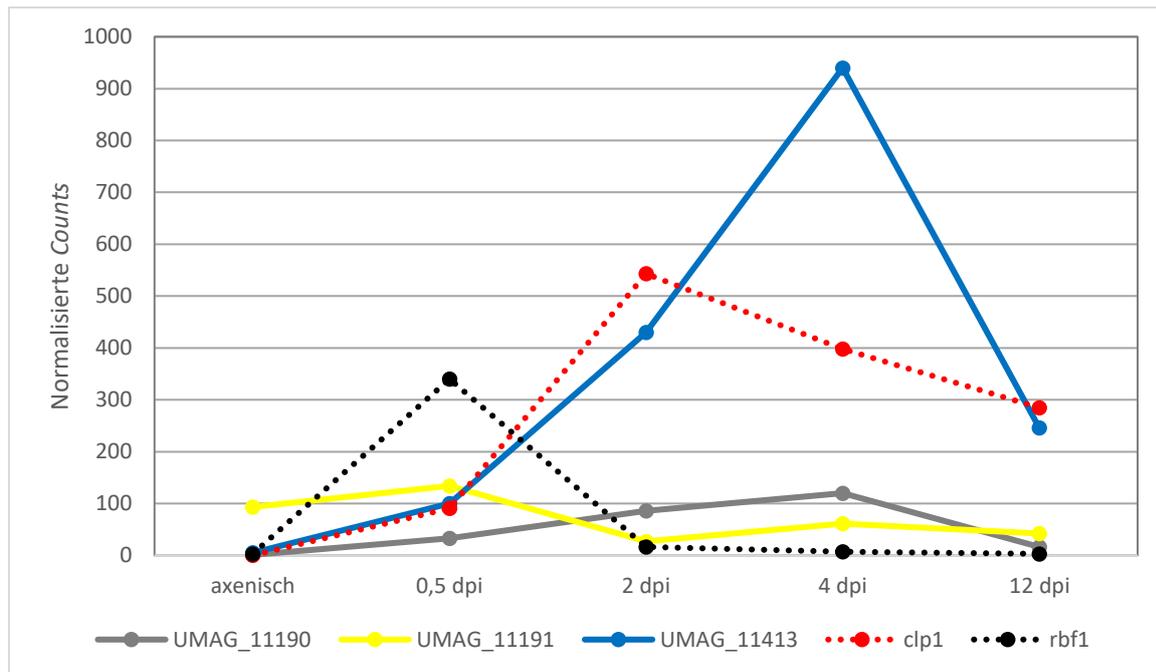


Abbildung 34: Gene mit Clp1 Bindung über das bE/bW Heterodimer und differentieller Genregulation in den RNA-Seq Analysen dieser Arbeit, zeigen auch eine differentielle Regulation in der Pflanze. Expressionslevel während der pathogenen Entwicklung bis 12 dpi. Die Angaben beziehen sich auf die RNA-Seq Analyse aus Lanver *et al.*, 2018 und zeigen alle Gene, mit differentielle Regulation in der Pflanze, die durch Auswertung der RNA-Seq Analysen einen bE/bW-Clp1-abhängigen reprimierenden Effekt nach Stabilisierung des Clp1-Proteins aufweisen. Außer *rbf1* werden alle anderen Gene auch in der Pflanze weiterhin differentiell reguliert.

Den Genen *UMAG_11190*, *UMAG_11191* und *UMAG_11413*, welche neben *rbf1* und *clp1* zu den fünf Clp1-abhängig reprimierten Genen mit nachgewiesener Bindung und *bbs* zählen, wurde bisher keine entwicklungspezifische Funktion zugesprochen. Deletionen der Gene *UMAG_11190* und *UMAG_11413* zeigen im solopathogenen Stamm SG200 einen Wildtyp Phänotyp ohne Beeinträchtigung der pathogenen Entwicklung (Heimel *et al.*, 2010a). Jedoch ist auch bei diesen Genen, wie in Abbildung 34 gezeigt, eine differentielle Regulation in der Pflanze nachweisbar. Das Gen *UMAG_11413* zeigt ein sehr hohes Expressionsmaximum nach 4 dpi. Die beiden Gene *UMAG_11190* und *UMAG_11191* zeigen eine geringe, aber deutliche differentielle Expression in der Pflanze. Damit scheint *rbf1* eine Sonderposition einzunehmen und als einziges bE/bW-Clp1-abhängig reprimiertes Gen in der Pflanze nach 2 dpi komplett und durchgängig inaktiv zu bleiben. Die Regulation könnte spezifisch für *rbf1*, zumindest bei den in dieser Arbeit betrachteten Genen, durch Bindung eines Repressors im *rbf1*-Promotor ablaufen, der zu allen anderen bE/bW-Clp1-abhängig regulierten Genen keine Bindeaffinität aufweist.

Eine wesentliche Rolle für die differentielle Genexpression spielt die kombinatorische Interaktion zwischen Transkriptionsfaktoren. Diese Interaktionen ist wichtig, um eine raum-zeitlich spezifische Transkription auszulösen. Die kombinatorische Betrachtungsweise von RNA-Seq und CHIP-Seq Analysen kann genaueren Aufschluss über die regulatorische Funktion von Transkriptionsfaktorkomplexen geben.

Ein Einfluss der Clp1 Expression auf die Bindung des Heterodimers als grundlegender Mechanismus der Repression kann anhand der Daten ausgeschlossen werden. Nur für die beiden Clp1-abhängig reprimierten Gene *UMAG_01262* und *UMAG_01234* konnten Promotorregionen identifiziert werden, in denen die bE/bW-Bindung durch Überexpression von Clp1 aufgehoben wird. Bei beiden Genen ist mit Rbf1 ein deutlich stärkerer reprimierender Effekt ($\log_2FC = -6,2$ und $-6,14$) nachweisbar als im *rbf1*-Deletionshintergrund ($\log_2FC = -2,21$ und $-1,6$).

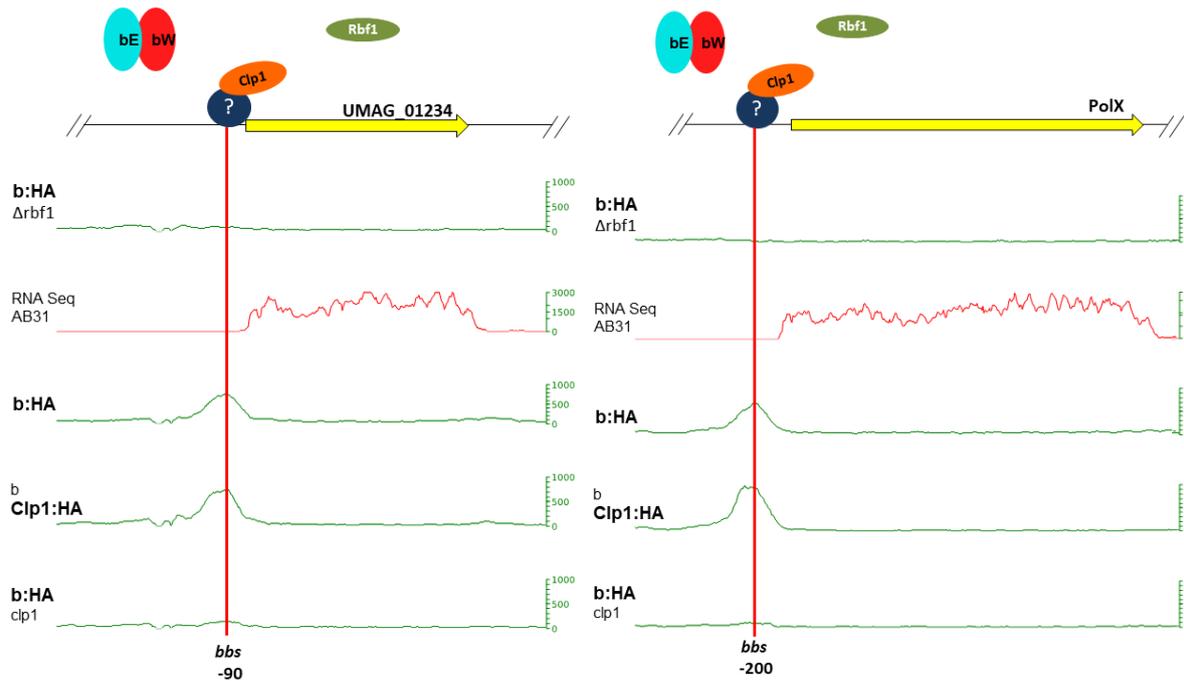


Abbildung 35: Promotoren mit Bindung von Clp1 über einen unbekanntem Faktor, unabhängig von bE/bW oder Rbf1. Visuelle Darstellung von Reads und Bindestellen der ChIP-Seq Analysen von UDS5 (b:HA $\Delta rbf1$), UDS1 (b:HA), UJU82.8 (b Clp1:HA) und UJF104 (b:HA clp1). Reads wurden mit Bowtie2 version 2.0.0-beta7 (Langmead und Salzberg, 2012b) auf das *Ustilago maydis* Genom (Ensembl Genomes 33 (Kersey et al., 2018) aligniert. Zur visuellen Darstellung der Reads wurde der Generic Genome Browser Version 2.33 verwendet. Peak-Profile sind repräsentiert durch global normalisierte Read-counts aller ChIP-Seq Experimente. Positionen der mittels FIMO Abfrage ermittelten *bbs* sind mit rotem Strich durch alle Experimente im Promotor markiert und durch gezeigte Proteinkomplexe in den Promotorregionen über den Tracks gekennzeichnet. RNA Seq AB31 zeigt die Expression des Gens nach *b*-Induktion. Links: Die Promotorregion von *poIX* (*UMAG_01262*) stellt exemplarisch einen Promotor mit Bindung des Heterodimers nach *b*-Induktion (b:HA) sowie Clp1 Bindung bei gleichzeitiger Überexpression von *b* und Clp1 (b Clp1:HA). Der Clp1 Effekt durch Repression von Rbf1 über den Proteinkomplex aus bE/bW und Clp1 beeinflusst die *b*-Bindung (b:HA clp1) genauso stark wie die Deletion von *rbf1* (b:HA $\Delta rbf1$). Die Überexpression von Clp1 Verdrängt die vorab am Promotor bindenden Faktoren Rbf1 und bE/bW. Die gezeigte Bindung von Clp1 muss daher über einen weiteren Faktor, gekennzeichnet durch den Faktor „?“, unabhängig von Rbf1 und bE/bW etabliert werden. Rechts: Die Promotorregion von *UMAG_01234* stellt einen weiteren Promotor mit demselben Bindemuster dar. Diese beiden Promotoren stellen eine Ausnahme dar und zeigen eine nur in diesen Promotoren nachweisbaren Effekt der Clp1 Induktion.

Wie in Abbildung 35 dargestellt, kann in den Promotorbereichen der Gene *poIX* (*UMAG_01262*) und *UMAG_01234* eine Bindung des bE/bW Heterodimers in der ChIP b:HA, bei der der *b*-Locus direkt induziert wurde, nachgewiesen werden. Der signifikante *Peak* in b:HA passt zu der durch eine FIMO Abfrage identifizierten *bbs*. Interessanterweise ist bei beiden Promotoren die Bindung von bE/bW von Rbf1-abhängig, da im *rbf1*-Deletionshintergrund keine bE/bW Bindung mehr detektiert werden kann (b:HA $\Delta rbf1$). Es ist anzunehmen, dass die fehlende Bindung von bW nach Clp1 Induktion ebenfalls durch die Clp1 vermittelte Repression von Rbf1 verursacht wird. Die fehlende *b*-Bindung nach Clp1 Induktion wäre damit kein direkter Effekt von Clp1 auf die Bindung des bE/bW Heterodimers. Über den Proteinkomplex mit bE/bW wirkt Clp1 reprimierend auf *rbf1*, das an der Bindung von *b* in den

Promotoren von *polX* und *UMAG_01234* mitbeteiligt sein muss. Wenn allerdings bE/bW auf Grund der Repression von Rbf1 nicht mehr an die DNA bindet, sollte auch keine signifikante Clp1 Bindung an der Promotorregion nachweisbar sein. Allerdings ist die Clp1 Bindung trotz nicht nachweisbarer Bindung von Rbf1 und bE/bW in beiden Promotoren signifikant. Da Clp1 jedoch keine DNA bindenden Motiv aufweisen, muss davon ausgegangen werden, dass Clp1 über die Interaktion mit einem weiteren Faktor an die DNA bindet, durch diese Bindung könnte der bE/bW-Rbf1 Komplex zusätzlich von der Bindestelle verdrängt werden.

Auf Grund der fehlenden DNA bindenden Domänen im Clp1-Protein, einem ausbleibenden Effekt bei alleiniger Überexpression von Clp1 und weiteren sechs Promotoren nach Auswertung der ChIP-Seq Analysen, an denen Clp1 wie auch in *UMAG_01262* und *UMAG_01234* ohne die Faktoren Rbf1 oder bE/bW eine Bindung aufweist (Tabelle 2), scheint die Bindung über weitere bisher unbekannte Faktoren am wahrscheinlichsten. Alle Gene, die diesen Promotorregionen zugeordnet wurden, sind unter den in dieser Arbeit getesteten Bedingungen nicht differentiell reguliert. Weder durch Induktion von *b* noch durch gleichzeitige Überexpression von *b* und Clp1 kann ein regulatorischer Effekt nachgewiesen werden. In Abbildung 36 sind die Expressionslevel von vier dieser Gene während der Kolonisierung der Pflanze dargestellt. Das Gen *UMAG_06076* hat ein Expressionsmaximum nach 4 dpi, das Gen *UMAG_05422* erst nach 8 dpi. *UMAG_11558* zeigt sein höchstes Expressionslevel bereits nach 0,5 dpi, vergleichbar mit *UMAG_01262*. Alle weiteren Gene aus dieser Kategorie sind in der Pflanze nur schwach exprimiert und zeigen keine differentielle Expression während der Proliferation der Pflanze bis 12 dpi. Obwohl die Gene in axenischer Kultur nicht Clp1-abhängig reguliert werden, kann damit eine Clp1-abhängige Regulation zu einem späteren Zeitpunkt während der pathogenen Phase ausgeschlossen werden. Eine mögliche Erklärung wäre die Bindung von Clp1 über unbekannte Faktoren, die zum einen die bE/bW unabhängige Bindung von Clp1 unter saprophytischen Bedingungen ermöglichen, zum anderen die Regulation in der Pflanze beeinflussen, unter axenischen Kulturbedingungen jedoch nicht aktiv sind.

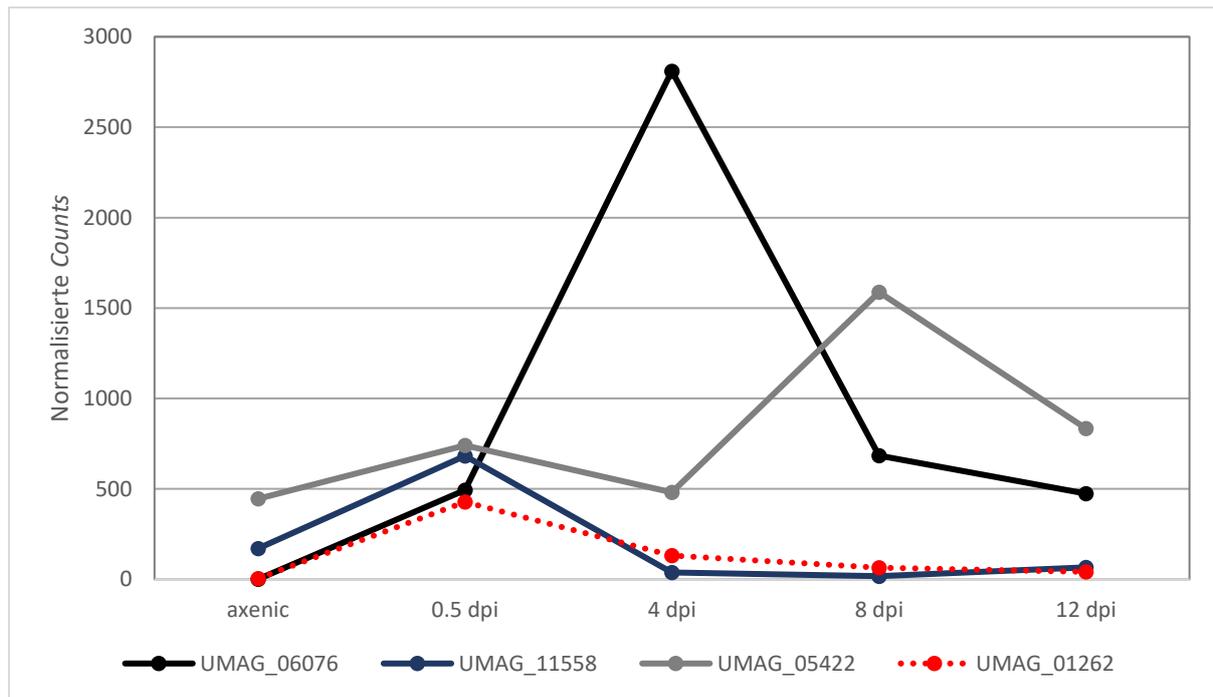


Abbildung 36: Expressionsprofile während der pathogenen Entwicklung bis 12 dpi. Gezeigt sind Gene, deren Promotorbereiche eine Clp1 Bindung unabhängig vom bE/bW Heterodimer aufweisen. Es ist eine differentielle Genexpression in der Pflanze für die gezeigten Gene nachweisbar. Die Angaben beziehen sich auf die RNA-Seq Analyse aus Lanver *et al.*, 2018 und zeigen alle Gene, mit differentiellem Regulation in der Pflanze, die durch Auswertung der ChIP-Seq Analysen eine Clp1 Bindung im Promotor nachweisen, ohne Komplexpartner bE/bW.

Bei allen Promotoren, bei denen Clp1 unabhängig von bE/bW bindet, stellt sich die Frage nach dem Komplexpartner, der die Bindung von Clp1 an die DNA ermöglicht. Bei einem Hefe-2-Hybrid Screen zur Identifizierung von potentiellen Interaktionspartnern von Clp1 wurden neben Rbf1 und bW, die Transkriptionsfaktoren Cib1 (*UMAG_11782*), white collar 2 (*wc-2*, *UMAG_02664*) und CDC36 (*UMAG_00523*) identifiziert (Heimel *et al.*, 2010b). Anhand RNA-Seq Analysen konnte jedoch lediglich für den Transkriptionsfaktor Cib1 eine sehr geringe Expression, bei vergleichbaren Bedingungen wie bei der durchgeführten ChIP-Seq Analyse, nachgewiesen werden (Jonas Ulrich, persönliche Mitteilung). Mit einem $\log_2FC = 0,5$ fällt das *cib1* Gen bei den angesetzten Filterkriterien als nicht signifikant reguliert heraus. Für Cib1 konnte bereits gezeigt werden, dass das Protein an DNA bindet und mit Clp1 einen Proteinkomplex eingeht, was die Cib1-abhängige transkriptionelle Aktivität reprimiert (Pinter *et al.*, 2019). Daher ist nicht auszuschließen, dass die minimale Expression in Verbindung mit der nachgewiesenen Stabilisierung durch die Interaktion mit Clp1 ausreicht, um eine Bindung an die DNA in den aufgezeigten Promotoren zu ermöglichen. Ein weiterer noch unbekannter Faktor, der unter den hier

betrachteten Bedingungen stark exprimiert wird, mit Clp1 interagiert und so eine DNA Bindung ermöglicht, kann weiterhin nicht ausgeschlossen werden.

Durch die Interaktion mit Clp1 führt es sowohl im Fall von bE/bW als auch von Cib1 zu einer Repression der Aktivität (Pinter *et al.*, 2019). Ein möglicher Repressionsmechanismus ist bereits für das Repressorprotein GAL80 in *S. cerevisiae* publiziert. Hier kommt es durch Bindung von GAL80 Proteinen als Dimer an den dimeren Transkriptionsaktivator Gal4 zur Maskierung der für die Geninduktion notwendigen Aktivierungsdomäne (Melcher und Xu, 2001; Pilauri *et al.*, 2005; Salmeron *et al.*, 1990). Eine in bW2 vermutete transaktivierende Domäne, die mit der Interaktionsdomäne zu Clp1 übereinstimmt, spricht ebenfalls für einen vergleichenden Mechanismus bei der Clp1-abhängigen Repression. Damit gehört der GAL80 Repressor und sehr wahrscheinlich auch Clp1, nach dem bisherigen Wissensstand, zur Klasse der „*short-range*“ Repressoren, welche meist im Promotorbereich binden und nahe liegende Aktivatoren oder den Präinitiationskomplex inhibieren (zusammengefasst in Gaston und Jayaraman, 2003). Darüber hinaus kann Clp1 nach Auswertung der RNA-Seq und ChIP-Seq Analysen zu den Repressoren mit genspezifischer Funktion gezählt werden, welche durch promotorspezifische Interaktion mit dem Präinitiationskomplex oder Konzentrationsveränderung der promotorbindenden Aktivatoren gezielt die Genaktivität beeinflussen (zusammengefasst in Payankulam *et al.*, 2010).

Eine nicht auszuschließende Erklärung für die fehlende Rbf1 und b-Bindung in den Promotoren *UMAG_01262* und *UMAG_01234* ist die Zugänglichkeit der Epitope für die IP bei Komplexbildung. Durch die Bindung des zusätzlich induzierten Clp1-Proteins an das bE/bW Heterodimer könnte das HA Epitop für die IP schwer oder gar nicht zugänglich sein. Somit wäre eine Anreicherung bei zusätzlicher Clp1 Überexpression trotz Anwesenheit von bE/bW am Promotor nicht möglich. Die Anreicherung von Clp1 hingegen wäre nicht beeinträchtigt und die DNA Bindung würde trotz allem über das Heterodimer stattfinden. Eine vergleichbare Argumentation wäre für den ebenfalls im Promotorkomplex sitzenden Faktor Rbf1 möglich. Hierfür wären Mutationen in den stark konservierten Bindestellen der beiden Transkriptionsfaktoren bE/bW und Rbf1 in einem der Promotoren nötig, um eine Bindung wirklich ausschließen zu können. Mit quantitativen ChIP Analysen könnte die fehlende Bindung von bE/bW und Rbf1 nach Mutation im Promotor überprüft werden. Anschließend wäre eine noch nachweisbare Clp1 Bindung an die DNA mit einem weiteren unbekanntem Faktor verifiziert.

In allen untersuchten Promotoren, in denen bE/bW an DNA bindet, interagiert bei gleichzeitiger Überexpression von Clp1 dieses immer mit dem Heterodimer an der DNA. Es konnte kein Promotor gezeigt werden, in dem Clp1 nicht mit dem bE/bW Heterodimer interagiert. Offensichtlich gibt es keine konkurrierenden Faktoren, die in axenischer Kultur anstelle von Clp1 mit dem bE/bW Heterodimer in Anwesenheit von Clp1 interagieren.

3.2 Identifizierung eines pathogenitätsrelevanten Motivs in Clp1

Eine Voraussetzung für die in 3.1 beschriebene Repression des bE/bW Komplexes durch Clp1 ist die Stabilisierung des Clp1-Proteins. Nach *b*-Induktion und dem daraus resultierenden G2 Zellzyklusarrest (Wahl *et al.*, 2010) wird das direkt *b*-induzierte *clp1* Gen schon früh während der Etablierung der pathogenen Entwicklung induziert. Clp1 ist jedoch erst bei Appressorienbildung und damit kurz vor der Penetration der Pflanze als Protein nachweisbar (Scherer *et al.*, 2006). Die Re-Initiation des Zellzyklus findet im selben Zeitfenster wie die Stabilisierung des Clp1-Proteins statt und ermöglicht die Proliferation in der Pflanze. Das „*steady state level*“ von Proteinen wird über die relative Produktionsrate und ihre Abbauraten bestimmt. Dabei hat sowohl die Transkriptionsrate der vorangegangenen mRNA und deren Abbau als auch die Translationsgeschwindigkeit zum Protein und der Proteinabbau Einfluss (Li *et al.*, 2014). Im Fall von Clp1 scheint die Erhöhung des Proteinlevel am wahrscheinlichsten durch eine Stabilisierung des Proteins beeinflusst zu werden. So konnte bereits ein stabilisierender Effekt auf das Clp1-Protein durch die Interaktion mit dem UPR-Regulator Cib1 nachgewiesen werden (Heimel *et al.*, 2013). Aufgrund der zeitlichen Übereinstimmung wurde Clp1 genauer auf eine Domäne mit möglicher Funktion an den Zellzykluskontrollpunkten oder im Hinblick auf die Proteinstabilität untersucht. Die Zellzykluskontrollpunkte vor und während der Mitose sind hauptsächlich vom Gleichgewicht der beiden cyclinabhängigen-Kinase(CDK)-Komplexe, Cdk1-Cib1 und Cdk1-Cib2, abhängig (García-Muse *et al.*, 2004).

Eine Clp1 Stabilisierung wurde bereits (Trognitz, 2014) durch C- und N-terminale Verkürzungen sowie als Folge von internen Deletionen im Clp1-Protein gezeigt. Der zentrale Bereich von Clp1, der aufgrund der erfolgten Voruntersuchungen als potentiell destabilisierend galt, weist ein für die aufgestellte Hypothese interessantes ABBA Motiv auf. ABBA wurde erstmals bioinformatisch als SLiM (*short linear motif*) in Cyclin

A, BUBR1, BUB1 und Acm1 (ABBA) als Mediator für die Bindung zwischen mitotischen Regulatoren und den „*Anaphase Promoting Complex/Cyclosome*“ (APC/C) Co-Aktivatoren Cdc20 und Cdh1 beschrieben (Di Fiore *et al.*, 2015). Der APC/C regelt, nach Aktivierung, durch die Bindung seiner Co-Aktivatoren den Abbau der mitotischen CDKs (Chang und Barford, 2014). Der APC/C wird durch seine Interaktion mit den Co-Aktivatoren Cdc20 und Hct1 zeitlich gesteuert, wodurch eine spezifische Substraterkennung im Zellzyklus gewährleistet wird (Visintin *et al.*, 1998). So spielt der APC/C sowohl bei Eintritt in die Anaphase, vermittelt über Cdc20, als auch beim Austritt aus der Mitose, vermittelt über Cdh1, eine bedeutende Rolle.

Der zeitliche Zusammenhang der Re-Initiation des Zellzyklus und die Stabilisierung des Clp1-Proteins lassen eine Funktion in diesem Rahmen vermuten. Auch die ausbleibende Proliferation in der Pflanze bei *clp1*-Deletionsstämmen lässt sich mit der fehlenden Wiederaufnahme des Zellzyklus erklären und zeigt eine mögliche Funktion von Clp1 am Zellzykluskontrollpunkt zum Zeitpunkt der Stabilisierung auf.

3.2.1 Das Mitose assoziierte ABBA Motiv hat Einfluss auf die Proteinabundanz von Clp1

Die Mutation des ABBA Motivs im Clp1-Protein führt zu einer Erhöhung des „*steady state levels*“ des Clp1-Proteins. Im untersuchten Clp1-Protein führen jedoch auch die Deletionen der Bereiche 1, 2 und 3 zu einer Erhöhung der Clp1 Menge in den Zellen (Abbildung 19). Das ABBA Motiv ist in Bereich 2 lokalisiert (Abbildung 16), was den Effekt auf das Clp1 Level erklären kann. Warum jedoch auch die Bereiche 1 und 3 einen Einfluss auf die Proteinmenge haben, kann nur vermutet werden. Ob die Deletionen die Proteinstruktur verändern und damit die Funktion des ABBA Motivs beeinflussen, sodass das Motiv z.B. für Protein/ Protein-Interaktionen nicht mehr zugänglich ist, oder ob die deletierten Bereiche zusätzliche Domänen enthalten, die für die Funktion des ABBA Motivs notwendig sind, muss weiter untersucht werden.

Weitere konservierte Domänen konnten bioinformatisch in Clp1 nicht identifiziert werden. Jedoch weisen viele Zellzyklusregulatoren eine ungeordnete Struktur auf und werden lediglich durch sogenannte SLiMs durchzogen, die kleine, kompakte, lineare Proteininteraktionsstellen enthalten. So sind auch die als SLiMs charakterisierten Motive ABBA, das D-Box („*Destruction*“) Motiv und das KEN-Box Degron häufig in räumlicher Nähe in Zellzyklusregulatoren nachweisbar (Di Fiore *et al.*, 2016; Lu *et al.*,

2014; Sewart und Hauf, 2017). Sowohl das D-Box Motiv als auch das KEN-Box Degron kontrollierten die Proteinstabilität durch APC/C-abhängig Polyubiquitinierung (Di Fiore *et al.*, 2015). Weitere Untersuchungen der Deletionsbereiche 1 und 3 auf ähnliche Domänen oder Motive mit vergleichbarer Funktion könnten zusätzliche wichtige Erkenntnisse über das Zusammenspiel des ABBA Motivs und der umliegenden Region im Clp1-Protein liefern.

Die Verbindung des ABBA Motivs zu zellzyklusabhängiger Proteindegradation lässt eine Hypothese zu, die sowohl das erhöhte Proteinlevel in den Deletions-Varianten bei vergleichbarem Translationslevel von *clp1* erklärt, wie auch die statistisch bestätigte unbeeinträchtigte Degradationsgeschwindigkeit nach Cycloheximidzugabe (2.2.1). Die Hypothese einer zellzyklusabhängigen Proteindegradation über das ABBA Motiv würde das erhöhte Proteinlevel der Deletions-Varianten in axenischer Kultur erklären (Abbildung 19). Das Signal zum Proteinabbau wäre in den Stämmen mit mutiertem ABBA Motiv sowie in den Stämmen mit deletierten Bereichen nicht mehr gegeben. Dagegen würde die zellzyklusabhängige Degradation im Wildtyp das Clp1-Protein zyklisch abbauen und damit zu einem deutlich geringeren Gesamtproteinlevel führen. Ein zusätzlicher, von ABBA unabhängiger Effekt auf die Proteinstabilität, welcher nicht an den Zellzyklus gekoppelt ist, könnte nach Cycloheximidzugabe die gleichbleibende Degradationsrate aller getesteten Clp1-Deletions-Varianten und des Wildtyps erklären (Abbildung 18). Die Cycloheximidzugabe stoppt die ribosomale Proteinbiosynthese und damit auch die Zellteilung, daher kann nach Zugabe des Translationshemmers nur noch die Zellzyklus- und ABBA-unabhängige Proteindegradation ermittelt werden, welche nicht durch die internen Deletionen oder die eingebrachte Mutation im ABBA Motiv von Clp1 beeinflusst wird.

