



**Die kombinatorische Regulation eines Transkriptions-
Netzwerks reguliert die Pflanzeninfektion von
*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. Jonas Ulrich
aus Stockenhausen

1. Referent: Prof. Dr. Jörg Kämper
2. Referent: Prof. Dr. Holger Puchta
Tag der mündlichen Prüfung: 06.02.2020

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich meine Dissertation mit dem Titel:

„Die kombinatorische Regulation eines Transkriptions-Netzwerks reguliert die Pflanzeninfektion von *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) habe ich beachtet.

Die elektronische Version der Arbeit stimmt mit der schriftlichen überein und die Abgabe und Archivierung der Primärdaten gemäß Abs. A(6) der Regeln zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis des KIT ist gesichert.

Außerhalb der Fakultät habe ich keine anhängigen oder erfolglos beendeten Promotionsverfahren.

Ort/Datum

Jonas Ulrich

Die Untersuchungen zur vorliegenden Arbeit wurden beginnend im April 2015 bis Dezember 2019 am Institut für Angewandte Biowissenschaften des Karlsruher Instituts für Technologie (KIT) in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Jörg Kämper durchgeführt.

Zusammenfassung

Der Basidiomyzet *Ustilago maydis* besitzt einen dimorphen Lebenszyklus, bei dem sexuelle und pathogene Entwicklung eng miteinander verknüpft sind und in Verbindung mit der Wirtspflanze Mais ablaufen. Die komplexen Entwicklungsveränderungen müssen streng reguliert werden und erfordern die Integration verschiedenster Signalwege.

Der Wechsel von hefeartigem, saprophytischem Wachstum zur Ausbildung des pathogenen dikaryotischen Filaments wird durch ein eng verbundenes Netzwerk aus Transkriptionsfaktoren kontrolliert. Dieses Netzwerk integriert die Pheromon-Perzeption zweier kompatibler Sporidien, wodurch die Zellfusion ermöglicht wird, sowie den anschließenden Beginn der biotrophen Entwicklung durch die Bildung des heterodimeren bE/bW-Transkriptionsfaktorkomplexes. Das bE/bW-Heterodimer löst eine Regulationskaskade aus, die maßgeblich vom Master-Regulator Rbf1 gesteuert wird. Während der Pflanzenpenetration wird die Funktion beider Proteine durch die Wechselwirkung mit Clp1 gehemmt; zu einem späteren Zeitpunkt ist die Expression des "Hauptreglers" Rbf1 nicht mehr nachweisbar. Die b-Kaskade wird weitestgehend reprimiert. Die Expression von bE/bW allein reicht aus, um eine pathogene Entwicklung auszulösen. Die ektopische Expression von Rbf1 löst die initialen Schritte der pathogenen Entwicklung aus. Das betont die zentrale Rolle beider Faktoren.

Durch eine Kombination von RNA- und ChIP-Seq Analysen konnte ich die komplexe Kontrolle von Genen durch bE/bW, Rbf1 und Hdp1 während des Übergangs zur pathogenen Entwicklung zeigen. Sowohl Promotor-Bindung als auch Expressionsdaten zeigen eine komplexe Kontrolle durch bE/bW-Rbf1 und Hdp1-Rbf1 Interaktion und damit verbundene kombinatorische DNA-Bindung.

Hdp1 beeinflusst sowohl die *prf1*- als auch die *b*-Expression und reagiert sowohl auf Pheromon-Signale als auch auf die Zellfusion und verbindet die b-Kaskade weiter mit dem über Prf1 gesteuerten Pheromon-Signalweg.

Die beiden für die Pflanzeninfektion essentiellen Transkriptionsfaktoren Biz1 und Hdp2 übernehmen zu einem späteren Zeitpunkt die zentrale Funktion von Rbf1. *Ustilago maydis* verwendet unterschiedliche kombinatorisch wirkende Regulatoren um die verschiedenen Signale vor und nach der Infektion der Pflanze zu integrieren und/oder zu differenzieren. Das transkriptionelle Netzwerk, das die Transition von

saprophytischem zu biotrophem Wachstum reguliert, ist hierarchisch aufgebaut und lässt sich in Entwicklungsstadium-abhängige Module aufgliedern, die ihrerseits wiederum hierarchisch gegliedert sind. Aufeinanderfolgende Wellen von Transkriptionsfaktoren regulieren gemeinsam die kritischen Veränderungen die mit der Lebensweise von *Ustilago maydis* einhergehen.

Darüber hinaus konnte in dieser Arbeit der Grundstein für ein CrisprCas basiertes System zur Anreicherung spezifischer DNA-Bereiche mit assoziierten Molekülen gelegt werden. In weiterführenden Experimenten, bei denen die „gene centered“ Analyse von DNA-bindenden Proteinen im Vordergrund steht, wird es möglich sein, weitere Knotenpunkte des Netzwerks zu identifizieren und darüber hinaus die Integration von essentiellen pflanzenspezifischen Signalen zu verstehen.

Summary

Complex developmental changes require strict regulatory inputs from diverse signaling pathways. In the dimorphic basidiomycete *Ustilago maydis*, sexual and pathogenic development are closely linked and take place in conjunction with the host plant maize. The change from yeast-like saprophytic growth to formation of pathogenic filamentous hyphae is controlled by a closely interconnected and cross-controlled network of transcription factors. The network integrates pheromone signaling during the mating-associated cell fusion events as well as the subsequent onset of the biotrophic development by formation of the bE/bW heterodimeric transcription factor complex. bE/bW activation triggers the expression of Rbf1, the master regulator for most bE/bW-regulated genes. bE/bW expression alone is sufficient to trigger pathogenic development, ectopic Rbf1 expression at least initiates pathogenic development, stressing the central role of both factors. During plant penetration, function of both proteins is inhibited by the interaction with Clp1; at later stages, expression of the “master regulator” Rbf1 is not detectable.

Via a combination of RNA- and ChIP-Seq analysis, I was able to elucidate the complex control of bE/bW, Rbf1 and Hdp1 of genes during the switch to pathogenic development on various promoters. Both promoter-binding as well as expression data show a complex control through bE/bW-Rbf1 and Rbf1-Hdp1 interaction and combinatorial binding.

Hdp1 influences both *prf1*- and *b*-expression and responds to pheromone signaling and cell fusion, providing an additional link between the b-cascade to the Prf1-directed pheromone pathway.

After plant infection, the two transcription factors Biz1 and Hdp2, both essential for plant infection, overtake the central function of Rbf1. Apparently, *U. maydis* uses distinct sets of regulators to integrate and/or differentiate the different signals before and after infecting its plant host.

The transcriptional network that regulates the transition from saprophytic to biotrophic growth is hierarchical and can be broken down into development-stage-dependent modules, which in turn are hierarchically structured. Successive waves of transcription factors regulate the critical changes in the lifestyle of *Ustilago maydis* in a combinatorial way.

In addition, the basis for a CrisprCas-based system for the enrichment of specific DNA areas together with associated proteins could be laid in this work. In further "gene-centered" analyses of DNA-binding proteins, it is expected to identify further nodes of the network, and to understand the integration of essential plant-specific signals.

Abkürzungen

bE	bEast	LC-MS	Flüssigchromatographie mit
bW	bWest		Massenspektrometrie-
<i>bbs</i>	b-Bindestelle		Kopplung
ChIP	Chromatin- Immunopräzipitation	p.a.	<i>pro analysi</i>
ChIP-Seq	Chromatinimmunopräzipitation mit anschließender Sequenzierung	P _{xy}	Promotor
CM	Komplex-Medium	<i>Rbs</i>	Rbf1-Bindestelle
dpi	<i>days post infection</i> (Tage nach Infektion)	RNA-Seq	RNA-Sequenzierung
GM	Glutamin-Minimalmedium	TF	Transkriptionsfaktor
<i>H1bs</i>	Hdp1-Bindestelle	üN	über Nacht
HD	Homeodomäne	w.o.	<i>without</i> (ohne Zusatz)
IP	Immunopräzipitation	ip ^r [...] _{ip^s/s^{*n}}	einfache/multiple Integration im <i>ip</i> -Locus
		Δ	Deletion

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	I
Summary	III
Abkürzungen	IV
1. Einleitung	1
1.1 <i>Ustilago maydis</i>	1
1.2 Lebenszyklus	4
1.3 Paarungstyp-Loci und genetische Kontrolle der Pathogenität	7
1.3.1 Der <i>a</i> -Locus kontrolliert Erkennung und Fusion kompatibler Sporidien	7
1.3.2 Der <i>b</i> -Locus kodiert für den zentralen Schalter der pathogenen Entwicklung	11
1.4 Die <i>b</i> -Regulationskaskade.....	12
1.5 Zielsetzung	18
2. Ergebnisse	20
2.1 Untersuchung des transkriptionellen Netzwerks für die Transition von saprophytisch zu biotropher Lebensweise von <i>Ustilago maydis</i>	20
2.1.1 Identifizierung einer Konsensussequenz für die Rbf1-Bindung	21
2.1.2 Rbf1 und das bE/bW Heterodimer binden zusammen an Promotoren	27
2.1.3 Rbf1 interagiert mit weiteren Transkriptionsfaktoren.....	33
2.1.4. Das b-Heterodimer, Rbf1 und Hdp1 können als Komplexe an Promotoren binden	38
2.1.5 Im <i>b</i> -Promotor befindet sich ein Hdp1-Konsensusmotiv	47
2.2 Integrative Analyse von ChIP-Seq und RNA-Seq Daten	49
2.2.1 Rbf1 und das bE/bW Heterodimer regulieren gemeinsam die <i>b</i> -Regulationskaskade.....	50
2.2.2 Hdp1 hat nur geringfügigen Einfluss auf die durch die <i>b</i> -Kaskade vermittelte Genregulation	55
2.2.3 The next generation: Kontrolle durch die <i>rbf1</i> -abhängigen Transkriptionsfaktoren Hdp1 und Biz1	63
2.3 EnChIP - engineered DNA-binding molecule-mediated chromatin immunoprecipitation	68
2.3.1 Etablierung eines EnChIP Systems für <i>Ustilago maydis</i>	68
2.3.2 Proof of Principle des dCas9 Systems zur Detektion von Rbf1 am <i>dik6</i> -Promotor.	71
2.3.3 Durch Kopplung der enChIP mit LC-MS lassen sich mit einem spezifischen DNA Bereich assoziierte Proteine identifizieren.....	79
2.3.4 Erhöhung der Sensitivität des Systems zum Nachweis der Bindung sequenzspezifischer Transkriptionsfaktoren	81
3. Diskussion	85
3.1 Rbf1- <i>b</i> Kombinatorik.....	86
3.2 Putative Wirkungsmechanismen und Interaktionspartner von Rbf1	95
3.2.1 Rbf1 interagiert mit weiteren Transkriptionsfaktoren.....	97

3.2.2 Rbf1 bindet zusammen mit Hdp1 an DNA	99
3.2.3 Proof of principle für einen <i>gene-centered in vivo</i> Ansatz zur Identifizierung von regulatorischen Proteinen (enChIP)	106
3.3 Das transkriptionelle Netzwerk das die Initiation der biotrophen Phase steuert ist hierarchisch aufgebaut	110
3.3.1 Entwicklungsstadien spezifische Module der <i>hdp1</i> -abhängig regulierten Gene	110
3.3.2 Hdp1 verbindet den <i>a</i> - und den <i>b</i> -Signalweg	112
3.3.3 Biz1 und Hdp2 übernehmen die zentrale Funktion von Rbf1	115
3.3.4 Die <i>b</i> -abhängige Regulationskaskade ist modulär aufgebaut	116
4. Material und Methoden	119
4.1 Material und Bezugsquellen	119
4.1.1 Chemikalien, Puffer, Lösungen; Enzyme, Kits und Medien	119
4.1.2 Stämme	122
4.1.3 Nukleinsäuren, Oligonukleotide und Plasmide	128
4.1.4 Sonstige Materialien	146
4.2 Mikrobiologische und genetische Methoden	147
4.2.1 <i>Escherichia coli</i>	147
4.2.2 <i>Ustilago maydis</i>	148
4.3 Molekularbiologische Standardmethoden	152
4.3.2 Handhabung von Nukleinsäuren	153
4.3.3 In vitro-Modifikationen von DNA (Sambrook <i>et al.</i> , 1989)	154
4.4 Biochemische Methoden	157
4.4.1 Isolierung von Gesamtprotein	157
4.4.3 Aufreinigung und Analyse von Proteinen und Proteinkomplexen	159
4.4.4 Auftrennung und Nachweis von Proteinen (SDS-PAGE)	162
4.4.6 Nachweis von immobilisierten Proteinen (Western-Analyse)	163
4.4.7 Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)	164
4.4.8 Chromatinisolation und Chromatin-Immunopräzipitation	167
4.5 PCR-Techniken	170
4.6 Sequenzanalysen und <i>in silico</i> Methoden	174
5. Literaturverzeichnis	178
6. Anhang	190
6.1 Digitale Daten	203

1. Einleitung

1.1 *Ustilago maydis*

In den letzten Jahrzehnten hat sich *Ustilago maydis* zu einem der wichtigsten Organismen zur Untersuchung phytopathogener Pilze entwickelt. Diese Entwicklung begründet sich durch Eigenschaften, die *Ustilago maydis* zu einem idealen Modellorganismus machen. Er besitzt einen kurzen Lebenszyklus, der unter Laborbedingungen innerhalb von drei Wochen durchlaufen werden kann (Banuett, 1995). In seiner saprophytischen, haploiden Form lässt sich *Ustilago maydis* leicht kultivieren und ist für eine Vielzahl an molekularbiologischen Methoden gut zugänglich. Durch die sehr effiziente homologe Rekombination (beschrieben in Holliday, 1974) und die veröffentlichte Genomsequenz (Kämper *et al.*, 2006) lassen sich vergleichsweise einfach genetische Manipulationen und gezielte Deletion von Genen durchführen (Brachmann *et al.*, 2004; Feldbrügge *et al.*, 2004). Die Generierung von Fusionsproteinen ist ebenfalls möglich (Brachmann *et al.*, 2004). Außerdem stehen regulierbare Promotoren (Banks *et al.*, 1993; Bottin *et al.*, 1996; Brachmann *et al.*, 2004) und Antibiotikaresistenzen wie auch Auxotrophiemarker als Selektionsmarker (Gold *et al.*, 1994; Keon *et al.*, 1991; Kojic und Holloman, 2000) zur Verfügung. Kürzlich wurde zudem das CRISPR-Cas9 System in *Ustilago maydis* etabliert, das eine zusätzliche Möglichkeit der Geneditierung bietet (Schuster *et al.*, 2016). In Verbindung mit frei replizierenden Plasmiden lassen sich so auch Änderungen mehrerer Zielsequenzen gleichzeitig durchführen (Schuster *et al.*, 2018).

Ustilago maydis ist ein phytopathogener Pilz aus der Abteilung der Basidiomycota. Er gehört zum Subphylum Ustilaginomycotina, den Brandpilzen. Diese sind in der Lage, parasitär auf Pflanzen zu wachsen (Begerow *et al.*, 2006). Sie gehören mit zu den am besten erforschten Gruppen phytopathogener Pilze und enthalten neben *Ustilago maydis* noch weitere Spezies wie *Ustilago hordei* und *Ustilago tritici*, mit den Wirten Gerste und Weizen. Das enge Wirtsspektrum von *Ustilago maydis* schließt eine Gefahr für andere Organismen aus. Als Auslöser der Krankheit Maisbeulenbrand begrenzt sich das Wirtsspektrum von *Ustilago maydis* auf Mais (*Zea mays*) und die eng verwandte, aus Mexiko stammende Teosinte (*Euchlena mexicana*) (Doebley, 1992), die als Urform des Kulturmaises gilt. Mais ist ebenfalls ein gut untersuchter

Organismus und relativ leicht zu kultivieren. Die Anzucht in Phytokammern oder im Gewächshaus liefert bereits sieben Tage nach der Aussaat Pflanzen, mit denen Pathogenitätsstudien durchgeführt werden können (Banuett und Herskowitz, 1989).

Eine Infektion der Pflanze mit *Ustilago maydis* zeichnet sich durch die verstärkte Bildung von Anthocyanen und Chlorosen an den Blättern aus. An allen überirdischen Teilen der Pflanze wie Blätter, Stängel und Kolben bilden sich charakteristische Gallen aus, die auch als Tumore bezeichnet werden (erstmalig beschrieben durch Bonnet, 1754; Christensen, 1963). In diesen Tumoren werden durch Karyogamie diploide Teliosporen gebildet, die zur Verbreitung dienen. Nach einer Reifungsphase setzen die Tumore melanisierte Sporen frei, die sich wie Ruß auf die Pflanze legen die der Krankheit sowie dem Pilz selbst den Namen Maisbeulenbrand und *Ustilago* (lat. Ustilare: brennen) geben (zusammengefasst in Banuett, 1992). In Mexiko sind infizierte Maiskolben als Delikatesse verbreitet und tragen den Namen "Huitlacoche" (Ruiz-Herrera und Martinez-Espinoza, 1998). In Europa dagegen wird der Pilz als Ernteschädling betrachtet.

Die Relevanz für Untersuchungen pilzlicher Infektionsmechanismen stützt sich auf zwei Aspekte. Zum einen löst eine Vielzahl von Pilzen Krankheiten im Menschen aus (zusammengefasst in Kohler *et al.*, 2017). Zu den bedeutendsten und am besten untersuchten Krankheitserregern zählen dabei die Ascomyceten *Candida albicans* und *Aspergillus fumigatus* sowie der Basidiomycet *Cryptococcus neoformans* (Guarro *et al.*, 1999). Zum anderen lösen Pilze mehr pflanzliche Krankheiten aus als alle anderen Organismen. Ca. 83 % der wichtigsten Infektionskrankheiten für in Mitteleuropa kultivierte Pflanzen werden durch Pilze verursacht (Almeida *et al.*, 2019). Der weltweit jährlich verursachte Schaden durch Pilze lässt sich schwer ermitteln. Er wurde Anfang des 21sten Jahrhunderts auf ca. 13 % des Ernteertrages geschätzt (Oerke, 2005). Zur Bekämpfung pathogener Pilze stehen jedoch nur begrenzt Mittel zur Verfügung. Gegen humanpathogene Pilze werden hauptsächlich Antibiotika eingesetzt, was seit ihrem Einsatz zu einem verstärkten Aufkommen von Antibiotikaresistenzen geführt hat (Vanden Bossche *et al.*, 1998; Jensen, 2016). Zur Bekämpfung von Pflanzenpathogenen werden Fungizide eingesetzt, zumeist auf der Basis von organischen Verbindungen kombiniert mit Schwermetallionen. Der Einsatz ist nicht nur mit einem hohen technischen und finanziellen Aufwand verbunden, sondern auch ökologisch höchst bedenklich (zusammengefasst in Brauer *et al.*, 2019).

Das Ziel der Erforschung pathogener Pilze besteht deshalb darin, pathogenitätsrelevante Mechanismen zu verstehen und auf Basis dieses Wissens wirksame und für Mensch und Umwelt verträgliche Wirkstoffe und Strategien zu entwickeln. Die Pathogenität von phyto- und humanpathogenen Pilzen weist viele Parallelen auf. Beispielsweise sind evolutionär konservierte Signalübertragungswege wie MAP-Kinase- oder cAMP-Kaskaden wichtige Bestandteile der pathogenen Entwicklung. Eine sehr wichtige Komponente der pathogenen Entwicklung stellt der morphologische Wechsel von hefeartigem und filamentösem Wachstum dar (Madhani und Fink, 1998).

Im Zusammenhang mit Morphologiewechsel stellt *Ustilago maydis* mit seiner dimorphischen Lebensweise aufgrund der oben beschriebenen Vorteile ein hervorragendes Modellsystem zur Untersuchung von pathogener Entwicklung dar.

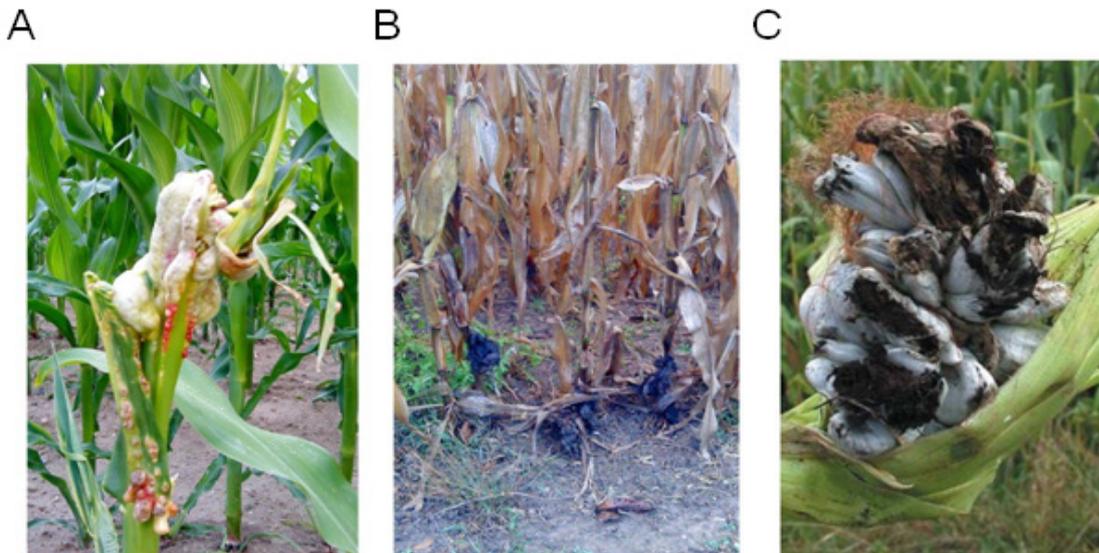


Abbildung 1.1: Infizierte Maispflanzen mit tumorartigen Gallen. (A) Tumor am Stängel einer infizierten Maispflanze zu Beginn der Vegetationsperiode. **(B), (C)** Aufgebrochene Tumore zum Ende der Vegetationsperiode. Die freigesetzten melanierten Teliosporen, auch Brandsporen führen zu einem verbrannten Aussehen der infizierten Pflanzenteile. (Fotos aufgenommen im Juni (A) und Oktober (B) 2009 in Karlsruhe-Rüppurr). (A) und (B) aus (Heimel, 2010); (C) aus (Kahmann und Kämper, 2004)

1.2 Lebenszyklus

Ustilago maydis ist ein fakultativ biotropher Pflanzenparasit, der keine Fruchtkörper bildet und so einen, verglichen mit den nahe verwandten Rostpilzen, einfachen Lebenszyklus hat. Dieser lässt sich in eine pathogene und eine apathogene Phase untergliedern. Dabei durchläuft er drei verschiedene Kernphasen, die sich auch in seiner morphologischen Erscheinung widerspiegeln: die saprophytisch wachsenden Sporidien sind haploid, das pathogene Filament ist dikaryotisch, und die Teliosporen sind diploid. In der haploiden Phase vermehrt sich *Ustilago maydis* durch vegetative Knospung hefeartig. Diese Phase läuft außerhalb der Wirtspflanze ab und der Pilz ist apathogen. Die pathogene Phase findet ausschließlich planzenassoziiert statt und beginnt durch Ausbildung eines mehrzelligen dikaryotischen Filaments. Dazu müssen zwei kompatible Sporidien mit passenden Paarungstypen über Konjugation auf der Pflanzenoberfläche miteinander fusionieren (Snetselaar und Mims, 1992; Snetselaar und Mims, 1993). Die Kompatibilität wird durch ein tetrapolares System aus zwei Paarungstyp-Loci, dem *a*- und dem *b*-Locus, gesteuert (Rowell, 1955; Bölker, 2001; Feldbrügge *et al.*, 2004; Kahmann und Kämper, 2004).

Die Einleitung der sexuellen Entwicklung von *Ustilago maydis* erfolgt durch die Pheromon- gesteuerte Perzeption eines kompatiblen Kreuzungspartners (1) (siehe Abbildung 1.2). Die Zell/Zellerkennung und die anschließende Zellfusion verlaufen dabei über ein Pheromon-Rezeptor-System, das durch den biallelischen *a*-Locus gesteuert wird. Besitzen die Sporidien miteinander kompatible Allele bilden sie Konjugationshyphen aus, wachsen auf der Pflanzenoberfläche aufeinander zu und fusionieren. An dieser Stelle wird der Zellzyklus in der G2-Phase arretiert (2) (Garcia-Muse *et al.*, 2003). Das entstandene heterodikaryotische Filament wächst unter der Kontrolle des *b*-Locus durch Spitzenwachstum aus (3) (Snetselaar *et al.*, 1996; Spellig *et al.*, 1994b). In diesem Stadium findet, wie auch nach Ausbildung der Konjugationshyphen keine weitere Kernteilung statt, der Zellzyklus bleibt demnach arretiert. Die Zellen werden nicht geteilt, durch Septierung entstehen am Pol der Hyphe Kompartimente, von denen nur das apikale Zytoplasma und die von den beiden Paarungspartnern stammenden Zellkerne enthält (Banuett und Herskowitz, 1994). Das infektiöse dikaryotische Filament wächst auf der Pflanzenoberfläche und kann Apressorium-ähnliche Strukturen ausbilden (4), von denen aus das Pflanzengewebe penetriert wird (5). Ein Unterschied zum Apressorium von z.B. *Magnaporthe grisea*

ist, dass keine Melanineinlagerung stattfindet. Die Struktur dient daher nicht der Druckerzeugung zur mechanischen Pflanzenpenetration (Snetselaar und Mims, 1992; Snetselaar und Mims, 1993), sondern als Markierung der Penetrationsstelle. Die Penetration selbst wird vermutlich durch Sekretion von lytischen Enzymen ermöglicht (Kahmann und Kämper, 2004; Schirawski *et al.*, 2005). Anschließend wird der G2- Zellzyklusarrest aufgehoben und die Proliferation des Heterodikaryons innerhalb der Wirtspflanze eingeleitet (Banuett und Herskowitz, 1996). Das Filament wächst bevorzugt in nährstoffreichem Gewebe intra- und interzellulär, dabei bleibt die Plasmamembran der Pflanzenzellen intakt. Mikroskopisch ist keine Abwehrreaktion der Pflanze zu beobachten. Erst ca. drei Tage nach Infektion können Anthocyanbildung und vereinzelt Nekrosen an der Penetrationsstelle beobachtet werden. Die Zellkernverteilung verläuft durch für Basidiomyzeten spezifische Schnallenzellen (Scherer *et al.*, 2006). Durch vermehrte Proliferation und Verzweigung der Hyphen (6) entstehen in Zusammenhang mit erhöhten Teilungsraten und Riesenwuchs der infizierten pflanzlichen Zellen Tumore. In ihnen findet die Karyogamie und die anschließende Differenzierung zu Teliosporen statt (7) (Banuett und Herskowitz, 1996; Snetselaar und Mims, 1993). Die Tumore platzen auf, und Brandsporen werden freigesetzt. Diese können über Wind, Wasser und Insekten verbreitet werden und überdauern, bis sie bei geeigneten Bedingungen auskeimen. Dabei entstehen aus dem diploiden Kern durch Meiose vier haploide Kerne und es bildet sich eine Probasidie. Von ihr werden neue Spordien abgeschnürt, die je einen haploiden Zellkern enthalten und einen neuen Zyklus einleiten (zusammengefasst in Christensen, 1963).

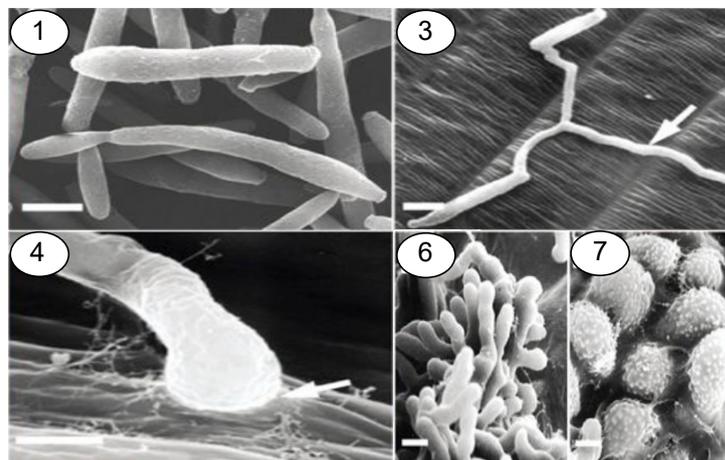
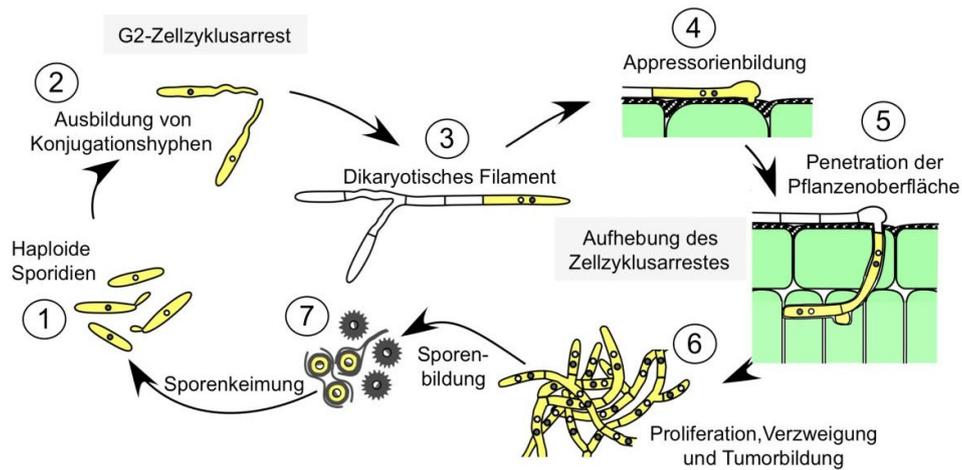


Abbildung 1.2: Der Lebenszyklus von *Ustilago maydis*. Schematische Darstellung und elektronenmikroskopische Aufnahmen der Phasen während der sexuellen und pathogenen Entwicklung. (1): Hefeartiges, vegetatives Wachstum; Sporidien teilen sich durch Knospung. (2): Durch den a -Locus gesteuerte Konjugationshyphenbildung und Zellfusion. (3): Bildung eines pathogenen Dikaryons, filamentöses Wachstum. (4): Bildung von Appressorien und Penetration der Pflanzenoberfläche. (5): Aufhebung des Zellzyklusarrestes und Proliferation im Pflanzengewebe. Pflanzenzellen werden dabei nicht zerstört. Es bilden sich Schnallenzellen. (6): Verzweigung, Tumorinduktion und Karyogamie. (7): Differenzierung der Teliosporen (modifiziert nach Kämper *et al.*, 2006).

1.3 Paarungstyp-Loci und genetische Kontrolle der Pathogenität

In *Ustilago maydis* sind sexuelle und pathogene Entwicklung eng miteinander verbunden. Diese Kopplung ist kennzeichnend für Brandpilze (Bakkeren *et al.*, 2008). Die Ausbildung des infektiösen Dikaryons unterliegt präziser Kontrolle, koordiniert und gesteuert durch Paarungstyp-Loci. Bei *Ustilago maydis* handelt es sich um eine heterothallische Spezies mit tetrapolaren Paarungssystemen (Kothe, 1996; Hsueh und Heitman, 2008) In diesen Systemen werden zwei Paarungstyp-Loci, die sogenannten *a*- und *b*-Loci, unterschieden. Sie kodieren in *Ustilago maydis*, wie typisch für tetrapolare Systeme in Basidiomyceten, für ein Pheromon/Pheromonrezeptor-basiertes Zell/Zell-Erkennungssystem und für Homeodomänen-Transkriptionsfaktoren (Morrow und Fraser, 2009). Erkennung, Konjugationshyphen-Bildung und schließlich Fusion werden dabei über den biallelischen *a*-Locus, weitere sexuelle und pathogene Entwicklung über den multiallelischen *b*-Locus gesteuert (zusammengefasst in Bölker *et al.*, 1995). Dieses System macht so Kreuzung genotypisch identischer Partner unmöglich und dient der Erhaltung der genetischen Diversität.

1.3.1 Der *a*-Locus kontrolliert Erkennung und Fusion kompatibler Sporidien

Der *a*-Locus kontrolliert das Pheromon/Rezeptor-System und die daraus erfolgende Zell/Zell-Erkennung. Er liegt biallelisch in den Allelen *a1* und *a2* vor und codiert für das Pheromon Mfa (*mating factor a*) und den membranständigen Pheromonrezeptor Pra (*pheromon receptor a*) (Abbildung 1.3). Mfa1 und Mfa2 sind aus 13 bzw. 9 Aminosäuren bestehende, sekretierte Pheromone, die aus 40 bzw. 38 Aminosäuren umfassenden Vorläufermolekülen posttranslational prozessiert und modifiziert werden. Die Pheromone werden jeweils von den Pheromon-Rezeptoren des komplementären *a*-Locus perzipiert. Dies führt zur Bildung der oben beschriebenen Konjugationshyphen. Die Pheromon-Rezeptoren Pra1 und Pra2 bestehen aus 357 bzw. 346 Aminosäuren und weisen Homologie zu anderen pilzlichen Pheromonrezeptoren auf. Sie enthalten je sieben Transmembrandomänen und gehören zur Familie der Ste3p- ähnlichen Pheromonrezeptoren aus *Saccharomyces cerevisiae* (Bölker *et al.*, 1992). Dieses System aus Pheromon und Pheromonrezeptor entspricht dem der gut untersuchten Ascomyceten *Saccharomyces cerevisiae* (Kurjan,

1993) und *Schizosaccharomyces pombe* (Yamamoto *et al.*, 1997). In diesen Organismen codiert das Genom jeder einzelnen Zelle für die Gene beider Paarungstypen, es werden allerdings immer nur die Gene eines Paarungstyps, gesteuert durch Transkriptionsfaktoren im Paarungstyp-Locus, exprimiert.

Bei allen Basidiomyceten liegen die Paarungstypen in unterschiedlichen Allelen vor (Banuett, 1998). Der *a2*-Locus von *Ustilago maydis* umfasst zusätzlich die Gene *lga2* und *rga2*. Die resultierenden Proteine werden erst nach der Fusion zweier Sporidien induziert und sind an Fusions- und Spaltungsprozessen von Mitochondrien im Dikaryon beteiligt, wodurch sie uniparentale Vererbung mitochondrialer DNA vermitteln (Bortfeld *et al.*, 2004; Fedler *et al.*, 2009; Mahlert *et al.*, 2009).

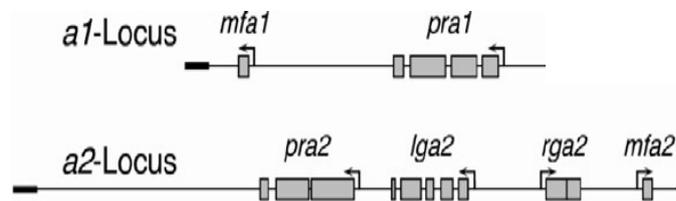


Abbildung 1.3: Schematische Darstellung der Gene der *a*-Loci. Der *a1*-Locus kodiert für ein Pheromon- Vorläuferprotein Mfa1 und den Pheromonrezeptor Pra1. Im *a2*-Locus sind zusätzlich die Gene *lga2* und *rga2* enthalten, die eine Rolle bei der Vererbung mitochondrialer DNA spielen (Abbildung nach Brachmann, 2001).

Befinden sich zwei kompatible haploide Sporidien in räumlicher Nähe, führt die Perzeption des Pheromons durch den Pheromonrezeptor zum G2-Zellzyklusarrest und zur Ausbildung von Konjugationshyphen, die entlang des Pheromongradienten aufeinander zuwachsen, um an ihren Spitzen zu fusionieren (Garcia-Muse *et al.*, 2003; Snetselaar *et al.*, 1996; Spellig *et al.*, 1994a). Vermittelt wird dies durch eine Signaltransduktionskaskade, die zu der durch den Transkriptionsfaktor Prf1 (*Pheromone response factor 1*) induzierten Aktivierung von Pheromon-Response-Elementen (PRE) in regulatorischen Regionen *Mating*-spezifischer Gene führt (Urban *et al.*, 1996). Die Pheromon/Rezeptor-Bindung löst eine über einen cAMP-abhängige Proteinkinase A (PKA) und eine Mitogen-aktivierte Protein-Kinase-Kaskade (MAPK-Kaskade) vermittelte Signaltransduktion aus (Details Abbildung 1.4). Beide Wege münden in der Phosphorylierung von Prf1. Um die Expression der *a*-Gene zu induzieren muss Prf1 von der PKA Adr1 phosphoryliert werden (gelb), wohingegen die Induzierung von *b*-Genen zusätzlich die Phosphorylierung durch die MAPK Kpp2

benötigt (blau). Die transkriptionelle Regulation von *prf1* wird über die MAPK Kpp2 und Crk1 über ein komplexes Zusammenspiel aus mindestens vier weiteren Transkriptionsfaktoren gesteuert. Rob1, Hap2, ein unbekannter Faktor induziert durch Crk1, und Prf1 selbst binden an getrennten Elementen im *prf1*-Promotor und beeinflussen damit die Expression des Gens (zusammengefasst in Brefort *et al.*, 2009). Durch differenzielle Phosphorylierung wird Prf1 posttranslational reguliert und kann die Expression verschiedener Zielgene in Abhängigkeit des Phosphorylierungsstatus induzieren (Abbildung 1.4) (Kaffarnik *et al.*, 2003; Zarnack *et al.*, 2008). Zielgene von Prf1 besitzen PRE-Elemente in ihren Promotoren (Hartmann *et al.*, 1996), an denen Prf1 bindet. Zu Prf1 Zielgenen gehören, neben *prf1* selbst, die *a*-Locus-Gene *mfa* und *pra*. Die Aktivierung der *a*-Gene und die Auto-Induktion von *prf1* führen zu einer positiven Rückkopplung und zu einer Amplifikation der Pheromon-Antwort. Das führt vermutlich zum polaren Wachstum der Konjugationshyphen entlang des Pheromongradienten (Hartmann, 1997; Snetselaar *et al.*, 1996). Erst nach der Fusion der Sporidien mit kompatiblen *b*-Loci wird dies durch eine Repression von *pra* und *mfa* unterbrochen (Urban *et al.*, 1996).

Prf1 spielt in beiden aufeinander folgenden Entwicklungsstadien von *Ustilago maydis* eine Rolle. Durch die Regulation der *a*-Locus Gene *mfa* und *pra* wird die Zellfusion gesteuert. Die Regulation der *b*-Locus-Gene, sowie des C2H2-Zinkfinger Transkriptionsfaktor Rbf1, bestimmen die weitere pathogenen Entwicklung (Hartmann *et al.*, 1996; Urban *et al.*, 1996; Zarnack *et al.*, 2008; Heimel *et al.*, 2010b).

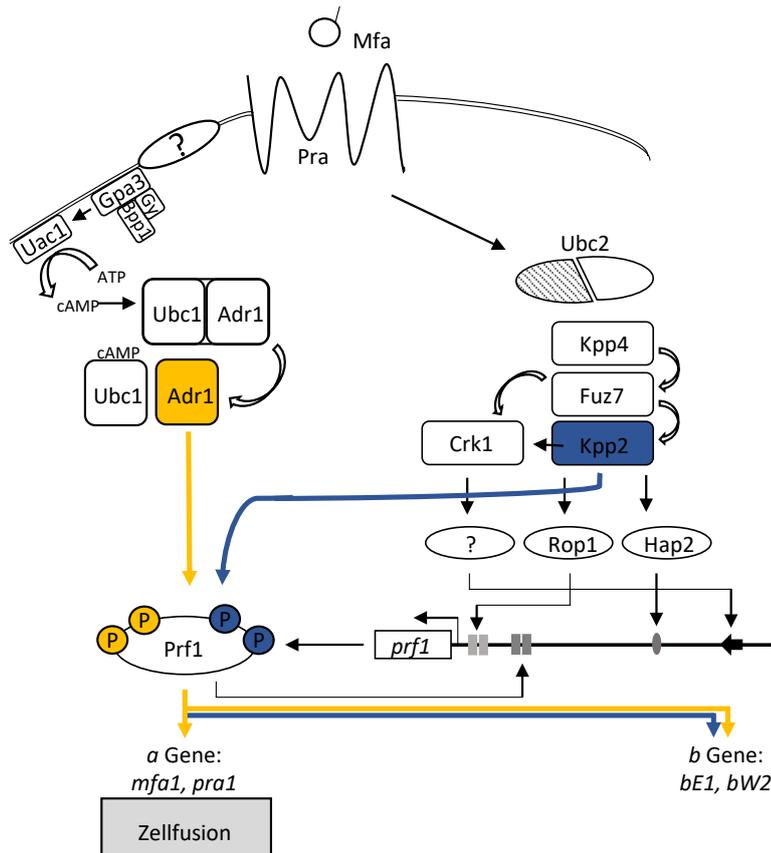


Abbildung 1.4: Schematische Darstellung der a-vermittelten Pheromonekaskade. Der zentrale Transkriptionsfaktor Prf1 wird über eine durch das Pheromon/Rezeptor-System mit Mfa und Pra aktivierte MAP-Kinase-Kaskade über Ubc2, Kpp4, Fuz7 und Kpp2 phosphoryliert. Die Kpp2 gesteuerten Proteine Rop1 und Hap2, und ein weiterer unbekannter Faktor, aktiviert durch Crk1 sowie Prf1 selbst, binden an den *prf1*-Promotor und regulieren die *prf1*-Expression. Das durch Phosphorylierung aktivierte Prf1 beeinflusst direkt die Zellfusion, die Bildung des bW/bE-Heterodimer und damit die Aktivierung der b-Regulationskaskade. Die Phosphorylierung über die Protein-Kinase-Kaskade (gelb), aktiviert durch äußere Signale, sowohl für die Induktion der a- als auch der 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)).