Eine zellzyklusabhängige Degradation von Proteinen läuft sehr häufig über den APC/C, welcher als Ubiquitin Protein Ligase mitotische Abläufe durch koordinierten Proteinabbau von Securin, Cyclin und anderen Proteinen kontrolliert (Lu *et al.*, 2014). Eine Ubiquitinierung von Clp1 wäre in einem Westernblot mit einem Antikörper gegen Ubiquitin zu überprüfen. Das Clp1-Protein im Wildtyp müsste ubiquitiniert vorliegen, um für den zellzyklusabhängigen Abbau, vermittelt über das ABBA Motiv, markiert zu sein. In den Deletions-Varianten sollte kein ubiquitiniertes Clp1-Protein vorliegen, da das ABBA Motiv mutiert oder nicht mehr zugänglich, auf Grund der deletierten flankierenden Regionen, vorliegt und das Signal zur Ubiquitinierung über den APC/C fehlt.

Bereits gezeigt wurde ein stabilisierender Effekt auf das Clp1-Protein durch die Aktivierung der UPR und die damit verbundene Interaktion von Clp1 mit dem UPR Regulator Cib1 (Pinter *et al.*, 2019). Eine erhöhte ER-Stresstoleranz korreliert mit der Clp1-abhängigen Phosphorylierung von Cib1 und der erhöhten Proteinstabilität von Clp1 und Cib1. Die UPR ist ein entscheidender Faktor für die Virulenz von humanen und pflanzenpathogenen Pilzen (Cheon *et al.*, 2011; Heimel *et al.*, 2013; Jung *et al.*, 2018). Die UPR ist für die effiziente Sekretion hydrolytischer Enzyme wichtig und ermöglicht damit den Abbau von Polysacchariden aus Pflanzenzellwänden wie Cellulose, Hemicellulose oder Pektin (Benz *et al.*, 2014; Montenegro-Montero *et al.*, 2015; Pakula *et al.*, 2003; Saloheimo *et al.*, 2003). Die Interaktion des UPR-Regulators Cib1 mit dem Entwicklungsregulator Clp1 führt zur Akkumulation von Clp1 und löst eine Re-Initiierung von mitotischen Zellteilungen in der Pflanze aus (Heimel *et al.*, 2013). Cib1 und Clp1 sind in allen Stadien während der Pflanzeninfektion exprimiert. So könnten sie flexibel auf wechselnde Anforderungen an die Proteinsekretion, zum Beispiel bei der stadienspezifischen Expression von Effektoren, reagieren und die UPR-Genexpression in verschiedenen Phasen der biotrophen Entwicklung stabil halten (Pinter *et al.*, 2019).

3.2.2 Das ABBA Motiv ist notwendig für die Interaktion mit dem bE/bW Heterodimer und die Clp1-abhängige Repression.

Durch Mutation des ABBA Motivs oder Deletion der zentralen Bereiche in Clp1 kann nicht nur der in 3.2.1 beschriebene positive Effekt auf das Proteinlevel beobachtet werden. Durch Real-time Analysen (2.2.2) sind auch Effekte auf die transkriptionelle Regulation nachweisbar. Die beiden bE/bW-Clp1-abhängig regulierten Gene *rbf1* und *clp1* werden durch die Clp1-Varianten, die die ABBA-Mutation oder die verschiedenen Deletionen tragen, nicht mehr Clp1-abhängig reprimiert. Erklärt werden kann der Effekt durch die fehlende Bindung von Clp1 an den bE/bW Komplex. Mit Hilfe von Hefe-2-Hybrid Assays (2.2.5) und einer Co-IP in *U. maydis* (2.2.6) wurde die fehlende Interaktion von bW2 mit dem Clp1-Protein mit der ABBA Mutation bestätigt. Mittels quantitativer ChIP (2.2.3) konnte ebenfalls der Verlust der Clp1 Bindung an das Heterodimer in den untersuchten Promotorregionen von *rbf1* und *clp1* gezeigt werden. Damit hat das ABBA Motiv nachweislich nicht nur eine Funktion hinsichtlich der Proteinabundanz, sondern auch bei der Interaktion des Clp1-Proteins mit dem Komplexpartner bE/bW. Durch die gestörte Interaktion der Clp1-Deletions-Varianten

mit dem bE/bW Heterodimer ist kein regulatorischer Effekt durch Clp1 mehr nachweisbar.

3.2.3 Das ABBA Motiv ist essentiell für die Proliferation in der Pflanze nach Penetration

Durch Pflanzeninfektionen, den Test auf filamentöses Wachstum und mikroskopische Untersuchungen von infiziertem Blattmaterial konnte ein negativer Effekt auf die pathogene Entwicklung durch die eingebrachte Mutation im ABBA Motiv gezeigt werden. Die Mutation des ABBA Motivs im zentralen Bereich des Clp1-Proteins hatte keine Auswirkung auf das filamentöse Wachstum auf Aktivkohleplatten, jedoch starken Einfluss auf die Proliferation und Infektion der Pflanze (2.2.4). Da Clp1 während der saprophytischen Phase keine Funktion hat, ist ein Phänotyp der Sporidien nicht zu erwarten. Zu Beginn der pathogenen Entwicklung, nach Fusion zweier Sporidien, ist lediglich ein funktionsfähiges Heterodimer und die daraus resultierende *rbf1* Induktion notwendig um das filamentöse Wachstum zu bewirken und den zwingend erforderlichen G2-Zellzyklusarrest auszulösen.

Die ausbleibende pathogene Entwicklung und Virulenz aller untersuchten Clp1 Stämme mit internen Deletionen oder Mutation im ABBA Motiv sind vergleichbar mit dem Effekt einer kompletten *clp1* Deletion (Scherer *et al.*, 2006). Sowohl die Infektionsstudien wie auch die mikroskopischen Untersuchungen zeigen ähnliche Resultate. Alle getesteten Stämme sind noch in der Lage Appressorien zu bilden und die Pflanze zu penetrieren, können jedoch nicht weiter in der Pflanze proliferieren oder die für die Proliferation nötigen Schnallenzellstrukturen bilden. Durch Untersuchungen zur Zellkernverteilung in *clp1*-Deletionsstämmen konnte eine normale Zellkernwanderung bis in die Appressorienstruktur nachgewiesen werden, jedoch wurden keine Zellkerne in Hyphen, die die Pflanze bereits penetriert hatten, nachgewiesen (Faist, 2017). Damit lässt sich, in Übereinstimmung mit den Ergebnissen dieser Arbeit, die Funktion von Clp1 auf das Zeitfenster nach Appressorienbildung während der Pflanzenpenetration bis zur ersten Zellteilung in der Pflanze festlegen. Durch Mutation des ABBA Motivs und die gezeigten negativen Effekte auf die pathogene Entwicklung nach Appressorienbildung und Pflanzenpenetration ist ein Einfluss auf einen Zellzykluskontrollpunkt, der die Verteilung der Zellkerne in die dem Appressorium angrenzende Zelle in der Pflanze

reguliert, sehr wahrscheinlich. Das ABBA Motiv ist in der Literatur in Verbindung mit Proteinen beschrieben, die einen Einfluss auf Zellzykluskontrollpunkte haben wie das BubR1 Protein (Bestandteil des MCC Komplexes) in eukaryotischen Zellen. Mutationen in den beiden ABBA Motiven des BubR1 Proteins zeigen einen Verlust der MCC Bindung an APC/C, was eine für den Zellzyklus notwendige Arretierung während des „*Spindel Assembly Checkpoint*“ (SAC) im Metaphasen-Kontrollpunkt verhindert (Di Fiore *et al.*, 2016).

Für die Pflanzenpenetration und Proliferation in der Pflanze müssen Zellzykluskontrollpunkte während der Mitose, wie der G2/Mitose-, der Metaphasen-, oder der Mitose/G1-Kontrollpunkt, durchlaufen werden (Abbildung 37). Mikroskopische Untersuchungen (Faist, 2017) weisen darauf hin, dass der Eintritt in die Mitose und die Appressorienbildung, wie auch für das Reispathogen *Magnaporthe oryzae* beschrieben (Veneault-Fourrey *et al.*, 2006), zeitlich gekoppelt sind. Die Arretierung in der G2-Phase wird bei *U. maydis* bereits während der Appressorienbildung aufgehoben und die Mitose wird während der Penetration der Pflanzenzelle eingeleitet. Die offene Mitose bei *U. maydis* verursacht bereits in der Prophase der Mitose ein Abstreifen der Zellkernmembran. Bei der Infektion mit *clp1*-Deletionsstämmen ist die Membran der Kerne, indikativ für den Beginn der Mitose, permeabilisiert, was durch die zytoplasmatische Lokalisierung eines NLS:GFP Proteins nachgewiesen werden konnte (Faist, 2017). Offensichtlich kann in $\Delta clp1$ -Stämmen der erste G2/M-Kontrollpunkt zur Einleitung der Mitose Clp1 unabhängig überwunden werden und eine frühere Funktion von Clp1, noch vor der nachgewiesenen Stabilisierung zum Zeitpunkt der Appressorienbildung, ausgeschlossen werden.

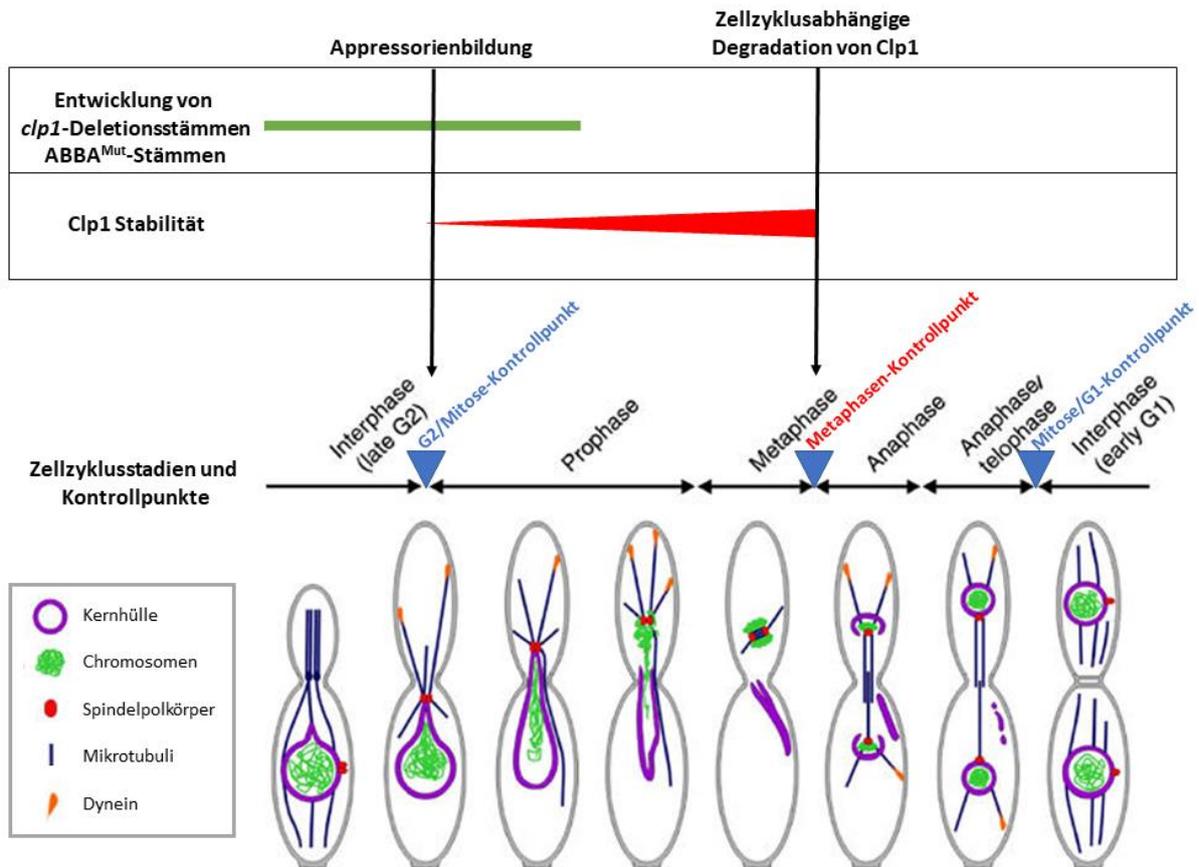


Abbildung 37: Modell der offenen Mitose in *U. maydis* mit Einordnung der Clp1 Funktion am Metaphasen-Kontrollpunkt. Gezeigt sind die einzelnen Stadien der Mitose. In der Interphase befindet sich der Kern noch in der Mutterzelle. Nach dem Passieren des G2/Mitose-Kontrollpunktes beginnt die Mitose mit der Prophase, in der der Kern in die Tochterzelle migriert. Die Kernhülle ist zu diesem Zeitpunkt bereits permeabel. Am Übergang der Prophase zur Metaphase kommt es zum vollständigen Abstreifen der Kernhülle und deren Verbleib in der Mutterzelle. In der Metaphase umgibt eine Spindel das Chromosom in der Tochterzelle. Nachdem der Metaphase-Kontrollpunkt passiert ist, verlängert sich die Spindel in der Anaphase und zieht die Chromosomen zurück in die Mutterzelle, während die Kernhülle aufgebaut wird. Die alte Hülle wird wiederverwendet und ist in der Telophase wieder vollständig intakt. Anschließend entsteht das Septum zwischen Mutter- und Tochterzelle. (Modifiziert nach (Straube *et al.*, 2005)) Zusätzlich eingezeichnet sind die drei Mitose Kontrollpunkte G2/Mitose, Metaphase und Mitose/G1. Der G2/M-Kontrollpunkt findet gleichzeitig mit der Clp1 Stabilisierung statt während der Apressorienbildung und kann daher auch in *c/p1*-Deletionsstämmen und in den in dieser Arbeit erstellten *ABBA^{Mut}*-Stämmen überwunden werden. Der genaue Mitosestopp in *c/p1*-Deletionsstämmen und *ABBA^{Mut}*-Stämmen ist nicht bekannt. Durch die in der Literatur übermittelte Funktion des ABBA Motivs, welche die zellzyklusabhängige Proteindegradation beeinflusst, vermittelt über den APC/C, wird eine Proteindegradation zum Zeitpunkt des Metaphasen-Kontrollpunktes vermutet.

Beim späteren Metaphasen-Kontrollpunkt wird die Aktivität des APC/C^{Cdc20} Komplexes durch Bindung des MCC Komplexes inhibiert (siehe Abbildung 39). Dabei wird das APC/C aktivierende Cdc20 (Homolog zu Spl1 in *S. pombe*) Protein über die in BubR1 (Homolog zu Mad3 in *S. pombe*; Bestandteil des MCC Komplexes) liegenden ABBA Motive erkannt und damit die Aktivierung des APC/C Komplexes durch Bindung des Cdc20 Substrats verhindert (siehe Abbildung 38). Das Homolog zu Mad3 *UMAG_11215* (34% Übereinstimmung) wurde in *U. maydis* bislang noch nicht

charakterisiert. Eine Deletion des Gens *UMAG_11215* oder eine temperatursensitive Mutante, die zum Zeitpunkt der Appressorienbildung inaktiviert werden kann, könnte genauere Erkenntnisse liefern, ob das Clp1-Protein möglicherweise eine Alternative im MCC Komplex zum Mad3 Homolog in *U. maydis* darstellt oder aber auch zusätzlich zu *UMAG_11215* MCC Komplexe bildet. Clp1 könnte durch die Bildung des hemmenden MCC Komplexes, zusätzlich zum MCC Komplex gebildet durch *UMAG_11215*, die Zeit verlängern bis der SAC erreicht und der Metaphasenkontrollpunkt überschritten wird, um die Mitose zu vollenden und die homologen Chromosomen auf die Mutter- und Tochterzelle zu verteilen. Ein Einfluss auf den Mitoseablauf in Sporidien scheint das Clp1-Protein nicht zu haben, da *clp1*-Deletionsstämme keine Probleme mit Zellteilungen in axenischer Kultur aufweisen. Eventuell muss der Zellzyklus für die Zellteilung von der Appressorienstruktur in die Hyphe innerhalb der Pflanze und auch weiterhin in der Pflanze während der Zellkernverteilung über die Schnallenzellbildung langsamer ablaufen als in Sporidien in axenischer Kultur und hierfür ist das stabilisierte Clp1-Protein notwendig.

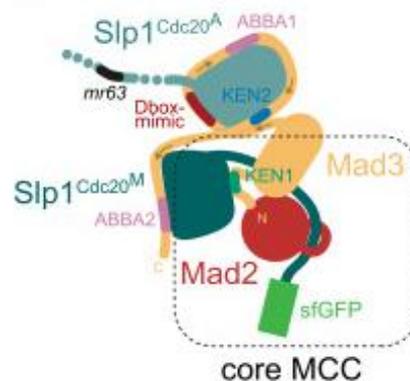


Abbildung 38: Clp1 könnte das Mad3 Homolog *UMAG_11215* im MCC Komplex als alternativer Komplexpartner unterstützen. Schematisch dargestellt sind die Kernkomponenten des MCC (Mad3, Mad2 und Spl1) in *S. pombe*. Das Mad3 (homolog zu BubR1) Homolog in *U. maydis* ist noch nicht beschrieben in der Literatur. Mad3 und Mad2 binden über D-Box, KEN-Box und ABBA Motive zwei Spl1 (homolog zu Cdc20) Proteine und inaktivieren durch Bindung im APC/C die Funktion des Komplexes (Sewart und Hauf, 2017). Clp1 könnte zum Zeitpunkt der Mitose auf der Pflanze eine alternative Funktion im MCC Komplex einnehmen und eventuell eine vermehrte Bildung des MCC Komplexes bewirken und damit eine verlängerte Phase für die Ausrichtung der homologen Chromosomen bewirken, bevor durch den erreichten SAC der Metaphasen-Kontrollpunkt überwunden wird und die Chromosomen auf die Mutter- und Tochterzelle verteilt werden.

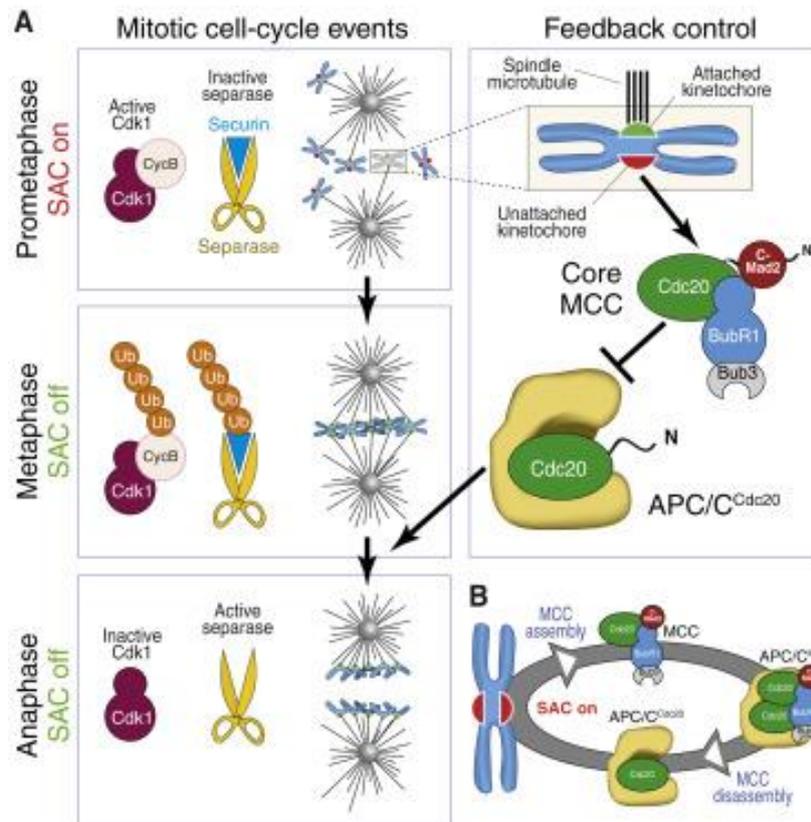


Abbildung 39: Der SAC Mechanismus in eukaryotischen Zellen. (A) Die Mitose wird durch Aktivierung des Cdk1-Cyclin B-Komplexes initiiert. Der SAC ist während der Prometaphase aktiv, wenn sich Chromosomen an der mitotischen Spindel anlagern. Die Befestigung erfolgt über die Kinetochoren an den Chromosomen. Richtig angebrachte Kinetochoren (grün) "erfüllen" den SAC und stoppen die Signalisierung. Ungebundene oder unsachgemäß angebrachte Kinetochoren (rot) geben das SAC-Signal weiter ab. Wie dargestellt wird der MCC, der SAC-Effektor, durch Signale von ungebundenen Kinetochoren aktiviert. Er bindet und hemmt APC/C^{Cdc20}, das für den Metaphasen-Kontrollpunkt benötigt wird, und verhindert so den Eintritt in die Anaphase. Wenn der SAC auf allen Kinetochoren (in der Metaphase) inaktiviert ist, fördert die Aktivierung von APC/C^{Cdc20} die Ubiquitinierung und Proteolyse von Cyclin B und Securin. Ihr Abbau leitet den mitotischen Exit mit der Trennung von Schwesterchromatiden ein, letzteres durch Aktivierung der Kohesin-Protease-Trennung. (B) Auch während der SAC aktiv ist, existiert in der Zelle der Kreislauf für die MCC-Produktion und die MCC-Inaktivierung. Dies ermöglicht eine reaktionsschnelle SAC-Antwort: Das Vorhandensein von "roten" Kinetochoren ist erforderlich, um jederzeit eine ausreichend hohe Rate der MCC-Produktion zu unterstützen, um der MCC-Demontage entgegenzuwirken. (Zusammengefasst in Musaccio, 2015)

Verstärkt wird die Hypothese einer Zellzyklus Kontrollfunktion von Clp1 durch die Interaktion mit weiteren Proteinen mit einer Funktion im Zellzyklus oder bei der Zellteilung (Heimel *et al.*, 2010b). In einem Hefe-2-Hybrid Screen wurde *UMAG_00493*, das Ortholog von Mob1, als potentieller Interaktor für Clp1 gefunden. Mob1 ist in *S. cerevisiae* neben dem mitotischen Exit auch für Zytokinese und Zelltrennung notwendig (Luca *et al.*, 2001). Als Protein des „mitotic exit network“ (MEN) hat Mob1 eine bedeutende Funktion im Übergang von Mitose zu G1 (M/G1 Kontrollpunkt), ebenfalls vermittelt über APC/C-abhängige Zyklindegradation. Eine genauere Funktion von Clp1 gemeinsam mit den hier beschriebenen

Interaktionspartnern an Zellzyklus Kontrollpunkten oder der Zelltrennung muss in weiteren Experimenten untersucht werden. So müsste die Interaktion, die durch Mutation im ABBA Motiv zum Komplexpartner bE/bW zerstört wird, auch für die weiteren Interaktionspartner wie Cib1, Cdc15 oder Mob1 verifiziert werden. Möglicherweise hat das Clp1-Protein nach Stabilisierung zum Zeitpunkt der Appressorienbildung und Mitose mehrere Funktionen in unterschiedlichen Zellzyklusregulationskomplexen.

Zusätzlich zu der hypothetischen Funktion von Clp1 als Protein eines Zellzykluskontrollpunktes ist auch hier der fehlende regulatorische Effekt im Proteinkomplex bE/bW-Clp1 eine mögliche Erklärung für die fehlende Proliferation in der Pflanze. Dringend erforderlich für die Re-Initiation des Zellzyklus ist die Repression des Masterregulators Rbf1 und die ausbleibende Induktion einer Vielzahl von *rbf1*-abhängigen Genen. Aufgrund der fehlenden Interaktion der Proteine bE/bW und Clp1 kann der erforderliche reprimierende Effekt des Proteinkomplexes nicht mehr ausgeführt werden. Somit würde der Masterregulator Rbf1 weiterhin auch nach Pflanzenpenetration aktiv bleiben und damit immer weiter den Zellzyklusarrest aufrechterhalten. Ein vergleichbares Experiment, in dem Rbf1 auch nach der Penetration induziert wurde, zeigt einen sehr ähnlichen Phänotyp der Hyphen in der Pflanze (Heimel *et al.*, 2010b). Genau wie bei der mikroskopischen Auswertung des ABBA^{Mut}-Stammes ist auch bei der dauerhaften Expression von Rbf1 eine normale Appressorienbildung und Pflanzenpenetration zu beobachten. Danach kommt das Wachstum jedoch sehr schnell zum Erliegen und die Hyphen bleiben in der ersten epidermalen Zellschicht der Pflanze stecken (Abbildung 26). Daher lässt sich vermuten, dass der fehlende repressorische Effekt von Clp1 auf *rbf1* auch eine mögliche oder zusätzliche Erklärung für die veränderte Morphologie der Hyphen und die fehlende Virulenz von *U. maydis* ist.

3.3 Die C-terminalen Enden der b-Proteine bE und bW im Heterodimer zeigen eine redundante Funktion für die Interaktion mit Clp1.

Die Interaktion des bE/bW-Komplexes mit Clp1 zum Zeitpunkt der Pflanzenpenetration ist zwingend notwendig, um die weitere Proliferation in der Pflanze zu ermöglichen. Bereits bekannt war die Interaktion einer C-terminalen Domäne von bW mit Clp1. In dieser Arbeit wurde das 7 AS lange ABBA Motiv im zentralen Bereich des

Clp1-Proteins als notwendig für die Interaktion mit bE/bW und damit für die Bildung des Proteinkomplexes aus bE/bW und Clp1, für eine repressorische Genregulation, bestätigt. In weiteren Experimenten wurde die Interaktion von Clp1 mit dem bE/bW Komplex weiter analysiert.

Das bE/bW-Fusionskonstrukt Kon8 (Grandel *et al.*, 2000) umfasst nur 407 der insgesamt 997 AS einer Vollängen-bE-bW-Fusion, trotzdem ist die Funktion des nativen bE/bW Heterodimers erhalten. Kon8 enthält unter anderem auch die vollständige Sequenz von bW, die für die Interaktion mit Clp1 ausreichend ist (Heimel, 2010). Der gleiche Bereich wurde im Hefe-2-Hybrid System als eine potentielle Aktivierungsdomäne identifiziert. Das Vollängen-bW-Protein zeigt in Hefe eine selbstaktivierende Funktion, die Deletion des C-terminalen Bereiches dagegen hebt die Selbstaktivierung auf. Interessanterweise zeigt die C-terminale Deletion von bW in *U. maydis* keinen Effekt (Kämper *et al.*, 1995). Eine entsprechende Deletion in Kon8 führt hingegen zu einem kompletten Funktionsverlust (Grandel *et al.*, 2000).

Die Deletion der C-terminalen Domäne im nativen bW-Protein könnte über das native Vollängen-bE-Protein im Heterodimer funktionell ausgeglichen werden. In Kon8 hingegen fehlt der C-terminale Bereich von bE, der für die Kompensation der bW-Deletion notwendig sein könnte, weshalb die Deletion des bW C-Terminus zum Funktionsverlust führt. Interessanterweise kann auch der C-Terminus von bE in Kombination mit einem Vollängen-bW-Protein als Interaktionspartner ohne Funktionsverlust in *U. maydis* deletiert werden (Schulz *et al.*, 1990), was letztlich auf eine redundante Funktion der beiden C-Termini hinweisen könnte.

3.3.1 Die C-terminalen Bereiche von bE und bW im Heterodimer zeigen eine funktionelle Redundanz für die Bildung des Proteinkomplexes mit Clp1.

Die in dieser Arbeit durchgeführten Co-IPs liefern genauere Erkenntnisse über den Aufbau und die Funktionsweise des bE/bW-Clp1-Proteinkomplexes. Der C-terminale Bereich des bW-Proteins ist ausreichend für eine Interaktion mit Clp1, deletiert man das C-terminale Ende, ist keine Interaktion im Hefe-2-Hybrid System (2.2.5) mehr nachweisbar. Trotzdem führt die C-terminale Verkürzung des bW2-Proteins zwar zu einer deutlichen Reduktion, aber nicht zum Verlust der Interaktion von Clp1 mit dem bE/bW Heterodimer in *U. maydis* (2.3.1). Mögliche Erklärungen wären eine im Hefe-2-Hybrid System nicht nachweisbare weitere Interaktionsstelle mit Clp1 innerhalb des

bW-Proteins oder aber eine weitere Interaktion mit dem bE-Protein im Heterodimer. Auch wenn eine Interaktion von Clp1 mit dem bE-Protein im Hefe-2-Hybrid System bislang nicht nachgewiesen werden konnte, konnte mit einer Co-IP mit HA-markierten nicht kompatiblen b-Proteinen eine Interaktion von Clp1 sowohl mit bW als auch mit bE bestätigt werden (2.3.2).

Mit den durchgeführten Experimenten konnte die Hypothese bestätigt werden, dass eine C-terminale Verkürzung des Interaktionsbereiches im bW2-Protein für die Komplexbildung mit Clp1 durch ein natives Volllängen-bE1-Protein ausgeglichen werden kann. Die C-terminalen Enden von bE und bW zeigen damit eine redundante Funktion in Bezug auf die Proteinkomplexbildung mit Clp1.

3.3.2 Die C-terminalen Bereiche von bE und bW im Heterodimer zeigen eine funktionelle Redundanz für die weitere pathogene Entwicklung in der Pflanze.

Um die redundante Funktion der C-terminalen Bereiche der b-Proteine im Heterodimer während der pathogenen Entwicklung zu überprüfen, wurden kompatible Stämme mit jeweils einem verkürzten b-Protein erstellt. Sowohl der Test auf filamentöses Wachstum als auch die Pflanzeninfektion verifizieren die redundante Funktion der C-Termini. Die bE Verkürzung wird durch ein Volllängen-bW-Protein kompensiert, die bW Verkürzung durch ein Volllängen-bE-Protein (2.3.3). Ausschließlich die Kreuzung von Stämmen, die beide ein verkürztes b-Protein tragen, zeigt kein filamentöses Wachstum und keine pathogene Entwicklung in der Pflanze.

Das ausbleibende filamentöse Wachstum auf Aktivkohle deutet darauf hin, dass das bE/bW-Heterodimer die in der Regulationskaskade nachgeschalteten Gene nicht mehr ausreichend induzieren kann. Der direkt *b*-abhängig induzierte Masterregulator Rbf1 ist ausreichend, um filamentöses Wachstum zu induzieren (Heimel, 2010). Diese Induktion scheint durch die C-terminale Verkürzung beider b-Proteine zumindest deutlich reduziert zu sein. Weiterführende Analysen sind notwendig, um den Einfluss der Verkürzungen auf die bE/bW vermittelte Genexpression zu quantifizieren.

Die mikroskopische Auswertung des Blattmaterials zeigt, dass die Kreuzung der Stämme, die sowohl die bE- als auch die bW- Verkürzung tragen, noch immer in der Lage sind, Appressorien zu bilden und die Pflanze zu penetrieren; die Hyphen zeigen

jedoch ein abnormales Wachstum in der Pflanze; das Hyphenwachstum endet kurz nach der Penetration. Der Phänotyp der Hyphe des ABBA^{Mut}- (Abbildung 26) und des Stammes mit C-terminalen bE- und bW-Verkürzungen (Abbildung 33) ähnelt sehr stark dem eines *b*-Deletionsstammes, in dem *rbf1* auf und in der Pflanze induziert wird bzw. *rbf1* und *clp1* gleichzeitig auch in der Pflanze weiter induziert werden (Heimel *et al.*, 2010b). Im ABBA^{Mut}-Stamm ist durch die Mutation keine Interaktion von bE/bW und Clp1 möglich und der reprimierende Effekt auf die Genregulation von *rbf1* ist nicht gegeben. Dies ist vergleichbar mit dem fehlenden bE/bW Heterodimer und Clp1 im *b*-Deletionsstamm, der jedoch eine dauerhafte *rbf1* Induktion aufweist. Auch die Hyphenstruktur bei C-terminaler Verkürzung beider b-Proteine im Heterodimer in der Pflanze (2.3.3) zeigt Ähnlichkeit zu dem *b*-Deletionsstamm mit Überexpression von *rbf1* und *clp1* in der Pflanze (Heimel *et al.*, 2010b). Erneut ist eine normale Appressorienbildung und Pflanzenpenetration nachweisbar, das weitere Wachstum der Hyphe in der Pflanze ist ebenfalls abnormal und zeigt knöllchenartige Verdickungen, teilweise erfolgt jedoch trotz dieser „Wucherungen“ ein weiteres filamentöses Wachstum in der Pflanze (Abbildung 33). Die für eine normale Proliferation notwendigen Schnallenzellen sind nicht nachweisbar. Auf Grund der C-terminalen Verkürzung scheint die Interaktion und Komplexbildung mit dem Clp1-Protein verloren zu gehen, wodurch der regulatorische Effekt auf *rbf1* und *clp1* nicht mehr ausgeführt werden kann. Damit wäre der gezeigte morphologische Effekt ebenfalls auf die fehlende bE/bW-Clp1-abhängige Genrepression zurück zu führen.

Wie die Kreuzung der beiden C-terminal verkürzten b-Stämme, trotz negativem Test auf filamentöses Wachstum, auf Aktivkohleplatten auf der Pflanze jedoch filamentös wachsen können, einen G2 Zellzyklusarrest auslösen, Appressorien bilden und die Pflanze penetrieren können, ist noch unklar. Hierfür ist die Expression von Rbf1 zwingend erforderlich. Eine mögliche minimale *b*-abhängige Expression von *rbf1* könnte nicht ausreichen um filamentöses Wachstum auf Aktivkohleplatten zu induzieren. Jedoch könnten zusätzliche pflanzliche Signale das *rbf1*-Level erhöhen und damit ein filamentöses Wachstum und Appressorienbildung auf der Pflanze ermöglichen. Ein ähnlicher Effekt müsste auch für die Expression von *clp1* nachweisbar sein, da vereinzelt Hyphen mit zwar abnormaler, aber erweiterter Proliferation nachweisbar sind, die dem *b*-Deletionsstamm mit induziertem *clp1* und *rbf1* in der Pflanze entsprechen.

3.4 Modell zum Aufbau und Mechanismus des bE/bW-Clp1-Proteinkomplexes

Das Wissen über den Aufbau eines Proteinkomplexes kann beim Verständnis des Funktionsmechanismus sehr hilfreich sein. Der in dieser Arbeit genauer untersuchte Proteinkomplex aus dem bE/bW-Heterodimer und dem Clp1-Protein ist in Abbildung 40 dargestellt. Der hypothetische Komplexaufbau zeigt das Heterodimer aus bE und bW, welche über den N-terminalen variablen Bereich interagieren und über die Homeodomänen beider Proteine an die DNA binden. Die C-terminalen Enden der beiden Proteine zeigen potentiell aktivierende Domänen, die eine redundante Funktion für die Interaktion mit Clp1 aufweisen. Das im Clp1 Protein befindliche ABBA Motiv ist notwendig für die Interaktion von Clp1 mit dem bE- sowie dem bW-Protein.

Durch Co-IP Experimente konnte die fehlende Bindung der Clp1_ABBA^{Mut}-Variante an das bE/bW-Heterodimer bestätigt werden und damit auch in quantitativen ChIP Experimenten die fehlende Bindung an die Promotorbereiche von *clp1* und *rbf1* festgestellt werden (Abbildung 22 und Abbildung 23). Wird jedoch zusätzlich eine native Clp1-Variante exprimiert, kann eine Anreicherung von Clp1_ABBA^{Mut} an den Promotorregionen von *rbf1* und *clp1* nachgewiesen werden (Anhang Abbildung 42). Zu erklären ist dies durch eine Dimer-Bildung von Clp1; das Dimer aus Clp1_ABBA^{Mut} und Clp1 ist, im Gegensatz zum Clp1_ABBA^{Mut} Protein, in der Lage, an bE/bW zu binden und die Bindung des Komplexes kann durch das mit GFP versehene Clp1_ABBA^{Mut} Protein in der quantitativen ChIP nachgewiesen werden. Die komplett fehlende Anreicherung im *clp1*-Deletionsstamm weist darauf hin, dass das ABBA Motiv für die Bindung von Clp1 sowohl zu bE als auch zu bW notwendig ist. Über welche Domänen die Interaktion zwischen den beiden Clp1-Proteinen abläuft ist noch unbekannt.

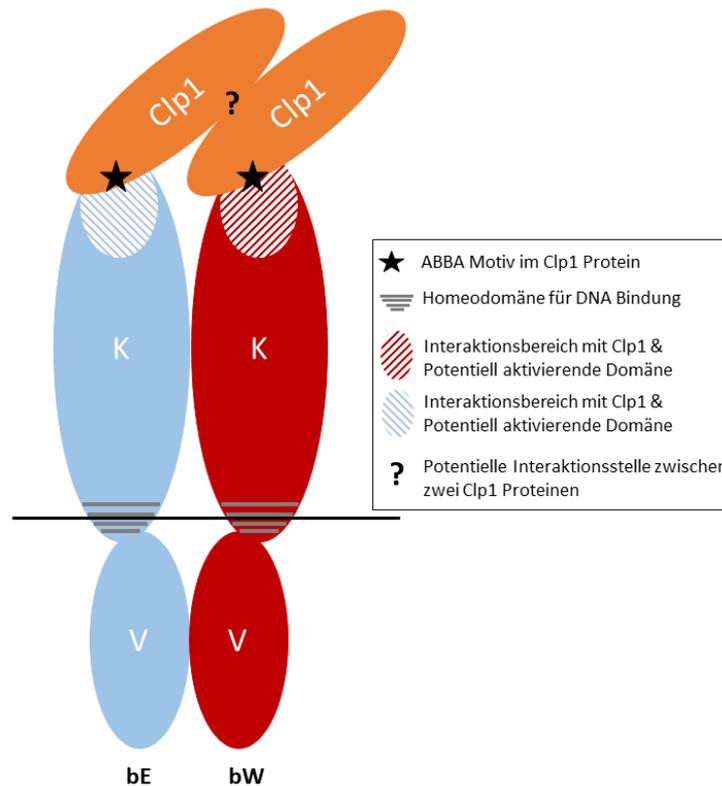


Abbildung 40: Schematische Darstellung des hypothetischen Proteinkomplexes aus dem bE/bW Heterodimer mit dem Clp1 Dimer. Das Heterodimer aus bE/bW interagiert durch die variablen N-terminalen Bereiche (V). Die Homeodomänen der beiden Proteine interagieren mit der DNA und ermöglichen dem Proteinkomplex aus bE/bW und Clp1 die Bindung an der DNA in regulierten Promotorbereichen. Der konstante C-terminale Bereich (K) der bE- und bW-Proteine trägt potentiell aktivierende Domänen. Im selben Bereich findet die Interaktion mit dem Clp1-Protein statt. Das ABBA Motiv im Clp1-Protein ist notwendig für die Bindung sowohl an das bE als auch an das bW-Protein im Heterodimer. Eine Bindung zwischen den Clp1-Proteinen und eine Homodimerbildung der beiden Clp1-Proteine ist sehr wahrscheinlich.

Der Proteinkomplex aus dem bE/bW Heterodimer und Clp1 führt zu einem reprimierenden transkriptionellen Effekt nach Stabilisierung des Clp1-Proteins während der Appressorienbildung. Aufgrund der in Abbildung 40 dargestellten Komplexstruktur wäre eine Maskierung der mutmaßlichen Aktivierungsdomänen, im Bereich der Interaktion der beiden Proteine, als Repressionsmechanismus von Clp1 auf das bE/bW Heterodimer möglich. Eine ähnliche Komplexstruktur und ein vergleichbarer regulatorischer Effekt ist für den Komplex der Proteine Gal80 und Gal4 in *S. cerevisiae* beschrieben und der Repressionsmechanismus durch die Maskierung der Transaktivierungsdomäne bereits bestätigt (Melcher und Xu, 2001; Pilauri *et al.*, 2005). Auch im Fall der Clp1 Interaktion mit Cib1, welche ebenfalls einen vergleichbaren regulatorischen Effekt auf die Aktivität von Cib1 aufweist, ist die Maskierung der Transaktivierungsdomäne ein diskutierter Repressionsmechanismus (Pinter *et al.*, 2019).

Vorläufige Untersuchungen, die Maskierung einer potentiellen Aktivierungsdomäne in *S. cerevisiae* zu demonstrieren, waren bislang erfolglos (Brenner, 2019). Eine mögliche Alternative wäre die Integration der Gal UAS („*upstream activation sequence*“), welche die notwendigen GAL4 Bindestellen aufweisen, in *U. maydis*. Eine Kombination aus einer Gal UAS, einem in *U. maydis* funktionsfähigen Minimalpromotor und einem Reporter gen wie *gfp*, könnte eine quantitative Aussage über den repressorischen Effekt von Clp1 auf die Selbstaktivierung von bW2 möglich machen.

In der vorliegenden Studie konnte der Aufbau des Repressorkomplexes bE/bW und Clp1 genauer beschrieben werden und der reprimierende Effekt von Clp1 auf ein klar begrenztes Feld aus pathogenitätsrelevanten Faktoren minimiert werden. Der Repressionsmechanismus kann aufgrund der Komplexstruktur, sowohl was den Komplexaufbau als auch die Funktion betrifft, hypothetisch auf eine Maskierung der im Heterodimer vorkommenden potentiellen Aktivierungsdomänen durch Clp1 festgelegt werden. Ein weiterer sehr interessanter Aspekt ist die Fragestellung, ob der gezeigte Phänotyp und negative Effekt auf die Pflanzeninfektion sowohl durch Deletion der C-terminalen Bereiche des Heterodimers als auch durch die Mutation im ABBA Motiv von Clp1, alleine durch die fehlende Interaktion der Proteine und den damit fehlenden reprimierenden Effekt erklärt werden kann. Eine weitere Möglichkeit wäre, dass das Clp1-Protein, vermittelt durch das ABBA Motiv, eine zusätzliche wichtige Funktion in einem Zellzykluskontrollpunkt am Ende der Mitose hat und damit das Ende der Mitose und Einwandern der Zellkerne mit steuert. Eine der bedeutendsten Funktionen des bE/bW-Clp1 Komplexes während der pathogenen Entwicklung ist zweifelsfrei die Repression von *rbf1* und *clp1*. Für eine weitere Proliferation in der Pflanze darf das *rbf1* Gen nach Pflanzenpenetration nicht weiter aktiv sein, um aus dem G2-Zellzyklusarrest heraus zu kommen. Weiteren Klärungsbedarf gibt es, um den Unterschied zwischen den Repressionen von *clp1* und *rbf1* zu verstehen. Da *clp1*, im Gegensatz zu *rbf1*, in der Pflanze wieder induziert wird, muss die Clp1-abhängigen Repression am *clp1* Promotor aufgehoben werden, am *rbf1* Promotor dagegen weiter bestehen bleiben.

Die Ergebnisse dieser Arbeit liefern neue Erkenntnisse über die Funktion und Relevanz des zentralen Entwicklungsregulators Clp1 in Kombination mit dem bE/bW-Heterodimer, zeigen jedoch auch weitere Funktionsfelder und Regulationen zu späteren Entwicklungszeitpunkten auf, die weiterhin von großem Interesse sein werden.

4 Material und Methoden

Alle Protokolle und angewandte Methoden basieren auf der allgemeinen Methodensammlung der AG Kämper und sind teilweise wörtlich übernommen. Lediglich Abweichungen zu standardmäßigen Verfahren wurden extra erwähnt.

4.1 Material und Bezugsquellen

4.1.1 Chemikalien

Alle in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien waren p.a. Qualität und wurden von den Firmen Ambion, Amersham, BioRad, Carl-Roth, Difco, Du Pont, Fluka, Invitrogen, Jena Bioscience, Merck, New England Biolabs Riedel-de-Haen, Roche, Serva und Sigma-Aldrich bezogen. Für weitere Anmerkungen siehe (Brachmann *et al.*, 2001).

4.1.2 Enzyme, Proteine und Antikörper

Tabelle 3: In dieser Arbeit verwendete Antikörper, Enzyme, Proteine und Substrate.

Name	Hersteller
Aktin-Antikörper	Cell Signaling Tecnology
Albumin (aus Rinderserum)	Sigma
Antarktische Phosphatase	New England Biolabs
Anti-Digoxigenin-AP Fab fragments	Roche
BSA (Rinder Serum Albumin) Lösung	New England Biolabs
CDP-Star	Roche
E.coli DNA-Polymerase I (Klenow-Fragment)	New England Biolabs
GFP-Antikörper	Sigma
HA-Antikörper	Cell Signaling Tecnology
Lysing Enzyme	Sigma
Lysozym (aus Hühnerei)	Merck
Novozym 234	Novo Nordisc
Phusion DNA-Polymerase	New England Biolabs
Q5 Polymerase	New England Biolabs
Restriktionsenzyme	New England Biolabs
Ribonuklease A (aus Rinderpankreas)	Boehringer
Sekundärer Antikörper Rabbit	Promega
T4-DNA Ligase	New England Biolabs

T4 DNA-Polymerase	New England Biolabs
Taq-Polymerase	Eigene Herstellung

4.1.3 Eingesetzte Kits

Tabelle 4: In dieser Arbeit eingesetzte Kits.

Verwendungszweck	Produkt (Firma)
Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	Kit JETSORB (Genomed)
Aufreinigung von PCR Produkten	QiaQuick PCR Purification Kit (Qiagen)
Aufreinigung von Plasmiden	Rotiprep Plasmid Mini (Carl Roth)
Klonierung von DNA-Fragmenten	TOPO TA Cloning Kit Dual Promotor (Invitrogen)
Herstellung DIG-markierter Sonden für Southern Blots	DIG High-Prime Kit (Roche)
Aufreinigung und Präparation hochreiner Gesamt-RNA	RNeasy Kit (Qiagen) Turbo DNA-free Kit (Ambion)
cDNA Synthese	RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Fischer)
Durchführung von qRT-PCR Analyse	MesaGreen qPCR MasterMix für SYBR Assay Kit (Eurogentech)

4.1.4 Puffer und Lösungen

Alle Standard-Puffer und Lösungen wurden nach Vorgaben von (Ausubel *et al.*, 1987) und (Sambrook und Russell, 2001) hergestellt. Alle Abweichungen sind bei den jeweiligen Methoden direkt vermerkt.

4.1.5 Medien

Medien und Lösungen für die Kultivierung von *E.coli*

Nach dem Autoklavieren wurden den Medien falls notwendig 100 µg/mL Ampicillin zur Selektion zugegeben. Zur optischen Selektion bei Klonierungen mit dem TOPO-TA Cloning Kit Dual Promotor (Invitrogen), wurden die Platten mit 40 µl X-Gal Lösung (40 mg/ml) beschichtet.

Tabelle 5: Verwendete Medien und Lösungen zur Anzucht von *E.coli*.

Name	Inhaltsstoffe
YT- Festmedium (Sambrook et al., 1989)	10 g Trypton 5 g Hefeextrakt 10 g NaCl 15 g Bacton Agar mit H ₂ O _{bid.} auf 1 L auffüllen und autoklavieren.
dYT- Flüssigmedium (Sambrook et al., 1989)	6 g Trypton 10 g Hefeextrakt 5 g NaCl mit H ₂ O _{bid.} auf 1 L auffüllen und autoklavieren.

Medien für die Kultivierung von *S. cerevisiae*

Tabelle 6: Verwendete Medien und Lösungen zur Anzucht von *S. cerevisiae*.

Name	Inhaltsstoffe
YEPD/A	10 g Hefeextrakt 20 g Bacto Pepton 0,003% (w/v) Adeninhemisulfat für Festmedium 15 g Bacto Agar zufügen, mit H ₂ O _{bid.} auf 980 ml auffüllen und autoklavieren. Nach dem Autoklavieren 2% (v/v) 50% Glukose (1% f.c.) zufügen.
Standard Minimal Medium (SD) (5x)	33,5 g Hefe Stickstoff Basismedium 7,26 g Drop-Out Mix 10% (100g) Glucose pH 5,8 einstellen, mit H ₂ O _{bid.} auf 1 l auffüllen und sterilfiltrieren.
H ₂ O-Agar	16 g Bacto Agar auf 800 ml mit H ₂ O _{bid.} auffüllen.
Aminosäure-Stocklösungen	L-Histidin HCL Monohydrat 1 g / 100 ml L-Uracil 0,2 mg / 100 ml L-Leucin 1 g / 100 ml L-Tryptophan 1 g / 100 ml
Selektionsplatten	400 ml H ₂ O-Agar 100 ml 5x SD + Aminosäure Für 1l Medium: L-Histidin HCL Monohydrate 2 ml L-Uracil 10 ml

	L-Leucin	2 ml
	L-Tryptophan	2 ml

Medien für die Kultivierung von *Ustilago maydis*

Nach dem Autoklavieren wurden den Medien falls notwendig clonNat (Nourseothricin), Cbx (Carboxin), Hyg (Hygromycin), Ka (Kanamycin) oder Gen (Geneticin) zur Selektion zugegeben. Für Festmedien wurde vor dem Autoklavieren 2% (w/v) Agar bzw. für Wachstumstest 2% (w/v) Noble Agar (Affymetrix) zugegeben.

Tabelle 7: Verwendete Medien und Lösungen zur Anzucht von *U. maydis*.

Name	Inhaltsstoffe
CM-Komplexmedium (Banuett und Herskowitz, 1989; Holliday, 1974)	1,5 g NH ₄ NO ₃ 2,5 g Caseinhydrolysat 0,5 g DNA 1 g Hefeextrakt 10 mL Vitamin-Lösung (s.u.) 62,5 mL Salz- Lösung (s.u.) mit H ₂ O _{bid.} auf 980 mL auffüllen und mit NaOH auf pH 7,0 einstellen; nach dem Autoklavieren 20 mL 50% (w/v) Glukose zugeben (f. c. 1%).
CM-Aktivkohle	6 g NH ₄ NO ₃ 10 g Caseinhydrolysat 1 g DNA 2 g Hefeextrakt 20 mL Vitamin-Lösung (s.u.) 250 mL Salz- Lösung (s.u.) 10 g Aktivkohle mit H ₂ O _{bid.} auf 980 mL auffüllen und mit NaOH auf pH 7,0 einstellen; nach dem Autoklavieren 20 mL 50% (w/v) Glukose zugeben (f. c. 1%).
YEPS Vollmedium (Tsukuda et al., 1988)	10 g Hefeextrakt 4 g Pepton 4 g Saccharose mit H ₂ O _{bid.} auf 1 L auffüllen und autoklavieren
YEPS _{light} -Flüssigmedium (Tsukuda et al., 1988)	10 g Hefeextrakt 4 g Pepton 4 g Saccharose Mit H ₂ O _{bid.} auf 1 L auffüllen und autoklavieren.

<p>Minimalmedium (Holliday, 1974)</p>	<p>Nitrat-Minimalmedium: 3 g KNO₃ 62,5 ml Salz-Lösung (s.u.) mit H₂O auf 980 ml auffüllen und mit NaOH auf pH 7,0 einstellen; nach dem Autoklavieren 20 ml 50% (w/v) Glucose-Lösung zugeben (f. c. 1%).</p> <p>Ammonium-Minimalmedium: 3 g (NH₄)₂SO₄ 62,5 ml Salz-Lösung (s.u.) mit H₂O auf 980 ml auffüllen und mit NaOH auf pH 7,0 einstellen; nach dem Autoklavieren 20 ml 50% (w/v) Glucose-Lösung zugesetzt (f. c. 1%).</p>
<p>NSY-Glyzerin (Einfriermedium)</p>	<p>8 g Nährbouillon 1 g Hefeextrakt 5 g Saccharose 800 ml 87% Glyzerin mit H₂O_{bid.} auf 1 L auffüllen und autoklavieren.</p>
<p>Regenerationsagar^{light} (Schulz et al., 1990)</p>	<p>1) Top Agar: 1,5% (w/v) Bacto-Agar 1 M Sorbitol in YEPS-Medium (s.u.)</p> <p>2) Bottom-Agar: wie 1), zusätzlich 8 µg/ml Carboxin, 400 µg/ml Hygromycin, 10 µg/ml Geneticin oder 100 µg/ml clonNat</p>
<p>Vitamin-Lösung (Holliday, 1974)</p>	<p>100 mg Thiamin 20 mg Calciumpanthothenat 50 mg p-Aminobenzoesäure 20 mg Nikotinsäure 20 mg Cholinchlorid 40 mg myo-Inositol 50 mg Folsäure Mit H₂O_{bid.} auf 1 L auffüllen und sterilfiltrieren.</p>
<p>Salz-Lösung (Holliday, 1974)</p>	<p>8 g KH₂PO₄ 2 g Na₂SO₄ 1 g MgSO₄ x 7H₂O 4 g MgSO₄ x 7H₂O 1,32 g CaCl₂ x H₂O Mit H₂O_{bid.} auf 1 L auffüllen und sterilfiltrieren.</p>

Spurenelement-Lösung (Holliday, 1974)	60 mg H ₃ BO ₃ 191 mg MnCl ₂ 400 mg ZnCl ₂ 47 mg NaMoO ₄ x 2H ₂ O 140 mg FeCl ₃ x 6H ₂ O 557 mg CuSO ₄ x 5H ₂ O Mit H ₂ O _{bid.} auf 1 L auffüllen und sterilfiltrieren.
--	--

4.1.6 Stämme

E. coli Stämme

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

S. cerevisiae Stämme

Für das Hefe-Zwei-Hybrid-System wurde der Stamm AH109 verwendet. Dieser hat den Genotyp MATa, trp1-901, leu2-3, 112, ura3-52, his3-200, gal4Δ, gal80Δ, LYS2::GAL1UASGAL1TATA-HIS3, GAL2UAS-GAL2TATA-ADE2, URA3::MEL1UAS-MEL1TATA-lacZ (James *et al.*, 1996).

Ustilago maydis Stämme

Tabelle 8: In dieser Arbeit verwendete Stämme.

Stamm	Genotyp	Resistenz	Referenz
FB1	<i>a1b1</i>	-	(Banuett und Herskowitz, 1989)
FB2	<i>a2b2</i>	-	(Banuett und Herskowitz, 1989)
SG200	<i>a1 mfa2 bE1bW2</i>	Phleo ^R	(Bölker <i>et al.</i> , 1995)
CP27	<i>a2Δb::P_{cg1}:rbf1</i>	Hyg ^R	(Heimel <i>et al.</i> , 2010a)
AB31	<i>a2, Δb::P_{cg1}:bW2, P_{cg1}:bE1</i>	Phleo ^R	(Brachmann, 2001b)

AB32	$a2, \Delta b::P_{crg1}:bW2, P_{crg1}:bE2$	Phleo ^R	(Brachmann, 2001b)
UDS1	$a2, \Delta b::P_{crg1}:bW2, P_{crg1}:bE1:3xHA$	Phleo ^R , Hyg ^R	Schuler, nicht veröffentlicht
UDS5	$a2, \Delta b::P_{crg1}:bW2, P_{crg1}:bE1, rbf1:3xHA$	Phleo ^R , Hyg ^R	(Heimel <i>et al.</i> , 2010b)
UMS12	$a2, \Delta b::P_{crg1}:bW2, P_{crg1}:bE1, \Delta clp1::hyg^R$	Phleo ^R , Hyg ^R	Scherer, nicht veröffentlicht
UMS25	$a2, \Delta b::P_{crg1}:bW2, P_{crg1}:bE1, \Delta rbf1::hyg^R$	Phleo ^R , Hyg ^R	Scherer, nicht veröffentlicht
UMS76	$a1 mfa2 bW2bE1, \Delta clp1::eGFP:nat^R$	Phleo ^R , Nat ^R	(Scherer <i>et al.</i> , 2006)
RK1607	$a1 \Delta bW1::hyg^R, bE1$	Hyg ^R	(Gillissen <i>et al.</i> , 1992)
RK1722	$a2 bW2, \Delta bE2::hyg^R$	Hyg ^R	(Gillissen <i>et al.</i> , 1992)
UMH1	$a1 \Delta bW1::hyg^R, bE1_{\Delta AS332}:gen^R$	Hyg ^R , Gen ^R	(Heinen, 2019)
UBL6	$a2, \Delta b::P_{crg1}:bW2:3xHA, P_{crg1}:bE1,$ $ip'(P_{crg1}:clp1:3xmyc)ip^s$	Phleo ^R , Hyg ^R , Cbx ^R	(Baumann, 2019)
UBL8	$a2, \Delta b::P_{crg1}:bW2_{\Delta 567}:3xHA, P_{crg1}:bE1,$ $ip'(P_{crg1}:clp1:3xmyc)ip^s$	Phleo ^R , Hyg ^R , Cbx ^R	(Baumann, 2019)
UBL15	$a2, \Delta b::P_{crg1}:bW2, P_{crg1}:bE1,$ $ip'(P_{crg1}:clp1:3xmyc)ip^s$	Phleo ^R , Cbx ^R	(Baumann, 2019)
UJU1.14	$a2, \Delta b::P_{crg1}:bW2, P_{crg1}:bE1:3xHA, \Delta rbf1::nat^R$	Phleo ^R , Hyg ^R , Nat ^R	Ulrich, nicht veröffentlicht
UJU71.7	$a2, \Delta b::P_{crg1}:bW2, P_{crg1}:bE1,$ $ip'(P_{crg1}:clp1:3xHA)ip^s$	Phleo ^R , Cbx ^R	Ulrich, nicht veröffentlicht
UJU79.7	$a2, P_{crg1}:bW2, P_{crg1}:bE1, \Delta rbf1::hyg^R,$ $ip'(P_{crg1}:clp1)ip^s$	Phleo ^R , Hyg ^R Cbx ^R	Ulrich, nicht veröffentlicht
UJU81.18	$a2, \Delta b::P_{crg1}:bW2, P_{crg1}:bE1, rbf1:3xHA:hyg^R,$ $ip'(P_{crg1}:clp1)ip^s$	Phleo ^R , Hyg ^R Cbx ^R	Ulrich, nicht veröffentlicht
UJU82.8	$a2, \Delta b::P_{crg1}:bW2, P_{crg1}:bE1,$ $ip'(P_{crg1}:clp1:3xHA)ip^s$	Phleo ^R , Cbx ^R	Ulrich, nicht veröffentlicht
UTaB23	$a2, \Delta b::P_{crg1}:bW2, P_{crg1}:bE2,$ $ip'(P_{crg1}:clp1:3xmyc)ip^s$	Phleo ^R , Cbx ^R	(Brenner, 2019)
UTaB28	$a2, \Delta b::P_{crg1}:bW2, P_{crg1}:bE2:3xHA,$ $ip'(P_{crg1}:clp1:3xmyc)ip^s$	Phleo ^R , Hyg ^R , Cbx ^R	(Brenner, 2019)
UTaB29	$a2, \Delta b::P_{crg1}:bW2:3xHA, P_{crg1}:bE2,$ $ip'(P_{crg1}:clp1:3xmyc)ip^s$	Phleo ^R , Hyg ^R , Cbx ^R	(Brenner, 2019)

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

Tabelle 9: In dieser Arbeit erstellte Stämme.