1.3.2 Der *b*-Locus kodiert für den zentralen Schalter der pathogenen Entwicklung

Nach erfolgreicher Zellfusion wird die pathogene Entwicklung vom multiallelischen *b*-Locus kontrolliert (Bölker *et al.*, 1995). Er kann als zentraler Schalter für den Übergang von saprophytischer, apathogener in die biotrophe, pathogene Phase gesehen werden. Der *b*-Locus kodiert für die von einer gemeinsamen Promotorregion divergent transkribierten Gene der Homeodomänenproteine *bEast* (*bE*) und *bWest* (*bW*) (Schulz *et al.*, 1990; Gillissen *et al.*, 1992). Er liegt in mindestens 19 verschiedenen Allelen vor (Kämper *et al.*, 1995); J. Kämper, pers. Mitteilung). Um einen funktionellen Transkriptionsfaktor zu bilden, müssen die beiden Homeodomänenproteine interagieren und ein Heterodimer bilden (Kämper *et al.*, 1995). Dies geschieht allerdings nur in Zellen mit Homeodomänenproteinen, die von unterschiedlichen Allelen stammen (Abbildung 1.5 B). Die Proteine *bE* und *bW* mit 473 bzw. 645 Aminosäuren Länge (Gillissen *et al.*, 1992) weisen trotz fehlender Sequenzhomologien einen ähnlichen strukturellen Aufbau auf. Beide Proteine bestehen aus einem zwischen den verschiedenen Allelen hoch konservierten C-terminalen und einem variablen N-terminalen Bereich (Abbildung 1.5 A) (Kronstad und Leong, 1990; Schulz *et al.*, 1990). Im C-terminalen Bereich befinden sich Homeodomänen, die für die DNA-Bindung verantwortlich sind. Der N-terminale variable Bereich beinhaltet Interaktionsdomänen, die die Heterodimerisierung steuern und so die Selbst/Nichtselbst-Erkennung sicherstellen. Sporidien mit identischen *b*-Allelen können fusionieren, jedoch wird kein funktionelles *bE/bW*-Heterodimer gebildet und die pathogene Entwicklung ist unterbunden. Das entstandene Dikaryon kann den Lebenszyklus nicht vollenden. Ein *b*-Heterodimer aus kompatiblen *bE* und *bW*-Proteinen stellt dagegen einen funktionellen Transkriptionsfaktor dar, der sequenzspezifisch DNA an *b*-Bindestellen (*bbs*) bindet und so die Expression von Zielgenen induziert (Brachmann *et al.*, 2001; Heimel *et al.*, 2010b; Romeis *et al.*, 2000). Durch genetische Manipulation generierte haploide Stämme mit kompatiblen *b*-Loci können auch ohne vorherige Paarung ihre pathogene Entwicklung vollständig abschließen. Anhand von solopathogenen Stämmen konnte gezeigt werden, dass ein funktionelles *b*-Heterodimer notwendige und ausreichende Voraussetzung für die sexuelle Entwicklung und den Wechsel zum pathogenen Wachstum und dem damit verbundenen G2 Zellzyklusarrest ist (Bölker *et al.*, 1995; Brachmann *et al.*, 2001; Heimel *et al.*, 2010b). Somit nimmt das aktive *bE/bW*-Heterodimer die zentrale Rolle

als transkriptioneller Regulator in der pathogenen Entwicklung von *Ustilago maydis* ein.

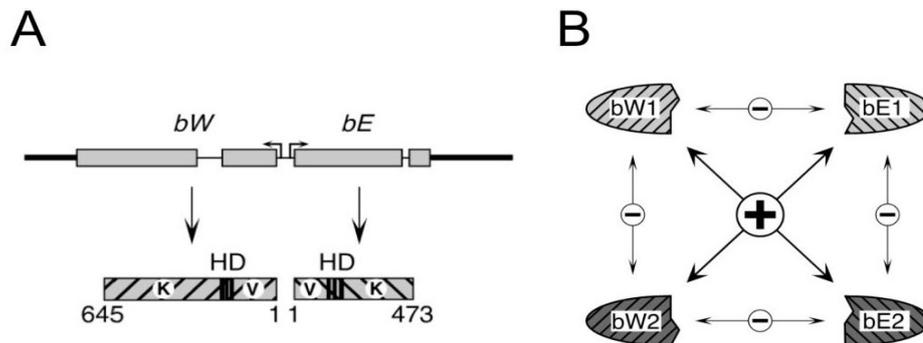


Abbildung 1.5: Schematische Darstellung des *b*-Locus. (A): Die genomische Struktur des *b*-Locus und die darin kodierte Homeodomänen (HD)-Proteine *bE* und *bW*, die konvergent von einem gemeinsamen Promotor transkribiert werden. V zeigt die variablen, K die konservierten Bereiche der Proteine an. **(B):** Dargestellt ist die allelspezifische Dimerisierung der *b*-Proteine. Wenn die Homeodomänen-Proteine von verschiedenen Allelen stammen, können sie dimerisieren und als *bE/bW*-Heterodimer einen funktionellen Transkriptionsfaktor bilden (nach Brachmann, 2001).

1.4 Die *b*-Regulationskaskade

Das *b*-Heterodimer löst in seiner Rolle als zentraler Schalter im Übergang zwischen saprophytischer und biotropher Lebensweise eine komplexe Regulationskaskade aus. Neben morphologischen Veränderungen und dem G2-Zellzyklusarrest sind verstärktes Spitzenwachstum und Abschnürung leerer septierter Bereiche der Filamente typisch für *b*-induziertes filamentöses Wachstum der nun infektiösen Form von *Ustilago maydis*.

Durch genomweite Expressionsanalysen konnten nach Induktion kompatibler *bE* und *bW* Gene insgesamt 345 Gene identifiziert werden, die differenziell *b*-reguliert sind (Heimel *et al.*, 2010b). Diese Gene können in zwei Klassen eingeteilt werden; Klasse 1 Gene werden dabei direkt durch das *b*-Heterodimer, Klasse 2 Gene indirekt durch *rbf1* reguliert. Darunter sind wiederum weitere Transkriptionsfaktoren (Abbildung 1.6). Direkt regulierte Gene weisen innerhalb ihrer Promotoren ein konserviertes Motiv auf, mit dem das *b*-Heterodimer interagiert. Die *b*-Bindestelle (*bbs*, *b*-binding site) konnte zuerst im Promotor des im *a2*-Locus liegenden Gens *Iga2* identifiziert werden (Romeis *et al.*, 2000) und wurde in weiteren direkt *b*-regulierten Genen gefunden (Brachmann *et al.*, 2001). Die meisten der *b*-regulierten Gene weisen jedoch keine *b*-Bindestellen

in ihrem Promotor auf. Das lässt auf eine indirekte Regulation über eine transkriptionelle *b*-Heterodimer induzierte Signalkaskade schließen.

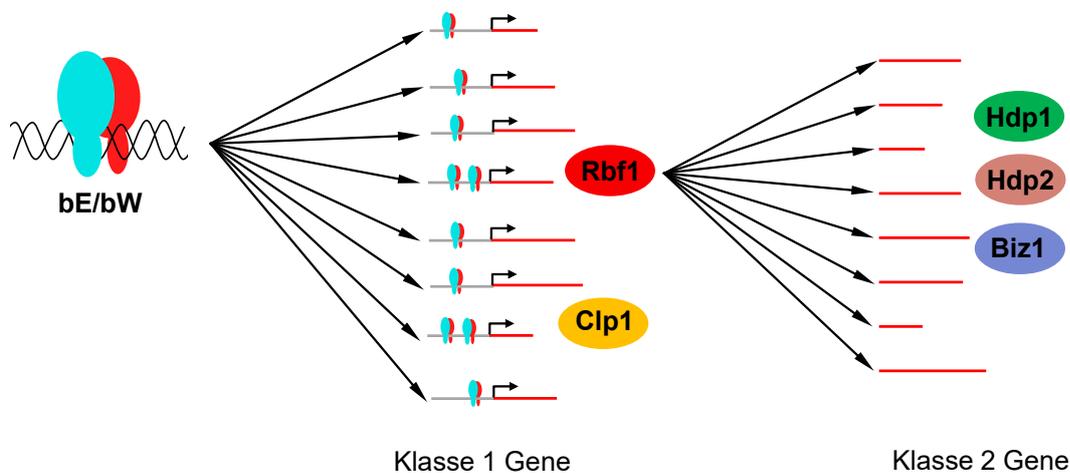


Abbildung 1.6: Darstellung der *b*-Regulationskaskade. Die Klasse 1 Gene sind direkt *b*-reguliert, dabei bindet das *b*-Heterodimer an eine *bbs* in deren Promotorregion. Die Klasse 2 Gene werden indirekt durch *b* reguliert, wobei ein Großteil von ihnen abhängig von *rbf1* ist (Abbildung abgeändert nach Kahmann und Kämper, 2004).

Rbf1, zentraler Regulator der *b*-Regulationskaskade

Das Hauptaugenmerk der weiteren funktionellen Analyse direkt *b*-regulierter Gene lag auf der Deletion potentieller Regulatoren. Dadurch konnten u.a. die pathogenitätsrelevanten Gene *clp1* und *rbf1* identifiziert werden. Der Großteil der *b*-regulierten Gene wird durch eine Regulationskaskade kontrolliert, die von weiteren Transkriptionsfaktoren abhängt. Eine zentrale Rolle dabei spielt das direkt *b*-regulierte Gen *rbf1*. Auf transkriptioneller Ebene werden ca. 90 % der *b*-abhängigen Gene von Rbf1 (*regulator of b-filament*) reguliert (Heimel *et al.*, 2010b). Rbf1 ist ein C2H2-Zinkfinger Transkriptionsfaktor, besteht aus 404 Aminosäuren, enthält eine N-terminale Zinkfingerdomäne, eine putative Kernlokalisationssequenz innerhalb der Zinkfingerdomäne und eine C-terminale Glutamin-reiche Sequenz. Kernlokalisierung von Rbf1 konnte experimentell nachgewiesen werden (Heimel *et al.*, 2010b). Der Promotor von *rbf1* enthält drei *bbs*-ähnliche Motive. Durch eine qChIP Analyse (quantitative Chromatin-Immunopräzipitation) konnte eine Interaktion von bE mit dem *bbs*-Motiv -1377 gezeigt werden, diese Bindung ist essentiell für die *b*-abhängige *rbf1* Expression (Heimel *et al.*, 2010b). Microarray Analysen zeigten außerdem eine frühe

Expression von *rbf1* nach *b*-Induktion. Bereits eine Stunde nach *b*-Induktion konnte eine Expression von *rbf1* nachgewiesen werden (Heimel *et al.*, 2010b). Zusammenfassend spricht das für eine direkte *b*-Regulation von *rbf1*.

Wird *rbf1* deletiert, führt dies zu fast vollständig vermindertem filamentösem Wachstum. Mikroskopische Untersuchungen zeigten, dass auf der Pflanzenoberfläche keine Appressorien mehr gebildet werden können und somit die weitere Entwicklung *in planta* nicht abgeschlossen werden kann. In Infektionsstudien wird deutlich, dass *rbf1*- Deletionsmutanten nicht in der Lage sind Tumore zu bilden. (Heimel *et al.*, 2010b). Während die *rbf1*-Deletion zum Verlust der Pathogenität führt, induziert die Überexpression auch ohne aktives *b*-Heterodimer filamentöses Wachstum und einen G2-Zellzyklus-Arrest. Rbf1 ist somit sowohl notwendig als auch ausreichend für *b*-vermitteltes, filamentöses Wachstum und den G2-Zellzyklusarrest. Rbf1 alleine reicht jedoch nicht für eine erfolgreiche Kolonisation der Pflanze aus (Heimel *et al.*, 2010a); (Wahl *et al.*, 2010). In einer CHIP-Seq (Chromatin Immunopräzipitation mit anschließender DNA-Sequenzierung im Hochdurchsatz) mit Rbf1 konnten genomweit Rbf1-Bindestellen ermittelt werden. Einige Bindestellen sind dabei mit *bbs* assoziiert, was auf eine mögliche kombinatorische Regulation von Zielgenen im Zusammenspiel mit dem bE/bW-Heterodimer hinweist (Ulrich, 2015).

Von *rbf1* werden eine Reihe weiterer Transkriptionsfaktoren induziert. Diese tragen gemeinsam zur Zellzyklus-Regulation und zum Wechsel vom haploiden, saprophytischen Wachstum zum polaren Wachstum des Filaments und somit zur pathogenen Entwicklung bei (Abbildung: 1.7). Der C2H2-Zinkfinger Transkriptionsfaktor Biz1 (*b-induced zinc finger 1*) reprimiert das mitotische Zyklin Clb1, dadurch wird der G2- Zellzyklusarrest nach der Bildung des Heterokaryons eingeleitet (Flor-Parra *et al.*, 2006). Die Deletion von *biz1* führt zu einer drastischen Reduktion der Appressorienbildung. Hyphen können zwar noch die Pflanzenoberfläche penetrieren, invasives Wachstum und Proliferation kann jedoch nicht mehr beobachtet werden. DNA-Microarray-Analysen zeigten weiter, dass *biz1* für die Regulation einer Vielzahl putativer sekretierter für *Ustilago maydis* spezifischer Proteine verantwortlich ist (Vranes, 2006). Zwei weitere durch Rbf1 induzierte Gene sind *hdp1* und *hdp2*, die beide für Homeodomänen-Transkriptionsfaktoren kodieren. Hdp1 beeinflusst ähnlich wie Biz1 den Zellzyklus (Pothiratana, 2008). Die *hdp1*-Deletion führt zu verkürzten Filamenten und die Anzahl von Filamenten mit zwei

Zellkernen steigt. In Infektionsstudien scheint die Deletion jedoch keinen Einfluss zu haben (Pothiratana, 2008). Die Deletion von *hdp2* führt hingegen zum Verlust der Appressorienbildung und ist damit essentiell für die Pathogenität (M. Scherer, pers. Mitteilung, (Lanver *et al.*, 2014)). Biz1 und Hdp2 werden zusätzlich *b*-unabhängig durch die beiden Proteine Sho1 und Msb2 gesteuert. Die Proteine sind an der Perzeption der hydrophoben Pflanzenoberfläche beteiligt und fließen nach der Bildung des *bW/bE* Heterodimers in die *b*-Regulationskaskade mit ein, um die Appressorienbildung zu gewährleisten (Lanver *et al.*, 2014). Rbf1 reguliert außerdem die Expression der MAPK Kpp6, die für eine effektive Penetration der Pflanzenoberfläche benötigt wird (Brachmann *et al.*, 2003).

Das ebenfalls direkt *b*-regulierte Gen *clp1* (*clampless 1*) kodiert für ein Protein, das Sequenzähnlichkeiten zu Clp1 aus *Coprinopsis cinerea* aufweist, und ist wie dieses (Kamada, 2002) an der Ausbildung von Schnallenzellen beteiligt. Wird *clp1* in *Ustilago maydis* deletiert, bleibt die Bildung von Schnallenzellen aus. Die Pflanze kann zwar noch penetriert werden, es findet allerdings keine Proliferation des Myzels innerhalb der Wirtspflanze statt. Die weitere pathogene Entwicklung ist somit blockiert (Scherer *et al.*, 2006). Das Gen *clp1* wird in dem in Abbildung 1.7 dargestellten Stadium der pathogenen Entwicklung zwar induziert, es wird jedoch kein stabiles Protein gebildet. Erst nach Stabilisierung sorgt es für die Aufhebung des G2-Zellzyklusarrest und somit für die Proliferation innerhalb der Pflanze (Heimel *et al.*, 2010a).

Die Pheromonkaskade und die *b*-Kaskade sind eng miteinander verknüpft. Ein aktives *b*-Heterodimer führt zu einer Reprimierung der *a*-Gene *mfa* und *pra*. Einige Faktoren der Pheromonkaskade besitzen allerdings eine zusätzliche Rolle während der pathogenen Entwicklung und innerhalb der *b*-Kaskade. So weist das mögliche Adaptorprotein Ubc2 eine N-terminale Domäne auf, die notwendig für die Hyphenfusion ist. Der Basidiomyceten-spezifische C-Terminus ist für die pathogene Entwicklung essentiell, spielt allerdings für die Zellfusion keine Rolle (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; die genauen Mechanismen sind jedoch unbekannt (Brefort *et al.*, 2009). (Abbildung 1.7). Da Prf1 sowohl die *a*-Gene als auch *bE* und *bW* induziert, stellt Prf1 eine Schlüsselkomponente im *Crosstalk* der *a*- und *b*-abhängigen Signalkaskaden dar (Feldbrügge *et al.*, 2004). Die beiden Signalwege werden weiter über Hdp1 miteinander verknüpft. Die *hdp1*-Expression ist sowohl *a*- als auch *b*-

abhängig, der *hdp1*-abhängige G2 Zellzyklus Arrest lässt sich sowohl vor der Pheromon-abhängigen Zellfusion als auch danach während des filamentösen Wachstums durch das *b*-Heterodimer beobachten. Hdp1 ist dabei jedoch nicht essentiell (Pothiratana, 2008).

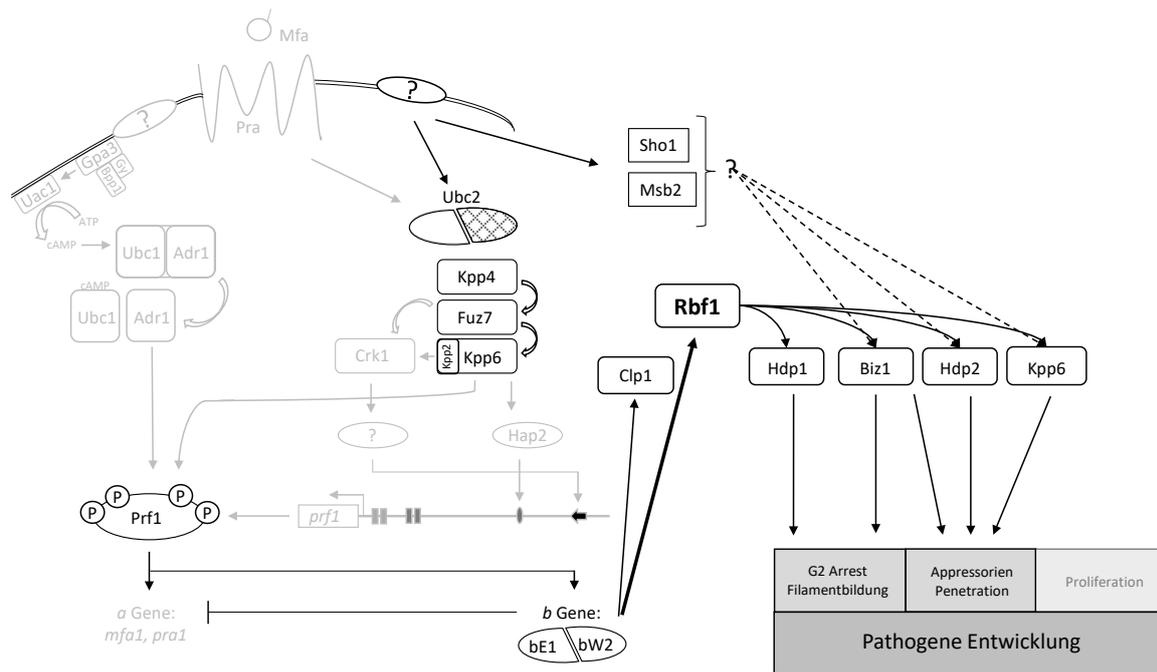


Abbildung 1.7: Schematische Darstellung der b-abhängigen Signalkaskade. Nach der Fusion zweier kompatibler Sporidien kann das bE/bW-Heterodimer gebildet werden. Als aktiver Transkriptionsfaktor bildet es so den zentralen Schalter der b-Kaskade. Die Gene *clp1* und *rbf1* werden direkt von b reguliert. Die Gene *hdp1*, sowie *biz1* werden, *rbf1*-abhängig exprimiert. Sie sind an der Bildung des Filaments beteiligt und regeln den G2-Zellzyklusarrest. Rbf1 induziert außerdem die Gene *hdp2* und *kpp6*, welche die Appressorienbildung und die Penetration der Pflanze, zusammen mit *biz1*, beeinflussen. Sho1 und Msb2 sind Sensoren für hydrophobe Oberflächen und haben ebenfalls einen noch nicht genau verstandenen Einfluss auf die Expression der Gene *hdp2*, *biz1* und *kpp6*. Sie sichern die Appressorienbildung. *clp1* wird in diesem Stadium zwar induziert, es wird jedoch kein stabiles Protein gebildet (Modifiziert nach Brefort *et al.*, 2009).

1.5 Zielsetzung

Alle biologischen Prozesse beruhen auf differenzieller Expression von Genen, deren Produkte anschließend gemeinsam zelluläre Funktionen ausmachen. Die Regulation der Transkription spielt somit eine zentrale Rolle, sowohl für differentielle Genexpression innerhalb der Zelle, als auch für Genaktivität aufgrund verschiedener Stimuli durch Signaltransduktion. Da sie meist mehr als ein Zielgen besitzen, werden sie selbst streng reguliert. Dabei kann ihre Aktivität entweder direkt durch die Synthese, durch posttranslationale Modifikationen wie z.B. Phosphorylierung, oder indirekt durch Stabilität, Abspaltung beziehungsweise Bindung eines Liganden oder Interaktionen mit weiteren Faktoren reguliert werden. Insgesamt entsteht so ein hochkomplexes, streng reguliertes Netzwerk aus positiven und negativen Rückkopplungsschleifen, sowohl posttranslational, als auch auf Transkriptionsebene. Zum Verständnis solcher Regulationsnetzwerke ist es notwendig Transkriptionsfaktoren zu identifizieren, Bindemechanismen zu entschlüsseln und Interaktionspartner sowie zugehörige Bindemotive und Zielgene zu finden.

In *Ustilago maydis* wird der Übergang zwischen saprophytischer und biotropher Lebensweise durch ein eng vernetztes Verbundsystem aus sich gegenseitig beeinflussenden Transkriptionsfaktoren gesteuert. Dieses Netzwerk verbindet Pheromon-abhängige Signale während der Paarung und Zellfusion mit der durch die Bildung des bE/bW-Heterodimer initiierten biotrophen Entwicklung. Dabei wird eine komplexe Regulationskaskade ausgelöst, in der der C2H2-Zinkfinger Transkriptionsfaktor Rbf1 eine entscheidende Rolle spielt. Auf transkriptioneller Ebene werden 90 % der *b*-abhängigen Gene von Rbf1 (*regulator of b-filament*) reguliert (Heimel *et al.*, 2010b).

Ziel dieser Arbeit war es das regulatorische Netzwerk um Rbf1 genauer zu analysieren. Die Untersuchung der Quervernetzung und möglicher kombinatorischer Regulation der von der *b*-Kaskade induzierten Transkriptionsfaktoren stand dabei im Vordergrund. Mit einer Kombination aus auf ChIP-Seq und RNA-Seq basierenden Experimenten sollte die physikalische und regulatorische Interaktion von bE/bW und Rbf1 und die kombinatorische Kontrolle von Zielgenen näher untersucht werden, und so deren zentrale Rolle für die Etablierung und Aufrechterhaltung der pathogenen Phase weiter entschlüsselt werden.

Parallel dazu sollte eine Grundlage für eine Zielgen-orientierte Untersuchung von regulatorischen Proteinen *in vivo* geschaffen werden. Dafür sollte die enChIP (*engineered DNA-binding molecule-mediated chromatin immunoprecipitation*), eine *in vivo* Methode zur Anreicherung spezifischer Chromatin-Regionen zusammen mit assoziierten Molekülen, in *Ustilago maydis* etabliert werden.

2. Ergebnisse

2.1 Untersuchung des transkriptionellen Netzwerks für die Transition von saprophytisch zu biotropher Lebensweise von *Ustilago maydis*

Die Kontrolle von zellulären Prozessen benötigt eine koordinierte Regulation von Genen in bestimmten zeitlichen und räumlichen Mustern. Ein Großteil dieser Kontrolle wird von Transkriptionsfaktoren bestimmt, die an DNA Sequenzen innerhalb des Chromatins binden und so Genexpression regulieren. Die Bindung an DNA ist meist sequenzspezifisch. Die Erkennung kann dabei sowohl durch den Transkriptionsfaktor selbst, als auch durch Komplexbildung mit anderen Proteinen bedingt sein. Die Identifizierung von Zielgenen und spezifischen Bindesequenzen von Transkriptionsfaktoren liefert Informationen sowohl über individuelle Prozesse, als auch darüber, wie Transkriptionsfaktoren innerhalb eines transkriptionellen Netzwerks interagieren und arbeiten.

Ustilago maydis besitzt einen diphasischen Lebenszyklus, bei dem der Pilz eine Transition von saprophytischer zu biotropher Lebensweise durchläuft. Dieser Vorgang wird streng reguliert durch eine Regulationskaskade, ausgelöst durch das bE/bW Heterodimer. In Vorarbeiten konnte gezeigt werden, dass der Transkriptionsfaktor Rbf1 dafür eine zentrale Rolle spielt. Die Deletion von *rbf1* hebt alle *b* vermittelten Prozesse auf, außerdem führt eine Induktion von *rbf1* alleine zu filamentösem Wachstum und einem G2 Zellzyklusarrest, entsprechend einer Induktion von *b* (Heimel *et al.*, 2010b). Microarray Analysen (Heimel *et al.*, 2010b) und ChIP-Seq Analysen (Ulrich, 2015) lieferten weitere Einblicke in das transkriptionelle Netzwerk, das für die Kontrolle des Übergangs zur pathogenen Lebensweise von *Ustilago maydis* nötig ist.

2.1.1 Identifizierung einer Konsensussequenz für die Rbf1-Bindung

In vorangegangenen ChIP-Seq Experimenten mit Rbf1 konnte kein eindeutiges Konsensusmotiv für die Rbf1-Bindung bestimmt werden. Allerdings fiel auf, dass Rbf1-*Peaks* alle bis dato beschriebenen b-Bindestellen beinhalten. Es wäre möglich, dass b und Rbf1 in diesen Fällen gemeinsam an DNA binden. Hier stellt sich die Frage ob Rbf1 überhaupt unabhängig von anderen Faktoren an DNA Binden kann und von welchen anderen Faktoren die Bindung noch beeinflusst werden könnte.

Zur Aufklärung der Rbf1-Bindung wurden ChIP-Seq (Chromatin-Immunopräzipitation mit anschließender DNA-Sequenzierung im Hochdurchsatz) Experimente wie beschrieben durchgeführt (4.4.8). Die Chromatin-Immunopräzipitation wurde mit den Stämmen UDS5 ($\Delta b::P_{crg1}:bW2$, $P_{crg1}:E1$, $rbf1:3xHA$) (**b**, **Rbf1**↓) und UMJ42 ($\Delta b::P_{crg1}:rbf1:3xHA$) (Δb , **Rbf1**↓) durchgeführt, in denen das für die Präzipitation verwendete Rbf1:3xHA Protein entweder indirekt über die *crg1*-Promotor-vermittelte Induktion von bE/bW oder direkt durch die *crg1*-Induktion von *rbf1* exprimiert wurde. Die Experimente wurden jeweils in biologischen Replikaten durchgeführt. Bei *crg1* handelt es sich um ein durch Glukose reprimiertes und durch Arabinose stark induziertes Gen für eine potentielle Arabinase in *Ustilago maydis*. Der *crg1*-Promotor wird standartmäßig für Induktionen von Genen durch Medienwechsel verwendet (Bottin *et al.*, 1996). Dazu kann der Promotor zusammen mit dem Gen zusätzlich zum nativen Gen ektopisch in den *cbx*-Locus eingebracht werden, wie im Fall von UMJ42, oder der Promotor wird über homologe Rekombination in den nativen Locus vor das Gen eingebracht, wie in UDS5 der Fall.

Nach der Sequenzierung der durch die Chromatin-Immunopräzipitation angereicherten DNA werden die *Reads* auf das Genom aligniert. Bereiche für die viel DNA angereichert werden konnte stellen sich visuell als *Peaks* dar (Details siehe 4.6).

Für die Identifizierung von potentiellen Konsensussequenzen für die Rbf1-Bindung wurden nun *Peaks* verwendet, die im *Peak-calling* jeweils in beiden biologischen Duplikaten signifikant waren, d.h. im Fall von Rbf1:3xHA für UDS5

und UMJ42, einen *pz-score* (*Peakzilla score* (Bardet *et al.*, 2013)) ≥ 80 bzw. ≥ 65 aufwiesen. Die *Peaks* wurden anschließend Genen zugeordnet. Die Kriterien für die Zuordnung sind im Material und Methodenteil (4.6) aufgeführt. In Abbildung 2.1 A ist ein proportionales Venn-Diagramm der Schnittmengen beider Experimente zu sehen. In UMJ42 (*a2*, $\Delta b::P_{crg1}:rbf1:3xHA$) konnten die Promotoren von 66 Genen identifiziert werden, an denen Rbf1:3xHA bindet. In diesem Stamm wird *rbf1:3xHA* direkt über den *crg1*-Promotor induziert und der *b*-Locus ist deletiert; angereichert werden also Promotoren, in denen Rbf1 unabhängig von *bE/bW* bindet. In UDS5 (*a2*, $\Delta b::P_{crg1}:bW2$, $P_{crg1}:E1$, *rbf1:3xHA*) wird die *rbf1:3xHA* Expression durch *bE/bW* induziert; in diesem Stammhintergrund bindet Rbf1:3xHA an die Promotoren von 211 Genen, wobei 64 dieser Gene auch *b*-unabhängig im UMJ42-Hintergrund gebunden werden (*1).

Interessanterweise werden in UDS5 (**b**, **Rbf1**↓) über 3-mal mehr Promotoren von Rbf1 gebunden als in UMJ42 (Δb , **Rbf1**↓). In UDS5 wird *rbf1* über die *b*-Kaskade induziert, in UMJ42 ist *b* deletiert und *rbf1* wird direkt induziert. Durch die Induktion von *b* in UDS5 sind im direkten Vergleich zu UMJ42 zusätzliche *b*-abhängige Gene exprimiert, die die Bindung von Rbf1 beeinflussen können. Eine mögliche Erklärung für die vermehrt auftretenden Rbf1-Bindungen in UDS5 könnte die Rbf1-Abundanz in diesen Stammhintergründen sein. Unphysiologisch hohe Proteinkonzentrationen könnten zur Bindung an wenig affine Sequenzmotive führen, wodurch die Bestimmung der Konsensussequenz erschwert würde. In UMJ42 kann zwar eine 9-fach höhere *rbf1* Transkriptmenge detektiert werden, allerdings wird weniger Rbf1-Protein produziert als in UDS5; das Rbf1 Protein scheint in UDS5 stabiler zu sein oder effizienter translatiert zu werden (Abbildung 6.1, Anhang). Rbf1 könnte zusammen mit anderen Faktoren *b*-abhängig an zusätzliche Stellen binden. Kombinatorische Bindung beeinflusst oft die Binde-Motive der Transkriptionsfaktoren, deshalb wurde zunächst das Rbf1-Konsensusmotiv für die Bindungen in UMJ42, also *b*-unabhängig ermittelt. Zur Identifizierung potentieller Binde-Motive wurden die Sequenzen der gefilterten *Peaks* mit der MEME-Suite mit MEME-ChIP (Multiple EM for Motif Elicitation) und mit FIMO (Find Individual Motif Occurrences) analysiert (Bailey *et al.*, 2009). Als Input

dienten dabei FASTA-Dateien bestehend aus je 328 bp langen Sequenzen um die Maxima der signifikanten *Peaks* (*cookie cuts*). Eine MEME-ChIP Analyse der *Peaks* der in Abbildung 2.1 A dargestellten Überlappung aus beiden Experimenten (*1) lieferte ein in den Input Sequenzen zentral angereichertes 11 bp langes Motiv (Abbildung 2.1 B; *E-value*: $1.2e-7$). Die dargestellten 64 Gene werden durch 54 Promotoren reguliert, von denen jeweils der *Peak* mit dem höchsten *pz-score* in die MEME Analyse einging. Das Motiv konnte in den 54 Sequenzen 26-mal identifiziert werden. Eine FIMO Analyse mit diesem Motiv zeigt, dass 34 der 64 Gene das Motiv mindestens einmal in ihrem Promotor enthalten. Das Motiv kann allerdings mehrfach im selben Promotor vorhanden sein. (Abbildung 2.1 A; Zahl in Klammern).

Um die Rbf1-Bindung weiter zu untersuchen wurden die verschiedenen Teilmengen *1, *2 und *3 der in Abbildung 2.1 A dargestellten Gene mit MEME und CentriMo (Local Motif Enrichment Analysis) analysiert. Die ermittelten Teilmengen sind in (Abbildung 6.2 A-C; Anhang) gezeigt. Die CentriMo Analyse der Teilmengen zeigt deutlich die zentrale Anreicherung des Motivs innerhalb der untersuchten Sequenzen (Exemplarisch für *3 dargestellt in Abbildung 6.2 D; Anhang). Die zentrale Anreicherung von Motiven innerhalb der mit ChIP-Seq ermittelten *Peaks* dient als zusätzlicher Hinweis, dass es sich bei der Konsensussequenz tatsächlich um das Bindemotiv des untersuchten Transkriptionsfaktors handelt. Die Konsensussequenzen der verschiedenen Teilmengen wurden mit TOMTOM (Motif Comparison Tool) (Bailey *et al.*, 2009) verglichen, dabei konnte keine signifikante Veränderung festgestellt werden (Tabelle 6.1; Anhang). Eine FIMO Analyse der Teilmengen zeigte jedoch, dass die Rbf1-Konsensussequenz in UMJ42 in 53 % der angereicherten Promotoren vorkommt, in der Differenzmenge *2 nur in 39 % der Promotoren gefunden wird. Zusammenfassend sprechen diese Untersuchungen dafür, dass die vermehrte Rbf1-Bindung in UDS5 zum einen durch eine Erhöhung der Protein-Abundanz, zum anderen durch kombinatorische Bindemechanismen zustande kommt.

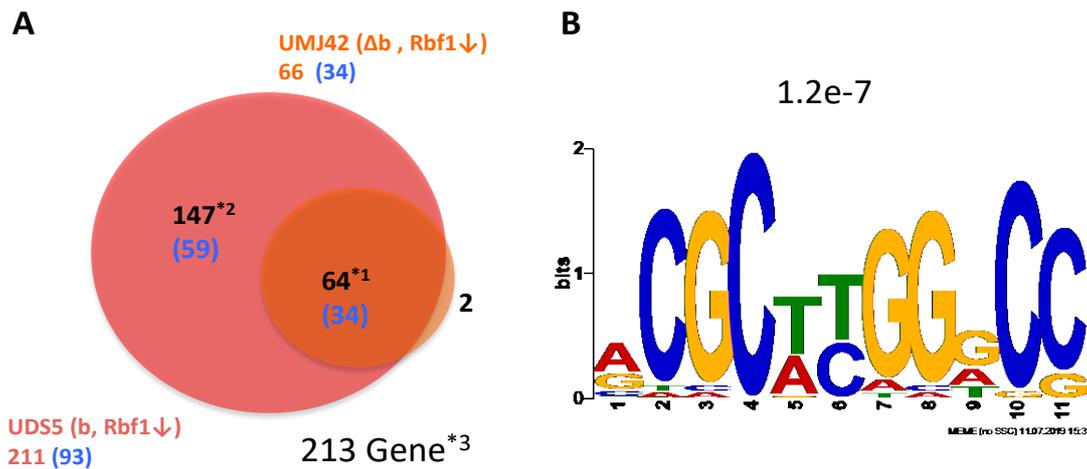


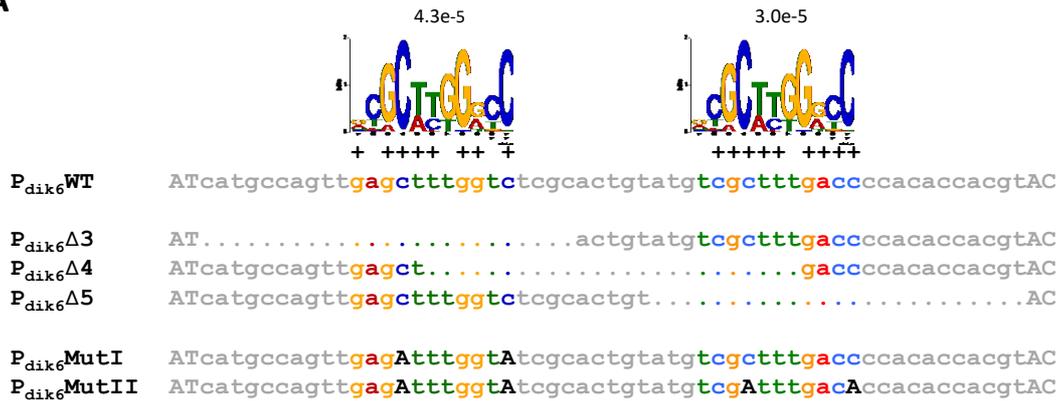
Abbildung 2.1: (A) Venn-Diagramm; Gene deren Promotoren mit Rbf1:HA angereichert wurden; UMJ42 ($a2$, $\Delta b::P_{crg1}:rbf1:3xHA$) (Δb , Rbf1 \downarrow) gegen UDS5 ($a2$, $\Delta b::P_{crg1}:bW2$, $P_{crg1}:E1$, $rbf1:3xHA$) (b, Rbf1 \downarrow). Zahlen beziehen sich auf Gene, deren Promotoren mit Rbf1:3xHA im jeweiligen Stammhintergrund angereichert werden konnten. Promotoren können dabei mehr als einen *Peak* beinhalten. Derselbe *Peak* kann außerdem, im Fall von divergenten Promotoren, auf zwei Gene bezogen sein. Dargestellt sind proportionale Überlappungen. Zahlen in Klammern stehen für die Anzahl der Promotoren mit mindestens einer Rbf1-Konsensussequenz, ermittelt mit FIMO, die *einen* p -value $< 10^{-4}$ aufweisen. Der p -value für das Vorhandensein eines Motivs ist definiert als die Wahrscheinlichkeit der Übereinstimmung einer zufälligen Sequenz der gleichen Länge mit dieser Position mit besserem oder gleichem Wert. **(B): Rbf1-Konsensussequenz. Die Konsensussequenz wurde mit MEME erstellt, dargestellt ist die *position weight matrix*. Sie gibt die Wahrscheinlichkeit für das Vorkommen eines Nukleotids innerhalb der Konsensussequenz an, repräsentiert durch die Höhe der Darstellung des jeweiligen Nukleotids bezogen auf das gesamte Motiv. Als Input wurden 328 bp lange Sequenzen um die Maxima der Rbf1-HA *Peaks* (*cookie cuts*) aus dem Überlapp beider in A dargestellten Experimente verwendet (*1). Der über dem Motiv angegebene MEME E -Value basiert auf einem Likelihood-Quotienten-Test, der die Höhe (Wahrscheinlichkeit des Vorkommens des jeweiligen Nukleotids an einer bestimmten Stelle) und Anzahl der Nukleotide innerhalb der Konsensussequenz, und die Nukleotid-Häufigkeitsverteilung sowie Größe der Input Sequenzen berücksichtigt.**

Um die Funktionalität des über ChIP-Seq ermittelten Rbf1-Konsensusmotivs für die Bindung von Rbf1 zu bestätigen, wurde der *dik6*-Promotor in einem GFP Reporter Assay verwendet. Bei *dik6* handelt es sich um ein *rbf1*-reguliertes Gen, wobei Rbf1 für die Induktion des *dik6*-Gens notwendig und ausreichend ist. Durch systematische Deletionsanalysen konnte der Bereich des *dik6*-Promotors, der für die Rbf1-abhängige Induktion notwendig ist, auf -515 bis -570 (in Bezug auf das *dik6*-ATG) eingegrenzt werden (Heimel *et al.*, 2010b; Fortenbacher, 2016). Eine MAST (Motif Alignment & Search Tool) Analyse des *dik6*-Promotors mit dem durch ChIP-Seq ermittelten Rbf1-Konsensusmotiv

zeigte zwei Übereinstimmungen mit zwei 11 bp Sequenzen an Position -526 bis -537 und -549 bis -560. Zur weiteren Analyse wurden in diesen beiden 11 bp Sequenzen Mutationen der beiden am stärksten konservierten Nukleotide des Konsensusmotivs eingeführt. Die Cytosine an Position vier und 11 wurden dafür durch Adenin, wie in Abbildung 2.2 A dargestellt, ersetzt.

Die *Pdik6*-GFP Reporter-Konstrukte wurden als *Einfach*-Integrationen in den *cbx*-Locus von *Ustilago maydis* CP27 (*a2*, $\Delta b::P_{crg1}:rbf1$) eingebracht. Die Expression von *rbf1* wurde in Arabinose-Medium induziert, und die Transkriptmengen von *rbf1* und des GFP-Reporters über qRT-PCR bestimmt. Die Stämme mit internen Deletionen $\Delta 3$, $\Delta 4$ und $\Delta 5$ im *dik6*-Promotor (Fortenbacher, 2016), die im Bereich der postulierten Rbf1-Konsensussequenzen liegen (Abbildung 2.2 A), weisen eine signifikant verringerte GFP Expression auf. Bei der Deletion $P_{dik6}\Delta 4$, die beide putativen Rbf1-Bindestellen betrifft, ist kaum noch *rbf1*-Transkript detektierbar. $P_{dik6}\Delta 3$ und $P_{dik6}MutI$ führen zu ähnlichen verringerten Transkriptmengen. In $P_{dik6}MutI$ ist die erste der beiden 11 bp Sequenzen mutiert, diese fehlen in $P_{dik6}\Delta 3$ komplett. Werden beide Bindestellen mutiert ($P_{dik6}MutII$) lässt sich kein Transkript mehr detektieren (Abbildung 2.2 B). Somit sind beide 11 bp Sequenzen für eine *rbf1*-abhängige *dik6*-Expression notwendig und stellen echte Rbf1-Bindestellen dar.

A



B

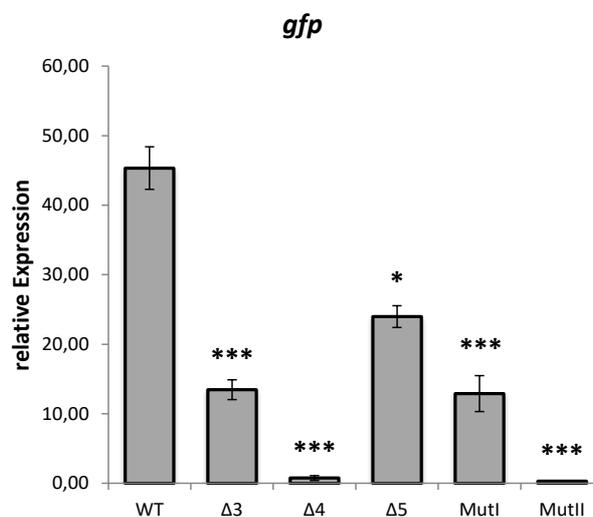


Abbildung 2.2: (A) qRT-PCR von *gfp* im *dik6*-Promotor Assay. Die Stämme CP40 (*a2 Δb::P_{crg1}:rbf1 ip'[P_{dik6_816}:gfp]ip^s*) (WT), UJF17 (*a2, Δb::P_{crg1}:rbf1 ip'[P_{dik6_816}Δ3:gfp]ip^s*) (Δ3), UJF20 (*a2, Δb::P_{crg1}:rbf1 ip'[P_{dik6_816}Δ4:gfp]ip^s*) (Δ4), UJF3 (*a2, Δb::P_{crg1}:rbf1 ip'[P_{dik6_816}Δ5:gfp]ip^s*) (Δ5), UJU6 (*a2 Δb::P_{crg1}:rbf1, ip'[P_{dik6_816}_MutI:gfp]ip^s*) (MutI) und UMA11 (*a2, Δb::P_{crg1}:rbf1, ip'[P_{dik6_816}_MutII:gfp]ip^s*) (MutII) wurden wie beschrieben behandelt. Transkriptmengen wurden mittels qRT-PCR analysiert. Die *gfp*-Expression ist verglichen mit WT in allen Stämmen signifikant reduziert. In MutII ist kaum noch Transkript nachzuweisen. *eIF2b* (*UMAG_04869*) wurde als Haushaltsgen zur Normalisierung verwendet. Kontrollen zur *rbf1*-Induktion wurden durchgeführt (nicht gezeigt). Das Experiment wurde mit je zwei biologischen Duplikaten in technischen Duplikaten durchgeführt (außer für Δ5; nur technisches Duplikat). Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung der Mittelwerte der biologischen Duplikate. Statistische Signifikanz wurde mit dem *Student's t-test* ermittelt. **p*-value ≤ 0.05, ** *p*-value ≤ 0.01, und *** *p*-value ≤ 0.001. (B) Überblick über Deletionen und Mutationen in den Rbf1-Konsensussequenzen im *Pdik6*-Promotor. Rbf1-Konsensussequenz aus Abbildung 2.1 B, dargestellt als *position weight matrix* mit *p*-value. +: Übereinstimmung der Promotorsequenz mit dem *best possible match* der Konsensussequenz. Grau: *Pdik6*-Promotor Kontext,: interne Deletionen, schwarzes A: Austausch der entsprechenden Base durch Adenin (in MutI und MutII).

2.1.2 Rbf1 und das bE/bW Heterodimer binden zusammen an Promotoren

In den ChIP-Seq Experimenten mit Rbf1:3xHA in UDS5 (*a2, Δb::P_{crg1}:bW2, P_{crg1}:bE1, rbf1:3xHA*) konnte die Bindung von Rbf1 an verschiedenen Promotoren gezeigt werden, die eine konservierte Bindestelle für das bE/bW Heterodimer besitzen (*b-binding site*) (Romeis *et al.*, 2000; Scherer *et al.*, 2006; Brachmann *et al.*, 2001; Heimel *et al.*, 2010b; vgl. Abbildung 2.3 A). Die Maxima der *Peaks* liegen dabei sehr nahe der *bbs*. Zur weiteren Analyse wurde ein ChIP-Seq Experiment mit dem Stamm UDS1 (*a2, Δb::P_{crg1}:bW2, P_{crg1}:bE1:3xHA*) durchgeführt. In UDS1 (**b↓, Rbf1**) kann wie in UDS5 (**b, Rbf1↓**) die b-Kaskade über den Arabinose-abhängigen *crg1*-Promotor induziert werden; allerdings ist in UDS1 bE1 mit einem 3xHA-tag versehen; mit der ChIP werden Sequenzen angereichert, an die das bE/bW Heterodimer bindet. Für die Analyse wurden nur *Peaks* verwendet, die im *Peak-calling* in beiden biologischen Duplikaten signifikant waren, d.h. einen *pz-score* ≥ 80 aufwiesen. Signifikanten *Peaks* wurden wie bereits beschrieben Gene zugeordnet. Insgesamt konnten in UDS1 die Promotoren von 23 Genen angereichert werden. Zur Verifizierung der bereits bekannten *bbs* wurden die Sequenzen der gefilterten *Peaks* mit MEME analysiert. Es konnte ein 18 bp langes Motiv mit einem *E-Value* von $1.1 \cdot 10^{-13}$ ermittelt werden, das in den 21 analysierten Sequenzen 14-mal vorkommt (vgl. Abbildung 2.3 A). Dieses Motiv überlappt mit der bereits beschriebenen *b*-Bindesequenz (Romeis *et al.*, 2000; Scherer *et al.*, 2006; Brachmann *et al.*, 2001; Heimel *et al.*, 2010b), definiert den Konsensus jedoch präziser. Mit dem erweiterten *b*-Konsensusmotiv konnten durch MAST Analysen in den Promotoren von *rbf1* und *clp1* weitere, bisher nicht identifizierte *bbs* detektiert werden (Abbildung 2.3 A). Die Positionen der neu identifizierten *bbs* korrelieren mit *Peaks* der ChIP Seq. Im Bereich des *rbf1*-Promotor liegen drei *bbs*-Konsensusmotive (Abbildung 2.3 C), von denen zwei bereits auf Funktionalität untersucht worden sind (Heimel). Die Deletion von *bbs*₋₉₈₁ hat keinen Einfluss auf die *b*-abhängige *rbf1*-Expression, *bbs*₋₁₃₇₇ ist für die *b*-abhängige *rbf1*-Induktion essentiell (Heimel *et al.*, 2010b). Die Funktion der dritten *bbs*₋₂₇₇₈ wurde mit einem GFP Reporter Assay weiter untersucht. Dazu wurden P_{*rbf1*}:GFP Konstrukte als Einfach-

Integrationen in den *cbx*-Locus von *Ustilago maydis* AB31 (*a2*, $\Delta b::P_{crg1}:bE1$, $P_{crg1}:bW2$) eingebracht. Verwendet wurde der native Promotor (WT), eine Version mit interner Deletion der *bbs*-1377 ($\Delta 1$) bzw. der *bbs*-2778 ($\Delta 2$) und eine Doppeldeletion beider *bbs* ($\Delta\Delta$). Die Expression von bE/bW wurde durch Arabinose induziert, und Transkriptmengen von bE, bW (als Induktionskontrolle) und des GFP-Reporters wurden mittels qRT-PCR analysiert. Die Deletion von *bbs*-2778 ($\Delta 2$) führt ebenfalls zu einer deutlichen Abnahme der *b*-abhängigen *rbf1*-Induktion, allerdings nicht so drastisch wie die Deletion von *bbs*-1377. Sowohl *bbs*-1377 als auch *bbs*-2778 sind somit für die *b*-abhängige *rbf1*-Expression notwendig.

Ein Vergleich der ChIP-Seq von UDS5 (**b**, **Rbf1**↓) mit UDS1 (**b**↓, **Rbf1**) zeigt, dass der Großteil der Gene mit Promotoren, die mit Rbf1:3xHA angereichert werden können, nicht mit bE1:3xHA angereichert werden. Interessanterweise können jedoch, in der reziproken Betrachtung, fast alle Gene (91 %), deren Promotoren mit bE1:3xHA angereichert werden können, auch mit Rbf1:3xHA angereichert werden (Abbildung 2.3 B). Bei genauer Betrachtung fällt auf, dass für diese Promotoren die *Rbf1*-Peaks oft mit *b*-Bindestellen überlagern. Analysiert man die 21 Promotoren der Schnittmenge (1*) mit FIMO, weisen 6 mindestens eine *bbs*, 8 mindestens eine *bbs* und eine *Rbs* (Rbf1-bindingssite), und 7 keine *b*-Bindestellen auf. Befinden sich beide Bindestellen im Promotor, können die *Peaks* wie im Fall von UMAG_06383 klar getrennt sein (139 bp Abstand der *bbs* von der *Rbs*), bei der Mehrzahl überlagern sich die *Peaks* allerdings, wie z.B. im Promotor von *Iga2*. Dort liegen die *Rbs* und die *bbs* lediglich 24 bp voneinander entfernt, im Fall von UMAG_01262 (*polX*) sogar nur 16 bp.

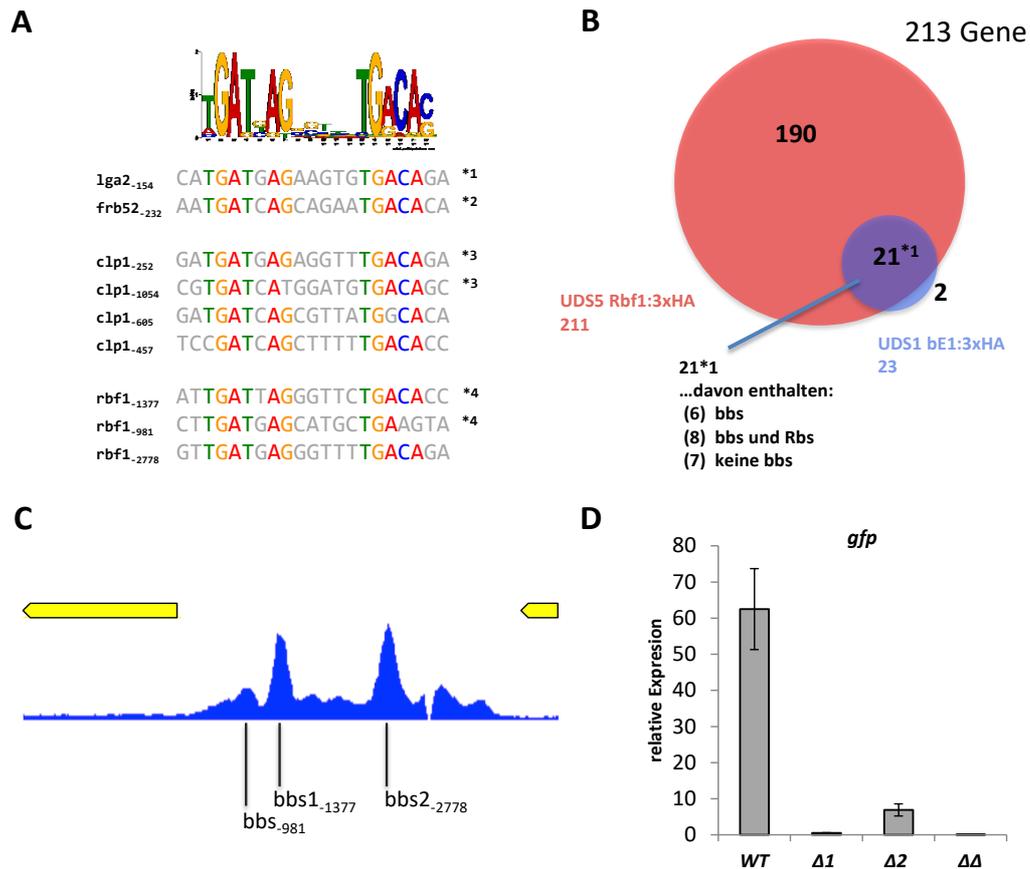


Abbildung 2.3: (A) Vergleich der b-Konsensussequenz mit bekannten bbs. Die Konsensussequenzen wurden mit MEME ermittelt und sind als *position weight matrix* dargestellt. Als Input für die MEME-Analyse wurden 328 bp lange Sequenzen um die Maxima der bE1:HA *Peaks (cookie cuts)* aus dem Überlapp der in B dargestellten Experimente verwendet (*1). Exakte Übereinstimmungen der b-Bindestellen mit dem b-Konsensusmotiv sind farbig dargestellt. Die tiefgestellte Zahl gibt die Position der Bindestelle innerhalb des Promotors bezogen auf das ATG an. *bbs* entnommen aus *1 (Romeis *et al.*, 2000), *2 (Brachmann *et al.*, 2001), *3 (Scherer *et al.*, 2006), *4 (Heimel *et al.*, 2010b). Im *clp1*- und im *rbf1*-Promotor konnten weitere *bbs* identifiziert werden. **(B) Venn-Diagramm ChIP-Seq UDS5 gegen UDS1.** Zahlen beziehen sich auf Gene, deren Promotoren im jeweiligen Stammhintergrund angereichert werden konnten. Die Schnittmenge *1 ist weiter aufgeschlüsselt. Angegeben ist die Verteilung von *bbs* und *Rbs* in den Promotoren. **(C) Visuelle Darstellung der Reads aus der ChIP-Seq mit UDS1 im *rbf1*-Promotor.** Reads wurden mit Bowtie2 version 2.0.0-beta7 (Langmead und Salzberg, 2012) 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 normalisierte *Read-counts*. Positionen der *bbs* sind angegeben. **(D) qRT-PCR von *gfp* im *rbf1*-Promotor Assay.** Die Stämme UJU16 (*a2*, $\Delta b::P_{crg1}:bE1$, $P_{crg1}:bW2$, *ip*[$P_{rbf1_WT}:gfp$]*ip*^s) (WT), UJU18 ($\Delta 1$), UJU19 ($\Delta 2$), und UJU17 ($\Delta\Delta$) wurden wie bereits beschrieben behandelt. Transkriptmengen wurden mittels qRT-PCR analysiert. *bbs*₋₁₃₇₇ ($\Delta 1$) ist essentiell für die *b*-abhängige Expression. Wird nur *bbs*₋₂₇₇₈ ($\Delta 2$) deletiert kann noch ein geringes Transkriptlevel detektiert werden. *eIF2b (UMAG_04869)* wurde als Haushaltsgen zur Normalisierung verwendet. Kontrollen zur *crg1*-Induktion wurden durchgeführt (nicht gezeigt). Biologische Duplikate sind nebeneinander dargestellt. Das Experiment wurde mit biologischen Duplikaten durchgeführt. Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung der Mittelwerte der biologischen Duplikate.

Zur genaueren Analyse des Zusammenspiels aus Rbf1- und b-Bindung wurde eine weitere ChIP-Seq in einem Stamm durchgeführt, in dem die Bindung von bE1 ohne Rbf1 ($\Delta rbf1$) adressiert wurde (UJU1.14 ($a2, \Delta b::P_{crg1}:bW2, P_{crg1}:bE1:3xHA; \Delta rbf1$)). Die visuelle Inspektion und FIMO Analysen von 21 Promotoren, die sowohl mit Rbf1:3xHA als auch mit bE1:3xHA angereichert werden können, zeigt eine Kombinatorik für die Bindung von Rbf1 und bE/bW. Weder in UMJ42 ($a2, \Delta b::P_{crg1}:rbf1:3xHA$) ($\Delta b, rbf1\downarrow$) noch in UJU1.14 ($b\downarrow, \Delta rbf1$) kann eine signifikante Bindung der Proteine an die entsprechenden Bindestellen beobachtet werden. Damit binden Promotoren, die eine *Rbs* und eine *bbs* besitzen, sowohl Rbf1 als auch bE/bW, allerdings nur, wenn der jeweils andere Faktor vorhanden ist (Abbildung 2.4; oben). An Promotoren, die nur eine *bbs*, aber keine *Rbs* aufweisen, bindet bE/bW auch im *rbf1*-Deletionshintergrund ($\Delta b, rbf1\downarrow$). Die Region kann zusätzlich auch mit Rbf1 angereichert werden, allerdings nur, wenn bE/bW vorhanden sind und binden (Abbildung 2.4; unten). Das spricht für eine Protein- Protein Interaktion zwischen b und Rbf1, bei der Rbf1 nicht direkt an DNA bindet. Es wäre außerdem möglich, dass durch die Interaktion die Bindungsspezifität von Rbf1 verändert wird, so dass auch Bindestellen, die nicht dem Rbf1-Konsensus entsprechen, erkannt und gebunden werden.

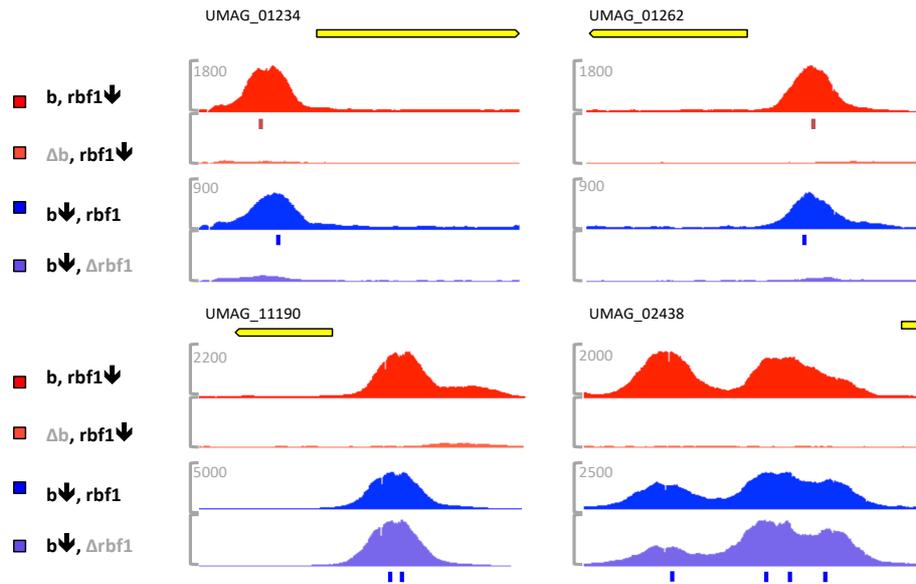


Abbildung 2.4: Visuelle Darstellung von Peaks und Bindestellen der ChIP-Seq von UDS5 (rot), UMJ42 (orange), UDS1 (blau) und UJU1.14 (schieferblau) in exemplarischen Promotoren. Reads wurden mit Bowtie2 version 2.0.0-beta7 (Langmead und Salzberg, 2012) auf das *Ustilago maydis* Genom (Ensembl Genomes 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. Die Skalierung entspricht sofern nicht extra angegeben der des darüber liegenden Tracks. Der Status der Transkriptionsfaktoren b und Rbf1 ist vor jedem Track dargestellt (schwarz: exprimiert, grau: nicht exprimiert, ↓: mit 3xHA-tag versehener Transkriptionsfaktor für die ChIP-Seq). Positionen der Bindestellen sind rot (Rbs) und blau (bbs) gekennzeichnet.

Von 23 Promotoren (entsprechend 26 Genen), an denen bE/bW bindet, ist *rbf1* bei fünf Promotoren für die Bindung von bE/bW notwendig: im $\Delta rbf1$ -Hintergrund kann keine signifikante Bindung von bE/bW mehr detektiert werden (*UMAG_12024*, *UMAG_01234*, *UMAG_01262*, *UMAG_06383* und *Iga2*). In diesen Promotoren ist somit Rbf1 notwendig für die Bindung des bE/bW Heterodimers. Alle fünf Promotoren besitzen außerdem eine Rbs. Die Expression von vier der Gene wird sowohl durch *rbf1* als auch durch bE/bW beeinflusst: die Deletion von Rbf1 führt bei zwei (*Iga2* und *UMAG_12024*) zum Verlust, bei zwei (*UMAG_01234* und *UMAG_01262*) zu einer stark verminderten Expression nach bE/bW Induktion. Die ektopische Induktion von *rbf1* in einem Δb -Hintergrund reicht für die Expression aus, sie ist allerdings reduziert. *UMAG_06383* wird trotz Bindung der Transkriptionsfaktoren nicht differentiell reguliert. (RNA-Seq diese Arbeit). *UMAG_12024* (*hdp1*) codiert für einen Homeodomänen-Transkriptionsfaktor, der das filamentöse Wachstum

und den Zellzyklus Arrest moduliert (Pothiratana, 2008). *Iga2* und *rga2* werden gemeinsam von einem divergenten Promotor aus transkribiert. Die Gene liegen im *a2*-Locus und sind bei der uniparentalen Vererbung der mitochondrialen DNA nach der Fusion von Sporidien beteiligt (Fedler *et al.*, 2009). Bei *UMAG_01234* und *UMAG_01262* handelt es sich um zwei der am stärksten *b*-induzierte Gene in *Ustilago maydis*. *UMAG_01234* besitzt ein Leucin-rich Repeat Motiv, die Deletion im solopathogenen Stamm SG200 zeigt jedoch keine Veränderung der Pathogenität in Infektionsstudien (Heimel *et al.*, 2010b). *UMAG_01262* (*frb52; polX*) gehört wie *UMAG_01234* zu den früh *b*-induzierten Genen. In Infektionsstudien mit Kreuzungen aus *FB1ΔUMAG_01262* und *FB2ΔUMAG_01262* kann eine leicht reduzierte Pathogenität festgestellt werden, Spornbildung und Sporenkeimung sind nicht beeinflusst (Brachmann *et al.*, 2001). Das trotz *b*- und Rbf1-Bindung nicht differentiell regulierte Gen *UMAG_06383* kodiert für ein Protein mit Homologien zu MAP-Kinasen.

Alle bereits beschriebenen Gene mit *b*- und Rbf1-Bindestellen im Promotor, deren Bindung vom jeweils anderen Transkriptionsfaktor beeinflusst wird bzw. direkt abhängt spielen somit eine Rolle während der Transition von hefeartigem zu filamentösem Wachstum.

Zusammenfassend bilden Rbf1 und das *bE/bW*-Heterodimer Komplexe die über einen der beiden Faktoren mit DNA assoziiert sind oder gemeinsam an DNA binden, wobei dann beide Proteine für die Bindung notwendig sind. Dass der Großteil der mit Rbf1:3xHA anreicherbaren Promotoren zwar ein aktives *b* benötigt, allerdings nicht mit *bE1*:3xHA angereichert werden kann, und nicht die Rbf1-Bindestelle enthält, spricht weiterhin dafür, dass Rbf1 zusätzlich mit weiteren unbekanntem Faktoren interagiert, um seine Bindesequenz-Spezifität zu modulieren.

2.1.3 Rbf1 interagiert mit weiteren Transkriptionsfaktoren

Zur Überprüfung ob Rbf1 und b im selben Komplex vorkommen und ob es noch weitere Interaktionspartner für bE/bW und/oder Rbf1 gibt, wurde eine Co-Immunopräzipitation (CoIP) mit anschließender Flüssigchromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung (LC-MS) durchgeführt. Dazu wurden die Stämme verwendet, in denen *rbf1* über die *crg1*-Promotor-vermittelte Induktion von bE/bW exprimiert wird. In UDS5 (*a2*, $\Delta b::P_{crg1}:bW2$, $P_{crg1b}E1$; *rbf1:3xHA*) wurde die IP mit Rbf1:3xHA und in UDS1 (*a2*, $\Delta b::P_{crg1}:bW2$, $P_{crg1}:bE1:3xHA$) mit bE1:3xHA durchgeführt. Die Stämme wurden wie bereits beschrieben für 5h induziert. Um unspezifische Proteine zu identifizieren wurde AB31 (*a2*, $\Delta b::P_{crg1}:bW2$, $P_{crg1}:bE1$) als Negativkontrolle mitgeführt. Die Proteinextrakte wurden wie in (4.4.3) beschrieben behandelt anschließend in Kooperation mit dem GZMB (Göttingen Center for Molecular Biosciences) an der Georg-August Universität Göttingen analysiert (4.6). Als Qualitätskontrolle wurde vor der LC-MS Analyse ein Westernblot durchgeführt, um die Proteinlevel der IP zu überprüfen. In allen IPs (Immunopräzipitationen) konnte ausreichend Protein angereichert werden (Abbildung 2.5).

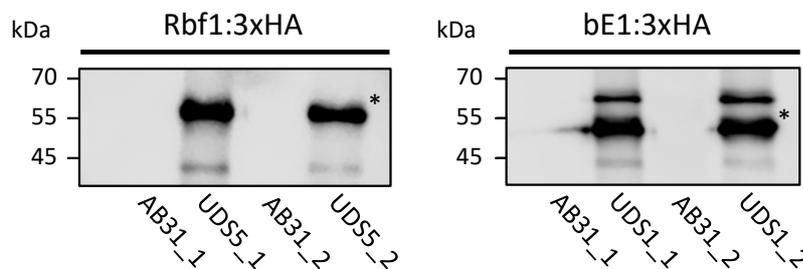


Abbildung 2.5: Westernblot der IPs von Rbf1:3xHA (UDS5) und bE1:3xHA (UDS1). Die Stämme AB31 (*a2*, $\Delta b::P_{crg1}:bW2$, $P_{crg1}:bE1$), UDS1 (*a2*, $\Delta b::P_{crg1}:bW2$, $P_{crg1}:bE1:3xHA$) und UDS5 (*a2*, $\Delta b::P_{crg1}:bW2$, $P_{crg1b}E1$; *rbf1:3xHA*) wurden in CM-Flüssigmedium mit 1 % Glukose auf eine $OD_{600} = 0,8$ angezogen und anschließend in CM-Flüssigmedium mit 1 % Arabinose geschiftet um die *crg1*-Promotor abhängige *b*-Expression zu induzieren. Die Zellen wurden 5h inkubiert und anschließend geerntet. Proteine wurden extrahiert und es wurde eine Immunopräzipitation mit HA-Agarose durchgeführt. Eluierte Fraktionen wurden als Qualitätskontrolle vor der LC-MS untersucht. Die Proben wurden über eine SDS-PAGE (10 %) aufgetrennt und durch Westernblot analysiert. Für die Detektion wurde ein anti-HA Antikörper verwendet. Als Negativkontrolle wurde der Stamm AB31 mitgeführt (gleicher Genotyp ohne HA-Tag). Sterne zeigen die Rbf1:3xHA bzw. bE1:3xHA Fusionsproteine mit einer berechneten Größe von ~49 kDa bzw. ~57 kDa.

In der LC-MS Analyse wurden insgesamt 33 Proteine sowohl mit Rbf1:3xHA als auch mit bE1:3xHA co-immunopräzipitiert, die nicht in der Negativkontrolle AB31 vorkamen (Tabelle 6.2; Anhang). Sowohl bE1 als auch bW2 konnten mit Rbf1:3xHA co-immunopräzipitiert werden. Die Co-Präzipitation von bE1 und bW2 mit Rbf1:3xHA und die hohe Schnittmenge der co-präzipitierten Proteine beider IPs spricht für einen Komplex, in dem Rbf1 und bE/bW gemeinsam vertreten sind. Weiterhin wurden 10 Proteine mit potentiellen DNA-Binde-Eigenschaften in beiden IPs co-präzipitiert. Darunter befinden sich, wie zu erwarten, bW2 (UMAG_00578), da es mit bE1 ein Heterodimer bildet (Kämper *et al.*, 1995) sowie der Homeodomänen-Transkriptionsfaktor Hdp1 (UMAG_12024).

Zur quantitativen Analyse wurde die LC-MS in biologischen Duplikaten wiederholt. Die Daten sind als Heatmap in Abbildung 2.6 dargestellt. Jedes biologische Duplikat entspricht einer Spalte. Die Werte (Zeilen) der Proteine innerhalb der Spalten sind entsprechend ihrer Abundanz gefärbt, wofür hohe bzw. niedrige \log_2 LFQ (label-free quantification) Werte in rot und blau dargestellt sind. Der Bereich der \log_2 LFQ Werte ist unten dargestellt (Abbildung 2.6).

Bei UMAG_02438 (oberstes Protein) handelt es sich um das Clp1 Protein, dessen Interaktion mit bE1 und Rbf1 bereits nachgewiesen wurde (Heimel *et al.*, 2010a). Orange markiert ist bE1, das in UDS1 direkt immunopräzipitiert wurde. Blau markiert sind Proteine mit potentiell DNA-bindender Funktion. Bei dem mit * markierten *cluster* handelt es sich um die in Beiden verschiedenen IPs am stärksten angereicherten Proteine. Bei UMAG_00578 handelt es sich um das bW2 Protein, das zusammen mit bE1 ein heterodimer bildet (Kämper *et al.*, 1995). UMAG_00867, UMAG_01329 und UMAG_10702 sind cytoplasmatische Proteine. Sie befinden sich unter den verwendeten Konditionen unter den 60 am stärksten exprimierten Genen (Heimel *et al.*, 2010b), es handelt sich vermutlich um unspezifische Anreicherungen.

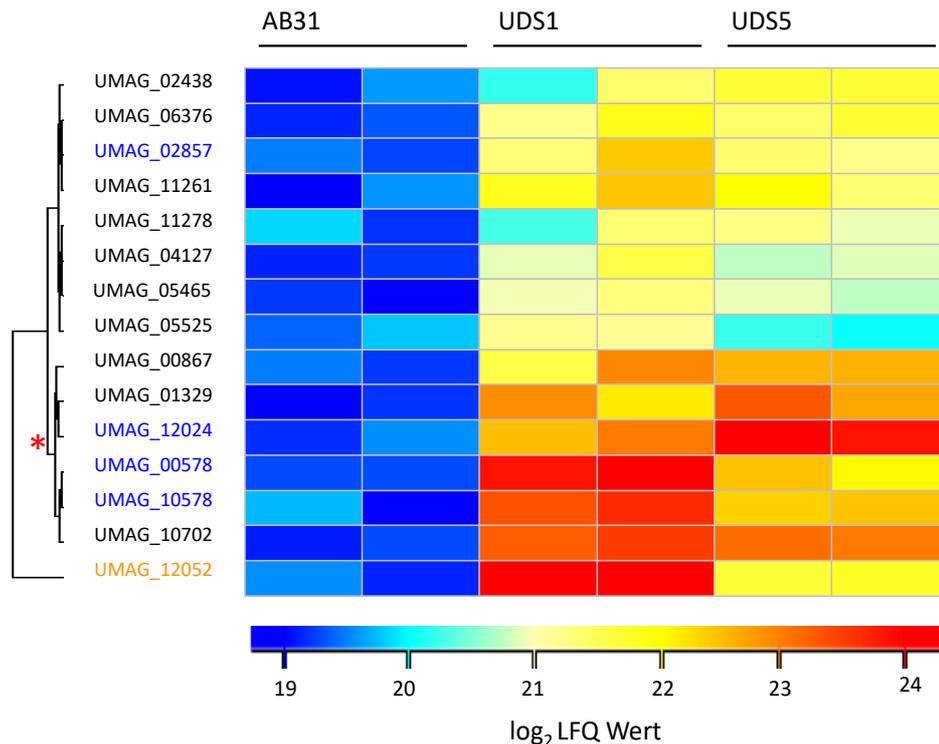


Abbildung 2.6: Heatmap von potentiellen Rbf1 und bE1 Interaktionspartnern, identifiziert durch LC-MS Analyse. Die Stämme AB31, UDS1 und UDS5 wurden wie beschrieben induziert und geerntet. Proteine wurden extrahiert und es wurde eine Immunopräzipitation mit HA-Agarose durchgeführt. Proteine wurden eluiert und über LC-MS analysiert. Daten wurde mit MaxQuant (<https://maxquant.org>) 1.6.0.16 mit der *label-free quantification* Methode durchgeführt. Für die statistische Analyse des Outputs wurde Perseus (1.6.2.3) benutzt. Die Daten sind als Heatmap dargestellt und geclustert entsprechend ihrer Abundanz in den Spalten UDS1 und UDS5. Jedes biologische Duplikat entspricht einer Spalte. Die Werte (Zeilen) der Proteine innerhalb der Spalten sind entsprechend ihrer Abundanz gefärbt, wofür hohe bzw. niedrige log₂ LFQ (label-free quantification) Werte in rot und blau dargestellt sind. Der Bereich der log₂ LFQ Werte ist unten dargestellt.

UMAG_02857 und UMAC_10578 besitzen eine Zn(2)-C6 *fungus-type* DNA-Bindedomäne. Beide Gene wurden zur weiteren Analyse in SG200 (*a1:mfa2 bW2, bE1*) deletiert und es wurden Infektionsstudien durchgeführt. Beide Deletionen führen nicht zum Verlust der pathogenen Entwicklung, die Pathogenität scheint aber leicht reduziert zu sein (Abbildung 6.3; Anhang). Für eine quantitative Aussage zur Virulenz reicht der Stichprobenumfang allerdings nicht aus. UMAC_12024 (Hdp1) erscheint als der interessanteste Kandidat. Hdp1 ist ein Homeodomänen Transkriptionsfaktor, der am G2 Zellzyklus Arrest und der Filamentierung von *Ustilago maydis* während der Transition von saprophytischer zu biotropher Lebensform beteiligt ist. Die *hdp1*-Deletion führt nach der Fusion von zwei Sporidien zu verkürzten Filamenten, und die Anzahl

von Filamenten mit mehr als zwei Zellkernen steigt. In Infektionsstudien scheint die Deletion jedoch keinen Einfluss auf die pathogene Entwicklung zu haben (Pothiratana, 2008). Die *hdp1*-Expression ist sowohl *a*- als auch *b*-abhängig, der *hdp1*-abhängige G2 Zellzyklus Arrest lässt sich sowohl vor der Pheromon-abhängigen Zellfusion als auch danach während des filamentösen Wachstums durch das *b*-Heterodimer beobachten. Hdp1 ist dabei jedoch nicht essentiell. Zusätzlich spielt *hdp1* vermutlich ebenfalls unabhängig von *a* oder *b* eine Rolle bei der Feinabstimmung des Zellzyklus bedingt durch Umweltfaktoren und Ernährungsstress (Pothiratana, 2008).

Die Interaktion von Hdp1 mit Rbf1 und mit dem *b*-Heterodimer wurde zur Verifizierung in einem weiteren Experiment untersucht. Dazu wurden Co-IPs von Rbf1 sowohl bei vorhandenem *b* als auch im *b*-Deletions-Hintergrund und *vice versa* durchgeführt. Die Co-IP wurde mit Rbf1:3xHA ohne *b* (UJU86 (*a2*, $\Delta b::P_{crg1}:rbf1:3xHA$, *hdp1:gfp*) und mit *b* (UJU62 (*a2*, $P_{crg1}:bE1$, $P_{crg1}:bW2$, *rbf1:3xHA*, *hdp1:gfp*) durchgeführt. Die Stämme UJU75 (*a2*, $\Delta b::P_{crg1}:rbf1$, $ip^r[P_{crg1}:hdp1:gfp]ip^s$) und UJU72 (*a2*, $P_{crg1}:bE1$, $P_{crg1}:bW2$, *hdp1:gfp*) dienen dabei jeweils als Negativkontrolle. Sie exprimieren das *hdp1:gfp*-Fusionskonstrukt, *rbf1* ist allerdings nicht mit einem 3xHA-tag versehen (Abbildung 2.7; links). Eine weitere Co-IP wurde mit *bE1:3xHA* ohne *rbf1* (UJU74.3 (*a2*, $P_{crg1}:bE1:3xHA$, $P_{crg1}:bW2$, $\Delta rbf1$, $ip^r[P_{crg1}:hdp1:gfp]ip^s$)) und mit *rbf1* (UJU61 (*a2*, $P_{crg1}:bE1:3xHA$, $P_{crg1}:bW2$, *hdp1:gfp*)) durchgeführt. Als Kontrollen dienen die entsprechenden Stämme ohne 3xHA-tag (UJU76.9 (*a2*, $P_{crg1}:bE1$, $P_{crg1}:bW2$, $\Delta rbf1$, $ip^r[P_{crg1}:hdp1:gfp]ip^s$)) und (UJU72 (*a2*, $P_{crg1}:bE1$, $P_{crg1}:bW2$, *hdp1:gfp*)) (Abbildung 2.7, rechts). Die Funktionalität von Hdp1:GFP wurde bereits bestätigt (Pothiratana, 2008). Zusätzlich wurde sie mittels qRT-PCR auf *hdp1*-Zielgene überprüft (nicht gezeigt).

Die Co-IP (Abbildung 2.7) zeigt, dass Hdp1:GFP sowohl mit Rbf1:3xHA (+, links) als auch mit *bE1:3xHA* (+, rechts) im jeweiligen *b*- bzw. *rbf1*-Deletionshintergrund angereichert werden kann. Die Anreicherung funktioniert allerdings mit Rbf1:3xHA besser, was auch den Ergebnissen der LC-MS Analyse entspricht. Interessanterweise lässt sich am meisten Hdp1:GFP mit Rbf1:3xHA co-präzipitieren, wenn *b* vorhanden ist (Spur 3). Dies kann an der Beteiligung des *b*-Heterodimers selbst an diesem Komplex liegen, oder an

weiteren *b*-abhängigen Faktoren, die den Komplex stabilisieren. Wie bereits beschrieben scheint *b* die Stabilität von Rbf1 zu beeinflussen (vgl. Abbildung 6.1; Anhang). Um die CoIP Ergebnisse zu bestätigen wurde dieses Experiment erfolgreich reproduziert.

Die Ergebnisse zeigen, dass sich Hdp1 zusammen mit Rbf1 und dem bE1/bW2-Heterodimer in einem Komplex befindet. Dies spricht zum einen für eine Protein-Protein Interaktion von Rbf1 und *b*, die wie in ChIP-Seq Experimenten gezeigt auch gemeinsam als Komplex an Promotoren binden, zum anderen für eine Beteiligung von Hdp1 an diesem Komplex.

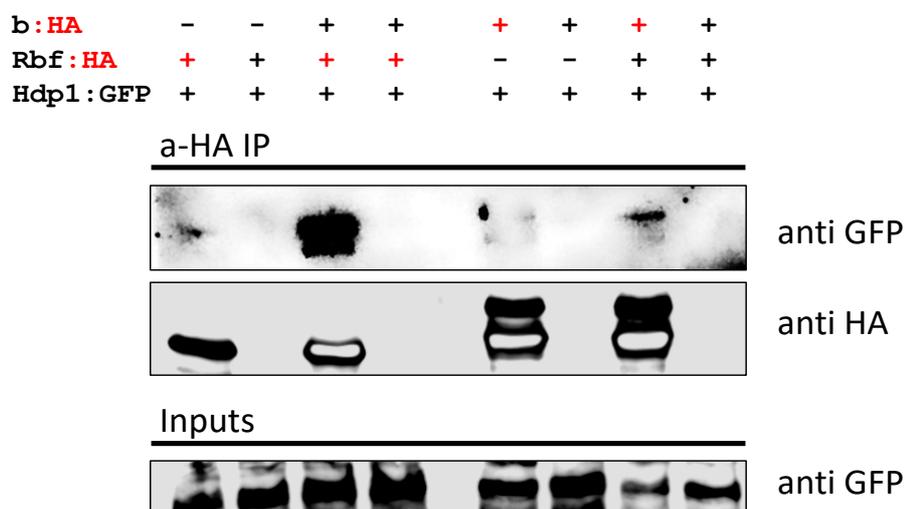


Abbildung 2.7: Westernblot der Co-IPs von Rbf1 und Hdp1 bzw. und bE1 und Hdp1. Rbf1:HA und bE1:HA wurden jeweils mit und ohne vorhandenem *b* bzw. *rbf1* induziert. Dazu wurden die Zellen in CM-Flüssigmedium mit 1 % Glukose auf eine $OD_{600} = 0,8$ angezogen und anschließend in CM-Flüssigmedium mit 1 % Arabinose geschiftet um die *crg1*-Promotor abhängige *b*- bzw. *rbf1*-Expression zu induzieren. Die Zellen wurden 5h inkubiert und anschließend geerntet. *hdp1:gfp* wird dabei indirekt über Rbf1 induziert. In den Stämmen mit *rbf1*-Deletion wurde *hdp1:gfp* über den *crg1*-Promotor Arabinose-abhängig induziert. Proteine wurden extrahiert und es wurde eine Immunopräzipitation mit HA-Agarose durchgeführt. Die Proben wurden über eine SDS-PAGE (10 %) aufgetrennt und durch Westernblot analysiert. Für die Detektion wurde ein anti-HA bzw. ein anti-GFP Antikörper verwendet. In der Analyse konnte Hdp1:GFP sowohl mit Rbf1:3xHA als auch mit bE1:3xHA co-präzipitiert werden. Am besten mit Rbf1:3xHA mit aktivem *b*. Die Negativkontrollen zeigen keine unspezifische Bindung von Hdp1:GFP.

2.1.4. Das b-Heterodimer, Rbf1 und Hdp1 können als Komplexe an Promotoren binden

Um zu untersuchen ob sich die durch die LC-MS Analyse und Co-IP gezeigten Komplexe auch an Promotoren befinden, wurden zur Untersuchung der Funktion von Hdp1 weitere CHIP-Seq Experimente durchgeführt. Dabei wurde die Immunopräzipitation mit Hdp1:3xHA durchgeführt. Um zu untersuchen ob Hdp1 alleine an Promotoren binden kann, wurde der Stamm UJU5 (*a2, Δb, ip'[P_{crg1}:hdp1:3xHA]ip^s*) (**Δb, kein Rbf1, Hdp1↓**) verwendet. In diesem Stamm wird Hdp1 *b*-unabhängig direkt über den *crg1*-Promotor induziert. Um die Rolle von *rbf1* bzw. *b* UND *rbf1* für die Hdp1-Bindung zu untersuchen wurden die Stämme UJU66 (*a2, Δb::P_{crg1}:rbf1, hdp1:3xHA*) (**Δb, Rbf1, Hdp1↓**) und UJU65 (*a2, Δb::P_{crg1}:bE1, P_{crg1}:bW2, hdp1:3xHA*) (**b, Rbf1, Hdp1↓**) verwendet. In UJU66 ist *b* deletiert und *hdp1* wird indirekt über *crg1*-induziertes *rbf1* induziert, in UJU65 werden sowohl *rbf1* als auch *hdp1* über die Induktion des bE/bW-Heterodimers induziert.

Für die Analysen wurden *Peaks* verwendet, die in beiden biologischen Duplikaten signifikant waren, d.h. im Fall von Hdp1:3xHA einen *pz-score* ≥ 150 aufwiesen. Signifikanten *Peaks* wurden anschließend, wie bereits beschrieben, Gene zugeordnet.

Abbildung 2.8 zeigt die Überlappung von Genen, deren Promotoren in den drei Experimenten mit Hdp1:3xHA angereichert werden konnten, in einem Venn-Diagramm. Die MEME-ChIP Analyse der UJU66 *Peaks* liefert ein zentral angereichertes 7 bp Konsensusmotiv (Abbildung 2.8 B; *E-value* = 1.6e-14). Vergleiche mit der JASPAR-Datenbank (Fornes *et al.*, 2019) zeigen eine Ähnlichkeit des Motivs zu Homeodomänen-Bindestellen. In den untersuchten 134 Sequenzen kommt das Motiv 55-mal vor. Werden für die MEME Analyse *Peaks* der anderen Stämme bzw. verschiedene Schnittmengen analysiert ändert sich das Motiv nicht (nicht gezeigt). Die CHIP-Seq Experimente von Hdp1 mit und ohne aktiver *b*-Kaskade weisen eine hohe Überlappung auf (Schnittmenge in Abbildung 2.8 A; 2*). Der Einfluss von *b* bzw. *rbf1* für die Hdp1-Bindung scheint demnach gering zu sein. Hdp1 kann am Großteil seiner putativen Zielpromotoren unabhängig von *b* oder *rbf1* an DNA binden.

Eine FIMO Analyse zeigt, dass 24 der Promotoren der dargestellten 99 Gene mindestens ein Hdp1-Konsensusmotiv enthalten. Die übrigen *Peaks* entstehen vermutlich durch die Bindung von Hdp1 in Kombination mit weiteren Transkriptionsfaktoren.