Stamm	Genotyp	Resistenz	Ausgangs- stamm
UJF29	<i>a2 Δb::P_{crg1}:bW2, P_{crg1}:bE1, Δrbf, ip'(P_{crg1}:clp1:3xHA)ip^s</i>	Phleo ^R , Cbx ^R , Hyg ^R	UMS25
UJF33	<i>a2 Δb::P_{crg1}:rbf1 ip'(P_{crg1}:clp1:3xHA)ip^s</i>	Hyg ^R , Cbx ^R	CP27
UJF39	<i>a2 Δb::P_{crg1}:bW2, P_{crg1}:bE1, ip'(P_{crg1}:clp1)ip^s</i>	Phleo ^R , Cbx ^R	AB31
UJF75	<i>a2 Δb::P_{crg1}:bW2, P_{crg1}:bE1, clp1:GFP:hyg^R</i>	Phleo ^R , Hyg ^R	AB31
UJF79	<i>a2 Δb::P_{crg1}:bW2, P_{crg1}:bE1, clp1Δ2:GFP:hyg^R</i>	Phleo ^R , Hyg ^R	AB31
UJF83	<i>a2 Δb::P_{crg1}:bW2, P_{crg1}:bE1, clp1Δ3:GFP:hyg^R</i>	Phleo ^R , Hyg ^R	AB31
UJF84	<i>a2 Δb::P_{crg1}:bW2, P_{crg1}:bE1, clp1Δ1:GFP:hyg^R</i>	Phleo ^R , Hyg ^R	AB31
UJF104	<i>a2 Δb::P_{crg1}:bW2, P_{crg1}:bE1:3xHA, ip'(P_{otef}:clp1)ip^s</i>	Phleo ^R , Hyg ^R , Cbx ^R	UDS1
UJF110	<i>a2 Δb::P_{crg1}:bW2, P_{crg1}:bE1, ip'(P_{otef}:clp1:GFP)ip^s</i>	Phleo ^R , Cbx ^R	AB31
UJF114	<i>a2 Δb::P_{crg1}:bW2, P_{crg1}:bE1, ip'(P_{otef}:clp1Δ1:GFP)ip^s</i>	Phleo ^R , Cbx ^R	AB31
UJF117	<i>a2 Δb::P_{crg1}:bW2, P_{crg1}:bE1, ip'(P_{otef}:clp1Δ2:GFP)ip^s</i>	Phleo ^R , Cbx ^R	AB31
UJF119	<i>a2 Δb::P_{crg1}:bW2, P_{crg1}:bE1, ip'(P_{otef}:clp1Δ3:GFP)ip^s</i>	Phleo ^R , Cbx ^R	AB31
UJF121	<i>a1 mfa2 bE1, bW2, H1:mcherry:Nat</i>	Nat ^R	SG200
UJF125	<i>a2 Δb::P_{crg1}:bW2, P_{crg1}:bE1, clp1_ABBA^{Mut}:GFP:hyg^R</i>	Phleo ^R , Hyg ^R	AB31
UJF131	<i>a1 mfa2 bE1, bW2, H1:mcherry:Nat, clp1:GFP:hyg^R</i>	Nat ^R , Hyg ^R	UJF121
UJF135	<i>a1 mfa2 bE1, bW2, H1:mcherry:Nat, clp1Δ1:GFP:hyg^R</i>	Nat ^R , Hyg ^R	UJF121
UJF137	<i>a1 mfa2 bE1, bW2, H1:mcherry:Nat, clp1Δ2:GFP:hyg^R</i>	Nat ^R , Hyg ^R	UJF121
UJF138	<i>a1 mfa2 bE1, bW2, H1:mcherry:Nat, clp1Δ3:GFP:hyg^R</i>	Nat ^R , Hyg ^R	UJF121
UJF141	<i>a1 mfa2 bE1, bW2, H1:mcherry:Nat, clp1_ABBA^{Mut}:GFP:hyg^R</i>	Nat ^R , Hyg ^R	UJF121
UJF144	<i>a2 Δb::P_{crg1}:bW2, P_{crg1}:bE1:3xHA, ip'(P_{otef}:clp1:GFP)ip^s</i>	Phleo ^R , Cbx ^R , Hyg ^R	UDS1
UJF147	<i>a2 Δb::P_{crg1}:bW2, P_{crg1}:bE1:3xHA, ip'(P_{otef}:clp1Δ3:GFP)ip^s</i>	Phleo ^R , Cbx ^R , Hyg ^R	UDS1
UJF150	<i>a2 Δb::P_{crg1}:bW2, P_{crg1}:bE1:3xHA, ip'(P_{otef}:clp1_ABBA^{Mut}:GFP)ip^s</i>	Phleo ^R , Cbx ^R , Hyg ^R	UDS1
UJF152	<i>a2 Δb::P_{crg1}:bW2, P_{crg1}:bE1, ip'(P_{otef}:clp1_ABBA^{Mut}:GFP)ip^s</i>	Phleo ^R , Cbx ^R	AB31
UJF164	<i>a2 Δb::P_{crg1}:bW2, P_{crg1}:bE1, Δclp1::gen^R; ip'(P_{otef}:clp1:GFP)ip^s</i>	Phleo ^R , Gen ^R , Cbx ^R	UJF110

UJF165	<i>a2 Δb::P_{crp1}:bW2, P_{crp1}:bE1, Δclp1::gen^R, ip'(P_{otef}:clp1Δ3:GFP)ip^s</i>	Phleo ^R , Gen ^R , Cbx ^R	UJF119
UJF167	<i>a2 Δb::P_{crp1}:bW2, P_{crp1}:bE1:3xHA, Δclp1::gen^R, ip'(P_{otef}:clp1Δ3:GFP)ip^s</i>	Phleo ^R , Gen ^R , Cbx ^R , Hyg ^R	UJF147
UJF168	<i>a2 Δb::P_{crp1}:bW2, P_{crp1}:bE1:3xHA, Δclp1::gen^R, ip'(P_{otef}:clp1_ABBA^{Mut}:GFP)ip^s</i>	Phleo ^R , Gen ^R , Cbx ^R , Hyg ^R	UJF150
UJF170	<i>a2 Δb::P_{crp1}:bW2, P_{crp1}:bE1:3xHA, Δclp1::gen^R, ip'(P_{otef}:clp1:GFP)ip^s</i>	Phleo ^R , Gen ^R , Cbx ^R , Hyg ^R	UJF144
UJF172	<i>a2 Δb::P_{crp1}:bW2, P_{crp1}:bE1, Δclp1::gen^R, ip'(P_{otef}:clp1_ABBA^{Mut}:GFP)ip^s</i>	Phleo ^R , Gen ^R , Cbx ^R	UJF152
UJF174	<i>a2 bW2_{ΔAS567}:gen^R, ΔbE2::hyg^R</i>	Gen ^R , Hyg ^R	RK1722

4.1.7 Nukleinsäuren, Oligonukleotide und Plasmide

Nukleinsäuren

Für die Herstellung von CM-Medium (siehe 4.1.5) wurde Herings-Sperma DNA (Sigma) verwendet. Für PCR-Reaktionen wurden dATP, dTTP, dCTP und dGTP (Jena Bioscience) eingesetzt. Für die Markierung Digoxigenin-markierter Sonden für Southern-Analysen wurden Digoxigeninmarkierte dUTPs (Jena Bioscience) verwendet. Als DNA-Größenstandard für die Agarose-Gelelektrophorese wurde der GeneRuler DNA Ladder Mix (Fermentas) verwendet.

Oligonukleotide

Alle in dieser Studie verwendeten Oligonukleotide wurden über MWG Eurofins bezogen.

Tabelle 10: In dieser Arbeit verwendete Oligonukleotide.

Bezeichnung	Nukleotidsequenz (5´-3´)
Fw_Clp1_NdeI	CGCATATGATGATAATGTCACCCCGTCACC
Clp1_AfIII_rv	CGGCTTAAGCTCGAGTTTGGTGGATTGGA
Clp1_Stop_AfIII_rv	CGGCTTAAGTCACTCGAGTTTGGTGGATTGG
Clp1_Stop_BamHI_rv	CGGGATCCTCACTCGAGTTTGGTGGATTG
RT Primer	
Rbf1_bbs1_f	CTTGAGCTGTGGACGAT
Rbf1_bbs1_r	CACGAATCACGAATCACGTATGG
clp1-252_bind_for	AACTGGCTAGCGCGCAGG
clp1-252_bind_rev	CGGGCTCAACGGACAACG
RT_aktin_f	CATGTACGCCGGTATCTCG
RT_aktin_r	CTCGGGAGGAGCAACAATC
RT_eIF2B_f	ATCCCGAACAGCCCAAAC
RT_eIF2B_r	ATCGTCAACCGCAACCAC

Fw_RT_bW2	TCGTGCAATGGATGGTAAGG
Rv_RT_bW2	GAGTCGTGTGCCATCGAAG
RT_clp1_for	CCAGCGTCTACTCTTGATCC
RT_clp1_rev	GACGGTCCTCTTGCTCCTTG
RT_rbf1_f	AGTACGAGCTACGACGGATTC
RT_rbf1_r	GGGTAGGTGTTGGACACATTC
RT_crg1_f	TTGGTGCTGGCGTCATTG
RT_crg1_r	CCGCGGTTATTGTATTGCGTC
RT_clp1_fw Selektion	ATGGTCGCTCGCTCATCAAG
RT_clp1_3'UTR_rv	TGAGGCGTTGAATGGTTGG
RT_3xHA_rv	AGGCGGCACCGGCATAG
Clp1 Fusion	
FW_Clp1_LB	ATGATAATGTCAACCCGTCACC
Fw_RB_Clp1_Sfi	GCGGCCTGAGTGGCCATCCAACCATTCAACGCCTCACATC
Rv_Clp1_LB_Sfi	GCGGCCGCGTTGGCCATCTCGAGTTTGGTGGATTG
Rv_RB_Clp1	CGCCAAGATAGGCTTTACGG
Clp1 Deletion	
Fw_LB_clp1_KO	CTGGAGCGCTACTCTGTGAC
Fw_RB_clp1_KO_Sfi	GCGCGGCCTGAGTGGCCATCCAACCATTCAACGCCTCAC
Rv_LB_clp1_KO_Sfi	GCGCGGCCATCTAGGCCGATTGGGAATGGGACAATTTGAG
Rv_RB_clp1_KO	GCTGGCGCACATGTGCAAAG
Clp1_KO_nested_fw	CAGATACGAGTCCGACGACGTAAG
Clp1_KO_nested_rv	AGGGCTGGTCTCGTACCTTG
Gibson Primer interne Clp1 Deletionen	
Fw_Gibson_Topo	AACAGCTATGACCATGATTACG
Rv_Gibson_Topo	GAATTGGGCCCTCTAGATGC
Fw_Clp_Del.Destabi1_Gibson	ACCTCACCCAGTACCTCGAGTTGCCAGAGACGGTCCCGAT
Fw_Clp_Del.Destabi2_Gibson	AAGTGATCCCAGGTCAGCCTACGCTGTATGCCATTCATGG
Fw_Clp_Del.Destabi3_Gibson	ATTCGGATCGAGAAGCTGCACACATGCCACGCAAGCGTT
Rv_Clp_Del.Destabi1_Gibson	ATCGGGACCGTCTCTGGCAACTCGAGGTAAGTGGGTGAGGT
Rv_Clp_Del.Destabi2_Gibson	CCATGAATGGCATAACGCTAGGCTGACCTGGGATCACTT
Rv_Clp_Del.Destabi3_Gibson	AACGCTTGCGTGGGCATGTGTGCAGCTTCTCGATCCGAAT
Mutagenese Primer ABBA Motiv	
fw_clp1_Mut.ABBA	ACGACCACCGACGCACTTGGGCTGGCAGGCGCTCGCCCGA GAAGCTGCAACGCTGT
rv_clp1_Mut.ABBA	ACAGCGTTGCAGCTTCTCGGGCGAGCGCCTGCCAGCCCAA GTGCGTCGGTGGTCTGT
fw_Clp1_Mut.ABBA_Acc65I	TTACGCCAAGCTTGGTACCG
rv_Clp1_Mut.ABBA_Mlul	TCAGGTTCCACGCGTGATCG
bW2 Verkürzung/ Fusion	
bW2(del.409)_LB_fw	CCGAAGCAGTCCGAATC
bW2(del.409)_LB_Sfi_rv	ACGGCCGCGTTGGCCGCTTCTCGAAAGTCCTTGTGTCATC
bW2_LB_fw	GTTACCATCGTCGCGCTCAAC
bW2_LB_Sfi_rv	ACGGCCGCGTTGGCCGCGGCAAGCGAGAAAGAGTTTCGAGT AG
RB_bW2_Sfi_fw	ACGGCCTGAGTGGCCTGGCGTCGGCTGACTTTGAAAAC
RB_bW2_rv	GACAAGCCGTTGAAGCTAGCG
LB_del.AD_fw	GAGTCACCTCCTCCCTCATC
LB_del.AD_Sfil_rv	ACGGCCGCGTTGGCCGCTGGGTGACAAAAGGCATCTG

Plasmide

Alle Klonierungsschritte wurden durch Restriktionsanalyse überprüft, alle eingebrachten PCR-Amplifikate sequenziert.

Tabelle 11: In dieser Arbeit verwendete Plasmide.

Plasmid	Beschreibung	Resistenz	Referenz
pBL6	Plasmid zur Fusion von einem C-terminalen 3xHA-Fragment an ein verkürztes <i>bW2</i> . Plasmid enthält 1 kb Fragment entsprechend einer Verkürzung auf AS567 des <i>bW2</i> ORFs, ein 3,1 kb 3xHA-Hyg (aus pUMa792) SfiI-Fragment und ein 1 kb umfassenden Bereich stromabwärts des <i>bW2</i> Gens im pCR2.1 TOPO Rückgrat.	Amp ^R , Hyg ^R	(Baumann, 2019)
pUMa792	Knock-in mit c-terminaler 3xHA-Fusion und Hygromycin Kasette.	Amp ^R , Hyg ^R	Plasmidsammlung <i>Ustilago</i> Research Community Heinrich Heine Universität
pUMa1057	Knock-out mit Geneticin Resistenzkasette.	Amp ^R , Gen ^R	Plasmidsammlung <i>Ustilago</i> Research Community Heinrich Heine Universität
pMF5-9g (MJ)	Knock-in mit c-terminaler 3xHA-Fusion und Geneticin Kasette.	Amp ^R , Gen ^R	Jurca, nicht veröffentlicht
pGADT7	Y2H-Beutevektor	Amp ^R , Leu+	Clontech
pGADT7-SV40	Y2H-Beutevektor, SV40 large T-antigen fusioniert an die GAL4 Aktivierungsdomäne (Interaktionspartner für Positiv- und Negativkontrolle)	Amp ^R , Leu+	Clontech
pGADT-bW2 Volllänge	Y2H-Beutevektor, enthält das Volllängen <i>bW2</i> -Gens fusioniert an die GAL4 Aktivierungsdomäne	Amp ^R , Leu+	(Heinen, 2019)
pGADT-bW2₃₃₉₋₆₄₅	Y2H-Beutevektor, enthält den C-terminalen Bereich des <i>bW2</i> -Gens (AS 339-645) fusioniert an die GAL4 Aktivierungsdomäne	Amp ^R , Leu+	(Heimel, 2010)

pGADT-bW2₅₆₇₋₆₄₅	Y2H-Beutevektor, enthält den C-terminalen Bereich des <i>bW2</i> -Gens (AS 567-645) fusioniert an die GAL4 Aktivierungsdomäne	Amp ^R , Leu+	(Heimel, 2010)
pGADT-bW2₁₋₃₃₉	Y2H-Beutevektor, enthält den N-terminalen Bereich des <i>bW2</i> -Gens (AS 1-339) fusioniert an die GAL4 Aktivierungsdomäne	Amp ^R , Leu+	(Heinen, 2019)
pGBKT7	Y2H-Ködervektor	Kan ^R , Trp+	Clontech
pGBKT7-p53	Y2H Ködervektor, p53 fusioniert an die GAL4 Bindedomäne (Positivkontrolle)	Kan ^R , Trp+	Clontech
pGBKT7-Lam	Y2H Ködervektor, LamC fusioniert an die GAL4 Bindedomäne (Negativkontrolle)	Kan ^R , Trp+	Clontech
pGBKT-clp1 Volllänge	Y2H Ködervektor, enthält das Volllängen <i>clp1</i> -Gen fusioniert an die GAL4 DNA-Bindedomäne	Kan ^R , Trp+	(Baumann, 2019)
pGBKT-clp1Δ1	Y2H Ködervektor, enthält das <i>clp1</i> -Gen mit deletiertem Bereich 1 fusioniert an die GAL4 DNA-Bindedomäne	Kan ^R , Trp+	(Baumann, 2019)
pGBKT-clp1Δ2	Y2H Ködervektor, enthält das <i>clp1</i> -Gen mit deletiertem Bereich 2 fusioniert an die GAL4 DNA-Bindedomäne	Kan ^R , Trp+	(Baumann, 2019)
pGBKT-clp1Δ3	Y2H Ködervektor, enthält das <i>clp1</i> -Gen mit deletiertem Bereich 3 fusioniert an die GAL4 DNA-Bindedomäne	Kan ^R , Trp+	(Baumann, 2019)
pGBKT-clp1ABBA^{Mut}	Y2H Ködervektor, enthält das <i>clp1</i> -Gen mit mutiertem ABBA Motiv fusioniert an die GAL4 DNA-Bindedomäne	Kan ^R , Trp+	(Heinen, 2019)

Tabelle 12: In dieser Arbeit hergestellte Plasmide.

Plasmid	Beschreibung	Resistenz
pJF12	pBF10 Derivat (Faist, 2017). Zur Expression von <i>clp1</i> mit C-terminalem 3xHA-Fragment (110 bp SfiI-Ascl-Fragment) unter dem <i>crg1</i> -Promotor.	Amp ^R , Cbx ^R
pJF25	pRU11 Derivat. Zur Expression von <i>clp1</i> (1,2 kb NdeI-AfIII-Fragment) unter dem <i>crg1</i> -Promotor.	Amp ^R , Cbx ^R
pJF32	Plasmid zur Integration in den <i>clp1</i> -Locus. Die Integration führt zum Austausch des ORFs von <i>clp1</i> mit einer <i>clp1</i> Version mit C-terminalem eGFP Fragment. Plasmid enthält 1,2 kb Fragment entsprechend dem <i>clp1</i> ORFs, ein 3,7 kb eGFP-Hyg ^R (aus pUMa317) SfiI-Fragment und ein 1 kb	Amp ^R , Kan ^R , Hyg ^R

	umfassenden Bereich stromabwärts des <i>clp1</i> Gens im pCR2.1 TOPO Rückgrat.	
pJF37	Plasmid zur Integration in den <i>clp1</i> -Locus. Die Integration führt zum Austausch des ORFs von <i>clp1</i> mit einer <i>clp1</i> Δ 1-Version mit C-terminalem eGFP Fragment. Das Rückgrat pJF32 (3,8 kb KpnI-EcoRV-Fragment) wurde mit den beiden Gibson PCR Fragmenten für die Deletion von Bereich 1 in die Gibson Reaktion eingebracht.	Amp ^R , Kan ^R , Hyg ^R
pJF38	Plasmid zur Integration in den <i>clp1</i> -Locus. Die Integration führt zum Austausch des ORFs von <i>clp1</i> mit einer <i>clp1</i> Δ 2-Version mit C-terminalem eGFP Fragment. Das Rückgrat pJF32 (3,8 kb KpnI-EcoRV-Fragment) wurde mit den beiden Gibson PCR Fragmenten für die Deletion von Bereich 2 in die Gibson Reaktion eingebracht.	Amp ^R , Kan ^R , Hyg ^R
pJF39	Plasmid zur Integration in den <i>clp1</i> -Locus. Die Integration führt zum Austausch des ORFs von <i>clp1</i> mit einer <i>clp1</i> Δ 3-Version mit C-terminalem eGFP Fragment. Das Rückgrat pJF32 (3,8 kb KpnI-EcoRV-Fragment) wurde mit den beiden Gibson PCR Fragmenten für die Deletion von Bereich 3 in die Gibson Reaktion eingebracht.	Amp ^R , Kan ^R , Hyg ^R
pJF41	Plasmid zur Fusion von einem C-terminalen 3xHA-Fragment an <i>bW2</i> . Plasmid enthält 1 kb Fragment entsprechend dem <i>bW2</i> ORFs, ein 3,1 kb 3xHA-Hyg (aus pUMa792) SfiI-Fragment und ein 1 kb umfassenden Bereich stromabwärts des <i>bW2</i> Gens im pCR2.1 TOPO Rückgrat.	Amp ^R , Kan ^R , Hyg ^R
pJF46	Plasmid zur Fusion von einem C-terminalen 3xHA-Fragment an ein verkürztes <i>bW2</i> . Plasmid enthält 1 kb Fragment entsprechend einer Verkürzung auf AS409 des <i>bW2</i> ORFs, ein 3,1 kb 3xHA-Hyg (aus pUMa792) SfiI-Fragment und ein 1 kb umfassenden Bereich stromabwärts des <i>bW2</i> Gens im pCR2.1 TOPO Rückgrat.	Amp ^R , Kan ^R , Hyg ^R
pJF47	p123 Derivat, zur konstitutiven Expression von <i>clp1</i> unter dem <i>otef</i> -Promotor mit C-terminalem eGFP-Fragment. <i>clp1</i> -Fragment aus pJF32 (1,2 kb BamHI-NotI-Fragment) im p123 (5,5 kb BamHI-NotI-Fragment) Rückgrat.	Amp ^R , Cbx ^R
pJF48	p123 Derivat, zur konstitutiven Expression von <i>clp1</i> Δ 1 unter dem <i>otef</i> -Promotor mit C-terminalem eGFP-Fragment. <i>clp1</i> Δ 1-Fragment aus pJF37 (1,2 kb BamHI-NotI-Fragment) im p123 (5,5 kb BamHI-NotI-Fragment) Rückgrat.	Amp ^R , Cbx ^R
pJF49	p123 Derivat, zur konstitutiven Expression von <i>clp1</i> Δ 2 unter dem <i>otef</i> -Promotor mit C-terminalem eGFP-Fragment. <i>clp1</i> Δ 2 -Fragment aus pJF38 (1,2 kb BamHI-NotI-Fragment) im p123 (5,5 kb BamHI-NotI-Fragment) Rückgrat	Amp ^R , Cbx ^R

pJF50	p123 Derivat, zur konstitutiven Expression von <i>clp1Δ3</i> unter dem <i>otef</i> -Promotor mit C-terminalem eGFP-Fragment. <i>clp1Δ3</i> -Fragment aus pJF39 (1,2 kb BamHI-NotI-Fragment) im p123 (5,5 kb BamHI-NotI-Fragment) Rückgrat	Amp ^R , Cbx ^R
pJF53	Zwischenprodukt enthält <i>clp1</i> ORF mit, mittels PCR, eingebrachten Acc65I und MluI Schnittstellen im pCR2.1 TOPO Rückgrat. Mutagenese PCR auf entstandenes Plasmid, um ein mutiertes ABBA Motif in <i>clp1</i> zu generieren.	Amp ^R , Kan ^R
pJF54	Plasmid zur Integration in den <i>clp1</i> -Locus. Die Integration führt zum Austausch des ORFs von <i>clp1</i> mit einer <i>clp1ABBA^{Mut}</i> Version mit C-terminalem eGFP Fragment. Rückgrat pJF32 (8,0 kb MluI-Acc65I-Fragment) wird mit <i>clp1 ABBA^{Mut}</i> -Fragment aus pJF53 (1,2 kb MluI-Acc65I-Fragment) in die Ligation eingebracht.	Amp ^R , Kan ^R , Hyg ^R
pJF56	p123 Derivat, zur konstitutiven Expression von <i>clp1ABBA^{Mut}</i> unter dem <i>otef</i> -Promotor mit C-terminalem eGFP-Fragment. <i>clp1ABBA^{Mut}</i> -Fragment aus pJF54 (1,2 kb BamHI-NotI-Fragment) im p123 (5,5 kb BamHI-NotI-Fragment) Rückgrat	Amp ^R , Cbx ^R
pJF59	Plasmid zur Fusion von einem C-terminalen 3xHA-Fragment an <i>bW2</i> . Rückgrat pJF41 (6,0 kb SfiI-Fragment) wird mit 2,4 kb 3xHA-Gen SfiI-Fragment (Jurca, nicht veröffentlicht) in die Ligation eingebracht.	Amp ^R , Kan ^R , Gen ^R
pJF60	Plasmid zur Fusion von einem C-terminalen 3xHA-Fragment an ein verkürztes <i>bW2</i> (AS409). Rückgrat pJF46 (6,0 kb SfiI-Fragment) wird mit 2,4 kb 3xHA-Gen SfiI-Fragment (Jurca, nicht veröffentlicht) in die Ligation eingebracht	Amp ^R , Kan ^R , Gen ^R
pJF61	Plasmid zur Fusion von einem C-terminalen 3xHA-Fragment an ein verkürztes <i>bW2</i> (AS567). Rückgrat pBL6 (Baumann, 2019) (6,0 kb SfiI-Fragment) wird mit 2,4 kb 3xHA-Gen SfiI-Fragment (Jurca, nicht veröffentlicht) in die Ligation eingebracht	Amp ^R , Kan ^R , Gen ^R
pJF66	Plasmid zur Deletion von <i>clp1</i> . Plasmid enthält ein 1 kb Fragment entsprechend dem Bereich stromaufwärts des <i>clp1</i> Gens, ein 2,0 kb SfiI-Gen-Fragment (aus pUMa1057) und ein 1 kb umfassenden Bereich stromabwärts des <i>clp1</i> Gens. Drei Fragment Ligation wurde mittels <i>nested</i> -Primern amplifiziert und in ein pCR2.1 TOPO Rückgrat eingebracht.	Amp ^R , Kan ^R , Gen ^R

4.1.8 Allgemeine Verbrauchsmaterialien

Material	Hersteller
Filterpapier 3MM	Whatsman
Glasperlen 150-212 microns	Sigma
Nylonmembran Hybond N+	Amersham
Nitrocellulose-Membran	Millipore
Papierfilter	S&S 595
Petrischalen	Greiner
1,5 ml- und 2 ml-Reaktionsgefäße	Greiner
0,2 ml PCR-Reaktionsgefäße	Greiner
15 ml und 50 ml PPN-Röhrchen	Greiner
1,5 ml Polystyrol-Küvetten	Roth
Sterilfilter 0,20 µm	Roth

4.2 Mikrobiologische, genetische und zellbiologische Methoden

Escherichia coli

Kultivierung von *E. coli*

Die bei -80°C gelagerten Glycerinkulturen wurden vor weiteren Arbeiten auf YT-Amp-Festmedien ausgestrichen. *E. coli*-Stämme wurden entweder als Schüttelkulturen bei 200 Upm oder auf Festmedien unter aeroben Bedingungen bei 37°C kultiviert. Übernachtskulturen wurden von YT-Amp-Festmedien angeimpft.

Bestimmung der Zelldichte bei *E. coli*

Die Zelldichte von Flüssigkulturen wurde photometrisch in einem 7300 Spectrophotometer (JENWAY) bei 600 nm bestimmt. Um eine lineare Abhängigkeit sicherzustellen, wurden für die Messung der OD₆₀₀ die Kulturen durch entsprechende Verdünnung auf einen Wert unterhalb von 0,8 verdünnt. Als Nullwert wurde die OD₆₀₀ des jeweiligen Kulturmediums verwendet. Eine OD₆₀₀ von 1,0 entspricht etwa 10⁹ Zellen/ml.

RbCl-Transformation von *E. coli*

Zur Herstellung transformationskompetenter Bakterienzellen wurden 100 ml LB-Medium, dem je 10 mM MgCl₂ und MgSO₄ zugesetzt waren, mit 1 ml einer frischen TOP10-Übernachtskultur angeimpft und bis zu einer OD₆₀₀ ≈ 0,5 bei 37°C und 200 Upm inkubiert. Die Zellen wurden für 15 Minuten bei 3.000 Upm und 4°C pelletiert und in 33 ml eiskalter RF1-Lösung resuspendiert. Nach 30 bis 60 Minuten Inkubation auf Eis wurden die Zellen erneut abzentrifugiert (15 min, 3.000 Upm, 4°C), der Überstand abgenommen, die Zellen in 5 ml eiskalter RF2-Lösung resuspendiert und 15 Minuten inkubiert. Die Zellsuspension wurde zu je 100 µl aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert. Zur Transformation wurden die Zellen auf Eis aufgetaut, jeweils 50 µl mit 10 µl Plasmidlösung (1-5 ng Plasmid) bzw. Ligationsansatz versetzt und 5 bis 30 Minuten auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock von 1 Minute bei 42°C und weiteren 2 Minuten auf Eis, wurde der Transformationsansatz zur phänotypischen Expression der durch das eingebrachte Plasmid vermittelten Antibiotika-Resistenz mit 500 µl dYT-Medium versetzt und 30 Minuten bei 500 Upm und 37°C in einem Eppendorf-Wärmeblock inkubiert. 200 µl des Transformationsansatzes wurde auf YT-Platten mit 100 µg/ml Ampicillin ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Auf diese Weise konnte eine Transformationsrate von 10⁶ Transformanten pro 1 µg eingesetzter Plasmid-DNA erreicht werden. (Modifiziert nach (Cohen *et al.*, 1972)).

RF1-Lösung:

100 mM RbCl

50 mM MnCl₂ x 4 H₂O

30 mM K-Acetat

10 mM CaCl₂ x 2 H₂O

15% (v/v) Glycerin

in H₂O_{bid.} mit Essigsäure auf pH 5,8

einstellen und sterilfiltrieren

RF2-Lösung:

10 mM MOPS

10 mM RbCl

75mM CaCl₂x2H₂O

15% (v/v) Glycerin

in H₂O_{bid.} mit Essigsäure auf pH 5,8

einstellen und sterilfiltrieren.

Saccharomyces cerevisiae

Kultivierung von *S. cerevisiae*

S. cerevisiae-Stämme wurden standardmäßig als Schüttelkulturen bei 200 Upm oder auf Festmedien unter aeroben Bedingungen bei 28°C oder 30°C kultiviert.

Übernachtkulturen wurden entweder aus Glycerinkulturen (bei -80°C eingelagert) oder von bewachsenen YEPD-Platten bzw. entsprechenden Selektionsplatten, die weniger als zwei Monate bei 4°C gelagert waren, angeimpft.

Bestimmung der Zelldichte

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

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

Von einem Verdünnungsausstrich auf YEPD-Platten ausgehend wurden 25 ml YEPDA-Medium mit einigen AH109-Einzelkolonien inokuliert und bis zur stationären Wachstumsphase ($OD_{600} > 1,5$) bei 30°C und 250 Upm inkubiert. Diese Vorkultur wurde ca. 1:50 in 50 ml YEPDA-Medium auf eine $OD_{600} = 0,1$ verdünnt und weitere 4-6 h bei 28°C und 250 Upm bis zu einer $OD_{600} = 0,4-0,6$ inkubiert. Um die Zellen zu ernten wurde die Kultur in 50 ml Greiner-Röhrchen überführt und 3 min bei 2.000 Upm und Raumtemperatur abzentrifugiert. Die Zellen wurden dann einmal mit 15 ml sterilem H₂O und anschließend mit 10 ml SORB-Lösung gewaschen. Nach der Pelletierung wurden die kompetenten Zellen in 360 µl SORB-Lösung aufgenommen und 40 µl Lachssperma-DNA (Invitrogen) zugeben. Der Ansatz wurde für 10 min bei 100°C in einem Eppendorf-Wärmeblock denaturiert und anschließend sofort auf Eis gekühlt. Nach diesem Schritt konnten die Zellen in 50 µl Aliquots bei -80°C eingefroren werden. Für die Transformation wurden 50 µl der kompetenten Zellen auf Eis aufgetaut, mit 2 µl Plasmid-DNA versetzt und gemischt. Anschließend wurde das 6-fache Volumen

steriler LIT-PEG-Lösung zugefügt, gemischt und der Ansatz für 30 min bei 30°C inkubiert. Nach einem Hitzeschock für 15 min bei 42°C wurden die Zellen 3 min bei 2.000 Upm in einer Heraeus Biofuge pico abzentrifugiert, einmal mit YEPDA-Medium gewaschen und in 100 µl TE-Puffer resuspendiert, bevor der Ansatz auf einer entsprechenden Selektionsplatte ausgestrichen wurde.