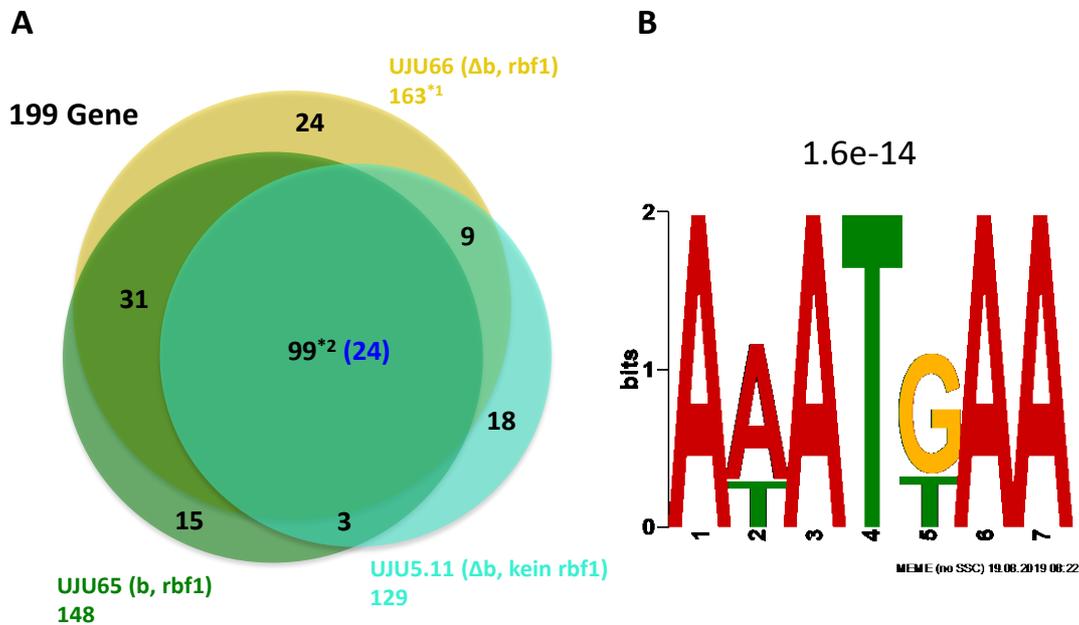


Abbildung 2.8: (A) Venn-Diagramm ChIP-Seqs mit Hdp1:3xHA; UJU65 (*a2*, $\Delta b::P_{crg1}:bE1$, $P_{crg1}:bW2$, *hdp1:3xHA*), UJU66 (*a2*, $\Delta b::P_{crg1}:rbf1$, *hdp1:3xHA*) und UJU5 (*a2*, Δb , *ip'[P_{crg1}:hdp1:3xHA]ip^s*). Zahlen beziehen sich auf Gene, deren Promotoren mit Hdp1:3xHA im jeweiligen Stammhintergrund angereichert werden konnten. Dargestellt sind proportionale gebietsweise Überlappungen. Zahlen in Klammern stehen für die Anzahl der Promotoren mit mindestens einer Hdp1-Konsensussequenz, ermittelt mit FIMO, die einen *p-value* $< 10^{-4}$ aufweisen. **(B) Hdp1-Konsensussequenz.** Der Konsensus wurde mit MEME erstellt und ist als *position weight matrix* dargestellt (*E-Value*: 1.6×10^{-14}). Als Input wurden 328 bp lange Sequenzen um die Maxima der Hdp1-*Peaks* (*cookie cuts*) aus UJU66 verwendet (*1).

Zur weiteren Untersuchung des Komplexes aus Rbf1, *b* und Hdp1 wurden die ChIP-Seq Daten aus UDS5 (*a2*, $\Delta b::P_{crg1}:bW2$, $P_{crg1}:bE1$; *rbf1:3xHA*) (**b**, **Rbf1**↓, **Hdp1**), UDS1 (*a2*, $\Delta b::P_{crg1}:bW2$, $P_{crg1}:bE1:3xHA$) (**b**↓, **Rbf1**, **Hdp1**) und UJU65 (*a2*, $\Delta b::P_{crg1}:bE1$, $P_{crg1}:bW2$, *hdp1:3xHA*) (**b**, **Rbf1**, **Hdp1**↓) miteinander verglichen. In allen drei Stämmen ist die *b*-Kaskade aktiv, sowohl *b*, *rbf1* als auch *hdp1* werden exprimiert, die ChIP erfolgte jeweils mit einem der drei Transkriptionsfaktoren. Insgesamt konnten die Promotoren von 318 Genen angereichert werden. Die größte Schnittmenge weisen die Gene auf, an deren Promotoren Hdp1:3xHA oder Rbf1:3xHA binden (60; Abbildung 2.9 A; *1).

Gemeinsam mit den Daten aus der Co-IP, (Abbildung 2.7) legen die ChIP-Seq-Ergebnisse nahe, dass Hdp1 stärker mit Rbf1 als mit bE/bW assoziiert ist. Untersucht man die 60 Promotoren, die sowohl Rbf1 als auch Hdp1 binden mit FIMO auf Konsensusmotive, findet man in 13 Promotoren eine *H1bs*, in 17 eine *Rbs*, in 7 beide Bindestellen und in 24 keine Bindestellen. Befindet sich im Promotor nur eine *H1bs*, bindet Hdp1 sowohl mit als auch ohne aktiver *b*-Kaskade gleich gut. Dieselbe Stelle kann auch, obwohl keine *Rbs* vorhanden ist, mit Rbf1 angereichert werden, was für eine Hdp1-Rbf1 Interaktion spricht. Die Anreicherung durch Rbf1:3xHA ist allerdings deutlich besser mit aktiver *b*-Kaskade (Abbildung 2.9 B; links). Befinden sich beide Bindestellen im Promotor, kann Hdp1 binden, und Rbf1 kann auch ohne bE/bW binden. Die Maxima der *Peaks* sind leicht verschoben (Abbildung 2.9 B; rechts). Für Rbf1 mit aktivem *b* (rot) erkennt man allerdings zwei Maxima. Eines der Maxima ist deckungsgleich mit der Position der *Rbs*, das andere entspricht dem Hdp1-*Peak*. Auch hier scheint Rbf1 mit Hdp1 assoziiert zu sein. Die exemplarische Darstellung trifft auf alle Promotoren in diesen beiden Gruppen zu. Bei Promotoren, die eine *Rbs* enthalten aber keine *H1bs*, lassen sich bei Betrachtung aller ChIP-Seq Experimente mit Hdp1:3xHA verschiedene Szenarien unterscheiden: (1) Rbf1 und Hdp1 können trotz fehlender *H1bs* unabhängig voneinander binden, (2) Rbf1 bindet, Hdp1 allerdings nur wenn Rbf1 vorhanden ist, (3) Rbf1 bindet, Hdp1 allerdings nur, wenn bE/bW und Rbf1 vorhanden sind. Dasselbe gilt wenn sich weder eine *Rbs* noch eine *H1bs* im Promotor befindet. Allerdings fällt in dieser Gruppe auf, dass die Maxima der Rbf1- und Hdp1-*Peaks* z.T. nicht deckungsgleich sind. Es handelt sich dabei vermutlich um unabhängige Bindestellen, für die jeweils weitere Interaktionspartner von Rbf1 bzw. Hdp1 nötig sind (Abbildung 2.10).

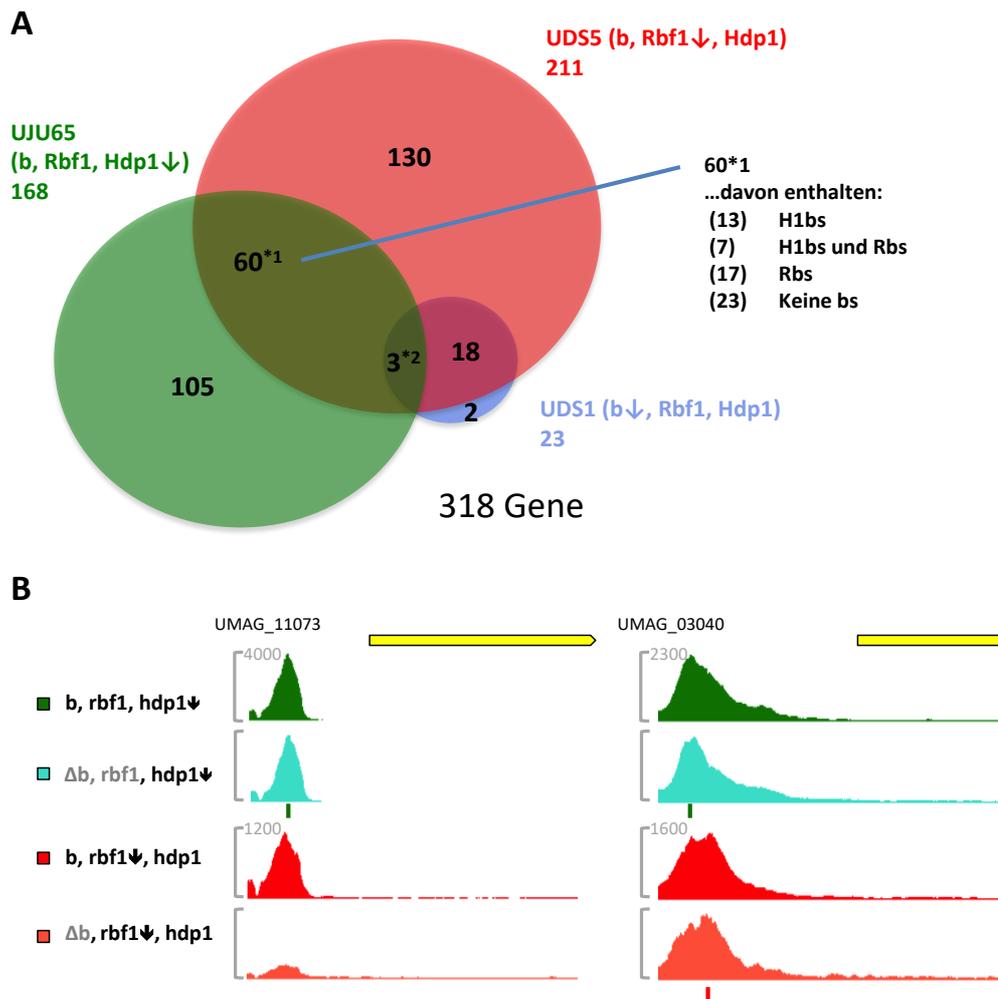


Abbildung 2.9: (A) Venn-Diagramm von UDS5 (Rbf1:3xHA), UDS1 (bE1:3xHA) und UJU65.1 (Hdp1:3xHA). Zahlen beziehen sich auf Gene, deren Promotoren im jeweiligen Stammhintergrund angereichert werden konnten. Die Schnittmenge *1 ist weiter aufgeschlüsselt. Angegeben ist die Verteilung von *Rbs* und *H1bs* in den Promotoren. **(B) Visuelle Darstellung von Peaks in exemplarischen Promotoren der Schnittmenge *1 in den ChIP-Seqs von UJU65.1 (grün), UJU5.11 (türkis), UDS5 (rot) und UMJ42 (orange) sowie Rbf1- und Hdp1- Bindestellen.** Reads wurden mit Bowtie2 Version 2.0.0-beta7 (Langmead und Salzberg, 2012) 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. Die Skalierung entspricht sofern nicht extra angegeben der des darüber liegenden Tracks. Positionen der identifizierten Konsensusmotive sind grün (*H1bs*) und rot (*Rbs*) gekennzeichnet.



Abbildung 2.10: Visuelle Darstellung der Überschneidung von Peaks der ChIP-Seqs von UJU5.11 (türkis) und UMJ42 (orange) in zwei exemplarischen Promotoren. Reads wurden mit Bowtie2 Version 2.0.0-beta7 (Langmead und Salzberg, 2012) 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.

Drei Promotoren lassen sich mit allen drei Transkriptionsfaktoren anreichern (Abbildung 2.9 A; Schnittmenge *2). Es handelt sich dabei um die Promotoren von UMAG_12024 (*hdp1*) und UMAG_03172 (*rbf1*) selbst, und um UMAG_02438 (*clp1*). Die Promotoren der beiden bereits als Schlüsselfaktoren der *b*-Kaskade beschriebenen Proteine Rbf1 und Clp1 werden also kombinatorisch von allen drei Transkriptionsfaktoren gebunden.

Im Folgenden werden *Peaks* aus allen durchgeführten ChIP-Seq Experimenten und die ermittelten Konsensusmotive aller drei Transkriptionsfaktoren in den Promotoren dieser drei Gene betrachtet. Die ChIP-Seqs erfolgten jeweils mit den einzelnen Transkriptionsfaktoren (Rbf1, *b*, Hdp1) im *rbf1*- bzw. *b*-Deletionshintergrund. Die ChIP-Seq wurde mit Rbf1:3xHA in UDS5 (**b**, **Rbf1**↓, **Hdp1**) (rot) und in UMJ42 (**Δb**, **Rbf1**↓, **Hdp1**) (orange) im *b*-Deletionshintergrund durchgeführt, *hdp1* wird dabei jeweils indirekt über *rbf1* induziert. Mit bE1:3xHA wurde die ChIP-Seq in UDS1 (**b**↓, **Rbf1**, **Hdp1**) (blau) und in UJU1.14 (**b**↓, **ΔRbf1**, **kein Hdp1**) (blaugrau) im *rbf1*-Deletionshintergrund durchgeführt. In UJU1.14 wird aufgrund der *rbf1*-Deletion kein *hdp1* exprimiert. Die ChIP-Seqs mit Hdp1:3xHA wurden in UJU65 (**b**, **Rbf1**, **Hdp1**↓) (grün, *rbf1* wird über bE/bW induziert, *hdp1:3HA* wird durch *rbf1* induziert), in UJU66 (**Δb**, **Rbf1**, **Hdp1**↓) (gelb, *b*-Deletionshintergrund, *rbf1* wird über den *crg1*-Promotor induziert und *hdp1:3xHA* durch *rbf1*), und in UJU5.11 (**Δb**, **kein Rbf1**, **Hdp1**↓) (türkis, *b*-Deletionshintergrund, *rbf1* ist nicht induziert, *hdp1:3xHA* wird über den *crg1*-Promotor induziert).

Insgesamt gibt es in den ChIP-Seq Experimenten in den unterschiedlichen Stämmen fünf *Peaks* im *hdp1*-Promotor (Abbildung 2.11). Betrachtet man den

ersten *Peak*, fällt auf, dass er mit bE1:3xHA bzw. Rbf1:3xHA am stärksten angereichert werden kann, allerdings nur, wenn der jeweils andere Faktor vorhanden ist. b alleine bindet nicht, Rbf1 alleine nur schwach. Die Maxima der beiden *Peaks* sind leicht verschoben und entsprechen der Position der jeweiligen Konsensusmotive. b und Rbf1 binden also verschiedene Positionen, allerdings nur 33 bp voneinander entfernt. Mit Hdp1 lässt sich derselbe Bereich auch anreichern, allerdings nur wenn *rbf1* vorhanden ist (grün, gelb). Hdp1 bindet also wahrscheinlich im *hdp1*-Promotor nicht direkt an die DNA, sondern interagiert vermutlich mit Rbf1. Hdp1 Konsensusmotive befinden sich in *Peak* 2 und 5. Diese *Peaks* entstehen auch in den ChIP-Seqs mit Rbf1:3xHA und bE1:3xHA, mit bE1:3xHA jedoch nur wenn *rbf1* vorhanden ist. Auffallend ist, dass Hdp1:3xHA alleine (türkis) generell sehr viel schlechter bindet, *rbf1* scheint also nötig zu sein für eine effiziente Bindung. *Peak* 3 und 4 beinhalten keines der identifizierten Konsensusmotive, verhalten sich aber wie *Peak* 2 und 5. Durch Protein-Protein Interaktionen untereinander oder mit jeweils weiteren unbekanntem Transkriptionsfaktoren entstehen vermutlich Affinitäten zu bisher unbekanntem Motiven. Betrachtet man das Expressionsprofil von *hdp1* wird deutlich, dass *rbf1* ausreichend für die *hdp1*-Expression ist, ein aktives b allerdings die Expression verbessert. Diese geht einher mit dem Bindeverhalten von Rbf1 und b am *hdp1*-Promotor. Inwiefern Hdp1 Einfluss auf seine eigene Expression nimmt ist bisher nicht untersucht worden.

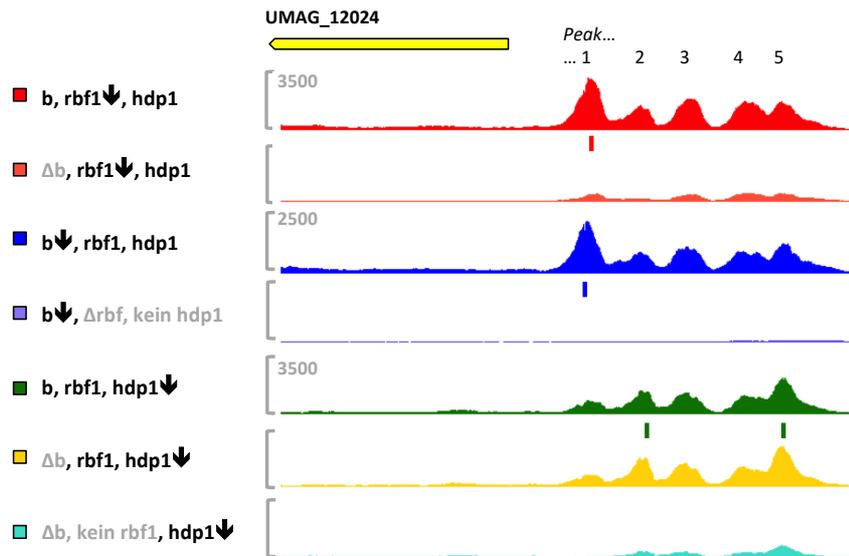


Abbildung 2.11: Visuelle Darstellung von Peaks im *hdp1*-Promotor. Dargestellt sind *Peaks* aus allen durchgeführten ChIP-Seqs. UDS5 (rot),UMJ42 (orange), UDS1 (blau), UJU1.14 (schieferblau), UJU65.1 (grün), UJU66.7 (gelb) und UJU5.11(türkis), sowie Rbf1-, b- und Hdp1- Konsensusmotive. Reads wurden mit Bowtie2 Version 2.0.0-beta7 (Langmead und Salzberg, 2012) 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. Die Skalierung entspricht sofern nicht extra angegeben der des darüber liegenden Tracks. *Peaks* sind nummeriert. Der Status der Transkriptionsfaktoren b, Rbf1 und Hdp1 ist vor jedem Track dargestellt (schwarz: exprimiert, grau: nicht exprimiert, ↓: mit 3xHA-tag versehener Transkriptionsfaktor für die ChIP-Seq). Positionen der Konsensusmotive der jeweiligen Transkriptionsfaktoren sind unterhalb den Tracks eingezeichnet (rot: Rbf1-, blau: b-, und grün: Hdp1-Motiv).

Abbildung 2.12 zeigt entsprechend dargestellt den *rbf1*-Promotor. In ihm lassen sich 6 *Peaks* darstellen. Mit Rbf1:3xHA lassen sich dabei bei aktiver b Kaskade alle 6 Bereiche anreichern. Die Maxima der *Peaks* 2 und 6 stimmen mit Rbf1-Bindestellen überein. Beide Bereiche lassen sich auch mit Hdp1:3xHA anreichern sofern *rbf1* vorhanden ist (grün). Dies spricht für eine direkte Rbf1-Bindung und eine Rbf1-Hdp1 Protein-Protein Interaktion. *b*-Bindestellen befinden sich in *Peak* 1 und 4, sowie an der bereits als nicht benötigt beschriebenen vorgelagerten Position -981 (vgl. Abbildung 2.3 C) Die *bbs* in *Peak* 1 und 4 können auch ohne *rbf1* und *hdp1* von bE1:3xHA gebunden werden. Im Bereich von *Peak* 1 befindet sich außerdem eine Hdp1-Bindestelle 63 bp vor der *bbs*, an die Hdp1 jedoch ohne Rbf1 und bE/bW nicht bindet. Am stärksten lassen sich die Bereiche von *Peak* 4 und 5 mit Hdp1:3xHA anreichern. Ohne *rbf1* bindet Hdp1:3xHA nicht im *rbf1*-Promotor. Die Bereiche von *Peak* 3 und 5 lassen sich mit Rbf1:3xHA und mit Hdp1:3xHA anreichern,

sofern alle drei Transkriptionsfaktoren vorhanden sind, allerdings konnte dafür bisher kein Konsensusmotiv bestimmt werden.

Für die *rbf1*-Expression ist *b* ausreichend. Dafür ist wie beschrieben die *bbs*-₁₃₇₇ (hier *Peak* 1) essentiell. Rbf1 selbst hat trotz der komplexen Beteiligung am Bindeprofil des Transkriptionsfaktor-Komplexes keinen Einfluss auf die *b*-abhängige *rbf1*-Expression. Hdp1 hat ebenfalls keinen Einfluss (RNA-Seq, diese Arbeit).

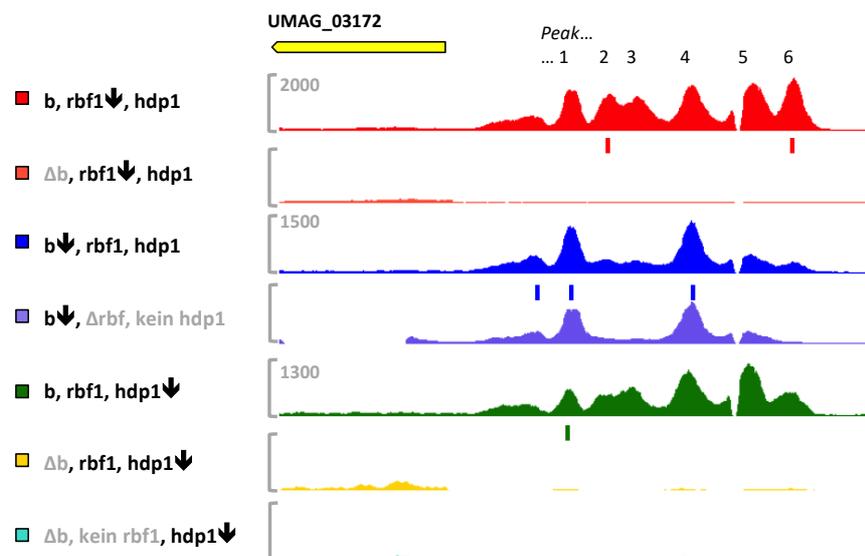


Abbildung 2.12: Visuelle Darstellung von *Peaks* im *rbf1*-Promotor. Dargestellt sind *Peaks* aus allen durchgeführten ChIP-Seqs. Legende siehe Bildunterschrift 2.15.

Der *clp1*-Promotor weist zwei *Peaks* auf (Abbildung 2.13), von denen der zweite drei Maxima besitzt. Alle vier Maxima sind deckungsgleich mit *b*-Bindestellen und lassen sich sowohl mit *bE1:3xHA* alleine (schieferblau) als auch mit *Rbf1:3xHA* bei aktivem *b* (rot) anreichern. Im *clp1*-Promotor lassen sich weiterhin zwei *Hdp1*-Bindestellen identifizieren, deren Position mit den Maxima der *Peaks* übereinstimmt. *Hdp1:3xHA* kann allerdings nur mit aktivem *b* binden. Die Maxima entsprechen den Maxima 1 und 3 der *b*-*Peaks*. Die *Hdp1*- und *b*-Bindestellen sind in *Peak* 1 zwei bp und in *Peak* 3 21 bp voneinander entfernt. Für die *clp1*-Expression ist *b* ausreichend. Weder *rbf1* noch *hdp1* alleine induzieren *clp1* noch beeinflusst deren Deletion die *b*-abhängige *clp1*-Expression.

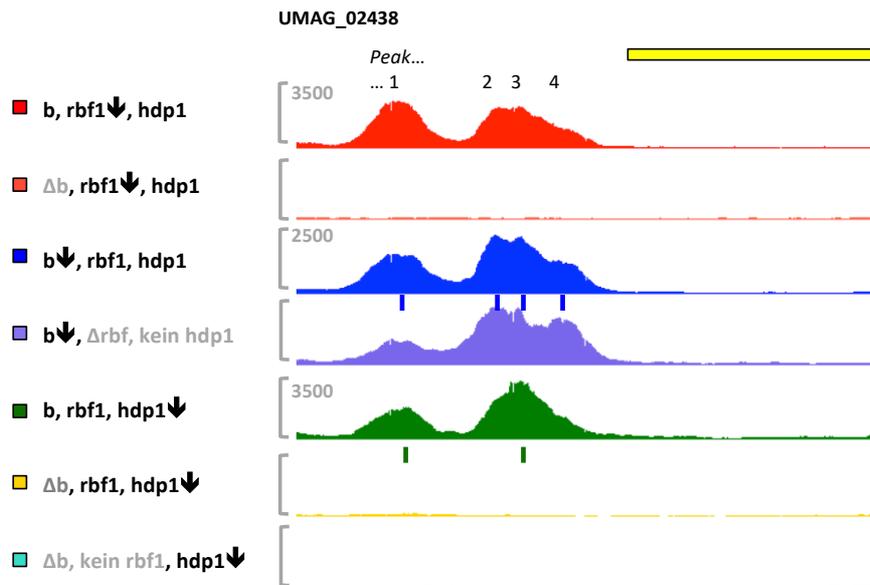


Abbildung 2.13: Visuelle Darstellung von Reads im *clp1*-Promotor. Dargestellt sind *Peaks* aus allen durchgeführten ChIP-Seqs. Legende siehe Bildunterschrift 2.15.

2.1.5 Im *b*-Promotor befindet sich ein Hdp1-Konsensusmotiv

Da es sich bei allen für ChIP-Seq Experimente verwendeten Stämmen entweder um über den *crg1*-Promotor *b*-induzierbare oder um *b*-Deletionsstämme handelt, konnte der native *b*-Promotor *in vivo* nicht auf Bindung untersucht werden. Im multiallelischen *b*-Locus werden *bW* und *bE* divergent transkribiert, die intergenische Region beträgt nur ca. 200 bp. Zur bioinformatischen Untersuchung des *b*-Promotors wurde ein Alignment aus 26 verschiedenen Sequenzen der *b*-Allele erstellt und nach den in dieser Arbeit identifizierten Rbf1-, *b*-, und Hdp1-Bindestellen gesucht (Abbildung 6.4; Anhang).

bE und *bW* werden Pheromon-abhängig und *prf1*-abhängig induziert; allerdings gibt es keine Prf1-Bindestelle im *b*-Promotor. Da die Pheromon-Induktion im $\Delta rbf1$ -Hintergrund nicht verändert ist, und *bE/bW* durch *rbf1*-Induktion nicht aktiviert werden, kann auch Rbf1 als potentieller Aktivator von *bE/bW* ausgeschlossen werden (Heimel, Jurca pers. Mitteilung).

Nur in 4 der 26 Sequenzen konnten Motive mit einer geringen Übereinstimmung zur *bbs* identifiziert werden, die zudem 3 bp vor dem *bE*-ATG liegen. Eine *b*-Bindung und Autoregulation ist damit ebenfalls unwahrscheinlich.

Allerdings konnte konserviert über alle *b*-Promotoren eine Hdp1-Konsensussequenz identifiziert werden. In 21 der 26 untersuchten Sequenzen handelt es sich um eine 100 %-ige Übereinstimmung mit dem *best-fit* der Konsensussequenz. Die Übereinstimmung ist in Abbildung 2.14 exemplarisch für die in den gängigen Laborstämmen verwendeten Allelen *b1* und *b2* gezeigt. In Arbeiten von Matteo Jurca konnte inzwischen gezeigt werden, dass die ektopische Induktion von *hdp1* zu einer starken Induktion der *bE* und *bW* Gene führt, der identifizierte Hdp1-Bindestellen-Konsensus könnte damit für die *hdp1*-abhängige Induktion notwendig sein.

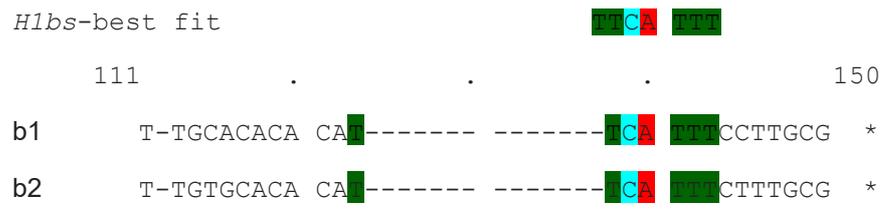


Abbildung 2.14: Ausschnitt aus dem *b*-Promotor Alignment. Angegeben sind Bereiche mit 100 % Übereinstimmung zur Hdp1-Konsensussequenz für die Allele *b1* und *b2*.

2.2 Integrative Analyse von ChIP-Seq und RNA-Seq Daten

Durch die Analyse der ChIP-Seq Daten konnten Bindestellen zwei der wichtigsten für den Übergang von der saprophytischen zur pathogenen Lebensweise von *Ustilago maydis* nötigen Transkriptionsfaktoren (bE/bW und Rbf1) analysiert und mechanistische Zusammenhänge untersucht werden. Um das transkriptionelle Netzwerk besser zu verstehen, müssen speziell im Hinblick auf Genexpression weitere Experimente durchgeführt werden. Die Bindung von Transkriptionsfaktoren muss nicht zwangsläufig zu einer Expression des Zielgens führen. Die Integration von genomweiten Expressionsanalysen in Form von RNA-Seq stellt dafür eine gebräuchliche Herangehensweise dar.

In (Heimel *et al.*, 2010b) wurden bereits genomweite Expressionsanalysen bezogen auf die Funktion der Transkriptionsfaktoren bE/bW und Rbf1 durchgeführt. Dafür wurden DNA-Microarrays und ein spezielles Array-Minimal-Medium zur Anzucht der Stämme verwendet, das nicht zufriedenstellend mit der etablierten ChIP-Seq Methode (Ulrich, 2015) kompatibel ist. Um die ChIP-Seq Daten besser mit Expressionsdaten vergleichen zu können, wurde deshalb neben der ChIP-Seq auch eine RNA-Seq Analyse der ChIP-Stämme und von entsprechenden Deletionsstämmen durchgeführt. Verwendet wurde dazu das CM-Medium, ein komplexes Vollmedium. Um etwaige Streuung der Daten durch Schwankungen der Medienzusammensetzung und unterschiedliche Induktionsstärken der Transkriptionsfaktoren durch unabhängige Medienwechsel zu verhindern, wurden alle ChIP-Seq und RNA-Seq Experimente parallel, sofern möglich auch mit denselben Kulturen, durchgeführt. Für alle Anzuchten und Induktionen wurde die gleiche Charge CM-Medium verwendet, Proben wurden gleichzeitig entnommen. Alle RNA-Seq Experimente wurden in biologischen Triplikaten durchgeführt. Anzucht, RNA Isolation, Datengenerierung, und -Auswertung sind im Methodenteil (4.6) im Detail beschrieben.

2.2.1 Rbf1 und das bE/bW Heterodimer regulieren gemeinsam die b-Regulationskaskade

Um den Zusammenhang zwischen *b*- und *rbf1*-abhängiger Genregulation genauer zu beleuchten, wurden Expressionsprofile der verwendeten Stämme erstellt. *b*-abhängige Gene für deren Expression *rbf1* benötigt wird wurden durch den Vergleich der Transkriptionsprofile der Stämme AB31 (*a2*, *P_{crg1}:bW2*, *P_{crg1}:bE1*) und AB31 Δ *rbf1* identifiziert. Mit AB31 lassen sich *bE1* und *bW2* über den mit Arabinose induzierbaren *crg1*-Promotor induzieren. Als Kontrolle für beide Stämme wurden die inkompatiblen Gene *bE2* und *bW2* in AB32 induziert. Direkt induzierte *rbf1*-Expression im Stamm CP27 (*a2*, Δ *b::P_{crg1}:rbf1*) wurde zur Identifizierung von Genen verwendet, für deren Expression *rbf1* ausreichend ist. Als Kontrolle wurde JB2 (*a2*, Δ *b*) verwendet.

162 der insgesamt 184 *b*-abhängig regulierten Gene zeigten keine signifikante Veränderung nach *b*-Induktion in AB31 Δ *rbf1* (Abbildung 2.15; Tabelle 6.1.1 Datenanhang). Die übrigen 22 Gene lassen sich wiederum in zwei Gruppen aufteilen. 12 davon zeigten vergleichbare Expressionswerte nach *b*-Induktion in AB31 und AB31 Δ *rbf1*, und reagierten nicht auf die direkte *rbf1*-Expression in CP27. Es handelt sich dabei um ausschließlich über *b* regulierte Gene („*b* alleine“). Die verbleibenden 10 Gene zeigten eine signifikante Veränderung nach *rbf1*-Deletion, werden allerdings dennoch differentiell reguliert, außerdem reagieren sie auf die *rbf1*-Induktion in CP27. Diese Gene werden folglich direkt über *b* und zusätzlich unabhängig über *rbf1* reguliert. („*b* oder *rbf1*“). Für 70 der *b*-abhängigen Gene verhindert die *rbf1*-Deletion eine Induktion, außerdem reagieren sie auf die *rbf1*-Induktion in CP27. Für diese Gene wird *rbf1* benötigt und ist ausreichend („*rbf1* benötigt und ausreichend“). Die restlichen 93 Gene werden abhängig von *rbf1* reguliert, nach *rbf1*-Induktion in CP27 konnte jedoch keine signifikante Veränderung festgestellt werden („*rbf1* benötigt“).

Zusammenfassend bestätigen diese Ergebnisse die Aussage aus (Heimel *et al.*, 2010b), dass Rbf1 als Hauptregulator der *b*-Kaskade angesehen werden kann. Von den in CM-Medium 184 *b*-abhängig identifizierten Genen sind 81 auch in Minimal-Medium ähnlich reguliert, wobei die meisten der am stärksten regulierten Gene in beiden Studien übereinstimmend identifiziert werden konnten. Neben den unterschiedlichen Medien können Unterschiede auf die

nur begrenzte zeitliche Auflösung in dieser Arbeit (5 h Induktion gegen 1h, 2 h, 3 h, 5 h und 12 h in (Heimel *et al.*, 2010b)) und die unterschiedliche Methodik (RNA-Seq gegen DNA-Microarray) zurückgeführt werden.

Zum weiteren Abgleich der RNA-Seq Daten mit den Ergebnissen aus den entsprechenden CHIP-Seq Experimenten ist das Vorhandensein von signifikanten *Peaks* und Übereinstimmungen mit den bioinformatisch identifizierten Konsensusmotiven der Transkriptionsfaktoren innerhalb der Promotoren von regulierten Genen in Abbildung 2.15 neben der Heatmap dargestellt. Eine Kumulation von Rbf1-*Peaks* ist wie zu erwarten in der Gruppe „*rbf1* benötigt und ausreichend“ zu erkennen. *b*-*Peaks* befinden sich vermehrt in den beiden Gruppen „*b* oder *rbf1* ausreichend“ und „*b* alleine“. Außerdem fällt auf, dass ohne das Vorhandensein von *b* im Stamm CP27 verschiedene Rbf1-*Peaks* wegfallen (Rbf1-*Peaks* (AB31) gegen Rbf1-*Peaks* (CP27)).

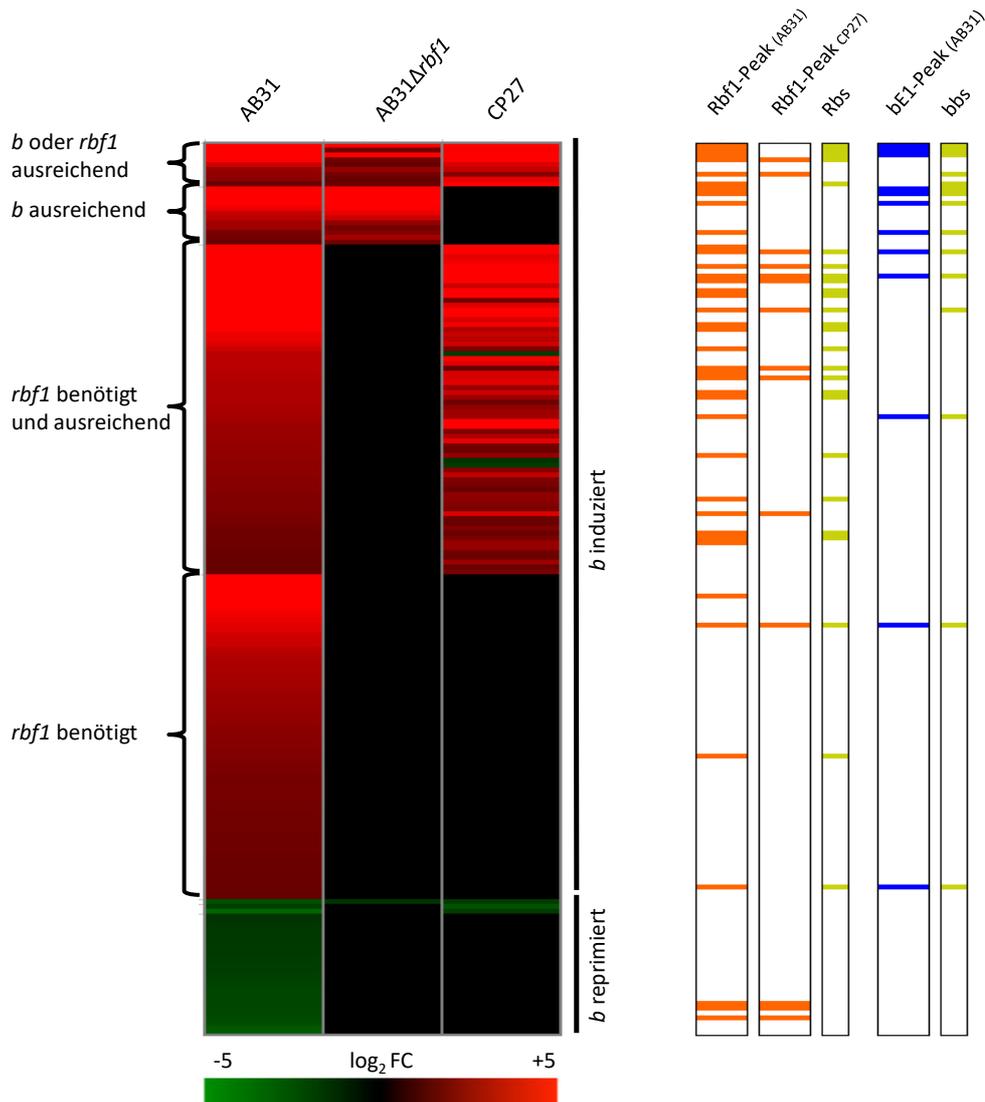


Abbildung 2.15: Rbf1 Einfluss auf die Expression von *b*-abhängig regulierten Genen. *bE1* und *bW2* wurden in den Stämmen AB31 (*a2*, $P_{crg1:bW2}$, $P_{crg1:bE1}$) und AB31 Δ rbf1 induziert, als Kontrolle für beide Stämme wurden die inkompatible Kombination *bE2* und *bW2* in AB32 (*a2*, $P_{crg1:bW2}$, $P_{crg1:bE2}$) induziert. Der Stamm CP27 (*a2*, $\Delta b::P_{crg1:rbf1}$) wurde für die induzierte *rbf1*-Expression verwendet, JB2 (*a2*, Δb) diente als Kontrolle. Die Stämme wurden durch den Wechsel von CM Medium mit 1 % Glukose auf CM-Medium mit 1 % Arabinose für 5 h induziert. Die Zellen wurden geerntet, RNA extrahiert und für RNA-Seq Analysen verwendet. Die Heatmap zeigt signifikante Veränderungen (FDR < 0.01; CPM < 1; \log_2 fold change (FC) > 2 bzw. < -2) der Genexpression für alle signifikant *b*-regulierten Gene. Die Reihenfolge der Gene mit Identifikationsnummer sowie die genauen Werte der Expressionsveränderung sind in Tabelle 6.1.1 (Datenanhang) gezeigt. Eine genaue Beschreibung zur Durchführung der RNA-Seq und der Datenanalyse befindet sich im Material und Methoden Teil (4.6). Neben den Expressionsprofilen sind die entsprechenden ChIP-Seq Ergebnisse in Form von signifikanten *Peaks* (p_z-score > 80 bzw. 65) (Rbf1-*Peaks* orange, bE1-*Peaks* blau) bzw. vorhandenen Konsensusmotiven (identifiziert mit FIMO) (gelb) dargestellt. Rbf1-*Peaks* (AB31) entsprechen den identifizierten *Peaks* aus der ChIP-Seq mit dem Stamm UDS5 (*a2*, $\Delta b::P_{crg1:bW2}$, $P_{crg1:E1}$, *rbf1:3xHA*). Dieser besitzt den gleichen genetischen Hintergrund wie AB31, allerdings ist Rbf1 mit einem HA-tag versehen. Rbf1-*Peaks* (CP27) entsprechen UMJ42 (*a2*, $\Delta b::P_{crg1:rbf1:3xHA}$) und bE1-*Peaks* (AB31) UDS1 (*a2*, $\Delta b::P_{crg1:bW2}$, $P_{crg1:E1:3xHA}$).

Insgesamt wurden 221 signifikante Rbf1-*Peaks* in UDS5 (*a2, Δb::P_{crg1}:bW2, P_{crg1}:bE1, rbf1:3xHA*) (**b, Rbf1↓**) identifiziert. Von den 184 *b*-regulierten Genen in AB31 besitzen 40 einen Rbf1-*Peak* (Abbildung 2.16 A). Alle *b*-abhängig regulierten Gene, die einen *b*-*Peak* besitzen (UDS1 (*a2, Δb::P_{crg1}:bW2, P_{crg1}:E1:3xHA*) (**b↓, Rbf1**)) besitzen auch einen Rbf1-*Peak*, sind also in diesen 40 Genen enthalten. Somit können 146 indirekt über die *b*-Kaskade regulierte Gene und 40 direkte Rbf1-Zielgene identifiziert werden. Interessanterweise besitzen jedoch 181 Gene einen Promotor, in dem Rbf1 zwar bindet, die Bindung jedoch nicht zu einer Veränderung der Expression unter den experimentellen Bedingungen führt.

Betrachtet man die 40 direkten Rbf1-Zielgene genauer (Abbildung 2.16 B; Tabelle 6.1.2; Datenanhang), weisen 28 das ermittelte Rbf1-Konsensusmotiv im Promotor auf (gelb), besitzen also eine Rbf1-Bindestelle (*Rbs*). Bei diesen direkten Rbf1-Zielgenen erfolgt die Regulation über eine direkte Protein-DNA Interaktion. Von den 12 nicht direkt von Rbf1 gebundenen Promotoren besitzen wiederum 6 das ermittelte *b*-Konsensusmotiv (hellblau), besitzen also eine *b*-Bindestelle (*bbs*) und befinden sich in der Gruppe „*b* alleine“. Sie werden nur durch *b* reguliert. Rbf1 scheint hier somit zwar mit den *bE1/bW2* Heterodimer assoziiert zu sein, hat allerdings keinen signifikanten Einfluss auf die Expression des Zielgens. Bei 22 der direkten Rbf1-Zielgene hat die Rbf1-Deletion einen signifikanten Einfluss auf die Expression (türkis). Vier davon werden mit aktivem *b* signifikant stärker exprimiert, obwohl *b* selbst nicht mit dem Promotor assoziiert ist (braun). Von den 28 direkt gebundenen und *rbf1*-abhängig exprimierten Genen besitzen 11 eine zusätzliche *bbs* (dunkelblau). Bei 8 dieser Gene hat die *rbf1*-Deletion einen signifikanten Einfluss (grün). Für 5 davon reicht die alleinige *rbf1*-Expression aus (CP27 (*a2, Δb::P_{crg1}:rbf1*)) (hellgrün), die *b*-Bindung scheint also unter den verwendeten Bedingungen nicht nötig zu sein. Bei 3 der 8 Gene reicht zwar *rbf1* für die Induktion aus, allerdings werden diese 3 Gene deutlich stärker exprimiert wenn beide Transkriptionsfaktoren binden (violett). Dabei handelt es sich um die Gene *Iga2*, *umag_01234* und *umag_01262* (*frb52; polX*). Alle drei Gene wurden schon in 2.1.2 beschrieben. In allen drei Promotoren bindet Rbf1 alleine nur schwach (z.T. nur wenig unterhalb der Signifikanzgrenze), die Expression wird

allerdings induziert. Nur im *umag_01234*-Promotor kann *b* alleine gut binden und reicht auch für die Expression aus. Sind beide Transkriptionsfaktoren vorhanden, binden beide direkt nebeneinander, die Bindung beider Transkriptionsfaktoren wird dabei durch den anderen deutlich verbessert, was auch eine Steigerung der Expression zur Folge hat.

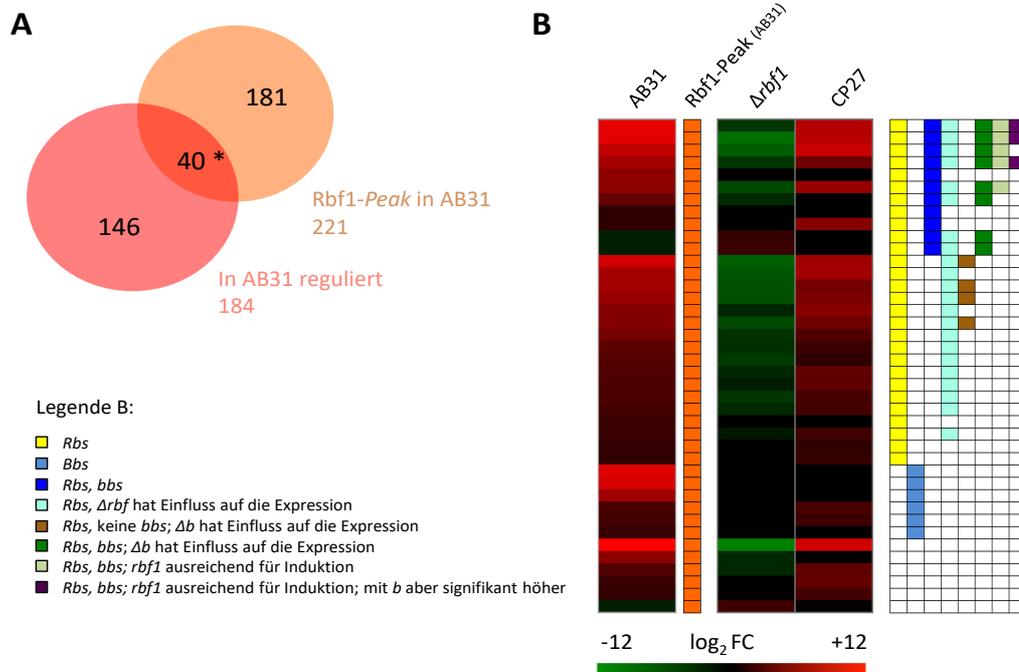


Abbildung 2.16: (A) Überschneidung *b*-regulierter Gene mit Rbf1-Peaks. In der ChIP-Seq mit dem Stamm UDS5 (*a2, Δb::P_{crG1}:bW2, P_{crG1}:bE1, rbf1:3xHA*) (AB31) wurden 221 signifikante Rbf1-Peaks identifiziert (oben). Von den 184 *b*-regulierten Genen in AB31 (unten) besitzen 40 (*) einen Rbf1-Peak, es handelt sich um direkte Rbf1-Zielgene. **(B) Expressionsprofil der 40 direkten Rbf1-Zielgene.** Die Heatmap zeigt signifikante Veränderungen (FDR < 0.01; CPM < 1; log₂ fold change (FC) > 2 bzw. < -2) der Genexpression für alle direkten Rbf1-Zielgene. Die Reihenfolge der Gene mit Identifikationsnummer sowie die genauen Expressionsveränderungen sind in Tabelle 6.1.2 auf dem Datenträger gezeigt. Die Gene *bE1* und *bW2* wurden in dem Stamm AB31 (*a2, P_{crG1}:bW2, P_{crG1}:bE1*) induziert, als Kontrolle wurden die inkompatiblen Gene *bE2* und *bW2* in AB32 (*a2, P_{crG1}:bW2, P_{crG1}:bE2*) induziert. Für *Δrbf1* wurde analog AB31 Δ *rbf1* benutzt, als Kontrolle diente allerdings AB31. Der Stamm CP27 (*a2, Δb::P_{crG1}:rbf1*) wurde für die induzierte *rbf1*-Expression verwendet, JB2 (*a2, Δb*) diente als Kontrolle. Rbf1-Peaks (AB31) (orange) entsprechen den identifizierten Peaks aus der ChIP-Seq mit dem Stamm UDS5 (*a2, Δb::P_{crG1}:bW2, P_{crG1}:bE1, rbf1:3xHA*). Dieser besitzt den gleichen genetischen Hintergrund wie AB31, allerdings ist Rbf1 mit HA getagt. Im jeweiligen Promotor vorhandene Konsensusmotive (identifiziert mit FIMO) sind für Rbf1-Bindestellen gelb, für *b*-Bindestellen blau bzw. hellblau dargestellt. Bei 22 der direkten Rbf1-Zielgene mit Rbf1-Bindestelle im Promotor hat die *rbf1*-Deletion einen signifikanten Einfluss auf die Expression (türkis). Vier dieser 22 Gene werden mit aktivem *b* signifikant exprimiert höher (log₂ FC Differenz > 1), obwohl *b* selbst nicht am Promotor bindet (braun). Acht besitzen eine zusätzliche *b*-Bindestelle im Promotor (grün). Für fünf davon ist die alleinige *rbf1*-Expression in CP27 ausreichend (hellgrün) bei drei Genen reicht *rbf1* für eine Expression aus, diese ist allerdings zusammen mit *b* signifikant höher (log₂ FC Differenz > 1) (violett).

2.2.2 Hdp1 hat nur geringfügigen Einfluss auf die durch die b-Kaskade vermittelte Genregulation

Um die Rolle von *hdp1* für die *b*-Kaskade und die Protein-Protein-Interaktion von Hdp1 mit Rbf1 und *b* näher zu untersuchen, wurden RNA-Seq Experimente mit *hdp1* Deletionsstämmen bzw. mit einem direkt *hdp1*-induzierbaren Stamm durchgeführt und mit den ChIP-Seq Daten abgeglichen.

b-abhängige Gene, für deren Expression *rbf1* benötigt wird, wurden wie bereits beschrieben durch den Vergleich der Transkriptionsprofile der Stämme AB31 (*a2*, *P_{crg}:bW2*, *P_{crg}:bE1*) und AB31 Δ *rbf1* identifiziert. Der zusätzliche Vergleich mit dem Transkriptionsprofil von AB31 Δ *hdp1* macht die Funktion von *hdp1* innerhalb dieser Kaskade deutlich. Als Kontrolle für alle drei Stämme wurden die inkompatiblen Gene *bE2* und *bW2* in AB32 induziert.

Wie bereits beschrieben, werden 22 der 184 *b*-abhängig regulierten Gene durch das Zusammenspiel von *b* und Rbf1 reguliert. 162 der 184 Gene zeigen keine signifikante Veränderung nach *b*-Induktion in AB31 Δ *rbf1*. Bei der *hdp1*-Induktion handelt es sich um eine hierarchische Abhängigkeit. *b* induziert *rbf1*, *rbf1* induziert dann *hdp1*. *hdp1*-abhängig regulierte Gene sind somit auch in AB31 Δ *rbf1* dereguliert. Diese 162 Gene lassen sich weiter in zwei Gruppen aufteilen. 98 Gene werden in AB31 Δ *hdp1* ähnlich wie in AB31 reguliert, jedoch können sie in AB31 Δ *rbf1* nicht mehr differentiell reguliert werden, Rbf1 ist also nötig für die Regulation („*rbf1* benötigt“). 64 Gene werden weder in AB31 Δ *rbf1* noch in AB31 Δ *hdp1* differentiell reguliert, *hdp1* wird folglich für die Regulation benötigt und *rbf1* ist nicht ausreichend („*hdp1* benötigt“). (Abbildung 2.17; Tabelle 6.1.3; Datenanhang).

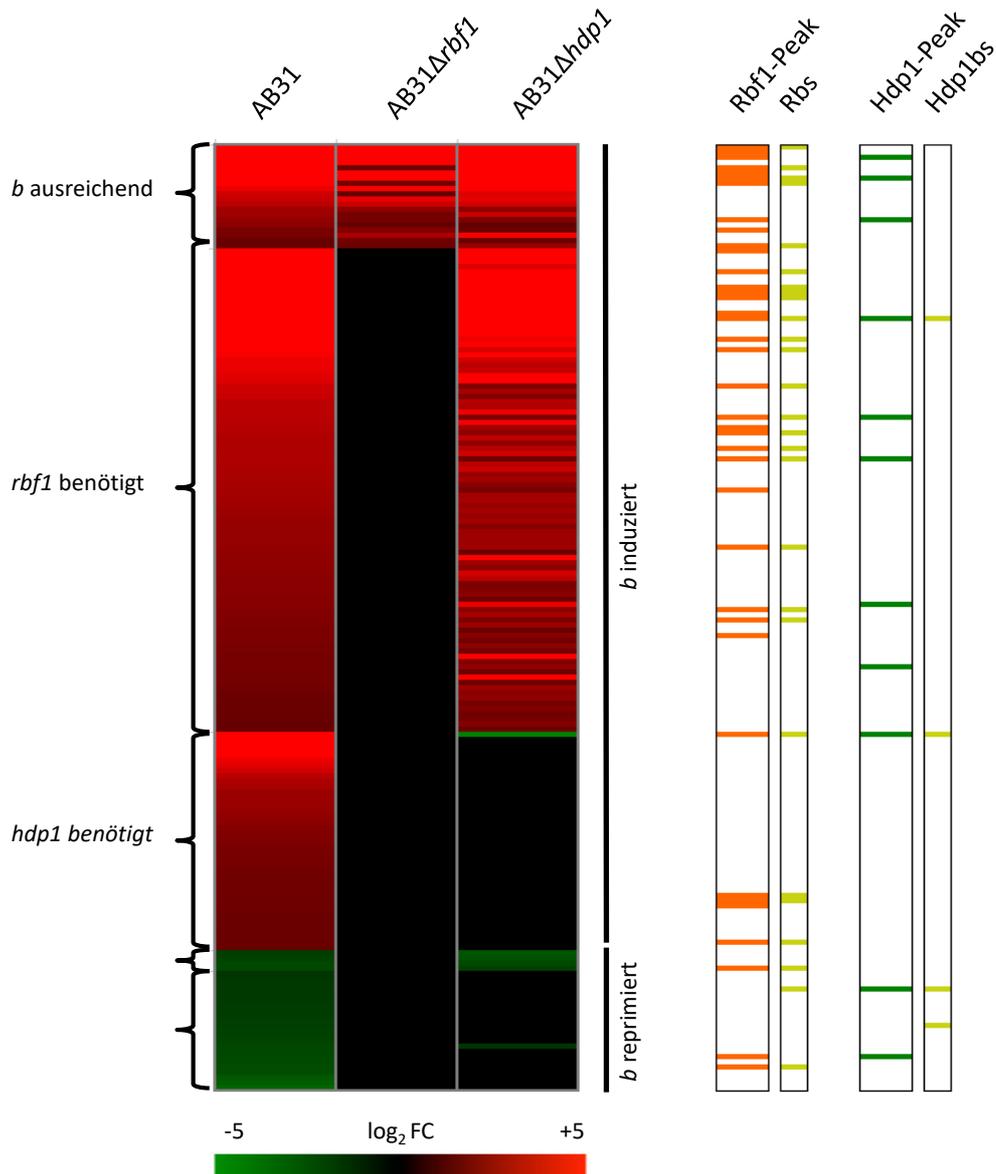


Abbildung 2.17: Rolle von *hdp1* auf die durch die *b*-Kaskade vermittelte Genexpression.

bE1 und *bW2* wurden in den Stämmen AB31 (*a2*, *P_{crg1}:bW2*, *P_{crg1}:bE1*), AB31 Δ *rbf1* und AB31 Δ *hdp1* induziert, als Kontrolle für alle Stämme wurden die inkompatiblen Gene *bE2* und *bW2* in AB32 (*a2*, *P_{crg1}:bW2*, *P_{crg1}:bE2*) induziert. Proben wurden wie oben beschrieben generiert. Die Heatmap zeigt signifikante Veränderungen (FDR < 0.01; CPM < 1; \log_2 fold change (FC) > 2 bzw. < -2) der Genexpression für alle signifikant *b*-regulierten Gene. Die Reihenfolge der Gene mit Identifikationsnummer sowie die genauen Werte der Expressionsveränderung sind in Tabelle 6.1.3 auf dem Datenträger gezeigt. Eine genaue Beschreibung zur Durchführung der RNA-Seq und der Datenanalyse sind im Material und Methoden Teil (4.6) beschrieben. Neben den Expressionsprofilen sind die entsprechenden ChIP-Seq Ergebnisse in Form von signifikanten *Peaks* (pz-score > 80 (Rbf1) bzw. 150 (Hdp1)) (Rbf1-*Peaks* orange, Hdp1-*Peaks* grün) bzw. vorhandenen Konsensusmotiven (identifiziert mit FIMO) (gelb) dargestellt. Rbf1-*Peaks* (AB31) entsprechen den identifizierten *Peaks* aus der ChIP-Seq mit dem Stamm UDS5 (*a2*, $\Delta b::P_{crg1}:bW2$, *P_{crg1}:bE1*, *rbf1:3xHA*). Dieser besitzt den gleichen genetischen Hintergrund wie AB31, allerdings ist Rbf1 mit HA getagt. Hdp1-*Peaks* (AB31) entsprechen UJU65 (*a2*, $\Delta b::P_{crg1}:bW2$, *P_{crg1}:bE1*, *hdp1:3xHA*).

Direkt induzierte *hdp1*-Expression im Stamm JB2 $P_{crg1}:hdp1$ ($a2$, Δb , $ip'[P_{crg1}:hdp1:3xHA]ip^s$) (UJU5) wurde zur Identifizierung von Genen verwendet, für deren Expression *hdp1* ausreichend ist. Als Kontrolle wurde JB2 ($a2$, Δb) verwendet. Untersucht man das Expressionsprofil der oben beschriebenen 64 Gene, für deren Regulation innerhalb der *b*-Kaskade *hdp1* benötigt wird, lassen sich diese wiederum in zwei Gruppen aufteilen. 24 der 64 Gene reagieren auf die *hdp1*-Induktion in JB2 $P_{crg1}:hdp1$. Für diese Gene wird *hdp1* benötigt und ist ausreichend („*hdp1* benötigt und ausreichend“). Die restlichen 40 Gene werden abhängig von *hdp1* reguliert, nach *hdp1*-Induktion in JB2 $P_{crg1}:hdp1$ konnte jedoch keine signifikante Veränderung festgestellt werden („*hdp1* benötigt“) (Abbildung 2.18, Tabelle 6.1.4 auf dem Datenträger).

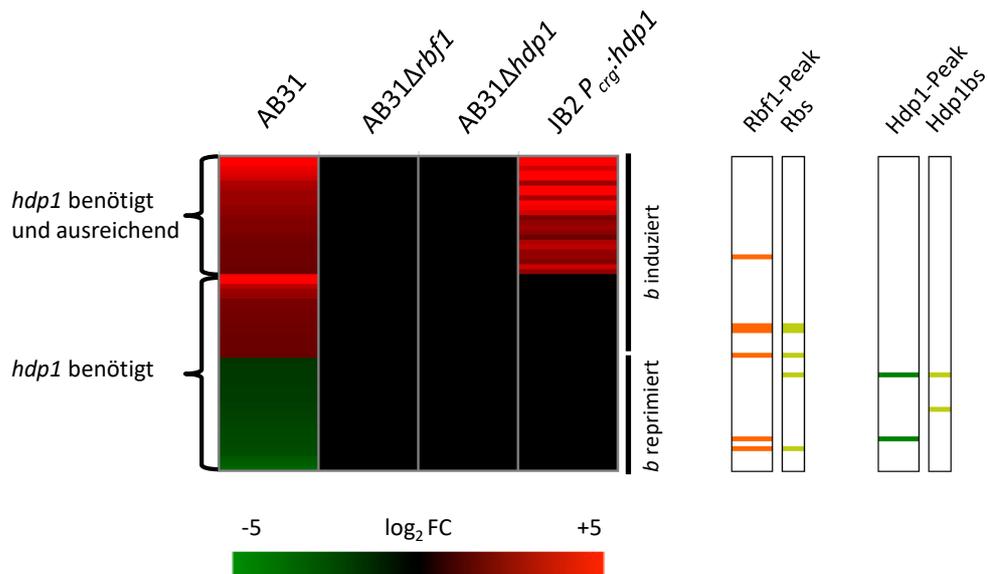


Abbildung 2.18: b-abhängig regulierte Gene, für deren Expression *hdp1* benötigt wird. *bE1* und *bW2* wurden in den Stämmen AB31 (*a2*, *P_{crg1}:bW2*, *P_{crg1}:bE1*), AB31Δ*rbf1* und AB31Δ*hdp1* induziert, als Kontrolle für alle Stämme wurden die inkompatiblen Gene *bE2* und *bW2* in AB32 (*a2*, *P_{crg1}:bW2*, *P_{crg1}:bE2*) induziert. Der Stamm JB2 *P_{crg1}:hdp1* (*a2*, Δ*b*, *ip*[*P_{crg1}:hdp1:3xHA*]*ip^s*) (UJU5) wurde für die induzierte *rbf1*-Expression verwendet, JB2 (*a2*, Δ*b*) diente als Kontrolle. Proben wurden wie oben beschrieben generiert. Die Heatmap zeigt signifikante Veränderungen (FDR < 0.01; CPM < 1; log₂ fold change (FC) > 2 bzw. < -2) der Genexpression für alle signifikant *b*-regulierten Gene die für die Expression *hdp1* benötigen. Die Reihenfolge der Gene mit Identifikationsnummer sowie die genauen Werte der Expressionsveränderung sind in Tabelle 6.1.4 auf dem Datenträger gezeigt. Eine genaue Beschreibung zur Durchführung der RNA-Seq und der Datenanalyse sind im Material und Methoden Teil (4.6) beschrieben. Neben den Expressionsprofilen sind die entsprechenden ChIP-Seq Ergebnisse in Form von signifikanten *Peaks* (p_z-score > 80 (Rbf1) bzw. 150 (Hdp1)) (Rbf1-*Peaks* orange, Hdp1-*Peaks* grün) bzw. vorhandenen Konsensusmotiven (identifiziert mit FIMO) (gelb) dargestellt. Rbf1-*Peaks* (AB31) entsprechen den identifizierten *Peaks* aus der ChIP-Seq mit dem Stamm UDS5 (*a2*, Δ*b*::*P_{crg1}:bW2*, *P_{crg1}:bE1*, *rbf1:3xHA*). Dieser besitzt den gleichen genetischen Hintergrund wie AB31, allerdings ist Rbf1 mit HA getagt. Hdp1-*Peaks* (AB31) entsprechen UJU65 (*a2*, Δ*b*::*P_{crg1}:bW2*, *P_{crg1}:bE1*, *hdp1:3xHA*).

Vergleicht man die Expression dieser 64 innerhalb der *b*-Kaskade *hdp1*-abhängig differentiell regulierten Gene in AB31 und in AB31Δ*hdp1*, weisen nur 11 davon eine durch die *hdp1*-Deletion um mehr als das 4-fache veränderte Expression auf. Dies spricht für einen begrenzten Einfluss von *hdp1* auf die *b*-Kaskade. Um Rolle von *hdp1* weiter untersuchen zu können wurden deshalb im folgenden Stämme verwendet, in denen *b* kurzgeschlossen wurde, d.h. *rbf1* bzw. *hdp1* direkt, also *b*-unabhängig induziert wurden.

rbf1-abhängige Gene, für deren Expression *hdp1* benötigt wird, wurden durch den Vergleich der Transkriptionsprofile der Stämme CP27 (*a2*, Δ*b*::*P_{crg1}:rbf1*) und CP27Δ*hdp1* identifiziert. Mit CP27 lässt sich *rbf1* über den mit Arabinose

induzierbaren *crg1*-Promotor induzieren. Direkt induzierte *hdp1*-Expression im Stamm JB2 $P_{crg1}:hdp1$ (*a2*, Δb , $ip'[P_{crg1}:hdp1:3xHA]ip^s$) wurde zur Identifizierung von Genen verwendet, für deren Expression *hdp1* ausreichend ist. Als Kontrolle für alle drei Stämme wurde JB2 (*a2*, Δb) verwendet. 163 der insgesamt 204 *rbf1*-abhängig induzierten Gene werden ebenfalls nach *rbf1*-Induktion in CP27 $\Delta hdp1$ induziert (Abbildung 2.19; Tabelle 6.1.5; Datenanhang). 72 dieser Gene reagieren auf die direkte *hdp1*-Induktion in JB2 $P_{crg1}:hdp1$, werden also über *rbf1* und zusätzlich unabhängig über *hdp1* reguliert („*rbf1* oder *hdp1* ausreichend“). Die übrigen 91 Gene reagieren nicht auf direkte *hdp1*-Induktion, *rbf1* ist für die Induktion ausreichend („*rbf1* ausreichend“). Die restlichen 41 Gene werden zwar nach *rbf1*-Induktion in CP27 induziert, die *hdp1*-Deletion verhindert allerdings eine Induktion. 20 davon reagieren auf direkte *hdp1*-Induktion („*hdp1* benötigt und ausreichend“), 21 reagieren nicht („*hdp1*-benötigt“).

Gleicht man die Expressionsprofile mit *Peaks* aus den entsprechenden ChIP-Seq Experimenten ab, wird deutlich, dass nur wenige der regulierten Gene Promotoren mit signifikanten *Peaks* besitzen. In CP27 können 163 Promotoren mit signifikanten Hdp1-*Peaks* identifiziert werden, allerdings befinden sich nur 19 davon in Promotoren von Genen die in CP27 reguliert werden. Der größte Anteil an Bindestellen (6 der insgesamt 19) befindet sich wie vermutet in der 21 Gene umfassenden Gruppe „*hdp1* benötigt“. Bei mindestens 7 dieser Gene handelt es sich interessanterweise um Transporter.

Von den insgesamt 63 Genen, deren Promotoren sich sowohl mit Hdp1:3xHA als auch mit Rbf1:3xHA anreichern lassen (Abbildung 2.9; *1 UND *2) werden nur 7 in ihrer Regulation durch Hdp1 innerhalb der *rbf1*-Kaskade beeinflusst. Für den Großteil der Bindungen des Rbf1-Hdp1 Komplexes lässt sich weder eine *hdp1*- noch *rbf1*- abhängige Regulation feststellen. Hdp1 spielt also unter den getesteten Bedingungen keine signifikante Rolle bei der *rbf1*-vermittelten Genregulation.

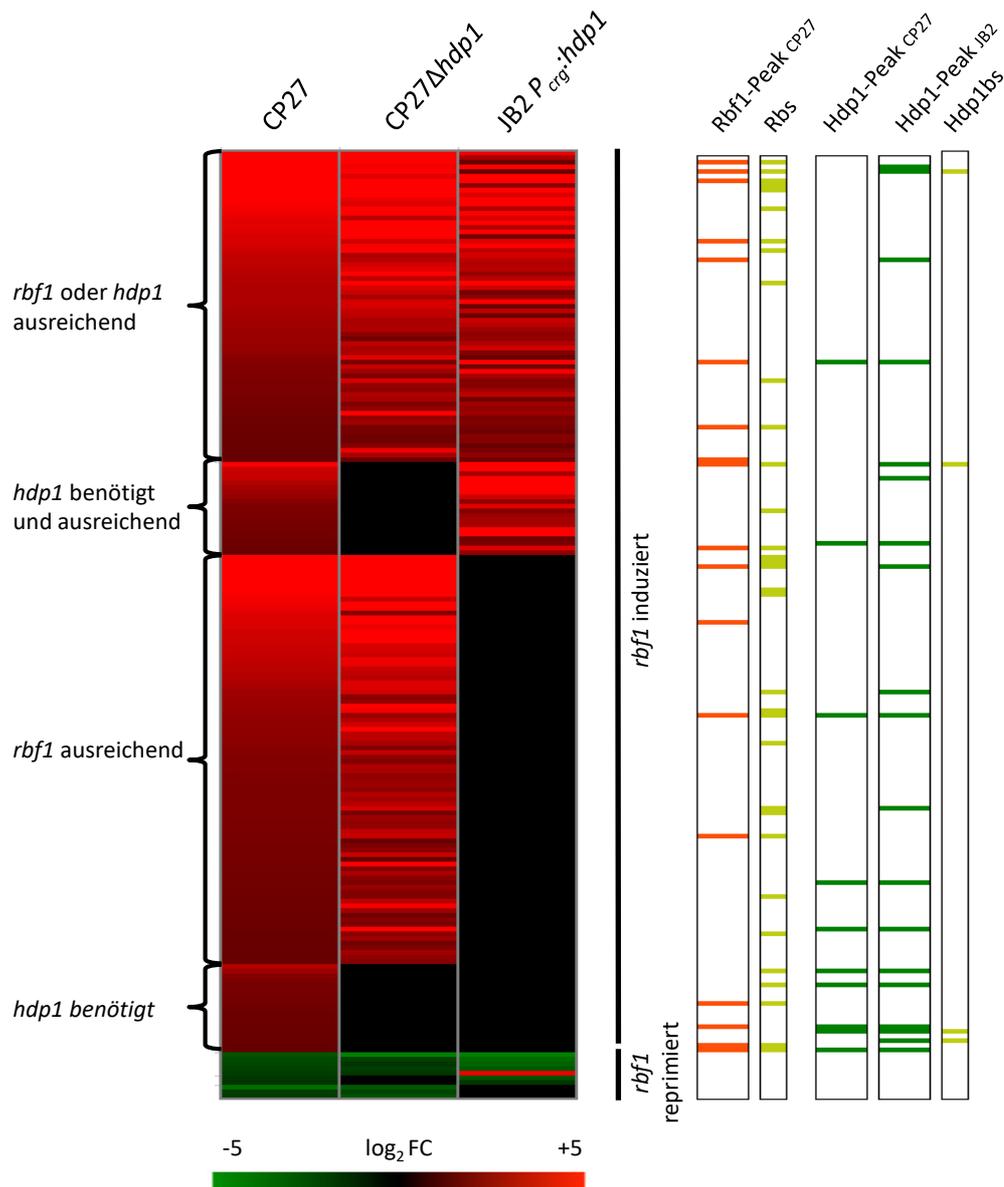


Abbildung 2.19: Hdp1 Einfluss auf die Expression *rbf1*-abhängig regulierten Gene. Rbf1 wurde in den Stämmen CP27 ($a2, \Delta b::P_{crg1}:rbf1$) und CP27Δhdp1 ($a2, \Delta b::P_{crg1}:rbf1, \Delta hdp1$) induziert. Der Stamm JB2 P_{crg}:hdp1 ($a2, \Delta b, ip[P_{crg1}:hdp1:3xHA]ip^s$) (UJU5) wurde für die direkt induzierte *hdp1*-Expression verwendet. JB2 ($a2, \Delta b$) diente für alle Stämme als Kontrolle. Proben wurden wie oben beschrieben generiert. Die Heatmap zeigt signifikante Veränderungen (FDR < 0.01; CPM < 1; log₂ fold change (FC) > 2 bzw. < -2) der Genexpression für alle signifikant *rbf1*-regulierten Gene. Die Reihenfolge der Gene mit Identifikationsnummer sowie die genauen Werte der Expressionsveränderung sind in Tabelle 6.1.5 auf dem Datenträger gezeigt. Eine genaue Beschreibung zur Durchführung der RNA-Seq und der Datenanalyse sind im Material und Methoden Teil (4.6) beschrieben. Neben den Expressionsprofilen sind die entsprechenden ChIP-Seq Ergebnisse in Form von signifikanten *Peaks* (p_z-score > 80 (Rbf1) bzw. 150 (Hdp1)); (Rbf1-*Peaks* orange, Hdp1-*Peaks* grün) bzw. vorhandenen Konsensusmotiven (identifiziert mit FIMO) (gelb) dargestellt. Rbf1-*Peaks* (CP27) entsprechen den identifizierten *Peaks* aus der ChIP-Seq mit dem Stamm UMJ42 ($a2, \Delta b::P_{crg1}:rbf1:3xHA$). Dieser besitzt den gleichen genetischen Hintergrund wie CP27, allerdings ist Rbf1 mit HA getagt. Hdp1-*Peaks* (CP27) entsprechen UJU66 ($a2, \Delta b::P_{crg1}:rbf1, hdp1:3xHA$), Hdp1-*Peaks* (JB2) entsprechen UJU5 ($a2, \Delta b, ip[P_{crg1}:hdp1:3xHA]ip^s$).

Insgesamt beeinflusst die direkte *hdp1*-Induktion in JB2 $P_{crg:hdp1}$ (*a2*, Δb , *ip*'[$P_{crg1:hdp1:3xHA}$]*ip*^s) die Expression von 296 Genen. 150 davon werden nicht in CP27 über *rbf1* induziert, obwohl die *hdp1*-Induktionslevel in CP27 und JB2 $P_{crg1:hdp1}$ nahezu identisch sind (Abbildung 6.5; Anhang), noch hat die *hdp1*-Deletion einen Einfluss auf deren Expressionslevel in CP27. Damit scheint Rbf1 die *hdp1*-abhängige Regulation zu verhindern. Von den 150 Genen, die nicht über Rbf1 induziert werden, werden 102 durch Hdp1 induziert und 48 reprimiert (Abbildung 2.20; Tabelle 6.1.6 auf dem Datenträger).

Untersucht man diese Gene auf Hdp1-*Peaks* in den entsprechenden ChIP-Seq Experimenten, findet man insgesamt 22 *Peaks*, davon nur 2 bei den *hdp1*-induzierten Genen. Allerdings weisen 20 der 48 *hdp1*-abhängig reprimierten Gene einen Hdp1-*Peak* im Promotor auf, 9 davon zusätzlich auch die Hdp1-Konsensussequenz. Interessanterweise hat die *rbf1*-Induktion keine Auswirkung auf die Bindung von Hdp1: wird *rbf1* induziert, geht zwar die Regulation dieser Gene verloren (Abbildung 2.20; links: CP27, Heatmap erste Spur), jedoch nicht die Hdp1-Bindung am Promotor (Abbildung 2.20; rechts: Hdp1-*Peaks* gegen JB2-*Peaks* (grün); nahezu identische *Peaks* in CP27 und JB2 $P_{crg1:hdp1}$). Mit Rbf1:3xHA können außerdem nur 3 dieser Promotoren angereichert werden. Der *rbf1*-Effekt, der die *hdp1*-abhängige Repression dieser Gene verhindert, läuft folglich weder über die Inhibierung der Hdp1-Bindung noch über einen inhibitorischen Effekt durch eine zusätzliche Bindung von Rbf1 ab. Denkbar wäre die *rbf1*-abhängige Induktion eines weiteren Regulators oder eine Modifizierung von Hdp1. Ein möglicher Kandidat wäre die *rbf1*-induzierte MAP-Kinase Kpp6.

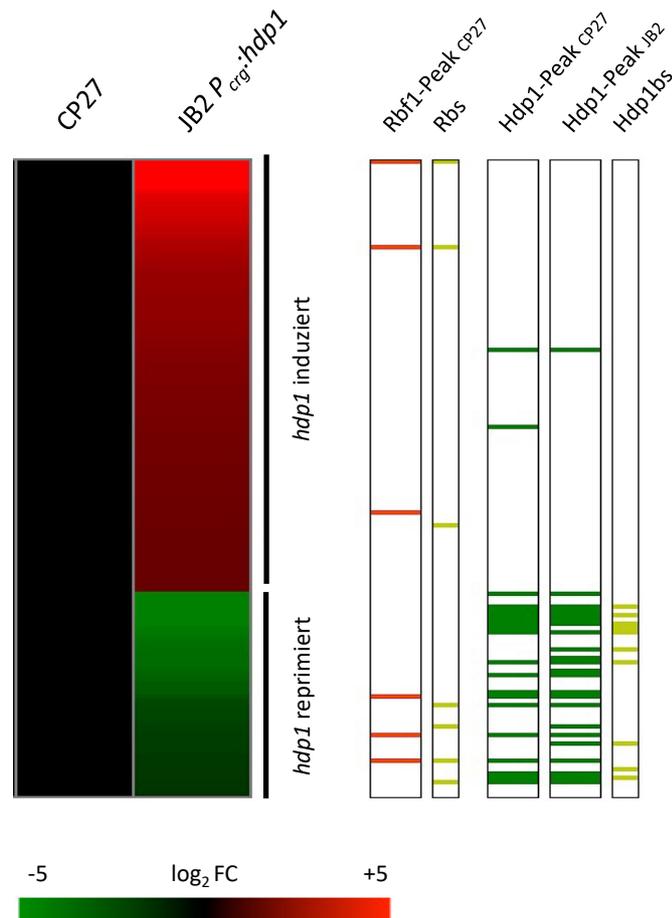


Abbildung 2.20: Rbf1 verhindert die $hdp1$ -abhängige Regulation. Rbf1 wurde in dem Stamm CP27 ($a2$, $\Delta b::P_{crg1}:rbf1$) induziert. Der Stamm JB2 $P_{crg}:hdp1$ ($a2$, Δb , $ipr[P_{crg}:Hdp1:3xHA]ips$) (UJU5) wurde für die direkt induzierte $hdp1$ -Expression verwendet. JB2 ($a2$, Δb) diente für alle Stämme als Kontrolle. Proben wurden wie oben beschrieben generiert. Die Heatmap zeigt signifikante Veränderungen (FDR < 0.01; CPM < 1; \log_2 fold change (FC) > 2 bzw. < -2) der Genexpression für alle signifikant $hdp1$ -regulierten Gene, die nicht in CP27 nicht differentiell reguliert sind. Die Reihenfolge der Gene mit Identifikationsnummer sowie die genauen Werte der Expressionsveränderung sind in Tabelle 6.1.6 auf dem Datenträger gezeigt. Eine genaue Beschreibung zur Durchführung der RNA-Seq und der Datenanalyse sind im Material und Methoden Teil 4.6 beschrieben. Neben den Expressionsprofilen sind die entsprechenden CHIP-Seq Ergebnisse in Form von signifikanten *Peaks* (p_z-score > 80 (Rbf1) bzw. 150 (Hdp1) (Rbf1-*Peaks* orange, Hdp1-*Peaks* grün) bzw. vorhandenen Konsensusmotiven (identifiziert mit FIMO) (gelb) dargestellt. Rbf1-*Peaks* (CP27) entsprechen den identifizierten *Peaks* aus der CHIP-Seq mit dem Stamm UMJ42 ($a2$, $\Delta b::P_{crg1}:rbf1:3xHA$). Dieser besitzt den gleichen genetischen Hintergrund wie CP27, allerdings ist Rbf1 mit HA getagt. Hdp1-*Peaks* (CP27) entsprechen UJU66 ($a2$, $\Delta b::P_{crg1}:rbf1$, $hdp1:3xHA$), Hdp1-*Peaks* (JB2) entsprechen UJU5 ($a2$, Δb , $ipr[P_{crg1}:Hdp1:3xHA]ips$).

2.2.3 The next generation: Kontrolle durch die *rbf1*-abhängigen Transkriptionsfaktoren Hdp1 und Biz1

162 der 184 *b*-abhängig regulierten Gene in *Ustilago maydis* werden über *rbf1* reguliert (RNA-Seq, diese Arbeit). In dieser Gruppe befinden sich zwei weitere Transkriptionsfaktoren, UMAG_02549 (Biz1) und UMAG_04928 (Hdp2). Biz1 (*b-dependent zinc finger protein*) ist essentiell für die pathogene Entwicklung von *Ustilago maydis*. Die Deletion verhindert Appressorienbildung, wodurch eine Penetration der Pflanze und anschließende Proliferation verhindert wird. Biz1 ist also für den frühen Infektionsprozess von Bedeutung (Flor-Parra *et al.*, 2006). Die Deletion von *hdp2* (*homeodomain transcription factor 2*) führt zu einem vergleichbaren Phänotyp. Sowohl die *biz1*- als auch die *hdp2*-Deletion verhindert die Appressorienbildung, das filamentöse Wachstum kann jedoch weiterhin über *b* induziert werden. Beide Transkriptionsfaktoren regulieren verschiedene Effektoren, die vor allem während der frühen Infektionsphase von Bedeutung sind (Lanver *et al.*, 2014).

Zur Identifizierung von Bindestellen der Transkriptionsfaktoren Biz1 und Hdp2 wurden, um die Komplexität des transkriptionellen Netzwerks gering zu halten, zunächst ChIP-Seqs mit Stämmen durchgeführt, in denen *biz1:3xHA* (UJU4 (*a2*, Δb , *ip*'[*P_{crg1}:biz1:3xHA*]*ip*^s)) bzw. *hdp2:3xHA* (UJU2 (*a2*, Δb , *ip*'[*P_{crg1}:hdp2:3xHA*]*ip*^s)) direkt, unabhängig von *rbf1*, induziert werden konnten. Die ChIP-Seq Experimente wurden wie bereits beschrieben durchgeführt. Zur Identifizierung von Konsensusmotiven wurde eine MEME-ChIP Analyse mit 328 bp langen Sequenzen um die Maxima der *Peaks* (*cookie cuts*) durchgeführt. Die Grenze für signifikante *Peaks* wurde zunächst sehr hoch auf einen *pz-score* von 500 festgesetzt. In Abbildung 2.21 sind die ermittelten Konsensusmotive als *position weight matrix* für die Biz1- (links) und die Hdp2-Bindestelle (rechts) dargestellt. Das Konsensusmotiv konnte für Biz1 in 59 von 60 (*E-Value* = 7.4e-21), für Hdp2 in 31 von 59 (*E-Value* = 4.3e-8) untersuchten Sequenzen identifiziert werden. Beide Motive sind dabei innerhalb der untersuchten Sequenzen zentral angereichert. Das Biz1-Konsensusmotiv bestätigt das bereits durch die Untersuchung der Promotoren von *biz1*-abhängig regulierten Genen bioinformatisch ermittelte Motiv (Finkernagel, 2006). Abbildung 2.21 zeigt jeweils rechts neben den Motiven den Überlapp

der Gene mit signifikanten *Peaks* im Promotor und den *biz1*- bzw. *hdp2*-abhängig regulierten Genen aus Microarray-Analysen mit direkt *biz1*- bzw. *hdp2*-induzierbaren Stämmen (Miroslav Vranes, unveröffentlicht). Für Biz1 konnten so 19, für Hdp2 lediglich 3 direkte Zielgene identifiziert werden.

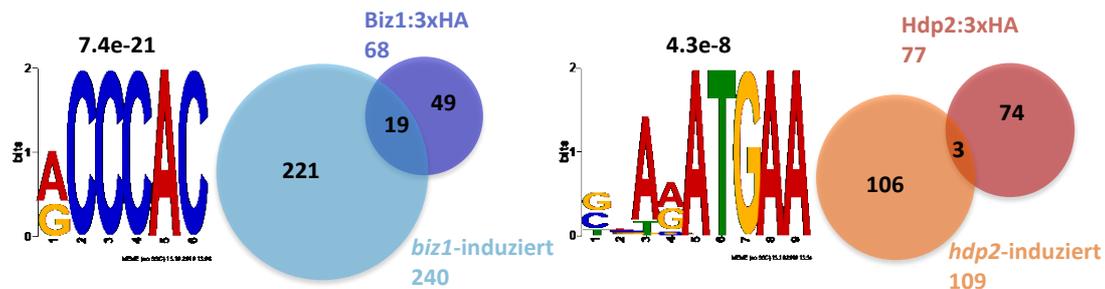


Abbildung 2.21: Konsensussequenzen und Überlap von Bindung und Regulation von Biz1 und Hdp2. Konsensussequenzen erstellt mit MEME, dargestellt als *position weight matrix* (links: Biz1; *E-Value*: 7.4×10^{-21} , rechts: Hdp2; *E-Value*: 4.3×10^{-8}). Als Input wurden *cookie cuts* der Maxima von signifikanten (p -score > 500) Biz1- *Peaks* bzw. Hdp2-*Peaks*. Die Venn-Diagramme zeigen den Überlap von Bindung und Regulation von Zielgenen von Biz1 und Hdp2 (Regulation aus Microarray-Analysen mit (AB32 $P_{crg1:biz1}$) bzw. (AB32 $P_{crg1:hdp2}$) (Miroslav Vranes, unveröffentlicht)).

Sowohl *biz1* als auch *hdp2* können über *rbf1* in axenischer Kultur induziert werden (Heimel *et al.*, 2010b). Betrachtet man jedoch transkriptionelle Veränderungen von *Ustilago maydis* während den Pflanzen assoziierten Phasen seines Zellzyklus können ca. drei Tage nach Infektion keine *rbf1* Transkripte mehr identifiziert werden, wohingegen *biz1* und *hdp2* in diesen Phasen sogar deutlich höher exprimiert werden als über die *b*-Kaskade in axenischer Kultur (Abbildung 2.22). Die Expression von *biz1* und *hdp2* muss während dieser Phase *rbf1*-unabhängig gesteuert werden.

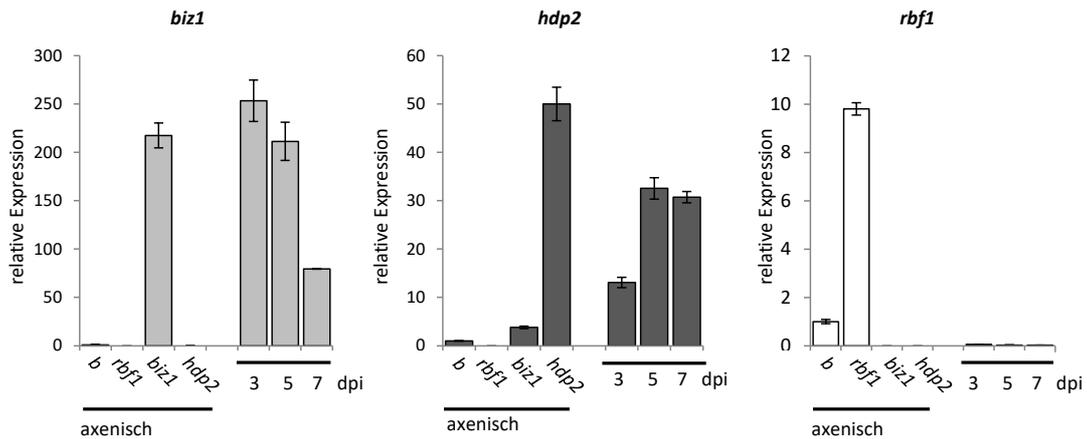


Abbildung 2.22: Vergleich der *biz1*, *hdp2* und *rbf1*-Level in axenischer Kultur mit Pflanzeninfektionen. Die einzelnen Diagramme zeigen die Transkriptmenge von *biz1*, *hdp2* und *rbf1* in Relation zu *b*-induzierter axenischer Kultur (Spur1: *bE* (AB31 *a2*, *Pcrg1:bW2*, *Pcrg1:bE1*)). Die Transkriptionsfaktoren *rbf1*, *biz1* und *hdp2* wurden in Spur 2, 3 und 4 *b*-unabhängig direkt mit dem Arabinose abhängigen *crg1*-Promotor induziert (*rbf1*: CP27 (*a2*, $\Delta b::P_{crg1}:rbf1$), *biz1*: UMJ33 (*a2* Δb *ip*^r[*Pcrg1:biz1*]*ip*^s) und *hdp2*: UMJ32 (*a2* Δb *ip*^r[*Pcrg1:hdp2*]*ip*^s)). Die letzten drei Spuren zeigen eine Zeitreihe von *Ustilago maydis* während der Pflanzen-assoziierten Phase 3, 5 und 7 Tage nach Infektion (dpi: days post infection). *eIF2b* (UMAG_04869) wurde als Haushaltsgen zur Normalisierung verwendet. Kontrollen zur *crg1*-Induktion wurden durchgeführt (nicht gezeigt). Das Experiment wurde mit technischen Duplikaten durchgeführt. Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung der Mittelwerte der technischen Duplikate.