SORB:

100 mM LiAc

10 mM Tris-Cl, pH 8,0

1 mM Na₂-EDTA, pH 8,0

1M Sorbitol

in H₂O_{bid.}

Lit/PEG:

50 g PEG-3500

10 ml Lithium-Acetat-Lösung (100 mM)

in 100 ml H₂O_{bid.}, sterilfiltriert

Ustilago maydis

Kultivierung von *Ustilago maydis*

U. maydis-Stämme wurden entweder als Schüttelkulturen bei 200 Upm oder auf Festmedien unter aeroben Bedingungen bei 28°C kultiviert, sofern nicht anders vermerkt. Übernachtskulturen wurden von Kulturen auf Festmedien, die weniger als einen Monat bei 4°C gelagert wurden angeimpft. Die bei -80°C gelagerten Glyzerinkulturen wurden vor weiteren Arbeiten immer zuerst auf Festmedien ausgestrichen.

Bestimmung der Zelldichte bei *U. maydis*

Die Zelldichte von Flüssigkulturen wurde photometrisch in einem 7300 Spectrophotometer (JENWAY) bei 600 nm bestimmt. Um eine lineare Abhängigkeit sicherzustellen, wurden für die Messung der OD₆₀₀ die Kulturen durch entsprechende Verdünnung auf einen Wert unterhalb von 0,8 verdünnt. Als Nullwert wurde die OD₆₀₀ des jeweiligen Kulturmediums verwendet. Eine OD₆₀₀ von 1,0 entspricht etwa 1-5 x 10⁷ Zellen/ml.

Induktion von *U. maydis*-Stämmen

Die Stämme wurden aus Vorkultur in Flüssigmedium (CM-Flüssigmedium) angeimpft, das reprimierende Bedingungen bot (im Fall des *crg1*-Promotors mit Glukose (f. c. 1 %) als einzige Kohlenstoffquelle) und bis zu einer $OD_{600} \approx 0,5$ bei 28 °C und 180 Upm inkubiert. Die Zellen wurden daraufhin abzentrifugiert (3.500 Upm, 5 min, 28 °C, Heraeus Biofuge stratos), der Überstand abgenommen und die Zellen im gleichen Volumen CM-Medium resuspendiert, welches induzierende Bedingungen bot (im Fall des *crg1*-Promotors Arabinose (f. c. 1 %) als einzige Kohlenstoffquelle). Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt wurden die Zell-Pellets in diesem Flüssigmedium resuspendiert und in frische Schikanekolben überführt. Die Kulturen wurden bei 28 °C und 200 Upm für 5-6 h induziert.

Transformation von *U. maydis* nach Gillisen *et al.*, 1992 und Schulz *et al.*, 1992

Herstellung von Protoplasten von *U. maydis*

Von einer auf Platte wachsenden Kultur wurde eine 10 ml YEPS_{light} Flüssigkultur angesetzt und für 8-10 h bei 28 °C geschüttelt. Diese Vorkultur wurde anschließend in 50 ml frischem YEPS_{light} Medium verdünnt und bei 28 °C bis zu einer Zelldichte von $1-2 \times 10^7$ Zellen/ml (bis $OD_{600} = 0,6-1,0$) geschüttelt. Nach Erreichen des optimalen Zelltiters wurden die Zellen durch Zentrifugation (3.500 Upm, 6 min, Heraeus Biofuge stratos) geerntet, einmal mit 20 ml SCS gewaschen und in 5 ml SCS mit 12,5 mg/ml (in SCS, sterilfiltriert) Lysing Enzyme resuspendiert. Die in diesem Puffer bei Raumtemperatur erfolgende Protoplastierung kann mikroskopisch verfolgt werden, da die zigarrenförmigen Zellen nach Lyse der Zellwand eine kugelige Form einnehmen. Nach vollständiger Protoplastierung (5-8 min) wurden 30 ml SCS zugegeben und die Protoplasten durch achtminütige Zentrifugation bei 2.300 Upm pelletiert. Dieser Waschschrift wurde noch einmal wiederholt. Als nächsten Waschschrift wurden die Zellen in 5 ml SCS und 5 ml kalter STC-Puffer resuspendiert (zuerst SCS auf die Zellen geben). Ab diesem Schritt wurden alle Zentrifugationsschritte bei 4 °C vorgenommen und die Zellen auf Eis resuspendiert. Danach wurden Zellen vorsichtig in 10 ml kaltem STC-Puffer aufgenommen und zentrifugiert. Alle Zentrifugationsschritte nach der Protoplastierung erfolgten für 8 min bei 2.300 Upm, 4 °C. Die Zellen wurden in 500 µl

STC-Puffer resuspendiert und auf Eis gehalten, je 50 µl Zellen wurden in 2 ml Reaktionsgefäße aliquotiert. Die Lagerung der Protoplasten erfolgte bei -80 °C für mehrere Monate.

SCS:

20 mM Na-Citrat, pH 5.8

1 M Sorbitol

in H₂O_{bid.}, sterilfiltrieren

STC:

10 mM Tris-HCl, pH 7.5

100 mM CaCl₂

1 M Sorbitol

in H₂O_{bid.}, sterilfiltrieren

Transformation von *U. maydis* Protoplasten

Zur integrativen Transformation wurden 50 µl Protoplasten mit 1-5 µl linearisierter Plasmid-DNA oder einem PCR-Produkt (optimal 3-5 µg in max. 10 µl Wasser/Puffer) und 1 µl Heparin- Lösung (15 mg/ml) für 15 min auf Eis inkubiert. Bei einer Transformation mit selbstreplizierenden Plasmiden wurden nur ca. 1 µg DNA eingesetzt. Nach Zugabe von 250 µl STC/PEG folgte eine weitere Inkubation von 15 min auf Eis. Anschließend wurde der gesamte Transformationsansatz auf einer kurz vorher mit Top-Agar überschichteten Hygromycin-, Nourseothricin- bzw. Carboxin-Bottom-Agarplatte ausgestrichen. Nach 2 bis 5 Tagen Inkubation bei 28 °C wurden die gewachsenen Kolonien mit flachen Zahnstochern auf CM-Platten, die das entsprechende Antibiotikum zur Selektion enthielten, vereinzelt.

STC/PEG (25ml):

60% STC-Puffer 15 ml

40% PEG 4000 10g PEG

in STC-Puffer lösen, sterilfiltrieren

Test auf filamentöses Wachstum

U. maydis Stämme wurden in CM-Flüssigmedium bei 28 °C bis zu einer OD₆₀₀ ≈ 0,5 angezogen. Die Zellen wurden pelletiert (3500 Upm, 5 min, RT) und in H₂O_{bid.} aufgenommen, und die Zelldichte auf eine OD₆₀₀ ≈ 1,0 eingestellt. Bei Ko-Inokulationen wurden gleiche Volumina beider Kreuzungspartner in einem Eppendorf-

Reaktionsgefäß gemischt. Von jedem Ansatz wurden 3-5 µl auf eine aktivkohlehaltige Platte getropft. Die Platte wurde mit Parafilm versiegelt und für 24-48 h bei 22°C inkubiert.

Pflanzeninfektionen

Für einen Pathogenitätstest wurde eine Spritzinfektion durchgeführt, 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 $OD_{600} \approx 0,8$ angezogen, durch Zentrifugation (3000 Upm, 5 min, RT) pelletiert und in $H_2O_{bid.}$ aufgenommen ($OD_{600} \approx 3,0$). Die kompatiblen Stämme wurden vor der Infektion 1:1 gemischt. Die Bonitur erfolgte 7 Tage nach Infektion.

4.3 Mikroskopie und Bildverarbeitung

Die zellmorphologische Betrachtung von *U. maydis* erfolgte an einem Lichtmikroskop (Axiophot oder Axiomager Z1, Zeiss) mittels Nomarski-Optik. Für DIC- und Fluoreszenz- Mikroskopie wurde ein 63-faches Plan-APOCHROMAT Ölimmersions-Objektiv (Zeiss, Jena) mit 1,4 numerischer Apertur verwendet. 3 µl einer exponentiell wachsenden Kultur ($OD_{600} \approx 0,3-0,5$) in CM-Glucose oder CM-Arabinose Medium wurden zur Analyse auf Agarose- beschichtete Objektträger (120 µl 2 % Agarose in $H_2O_{bid.}$) getropft oder die Zellen wurden auf dem Objektträger durch Trocknen an der Luft auf dem Objektträger fixiert. Digitale Aufnahmen wurden mit einer hochauflösenden AxioCam MRm (Zeiss, Jena) aufgenommen, welche durch die AxioVision-Software (Zeiss, Jena) gesteuert wurde. Die Nachbearbeitung der Bilder (Bildausschnitt, Kontrastverstärkung, Maßstabsskalierung) erfolgte mit der AxioVision-Software Zen (Zeiss, Jena). Die Bilder wurden als PNG- und JPEG-Dateien für die weitere Bearbeitung abgespeichert. Die Bearbeitung aller Bilder umfasste Helligkeit-, Kontrast- und Gammakorrekturen.

4.3.1 Chlorazol Black E-Färbung

Drei bis acht Tage nach der Pflanzeninfektion wurden die Blätter ca. 1 cm unter der Injektionsstelle abgetrennt. Es folgte eine Entfärbung der Blattschnitte für 3 bis 4 Tage in 100 % Ethanol. Nachdem die Schnitte in $H_2O_{bid.}$ gewaschen wurden, erfolgte die Inkubation in 10 %-iger KOH bei 90 °C (max. 6 Stunden). Danach wurde die KOH-Lösung vorsichtig abpipettiert und die Chlorazol Black E-Lösung aufpipettiert. Es folgte eine Inkubation ÜN bei 60 °C und danach die Entnahme der Färbelösung. Die Präparate können in 50 % Glycerin aufbewahrt werden.

Chlorazol Black E-Lösung:

0,03 % f. c. Chlorazol (Sigma) in $H_2O_{bid.}$,

Glycerin und Milchsäure im Mischverhältnis 1:1:1.

4.3.2 WGA-AF488 / Propidium Iodid Färbung

Drei bis acht Tage nach der Pflanzeninfektion wurden die Blätter ca. 1 cm unter der Injektionsstelle abgetrennt. Es folgte eine Entfärbung der Blattschnitte für 3 bis 4 Tage in 100 % Ethanol. Nachdem die Schnitte in $H_2O_{bid.}$ gewaschen wurden, erfolgte die Inkubation in 10 %-iger KOH bei 90 °C (max. 6 Stunden). Danach wurde die KOH-Lösung vorsichtig abpipettiert und die WGA-AF488 / Propidium Iodid-Lösung für 30 Minuten auf die Proben gegeben. Danach wurde das Blattmaterial mit 1xPBS gewaschen und anschließend auf einem Objektträger gelegt.

WGA-AF488/ PI-Lösung:

1 µg/ml Propidium Iodid

10 µg/ml WGA-AF488

0,02% Tween 20

4.4 Molekularbiologische Standardmethoden

4.4.1 Handhabung von DNA

Standardtechniken zur Handhabung von DNA, oder Klonierungstechniken sind bei Ausubel., 1987 und Sambrook *et al.*, 1989 beschrieben.

Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentration von Nukleinsäuren wurde photometrisch bestimmt. Bei einer Wellenlänge von 260 nm entspricht ein Absorptionswert von 1, bei einer Schichtdicke von 1 cm einer Konzentration von etwa 50 µg/ml doppelsträngiger DNA und 33 µg/ml einzelsträngiger DNA, bzw. 40 µg/ml RNA. Als Maß für die Reinheit der Desoxyribonukleinsäuren diente der Quotient aus den optischen Dichten bei den Wellenlängen 260 nm (A₂₆₀) und 280 nm (A₂₈₀). Für reine DNA sollte er bei etwa 1,8 liegen. Niedrigere Werte deuten Verunreinigungen mit Proteinen, höhere Werte zeigen Verunreinigungen mit Salzen oder Zuckern an. Alle Messungen erfolgten an einem Nanodrop 2000-Spektralphotometer (NanoDrop-Technologies).

Restriktion von DNA

Zur Spaltung von doppelsträngiger DNA wurden TypII-Restriktionsendonukleasen unter den vom Hersteller empfohlenen Pufferbedingungen eingesetzt. Ein typischer analytischer Ansatz enthielt: 0,5 µg DNA, 0,5 U Restriktionsenzym (New England Biolabs) im empfohlenen 10x Puffer in einem 10 µl Gesamtansatz. Nach einer Inkubationszeit von einer Stunde bei 37 °C (bzw. der für das jeweilige Enzym optimalen Temperatur) wurden dem Ansatz 2 µl 6x Auftragspuffer zugesetzt und die Reaktionsprodukte wurden auf einem 2 % oder 0,8 % Agarose-Gel analysiert.

Dephosphorylierung linearer DNA-Fragmente

5'-terminale Phosphatgruppen können mit Hilfe der Antarktischen Phosphatase abgespalten werden. Da DNA-Stränge ohne 5'-terminale Phosphatgruppen nicht religieren können, kann so die Selbstligation von linearisierter Plasmid-DNA verhindert werden. Ein typischer Reaktionsansatz enthielt: 1 µg linearisierte Plasmid-DNA, 1 U Antarktische Phosphatase (New England Biolabs) in 20-50 µl Antarktische Phosphatase Puffer. Der Ansatz wurde für 30 Minuten bei 37°C inkubiert und anschließend für 10 Minuten bei 65 °C hitzeinaktiviert. Die behandelte Plasmid-DNA konnte direkt in einen Ligationsansatz eingesetzt werden.

Ligation von DNA-Fragmenten

Doppelsträngige DNA-Fragmente wurden mit Hilfe der T4 DNA-Ligase kovalent miteinander verknüpft. Das zu klonierende Fragment wurde in der Regel in drei- bis sechs-fach molarem Überschuss gegenüber der linearisierten, dephosphorylierten Plasmid-DNA eingesetzt. Ein typischer Reaktionsansatz enthielt: 30-50 ng linearisierte, dephosphorylierte Plasmid-DNA, dreifach molarer Überschuss an linearem Fragment, 1 U T4 DNA-Ligase (New England Biolabs) in 20 µl T4 DNA-Ligase Puffer. Der Ansatz wurde entweder für zwei Stunden bei Raumtemperatur oder über Nacht bei ca. 16 °C inkubiert. Der Ligationsansatz konnte direkt in chemisch kompetente *E. coli* TOP10 Zellen transformiert werden.

Gibson Ligation

Die Gibson Assembly Methodik (Gibson *et al.*, 2009) erlaubt den Zusammenbau von mehreren DNA Fragmenten. Es ist möglich, mehrere überlappende DNA Fragmente in einer einzigen Reaktion zu verknüpfen. Hierfür sind Primer notwendig, die ein Fragment amplifizieren und dabei einen Überhang (20 – 40 bp) zu dem angrenzenden DNA Fragment erstellen. Durch die im Master Mix enthaltene T5-Exonuklease entsteht während der Gibson-Reaktion ein 3'-Überhang, der kompatible Fragmente als *sticky ends* durch Hybridisierung der homologen Bereiche verbindet. Die enthaltene DNA Polymerase füllt anschließend die Lücken zwischen den gebundenen Fragmenten zu einem vollständigen Doppelstrang auf. Als letztes fügt die DNA-Ligase die aufgefüllten Doppelstränge zusammen. Durch das Design der Primer-Paare lassen sich einfach Bereiche deletieren, oder zusätzliche Restriktionschnittstellen einbringen.

Ein typischer Reaktionsansatz enthielt 5 µl DNA (Gesamtmenge aller Fragmentstücke 20-200 ng) mit 15 µl Master Mix

Der Ansatz wurde für eine Stunde bei 50 °C inkubiert. Die so behandelte DNA konnte direkt in chemisch kompetente *E. coli* TOP10 Zellen transformiert werden.

5X ISO Puffer:

1 ml 1 M Tris-HCl pH 7.5
 50 µl 2 M MgCl₂
 20 µl 100 mM dGTP
 20 µl 100 mM dATP
 20 µl 100 mM dTTP
 20 µl 100 mM dCTP
 100 µl 1 M DTT
 0.5 g PEG-8000
 100 µl 100 mM NAD
 Mit ddH₂O auf 2 ml auffüllen
 320µl Aliquots bei -20°C einfrieren

Master Mix:

320 µl 5x ISO Puffer
 0.64 µl 10 U/µl T5 Exonuklease
 20 µl 2 U/µl Phusion Polymerase
 160 µl 40 U/µl Taq Ligase
 Mit ddH₂O auf 1,2 ml auffüllen
 15 µl Aliquots bei -20°C einfrieren

4.4.2 Isolierung von Nukleinsäuren

Minipräparation von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus *E.coli* erfolgte durch „Lyse durch Kochen“ nach Sambrook *et al.*, 1989. 1,5 ml einer *E. coli* Übernachtskultur wurden 60 s bei 13.000 Upm (Heraeus Biofuge 15) pelletiert. Das Zellpellet wurde in 300 µl STET resuspendiert, nach Zugabe von 30 µl Lysozym-Lösung kräftig geschüttelt. Nach einem Hitzeschock (1 min, 95°C) wurden die lysierten Zellen und die denaturierte genomische DNA 15 min bei 13000 Upm abzentrifugiert (Heraeus Biofuge 15) und danach mit einem sterilen Zahnstocher aus der wässrigen Lösung entfernt. Die Reinigung der Plasmid-DNA erfolgte durch Fällung mit 40 µl 3 M Na-Acetat (Minilysat III), pH 4,8 und 400 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 50 µg/ml RNase A aufgenommen und bei 50°C gelöst. Mit dieser Methode gelang es routinemäßig, aus 1,5 ml Übernachtskultur etwa 50 µg Plasmid-DNA zu isolieren.

STET-Puffer:

10 mM Tris-HCL, pH 8,0
 100 mM NaCl
 1 mM Na₂-EDTA
 5% (v/v) TritonX-100
 in H₂O_{bid.}

Lysozym-Lösung:

10 mg/ml Lysozym in 1xTE-Puffer

Minilysat(III)-Lösung:

3 M NaAc, pH 4,8 in H₂O_{bid.}

Isolierung genomischer DNA aus *U. maydis* mit Hilfe der „alternativen Präparations-Methode“

Für die Isolierung genomischer DNA aus *Ustilago maydis* (Lu *et al.*, 2018) wurden 2,5 ml Kulturen über Nacht in Yeps_{light} bei 28 °C im Roller kultiviert, danach in 2 ml Reaktionsgefäße gegeben (Glaskugeln vorlegen), abzentrifugiert (1 min, 13.000 Upm, Heraeus Biofuge pico) und der Überstand wurde abgenommen. Zum Pellet wurden 500 µl Lysis-Puffer (50:50 mit 1xTE-Puffer gemischt) gegeben und die Zellen wurden 10-15 min auf einem Vibrax-Schüttler (1400 Upm) aufgeschlossen. Danach wurden die Zelltrümmer zuerst 15 min bei 65 °C aufgekocht und danach für 5 min auf Eis inkubiert. Zur Aussalzung der Proteine wurden 100 µl 8 M Kaliumacetat zugegeben, gut gevortext oder 8-10 Mal invertiert und anschließend die Zelltrümmer bei 14.000 Upm für 15 min abzentrifugiert (Raumtemperatur, Eppendorf Centrifuge 5417R). 500 µl des Überstands wurden in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß gegeben, in dem bereits 300 µl Isopropanol vorgelegt worden waren. Nach sehr gutem Mischen (8-10x invertieren oder vortexen) wurde die DNA bei einem weiteren Zentrifugationsschritt (15 min, 13.000 Upm, Raumtemperatur, Heraeus Biofuge pico) ausgefällt. Anschließend wurde das Pellet einmal mit 500 µl 70 % Ethanol gewaschen (5 min, 13.000 Upm) und danach erneut für ca. 5 sec abzentrifugiert, um restliche Flüssigkeiten zu entfernen. Das Pellet wurde 3- 5 min bei Raumtemperatur getrocknet und danach in 50 µl TE-Puffer mit 50 µg/ml RNase A aufgenommen. Anschließend wurde die DNA bei 50 °C und 850 Upm für 20 min in einem Eppendorf-Thermomixer gelöst. Zur Qualitätskontrolle wurde 1 µl der genomischen DNA auf ein 0,8 %-iges Agarosegel aufgetragen und analysiert.

***Ustilago* Lysis-Puffer:**

1 % (w/v) SDS

50 mM Tris-Cl, pH 7,5

50 mM Na₂-EDTA, pH 8,0

in H₂O bid.

RNA-Isolierung nach der Trizol –Methode

Diese Methode orientiert sich am Protokoll der Firma Invitrogen und wurde zur Präparation von Gesamt-RNA aus *U. maydis* Flüssigkulturen verwendet. 10 ml Flüssig-Zellkultur ($OD_{600} \approx 0,8$) wurden pelletiert (3.500 Upm, 5 min, RT), der Überstand verworfen und das Pellet in flüssigem Stickstoff schockgefroren (ggf. Aufbewahrung bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$). Auf das tiefgefrorene Zellpellet wurde 1 ml Trizol pipettiert, dieser Ansatz kurz gevortext und nach Zugabe von ca. 0,3 g Glasperlen für 5 min auf einer Kugelmühle (Retsch) bei 25 Hz aufgeschlossen. Nach Inkubation bei RT für 5 min wurden die ersten Zelltrümmer abzentrifugiert (13.000 Upm, 10 min). Der Überstand (ca. 1 ml) wurde in ein frisches Reaktionsgefäß mit 200 μl Chloroform überführt, kräftig geschüttelt und 3 min bei RT inkubiert. Nach Zentrifugation (13.000 Upm, 15 min) wurde die wässrige Phase abgenommen, in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und nach Zugabe von 500 μl Isopropanol 10 min bei RT gefällt. Nach erneuter Zentrifugation (13.000 Upm, 10 min) wurde die pelletierte RNA mit 70 % Ethanol gewaschen und erneut zentrifugiert (13.000 Upm, 5 min). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet für 5 min bei RT getrocknet, anschließend in 50 μl Nuclease-freiem H_2O (Ambion) aufgenommen und für 20 min bei $55\text{ }^{\circ}\text{C}$ resuspendiert. Eine Quantitäts- und Qualitätskontrolle erfolgte durch photometrische Messung am NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer sowie durch Analyse auf einem Agarose-Gel.

4.4.3 Auftrennung und Nachweis von Nukleinsäuren

Nicht-denaturierende Agarose-Gelelektrophorese

In Agarose-Gelen können Nukleinsäuren in einem elektrischen Feld gemäß ihrer Größe aufgetrennt werden (Sambrook *et al.*, 1989). Standardmäßig wurden Gele mit 0,8 % (w/v) Agarose hergestellt. Für die Auftrennung von DNA-Fragmenten bis zu einer Größe von etwa 500 bp wurden 2 %-ige Agarose- Gele verwendet. Die entsprechende Menge an Agarose wurde in 0,5xTBE-Puffer aufgekocht, nach Abkühlung auf ca. $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ mit Ethidiumbromid versetzt (f.c. 0,5 $\mu\text{g/ml}$) und in einen Elektrophorese- Schlitten gegossen. Nach Erstarren des Gels wurde die Gelkammer mit 0,5x TBE-Puffer gefüllt. Die Nukleinsäuren wurden vor dem Auftragen im Verhältnis 6:1 mit nativem Auftragspuffer versetzt. Die Elektrophorese erfolgte bei einer konstanten Spannung von 5-10 V/cm. Die Banden konnten anschließend im UV-

Durchlicht (254 nm) mit einer „eagle eye“-Apparatur (Stratagene) oder einem EBOX Video- Dokumentationssystem (Peqlab) detektiert und auf Thermalpapier photographisch festgehalten werden. Für die Isolierung von Fragmenten aus Agarosegelen wurde das Gel bei Bedarf nach Beendigung der Elektrophorese 30 min in einem GelStar™ (Lonza)-Färbebad inkubiert.

5xTBE-Puffer:

500 mM Tris-Borat, pH 7,9

10 mM Na₂-EDTA

in H₂O_{bid}.

6x Auftragspuffer, nativ:

50 % (w/v) Sucrose

0,25 % (w/v) Bromphenol-Blau

0,25 % (w/v) Xylencyanol FF

in TE-Puffer

Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen

Für die Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wurde das JETSORB®-Kit (Genomed) verwendet. Hierbei wird die DNA unter Hochsalzbedingungen an eine Silikat-Matrix gebunden, von Verunreinigungen frei gewaschen und schließlich unter Niedrigsalzbedingungen von der Matrix eluiert. Die Isolierung wurde nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Mit dieser Methode konnten DNA-Fragmente einer Länge von 200 bp bis 5 kb aus Agarosegelen zu etwa 80 – 90 % isoliert werden.

Transfer von DNA (Southern-Blot)

Der Transfer der aufgetrennten DNA- Fragmente aus einem Agarosegel auf eine Nylonmembran erfolgte mittels Kapillar- Blot. Hierbei wird die Transfer- Lösung (20xSSC) 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 darüberliegende Nylonmembran (Hybond-N+, Amersham Pharmacia Biotech). Vor dem Transfer wurde das Agarosegel für jeweils 15 min in 0,25 M HCl, DENAT- und RENAT- Lösung inkubiert, um u.a. einen Teil der Purine abzuspalten und damit den Transfer großer DNA-Fragmente zu erleichtern. Der Kapillar-Blot erfolgte in der Regel über Nacht, mindestens jedoch für 2 h. Anschließend wurde die Membran kurz getrocknet und die DNA durch UV-Bestrahlung (Stratalinker 1800, Stratagene) fixiert. (Modifiziert nach (Southern, 1975))

Aufbau des Blots von unten nach oben:

Whatman 3MM-Brücke zum Pufferreservoir

Agarosegel

Nylonmembran (Hybond N+)

3 Lagen Whatman 2 MM

Stapel Papierhandtücher

DENAT-Lösung:

1,5 M NaCl

0,4 M NaOH

in 1l H₂O_{bid.}

RENAT-Lösung:

1,5 M NaCl

282 mM Tris-HCl

218 mM Tris-Base

in 1l H₂O_{bid.}

SSC (20x):

3,0 M NaCl

0,3 M Natrium Citrat * 2H₂O

in 1l H₂O_{bid.}, pH 7,0

Der spezifische Nachweis immobilisierter Nukleinsäuren (DIG)

Gen-spezifische Sonden wurden durch den Einbau von Digoxigenin-11-dUTP (DIG) in die Sonden- DNA hergestellt.

Ein typischer Ansatz für die Markierungsreaktion enthielt:

6,6 µl DNA (0,5-1 µg in H₂O_{bid.})

1 µl 10xDIG-Mix (Jena Bioscience, siehe Herstellerangaben)

1 µl 10x Octadeoxyribonukleotide in Markierungspuffer (New England Biolabs)

1 µl BSA (10 µg/µl)

0,4 µl DNA Polymerase I large (Klenow)-Fragment (New England Biolabs)

Vor der Markierungsreaktion wurde die Sonden-DNA zunächst für 10 Minuten bei 95 °C in einem Eppendorf-Heizblock denaturiert. Anschließend wurde das Gemisch über Nacht, mindestens jedoch eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Statt Hitzeinaktivierung und anschließender Fällung wurde das Gemisch mit 1 ml Southern-Hybridisierungspuffer gelöst und 10 Minuten bei 95 °C in einem Eppendorf-Heizblock oder einem Wasserbad denaturiert. Zur Absättigung der unspezifischen Bindestellen der Nylon-Membran wurde diese mit Southern- Hybridisierungspuffer für 15-30 Minuten bei 65 °C in einer Hybridisierungsröhre prä-inkubiert. Der Puffer wurde anschließend verworfen, die denaturierte Sonde (in 10 ml Southern-

Hybridisierungspuffer) hinzugegeben und über Nacht im Hybridisierungssofen bei 65 °C hybridisiert. Anschließend wurde die Membran für je 15 Minuten bei 65 °C mit 2xSSPE + 0,1 % (v/v) SDS, 1xSSPE + 0,1 % (v/v) SDS und 0,1xSSPE + 0,1 % (v/v) SDS gewaschen. Für die Detektion wurde die Membran bei RT in der Hybridisierungsröhre in den folgenden Lösungen inkubiert: 5 Minuten DIG-Waschpuffer, 30 Minuten DIG2-Lösung, 60 Minuten Antikörper-Lösung (1:10.000 Anti-Digoxigenin-Fab-Fragmente (Roche) in DIG2-Lösung), und zwei Mal 15 Minuten in DIG-Waschpuffer. Anschließend wurde die Membran für 5 Minuten in DIG3-Lösung äquilibriert und für 5 Minuten in der Chemilumineszenz-Lösung (1:500 CDP-Star Lösung in DIG3) inkubiert. Die Membran wurde luftblasenfrei auf eine Detektionsplatte gelegt und leicht mit CDP-Star Lösung befeuchtet. Die Hilfe der Chemilumineszenz-Anlage Odyssey Fc (Li-Cor) wurde eine digitalen Aufnahme des Blots über eine CCD-Kamera gemacht. Mit der Image Studio Software (Li-Cor) konnten digitale Aufnahmen bearbeitet oder für eine weitere Bearbeitung exportiert werden.