Im *biz1*-Promotor befindet sich zwar ein *Rbf1*-Peak, der *pz*-score liegt allerdings deutlich unterhalb der Signifikanz-Grenze. Außerdem befindet er sich 2,4 kbp vom ATG des *biz1* Gens entfernt, und nur 1 kbp vom divergent exprimierten Gen UMAG_02550. Eine direkte Regulation von *biz1* durch *Rbf1* erscheint deshalb unwahrscheinlich. Der *hdp2*-Promotor besitzt *Rbf1*-, *Biz1*-, und *Hdp2*-Bindestellen. *hdp2* kann sowohl über *rbf1* als auch über *biz1* induziert werden, allerdings ist die Expression in axenischer Kultur deutlich geringer als während Pflanzen-assoziierten Phasen, in den *rbf1* nicht mehr exprimiert wird. Der genaue Mechanismus der *rbf1*-unabhängigen *biz1*- und *hdp1*-Expression in der Pflanze ist Gegenstand weiterführender Untersuchungen.

Vergleicht man die ChIP-Seq Experimente von *Hdp2* und *Biz1*, können die Promotoren von 55 Genen sowohl mit *Hdp2*:3xHA als auch mit *Biz1*:3xHA angereichert werden. Es handelt sich dabei allerdings nicht wie im Fall von *b*, *Rbf1* und *Hdp1* um fast deckungsgleiche Bereiche, die angereichert werden,

sondern hauptsächlich um deutlich voneinander getrennte Bereiche. In nur 10 von 55 Fällen sind die signifikantesten *Peaks* der entsprechenden ChIP-Seq Experiment weniger als 50 bp voneinander getrennt. Die Hdp2- und Biz1-Bindung steht also vermutlich nicht in einem kombinatorischen Zusammenhang. Berücksichtigt man zusätzlich die ChIP-Seq mit Rbf1:3xHA wird deutlich, dass 34 % der Gene mit Rbf1-*Peaks* im Promotor auch mit Biz1 und/oder Hdp2 angereichert werden können (Abbildung 6.6; Anhang). Auch hier handelt es sich um deutlich getrennte *Peaks*. Dies lässt vermuten, dass die Regulation eines Teils der über Rbf1-Bindung regulierter Gene zu späteren Zeitpunkten der pathogenen Entwicklung von Biz1 und/oder Hdp2 übernommen wird.

Trotz fast identischer Konsensusmotive binden Hdp1 und Hdp2 an unterschiedliche Bereiche

Betrachtet man die über MEME-ChIP ermittelten Konsensusmotive von Hdp1 und Hdp2, kann kaum ein Unterschied identifiziert werden (Abbildung 2.23; oben). Bei beiden Transkriptionsfaktoren handelt es sich um Homeodomänen Proteine. Gleicht man die Analysen der Hdp1:3xHA ChIP-Seq Experimente mit denen des Hdp2:3xHA ChIP-Seq Experiments ab, findet man lediglich 10 Promotoren mit *Peaks* und Konsensusmotiven für beide Transkriptionsfaktoren. 7 davon besitzen klar getrennte *Peaks* mit Konsensusmotiv (Abbildung 2.23, unten). In einer FIMO Analyse dieses Bereichs lassen sich jeweils beide Konsensusmotive an 3 Positionen bestimmen. Die Sequenzen an diesen Stellen sind von links nach rechts TAATGAA // AAATGAA // AAATAAA. Betrachtet man allerdings die Maxima der *Peaks*, wird deutlich, dass trotz der Ähnlichkeit die mittlere Sequenz von Hdp1, die beiden äußeren hingegen von Hdp2 gebunden werden. Die Bindung beider Transkriptionsfaktoren ist demnach trotz fast identischer Bindemotive *in vivo* sehr spezifisch. Es ist bekannt, dass Homeodomänen-Transkriptionsfaktoren kurze, ähnliche AT-reiche Sequenzen binden können, die Anwesenheit eines Motivs *per se in vivo* allerdings nicht für die spezifische Bindung ausreichend ist. Es wird angenommen, dass die Bindung von Homeodomänen-Transkriptionsfaktoren zusätzlich über Chromatin-

Zugänglichkeit und die Interaktion mit weiteren Faktoren bestimmt wird (Bobola und Merabet, 2017).

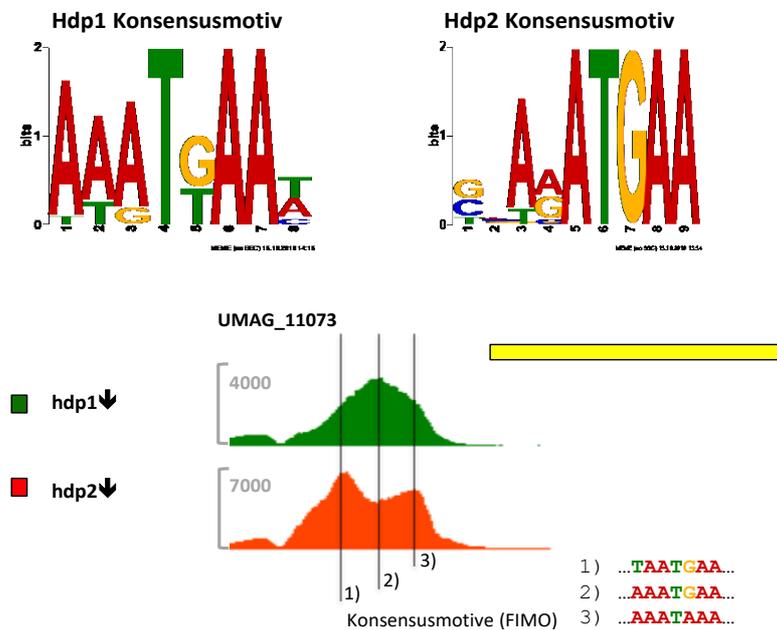


Abbildung 2.23: (A) Konsensussequenz des DNA-Bindemotifs von Hdp1- und Hdp2. Die Konsensussequenzen wurden wie beschrieben mit MEME erstellt und sind als *position weight matrix* dargestellt. **(B) Visuelle Darstellung von Peaks und Konsensussequenzen in einem Promotor der von Hdp1- und Hdp2 gebunden werden kann.** Reads wurden mit Bowtie2 version 2.0.0-beta7 (Langmead und Salzberg, 2012) auf das *Ustilago maydis* Genom (Ensembl Genomes 33 (Kersey *et al.*, 2018) aligniert. *Peak*- Profile sind repräsentiert durch global normalisierte *Read-counts* aller ChIP-Seq Experimente. Trotz fast identischer Konsensussequenzen binden Hdp1 und Hdp2 an spezifische Bereiche, die sich bezogen auf ihre Primärsequenz kaum unterscheiden. Die Sequenzen die den Maxima der *Peaks* entsprechen sind von links nach rechts: TAATGAA / AAATGAA / AAATAAA.

2.3 EnChIP - engineered DNA-binding molecule-mediated chromatin immunoprecipitation

Die Funktion des eukaryotischen Genoms wird auf der Ebene des Chromatins durch molekulare Komplexe gesteuert. Klassische Chromatin-Immunopräzipitations Ansätze verwenden zur Anreicherung des Chromatins ein *protein of interest* für die Präzipitation, beispielsweise ein Transkriptionsfaktor oder ein Histon. Es werden also Chromatin-Bereiche angereichert, die mit einem bestimmten Protein assoziiert sind (WO bindet das *protein of interest*). Um Einblicke in molekulare Mechanismen einer spezifischen genomischen Region zu bekommen, ist es allerdings nötig, Moleküle zu identifizieren, die mit einem bestimmten DNA-Bereich assoziiert sind (WAS bindet an eine *region of interest*). EnChIP (*engineered DNA-binding molecule-mediated chromatin immunoprecipitation*) stellt eine *in vivo* Methode zur Anreicherung spezifischer DNA-Bereiche MIT assoziierten Molekülen dar.

2.3.1 Etablierung eines EnChIP Systems für *Ustilago maydis*

Bei der enChIP werden spezifische genomische Bereiche mithilfe von modifizierten DNA-bindenden Proteinen markiert, biochemisch aufgereinigt, und anschließend analysiert. Hier wurde eine katalytisch inaktive Form des Cas9-Proteins aus dem CRISPER (*clustered regularly interspaced short palindromic repeats*) System verwendet, mit dem Ziel die mit einer bestimmten Chromatin-Region interagierenden Proteine zu identifizieren.

Um das Cas9-Protein an eine spezifische DNA-egion zu binden, wird eine sgRNA (*single guide RNA*) benötigt. Sie besteht aus den 20 Nukleotiden *upstream* (in 5'-Richtung) eines PAM (*Protospacer Adjacent Motif*) der zu bindenden Ziel-DNA und der tracrRNA, sie dient als Adapter für die Bildung des RNA-Protein-DNA Komplexes. Um das Einführen eines Doppelstrangbruches zu verhindern muss eine katalytisch inaktive Form (dCas9) von Cas9 verwendet werden (Jinek *et al.*, 2012). Außerdem muss das Cas9-Protein mit einem *tag* für die Immunopräzipitation versehen werden. In Abbildung 2.24 ist das Prinzip der EnChIP schematisch dargestellt. dCas9:HA wird mithilfe einer

spezifischen sgRNA an den Promotor des Ziel-Gens gebunden. Das Chromatin wird fixiert und fragmentiert. Protein-DNA-Komplexe können nun über dCas9:HA immunopräzipitiert werden. Anschließend können DNA bzw. Proteine aus der Probe isoliert und analysiert werden (detaillierter Ablauf im Methodenteil 4.4.8).

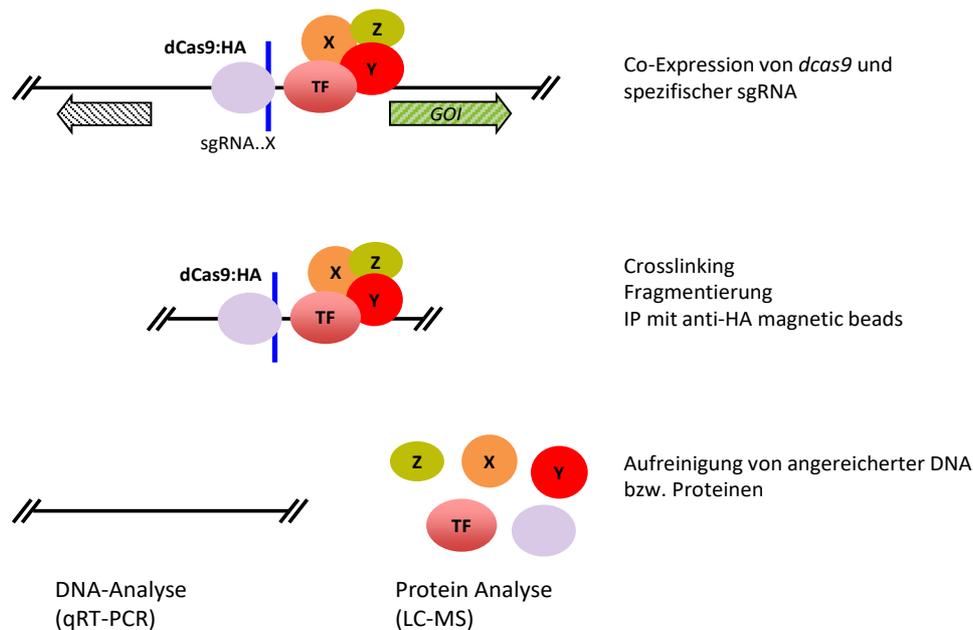


Abbildung 2.24: Prinzip und Arbeitsablauf der enChIP. Schematische Darstellung einer *region of interest* mit dCas9:HA Bindung, Transkriptionsfaktor-Bindung (TF) und weiteren assoziierten Proteinen (X Y, Z). *dcas9* und eine für die Region spezifische sgRNA werden co-exprimiert und binden an die *region of interest*. Nach der Fixierung der Zellen und Isolierung und Fragmentierung des Chromatins kann die Region mit assoziierten Proteinen über dCas9:HA mit anti-HA magnetic Beads angereichert werden. Anschließend können DNA und Proteine isoliert und mit qRT-PCR bzw. LC-MS analysiert werden.

Die Etablierung des enChIP Systems für *Ustilago maydis* baut auf der Basis des bereits publizierten Cas9-Systems aus (Schuster *et al.*, 2016) auf; in Cas9 wurden zusätzlich zwei Mutationen (D10A und H840A) eingefügt, um das Protein katalytisch inaktiv zu machen. Als CRISPER-Cas9 Expressionssystem wurde ein frei replizierendes Plasmid verwendet, das Carboxin Resistenz vermittelt (Abbildung 2.25). *dcas9* wurde dabei über den starken konstitutiven *otef*-Promoter exprimiert. Die sgRNA, die die Spezifität der Cas9 Bindung vermittelt, kann über eine singuläre Acc65I Restriktionsschnittstelle in das

gleiche Plasmid eingebracht werden; die sgRNA und wird durch den Polymerase III abhängigen *U6* Promotor exprimiert. Das dCas9 Protein besitzt eine N-terminale NLS und einen C-terminalen HA-tag, gefolgt von einer weiteren NLS (Schuster *et al.*, 2016).

Da in einem Westernblot nur sehr geringe Mengen an dCas9-Protein detektiert werden konnte, wurde das *dcas9* Gen zusätzlich Dicodon optimiert um eine bessere heterologe Expression in *Ustilago maydis* zu gewährleisten (vgl. Zarnack *et al.*, 2006) (Abbildung 2.25). Die Nukleotidsequenz ist in Abbildung 6.7 im Anhang dargestellt.

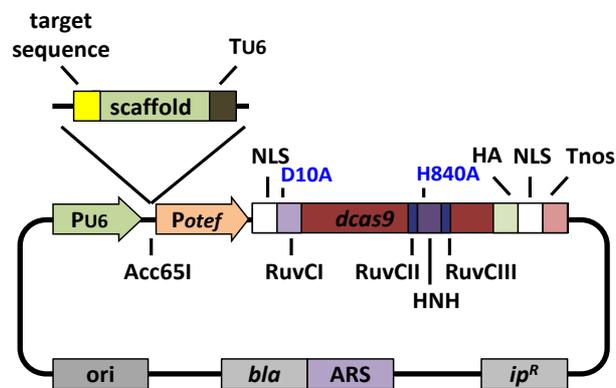


Abbildung 2.25: CRISPR-Cas9 Expressionssystem für *Ustilago maydis*. Schematische dargestellt ist das frei replizierende Plasmid pJU30-sgRNA_0. Mit ihm kann das für *Ustilago maydis* dicodon optimierte *NLS-dcas9-HA-NLS* und eine benutzerdefinierte sgRNA exprimiert werden. Als Doppelstrang DNA synthetisierte sgRNA Fragmente können in den mit *Acc65I* linearisierten Vektor über Gibson Assembly eingebracht werden. Die erforderlichen Mutationen in den Endonuclease-Domänen von Cas9 die für die Erstellung einer katalytisch inaktiven Form (dCas9) notwendig sind, sind blau eingetragen. Abbildung modifiziert nach Schuster *et al.*, 2016).

P_{U6} : *Ustilago maydis* *U6* Promotor, T_{U6} : *U6* Terminator, P_{otef} : starker, konstitutiver *otef* Promotor, NLS: *nuclear localization signal*, D10A; H840A: Austausch der Aminosäure an Position 10 bzw. 840 (Asparaginsäure bzw. Histidin ersetzt durch Alanin), RuvCI, II, III und HNH: Endonuclease-Domänen, HA: Hämagglutinin Tag, T_{nos} : *nos* Terminator, ori: *origin of replication*, bla: beta-Lactamase Gen, ARS: *autonomously replicating sequence*, ip^R : *Ustilago maydis ip*-Locus; vermittelt Carboxin Resistenz.

2.3.2 Proof of Principle des dCas9 Systems zur Detektion von Rbf1 am *dik6*-Promotor.

Zur Etablierung des enChIP Systems für *Ustilago maydis* wurde der *dik6*-Promotor als Proof of Principle verwendet. Wie bereits beschrieben, handelt es sich bei *dik6* um ein direkt *rbf1* reguliertes Gen. Die Bindung von Rbf1 im *dik6*-Promotor ist ausreichend, um die *dik6*-Expression zu induzieren (RNA Seq, diese Arbeit). Weiterhin konnten Rbf1-Bindestellen an Position -526 bis -537 und -549 bis -560 identifiziert werden (Abbildung 2.2). In Abbildung 2.26 ist der genomische Kontext von *dik6* dargestellt. Um dCas9 an diesen Promotor zu binden, wurde nach passenden sgRNAs in der Mitte des intergenischen Bereichs zwischen dem ORF von *dik6* und dem benachbarten Gen (blau markierter Bereich) gesucht. Dazu wurde das E-CRISP tool (Heigwer *et al.*, 2014) verwendet. Die drei sgRNAs mit den besten scores wurden zusammen mit Überhängen für die Klonierung, einer *scaffold* Sequenz und dem U6 Terminator synthetisiert (IDT, Abbildung 6.8, Anhang), und in das freireplizierende dCas9 Expressions-Plasmid (pJU30) kloniert. Die Positionen der Bindung der sgRNAs im *dik6*-Promotor sind in Abbildung 2.26 blau dargestellt. Das Plasmid wurde in einen Stamm transformiert, in dem Rbf1 mit einem Myc-tag versehen ist und das *rbf1:myc*-Gen über Arabinose induziert werden kann (UDS6 (*a2*, $\Delta b::P_{crg1}:bE1$, $P_{crg1}:bW2$, *rbf1:3xMyc*)). Zur weiteren Evaluation der Funktionalität der sgRNAs wurden die im Folgenden aufgeführten Kontrollen durchgeführt.

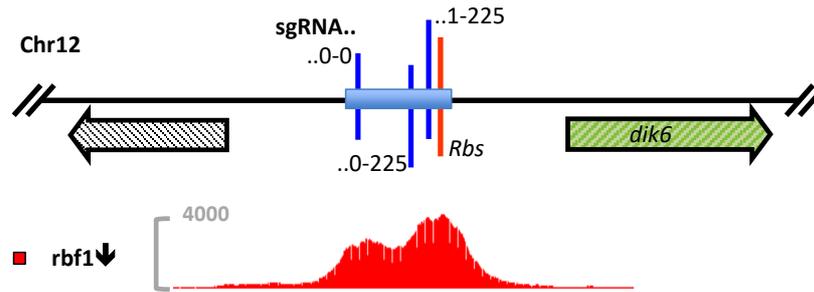


Abbildung 2.26: Schematische Darstellung des *dik6*-Locus von *Ustilago maydis*. Oben: *dik6*-Locus mit Bindestellen der mit dem E-CRISP *tool* im blau markierten Bereich vorhergesagten und anschließend synthetisierten sgRNAs 0-0, 0-225 und 1-225. Rot ist der Bereich der Rbf1 Bindestellen. Unten: visuelle Darstellung der *Peaks* im *dik6*-Promotor der ChIP-Seq mit UDS5 (*a2*, $\Delta b::P_{crg1}:bW2$, $P_{crg1}:E1$, *rbf1:3xHA*); die Immunpräzipitation wurde mit Rbf1:3xHA durchgeführt.

Die dCas9:HA Bindung am *dik6*-Promotor beeinflusst nicht die *rbf1*-abhängige *dik6*-Expression.

Bei der Evaluation der sgRNAs für die Bindung von dCas9 in Promotor-Regionen müssen zwei Faktoren berücksichtigt werden: (1) spezifische Bindung von dCas9 an der definierten Sequenz und (2) Einfluss von dCas9 auf Bindung oder Funktion weiterer Transkriptions-relevanter Faktoren und damit auf die Expression des Zielgens.

Zur Untersuchung des dCas9:HA Einflusses auf die *dik6*-Induktion wurden vier Stämme verwendet, die alle *dcas9:HA* zusammen mit jeweils einer der drei zu untersuchenden sgRNAs, bzw. ohne sgRNA, exprimieren (UJU9-12). Der Stamm ohne sgRNA dient als Kontrolle für unspezifische Effekte. Zusätzlich wurde UJU13 (pNEBUC) als Kontrolle der *dik6*-Induktion unter Selektionsdruck verwendet. Das Plasmid pNEBUC vermittelt lediglich die Carboxin Resistenz, *dcas9* wird nicht exprimiert. Die detaillierten Genotypen sind in Tabelle 4.3 (4.1.3) aufgeführt. *rbf1* wurde in den Stämmen durch Medienwechsel induziert und die *rbf1*-abhängige *dik6*-Expression wurde über qRT-PCR ermittelt. Abbildung 2.27 zeigt, dass *dcas9* in allen Stämmen mit Ausnahme der Negativkontrolle exprimiert wird. Außerdem wird deutlich, dass die *dcas9* Expression mit den verschiedenen sgRNAs keinen signifikanten Einfluss auf die *dik6*-Expression hat. Zur Kontrolle wurde zusätzlich der Level der *rbf1*-Induktion untersucht.

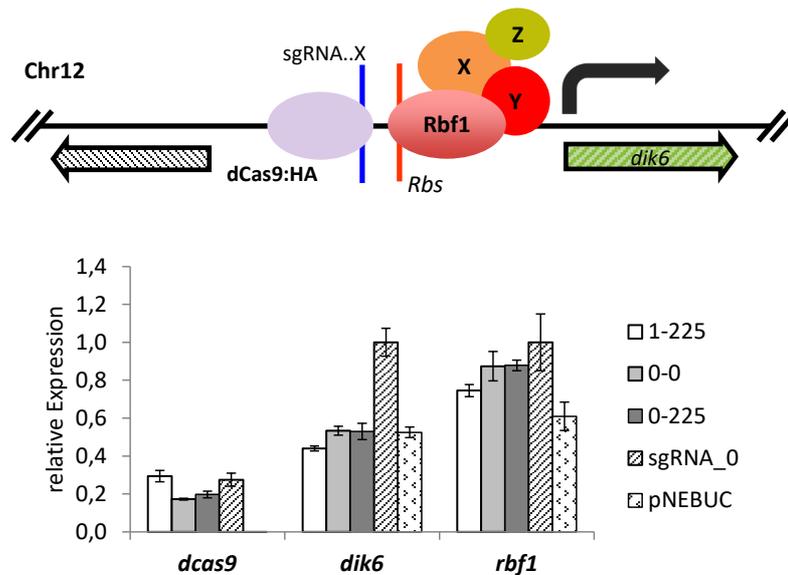


Abbildung 2.27: Einfluss von dCas9 auf die *dik6*-Expression. (A): Schematische Darstellung des *dik6*-Locus von *Ustilago maydis* mit dCas9:HA Bindung, Rbf1-Bindung und weiteren putativ assoziierten Proteinen. (B): qRT-PCR; Die Stämme UJU9 (0-0), UJU10 (0-225) und UJU11 (1-225) exprimieren jeweils *dcas9* und die entsprechende sgRNA, UJU12 exprimiert *dcas9* ohne sgRNA und dient als Kontrolle für unspezifische Effekte durch die *dcas9* Expression. UJU13 dient als Kontrolle der *dik6*-Induktion, es wird lediglich die Carboxin-Resistenz vermittelt, *dcas9* wird nicht exprimiert. Transkriptmengen wurden mittels qRT-PCR analysiert. Die Expression von *dcas9* hat keinen signifikanten Einfluss auf die *dik6*-Expression. Zur Kontrolle wurde der Level der *rbf1*-Induktion untersucht. *eIF2b* (*UMAG_04869*) wurde als Haushaltsgen zur Normalisierung verwendet. Das Experiment wurde mit technischen Duplikaten durchgeführt. Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung der Mittelwerte der technischen Duplikate.

Der *dik6*-Promotor kann mit allen getesteten sgRNAs angereichert werden.

Zur Untersuchung der Bindung von dCas9 mit den verschiedenen sgRNAs an den *dik6*-Promotor wurde eine ChIP mit anschließender qRT-PCR durchgeführt. Dazu wurden die oben beschriebenen Stämme UJU9, UJU10, UJU11 und UJU12 wie oben beschrieben induziert. Anschließend wurde das Protokoll zur Chromatin-Isolation (4.4.8) durchgeführt.

Für ChIP-Seq Experimente wurde das fixierte Chromatin sonifiziert um Fragmentgrößen von ca. 150 bp zu erhalten. Für die enChIP werden größere Fragmente benötigt, da DNA-Protein Interaktionen der *region of interest* erhalten bleiben sollen. Die Fragmentgrößen wurden über eine Zeitreihe der Sonifizierung des Chromatins optimiert. Abbildung 2.28 A zeigt, dass bei drei Minuten Sonifizierung die meisten Fragmente eine durchschnittliche Größe von

ca. 2 kbp besitzen. Für alle enChIP Experimente wurde deshalb drei Minuten sonifiziert.

Mit der Chromatinlösung wurde eine Immunopräzipitation mit dCas9:HA wie beschrieben (4.4.8) durchgeführt, und isolierte DNA wurde mit qRT-PCR analysiert. Zur Analyse der Proben wurden Primer erstellt, die jeweils ca. 100 bp Fragmente der zu untersuchenden Region amplifizieren. Die Anreicherung der *dik6*-Promotrregion wurde mit unspezifischen Regionen verglichen, in denen keine Bindung von dCas9 an die DNA zu erwarten war. Dazu wurde als Negativkontrolle ein Fragment des ORFs von *hdp1* (UMAG_12024) amplifiziert. Normalisiert wurde mit *aktin* (UMAG_11232). Als Referenzreaktionen für die einzelnen Primer wurde Input-DNA (entnommen vor der IP) als Template eingesetzt.

Der Bereich *dik6_4*, der auch die beschriebenen Rbf1-Bindestellen beinhaltet, kann mit dCas9:HA mit allen sgRNAs angereichert werden (Abbildung 2.28 B). Für die sgRNA 0_0 wurde eine unspezifische Bindung (*off target*) an Chromosom 7 vorhergesagt. Auch diese Region lässt sich mit dCas9:HA und sgRNA 0_0 anreichern, allerdings sehr viel schwächer als die spezifische Region. Die beste Anreicherung ohne zusätzliche unspezifische Anreicherung wurde in Verbindung mit sgRNA 1-225 erzielt.

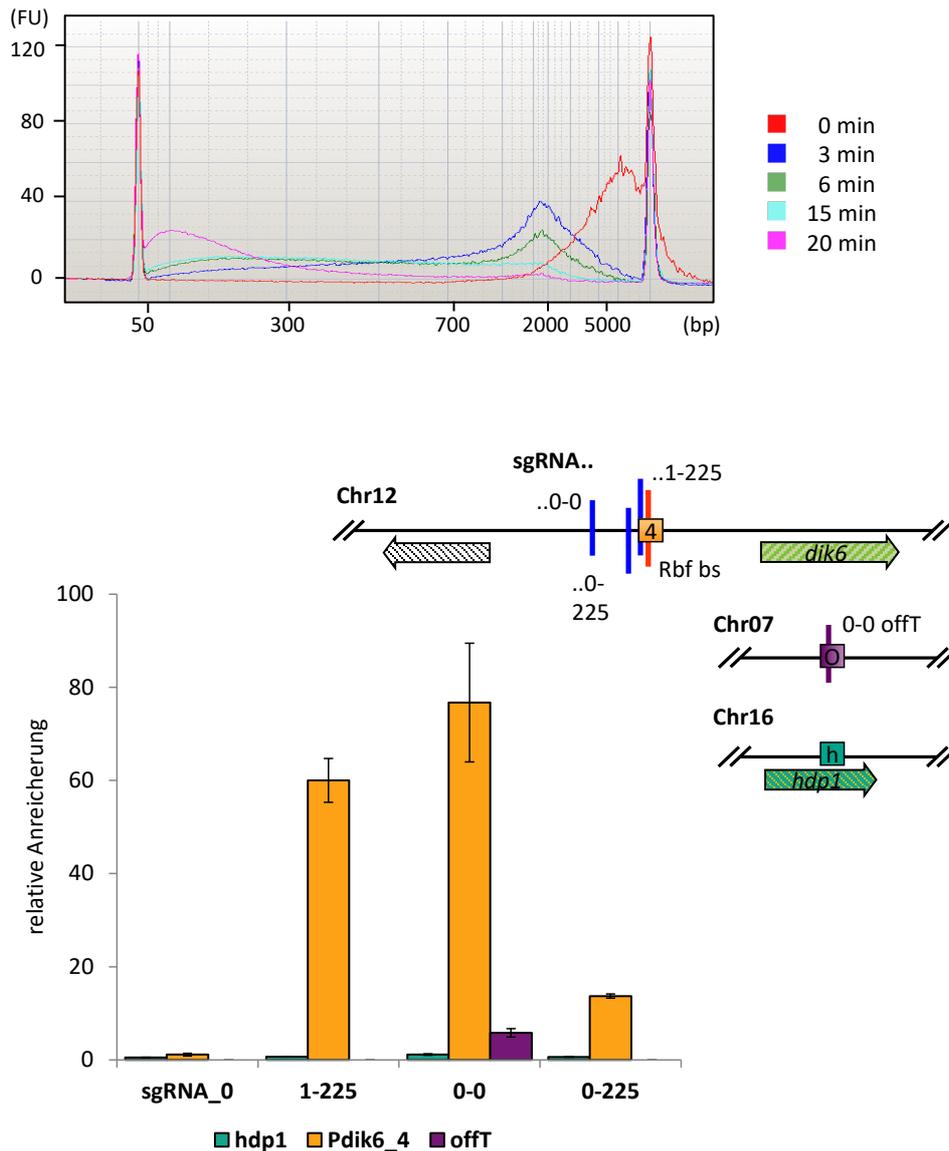


Abbildung 2.28: (A): Größenfragmentierung des Chromatins für die ChIP. Die Abbildung zeigt ein Elektropherogramm eines DNA 7500 Chip (Agilent) von sonifiziertem Chromatin. Die y-Achse gibt die Menge in *fluorescent units* (FU) an, auf der x-Achse ist die Größe der gemessenen Chromatin-Fragmente dargestellt. Die verschiedenen Farben stellen verschiedene Sonifizier-Zeiten dar. Nach 3 min Sonifizierung (blau) besitzt der größte Teil des Chromatins die gewünschte durchschnittliche Größe von ca. 2 kbp. **(B): qRT Analyse der ChIP mit dCas9:3xHA mit verschiedenen sgRNAs.** Die Anreicherungen sind relativ zum Vorkommen des Actin ORF-Fragments angegeben. Als Referenzreaktionen für die einzelnen Primer wurde Input-DNA (entnommen vor der IP) als Template eingesetzt. *hdp1* dient als Negativkontrolle. Gezeigt sind Mittelwerte aus technischen Replikaten, Fehlerbalken stellen die Standardabweichung vom Mittelwert dar. Die Farben der Balken richten sich nach der Darstellung rechts, amplifizierte Bereiche sind als farbige Kästen dargestellt. Bindepositionen der verwendeten sgRNAs sind blau (bzw. lila für das off-Target), die Rbf1-Bindestelle ist rot in den dargestellten *dik6*-Locus eingezeichnet. ORFs sind durch Pfeile dargestellt.

Um zu untersuchen, ob auch ein größerer Bereich mit dCas9:HA angereichert werden kann, wurden weitere Primer entworfen, die je ca. 100 bp Fragmente zwischen Position -7 und -930, bezogen auf das *dik6*-ATG, amplifizieren. Für das enChIP-Experiment wurde im Weiteren die sgRNA 1-225 verwendet, da diese die beste Anreicherung ohne vorhergesagtes *off target* aufwies. Abbildung 2.29 A zeigt die amplifizierten Bereiche des *dik6*-Locus, dargestellt als farbige Kästen, Abbildung 2.29 B zeigt die Anreicherung nach ChIP mit dCas9:HA (sgRNA 1-225). Alle Bereiche der getesteten 930bp langen Region vor dem ATG konnten >20-fach angereichert werden. Bis ca. 300 bp *up*- und *downstream* der dCas9:HA Bindung konnte eine >50-fache Anreicherung erzielt werden. In unmittelbarer Nähe der dCas9:HA Bindung gelang eine 418 fache Anreicherung.

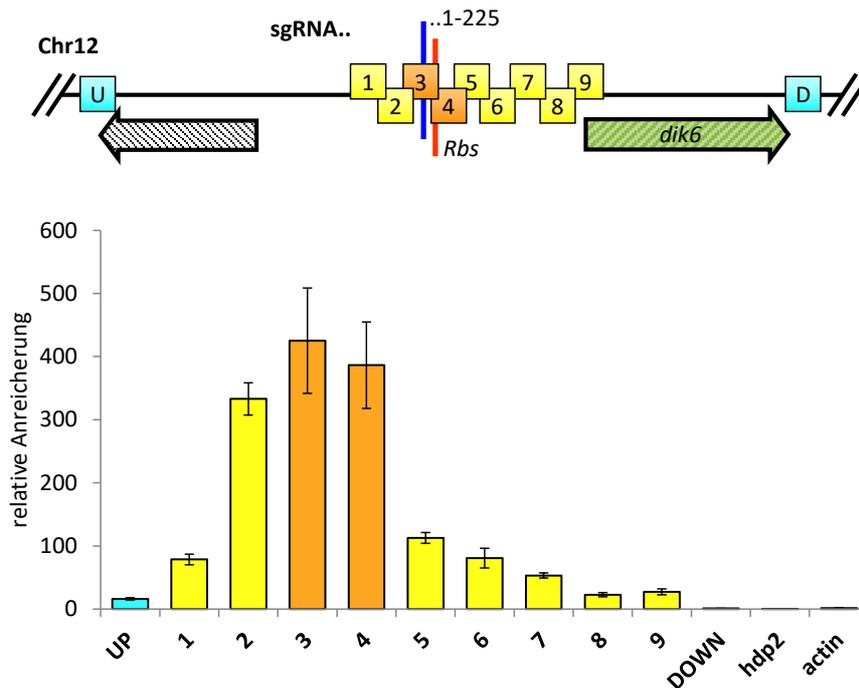


Abbildung 2.29: Die DNA um die Zielsequenz von sgRNA 1-225 lässt sich mit dCas9:HA spezifisch anreichern. (A) Verteilung der analysierten Amplicons im *dik6*-Locus. Für die Real-Time-Analyse der ChIP- Proben aus dCas9:HA (sgRNA 1-225) in Bezug auf den *dik6*-Promotor wurden die Primer gewählt, um überlappende Fragmente zu amplifizieren, die einen ca. 1 kbp großen Bereich abdeckten, in dem Bindungen regulatorischer Proteine vermutet werden. Zusätzlich wurden zwei weiter entfernte Bereiche zur Kontrolle amplifiziert. Die amplifizierten Bereiche sind als farbige Kästen dargestellt. Die mit der Rbf1-Bindung in Verbindung stehenden Bereiche sind orange gefärbt. Die Lage der Rbf1-Bindestelle ist durch einen roten, die durch sgRNA 1-225 vermittelte dCas9:HA-Bindestelle durch einen blauen Balken markiert. ORFs sind durch Pfeile dargestellt. (B): **Anreicherung der Bereiche nach ChIP mit dCas9:3xHA mit sgRNA 1-225.** Die Anreicherungen sind relativ zum Vorkommen des eIF2b ORF-Fragments angegeben. Als Referenzreaktionen für die einzelnen Primer wurde Input-DNA (entnommen vor der IP) als Template eingesetzt. *hdp2* und *actin* dienen als Negativkontrollen. Gezeigt sind Mittelwerte aus technischen Replikaten, Fehlerbalken stellen die Standardabweichung vom Mittelwert dar. Die Farben der Balken richten sich nach der Darstellung oben, amplifizierte Bereiche sind als farbige Kästen dargestellt. Die Anreicherung erreicht ein Maximum von 418-fach im Bereich 3.

Rbf1:Myc kann über den *dik6*-Promotor mit dCas9:HA (sgRNA 1-225) co-präzipitiert werden.

Da mit sgRNA 1-225 die beste Anreicherung des *dik6*-Promotors erzielt werden konnte, ohne die Rbf1-abhängige *dik6*-Expression zu stören, wurde mit den oben beschriebenen Stämmen UJU12 (sgRNA_1-225) und UJU13 (sgRNA_0) als Negativkontrolle wie in (4.4.8) beschrieben eine ChIP durchgeführt. In UJU13 wird keine sgRNA exprimiert, dCas9:HA sollte somit nicht an DNA binden können. Anschließend wurden Proteine aufgereinigt, die mit dem über

dCas9:HA angereicherten *dik6*-Promotor assoziiert sind, und ein Westernblot durchgeführt. Als Kontrolle wurde der Input (Chromatinlösung vor der IP) aufgetragen (Abbildung 2.30). Rbf1:Myc (*), das auf dem *dik6*-Promotor ca. 100 bp neben der Bindestelle von sgRNA_1-225 bindet, konnte effizient mit dCas9:HA co-präzipitiert werden. Wird die IP ohne sgRNA durchgeführt, kann kein Rbf1:Myc detektiert werden. Die schwächeren dCas9:HA Banden in den sgRNA_0 Proben lassen sich durch die Aufreinigung erklären. Dabei wird eine Chromatinfällung durchgeführt, ungebundene Proteine gehen verloren. Da dCas9 ohne sgRNA nicht spezifisch an DNA binden kann, stellt die Bande in den sgRNA_0 Proben nur unspezifisch gefälltes dCas9:HA dar.

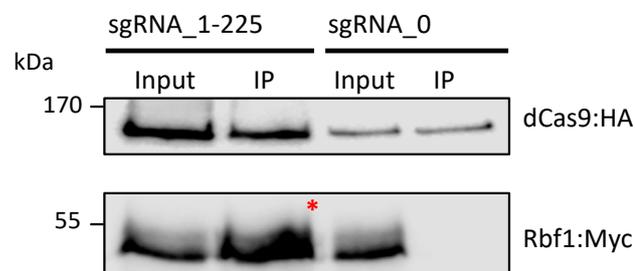


Abbildung 2.30: Westernblot der enChIP mit dCas9:HA von UJU12(sgRNA1-225) und UJU13(sgRNA_0). Die enChIP und anschließende Chromatin-Fällung wurde wie beschrieben durchgeführt (4.4.8, 4.4.3). Die Proben wurden über eine SDS-PAGE (8 %) aufgetrennt und durch Westernblot analysiert. Für die Detektion wurde ein anti-HA bzw. ein anti-Myc Antikörper verwendet. Für die Input Kontrollen wurde Chromatin vor der IP entnommen und entsprechend der IP-Proben gefällt. UJU13 diente als Negativkontrolle, in diesem Stamm wird keine sgRNA exprimiert, dCas9:HA kann also nicht spezifisch an DNA binden. dCas9:HA bzw. Rbf1:Myc konnten mit einer berechneten Größe von ~163 kDa bzw. ~49 kDa detektiert werden. Der Stern zeigt das mit dCas9:HA(sgRNA_1-225) spezifisch co-präzipitierte Rbf1:Myc Fusionsprotein an.

2.3.3 Durch Kopplung der enChIP mit LC-MS lassen sich mit einem spezifischen DNA Bereich assoziierte Proteine identifizieren

Das enChIP System wurde somit erfolgreich für *Ustilago maydis* etabliert. Es konnte gezeigt werden, wie sgRNAs entworfen und evaluiert werden müssen, um anschließend erfolgreich über eine ChIP mit einer *region of interest* assoziierte Proteine anzureichern.

Um mit dieser Methode unbekannte mit einer *region of interest* assoziierte Proteine zu identifizieren, wurde die enChIP mit LC-MS kombiniert. Die ChIP wurde wie beschrieben durchgeführt (4.4.8). Eluierte Proteine wurden mit Trypsin verdaut (4.4.3) und entstandene Peptide aufgereinigt und über LC-MS analysiert (4.4.3). Daten wurden mit MaxQuant (<https://maxquant.org>) 1.6.0.16 mit der *label-free quantification* (LFQ) Methode analysiert. Für die statistische Analyse des Outputs wurde Perseus (1.6.2.3) benutzt. Die Daten sind als Vulkanplot in Abbildung 2.31 dargestellt. Dafür wurden LFQ Werte aus Triplikaten der enChIP Probe mit sgRNA_1-225 gegen die Negativkontrolle ohne sgRNA verglichen. Es wurde ein einseitiger t-Test durchgeführt und die $-\log(p\text{-values})$ gegen die t-Test Differenz der LFQ Werte aufgetragen. Eingezeichnet ist die Grenze für Signifikanz mit einer FDR=0.01 (*false discovery rate*) und $S_0=2$ (S_0 beurteilt die Varianz innerhalb der getesteten Gruppen. Dabei wird der Unterschied der Mittelwerte der *p-values* berücksichtigt (Vgl. Tusher *et al.*, 2001). Signifikant angereicherte Proteine sind in Tabelle 2.1 aufgeführt. Detektiert werden konnten, wie zu erwarten, mit DNA assoziierte Proteine wie Histone oder Untereinheiten der RNA-Polymerase II. Rbf1 konnte jedoch wider Erwarten nicht detektiert werden. Eine Lockerung der Stringenz für die Signifikanz (FDR=0.05 und $S_0=1$) erweitert die Liste um weitere Histone, eine DNA Helikase und putativ chromatinmodifizierende Proteine. Im gesamten gescannten Spektrum aller Proben konnte jedoch kein Peptid von Rbf1 detektiert werden.

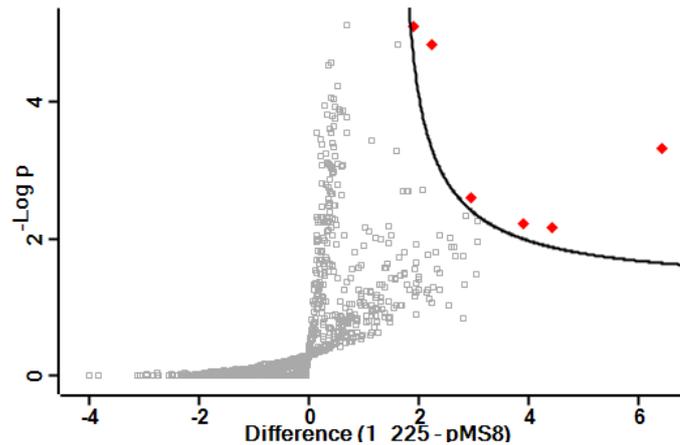


Abbildung 2.31: Label free quantitative Analyse der enChIP mit sgRNA 1-225. Der Vulkanplot stellt die Differenz der LFQ (*label free quantification*) Intensitäten der IP mit dCas9:HA mit sgRNA 1-225 gegen die Kontrolle ohne sgRNA (pMS8), aufgetragen gegen die negativen logarithmischen *p-values* eines t-tests, durchgeführt mit Triplikaten (FDR=0.01 und $S_0=2$) dar. Die Kurve trennt spezifisch angereicherte Proteine vom Hintergrund. Spezifische Proteine sind rot dargestellt.