DIG 1:

0,1 M Maleinsäure
0,15 M NaCl
in 1l H₂O_{bid.}, pH 7,5

DIG 2:

10 % (v/v) Blockierungslösung in DIG 1
in 1l H₂O_{bid.}

DIG 3:

0,1 M Maleinsäure
0,1 M NaCl
0,05 M MgCl₂
in 1l H₂O_{bid.}, pH 9,5

DIG-Waschpuffer:

0,3 % (v/v) Tween-20 in DIG 1

Southern-Hybridisierungspuffer:

500 mM Natriumphosphatpuffer, pH 7,0
7 % (w/v) SDS

SSPE:

3 mM NaCl
227 mM Na₂HPO₄*H₂O
20 mM Na₂-EDTA*2 H₂O
in 1l H₂O_{bid.}, pH 7

4.4.4 Proteinpräparation

Proteinpräparation

Um eine schnelle Proteinpräparation durchzuführen wurden 2 ml einer exponentiell wachsenden *Ustilago maydis* Kultur abzentrifugiert. Das Pellet wurde 1:20 in IP Puffer mit 1x PI (Proteaseinhibitoren, Roche) aufgenommen und die Zellen mit Glasbeads im Reaktionsgefäß 15 Minuten bei 4 °C auf dem Vibrax aufgeschlossen. Anschließend

wurden die Zelltrümmer abzentrifugiert (25.000 Upm, 30 Minuten, 4°C). Das Lysat kann dann bei -20 °C gelagert werden. Um eine erfolgreiche Proteinpräparation nachzuweisen, wurde das Lysat 1:4 mit Laemmli-Probenpuffer 3 Minuten bei 85°C aufgeköcht und 18 µl auf einem SDS-Gel analysiert.

Proteinpräparation für Immunopräzipitation

Für eine saubere Proteinpräparation für eine folgende Immunopräzipitation, wurden 100 ml einer exponentiell wachsenden *Ustilago maydis* Kultur geerntet, einmal in PBS gewaschen (3.500 Upm, 6 Minuten) und das Pellet in flüssigem Stickstoff eingefroren. Das Pellet kann anschließend bei -80 °C gelagert werden. Das Pellet wird frisch oder gefroren 1:100 in IP Puffer mit 2x PI resuspendiert und in der Zelmühle (25 Hz, 5 Minuten) aufgeschlossen. Die verwendeten Eisenbecher mit 2 Kugeln müssen vorab mit flüssigem Stickstoff tiefgefroren werden. Daraufhin werden die Zelltrümmer abzentrifugiert (20.000 Upm, 30 Minuten, 4°C) und das Lysat bei -20°C gelagert. Um eine erfolgreiche Proteinpräparation nachzuweisen, wurde das Lysat 1:4 mit Laemmli-Probenpuffer 3 Minuten bei 85°C aufgeköcht und 18 µl auf einem SDS-Gel nachgewiesen.

IP-Puffer:

300 mM NaCl

100 mM Tris, pH 7,5

10 % Glycerol

1 mM EDTA

0,1 % NP-40

Proteinfällung Chloroform-Methanol

Die Proteinprobe wird auf 100 µl mit Wasser aufgefüllt, mit 400 µl Methanol versehen, 10 Sekunden gevortext, anschließend mit 100 µl Chloroform versetzt und wieder 10 Sekunden gevortext. Zu der Probe werden 300 µl Wasser zugegeben, gut gevortext und anschließen bei 4°C abzentrifugiert (13.000 Upm, 3 Minuten). Es entstehen 2 Phasen, von denen die obere verworfen wird. Die Proteine befinden sich in der Interphase, sie darf auf keinen Fall zerstört werden. Erneut wird das Lysat mit 300 µl

Methanol gut gemischt und bei 4°C abzentrifugiert (13.000 Upm, 10 Minuten). Das Protein bildet nun ein Pellet. Der Überstand kann abgenommen werden, das restliche Methanol muss abdampfen, bevor das Pellet in 40 µl 1xLaemmli-Probenpuffer 3 Minuten bei 85°C gelöst werden kann um anschließend 18 µl auf einem SDS-Gel nachzuweisen.

Laemmli-Puffer:

60 mM Tris-HCl, pH 6,8

2% (v/v) SDS

10% (v/v) Glycerin

5% (v/v) β-Mercaptoethanol

0,01% (w/v) Bromphenolblau

4.5 PCR-Methoden

4.5.1 Standard-PCR-Ansätze

Ein typischer PCR-Ansatz enthielt etwa 10 ng Template-DNA, die beiden Oligonukleotide in einer Endkonzentration von 1 µM, dNTPs in einer Endkonzentration von 200 µM (d. h. je 200 µM dATP, dCTP, dGTP und dTTP) in PCR- Puffer. Durch eine PCR bietet sich die Möglichkeit, definierte DNA-Bereiche selektiv zu amplifizieren. Hierfür sind zwei Oligonukleotide (Primer) nötig, von denen einer zum 3' Bereich der gewünschten Sequenz, der andere zum Gegenstrang des 5'-Bereichs komplementär bindet. Alle PCR Reaktionen wurden in einem PTC-100 Thermal Cycler (MJ Research) oder einem T100 Thermal Cycler (BioRad) durchgeführt. (Modifiziert nach (Innis *et al.*, 1990))

PCR-Ansatz:

100 ng Matritzen-DNA

2 U Taq-DNA-Polymerase

1 µl 10 mM dNTPs

0,5 µl je Primer (50 pmol/µl)

in 50 µl PCR-Puffer

Initiale Denaturierung: 95 °C / 10 min

Amplifikation: 95 °C / 1 min

(30 Zyklen) x °C / 1 min

72 °C / y min

Finale Elongation: 72 °C / 10 min

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

Phusion/Q5-Polymerase-Protokoll

Für die Amplifikation genomischer Fragmente von *U. maydis* oder die Amplifikation von Fragmenten, welche für Klonierungsschritte benötigt wurden, wurde die Phusion oder Q5 Polymerase (NEB) verwendet, welche sich durch eine hohe Prozessivität und niedrige Fehleranfälligkeit auszeichnen.

PCR-Ansatz:

100ng Matrizen-DNA (genomisch) bzw. 5ng Matrizen-DNA (Plasmid)

1 U Polymerase

1 μ l 10 mM dNTPs

0,3 μ l je Primer (100 pmol/ μ l)

10 μ l empfohlener Puffer (5x)

mit H₂O auf 50 μ l Gesamtvolumen auffüllen

Initiale Denaturierung: 98 °C / 30 sec

Amplifikation: 98 °C / 10 sec

(30-33 Zyklen) x °C / 15 sec

72 °C / y sec

Finale Elongation: 72 °C / 10 min

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

ORF-PCR

Bei einer ORF-PCR werden kleine Fragmente aus dem offenen Leserahmen eines Gens amplifiziert. Ziel ist es in Transformanten von Deletionskonstrukten oder Integrationen von Fusionskonstrukten zu überprüfen, ob der ORF noch vorhanden ist oder ein Rekombinationsevent stattgefunden hat. Die Oligonukleotide sollten optimalerweise einen Bereich von 100-200 bp abdecken. Bei einer PCR zur

Überprüfung eines integrierten Fusionskonstruktes, sollten die gewählten Oligonukleotide optimalerweise aus dem Fusionskonstrukt in das zu überprüfende Gene amplifizieren und das zweite Oligonukleotid außerhalb der eingesetzten Flanke binden. Zur internen Kontrolle bietet sich ein zweites Primerpaar an, das einen etwas größeren oder kleineren Bereich amplifiziert. Der Ansatz und das Programm erfolgte analog zu „Phusion/Q5-Polymerase-PCR“, jedoch enthielt jede Reaktion vier statt zwei Oligonukleotide. Die Produkte müssen auf einem 2 % Agarose-Gel aufgetrennt werden.

4.5.2 PCR-Generierung von Gen-Deletions-Konstrukten für *U. maydis*

Mit dieser Methode (Kämper, 2004) können gezielt offene Leseraster von Genen bekannter Sequenz in *U. maydis* deletiert werden. Man bedient sich hierbei des Mechanismus der homologen Rekombination über die angrenzenden genomischen Flanken. Eine Klonierung der Fragmente ist dabei nicht notwendig. Prinzipiell erfolgt eine PCR-Amplifikation des 5'- und 3'- gelegenen Bereichs des zu deletierenden Gens. Die Fragmente haben dabei etwa eine Länge von 1 kb. Über geeignete Primer wurden an den, dem offenen Leseraster zugewandten Enden der Amplifikate SfiI-Restriktionsschnittstellen eingebracht. Nach Restriktion der PCR-Produkte wird über die SfiI-Restriktionsschnittstellen eine SfiI geschnittene Resistenzkassette direkt zwischen die amplifizierten Flanken ligiert. Mit einer weiteren PCR mit den jeweiligen Außenprimern der vorab generierten Flanken wird das komplette Deletionskonstrukt amplifiziert, aufgereinigt und für die Transformation in *U. maydis* verwendet. Für alle PCR-Amplifikationen wurde Phusion HighFidelity DNA Polymerase oder die Q5-Polymerase (NEB) nach dem Herstellerprotokoll verwendet. Alle Änderungen im Bezug auf den in (Kämper, 2004) publizierten Ablauf sind im Folgenden dargestellt.

PCR-Amplifikation der Flanken: Amplifikation der linken Flanke (left border: lb): Ein Außenprimer lb1 und ein Innenprimer lb2 mit SfiI-Restriktionsschnittstelle wurden zusammen mit genomischer DNA von *U. maydis* als Matrize in einer PCR-Reaktion eingesetzt. Die Produkte wurden auf einem Agarosegel überprüft und das gewünschte DNA Fragment, d.h. die linke (5'-) genomische Flanke des zu deletierenden Gens, über QiaQuick PCR Purification Säulen (Qiagen) aufgereinigt.

Amplifikation der rechten Flanke (right border: rb): Ein Außenprimer rb1 und ein Innenprimer rb2 mit SfiI-Restriktionsschnittstelle wurden zusammen mit genomischer DNA von *U. maydis* als Matrize in die PCR-Reaktion eingesetzt. Die Produkte wurden

auf einem Agarosegel überprüft und das gewünschten DNA-Fragment, d.h. die rechte (3'-) genomische Flanke des zu deletierenden Gens, über QiaQuick PCR Purification Säulen (Qiagen) aufgereinigt. Für die PCR wurden Bedingungen gewählt, die sich aus den Parametern des Herstellerprotokolls und der Primer ergeben (i.d.R. 15 s/kb Extensionszeit, 30-35 Zyklen). Die eluierten Flanken wurden anschließend mit SfiI nachgeschnitten. (20 Units; 2 h, 50 °C, Gesamtvolumen: 20-50 µl). Hiernach folgte eine Aufreinigung der restringierten Flanken über QiaQuick PCR Purification MinElute-Säulen (Qiagen). Im Anschluß erfolgte die Ligation der Flanken mit der mit SfiI-restringierten Resistenzkassette. Nach zweistündiger Ligation bei RT wurde der Ligationsansatz über ein 0,8 %iges TBE-Agarosegel aufgetrennt, die entsprechende Ligation-Bande aufgereinigt und direkt in pCR2.1-Vektor („TOPO“, Invitrogen) ligiert. Oder als Matrize in die abschließende PCR eingesetzt. Hierbei wurden *nested* Primer verwendet, um eine effiziente Amplifikation des Deletionskonstruktes zu gewährleisten. Nach Aufreinigung über QiaQuick PCR Purification MinElute-Säulen (Qiagen) wurde das Konstrukt in einen pCR2.1-Vektor („TOPO“, Invitrogen) ligiert, um es auszubewahren.

4.5.3 PCR-Generierung von Fusionskonstrukten für *U. maydis*

Die Herstellung von Fusionskonstrukten am C-Terminus erfolgte analog zur Herstellung von Deletions-Konstrukten (Kämper, 2004). Die linke Flanke muss jedoch ausgehend vom StopCodon des zu fusionierenden ORFs 1 kb in 5'-Richtung orientiert sein. Das Stop-Codon muss beim Design der Oligonukleotide ausgespart werden. Zur Verwendung des pUMa-Kassettensystems mit SfiI-Schnittstellen müssen 3 weitere Nukleotide zwischen dem ORF und der SfiI-Schnittstelle eingefügt werden, um den Leserahmen beizubehalten. Die linke Flanke, die den zu fusionierenden ORF enthält, muss sequenziert werden, um mögliche Mutationen aufgrund der durchgeführten PCR auszuschließen. Die rechte Flanke und sämtliche weitere Klonierungsschritte sind in 4.4.2. beschrieben.

4.5.4 DNase I-Behandlung und Reverse Transkription (für Real-time PCR)

Für die reverse Transkription wurde zunächst die isolierte Gesamt-RNA mit Turbo DNase I (Ambion) behandelt, um DNA-Kontaminationen zu entfernen. Hierbei wurde nach Herstellerprotokoll vorgegangen. Für die Reverse Transkription wurde das

RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit der Firma Thermo Fischer nach Herstellerprotokoll verwendet. Für die reverse Transkription von Gesamt-RNA, die aus *U. maydis* Flüssigkulturen extrahiert wurde, wurden 2,2 µg DNase-behandelter RNA eingesetzt und zusammen mit Oligo(dT)Primern, den entsprechenden Puffern und Enzymgemischen (siehe Herstellerprotokoll) für die Erststrang-cDNA-Synthese bei 42 °C für 60 min inkubiert.

4.5.5 Real-time PCR (RT PCR)

Real-time PCR wurden mit Hilfe des MESA GREEN qPCR Master Mix plus für SYBR Assay + Fluorescein (Eurogentech) verwendet und nach Herstellerangaben durchgeführt. Für die PCR Reaktion wurde 1 µl der synthetisierten cDNA eingesetzt (s.o.). Die Reaktionen erfolgten in einem BioRad CFX96-System unter der Verwendung des folgenden Programms:

Initiale Denaturierung:	95 °C / 5 min
Amplifikation:	95 °C / 15 sec
(45 Zyklen)	62 °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 Program Bio-Rad Gene Expression Macro der Firma Biorad.

4.6 Biochemische Methoden

4.6.1 Co-Immunopräzipitation

50 µl Pierce™ Anti-HA-gekoppelte magnetische Beads (Thermo Scientific) wurden dreimal mit PBS (1 ml) und anschließend mit 1 ml IP-Puffer mit 1 x PI gewaschen. Nach Zugabe von 500 µl Proteinlysat aus 4.4.1., erfolgte die Immunopräzipitation (IP) über Nacht bei 4 °C auf einem Drehrad. Je nach Protein wurden die Beads 5 – 8-mal mit je 1 ml IP-Puffer mit 1xPI bei 4 °C gewaschen. Hierfür wurde eine DyneMag™-2 Magnet (life technologies) verwendet. Vor dem letzten Waschschrift wurden die Beads in 500 µl PBS aufgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Das alte

Reaktionsgefäß wurde erneut mit 500 µl PBS ausgewaschen und mit dem vorherigen Waschschrift vereint. Der gesamte Überstand wurde abgenommen und die Beads in 40 µl 1x Laemmli-Probenpuffer 3 min bei 85 °C aufgeköcht. Das aufgeköchte Lysat wurde abgenommen und kann so bei -20 °C aufbewahrt werden. 18 µl der aufgeköchten Probe wurden auf ein 10 %-iges Polyacrylamidgel aufgetragen (4.6.2). Als Inputkontrolle wurde jeweils 1/10 der für die IP eingesetzten Proteinmenge aufgetragen.

Mit Hilfe von Pierce™ ChIP-geeigneten Protein A/G magnetischen Beads (Thermo Scientific™) konnten spezifische Antikörper (wie Myc oder GFP) an die Beads gekoppelt werden. Hierfür wurden 500 µl Lysat mit 5 µl Antikörper versetzt und über Nacht bei 4°C auf einem Drehrad gemischt. Am nächsten Tag wurde das Lysat mit zugegebenem Antikörper für 2 weitere Stunden mit 30 µl gewaschenen Beads (wie oben beschrieben) erneut bei 4°C auf dem Drehrad inkubiert. Alle weiteren Waschschriffe so wie die Elution liefen wie oben beschrieben bei 4°C ab.

Eine sanftere Elution am Ende der Co-IP ist für manche Antikörperkombinationen und für nachfolgende LC-MS von Vorteil. Hierbei werden die an die Beads gekoppelten Antikörper nicht miteluiert und verursachen bei den folgenden Applikationen keine Kreuzreaktionen. Für die Elution wurden die Beads nach der Immunopräzipitation in 100 µl TE 1% SDS aufgenommen und bei 65°C für 10 min und 950 Upm auf einem Heizblock inkubiert. Der Überstand wurde abgenommen und der Elutionsschrift wiederholt, hierbei wurden die Eluate vereint. Anschließend kann das Eluat mittels Chloroform-Methanol Proteinfällung 4.4.4 präzipitiert werden.

4.6.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese von Proteinen

Hierfür wurde die Methode der diskontinuierlichen SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) angewendet (Laemmli, 1970). Als Laufkammer wurde eine Mini Protean II Apparatur (Biorad) benutzt. Die Auftrennung erfolgte bei 20 mA (pro Gel) für 25-30 min bis die Auftragspufferbande die Trenngelschicht erreicht hatte. Die Auftrennung im Trenngel erfolgte bei 40 mA (pro Gel) für 45 min oder bei 30 mA (pro Gel) für 60 min. Als Größenstandard für die Proteingele wurde der Pageruler prestained Proteinmarker (Fermentas/Thermo) verwendet.

Laufpuffer für Protein-Gele

25 mM Tris-HCl, pH 8,8
200 mM Glyzin
0,1% (w/v) SDS in H₂O_{bid.}

Sammelgel (5%)

0,333 ml Acrylamid/Bisacrylamid (30%)
0,25 ml Sammelgel-Puffer, pH 6,8
1,385 ml H₂O_{bid.}
20 µl 10% SDS
10 µl 10% APS (w/v in H₂O_{bid.})
2 µl TEMED

Sammelgel-Puffer (4x)

55 mM Tris-Base
445 mM Tris-HCl
Mit H₂O_{bid.} angesetzt
und pH-Wert auf 6,8 eingestellt.

Trenngel (10%)

1,667 ml Acrylamid/Bisacrylamid (30%)
1,875 ml Trenngel-Puffer, pH 8,8
1,364 ml H₂O_{bid.}
50 µl 10% SDS
40 µl 10% APS (w/v in H₂O_{bid.})
4 µl TEMED

Trenngel-Puffer (4x)

1,27 M Tris-Base
0,23 M Tris-HCl
Mit H₂O_{bid.} angesetzt
und pH-Wert auf 8,8 eingestellt.

4.6.3 Nachweis von immobilisierten Proteinen - Western Blot (Towbin et al., 1979)

Der Transfer der Proteine aus SDS-Polyacrylamid-Gelen auf eine Nitrozellulose Membran (Hybond-P, Amersham) erfolgte mittels Elektro-Blot in einer Semi-Dry-Blotter-Apparatur, Fastblot B43 (Blot Biometra) für 18 Minuten mit 1 mA pro Gel.

Blot Aufbau:

Anode (+)

eine Lagen Whatman 3 MM (in Fastblotpuffer getränkt)

Nitrozellulose-Membran (10 sec in Methanol gewaschen, mit H₂O gespült)

SDS-Polyacrylamid-Gel

eine Lage Whatman 3 MM (in Fastblotpuffer getränkt)

Kathode (-)

Die Detektion erfolgte in einem ODYSSEY Fc (LI-COR). Für die Bestimmung der Bandenintensität wurde das Programm Image Studio Ver. 5.2 (LI-COR) verwendet.

4.6.4 Chromatin-Isolation und Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP)

Fixierung von Protein-DNA-Interaktionen

Zur Fixierung der zu untersuchenden Protein-DNA-Interaktionen wurden die Zellen für 15 min bei RT mit Formaldehyd behandelt. Dabei wurde 37%iges Formaldehyd unter Rühren tropfenweise bis zu einer Endkonzentration von 1% in eine *Ustilago maydis*-Flüssigkultur gegeben. Zum Stoppen der Fixierungsreaktion wurde Glycin aus einer 2,5 M Stammlösung bis zu einer Endkonzentration von 125 mM zugegeben.

Isolierung von Chromatin aus *Ustilago maydis*

Chromatin wurde aus etwa 50 ml mit Formaldehyd behandelter Flüssigkultur bei $OD_{600} = 0,6-1,0$ durchgeführt. Die fixierten Zellen wurden pelletiert (3.500 Upm, 4 min, Heraeus Varifuge), dreimal mit TBS gewaschen und schließlich in 1,5 ml FA-Lysepuffer mit Proteinase-Inhibitoren (1x Complete von Roche) aufgenommen. Diese Suspension wurde in die mit flüssigem Stickstoff vorgekühlten Metallbecher (10 ml) der Zelmühle überführt, in denen sich zwei kleine Metallkugeln befanden. Die Zellen wurden in der Zelmühle (Retsch MM200) für 5 min bei einer Frequenz von 30 Hz geöffnet. Anschließend wurde der pulverige Zellextrakt auf Eis aufgetaut. Um lösliche Proteine von fixiertem Chromatin zu trennen wurde der Zellextrakt zentrifugiert (14000 Upm, 15 min, 4°C, Eppendorf Centrifuge 5417R). Das Pellet wurde in 1 ml FA-Lysepuffer mit Proteinase-Inhibitoren aufgenommen und sonifiziert, um das Chromatin in Stücke von je 100-1000 Basenpaaren Länge zu brechen. Die Sonifizierung wurde mit einem Ultraschallhomogenisator (Covaris Ultrasonicator S220) am ITG (Institute of Toxicology and Genetics) durchgeführt. Dazu wurde die Suspension in Glasfläschchen (Covaris, 520056) umgefüllt und mit folgenden Einstellungen 3, 5, 10, 15 oder 20 min sonifiziert:

Average Incident Power (Watt)	7
Peak Incident Power (Watt)	140
Duty Factor (percent)	5
Cycles/Burst (count)	200

Nach der Sonifizierung wurden durch Zentrifugation (14000 Upm, 15 min, 4°C, Eppendorf Centrifuge 5417R) Zelltrümmer und nicht aufgeschlossenen Zellen vom nun gelösten Chromatin im Überstand getrennt.

Chromatin-Größenkontrolle

Zur Überprüfung der Effizienz der Sonifizierung und der Chromatinfragmentgröße wurden je 100 µl Chromatinlösung mit 400 µl TE/ 1% SDS versetzt und zur Auflösung der Fixierung über Nacht bei 65°C inkubiert. Im Anschluss wurden 4 µl TE-RNase (50 mg/ml) zugegeben und für 30 min bei 37 °C inkubiert, um störende RNA abzubauen. Dann wurden 50 µl Proteinase K (3,5 mg/ml) zugegeben und 2h bei 37 °C inkubiert. Dadurch werden noch verbliebene Proteinkomplexe und Proteine gelöst. Die verbleibende DNA wurde dann mit dem QiaQuick PCR Purification Kit (Qiagen) aufgereinigt. Anschließend wurden die DNA-Proben in 20 µl TE-Puffer aufgenommen und mit nativem Auftragspuffer vollständig auf ein 1,5 %iges Agarosegel (0,5x TBE) aufgetragen und bei konstanter Spannung (5-10 V/cm) elektrophoretisch aufgetrennt. Dann konnten die DNA-Banden bei UV-Durchlicht (254 nm) mit einem E-BOX Video-Dokumentationssystem (Peqlab) detektiert und auf Thermalpapier fotografisch dokumentiert werden, um so Sonifizier-Intensität und -Dauer resultierenden Fragmentgrößen zuzuordnen.

Zur genaueren Analyse der Fragmentgrößen und Konzentrationsbestimmung wurden die Proben auf einen Agilent DNA 7500 Chip geladen und am Bioanalyzer (Agilent) analysiert.

Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP-Seq)

Für die Chromatin-Immunopräzipitation wurden je 400 µl Chromatinlösung (15 min sonifiziert) verwendet. Die Fragmentgröße betrug dabei 100 bis 300 bp. Dazu wurden 40 µl Pierce™ Anti-HA-gekoppelte magnetische Beads (Thermo Scientific) gegeben, welche zuvor dreimal in FA-Lysepuffer mit Proteinaseinhibitoren gewaschen wurde. Der Ansatz wurde üN bei 4°C unter langsamem Drehen inkubiert. Zur Anreicherung des gebundenen Chromatins wurden die magnetischen Beads mit Hilfe des DyneMag™-2 Magnet (life technologies) mit jeweils 500 µl der folgenden Puffer gewaschen:

3x FA-Lysepuffer mit Proteinase-Inhibitoren

2x FA-Lysepuffer (High Salt)

2x ChIP-Waschpuffer

1x TE

Alle Waschschritte erfolgten bei 4°C.

Anschließend wurden die Agarose Beads in 500 µl TE in ein frisches 1,5 ml Eppendorf-Gefäß transferiert um unspezifisches Chromatin an den Wänden des Gefäßes vom spezifisch gebundenen Chromatin zu trennen. Der Überstand der Proben wurde mittels DyneMag™-2 Magnet so vollständig wie möglich abgenommen und die pelletierten Beads in 100 µl ChIP Elutionspuffer 15 min bei 65°C inkubiert. Die Elutionslösung wurde nach Einsatz des DyneMag™-2 Magnet in ein frisches Eppendorfgefäß transferiert und die pelletierten Beads in 150 µl TE/ 0,67% SDS für weitere 10 min bei 65°C inkubiert. Der resultierende Überstand wurde mit der Elutionslösung kombiniert und üN bei 65°C inkubiert, um die Fixierung aufzuheben. Als Input-Kontrolle wurden 50 µl Chromatinlösung mit 200 µl TE/ 1% SDS versetzt und ebenfalls zur Auflösung der Fixierung üN bei 65°C inkubiert. Die Probe wurde dann mit 4 µl TE-RNase (50 mg/ml) für 30 min bei 37 °C inkubiert, um störende RNA abzdauen. Im Anschluss wurden 50 µl Proteinase K (3,5 mg/ml) zugegeben und weitere 2 Stunden bei 37 °C inkubiert. Dadurch werden noch verbliebene Proteinkomplexe und Proteine gelöst. Die verbleibende DNA wurde mit dem QiaQuick PCR Purification Kit (Qiagen) aufgereinigt. Anschließend wurden die DNA-Proben in 50 µl TE-Puffer aufgenommen. Zur Messung der DNA-Konzentration wurde das Qbit® dsDNA HS Assay Kit von Invitrogen verwendet. Die Proben konnten nun über qRT-PCR (4.5.5) oder mittels NGS (*next generation sequencing*) (4.7.2 und 4.7.3) analysiert werden.

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

10 mM Tris-Cl, pH 7,5
250 mM LiCl
1 mM EDTA
0,5 % Nonidet P40
0,5 % Natriumdeoxycholat

ChIP Elutionspuffer

50mM Tris-Cl, pH 7,5
1 mM EDTA
1% SDS

4.7 Sequenzanalyse

4.7.1 Sequenzierung von Plasmid DNA

Plasmid 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 von allgemeinen oder spezifischen Oligonukleotiden verwendet. Das restliche Volumen wurde mit H₂O_{bid.} 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.

4.7.2 Sequenzierung und Analyse von Chromatin-Immunopräzipitierter DNA

Die Sequenzierung von immunopräzipitierter DNA wurde in Kooperation mit dem Transkriptomanalyse-Labor (TAL) der Universitätsmedizin Göttingen durchgeführt.

Für die Generierung von Bibliotheken aus Chromatin-Immunopräzipitierter DNA wurde das NEB Next Ultra II DNA Library Prep Kit for Illumina (NEB) verwendet, dabei wurde 1 ng angereicherte bzw. Input DNA eingesetzt. Zur Qualitäts- und Größenkontrolle wurde die Bibliotheken auf einem Agilent Bioanalyzer 2100 mit einem High Sensitivity DNA Kit (Agilent) analysiert. Die Konzentration wurde zusätzlich mittels Qubit® dsDNA HS Assay Kit (Life Technologies) bestimmt. Die Sequenzierung erfolgte auf einem HiSeq4000 Instrument (Illumina Inc) mit dem dem HiSeq 3000/4000 SBS Kit (50 Zyklen) im single-ended Betrieb. Dabei wurde ein Minimum von 40 Millionen raw reads für die individuellen Proben generiert.

Die reads wurden anschließend mit Bowtie2 version 2.0.0-beta7 (Langmead und Salzberg, 2012a) auf das *Ustilago maydis* Genom (Ensembl Genomes 33 (Kersey *et*

al., 2018) aligniert. Zur visuellen Darstellung der Peaks wurde der Generic Genome Browser version 2.33 verwendet. Das *peak calling* wurde für beide biologischen Duplikate individuell mit PeakZilla (<https://github.com/steinmann/peakzilla>), GitHub commit version 7167f084e024676bcb34e5b5c3e1281910423c25 durchgeführt. PeakZilla gibt einen Peak score (pz-score) aus, der sich aus der Differenz der auf die Größe der Library normalisierten *read counts* der IP Probe und der Kontrolle, multipliziert mit einem *distribution score* (Dafür wird die Übereinstimmung der beobachteten *read count* Verteilung mit der vom Modell erwarteten Verteilung verglichen) zusammensetzt. (Bardet *et al.*, 2013) Es wurden nur Peaks, die in beiden Duplikaten identifiziert wurden und jeweils einen pz-score von ≥ 102 für bE:HA in UJF104 und ≥ 169 für Clp1:HA in UJU82.8., sowie ≥ 80 für b:HA in UDS1 aufwiesen für weitere Analysen verwendet. Die Zuordnung der Peaks zu Genen erfolgte durch folgende Kriterien. Tandem orientierten Genen wurden alle Peaks im gesamten intergenischen Bereich zugeordnet. Divergente Promotoren wurden verschieden eingeteilt. Bis 2000 bp Abstand der ATGs wurde der gesamte intergenischer Bereich beiden Genen zugeordnet. Von 2000 bis 3000 bp Abstand wurde den Genen jeweils der Bereich 2000 bp vor dem ATG zugeordnet, ab 3000 bp Abstand jedem Gen die Hälfte des intergenischen Bereichs, plus 500 bp. Zur Identifizierung potentieller Binde-Motife wurden Sequenzen der gefilterten Peaks extrahiert und mit der *MEME Suite* mit MEME (Multiple EM for Motif Elicitation) und FIMO (Find Individual Motif Occurrences) analysiert (Bailey *et al.*, 2009).