Tabelle 2.1: Mit dCas9:HA (sgRNA 1-225) signifikant angereicherte Proteine.

Protein IDs	Blast	-LOG (<i>p-value</i>)	Dif.
UMAG_00469	- probable histone H2A F/Z family member HTZ1	3.33	6.44
UMAG_10429	- probable DNA-dependent RNA polymerase II RPB140	2.16	4.43
UMAG_10463	- related to GDP/GTP exchange factor for Gsp1p/Gsp2p	2.22	3.92
UMAG_06430	- probable heat shock protein HSP104	2.61	2.97
UMAG_01504	- probable HTA2 - histone H2A.2	4.83	2.25
UMAG_02710	- probable histone H4	5.11	1.91

FDR=0.01, $S_0=2$

Zur weiteren Analyse wurde das Experiment wiederholt, und mit den Proben aus beiden biologischen Replikaten bei der LC-MS ein tSIM (*Selected ion monitoring*) durchgeführt. Dabei wird nicht das gesamte Spektrum der Probe, sondern nur ein zuvor definierter Bereich des Masse-Ladungs-Verhältnisses übertragen und gescannt. (Die genauen Masse-Ladungs-Verhältnisse der Rbf1-Peptide sind durch vorherige LC-MS Analysen von Immunopräzipitationen mit Rbf1:3xHA bekannt (vgl. 2.1.3)). Auch hier konnte Rbf1 nicht detektiert werden.

2.3.4 Erhöhung der Sensitivität des Systems zum Nachweis der Bindung sequenzspezifischer Transkriptionsfaktoren

Eine Erklärungsmöglichkeit dafür, dass kein Rbf1 detektiert werden kann ist die Verwendung von frei replizierenden Plasmiden als Expressionssystem für dCas9:HA. Dabei muss der Selektionsdruck ständig aufrechterhalten werden, um den Verlust der Plasmide zu vermeiden. Da *Ustilago maydis* in nicht-selektiven Medien deutlich besser zu kultivieren ist, wurden im Folgenden stabil transformierte Stämme erzeugt, die *dCas9:HA* mit den entsprechenden sgRNAs konstitutiv exprimieren. Durch die Integration werden weiterhin Expressionsunterschiede durch Kopiezahleffekte in einzelnen Zellen vermieden. Zusätzlich wurde die zu untersuchende *region of interest* (der *dik6*-Promotor) als Promotor:GFP Fusion multipel in *Ustilago maydis* eingebracht, um die Menge an gebundenem Transkriptionsfaktor zu erhöhen. Alle Integrationen wurden durch Southern-Bot-Analysen und qRT-PCR verifiziert und quantifiziert (nicht gezeigt). Um mögliche Detektionsprobleme des Rbf1-Proteins *per se* auszuschließen wurden außerdem Stämme erstellt, die den *umag_11413*-Promotor als GFP-Fusion enthalten. *umag_11413* ist ein direkt *b*-reguliertes Gen (RNA-Seq, diese Arbeit). sgRNAs für diesen Promotor wurden wie bereits beschrieben ermittelt und evaluiert (Abbildung 6.9; Anhang).

In den Experimenten wurde der *dik6*-Promotor als Ziel für dCas9:HA für eine Rbf1:Myc-, und der *umag_11413*-Promotor für eine bE1:Myc-Co-Präzipitation verwendet. Dazu wurden die Stämme UJU89-91 zur Anreicherung des *dik6*-Promotors und die Stämme UJU91, 92 und 94 zur Anreicherung des *umag_11413*-Promotors wie bereits beschrieben für eine enChIP-LC-MS Analyse verwendet. Die detaillierten Genotypen sind in Tabelle 4.3 (4.1.3) aufgeführt. Die Experimente wurden jeweils in Duplikaten durchgeführt. Daten wurden mit MaxQuant (<https://maxquant.org>) 1.6.0.16 mit der *label-free quantification* (LFQ) Methode analysiert. Für die statistische Analyse des Outputs wurde Perseus (1.6.2.3) benutzt. Die LFQ Werte der enChIP Proben mit sgRNA wurden jeweils mit der entsprechenden Negativkontrolle ohne sgRNA verglichen. Es wurde ein einseitiger t-Test durchgeführt. Als Grenze für signifikante Anreicherung wurde eine FDR=0.05 und $S_0=1$ festgelegt (vgl.

Abbildung 2.31). Signifikant angereicherte Proteine sind tabellarisch in Tabelle 2.2 bis 2.5 dargestellt. Angegeben sind die $-\log(p\text{-values})$ und die t-test Differenz der LFQ Werte.

Wie auch im ersten Ansatz konnten mit allen verwendeten sgRNAs wie zu erwarten Proteine die mit DNA assoziiert sind angereichert werden. Verschiedene Histone finden sich in allen Proben. Zusätzlich lassen sich Proteine die mit small RNA Transkription und Prozessierung in Verbindung stehen detektieren. Mit den sgRNAs 0-0 für den *dik6*-Promotor und sgRNA 0-2 für den *umag_11413*-Promotor konnten außerdem verschiedene Polymerase II Untereinheiten und putativ Chromatinstruktur remodelierende Proteine sowie ein HMG (*high mobility group*) Protein angereichert werden. Wie zuvor lassen sich allerdings keine spezifischen Transkriptionsfaktoren detektieren. Auch im tSIM der Proben konnten keine Peptide der gesuchten Transkriptionsfaktoren Rbf1 bzw. bE1/bW2 identifiziert werden.

Diese Methode ist folglich prinzipiell geeignet um Proteine über die DNA-Bindung anzureichern. Allerdings können bisher in der LC-MS Analyse zwar DNA assoziierte Proteine, aber keine Transkriptionsfaktoren nachgewiesen werden.

Tabelle 2.2 Signifikant mit sgRNA 0-0 angereicherte Proteine am *dik6*-Promotor.

Protein IDs	Blast	-LOG (<i>p-value</i>)	Dif.
UMAG_01504	- probable HTA2 - histone H2A.2	2.18	6.53
UMAG_01505	- probable HTB2 - histone H2B.2	2.89	6.08
UMAG_02710	- probable histone H4	2.04	4.79
UMAG_10095	- probable RNA helicase dbp2 (DEAD box protein)	1.47	3.58
UMAG_03863	- putative DNA-directed RNA polymerase II core subunit	2.15	3.12
UMAG_10463	- related to GDP/GTP exchange factor for Gsp1p/Gsp2p	2.19	3.04
UMAG_10429	- probable DNA-dependent RNA polymerase II RPB140	1.50	2.92
UMAG_11734	- probable NOP1 – fibrillarin	2.05	2.77
UMAG_05568	- probable SPT16 - general chromatin factor	1.79	2.39
UMAG_06201	- probable RVB1 - RUVB-like protein DNA Helicase	1.71	2.38
UMAG_04007	- HMG box protein	2.47	2.36
UMAG_Cas9	- Cas9	2.02	2.16

FDR 0.05 $S_0=1$

Tabelle 2.3 Signifikant mit sgRNA 1-225 angereicherte Proteine am *dik6*-Ptomotor.

Protein IDs	Blast	-LOG (<i>p</i> -value)	Dif.
UMAG_01505	- probable HTB2 - histone H2B.2	3.40	4.72
UMAG_02710	- probable histone H4	1.73	3.33
UMAG_10095	- probable RNA helicase dbp2 (DEAD box protein)	1.41	3.20
UMAG_Cas9	- Cas9	2.85	2.16

FDR 0.05 $S_0=1$

Tabelle 2.4 Signifikant mit sgRNA 0-2 angereicherte Proteine am *umag_11413*-Ptomotor.

Protein IDs	Blast	-LOG (<i>p</i> -value)	Dif-
UMAG_01505	- probable HTB2 - histone H2B.2	2.40	7.16
UMAG_01504	- probable HTA2 - histone H2A.2	2.35	7.01
UMAG_02710	- probable histone H4	2.27	6.30
UMAG_03863	- putative DNA-directed RNA polymerase II core subunit RPO21	2.87	4.81
UMAG_10095	- probable RNA helicase dbp2 (DEAD box protein)	1.74	4.76
UMAG_02709	- probable HHT1 - histone H3	1.15	4.56
UMAG_Cas9	- Cas9	3.47	4.22
UMAG_11734	- probable NOP1 – fibrillarin	2.75	4.17
UMAG_10463	- related to GDP/GTP exchange factor for Gsp1p/Gsp2p	2.61	4.14
UMAG_10429	- probable DNA-dependent RNA polymerase II RPB140	1.78	3.96
UMAG_03724	- related to LHP1 - RNA binding protein	2.33	3.53
UMAG_05568	- probable SPT16 - general chromatin factor	1.95	3.37
UMAG_06035	- probable ADE4 - amidophosphoribosyltransferase	1.39	3.24
UMAG_04007	- HMG box protein	2.91	3.21
UMAG_11511	- related to Protein mlo3	1.24	3.18
UMAG_00685	- probable CBF5 - putative rRNA pseuduridine synthase	3.07	3.03
UMAG_05184	- conserved hypothetical protein	1.04	2.83
UMAG_00174	- related to transcriptional regulator protein SPT6	1.24	2.82
UMAG_06201	- probable RVB1 - RUVB-like protein Helicase	1.83	2.76
UMAG_01467	- probable NOP2 - nucleolar protein	0.82	2.63
UMAG_03280	- putative general transcription repressor	0.84	2.58
UMAG_05472	- related to nascent polypeptide-associated complex	0.83	2.57
UMAG_10239	- related to Transformer-2 protein	2.86	2.45
UMAG_00026	- related to FK506-binding protein (FKBP)	1.75	2.30
UMAG_01328	- probable IDH2 - isocitrate dehydrogenase (NAD)	1.32	2.26

UMAG_10027	- probable PRP19 - non-snRNP spliceosome component	1.27	2.17
UMAG_11769	- related to ATP-dependent RNA helicase	2.03	1.96
UMAG_06193	- related to NSR1 - nuclear localization sequence binding	1.75	1.95

FDR 0.05 $S_0=1$

Tabelle 2.5: Signifikant mit sgRNA 0-13 angereicherte Proteine am *umag_11413*-Promotor.

Protein IDs	Blast	-LOG (<i>p-value</i>)	Dif.
UMAG_00926	- probable ribosomal protein L13a	2.70	3.49
UMAG_01505	- probable HTB2 - histone H2B.2	2.56	5.69
UMAG_02710	- probable histone H4	2.51	4.10
UMAG_10573	- probable 60s ribosomal protein L7 subunit	1.81	4.12

FDR 0.05 $S_0=1$

3. Diskussion

Der Wechsel von saprophytischem zu biotrophem Wachstum in *Ustilago maydis* hängt von drei wesentlichen Schritten ab. Die Pheromon Perzeption zweier kompatibler Stämme und die damit verbundene Paarung, die Ausbildung eines Dikaryons durch Zellfusion und der dadurch resultierende G2 Zellzyklusarrest. Erst nach erfolgreicher Penetration der Pflanze wird dieser wieder aufgehoben und die Pflanze kann kolonisiert werden. Die durch das bE/bW-Heterodimer ausgelöste Kaskade mit Rbf1 als Master-Regulator spielt für die Ausbildung des Dikaryons eine zentrale Rolle. Die durchgeführten ChIP-Seq und RNA-Seq Experimente bieten neue Einblicke in das komplex regulierte Netzwerk und zeigen kombinatorische Regulation von Rbf1-Zielgenen auf.

Während der Proliferation in der Pflanze wird *rbf1* nicht mehr exprimiert. Die b-Kaskade wird weitestgehend reprimiert. Einige Rbf1-Zielgene werden jedoch weiter über die Transkriptionsfaktoren *hdp2* und *biz1* reguliert.

Der Homeodomänen Transkriptionsfaktor Hdp1 reagiert sowohl auf Pheromon Signale als auch auf die Zellfusion. Die mit LC-MS gezeigte Rbf1-Hdp1 Interaktion verbindet die b-Kaskade weiter mit dem über Prf1 gesteuerten Pheromon-Signalweg. Hdp1 beeinflusst sowohl die *prf1*- als auch die *b*-Expression.

Das transkriptionelle Netzwerk, das die Transition von saprophytischem zu biotrophem Wachstum reguliert, ist hierarchisch aufgebaut und lässt sich in Entwicklungsstadium-abhängige Module aufgliedern, die ihrerseits wiederum hierarchisch gegliedert sind. Aufeinanderfolgende Wellen von Transkriptionsfaktoren regulieren gemeinsam die kritischen Veränderungen, die mit der Lebensweise von *Ustilago maydis* einhergehen, und die folgend diskutiert werden.

3.1 Rbf1-b Kombinatorik

Die Rbf1-Konsensussequenz konnte in dieser Arbeit mit Hilfe von ChIP-Seq Experimenten identifiziert werden (Abbildung 2.1 B). Das Konsensusmotiv wurde zur Bestätigung weiter untersucht. Das Motiv ist im *dik6*-Promotor notwendig für eine *rbf1*-abhängige Expression. Mutationen der beiden am stärksten konservierten Nukleotide des Konsensusmotivs führten in einem GFP-Reporter Assay zum vollständigen Expressionsverlust. Bei Rbf1 handelt es sich um einen C2H2-Zinkfinger Transkriptionsfaktor mit vier aufeinander folgenden ZF-Domänen am N-terminalen Ende. Interessanterweise zeigt das Rbf1-Motiv mehr Ähnlichkeit mit bereits beschriebenen C4- als mit C2H2-Motiven. Eine TOMTO Suche nach ähnlichen Motiven lieferte 29 Treffer, hauptsächlich Bindemotive von C4-Zinkfinger Transkriptionsfaktoren. Die Gruppe der C4-Zinkfinger Transkriptionsfaktoren besteht hauptsächlich aus Liganden aktivierten Transkriptionsfaktoren (auch: Kernrezeptoren). Bei dieser Transkriptionsfaktor-Familie ist die DNA-Bindung nur durch Interaktion mit Co-Aktivatoren oder Repressoren möglich (Novac und Heinzl, 2004). Heterolog in *E. coli* exprimiertes Rbf1 bindet in EMSA (*Electro Mobility Shift Assay*) Experimenten nicht an die Rbf1-Konsensussequenz (Ulrich, 2015). Das Vollängen *rbf1* ließ sich in *E.coli* nur schwer exprimieren, deshalb wurde das Experiment mit einer verkürzten Rbf1-Version, die nur die vier Zinkfinger-Domänen enthält wiederholt. Es konnte keine Bindung nachgewiesen werden (getestet wurden 180 bp lange Fragmente mit Rbf1-Bindestelle (*Rbs*) aus dem *dik6*- bzw. *Iga2*-Promotor) (nicht gezeigt). Auch in einem Yeast-One-Hybrid Experiment konnte keine Rbf1-Bindung an die *in vivo* gezeigte Bindestelle aus dem *dik6*-Promotor nachgewiesen werden (Fortenbacher, pers. Mitteilung). Möglicherweise benötigt Rbf1 für eine Bindung an DNA weitere Faktoren, die in den artifiziellen Systemen nicht vorhanden sind.

Auffallend ist, dass Rbf1 bei aktiver b-Kaskade die Mehrzahl der von Rbf1-gebundenen Bereiche deutlich besser bindet als ohne b. Die Position wird allerdings nicht verändert, es handelt sich um dieselbe Bindestelle. Außerdem werden deutlich mehr Rbf1-Bindestellen gefunden, sofern b aktiv ist (Abbildung 3.1). Das Rbf1-Konsensusmotiv kommt in den *Peaks* von 44 % der Rbf1-

gebundenen Promotoren vor¹. Für die übrigen Rbf1-Bindungen konnten keine Bindemotive bestimmt werden. Dies zeigt, dass Rbf1 ebenfalls bisher unbekannte Bindestellen bindet, bzw. mit anderen Transkriptionsfaktoren assoziiert ist und indirekt an DNA bindet. Rbf1 könnte Multiproteinkomplexe bilden. Solche Komplexbildung kann die Bindesequenz-Spezifität von Transkriptionsfaktoren über Protein-Protein Interaktion auf vielfältige Weise beeinflussen (vgl. Siggers und Gordan, 2014).

Die Rbf1-Bindeeigenschaften könnten durch b-abhängige Faktoren verändert werden, sodass zusätzliche Bindestellen erkannt werden. Es könnte sich dabei um *low* und *high affinity* Bindestellen handeln, die einen unterschiedlichen Konsensus aufweisen. Zusätzlich konnte in dieser Arbeit die Interaktion von Rbf1 mit dem bE/bW-Heterodimer nachgewiesen werden. Rbf1 bindet z.T. vermutlich nur indirekt über die b-Bindestelle und über die Interaktion mit b an die DNA (Abbildung 2.4; unten). Ebenso denkbar ist ein Mechanismus, der die Rbf1-DNA-Bindeeigenschaften direkt durch die Rbf1-b-Interaktion beeinflusst. 16,5 % der zusätzlichen Rbf1-Bindungen mit aktiver b-Kaskade kommen durch die Beteiligung von b selbst an der Rbf1-Bindung zustande.

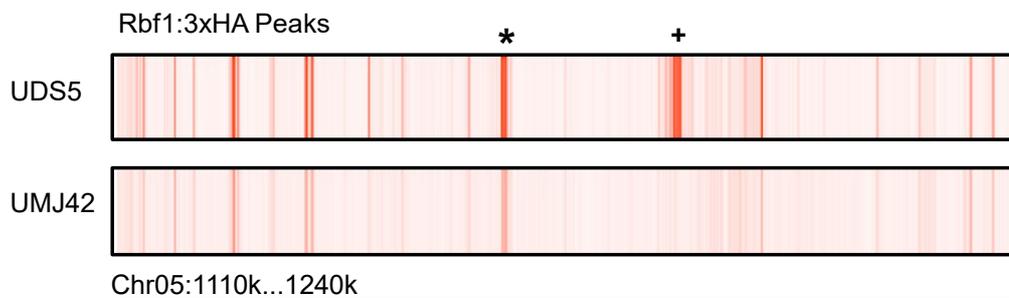


Abbildung 3.1: Visuelle Darstellung der Reads aus ChIP-Seqs mit Rbf1:3xHA. Reads wurden mit Bowtie2 Version 2.0.0-beta7 (Langmead und Salzberg, 2012) auf das *Ustilago maydis* Genom (Ensembl Genomes 33 (Kersey *et al.*, 2018) aligniert. Zur visuellen Darstellung der Reads wurde der Generic Genome Browser Version 2.33 verwendet. Peak-Profile sind repräsentiert durch normalisierte Read-counts und als *density plots* dargestellt. Zu sehen ist die jeweilige Anreicherung in einem 130 kbp großen Bereich von Chromosom 5. Oben im UDS5-Hintergrund (b, rbf1:3xHA) unten in UMJ42 (Δb, rbf1:3xHA). „*“ zeigt exemplarisch die bessere Anreicherung durch Rbf1:3xHA mit b. „+“ zeigt exemplarisch eine Rbf1-Bindung die im b-Deletionshintergrund nicht vorhanden ist.

¹ Zahlen basieren auf FIMO Analysen der Sequenzen der Peaks von Rbf1-gebundenen Promotoren. Falls Promotoren mehr als einen Peak aufwiesen ging nur der Peak mit dem höchsten *pz-value* in die Analyse mit ein.

Die bessere DNA-Bindung von Rbf1 mit aktiver b-Kaskade an den Rbf1-Konsensus könnte auf die Proteinstabilität von Rbf1 zurückzuführen sein. Trotz 9-fach höherer Transkriptmenge in einer direkten, *b*-unabhängigen *rbf1*-Induktion kann nur ca. halb so viel Protein nachgewiesen werden im Vergleich zur Rbf1-Proteinmenge in einem Stamm mit aktiver b-Kaskade (Abbildung 6.1; Anhang).

Im mittleren Bereich und am C-Terminus von Rbf1 befinden sich zwei intrinsisch ungeordnete Regionen. In mittleren Bereichen sind diese oft mit Protein-Protein und Protein-DNA Interaktion über Konformationsänderungen assoziiert. C-Terminal spielen sie meist eine Rolle für die Proteinstabilität (van der Lee *et al.*, 2014). Ob Rbf1 tatsächlich *b*-abhängig stabilisiert wird, und ob dies direkt durch die Komplexbildung mit *b* oder indirekt durch *b*-abhängige Faktoren geschieht, bedarf weiterer Untersuchungen.

Durch weitere CHIP-Seq Experimente mit *bE* konnte ein 18 bp langes Motiv für die *b*-Bindung ermittelt werden. Dieses Motiv gleicht den bereits beschriebenen *b*-Bindesequenzen (*bbs*) (Romeis *et al.*, 2000; Scherer *et al.*, 2006; Brachmann *et al.*, 2001; Heimel *et al.*, 2010b), definiert den Konsensus jedoch weitreichender. Mit dem erweiterten *b*-Konsensusmotiv konnten durch MAST Analysen in den Promotoren von *rbf1* und *clp1* weitere, bisher unbekannte *bbs* identifiziert werden (Abbildung 2.3 A).

Durch Vergleiche der CHIP-Seq Experimente mit Rbf1 und *bE* konnte gezeigt werden, dass *b*-Peaks fast immer Rbf1-Peaks überlagern. 91 % der Gene, deren Promotoren mit *bE*:3xHA angereichert werden, können auch mit Rbf1:3xHA angereichert werden. Die *b*-Bindung lässt sich in zwei Gruppen aufteilen: *b* bindet an die *bbs* und ist vermutlich durch Protein-Protein Interaktion mit Rbf1 assoziiert, das somit nur indirekt an diese Promotoren bindet. Diese Interaktion scheint für die *b*-abhängige Regulation dieser Gene allerdings keine Rolle zu spielen, *b* ist ausreichend sowohl für die *b*-Bindung als auch die *b*-abhängige Regulation der Zielgene (Abbildung 3.2 B und C; Seite 92). Bei der zweiten Gruppe der *b*-Bindungen überlagern sich ebenfalls *b*- mit Rbf1-Peaks. Erstaunlicherweise ist *rbf1* dabei allerdings für die *b*-Bindung notwendig, *b* kann nicht *rbf1*-unabhängig binden. In diesen Promotoren befindet sich dicht neben der *bbs* ebenfalls die ermittelte *Rbs*.

Beide Transkriptionsfaktoren binden in unmittelbarer Nähe. Der geringste Abstand tritt im Promotor von *UMAG_01262 (polX)* mit lediglich 16 bp auf. Interessanterweise ist umgekehrt *b* für eine signifikante Rbf1-Bindung ebenfalls wichtig. Diese Gene werden nur sehr schwach durch *rbf1* alleine induziert, die Rbf1-Bindung liegt in Stämmen mit *b*-Deletionshintergrund unterhalb des gewählten *thresholds*. Möglich wäre ein kooperativer Mechanismus, durch den Rbf1 mit geringer Affinität bindet und die Chromatinstruktur lockert, um die *b*-Bindung zu ermöglichen. Dies lässt auf eine kooperative Bindung von *b* zusammen mit Rbf1 schließen. Die schwache Rbf1-Bindung bei inaktivem *b* könnte sich wiederum durch die bereits diskutierte verminderte Rbf1-Stabilität erklären lassen.

Das *b*-Konsensusmotiv alleine ist nicht immer ausreichend für die *b*-Bindung. In Promotoren von Genen, die durch die *b*-Induktion in AB31 nicht differentiell reguliert werden, konnten ebenfalls *b*-Konsensusmotive gefunden werden (FIMO: $p\text{-value} < 10^{-4}$). Diese Motive werden in AB31 allerdings nicht von *b* gebunden. Die *b*-Kaskade wird nach der Pflanzenpenetration reprimiert (Heimel *et al.*, 2010b), eine verminderte *b*-Expression bleibt allerdings vorhanden. Um die Rolle von *b* während der Entwicklung von *Ustilago maydis* innerhalb der Pflanze zu untersuchen, wurde ein temperatur-sensitives *bE(ts)* Protein durch den Austausch einer Aminosäure generiert (Wahl *et al.*, 2010). Stämme die *bE(ts)* tragen werden bei restriktiven Temperaturen in der pathogenen Entwicklung blockiert. Der Phänotyp weist auf eine Rolle von *b* während der Proliferation *in planta* für die Kontrolle und Synchronisierung des Zellzyklus und der Cytokinese hin (Wahl *et al.*, 2010). *Microarray* Analysen zeigen insgesamt 81 *b*-abhängig regulierte Gene *in planta*. 24 dieser Gene besitzen eine *bbs* (FIMO: $p\text{-value} < 10^{-4}$) im Promotor, nur an 2 dieser *bbs* kann *b*-Bindung in axenischer Kultur in AB31 nach *b*-Induktion beobachtet werden (Tabelle 6.1.7; Datenanhang). Die Anzahl an bioinformatisch detektierten *b*-Konsensusmotiven in Promotoren der Gene aus diesem Datensatz ist signifikant höher als bei zufällig gewählten Promotoren. Dies zeigt eindeutig, dass Gene mit *bbs* im Promotor in axenischer Kultur nicht *b*-induziert sind, in der Pflanze jedoch reguliert werden. Dies legt nahe, dass zusätzliche, bisher unbekannte Faktoren, die nur während der biotrophen Phase von *Ustilago*

maydis in der Pflanze exprimiert werden, dazu führen, dass *b* an diese Promotoren binden kann. Ob *b* *in planta* tatsächlich an die gefundenen *b*-Konsensusmotive bindet, müsste weiter untersucht werden. Die *b*-Bindung wird folglich vermutlich stark durch die Chromatinstruktur beeinflusst. Dies lässt auf weitere Bindemechanismen von *b* mit anderen Transkriptionsfaktoren schließen. Bei *b* handelt es sich um einen Homeodomänen (HD) - Transkriptionsfaktor.

Ähnliches kann für Hdp1 und Hdp2 beobachtet werden. Für die beiden HD-Proteine konnten fast identische Konsensusmotive bestimmt werden, sie weisen allerdings unterschiedliche Affinitäten zu bestimmten Bereichen der DNA auf (Abbildung 2.23).

In vitro bevorzugen verschiedene HD-Proteine ähnliche Sequenzen mit hoher Affinität. *In vivo* hängt die DNA-Bindenspezifität allerdings von zusätzlichen Faktoren wie Chromatinstruktur (Zugänglichkeit der Bindestelle), Chromatin-*landscape* (Anwesenheit weiterer Transkriptionsfaktoren die die Bindung positiv oder negativ beeinflussen) und die Form der DNA-Doppelhelix (*shape*) ab (Bobola und Merabet, 2017).

Trotz der beobachteten kombinatorischen Bindung von Rbf1 und *b* reicht eine Rbf1-Bindung im Promotor nicht immer aus um *b*-Bindung an nahe liegende *bbs* zu ermöglichen. Ein Beispiel dafür stellt der bereits gut untersuchte *dik6*-Promotor dar. Er enthält eine beschriebene *bbs* an Position -577 (bezogen auf das ATG). Durch *in vitro* Studien konnte eine *b*-Bindung an diese Region gezeigt werden (Weinzierl, 2001; Abbildung 6.10 A, B; Anhang). Für die Gelretardierungsanalyse wurde dazu ein 340 bp langes *dik6*-Promotorfragment verwendet, das die *bbs* enthält und von einem heterolog exprimierten bE-bW-Fusionsprotein (Kon8) gebunden wird. Bei Kon8 handelt es sich um ein verkürztes, jedoch biologisch aktives bE-bW-Fusionsprotein (Romeis *et al.*, 1997; Grandel *et al.*, 2000), dessen Induktion ausreichend für die *dik6*-Expression ist (Weinzierl, 2001).

In vivo bindet das native bE/bW-Heterodimer jedoch nicht an den *dik6*-Promotor (Abbildung 6.10 C; Anhang). Die Chromatin *landscape* lässt also trotz vorhandener Konsensussequenz keine *b*-Bindung zu.

In diesem Zusammenhang wurde mit Kon8 ein SELEX-Experiment (Systematische Evolution von Liganden durch exponentielle Anreicherung)

durchgeführt. Kon8 bindet die dadurch ermittelte optimale Bindesequenz *in vitro*, sie kommt jedoch im *Ustilago maydis* Genom nicht vor (Jörg Kämper, pers. Mitteilung).

Die Tatsache, dass in einigen Fällen erst die Rbf1-Bindung die b-Bindung ermöglicht und dass Rbf1 zusammen mit aktivem b stabiler ist lässt spekulieren, dass b alleine nur an *high affinity* Bindestellen binden kann, in Kooperation mit Rbf1 wird der Komplex stabilisiert, dies erlaubt die Bindung von *low affinity* Bindestellen. Um die in axenischer Kultur nicht b-gebundenen b-Bindestellen zu besetzen benötigt b vermutlich weitere unbekannte Interaktionspartner, die kooperativ oder kollaborativ b-Bindung ermöglichen.

Insgesamt ergeben sich für die b- und Rbf1-Bindung an die identifizierten Bindemotive so drei Grund-Modelle (Abbildung 3.2). A) Rbf1 bindet alleine an die *Rbs*, die Bindung selbst ist vermutlich b-unabhängig. b ist nicht direkt an dieser Bindung beteiligt, beeinflusst allerdings indirekt die Bindeeffizienz. Eine gemeinsame Bindung von Rbf1 mit anderen unbekanntem Faktoren ist denkbar. B) b bindet direkt an die *bbs*, Rbf1 ist zwar mit diesem Bindekomplex assoziiert, bindet allerdings vermutlich nur indirekt. Rbf1 spielt dabei weder für die b-Bindung noch für die Regulation der Expression eine Rolle. C) Rbf1 und b binden beide direkt an ihre jeweilige Bindestelle. Diese liegen in unmittelbarer Nähe. Beide Transkriptionsfaktoren sind für eine effiziente Bindung notwendig. Ob sie während der Bindung an DNA auch auf Proteinebene miteinander interagieren wurde bisher nicht experimentell bestätigt, die gezeigte Interaktion in CoIP-Experimenten ist allerdings ein Hinweis.

Bei den übrigen b und Rbf1-Bindungen kann es sich um indirekte Bindungen an DNA, durch Interaktion mit weiteren, unbekanntem Faktoren, oder durch direkte Bindungen an unbekanntem Bindemotive handeln. Durch Protein-Protein Interaktionen könnten die Bindemotive modifiziert werden.

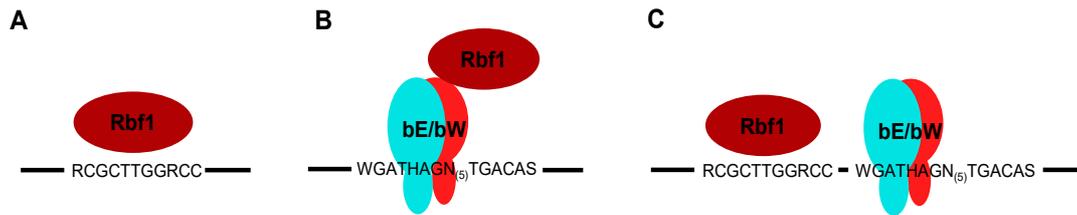


Abbildung 3.2: Schematische Darstellung der b- und Rbf1-Bindung an Bindemotive. A: Rbf1 bindet b-unabhängig an die *Rbs*, gemeinsame Bindung mit unbekanntem Faktoren ist allerdings denkbar. **B:** Das b-Heterodimer bindet direkt an die *bbs*, Rbf1 ist zwar mit diesem Bindekomplex assoziiert, bindet allerdings nur indirekt. **C:** Rbf1 und das b-Heterodimer binden beide direkt an ihre jeweilige Bindestelle. Diese liegen in unmittelbarer Nähe. Beide Transkriptionsfaktoren sind für eine effiziente Bindung notwendig. Ob sie auch auf Proteinebene direkt miteinander interagieren ist nicht untersucht.

Insgesamt kommt die in Abbildung 3.2 C dargestellte kombinatorische Rbf1-b-Bindung an 5 Promotoren vor. Dabei handelt es sich um die Promotoren der Gene *UMAG_12024*, *UMAG_01234*, *UMAG_01262*, *UMAG_06383*, *Iga2* und *rga2*. *UMAG_12024* (*hdp1*) codiert für einen Homeodomänen-Transkriptionsfaktor, der das filamentöse Wachstum und den Zellzyklusarrest moduliert (Pothiratana, 2008). Die Gene *Iga2* und *rga2* werden gemeinsam von einem divergenten Promotor aus transkribiert. Die Gene liegen im *a2*-Locus und sind bei der uniparentalen Vererbung der mitochondrialen DNA nach der Fusion von Sporidien beteiligt (Fedler *et al.*, 2009). Bei *UMAG_01234* und *UMAG_01262* handelt es sich um zwei der am stärksten *b*-induzierten Gene in *Ustilago maydis*. *UMAG_01234* besitzt ein *Leucin-rich Repeat* Motiv, die Deletion im solopathogenen Stamm SG200 zeigt jedoch keine Veränderung der Pathogenität in Infektionsstudien (Heimel *et al.*, 2010b). *UMAG_01262* (*frb52*; *polX*) gehört wie *UMAG_01234* zu den früh *b*-induzierten Genen. In Infektionsstudien mit Kreuzungen aus FB1 ($\Delta frb52$) und FB2 ($\Delta frb52$) kann eine leicht reduzierte Pathogenität festgestellt werden, Sporenbildung und Sporenkeimung sind nicht beeinflusst (Brachmann, 2001). Bei dem trotz *b*- und Rbf1-Bindung nicht differentiell regulierten Gen *UMAG_06383* handelt es sich um eine potentielle MAP-Kinase. Alle bereits beschriebenen Gene mit der kombinatorischen Rbf1-b-Bindung wie in Abbildung 3.2 C, spielen eine Rolle während der frühen Phase der Transition von hefeartigem zu filamentösem Wachstum und sind notwendig für Schlüsselprozesse. In dieser Phase lässt

sich ebenfalls die höchste Rbf1-Expression nachweisen. Dies spricht dafür, dass Rbf1 in dieser Phase seine Hauptaktivität zeigt.

Die Untersuchung von Bindemechanismen von Transkriptionsfaktoren an DNA ist ein weites Feld. Durch die sich in den letzten Jahren schnell entwickelten neuen Möglichkeiten der genomweiten Analyse von Transkriptionsfaktor- (TF) Bindung und Genregulation legen jüngste Ergebnisse nahe, dass die Dynamik und Variabilität von TF-DNA Bindung sehr viel komplexer ist als bisher angenommen. Viele Bindemotive von Transkriptionsfaktoren lassen sich nach wie vor nicht experimentell ermitteln. Das menschliche Genom codiert ca. 1400 Transkriptionsfaktoren. Nur ca. 40 % konnten bisher eindeutig Bindemotive zugeordnet werden (Deplancke *et al.*, 2016; Inukai *et al.*, 2017). Nur eine Minderheit der Transkriptionsfaktoren bindet ausschließlich aufgrund einer spezifischen Primärstruktur der Nukleotidsequenz. Verschiedene Mechanismen, die die TF-DNA Bindung über die Primärstruktur der Nukleotidsequenz hinaus variieren, sind beschrieben (zusammengefasst in Inukai *et al.*, 2017). 1): Ein Transkriptionsfaktor kann Bindesepezifität für mehrere verschiedene spezifische Nukleotidsequenz-Motive aufweisen. Dies kann über differentielle Anordnung mehrerer DNA-Bindedomänen vermittelt werden. Der menschliche TF Oct-1 beispielsweise kann so drei verschiedene Sequenzmotive binden (Badis *et al.*, 2009). 2): Die Bindesequenz wird durch TF-TF bzw. TF-Cofaktor Interaktionen beeinflusst. 3): DNA-Modifikationen wie Methylierung kann die TF-DNA Bindung an ein bestimmtes Motiv bedingen oder verhindern. 4): Viele Transkriptionsfaktoren benötigen eine bestimmte Struktur der DNA um das Bindemotiv, z.B.: eine bestimmte Weite der kleinen Furche. 5): Der genomische Kontext kann ebenfalls durch Sequenzen und Strukturen außerhalb des Bindemotivs die Bindung beeinflussen. Diese Vielzahl an Möglichkeiten zur Variation der Bindesepezifität macht die Identifizierung von Bindemotiven zu einer Herausforderung.

Im Fall einer gemeinsamen Beteiligung zweier Transkriptionsfaktoren an der Bindung können zwei Grundmodelle angenommen werden. Die beiden Transkriptionsfaktoren können beide direkt an die DNA binden, oder es bindet nur einer an DNA, der andere ist lediglich über Protein-Protein Interaktion mit der DNA assoziiert (vgl.- Abbildung 3.2 C und B). Eine kürzlich durchgeführte

Studie des Transkriptionsfaktor-Interaktoms von *Drosophila melanogaster* (Shokri *et al.*, 2019) integrierte *Yeast-two-Hybrid* Analysen, LC-MS Daten und ChIP-Seq Daten und lieferte so ein detailliertes TF-TF Interaktionsnetzwerk. Im Fall von Rbf1 und b lassen sich ebenfalls beide Möglichkeiten beobachten. Kombinatorische direkte Bindung zweier Transkriptionsfaktoren kann wiederum in drei Grundmodelle unterteilt werden (vgl. Deplancke *et al.*, 2016). Die Bindung kann kooperativ oder kollaborativ sein: Es besteht eine direkte Protein-Protein Interaktion oder nicht. Außerdem besteht noch die Möglichkeit einer cis-wirkenden TF-TF-Interaktion, bei der die jeweiligen Bindestellen sehr weit auseinander liegen können. Ob es sich im Fall der direkten TF-DNA Bindung bei Rbf1 und b um eine kooperative oder kollaborative Bindung handelt kann mit bisherigen Daten nicht beurteilt werden, eine Interaktion von Rbf1 mit b konnte allerdings in dieser Arbeit durch LC-MS Analysen gezeigt werden.

3.2 Putative Wirkungsmechanismen und Interaktionspartner von Rbf1

Während es sich bei b-Bindungen fast immer um direkte DNA-Protein Interaktionen an der beschriebenen *bbs* handelt, die in 90 % der Fälle auch zu einer Induktion der Gene führt, reicht die Rbf1-Bindung in vielen Promotoren nicht für eine Expression der Zielgene aus. Insgesamt weisen ca. 22 % der in der b-Kaskade regulierten Gene eine Rbf1-Bindung in ihrem Promotor auf, 70 % davon tragen die ermittelte Rbf1-Konsensussequenz (28 von 40). Bei 22 dieser Gene hat die *rbf1*-Deletion einen signifikanten Einfluss auf die Expression.

Interessanterweise befindet sich der Großteil (181 von 221) der detektierten Rbf1-Bindungen in Promotoren von Genen, die zu den in dieser Arbeit untersuchten Zeitpunkten und Konditionen durch die b-Kaskade nicht differentiell reguliert werden. Die Zahlen zeigen, dass Rbf1-Bindung an die *Rbs* nicht zwingend zur Expression des Zielgens führen muss. Denkbar ist, dass Rbf1 als eine Art Plattform für Multiproteinkomplexe dient; weitere Faktoren müssen rekrutiert oder abgelöst werden um Expression zu ermöglichen. Typische Mechanismen wären z.B.: das Hin- und Herpendeln von Proteinen vom Zytoplasma in den Zellkern, Phosphorylierung, und das Maskieren der Aktivierungsdomäne eines TF.

Das Gal4 Protein ist eines der bekanntesten und eines der am besten untersuchten Modelle für transkriptionelle Aktivierung in Eukaryoten. In Abwesenheit von Galaktose ist Gal4 inaktiv, da der Gal80 Repressor die Gal4 Aktivierungsdomäne maskiert. Nach Galaktose Induktion wird Gal80 entfernt und pendelt aus dem Zellkern in das Zytoplasma, das erlaubt Gal4 Co-Aktivatoren und die Transkriptionsmaschinerie zu rekrutieren. Gal4 erlebt außerdem eine Reihe von Phosphorylierungen, die zu drei unterschiedlichen migratorischen Formen von Gal4 führen, die sich so in ihrer Aktivität unterscheiden (zusammengefasst in Traven *et al.*, 2006). Rbf1 besitzt 6 putative MAP-Kinase Phosphorylierungs-Stellen, die Mutation all dieser Stellen beeinflusst allerdings nicht die Virulenz (Lanver *et al.*, 2014).

Ähnliche für eine transkriptionelle Aktivierung notwendige Schritte könnten im Fall von Rbf1 erst zu späteren Zeitpunkten der pathogenen Entwicklung

eintreten, Rbf1-Bindung ohne direkten Einfluss auf die Expression könnte eine Art *priming* (vgl. Gualdi *et al.*, 1996) der Gene sein.

Bei der mit Infektion in Zusammenhang stehenden Entwicklungsstadien phythopathogener Pilze spielt das Erkennen und Reagieren auf Pflanzenoberflächen eine zentrale Rolle (Tucker und Talbot, 2001). In *Ustilago maydis* führen hydrophobe Oberflächen und Cutin-Monomere zur Induktion von Zellwand degradierenden Proteinen und Effektor-Proteinen, die eine zentrale Rolle bei der Penetration und Kolonisation der Pflanze spielen (Mendoza-Mendoza *et al.*, 2009). Genomweite Transkriptom Studien zeigten eine drastische Veränderung der Expressionsprofile in *Ustilago maydis* durch Konfrontation mit hydrophoben Oberflächen und dem Cutin-Monomer Palmitinsäure (Hexadecansäure). Ca. 20 % aller Gene werden dadurch dereguliert (Lanver *et al.*, 2014). Diese Signale fehlen in den in dieser Arbeit durchgeführten CHIP-Seq und RNA-Seq Experimenten und könnten, obwohl sie scheinbar nicht für die Rbf1-Bindung nötig sind, für eine Rbf1-abhängige Expression der direkten Rbf1-Zielgene notwendig sein.

Denkbar wäre außerdem eine Funktion von Rbf1 als Pionier-Transkriptionsfaktor, der die Chromatinstruktur beeinflusst und die DNA so zugänglich für weitere Transkriptionsfaktoren macht (zusammengefasst in Zaret und Carroll, 2011). Solche Pionier-Transkriptionsfaktoren sind wichtig für die Rekrutierung weiterer Transkriptionsfaktoren oder histonmodifizierender Proteine, um speziell im Kontext der Einleitung eines bestimmten entwicklungsstadien-spezifischen Programms, Gene zu exprimieren bzw. zu reprimieren. Das Hefe-Protein Rap1 z.B. bindet Zielsequenzen im Chromatin und öffnet dieses dadurch für andere Faktoren (Yu und Morse, 1999; Koerber *et al.*, 2009).

Tatsächlich konnten durch LC-MS Analysen (Co-Immunopräzipitation (CoIP) mit anschließender Flüssigchromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung) mehrere mit Rbf1 interagierende Transkriptionsfaktoren identifiziert werden.