4.7.3 Sequenzierung und Analyse von isolierter RNA

Für die RNA-Seq (Gesamt-Transkriptom-Shotgun-Sequenzierung) wurden Stämme in CM-Medium mit 1% Glucose über Nacht bei 28°C auf $OD_{600} = 0.6$ angezogen und mit CM 1% Arabinose gewaschen und anschließend 5 Stunden induziert. Die Zellen wurden geerntet und in Flüssigstickstoff eingefroren. RNA wurde wie beschrieben extrahiert (4.4.2).

Die Sequenzierung von RNA wurde in Kooperation mit dem Transkriptomanalyiselabor (TAL) der Universitätsmedizin Göttingen durchgeführt.

Zur mRNA Anreicherung wurde das NEB Next Poly(A) mRNA Magnetic Isolation Module (NEB) verwendet. Es wurden 5 μ g Gesamt-RNA eingesetzt. Strangspezifische cDNA Bibliotheken wurden mit dem NEBNext Ultra directional DNA library preparation

kit for Illumina (NEB) erstellt. Zur Größen- und Qualitätskontrolle wurden die Bibliotheken mit einem Agilent High Sensitivity RNA Kit auf dem Agilent Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies) analysiert. Konzentrationsbestimmungen wurden zusätzlich mit dem Qubit® dsDNA HS Assay Kit (Life Technologies) durchgeführt. Die Sequenzierung erfolgte auf einem HiSeq4000 Instrument (Illumina Inc) mit dem HiSeq 3000/4000 SR Cluster Kit für Cluster-Generierung und dem HiSeq 3000/4000 SBS Kit (50 Zyklen) im single-ended Betrieb. Dabei wurde ein Minimum von 15 Millionen raw reads für alle individuellen Proben generiert. Die reads wurden anschließend mit STAR: Version 2.4.1 (Dobin *et al.*, 2013) bzw. mit Subread Version 1.4.3-p1 (Liao *et al.*, 2013) auf das *Ustilago maydis* Genom (Ensembl Genomes 33 (Kersey *et al.*, 2018)) aligniert. Read counts und RPM (*reads per million*) wurden mit benutzerdefinierten Python-Skripten (Florian Finkernagel, IMT Marburg) berechnet. Differentielle Expression wurde mit DESeq2 (Love *et al.*, 2014) bei einer FDR (*false discovery rate*) *threshold* von 0.015 und einem \log_2 *fold change threshold* von eins bzw. zwei festgelegt.

4.7.4 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.

ELM – *The Eukaryotic Linear Motif resource for Functional Sites in Proteins*, zur Motivsuche in Proteinen.

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

T-Coffee - *Multiple Sequence Aligning Tool*
(<http://tcoffee.org.cat/apps/tcoffee/do:regular>)

Tool Boxshade - *Multiple Sequence Aligning formatting*
(http://www.ch.embnet.org/software/BOX_form.html)

5 Literaturverzeichnis

Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., & Lipman, D. J. (1990).

Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, 215(3), 403-410.

Altschul, S. F., Madden, T. L., Schaffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., & Lipman, D. J. (1997).

Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*, 25(17), 3389-3402.

Ausubel, M. A., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidmann, J. G., Smith, J. A. & Struhl, K. (1987).

Current protocols in molecular biology. *Molecular Reproduction and Development*. John Wiley & Sons, Inc. Vol.1

Bailey, T. L., Boden, M., Buske, F. A., Frith, M., Grant, C. E., Clementi, L., Ren, J., Li, W. W. & Noble, W. S. (2009).

MEME SUITE: tools for motif discovery and searching. *Nucleic Acids Research*, 37(Web Server issue), W202-W208.

Bakkeren, G., Kämper, J., & Schirawski, J. (2008).

Sex in smut fungi: Structure, function and evolution of mating-type complexes. *Fungal genetics and biology*, 45 Suppl 1, 15-21.

Banuett, F. (1995).

Genetics of *Ustilago maydis*, a fungal pathogen that induces tumors in maize. *Annual Review of Genetics*, 29, 179-208.

Banuett, F., & Herskowitz, I. (1989).

Different *a* alleles of *Ustilago maydis* are necessary for maintenance of filamentous growth but not for meiosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 86(15), 5878-5882.

Banuett, F., & Herskowitz, I. (1994).

Identification of *fuz7*, a *Ustilago maydis* MEK/MAPKK homolog required for *a*-locus-dependent and *a*-independent steps in the fungal life cycle. *Genes & Development*, 8(12), 1367-1378.

Banuett, F., & Herskowitz, I. (1996).

Discrete developmental stages during teliospore formation in the corn smut fungus, *Ustilago maydis*. *Development*, 122(10), 2965-2976.

Bardet, A. F., Steinmann, J., Bafna, S., Knoblich, J. A., Zeitlinger, J., & Stark, A. (2013).

Identification of transcription factor binding sites from ChIP-seq data at high resolution. *Bioinformatics*, 29(21), 2705-2713.

Baumann, L. (2019).

Untersuchungen zur Protein-Protein-Interaktion von bW2 und Clp1 in *Ustilago maydis*. *Karlsruher Institut für Technologie*, Masterarbeit.

Begerow, D., Stoll, M., & Bauer, R. (2006).

A phylogenetic hypothesis of Ustilaginomycotina based on multiple gene analyses and morphological data. *Mycologia*, 98(6), 906-916.

Benz, J. P., Chau, B. H., Zheng, D., Bauer, S., Glass, N. L., & Somerville, C. R. (2014).

A comparative systems analysis of polysaccharide-elicited responses in *Neurospora crassa* reveals carbon source-specific cellular adaptations. *Molecular Microbiology*, 91(2), 275-299.

Bölker, M. (2001).

Ustilago maydis--a valuable model system for the study of fungal dimorphism and virulence. *Microbiology*, 147(Pt 6), 1395-1401.

Bölker, M., Genin, S., Lehmler, C., & Kahmann, R. (1995).

Genetic regulation of mating, and dimorphism in *Ustilago maydis*. *Canadian Journal of Botany*, 73, 320-325.

Bölker, M., Urban, M., & Kahmann, R. (1992).

The a mating type locus of *U. maydis* specifies cell signaling components. *Cell*, 68(3), 441-450.

Bortfeld, M., Auffarth, K., Kahmann, R., & Basse, C. W. (2004).

The *Ustilago maydis* a2 mating-type locus genes *Iga2* and *rga2* compromise pathogenicity in the absence of the mitochondrial p32 family protein Mrb1. *Plant Cell*, 16(8), 2233-2248.

Brachmann, A. (2001). Die frühe Infektionsphase von *Ustilago maydis*: Genregulation durch das bW/bE-Heterodimer. *Ludwig-Maximilians-Universität, München*, Doktorarbeit.

Brachmann, A., Schirawski, J., Müller, P., & Kahmann, R. (2003).

An unusual MAP kinase is required for efficient penetration of the plant surface by *Ustilago maydis*. *EMBO Journal*, 22(9), 2199-2210.

Brachmann, A., Weinzierl, G., Kämper, J., & Kahmann, R. (2001).

Identification of genes in the bW/bE regulatory cascade in *Ustilago maydis*. *Molecular Microbiology*, 42(4), 1047-1063.

Brefort, T., Doehlemann, G., Mendoza-Mendoza, A., Reissmann, S., Djamei, A., & Kahmann, R. (2009).

Ustilago maydis as a Pathogen. *Annual Review of Phytopathology*, 47, 423-445.

Brenner, T. (2019).

Untersuchung zur Kombinatorik von Transkriptionsfaktoren bei *Ustilago maydis*. *Karlsruher Institut für Technologie*, Masterarbeit.

Castillo-Lluva, S., Alvarez-Tabarés, I., Weber, I., Steinberg, G., & Pérez-Martín, J. (2007).

Sustained cell polarity and virulence in the phytopathogenic fungus *Ustilago maydis* depends on an essential cyclin-dependent kinase from the Cdk5/Pho85 family. *Journal of Cell Science*, 120, 1584-1595.

Chang, L., & Barford, D. (2014).

Insights into the anaphase-promoting complex: a molecular machine that regulates mitosis. *Current Opinion in Structural Biology*, 29, 1-9.

Cheon, S. A., Jung, K., Chen, Y., Heitman, J., Bahn, Y., & Kang, H. (2011).

Unique Evolution of the UPR Pathway with a Novel bZIP Transcription Factor, Hxl1, for Controlling Pathogenicity of *Cryptococcus neoformans*. *PLoS Pathogens*, 7(8).

Christensen, J. J. (1963).

Corn smut induced by *Ustilago maydis*. *Monographs. American Phytopathology Society*, 2.

Cohen, S. N., Chang, A. C., & Hsu, L. (1972).

Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 69(8), 2110-2114.

Dean, R., Van Kan, J. A., Pretorius, Z. A., Hammond-Kosack, K. E., Di Pietro, A., Spanu, P. D., Rudd, J. J., Dickman, M., Kahmann, R., Alleis, J. & Foster, G. D. (2012).

The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology*, 13(4), 414-430.

Demerec, M., Adelberg, E. A., Clark, A. J., & Hartman, P. E. (1966).

A proposal for a uniform nomenclature in bacterial genetics. *Genetics*, 54(1), 61-76.

Di Fiore, B., Davey, N. E., Hagting, A., Izawa, D., Mansfeld, J., Gibson, T. J., & Pines, J. (2015).

The ABBA motif binds APC/C activators and is shared by APC/C substrates and regulators. *Developmental Cell*, 32(3), 358-372.

Di Fiore, B., Wurzenberger, C., Davey, N. E., & Pines, J. (2016).

The Mitotic Checkpoint Complex Requires an Evolutionary Conserved Cassette to Bind and Inhibit Active APC/C. *Molecular Cell*, 64(6), 1144-1153.

Dobin, A., Davis, C. A., Schlesinger, F., Drenkow, J., Zaleski, C., Jha, S., Batut, P., Chaisson, M., & Gingeras, T. R. (2013).

STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics*, 29(1), 15-21.

Faist, B. (2017).

Mechanismus der Clp1-vermittelten Inhibition der bW- und Rbf1-Funktion in *Ustilago maydis*. *Karlsruher Instituts für Technologie*, Doktorarbeit.

Fedler, M., Luh, K. S., Stelter, K., Nieto-Jacobo, F., & Basse, C. W. (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(3), 847-860.

Feldbrügge, M., Kämper, J., Steinberg, G., & Kahmann, R. (2004).

Regulation of mating and pathogenic development in *Ustilago maydis*. *Current Opinion in Microbiology*, 7(6), 666-672.

Flor-Parra, I., Castillo-Lluva, S., & Pérez-Martin, J. (2007).

Polar Growth in the Infectious Hyphae of the Phytopathogen *Ustilago maydis* Depends on a Virulence-Specific Cyclin. *The Plant Cell*, 19, 3280-3296.

Flor-Parra, I., Vranes, M., Kämper, J., & Perez-Martin, J. (2006).

Biz1, a zinc finger protein required for plant invasion by *Ustilago maydis*, regulates the levels of a mitotic cyclin. *The Plant Cell*, 18(9), 2369-2387.

Garcia-Muse, T., Steinberg, G., & Perez-Martin, J. (2003).

Pheromone-induced G2 arrest in the phytopathogenic fungus *Ustilago maydis*. *Eukaryot Cell*, 2(3), 494-500.

García-Muse, T., Steinberg, G., & Perez-Martín, J. (2004).

Characterization of B-type cyclins in the smut fungus *Ustilago maydis*: roles in morphogenesis and pathogenicity. *Journal of Cell Science*, 117, 487-506.

Gaston, K., & Jayaraman, P. S. (2003).

Transcriptional repression in eukaryotes: repressors and repression mechanisms. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 60(4), 721-741.

Gibson, D. G., Young, L., Chuang, R. Y., Venter, J. C., 3rd, H. C. A., & Smith, H. O. (2009).

Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases. *Nature Methods*, 6(5),

Gillissen, B., Bergemann, J., Sandmann, C., Schröer, B., Bölker, M., & Kahmann, R. (1992).

A two-component regulatory system for self/non-self recognition in *Ustilago maydis*. *Cell*, 68(4), 647-657.

Gold, S. E., Bakkeren, G., Davies, J. E., & Kronstad, J. W. (1994).

Three selectable markers for transformation of *Ustilago maydis*. *Gene*, 142(2), 225-230.

Grandel, A., Romeis, T., & Kämper, J. (2000).

Regulation of pathogenic development in the corn smut fungus *Ustilago maydis*. *Molecular Plant Pathology*, 1(1), 61-66.

Hartmann, H. A., Kahmann, R., & Bölker, M. (1996).

The pheromone response factor coordinates filamentous growth and pathogenicity in *Ustilago maydis*. *EMBO Journal*, 15(7), 1632-1641.

Heimel, K. (2010).

Regulationsmechanismen der biotrophen Entwicklung von *Ustilago maydis*. *Philipps-Universität Marburg*, Doktorarbeit.

Heimel, K., Freitag, J., Hampel, M., Ast, J., Bölker, M., & Kämper, J. (2013).

Crosstalk between the unfolded protein response and pathways that regulate pathogenic development in *Ustilago maydis*. *The Plant Cell*, 25(10), 4262-4277.

Heimel, K., Scherer, M., Schuler, D., & Kamper, J. (2010b).

The *Ustilago maydis* Clp1 protein orchestrates pheromone and *b*-dependent signaling pathways to coordinate the cell cycle and pathogenic development. *The Plant Cell*, 22(8), 2908-2922.

Heimel, K., Scherer, M., Vranes, M., Wahl, R., Pothiratana, C., Schuler, D., Vincon, V., Finkernagel, F., Flor-Parra, I., & Kamper, J. (2010a).

The transcription factor Rbf1 is the master regulator for b-mating type controlled pathogenic development in *Ustilago maydis*. *PLoS Pathogens*, 6(8)

Heinen, M. (2019).

Untersuchungen zur Interaktion von Clp1 mit dem bE/bW Heterodimer in *Ustilago maydis*. *Karlsruher Institut für Technologie*, Bachelorarbeit.

Holliday, R. (1974). *Ustilago maydis*.

King, R. C. (Ed.), *Handbook of Genetics*, Vol. 1, 575-595. New York, USA: Plenum Press.

Holloman, W. K., Schirawski, J., & Holliday, R. (2008).

The homologous recombination system of *Ustilago maydis*. *Fungal genetics and biology*, 45 (Suppl 1), 31-39.

Hsueh, Y. P., & Heitman, J. (2008).

Orchestration of sexual reproduction and virulence by the fungal mating-type locus. *Current Opinion in Microbiology*, 11(6), 517-524.

Inada, K., Morimoto, Y., Arima, T., Murata, Y., & Kamada, T. (2001).

The *clp1* gene of the mushroom *Coprinus cinereus* is essential for A-regulated sexual development. *Genetics*, 157(1), 133-140.

Innis, M. A., Gelfand, D. H., Sninsky, J. J., & White, T. J. (1990).

PCR Protocols: a guide to methods and applications. *Academic Press*, (1st Edition).

Ito, H., Fukuda, Y., Murata, K., & Kimura, A. (1983).

Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. *Journal of Bacteriology*, 153(1), 163-168.

James, P., Halladay, J., & Craig, E. A. (1996).

Genomic libraries and a host strain designed for highly efficient two-hybrid selection in yeast. *Genetics*, 144(4), 1425-1436.

Joubert, A., Simoneau, P., Champion, C., Bataillé-Simoneau, N., Iacomi-Vasilescu, B., Poupard, P., François, J. M., Georgeault, S., Sellier, E., & Guillemette, T. (2011).

Impact of the unfolded protein response on the pathogenicity of the necrotrophic fungus *Alternaria brassicicola*. *Molecular Microbiology*, 79(5), 1305-1324.

- Jung, K.-W., Lee, K.-T., Averette, A. F., Hoy, M. J., Everitt, J., Heitman, J., & Bahn, Y.-S. (2018).**
Evolutionarily Conserved and Divergent Roles of Unfolded Protein Response (UPR) in the Pathogenic *Cryptococcus* Species Complex. *Scientific Reports*, 8(8132).
- Kaffarnik, F., Müller, P., Leibundgut, M., Kahmann, R., & Feldbrügge, M. (2003).**
PKA and MAPK phosphorylation of Prf1 allows promoter discrimination in *Ustilago maydis*. *EMBO Journal*, 22(21), 5817-5826.
- Kahmann, R., & Kämper, J. (2004).**
Ustilago maydis: how its biology relates to pathogenic development. *New Phytologist*, 164, 31-42.
- Kahmann, R., Romeis, T., Hartmann, H. A., Bohnert, H. U., Bölker, M., & Kämper, J. (1996).**
Control of mating, filamentous growth and pathogenicity in *Ustilago maydis*. *Biology Of Plant Microbe Interactions*, 239-241.
- Kahmann, R., Steinberg, G., Basse, C., & Kämper, J. (2000).**
Ustilago maydis, the causative agent of corn smut disease. J. W. Kronstad (Ed.), *Fungal Pathology*, 347-371. Kluwer Academic Publishers.
- Kamada, T. (2002).**
Molecular genetics of sexual development in the mushroom *Coprinus cinereus*. *BioEssays*, 24(5), 449-459.
- Kämper, J. (2004).**
A PCR-based system for highly efficient generation of gene replacement mutants in *Ustilago maydis*. *Molecular Genetics and Genomics*, 271(1), 103-110.
- Kämper, J., Kahmann, R., Bolker, M., Ma, L. J., Brefort, T., Saville, B. J., Banuett, F., Kronstad, J. W., Gold, S. E., Müller, O., Perlin, M. H., Wösten, H. A., de Vries, R., Ruiz-Herrera, J., Reynaga-Peña, C. G., Snetselaar, K., McCann, M., Pérez-Martín, J., Feldbrügge, M., Basse, C. W., Steinberg, G., Ibeas, J. I., Holloman, W., Guzman, P., Farman, M., Stajich, J. E., Sentandreu, R., González-Prieto, J. M., Kennell, J. C., Molina, L., Schirawski, J., Mendoza-Mendoza, A., Greilinger, D., Münch, K., Rössel, N., Scherer, M., Vranes, M., Ladendorf, O., Vincon, V., Fuchs, U., Sandrock, B., Meng, S., Ho, E. C., Cahill, M. J., Boyce, K. J., Klose, J., Klosterman, S. J., Deelstra, H. J., Ortiz-**

- Castellanos, L., Li, W., Sanchez-Alonso, P., Schreier, P. H., Häuser-Hahn, I., Vaupel, M., Koopmann, E., Friedrich, G., Voss, H., Schlüter, T., Margolis, J., Platt, D., Swimmer, C., Gnirke, A., Chen, F., Vysotskaia, V., Mannhaupt, G., Güldener, U., Münsterkötter, M., Haase, D., Oesterheld, M., Mewes, H. W., Mauceli, E. W., DeCaprio, D., Wade, C. M., Butler, J., Young, S., Jaffe, D. B., Calvo, S., Nusbaum, C., Galagan, J., & Birren, B. W. (2006). Insights from the genome of the biotrophic fungal plant pathogen *Ustilago maydis*. *Nature*, 444(7115), 97-101.
- Kämper, J., Reichmann, M., Romeis, T., Bölker, M., & Kahmann, R. (1995). Multiallelic recognition: nonself-dependent dimerization of the bE and bW homeodomain proteins in *Ustilago maydis*. *Cell*, 81(1), 73-83.
- Keon, J. P., White, G. A., & Hargreaves, J. A. (1991). Isolation, characterization and sequence of a gene conferring resistance to the systemic fungicide carboxin from the maize smut pathogen, *Ustilago maydis*. *Current Genetics*, 19(6), 475-481.
- Kersey, P. J., Allen, J. E., Allot, A., Barba, M., Boddu, S., Bolt, B. J., Carvalho-Silva, D., Christensen, M., Davis, P., Grabmueller, C., Kumar, N., Liu, Z., Maurel, T., Moore, B., McDowall, M. D., Maheswari, U., Naamati, G., Newman, V., Ong, C. K., Paulini, M., Pedro, H., Perry, E., Russell, M., Sparrow, H., Tapanari, E., Taylor, K., Vullo, A., Williams, G., Zadissia, A., Olson, A., Stein, J., Wei, S., Tello-Ruiz, M., Ware, D., Luciani, A., Potter, S., Finn, R. D., Urban, M., Hammond-Kosack, K. E., Bolser, D. M., De Silva, N., Howe, K. L., Langridge, N., Maslen, G., Staines, D. M., & Yates, A. (2018). Ensembl Genomes 2018: an integrated omics infrastructure for non-vertebrate species. *Nucleic Acids Res*, 46(D1), D802-D808.
- Kojic, M., & Holloman, W. K. (2000). Shuttle vectors for genetic manipulations in *Ustilago maydis*. *Canadian Journal of Microbiology*, 46(4), 333-338.
- Kothe, E. (1996). Tetrapolar fungal mating types: sexes by the thousands. *FEMS Microbiology Reviews*, 18(1), 65-87.
- Kronstad, J. W., & Leong, S. A. (1990). The *b* mating-type locus of *Ustilago maydis* contains variable and constant regions. *Genes & Development*, 4(8), 1384-1395.

Kronstad, J. W., Wang, J., Covert, S. F., Holden, D. W., McKnight, G. L., & Leong, S. A. (1989).

Isolation of metabolic genes and demonstration of gene disruption in the phytopathogenic fungus *Ustilago maydis*. *Gene*, 79(1), 97-106.

Laemmli, U. K. (1970).

Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(259), 680-685.

Langmead, B., & Salzberg, S. L. (2012a).

Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nature Methods*, 9(4), 357-359.

Langmead, B., & Salzberg, S. L. (2012b).

Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nature Methods*, 9(4), 357-359.

Lanver, D., Berndt, P., Tollot, M., Naik, V., Vranes, M., Warmann, T., Münch, K., Rössel, N., & Kahmann, R. (2014).

Plant Surface Cues Prime *Ustilago maydis* for Biotrophic Development. *PLOS*, 10(7).

Lanver, D., Müller, A. N., Happel, P., Schweizer, G., Haas, F. B., Franitza, M., Pellegrin, C., Reissmann, S., Altmüller, J., Rensing, S. A., & Kahmann, R. (2018).

The Biotrophic Development of *Ustilago maydis* Studied by RNA-Seq Analysis. *The Plant Cell*, 30, 300-323.

Li, J. J., Bickel, P. J., & Biggin, M. D. (2014).

System Wide Analyses have Underestimated Protein Abundances and the Importance of Transcription in Mammals. *PeerJ*, 2, e270.

Liao, Y., Smyth, G. K., & Shi, W. (2013).

The Subread aligner: fast, accurate and scalable read mapping by seed-and-vote. *Nucleic Acids Research*, 41(10), e108.

Love, M. I., Huber, W., & Anders, S. (2014).

Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biology*, 15(12), 550.

Lu, D., Hsiao, J. Y., Davey, N. E., Van Voorhis, V. A., Foster, S. A., Tang, C., & Morgan, D. O. (2014).

Multiple mechanisms determine the order of APC/C substrate degradation in mitosis. *Journal of Cell Biology*, 207(1), 23-39.

- Lu, Z., Obhof, T., Schneider, K., Feldbrügge, M., Nienhaus, G. U., & Kämper, J. (2018).**
Cytoplasmic Transport Machinery of the SPF27 Homologue Num1 in *Ustilago maydis*. *Scientific Reports*, 8, 3611.
- Luca, F. C., Mody, M., Kurischko, C., Roof, D. M., Giddings, T. H., & Winey, M. (2001).**
Saccharomyces cerevisiae Mob1p is required for cytokinesis and mitotic exit. *Molecular and Cellular Biology*, 21(20), 6972-6983.
- Martinez-Espinoza, A. D., Garcia-Pedrajas, M. D., & Gold, S. E. (2002).**
The Ustilaginales as plant pests and model systems. *Fungal Genetics and Biology*, 35(1), 1-20.
- Matei, A., & Doehlemann, G. (2016).**
Cell biology of corn smut disease - *Ustilago maydis* as a model for biotrophic interactions. *Current Opinion in Microbiology*, 34, 60-66.
- Melcher, K., & Xu, H. E. (2001).**
Gal80-Gal80 interaction on adjacent Gal4p binding sites is required for complete GAL gene repression. *EMBO Journal*, 20(4), 841-851.
- Montenegro-Montero, A., Goity, A., & Larrondo, L. F. (2015).**
The bZIP Transcription Factor HAC-1 Is Involved in the Unfolded Protein Response and Is Necessary for Growth on Cellulose in *Neurospora*. *Plos ONE*, 10(7).
- Mori, K., Sant, A., Kohno, K., Normington, K., Gething, M. J., & Sambrook, J. F. (1992).**
A 22 bp cis-acting element is necessary and sufficient for the induction of the yeast KAR2 (BiP) gene by unfolded proteins. *EMBO Journal*, 11, 2583-2593.
- Musacchio, A. (2015).**
The Molecular Biology of Spindle Assembly Checkpoint Signaling Dynamics. *Current Biology*, 25(20), R1002-R1018.
- Nielsen, K., & Heitman, J. (2007).**
Sex and virulence of human pathogenic fungi. *Advances in Genetics*, 57, 143-173.

Pakula, T. M., Laxell, M., Huuskonen, A., Uusitalo, J., Saloheimo, M., & Penttilä, M. (2003).

The effects of drugs inhibiting protein secretion in the filamentous fungus *Trichoderma reesei*. Evidence for down-regulation of genes that encode secreted proteins in the stressed cells. *Journal of biological chemistry*, 278(45), 45011-45020.

Payankaulam, S., Li, L. M., & Arnosti, D. N. (2010).

Transcriptional repression: conserved and evolved features. *Current Biology*, 20(17), R764-771.

Pilauri, V., Bewley, M., Diep, C., & Hopper, J. (2005).

Gal80 Dimerization and the Yeast GAL Gene Switch. *Genetics*, 169(4), 1903-1914.

Pinter, N., Hach, C. A., Hampel, M., Rekhter, D., Zienkiewicz, K., Feussner, I., Poehlein, A., Daniel, R., Finkernagel, F., & Heimel, K. (2019).

Signal peptide peptidase activity connects the unfolded protein response to plant defense suppression by *Ustilago maydis*. *PLoS Pathog* 15(4).

Pothiratana, C. (2007).

Functional characterization of the homeodomain transcription factor Hdp1 in *Ustilago maydis*. *Philipps-Universität, Marburg*, Doktorarbeit.

Raudaskoski, M., & Kothe, E.

Basidiomycete mating type genes and pheromone signaling. *Eukaryotic Cell*, 9(6), 847-859

Richie, D. L., Hartl, L., Amanianda, V., Winters, M. S., Fuller, K. K., Miley, M. D., White, S., McCarthy, J. W., Latgé, J. P., Feldmesser, M., Rhodes, J. C. & Askew, D. S. (2009).

A Role for the Unfolded Protein Response (UPR) in Virulence and Antifungal Susceptibility in *Aspergillus fumigatus*. *PloS Pathogens*, 5(1).

Romeis, T., Brachmann, A., Kahmann, R., & Kämper, J. (2000).

Identification of a target gene for the bE/bW homeodomain protein complex in *Ustilago maydis*. *Molecular Microbiology*, 37(1), 54-66.

Romeis, T., Kamper, J., & Kahmann, R. (1997).

Single-chain fusions of two unrelated homeodomain proteins trigger pathogenicity in *Ustilago maydis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94(4), 1230-1234.

Ron, D., & Walter, P. (2007).

Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 8, 519-529.

Rowell, J. B. (1955).

Functional role of compatibility factors and an *in vitro* test for sexual incompatibility with haploid lines of *Ustilago zea*. *Phytopathology*, 45, 370-374.

Salmeron, J. M., Leuther, K. K., & Johnston, S. A. (1990).

GAL4 mutations that separate the transcriptional activation and GAL80-interactive functions of the yeast GAL4 protein. *Genetics*, 125(1), 21-27.

Saloheimo, M., Valkonen, M., & Penttilä, M. (2003).

Activation mechanisms of the HACI-mediated unfolded protein response in filamentous fungi. *Molecular Microbiology*, 47(4), 1149-1161.

Sambrook, J., Frisch, E. F., & Maniatis, T. (1989).

Molecular Cloning: A Laboratory Manual. *Cold Spring Harbour Laboratory Press*.

Sambrook, J., & Russell, D. W. (2001).

Molecular Cloning: A Laboratory Manual (3rd ed.). *Cold Spring Harbour Laboratory Press*.

Sano, R., & Reed, J. C. (2013).

ER stress-induced cell death mechanisms. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1833, 3460-3470.

Saunders, D. G. O., Aves, S. J., & Talbot, B. J. (2010).

Cell Cycle–Mediated Regulation of Plant Infection by the Rice Blast Fungus *The Plant Cell*, 22(2), 487-507.

Scherer, M., Heimel, K., Starke, V., & Kamper, J. (2006).

The Clp1 protein is required for clamp formation and pathogenic development of *Ustilago maydis*. *The Plant Cell*, 18(9), 2388-2401.

Schirawski, J., Heinze, B., Wagenknecht, M., & Kahmann, R. (2005).

Mating type loci of *Sporisorium reilianum*: novel pattern with three a and multiple b specificities. *Eukaryotic Cell*, 4(8), 1317-1327.

Schuler, D. (2010).

in vivo-Charakterisierung von Transkriptionsfaktoren in *Ustilago maydis*. *Karlsruhe Institute of Technology*, Diplomarbeit.

Schulz, B., Banuett, F., Dahl, M., Schlesinger, R., Schäfer, W., Martin, T., Herskowitz, I., & Kahmann, R. (1990).

The *b* alleles of *U. maydis*, whose combinations program pathogenic development, code for polypeptides containing a homeodomain-related motif. *Cell*, 60(2), 295-306.

Sewart, K., & Hauf, S. (2017).

Different Functionality of Cdc20 Binding Sites within the Mitotic Checkpoint Complex. *Cell Press*, 27(8), 1213-1220.

Sgarlata, C., & Perez-Martin, J. (2005).

The *cdc25* phosphatase is essential for the G2/M phase transition in the basidiomycete yeast *Ustilago maydis*. *Molecular Microbiology*, 58(5), 1482-1496.

Siggers, T., & Gordân, R. (2014).

Protein–DNA binding: complexities and multi-protein codes *Nucleic Acids Research*, 42(4), 2099-2111.

Snetselaar, K. M., Bölker, M., & Kahmann, R. (1996).

Ustilago maydis mating hyphae orient their growth toward pheromone sources. *Fungal Genetics and Biology*, 20(4), 299-312.

Snetselaar, K. M., & Mims, C. W. (1992).

Sporidial fusion and infection of maize seedlings by the smut fungus *Ustilago maydis*. *Mycologia*, 84, 193-203.

Snetselaar, K. M., & Mims, C. W. (1993).

Infection of maize stigmas by *Ustilago maydis*: Light and electron microscopy. *Phytopathology*, 83, 843.

Southern, E. M. (1975).

Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *Journal of Molecular Biology*, 98(3), 503-517.

Spellig, T., Bölker, M., Lottspeich, F., Frank, R. W., & Kahmann, R. (1994).

Pheromones trigger filamentous growth in *Ustilago maydis*. *EMBO Journal*, 13(7), 1620-1627.

Steinberg, G., & Perez-Martin, J. (2008a).

Ustilago maydis, a new fungal model system for cell biology. *Trends in Cell Biology*, 18(2), 61-67.

Straube, A., Weber, I., & Steinberg, G. (2005).

A novel mechanism of nuclear envelope break-down in a fungus: nuclear migration strips off the envelope. *EMBO Journal*, 24(9), 1674-1685.

Towbin, H., Staehelin, T., & Gordon, J. (1979).

Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 76(9), 4350-4354.

Trognitz, K. (2014).

Untersuchung der Proteinstabilität von Clp1 in *Ustilago maydis*. *Karlsruher Institut für Technologie*, Masterarbeit.

Tsukuda, T., Carleton, S., Fotheringham, S., & Holloman, W. K. (1988).

Isolation and characterization of an autonomously replicating sequence from *Ustilago maydis*. *Molecular and Cellular Biology*, 8(9), 3703-3709.

Urban, M., Kahmann, R., & Bölker, M. (1996).

Identification of the pheromone response element in *Ustilago maydis*. *Molecular and General Genetics*, 251(1), 31-37.

Veneault-Fourrey, C., Barooah, M., Egan, M., Wakley, G., & Talbot, N. J. (2006).

Autophagic Fungal Cell Death Is Necessary for Infection by the Rice Blast Fungus. *Science*, 312(5773), 580-583.

Visintin, R., Craig, K., Hwang, E. S., Prinz, S., Tyers, M., & A., A. (1998).

The Phosphatase Cdc14 Triggers Mitotic Exit by Reversal of Cdk-Dependent Phosphorylation. *Molecular Cell*, 2(6), 709-718.

Wahl, R., Zahiri, A., & Kämper, J. (2010).

The *Ustilago maydis* *b* mating type locus controls hyphal proliferation and expression of secreted virulence factors *in planta*. *Molecular Microbiology*, 75(1), 208-220.

Walter, P., & Ron, D. (2011).

The Unfolded Protein Response: From Stress Pathway to Homeostatic Regulation. *Science*, 334(6059), 1081-1086.

Zarnack, K., Eichhorn, H., Kahmann, R., & Feldbrügge, M. (2008).

Pheromone-regulated target genes respond differentially to MAPK phosphorylation of transcription factor Prf1. *Molecular Microbiology*, 69(4), 1041-1053.

6 Appendix

Tabelle 13: Heatmap zur differentiellen Expression nach *b*-Induktion, bzw. zeitgleicher Überexpression von *b* und *Clp1* mit und ohne Einfluss von *Rbf1*. Zuordnung von signifikanten *Peaks* der ChIP-Seq Analyse nach Immunopräzipitation mit *Clp1* und *bE1* zu direkt *b*-regulierten Genen mit Überprüfung der konservierten *bbs* im Promotor.

Gene ¹	AB31 ²	AB31clp ³	AB31Δrbf1 ⁴	AB31Δrbf clp ⁵	<i>b</i> -peak (AB31clp) ⁶	<i>clp</i> -peak (AB31clp) ⁷	<i>bbs</i> ⁸	<i>b</i> -peak (AB31) ⁹
UMAG_11190	9,75	-4,01	9,70	-3,57				
UMAG_02438	9,46	3.69*	9,67	3.81*				
UMAG_01375	8,73	-5,40	8,25	-2,81				
UMAG_11413	6,95	-2,39	6,84	-1,99				
UMAG_03172	6,17	-3,45	6.07**	-5.69**				
UMAG_01234	10,17	-6,20	5,38	-2,21				
UMAG_03541	4,69	-3,04	4,93	-3,41				
UMAG_12256	3,89	-3,89	4,57	-3,20				
UMAG_01374	3,70	-4,42	3,97	-3,73				
UMAG_06350	2,35	0,07	3,30	-1,29				
UMAG_11514	3,02	-3,78	3,01	-2,37				
UMAG_06125	3,15	-2,59	2,90	-1,57				
UMAG_11191	2,39	-1,82	2,56	-1,63				
UMAG_04503	3,13	-2,78	2,31	-1,31				
UMAG_12189	2,88	-3,42	2,30	-2,12				
UMAG_05104	5,71	-5,84	2,25	-1,96				
UMAG_04275	2,06	-1,33	2,24	-0,92				
UMAG_01262	7,16	-6,14	2,22	-1,60				
UMAG_04667	2,04	-5,40	2,13	-2,11				
UMAG_00235	4,04	-5,16	2,02	-1,46				
UMAG_00374	2,75	-3,32	2,00	-2,37				
UMAG_05528	11,15	-9,07	0,00	0,00				
lga2	9,98	-7,58	0,11	-0,54				
UMAG_01949	9,82	-7,48	0,00	0,00				
UMAG_02006	9,60	-7,04	0,00	0,00				
UMAG_02222	9,17	-8,93	0,00	0,00				
UMAG_03065	8,77	-7,76	0,00	0,00				
UMAG_12024	8,45	-7,90	0,10	-1,41				
UMAG_10093	7,73	-3,85	0,00	0,00				
UMAG_11886	7,42	-8,08	0,00	0,00				
UMAG_00970	7,15	-7,82	0,00	0,00				
UMAG_11562	7,12	-5,66	0,00	0,00				
UMAG_04130	7,09	-7,36	-0,30	0,00				
UMAG_12238	6,77	-7,09	0,00	0,00				
UMAG_02752	6,67	-7,11	-0,46	0,48				
UMAG_01957	6,37	-8,02	0,15	0,29				
UMAG_04358	6,28	-7,87	0,00	0,00				
UMAG_02549	6,21	-6,47	0,00	0,00				
UMAG_00441	6,15	0,00	0,00	0,00				
UMAG_03924	6,11	-6,03	-0,65	0,04				
UMAG_11729	6,09	-8,15	0,00	0,00				
UMAG_02117	5,94	-6,71	0,00	0,00				
UMAG_11465	5,78	-6,75	0,00	0,00				
UMAG_11506	5,64	-6,56	0,00	0,00				
UMAG_02111	5,33	-5,25	1,85	-1,01				
UMAG_10529	5,09	-4,79	0,56	-1,15				
UMAG_04928	4,84	-5,92	0,04	0,00				
UMAG_03067	4,65	-5,62	0,00	0,00				
UMAG_11695	4,65	-3,72	0,00	0,00				
UMAG_02753	4,61	-7,46	0,00	0,00				
UMAG_11651	4,60	-6,78	-0,22	0,37				
rga2	4,42	-5,15	0,56	-0,59				
UMAG_00076	4,42	-5,89	0,00	0,00				
UMAG_01863	4,35	-6,01	-1,77	0,00				
UMAG_00102	4,09	-5,66	0,00	0,00				
UMAG_10000	4,04	-5,99	-0,37	0,62				
UMAG_10416	4,00	-4,77	-1,13	1,51				
UMAG_06332	3,95	-5,28	0,81	-0,65				
UMAG_02942	3,70	-1,49	1,20	-1,20				

UMAG_12015	3,68	-5,38	0,00	0,00				
UMAG_05889	3,67	-4,55	0,00	0,00				
UMAG_15077	3,67	-4,16	0,46	-0,49				
UMAG_02803	3,63	-4,70	-1,55	1,11				
UMAG_01897	3,59	-2,32	0,00	0,00				
UMAG_03284	3,58	-4,80	-0,12	0,23				
UMAG_02331	3,50	-4,85	-0,22	-0,29				
UMAG_11330	3,45	-6,31	0,00	0,00				
UMAG_05560	3,43	-3,69	0,44	0,20				
UMAG_06158	3,42	-5,00	0,77	0,30				
UMAG_00762	3,41	-0,78	0,00	0,00				
UMAG_02804	3,39	-5,00	-1,60	0,67				
UMAG_00154	3,39	-4,22	-0,11	-0,31				
UMAG_03294	3,38	-3,34	0,00	0,00				
UMAG_01235	3,34	-5,17	0,00	0,00				
UMAG_05486	3,33	-4,48	0,00	0,00				
UMAG_03821	3,32	-3,84	0,00	0,00				
UMAG_06012	3,31	-5,04	1,00	-0,69				
UMAG_05038	3,26	-5,31	-0,09	-0,51				
UMAG_11606	3,22	-2,38	1,62	-1,56				
UMAG_05704	3,21	-2,94	0,00	0,00				
UMAG_12264	3,18	-3,70	0,10	-0,18				
UMAG_02865	3,12	-4,08	1,12	-0,57				
UMAG_11984	3,09	-3,42	-0,18	0,20				
UMAG_05084	3,04	-3,35	0,73	-0,05				
UMAG_03296	3,03	-6,01	0,00	0,00				
UMAG_10545	3,03	-4,07	0,00	0,00				
UMAG_04695	3,02	-3,12	0,76	-0,32				
UMAG_05170	3,01	-3,53	1,32	-0,09				
UMAG_12225	2,97	-5,03	-1,30	0,00				
UMAG_04771	2,95	-3,83	0,10	-0,08				
UMAG_11211	2,93	-3,04	0,00	0,00				
UMAG_11777	2,93	-5,63	-0,91	1,32				
UMAG_05161	2,92	-4,03	-0,49	0,76				
UMAG_05046	2,91	-4,45	0,00	0,00				
UMAG_11365	2,90	0,00	0,00	0,00				
UMAG_05074	2,83	-3,97	0,93	-0,12				
UMAG_02984	2,81	0,00	0,00	0,00				
UMAG_05774	2,81	-0,18	1,87	-0,79				
UMAG_10392	2,80	-2,87	-0,19	0,29				
UMAG_12304	2,79	-2,70	-0,33	0,29				
UMAG_03310	2,79	-3,45	1,44	-2,45				
UMAG_05780	2,73	-0,84	0,00	0,00				
UMAG_12318	2,72	-1,90	0,00	0,00				
UMAG_11978	2,68	-3,13	-0,65	1,03				
UMAG_04309	2,68	-1,63	1,73	-0,50				
UMAG_11255	2,67	-2,97	-0,24	-0,24				
UMAG_01014	2,66	-3,86	-0,09	-0,18				
UMAG_12149	2,66	-4,53	0,62	-0,28				
UMAG_00695	2,58	-4,08	0,44	-0,17				
UMAG_15097	2,56	-2,23	1,57	-1,06				
UMAG_00167	2,56	-3,16	1,13	-0,01				
UMAG_02517	2,51	-2,27	0,22	0,27				
UMAG_01936	2,51	-2,13	1,70	-1,74				
UMAG_05514	2,51	-1,97	1,14	-1,00				
UMAG_04816	2,49	-2,99	-0,25	0,00				
UMAG_03689	2,45	-2,57	-0,12	0,18				
UMAG_15100	2,45	-2,60	1,47	-0,34				
UMAG_02162	2,44	-3,28	1,06	0,12				
UMAG_01872	2,41	-2,75	0,90	-0,34				
UMAG_02308	2,37	-1,43	0,00	0,00				
UMAG_12292	2,35	-3,92	0,11	0,00				
UMAG_05814	2,35	-1,21	-0,48	1,48				
UMAG_03221	2,35	-1,75	1,03	-0,19				
UMAG_10791	2,33	-2,40	0,82	-0,26				
UMAG_04247	2,33	-4,19	0,85	-0,86				
UMAG_10070	2,32	-2,57	0,59	0,15				
UMAG_05581	2,30	-2,02	-0,20	0,65				
UMAG_05933	2,30	-0,81	1,30	-1,01				
UMAG_06509	2,29	-2,62	1,39	-1,53				

UMAG_04185	2,28	-4,54	0,00	0,00				
UMAG_01888	2,28	-3,10	0,15	0,06				
UMAG_04357	2,25	-2,96	0,00	0,00				
UMAG_11604	2,24	-1,55	1,16	-0,55				
UMAG_03400	2,22	-1,37	-0,53	1,35				
UMAG_00063	2,22	-2,38	0,74	-0,94				
UMAG_05939	2,21	-2,75	-0,02	0,00				
UMAG_06456	2,21	-1,45	0,30	0,03				
UMAG_05219	2,19	-2,64	0,67	-0,38				
UMAG_04581	2,19	-2,75	0,43	-0,40				
UMAG_04482	2,19	-0,76	1,09	-1,13				
UMAG_04064	2,14	-2,74	1,14	-0,91				
UMAG_02008	2,14	-2,02	0,70	0,04				
UMAG_02152	2,13	0,00	0,00	0,00				
UMAG_05548	2,13	-2,90	-1,88	1,60				
UMAG_01554	2,12	-2,33	-0,08	0,16				
UMAG_00230	2,10	-3,21	0,13	0,21				
UMAG_01111	2,10	-2,77	0,35	-0,25				
UMAG_05431	2,09	-2,48	-0,13	0,27				
UMAG_11775	2,09	-2,11	0,00	0,00				
UMAG_01723	2,08	-2,08	1,42	-0,29				
UMAG_00385	2,07	-3,05	1,19	-0,88				
UMAG_02542	2,06	-1,98	0,62	-0,04				
UMAG_11107	2,05	-1,16	1,36	0,06				
UMAG_06118	2,05	-2,94	-0,16	0,21				
UMAG_10403	2,01	-3,17	0,00	0,00				
UMAG_05664	2,00	-1,78	-0,20	0,03				

¹ Genbezeichnung in *U. maydis*. ² Differentielle Expression nach *b*-Induktion und Bildung eines funktionsfähigen Heterodimers. ³ Differentielle Expression nach zeitgleicher Überexpression von *b* und *Clp1*. ⁴ Differentielle Expression nach *b*-Induktion und Bildung eines funktionsfähigen Heterodimers in einem *rbb1*-Deletionshintergrund. ⁵ Differentielle Expression nach zeitgleicher Überexpression von *b* und *clp1* in einem *rbb1*-Deletionshintergrund. ⁶ Signifikante *b*-peaks der ChIP-Seq Analyse nach Immunopräzipitation mit bE1:HA bei zeitgleicher Überexpression von *b* und *Clp1* in UJF104 mit pz-score ≥ 102 (Gelb). ⁷ Signifikante *clp1*-peaks der ChIP-Seq Analyse bei zeitgleicher Überexpression von *b* und *Clp1* nach Immunopräzipitation mit *Clp1*:HA in UJU82.8 mit pz-score ≥ 169 (Gelb). ⁸ Konservierte *b*-Bindestelle (*bbs*), ermittelt über FIMO (*Find Individual Motif Occurrences*) Abfrage (*p-value* $< 10^{-4}$, Blau). Als Input diente eine FASTA-Datei aller Promotorbereiche, bestehend aus je 328 bp langen Sequenzen um die Maxima der signifikanten *Peaks* (*cookie cuts*). ⁹ Signifikante *b*-peaks der ChIP-Seq Analyse nach Immunopräzipitation mit bE1:HA ohne zusätzliche *clp1* Induktion in UDS1 mit pz-score ≥ 80 (Gelb). * Werte für zusätzlich induziertes *clp1*, die nicht in die Auswertung einbezogen werden können. ** Werte für *rbb1* Gen trotz *rbb1* Deletion können durch eine unvollständige Deletion des ORFs erklärt werden. Es werden weiterhin 547 bp des ORFs amplifiziert, was jedoch gerade einmal 36 AS der 404 AS des Rbb1-Proteins entspricht und damit kein funktionsfähiges Protein ermöglicht. Die 547 bp des ORFs reichen aus um generierte *reads* auf das *U. maydis* Genom zu alignieren und Werte zu berechnen.

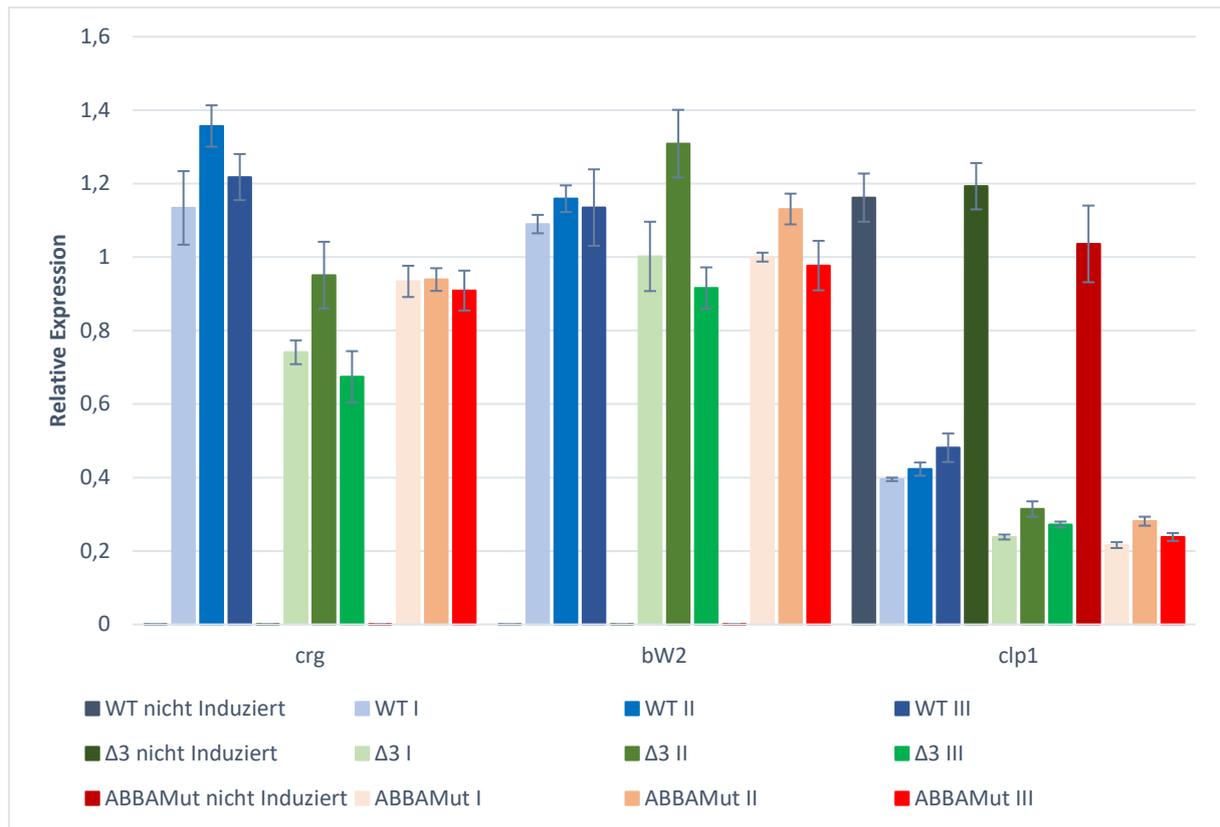


Abbildung 41: Induktionskontrollen zu allen für die quantitative ChIP verwendeten Stämme. Gezeigt sind alle in die qChIP eingesetzten Stämme, sowohl die uninduzierten Kontrollen, wie auch die induzierten Stämme in Triplikaten. Das *bW2* Gen wurde durch Aktivierung des P_{crg} induziert und zeigt auch in der relativen Expression ein ähnliches Level. Ein signifikanter Unterschied in der Anreicherung in der qChIP, aufgrund von geringerem *bW2* Transkript kann damit ausgeschlossen werden. Die relative Expression von *clp1* zeigt ein vergleichbares Level in allen induzierten Stämmen. Der negative Effekt der Arabinose auf den verwendeten P_{otef} ist deutlich von den uninduzierten zu den induzierten Stämmen zu erkennen. Alle Stämme wurden zum Haushaltsgen Aktin normalisiert. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung (SD) zwischen zwei technischen Duplikaten dar.

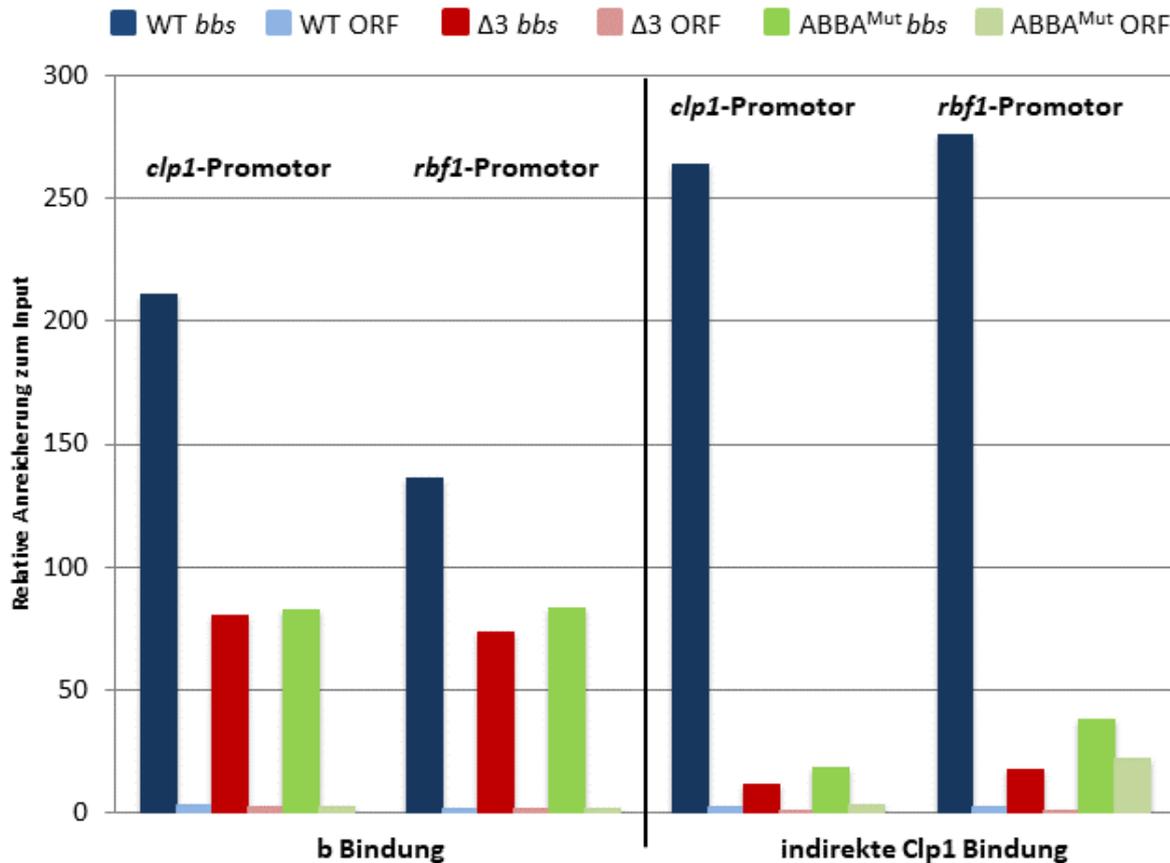


Abbildung 42: Quantitative ChIP-Seq Analyse zur Bindung von b an die DNA sowie die Bindung von Clp1 über b an die DNA im *rbf1* und *clp1* Promotorbereich. Angegeben ist die relative Anreicherung der durchgeführten IP zum Extrakt vor der Immunopräzipitation (Input), die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung zweier technischer Replikate in der Real-time PCR Auswertung. Verwendet wurde der Kontrollstamm UJF144 (*a2 Δb::P_{arg1}:bW2, P_{arg1}:bE1:3xHA, ip'(P_{otef}:Clp1:GFP)ip^s*), die Stämme UJF147 (*a2 Δb::P_{arg1}:bW2, P_{arg1}:bE1:3xHA, ip'(P_{otef}:Clp1Δ3:GFP)ip^s*), mit interner Deletion 3 im Clp1-Protein und UJF150 (*a2 Δb::P_{arg1}:bW2, P_{arg1}:bE1:3xHA, ip'(P_{otef}:Clp1_ABBA^{Mut}:GFP)ip^s*), mit eingebrachter Mutation im ABBA Motiv von Clp1. Das native nicht markierte Clp1-Protein ist ebenfalls noch im Genom enthalten. Links, die Bindung von bE1:HA an den *clp1*- bzw. *rbf1*-Promotor. Rechts, die indirekte Bindung von Clp1:GFP über das bE/bW Heterodimer an den *clp1*- bzw. *rbf1*-Promotor. Die verwendeten Stämme tragen ein HA-markiertes bE1 und ein GFP-Tag an der jeweiligen Clp1-Variante, um mit demselben aufbereiteten Chromatin beide Immunopräzipitationen durchführen zu können. Der Kontrollstamm trägt die Vollängen-Clp1:GFP-Fusion, der Stamm Δ3 die interne Deletion 3 in Clp1 fusioniert an GFP und der Stamm ABBA^{Mut} die Mutation im ABBA Motiv in Clp1 fusioniert an GFP. Das bE1-Protein ist in allen Stämmen unverändert. Das verwendete Primerpaar *bbs* amplifizieren einen ca. 100 bp großen Bereich des Promotors der die Bindestelle des bE/bW Heterodimers enthält und ebenfalls einen signifikanter Clp1 Peak abdeckt. Die Kontrollprimer ORF amplifizieren einen Bereich am Ende des jeweiligen ORF, welcher durch das Scheren des Chromatins in ca. 250 bp große Fragmente und folgende Präzipitation nicht angereichert werden kann

Digitale Daten

Liste 1: Ungefilterte RNA-Seq Liste

AB31 (AB31+ vs. AB32+)

AB31clp^{Ind} (UJU81.18 vs. UDS5)

AB31 Δ r**bf1** (UJU1.14 vs. AB32+)

AB31 Δ r**bf1**clp^{Ind} (UJU1.14 vs. UJU79.7)

Baseline und Experiment wurden bei Abfrage AB31 Δ r**bf1**clp^{Ind} vertauscht, daher muss der Vorzeichenfehler in der Abfrage manuell geändert werden.

Liste 2: Ungefilterte ChIP-Seq Listen

UJF104 im Duplikat (I und II)

UJU82.2 im Duplikat (I und II)

Digitale Version dieser Arbeit

Lebenslauf

Name	Julia Fortenbacher
Geboren	12.08.1990 in Baden-Baden
Familienstand	ledig
Staatsangehörigkeit	deutsch
Schulbildung	
09/97 - 07/01	Grundschule Balg
09/01 - 07/10	Klosterschule vom heiligen Grab, Baden-Baden Abschluss: Abitur
Studium	
10/2010 - 07/2013	Bachelorstudium der Biologie am Karlsruher Institut für Technologie, KIT Bachelor of Science, Gesamtnote: 1,4 Abteilung für angewandte Biowissenschaften: „Herstellung von Feinchemikalien über den Zentralmetabolismus von <i>Escherichia coli</i> “
10/2013 - 03/2016	Masterstudium der Biologie am Karlsruher Institut für Technologie, KIT Master of Science, Gesamtnote: 1,6 Abteilung Genetik: „Charakterisierung der Rbf1-Bindestelle durch <i>sliding window</i> Promotor-Analysen“
04/2016 – 12/2019	Anfertigung der Doktorarbeit am Karlsruher Institut für Technologie in Karlsruhe, Abt. Genetik unter der Betreuung von Prof. Dr. Jörg Kämper Titel der Arbeit: „Charakterisierung des Proteinkomplexes Clp1 mit bE/bW und seine Auswirkung auf die pathogene Entwicklung in <i>Ustilago maydis</i> “

Danksagung

Lieber Jörg, vielen Dank für die Möglichkeit meine Doktorarbeit in deiner Arbeitsgruppe anfertigen zu können! Schon während meiner Masterarbeit habe ich mich unglaublich wohl in deiner Arbeitsgruppe gefühlt und mich auch bei dir als Chef immer gut aufgehoben. Vielen Dank für alle Ratschläge, Gespräche, für dein offenes Ohr und alle deine Unterstützung sei es wissenschaftlich oder menschlich.

Vielen Dank an Prof. Dr. Holger Puchta für die Übernahme des Zweitgutachtens!

Vielen Dank an Victor Gourain, die *Sequencing Facility* Uni Göttingen und vor allem an Florian Finkernagel für die Hilfe bei der Vorbereitung, Sequenzierung und Auswertung der RNA-Seq sowie ChIP-Seq Experimente.

Die Kollegen aus der AG Fischer und AG Requena waren immer für ein kurzes Pläuschchen und konstruktive Kritik für mich da, vielen Dank auch dafür.

Nicht zu vergessen natürlich die unglaubliche AG Kämper, klein aber fein haben wir jedes Problem, jedes Praktikum und jeden Bachelor- und Masterjahrgang gemeistert. Ein besonderer Dank geht an Jonas, der mich als Betreuer während meiner Masterarbeit schon vor vielen Jahren ertragen hat und mich immer weiter über die Jahre unterstützt hat. Vielen Dank auch an Matteo und Karina, die immer ein offenes Ohr hatten, vor allem in der Endphase immer ein Eis oder Bier in der Küche bereit gestellt haben um mich auch mal wieder auf andere Gedanken zu bringen. Natürlich geht auch ein Dankeschön an die ehemaligen Kämpers Thes und Nathalie die jederzeit einen freien Kummerstuhl im Büro hatten und sich jedem Gefühlsvulkan gestellt haben. Und auch unser Neu-Kämper Lukas hat während seiner Masterarbeit mein Projekt mit super Ergebnissen vorangebracht, vielen Dank für deine Hilfe und deinen Einsatz über die lange Zeit.

Nicht zu vergessen meine Familie und vor allem meine Eltern, ohne die ich das ganze Projekt Doktor nicht hätte angehen können.

Ein riesiges DANKE haben meine Freundinnen Thea und Katrin mit großem und kleinem Anhang verdient. Ihr habt mich immer wieder aufgebaut, mir gut zugesprochen. Und natürlich allen voran mein Freund Max, der mich nicht nur immer wieder aufbauen musste, sondern auch meine emotionalen Ausbrüche und Verzweiflung ertragen und mich wieder in die richtige Bahn lenken musste!

Ohne Euch hätte ich die letzten Jahre nicht überstanden!