3.2.1 Rbf1 interagiert mit weiteren Transkriptionsfaktoren

Durch Co-IP Experimente konnte die Interaktion von b und Rbf1 gezeigt werden. Dieses Ergebnis passt zu den Beobachtungen aus den ChIP-Seq Daten. Zusätzlich wurden 33 Proteine identifiziert, die sowohl mit b, als auch mit Rbf1 präzipitiert werden konnten, was für einen Komplex dieser Proteine mit beiden Transkriptionsfaktoren spricht. Auffallend ist, dass Rbf1 nicht mit bE angereichert werden konnte. Dies liegt vermutlich an der generell schlechten Detektierbarkeit von Rbf1. Eine *in silico* Analyse von Rbf1 zeigt, dass 48 % des Proteins aufgrund der Länge der durch den tryptischen Verdau entstehenden Peptide technisch nicht nachgewiesen werden kann. Die tatsächliche Abdeckung der gefunden Rbf1-Peptide in der Rbf1:3xHA-IP betrug 19 % (vgl. bE1 Peptide in bE1:3xHA: 40 %). Insgesamt konnten 33 Proteine sowohl mit Rbf1 als auch mit bE1 angereichert werden, die in der Negativkontrolle nicht detektiert wurden. Darunter befanden sich, wie zu erwarten, bW2, das zusammen mit bE1 das b-Heterodimer bildet, und Clp1, dessen Interaktion mit bE1 bereits beschrieben wurde (Heimel *et al.*, 2010a). Die hohe Schnittmenge der beiden Experimente spricht für einen Komplex aus Rbf1 und b und bestätigt die Annahme aus den ChIP-Seq Experimenten. Unter den 33 Kandidaten befinden sich 10 Proteine mit putativer DNA-Bindedomäne (Tabelle 6.2; Anhang).

Von diesen 10 interessanten Kandidaten zeigten die Proteine UMAG_12024, UMAG_10578, UMAG_00578 (bW) und UMAG_02857 die Stärkste Anreicherung. Diese vier konnten auch in einem umfassenderen Experiment mit quantitativer LC-MS Analyse (*label free quantification*) bestätigt werden (Abbildung 2.6). Für die übrigen 6 Proteine mit potentieller DNA-Bindedomäne konnten nur 6 oder weniger Peptide identifiziert werden, was für eine haltbare quantitative Aussage nicht ausreichend ist. Alle Proteine sind zu den untersuchten Bedingungen (aktive b-Kaskade) nur relativ gering exprimiert, 5 werden auch in keiner bisher untersuchten Kondition weiter induziert oder reprimiert, es könnte sich um allgemeine Transkriptionsfaktoren handeln. Ein interessanter Kandidat ist jedoch zu erwähnen. UMAG_05601 wird zwar nicht über die b-Kaskade induziert, allerdings während der pathogenen Entwicklung innerhalb der Pflanze. Betrachtet man die Zeitpunkte 0.5 dpi (*days post*

infection) gegen 6 dpi aus RNA-Seq Studien (Datensatz aus Lanver *et al.*, 2018) wird *UMAG_05601* über 10-fach hoch reguliert. Der Zn(2)-C6 *fungus-type* Transkriptionsfaktor wird in (Lanver *et al.*, 2018) als einer von drei potentiellen Hauptregulatoren des *cyan-clusters* diskutiert. Dieses *Cluster* repräsentiert Gene, die kurz nach der Etablierung der biotrophen Phase, genau zu Beginn der Tumorbildung (2-4 dpi) induziert sind. Rbf1 ist während der Etablierung der biotrophen Phase ebenfalls stark exprimiert, RT-Analysen zeigten allerdings, dass 3 dpi kein *rbf1*-Transkript mehr nachgewiesen werden kann. Nichts desto trotz könnte die potentielle Interaktion von Rbf1 und *UMAG_05601* in der Transitionsphase zur Tumorbildung eine Rolle spielen. Die Interaktion muss allerdings durch weitere Experimente bestätigt werden. *UMAG_05601* könnte einer der Faktoren sein, der für die Aktivierung der Expression eines Teils der beschriebenen bereits zuvor von Rbf1 gebundene Promotoren nötig ist. Insgesamt 19 Gene des in (Lanver *et al.*, 2018) beschriebenen *cyan clusters* weisen eine Rbf1-Bindung in ihrem Promotor auf, bei 17 führt die Rbf1-Bindung alleine nicht zu einer Expression. Die Interaktion von *UMAG_05601* mit Rbf1 könnte außerdem lediglich indirekt über eine Interaktion mit dem bE/bW-Heterodimer zustande kommen, das über die gesamte biotrophe Phase benötigt wird.

Der Zn(2)-C6 *fungus-type* Transkriptionsfaktor *UMAG_10578* und der C2H2-Zinkfinger Transkriptionsfaktor *UMAG_02857* sind ebenfalls nicht innerhalb der b-Kaskade induziert, und werden auch während den Pflanzen-assoziierten Phasen nicht differentiell reguliert. Sie zeigen allerdings eine sehr starke Anreicherung in den Co-IPs. Die jeweilige Deletion beider TF führt nicht zum Verlust der Pathogenität, scheint die Virulenz jedoch leicht zu verschlechtern (Abbildung 6.3; Anhang). Um den Einfluss auf die pathogene Entwicklung genau zu bestimmen müssten allerdings umfassendere Infektionsstudien durchgeführt werden.

3.2.2 Rbf1 bindet zusammen mit Hdp1 an DNA

Hdp1 (UMAG_12024) ist neben *b* der interessanteste Rbf1-Interaktionspartner. Hdp1 ist das in der Co-IP mit Rbf1 am stärksten angereicherte Protein. Der Homeodomänen Transkriptionsfaktor ist am G2 Zellzyklusarrest und der Filamentierung von *Ustilago maydis* während der Transition von saprophytischer zu biotropher Lebensweise beteiligt. Wird *hdp1* deletiert führt dies zu verkürzten Filamenten und die Anzahl von Filamenten mit mehr als zwei Zellkernen steigt (Pothiratana, 2008). *hdp1* wird *rbf1*-abhängig induziert (Heimel *et al.*, 2010b; diese Arbeit), bleibt allerdings auch zu späteren Zeitpunkten der Infektion *rbf1*-unabhängig exprimiert (Vranes, unveröffentlicht; Lanver *et al.*, 2018).

Weitere Co-IP Experimente zeigen, dass Hdp1 in der Lage ist, sowohl mit *b* alleine (im *rbf1*-Deletionshintergrund), als auch mit Rbf1 alleine (im *b*-Deletionshintergrund) zu interagieren. Sie weisen außerdem ebenso wie die LC-MS Analysen darauf hin, dass Hdp1 stärker mit Rbf1 als mit *b* assoziiert ist. In der LC-MS Analyse der Immunopräzipitation mit Rbf1:3xHA konnten ca. doppelt so viele Hdp1-Peptide identifiziert werden wie bei der Immunopräzipitation mit *b*E1:3xHA. Die Rbf1-Hdp1 Interaktion wird allerdings durch *b* deutlich verstärkt. Ob dies aufgrund der direkten Beteiligung von *b* an diesem Komplex oder indirekt durch unbekannte *b*-induzierte Faktoren geschieht, kann bisher nicht eindeutig gezeigt werden. Wie bereits diskutiert, scheint *b* Rbf1 zu stabilisieren. ChIP-Seq Daten zeigen weiter, dass Hdp1 zusammen mit Rbf1 bzw. zusammen mit Rbf1 und *b* an DNA bindet, allerdings findet man keine Bindung an *b* wenn Rbf1 nicht vorhanden ist.

Der Einfluss von *b* bzw. *rbf1* auf die Hdp1-Bindung scheint allerdings gering zu sein. Hdp1 kann am Großteil der Promotoren putativer Zielgene auch unabhängig von *b* oder *rbf1* an DNA binden (129 von insgesamt 199) (Abbildung 2.8 A; türkis). Das bioinformatisch ermittelte Hdp1-Konsensusmotiv (Abbildung 2.8 B) lässt sich in ca. 25 % der Hdp1-Peaks identifizieren. Es handelt sich um ein für Homeodomänen- Transkriptionsfaktoren typisches, AT-reiches Motiv.

31 der Hdp1-gebundenen Promotoren können allerdings nur dann mit Hdp1:3xHA angereichert werden wenn *rbf1* bzw. *rbf1* und *b* zusätzlich

exprimiert sind. In 16 dieser Promotoren kann außerdem eine Rbf1-Bindung beobachtet werden. Rbf1 und Hdp1 binden diese Promotoren folglich auch kombinatorisch.

Insgesamt bindet Hdp1 an die Promotoren von 64 Genen zusammen mit Rbf1 als Komplex. Ähnlich wie schon für Rbf1 und b beschrieben, können sich beide Konsensusmotive von Rbf1 und Hdp1 nebeneinander in unmittelbarer Nähe befinden. Hdp1 kann dabei meist auch im *rbf1*-Deletionshintergrund an sein Konsensusmotiv binden. Ob in diesen Fällen Rbf1 auch *hdp1*-unabhängig binden kann ist unklar. Da *hdp1* durch *rbf1* induziert wird, ist in allen durchgeführten ChIP-Seq Experimenten mit Rbf1 auch *hdp1* exprimiert.

Für die Hdp1-Bindung an das identifizierte Hdp1-Bindemotiv lassen sich drei Grund-Modelle zeigen (Abbildung 3.3). A) Hdp1 bindet an die *H1bs* (Hdp1-Bindestelle), die Bindung selbst ist meist zwar *rbf1*-unabhängig, Rbf1 kann allerdings als Hdp1-Interaktionspartner ebenfalls mit dieser Bindestelle assoziiert sein. B) und C) Hdp1 und Rbf1 binden beide nebeneinander an ihre jeweilige Bindestelle. Diese liegen in unmittelbarer Nähe. Bei der Rbf1-Bindestelle kann es sich dabei um das identifizierte Rbf1-Konsensusmotiv handeln (B) oder um bisher unbekannte Motive (C). In beiden Fällen kann Rbf1 auch zusätzlich vermutlich indirekt durch Protein-Protein-Interaktion mit Hdp1 assoziiert sein. Dies zeigt sich durch zwei dicht aufeinander folgende Maxima in den entsprechenden Rbf1-*Peaks* (siehe Abbildung 2.9 B; rechts, rot und Abbildung 2.10). Dass Hdp1 und Rbf1 dicht nebeneinander binden lässt sich auch für Hdp1-Bindung an unbekannte Motive oft beobachten. Dabei handelt es sich vermutlich um kooperative Bindungen, bei denen durch die Interaktion die Komplexstabilität erhöht wird, um so das Binden von *low affinity* Bindestellen zu ermöglichen (*weak site assisted binding*) (vgl. Garvie *et al.*, 2001).

Essentielle Folge-Experimente, um die Hdp1-Rbf1 Kombinatorik näher zu untersuchen, wären Rbf1-Bindestudien im *hdp1*-Deletionshintergrund.

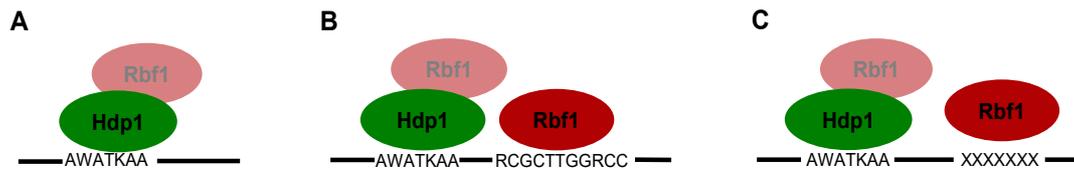


Abbildung 3.3: Schematische Darstellung der Hdp1- und Rbf1-Bindung an Bindemotive. **A:** Hdp1 bindet an die *H1bs* (Hdp1-Bindestelle). **B, C:** Hdp1 und Rbf1 binden ihre jeweilige Bindestelle, diese liegen in unmittelbarer Nähe. **B:** Bei der Rbf1-Bindestelle handelt es sich um das identifizierte Rbf1-Konsensusmotiv. **C:** Rbf1 bindet an bisher unbekannte Motive. Rbf1 kann durch Protein-Protein-Interaktion mit Hdp1 indirekt mit dem jeweiligen Locus assoziiert sein.

Die vielen *rbf1*-unabhängigen Hdp1-Bindungen spielen vermutlich auch eine zusätzliche Rolle zu späteren Zeitpunkten der Infektion, wenn *rbf1* nicht mehr exprimiert wird. In diesen Stadien könnte dann die Hdp1-b Interaktion in den Vordergrund rücken.

Hdp1 hat wenig Einfluss auf die Expression der *b*-abhängig regulierten Gene

Insgesamt ist der Einfluss von *hdp1* auf die *b*-Kaskade nur gering. Von den 184 *b*-abhängig regulierten Genen werden nur 64 durch die *hdp1*-Deletion signifikant beeinflusst, nur 11 weisen eine drastisch veränderte Expression auf. Die Mehrzahl der Gene mit von Hdp1 gebundenen Promotoren wird nicht durch die *b*-Kaskade induziert. Von 148 Hdp1-gebundenen Promotoren in AB31 werden nur 10 (6.8 %) durch *b* induziert. Von 129 Hdp1-gebundenen Promotoren werden 30 auch *hdp1*-abhängig reguliert (23 %). Dieses Verhältnis ist ähnlich wie für Rbf1 beschrieben (ca. 18 %). *hdp1* wird in der *b*-Kaskade direkt *rbf1*-abhängig induziert. Ähnlich wie *rbf1* wird *hdp1* auf der Pflanze stark exprimiert, die *hdp1*-Expression wird allerdings über den gesamten Verlauf der Infektion *rbf1*-unabhängig aufrechterhalten. Bei vielen der detektierten Hdp1-Bindungen könnte es sich also um zu späteren Zeitpunkten Hdp1-abhängig regulierte Promotoren handeln. Insgesamt bindet Hdp1 an die Promotoren von 64 Genen zusammen mit Rbf1 als Komplex, davon werden allerdings nur 7 von der *hdp1*-Deletion beeinflusst. Für die Regulation der übrigen Gene könnte eine

kooperative Rekrutierung, ähnlich wie für Enhancosomen beschrieben (Carey, 1998), von Pflanzensignal-abhängigen Cofaktoren notwendig sein, die durch die durchgeführten Experimente in axenischer Kultur nicht abgebildet werden können.

Die direkte, *b*-unabhängige *hdp1*-Induktion beeinflusst die Expression von 296 Genen. Nur 24 von ihnen weisen eine *b*-unabhängige Hdp1-Bindestelle auf. Der Großteil der durch *hdp1*-beeinflussten Gene wird also nicht direkt von Hdp1 reguliert. *hdp1* reprimiert einen und induziert fünf weitere Transkriptionsfaktoren. Dabei handelt es sich bei 3 dieser Transkriptionsfaktoren um direkte Hdp1-Zielgene. UMAG_02717 ein C2H2 Transkriptionsfaktor und UMAG_12189, ein Zn(2)-C6 *fungale type* Transkriptionsfaktor, werden Hdp1-abhängig induziert, Ncp1 (UMAG_04000), ein Transkriptionsfaktor, der durch Umweltfaktoren gesteuert an das UAS Motiv im *prf1*-Promotor bindet (Hartmann *et al.*, 1999), wird stark Hdp1-abhängig reprimiert. In (Pothiratana, 2008) wird Ncp1 als positiver Regulator des MEL Clusters (Mannosylerythritol) in *Ustilago maydis* diskutiert. MEL ist ein oberflächen-aktives Biotensid. Generell verbessern solche Tenside z.B. die Anhaftung an unpolare Oberflächen wie Blattoberflächen. Für *Ustilago maydis* sind die Komponenten des MEL Clusters in (Hewald *et al.*, 2006) beschrieben. Alle 5 Komponenten werden *hdp1*-abhängig reprimiert, 3 weisen Hdp1-Bindung im Promotor auf. Die Transkriptionsfaktoren UMAG_00946, UMAG_12304 und UMAG_02713 werden indirekt über *hdp1* induziert. Bei UMAG_02713 handelt es sich um den beschriebenen Hauptregulator der Pheromon-Antwort in *Ustilago maydis*, Prf1. Das erklärt die *hdp1*-abhängige Regulation einiger zuvor als Pheromon-abhängig reguliert beschriebener Gene (vgl. Zarnack *et al.*, 2008). Die *hdp1*-abhängige Induktion von *prf1* kann nicht durch die Repression von *ncp1* und die dadurch fehlende Ncp1-Bindung im *prf1*-Promotor erklärt werden, da die Bindung eine positive Wirkung auf die *prf1*-Expression hat (Hartmann *et al.*, 1999). Es ist wahrscheinlicher, dass die induzierende Wirkung von *hdp1* auf *prf1* in Verbindung mit *rop1* (UMAG_12033) steht. *rop1* ist für die *hdp1*-abhängige *prf1*-Induktion notwendig (Brefort *et al.*, 2005; Pothiratana, 2008). *rop1* wird durch *hdp1* 3.48-fach induziert (RNA-Seq, diese Arbeit), es ist also wahrscheinlich, dass *hdp1 prf1*

indirekt über *rop1* reguliert. Bei *rop1* handelt es sich allerdings ebenfalls um ein indirektes *hdp1*-Zielgen. Weder im *rop1*-Promotor noch im *prf1*-Promotor können Hdp1-Bindungen identifiziert werden. Für den beobachteten G2 Zellzyklusarrest nach *hdp1*-Induktion ist vermutlich *pcl12* verantwortlich, dass *hdp1*-abhängig induziert wird (Pothiratana, 2008; RNA-Seq diese Arbeit). Im *pcl12*-Promotor konnte ebenfalls keine signifikante Hdp1-Bindung festgestellt werden, es handelt sich um ein weiteres indirektes *hdp1*-Zielgen. Pcl12 kodiert für ein Zyklin, das spezifisch mit Cdk5 interagiert, einer Kinase, die eine essentielle Rolle in der Morphogenese von *Ustilago maydis* spielt. Eine Überexpression von *pcl12* induziert filamentöses Wachstum, eine Deletion führt zu einer verminderten Ausbildung von Konjugationshyphen während der Paarung, zu einer Beeinträchtigung des polaren Wachstums nach *b*-Induktion und hat Einfluss auf die Sporenkeimung. Die Deletion führt jedoch nicht zum Verlust der Virulenz (Flor-Parra *et al.*, 2007).

Auffallend ist, dass durch die *hdp1*-Induktion die Regulation vieler Transporter beeinflusst wird. Interessanterweise werden die meisten der direkten Hdp1-Zielgene durch die *hdp1*-Induktion reprimiert. 20 der 48 *hdp1*-abhängig reprimierten Gene weisen einen Hdp1-*Peak* im Promotor auf. Die Hdp1-Bindung scheint damit einen reprimierenden Effekt zu haben. Überraschend ist außerdem, dass für einige der "*rbf1* oder *hdp1*" -regulierten Gene die *hdp1*-Deletion in CP27 (direkte *rbf1*-Induktion, *hdp1* wird indirekt induziert) keinen Einfluss hat. Diese Gene scheinen nur durch *hdp1* induziert zu werden, wenn *rbf1* fehlt. Außerdem werden 150 Gene zwar durch direkte *hdp1*-Induktion beeinflusst, allerdings sind sie bei Anwesenheit von *rbf1* nicht differentiell reguliert (Tabelle 6.1.6; Datenanhang). Die *hdp1*-Expression ist in den untersuchten Stämmen CP27 (indirekte *hdp1*-Induktion über *rbf1*) und JB2 *P_{crp}:hdp1* (direkte *hdp1*-Induktion) identisch; vgl. Abbildung 6.5; Anhang. Rbf1 hat also einen negativen Effekt auf die *hdp1*-vermittelte Regulation. Interessanterweise befindet sich die größte Gruppe der direkten Hdp1-Zielgene unter diesen Genen. Hdp1-Bindung führt meist zur Repression der Gene, allerdings nur in Abwesenheit von *rbf1*. Der Mechanismus der diesem Effekt zugrunde liegt konnte allerdings bisher nicht identifiziert werden. Klar ist nur, dass *rbf1* nicht die Hdp1-Bindung selbst beeinflusst und Rbf1 in diesen Promotoren auch nicht bindet.

Hdp1 bindet an drei Promotoren zusammen mit b und Rbf1

Interessant ist, dass die Promotoren von Schlüsselfaktoren multiple Transkriptionsfaktor Bindungen und kooperative Regulationsmechanismen aufweisen. Die Promotoren von *UMAG_12024 (hdp1)* und *UMAG_03172 (rbf1)* selbst, sowie von *UMAG_02438 (clp1)* lassen sich mit allen drei untersuchten Transkriptionsfaktoren anreichern. Sowohl *rbf1* als auch *clp1* sind essentiell für die pathogene Entwicklung von *Ustilago maydis*. In allen drei Promotoren können multiple Bindungen der Transkriptionsfaktoren Rbf1, b und Hdp1 beobachtet werden (Abbildungen 2.11, 2.12 und 2.13).

Im Fall von *hdp1* reicht *rbf1* für die Induktion aus, diese ist jedoch in Kombination mit b stärker. Das spiegelt sich auch im Rbf1-b-Bindevverhalten wieder. Wie in Abbildung 2.11 dargestellt, bindet Rbf1 zusammen mit b kombinatorisch an Position 1. Ob die komplexe Kombinatorik an den Positionen 2-5 eine Rolle für die *hdp1*-Expression spielt müsste weiter untersucht werden. Die identifizierten Hdp1-Bindestellen im eigenen Promotor sprechen außerdem für eine Autoregulation.

Für die *rbf1*-Expression ist b ausreichend. Dafür ist die *bbs-1377* (Abbildung 2.12; Position 1) essentiell. Die *bbs-2778* an Position 2 beeinflusst die *rbf1*-Expression ebenfalls maßgeblich. Rbf1 selbst, sowie Hdp1 haben trotz der komplexen Beteiligung am Bindeprofil der Transkriptionsfaktor-Komplexe keinen Einfluss auf die b-abhängige *rbf1*-Expression in axenischer Kultur (RNA-Seq, diese Arbeit). Denkbar ist jedoch dass durch die komplexen kombinatorischen Bindungen Pflanzen- und Umweltsignale integriert werden können die in den durchgeführten Experimenten nicht auftreten.

Ähnliches lässt sich für die *clp1*-Regulation beobachten. Trotz komplexer kombinatorischer Bindung der drei Transkriptionsfaktoren (Abbildung 2.13) ist b für die *clp1*-Expression ausreichend. Weder *rbf1* noch *hdp1* alleine induzieren *clp1*, noch beeinflusst deren Deletionen die b-abhängige *clp1*-Expression in axenischer Kultur. Zu Beginn der pathogenen Entwicklung interagiert Clp1 mit b, was zur Aufhebung des G2 Zellzyklusarrest nach der Pflanzenpenetration führt (Heimel *et al.*, 2010a). Clp1 vermindert dadurch die Aktivierung durch b und reprimiert so seine eigene Expression. Diese negative Rückkopplung führt

vermutlich dazu, dass sich die *b* und *clp1* Expressionslevel zyklisch verändern, um Zellteilung trotz *b*-Expression zu ermöglichen (Heimel *et al.*, 2010a). Denkbar wäre eine Beteiligung von Hdp1 in dieser komplexen Regulation. Interessanterweise konnte im *b*-Promotor ebenfalls eine potentielle Hdp1-Bindestelle gefunden werden, und ektopische *hdp1*-Expression führt zu einer starken *b*-Induktion. Ob es sich dabei um einen direkten Effekt handelt und Hdp1 an der putativen Hdp1-Bindestelle bindet ist allerdings bisher nicht experimentell bestätigt worden.

Die Bedeutung der Hdp1-Rbf1 bzw. *b* Interaktion kann mit bisherigen Daten noch nicht umfassend beschrieben werden. Es ist zu vermuten, dass viele der Effekte in axenischer Kultur nicht beobachtet werden können, da zusätzlich Pflanzensignale und Umweltfaktoren berücksichtigt werden müssten. Insgesamt legen die Arbeiten jedoch die Basis für die Integration von *hdp1* in das regulatorische *b*-Netzwerk, das in Abschnitt 3.3 weiter beschrieben wird.

3.2.3 Proof of principle für einen *gene-centered in vivo* Ansatz zur Identifizierung von regulatorischen Proteinen (enChIP).

Die Tatsache, dass Rbf1 an manchen Promotoren mit Hdp1, an manchen mit b und an manchen mit beiden Transkriptionsfaktoren Komplexe bildet, wirft die Fragen auf, wie sich diese Komplexe unterscheiden, warum es die verschiedenen Komplexe gibt, und ob weitere Proteine an der Komplexbildung beteiligt sind. Auch die Suche nach putativen Regulationsmechanismen der Expression von Zielgenen dieser Komplexe, z.B. durch allosterische und/oder kooperative Kontrolle der Rekrutierung von Cofaktoren, wirft die Frage nach promotor-spezifischen Interaktionspartnern auf. Um einen Einblick in molekulare Mechanismen einer spezifischen genomischen Region zu bekommen, ist es nötig, Moleküle zu identifizieren, die mit einem bestimmten DNA-Bereich assoziiert sind. Es soll nur ein bestimmter Komplex am Promotor eines bestimmten Zielgens untersucht werden (*gene-centered*). Bisherige Ansätze dieser Art verwenden die *Yeast one-hybrid* (Y1H) Methode, bei der ein bestimmtes regulatorisches Element verwendet wird, um die Bindung eines ganzen Sets an Transkriptionsfaktoren in einem Experiment zu untersuchen. Mit dieser Methode konnten umfassende Protein-DNA Interaktionsnetzwerke beispielsweise für *Caenorhabditis elegans* (Fuxman Bass *et al.*, 2016) und *Drosophila melanogaster* erstellt werden (Shokri *et al.*, 2019). Dieses System hat allerdings eine Reihe von Nachteilen. Es handelt sich um ein heterologes System in dem nur direkte Interaktionen untersucht werden können. Die getestete Protein-DNA Interaktion läuft im Hefe-Zellkern ab. Außerdem können Heterodimere und andere, komplexere Interaktionen, die multiple Transkriptionsfaktoren benötigen nur schwer detektiert werden (zusammengefasst in Walhout, 2011).

Die enChIP (*engineered DNA-binding molecule-mediated chromatin immunoprecipitation*) (Fujita und Fujii, 2013) stellt eine der wenigen beschriebenen *gene centered in vivo* Methoden zur Identifizierung regulatorischer Proteine dar. Dabei werden spezifische genomische Bereiche mit Hilfe von modifizierten DNA-bindenden Proteinen *in vivo* markiert, unter Erhalt der DNA-Proteininteraktionen biochemisch aufgereinigt, und anschließend analysiert. In dieser Arbeit wurde dieses System für *Ustilago*

maydis etabliert. Dazu wurde eine katalytisch inaktive Form des Cas9-Proteins aus dem CRISPR (*clustered regularly interspaced short palindromic repeats*) System erstellt und für *Ustilago maydis* optimiert, mit dem Ziel die mit einer bestimmten DNA-Region interagierenden Proteine zu identifizieren.

Als Proof of Principle konnte in dieser Arbeit erfolgreich der *dik6*-Promotor angereichert, und Rbf1 als Interaktionspartner via Westernblot bestätigt werden (Abbildung 2.30). Das Prinzip und der Arbeitsablauf der enChIP sind in Abbildung 2.24 dargestellt. Die genaue Methodik ist im Methodenteil (4.4.8) beschrieben.

Um mit dieser Methode unbekannte mit einer *region of interest* assoziierte Proteine zu identifizieren, wurde die enChIP mit anschließender LC-MS kombiniert. So konnten erfolgreich mit dem *dik6*-Promotor assoziierte Proteine identifiziert werden.

Einige der identifizierten Proteine waren zu erwarten; Histone, RNA-Polymerase II-assoziierte Proteine, Helikasen und generelle chromatinmodifizierende Faktoren sprechen für eine Anreicherung einer offenen, aktiv transkribierten Chromatin-Region. Die Liste der identifizierten Proteine enthält zusätzlich neben Proteinen unbekannter Funktion auch einige metabolische Enzyme.

Durch die enChIP Methodik konnte ein interessanter, bisher uncharakterisierter HMG-Box Transkriptionsfaktor (UMAG_04007) als Interaktionspartner für beide in dieser Arbeit untersuchten Promotorregionen identifiziert werden. HMG-Proteine sind an vielen Kernprozessen beteiligt. Jede Familie (HMGA, HMGB und HMGN) spielt ihre eigene Rolle bei der Modulation der Chromatinstruktur und der Regulierung der genomischen Funktion (zusammengefasst in Reeves, 2010). Bei UMAG_04007 handelt es sich um ein Mitglied der HMGB Familie. Die HMGB-Proteine können die Rekrutierung von Chromatin-Remodelling-Proteinen erleichtern, sie können eine inhibitorische Rolle bei der Transkriptionsinitiierung spielen, oder durch so genannte "Hit-and-Run" –Wirkungsmodi die stabile Bindung anderer Transkriptionsfaktoren an ihre DNA-Erkennungsstellen ermöglichen, dissoziieren und das Partnerprotein stabil an sein DNA-Substrat gebunden zurücklassen (zusammengefasst in Reeves, 2010).

Überraschenderweise konnte Rbf1, trotz der Detektierbarkeit im Westernblot, wider Erwarten in einer LC-MS Analyse nicht als Interaktor für die *dik6*-Promotorregion detektiert werden. Auch die bereits über ChIP-Seq nachgewiesene Interaktion von bE/bW mit dem *UMAG_11413*-Promotor konnte nicht gezeigt werden. Auch in anderen Studien, die mit der enChIP Methode durchgeführt wurden, wurden zwar verschiedenen DNA-bindende Proteine nachgewiesen, allerdings konnten keine Gen-spezifischen Transkriptionsfaktoren identifiziert werden. In Kombination mit SILAC (*stable isotope labeling by/with amino acids in cell culture*) konnten jedoch quantitativ Veränderungen der Abundanz bestimmter Faktoren an Promotoren gezeigt werden (Fujita und Fujii, 2014). In Neuroblastomzellen konnte z.B. die Dissoziation von Proteinen am EPAS1 Promotor unter Sauerstoffmangel gezeigt werden. Die Dissoziation von Nukleosom-assoziierten Proteinen führt vermutlich zu einer Öffnung des Chromatins und könnte so die Induktion von EPAS1 unter Sauerstoffmangel erklären (Hamidian *et al.*, 2018).

Ein limitierender Faktor der enChIP Methode besteht vermutlich in der Menge an anreicherbarem Protein. Pro Zelle wird nur ein spezifischer Locus angereichert. Es muss also mit sehr viel Ausgangsmaterial begonnen werden. Zufriedenstellende Resultate wurden bisher bei der Identifizierung von Telomer-assoziierten Proteinen mit Hilfe von Anreicherungen mit modifizierten TAL-Proteinen erzielt (Fujita *et al.*, 2013). Ein Vorteil hierbei ist, dass Telomere aus repetitiven Sequenzen bestehen, was die Rekrutierung multipler TAL-Proteine ermöglicht und so die Performance verbessert. Eine multiple Integration der Ziel-Regionen der in dieser Arbeit durchgeführten Experimente konnte zwar die Menge an angereichertem Chromatin erhöhen, es konnten allerdings nach wie vor keine spezifischen Transkriptionsfaktoren nachgewiesen werden.

Ein weiteres Problem könnte im Crosslinking mit Formaldehyd bestehen. Durch diese unspezifische Vernetzung könnten unspezifisch Proteine angereichert werden, die sich in räumlicher Nähe befinden. Außerdem muss zur Detektion der Peptide die Vernetzung aufgehoben werden, was nicht zu 100 % geschieht und so die Auflösung herabsetzt. Eine mögliche Lösung dieses Problems bietet die Verwendung von BirA (Biotin Ligase) oder APEX2 (Ascorbat Peroxidase) die spezifisch an den Promoter gebracht werden (zusammengefasst in Trinkle-

Mulcahy, 2019). Dadurch können angrenzende Proteine mit Biotin markiert und anschließend aufgereinigt werden.

Bisher konnten nur assoziierte Proteine von repetitiven DNA-Bereichen identifiziert werden, mit Hilfe von APEX2 konnten nun assoziierte Proteine des TERT-Promotors in humanen Zelllinien identifiziert werden und erstmals auch Transkriptionsfaktoren die mit diesem *single-locus* assoziiert sind (Myers *et al.*, 2018). Werden mit einem Bereich assoziierte Proteine mit Biotin markiert, können diese direkt über Streptavidin angereichert werden. Eine stabile Verbindung von dCas9, über Chromatin bis zu assoziierten Proteinen ist nicht mehr nötig und *crosslinking* somit nicht mehr essentiell. APEX2 oxidiert in Gegenwart von Wasserstoffperoxid die Phenoleinheit von Biotin-Phenol-Verbindungen zu Phenoxyradikalen, die mit oberflächenexponierten Tyrosinresten reagieren und so die nahe gelegenen Proteine mit Biotinderivaten markieren (Lam *et al.*, 2015). Biotin-Phenol wird allerdings von *Ustilago maydis* Zellen nicht aufgenommen (Michael Feldbrügge, pers. Mitteilung). Das Verhalten einer optimierten BriA Variante (TurboID) wird momentan in *Ustilago maydis* untersucht (Johannes Freitag, pers. Mitteilung). Sie könnte, falls sich die Methodik erfolgreich einsetzen lässt, für die Modifikation des enChIP Protokolls verwendet werden.

Dass in dieser Arbeit Rbf1 mit enChIP als Interaktor des *dik6*-Promotors mit Westernblot Analysen gezeigt werden konnte, spricht gegen ein generelles Problem Transkriptionsfaktoren mit der enChIP Methode anzureichern. Möglicherweise werden die Peptide durch das Crosslinking der Zellen und/oder durch die Isolation aus dem SDS-Gel so modifiziert, dass sie in der LC-MS nicht nachgewiesen werden können. Ein gelfreier Ansatz wurde bereits bei unseren Kooperationspartnern etabliert (Kerstin Schmidt, pers. Mitteilung) und könnte diesem Problem Abhilfe schaffen.

3.3 Das transkriptionelle Netzwerk das die Initiation der biotrophen Phase steuert ist hierarchisch aufgebaut

Das transkriptionelle Netzwerk das die Transition von saprophytischem zu biotrophem Wachstum in *Ustilago maydis* reguliert ist hierarchisch aufgebaut. Es lässt sich in Entwicklungsstadium-abhängige Module aufgliedern, die ihrerseits meist wiederum hierarchisch gegliedert sind. Aufeinanderfolgende Wellen von Transkriptionsfaktoren regulieren gemeinsam die kritischen Veränderungen die mit der Lebensweise von *Ustilago maydis* einhergehen.

3.3.1 Entwicklungsstadien spezifische Module der *hdp1*-abhängig regulierten Gene

Die *hdp1*-Expression ist sowohl *a*- als auch *b*-abhängig. Bereits während der Pheromon Perzeption zweier kompatibler Sporidien lässt sich *hdp1*-Expression nachweisen. *rbf1* dagegen wird nur während eines relativ kurzen Zeitraums induziert. Bereits 3 Tage nach der Infektion kann keine *rbf1*-Expression mehr nachgewiesen werden. Je nach Entwicklungsstadium sind also Hdp1 und Rbf1 in der Zelle vorhanden oder nur Hdp1. *hdp1*- und *rbf1*-regulierte Gene lassen sich in vier Module aufteilen (Abbildung 3.4 A). In Modul a können die Gene entweder über *rbf1* oder über *hdp1* reguliert werden. Hdp1 scheint einen negativen Effekt auf die *rbf1*-induzierte Expression dieser Gene zu haben, das liegt allerdings vermutlich an der geringeren Expression von *rbf1* im Stamm CP27 Δ *hdp1*. Die Gene aus Modul a sind folglich nicht nur in der Transitionsphase von saprophytischem zu filamentösem Wachstum wichtig (*rbf1*-reguliert), sondern auch zu späteren Zeitpunkten in der Pflanze (*hdp1*-reguliert). Ähnlich verhält es sich mit den Genen aus Modul b. Diese werden zu denselben Zeitpunkten reguliert, allerdings wird *hdp1* auch schon in den frühen Phasen benötigt, *rbf1* alleine reicht nicht aus. Für die Regulation der Gene aus Modul c ist *rbf1* ausreichend, *hdp1* wird nicht benötigt. Es handelt sich um Gene, die während den initialen Phasen der Infektion eine Rolle spielen. Gene des Moduls d werden nur schwach exprimiert, *hdp1* ist dafür nötig. Interessanterweise werden einige Gene nur *hdp1*-abhängig reguliert, wenn *rbf1* nicht exprimiert wird (Abbildung 3.4, B). Die *rbf1*-Expression verhindert die

frühzeitige *hdp1*-abhängige Regulation dieser Gene (die *hdp1*-Expressions ist in CP27 und JB2 $P_{crg}:hdp1$ identisch; vgl. Abbildung 6.5; Anhang). Sie müssen erst zu späteren Zeitpunkten reguliert werden. Für diese Gene scheint es wichtig zu sein, dass sie während der Transitionsphase nicht dereguliert werden (Modul e und f). Hdp1-Bindung wird zum größten Teil bei den Genen aus Modul f beobachtet. Direkte Hdp1-Bindung scheint einen reprimierenden Effekt zu haben.

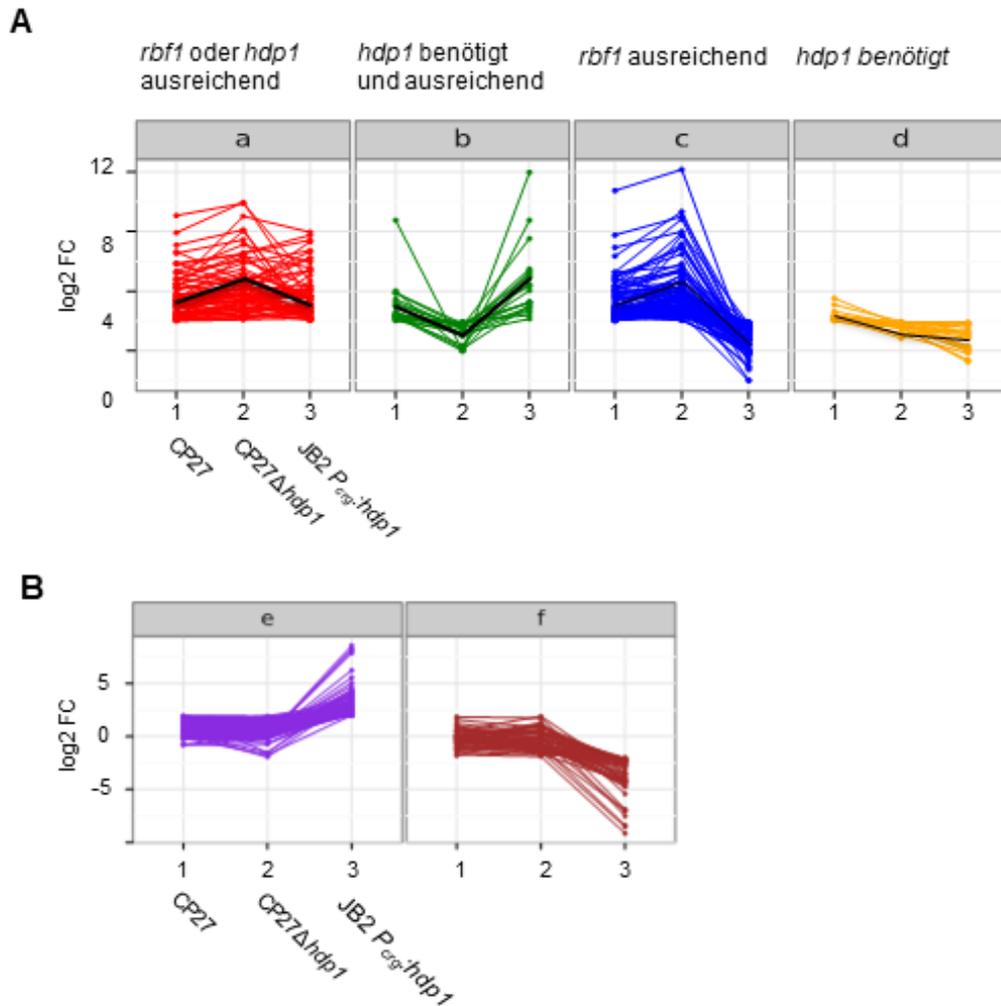


Abbildung 3.4: Module *hdp1*-abhängig regulierter Gene. Rbf1 wurde in den Stämmen CP27 (a2, $\Delta b::P_{crg1}:rbf1$) und CP27 $\Delta hdp1$ (a2, $\Delta b::P_{crg1}:rbf1$, $\Delta hdp1$) induziert. Der Stamm JB2 $P_{crg}:hdp1$ (a2, Δb , $ip[P_{crg1}:hdp1:3xHA]ip^s$) (UJU5) wurde für die direkt induzierte *hdp1*-Expression verwendet. JB2 (a2, Δb) diente für alle Stämme als Kontrolle. Mit signifikanten \log_2 fold change Werten (FDR < 0.01; CPM < 1) wurden mit Phyton *parallel coordinate plots* erstellt. Die Gene mit Identifikationsnummer sowie die genauen Werte der Expressionsveränderung sind in Tabelle 6.1.5 (A) und 6.1.6 (B) auf dem Datenträger gezeigt.

3.3.2 Hdp1 verbindet den *a*- und den *b*-Signalweg.

Hdp1 beeinflusst sowohl die *prf1*- als auch die *b*-Expression und reagiert sowohl auf Pheromon Signale als auch auf die Zellfusion. Die *hdp1*-Expression ist sowohl *a*- als auch *b*-abhängig, der *hdp1*-abhängige G2 Zellzyklusarrest lässt sich sowohl vor der Pheromon-abhängigen Zellfusion als auch danach während des filamentösen Wachstums durch das *b*-Heterodimer beobachten. Hdp1 verbindet so die *b*-Kaskade weiter mit dem über Prf1 gesteuerten Pheromon-Signalweg.

Die Pheromonkaskade und die *b*-Kaskade sind eng miteinander verknüpft. Ein aktives *b*-Heterodimer führt zu einer Reprimierung der *a*-Gene *mfa* und *pra* (Urban *et al.*, 1996). Zum Zeitpunkt der Pflanzenpenetration wird Clp1 stabilisiert und sorgt so für die Aufhebung des G2-Zellzyklusarrest und somit für die Proliferation innerhalb der Pflanze (Heimel *et al.*, 2010a). Clp1 reprimiert den *a*-Signalweg wodurch die *b*-Expression reprimiert wird und interagiert mit dem *b*-Heterodimer selbst, was zur Repression von *rbf1* und der *rbf1*-Zielgene führt (Abbildung 3,5).

Wird *hdp1* *a*-unabhängig direkt induziert, wird *b* stark exprimiert (Matteo Jurca). *b* kann somit mindestens über zwei getrennte Wege reguliert werden. Im *b*-Promotor befindet sich das Hdp1-Konsensusmotiv, und eine direkte Regulation ist wahrscheinlich. Die *hdp1*-Deletion beeinflusst die Pheromon-abhängige *b*-Induktion jedoch nicht. *hdp1* induziert ebenfalls *prf1*. Diese Rückkopplung verbindet die Signalwege miteinander und könnte für die beobachtete Aufrechterhaltung der *prf1*- und *b*-Expression in den späten Pflanzen-assoziierten Phasen verantwortlich sein.

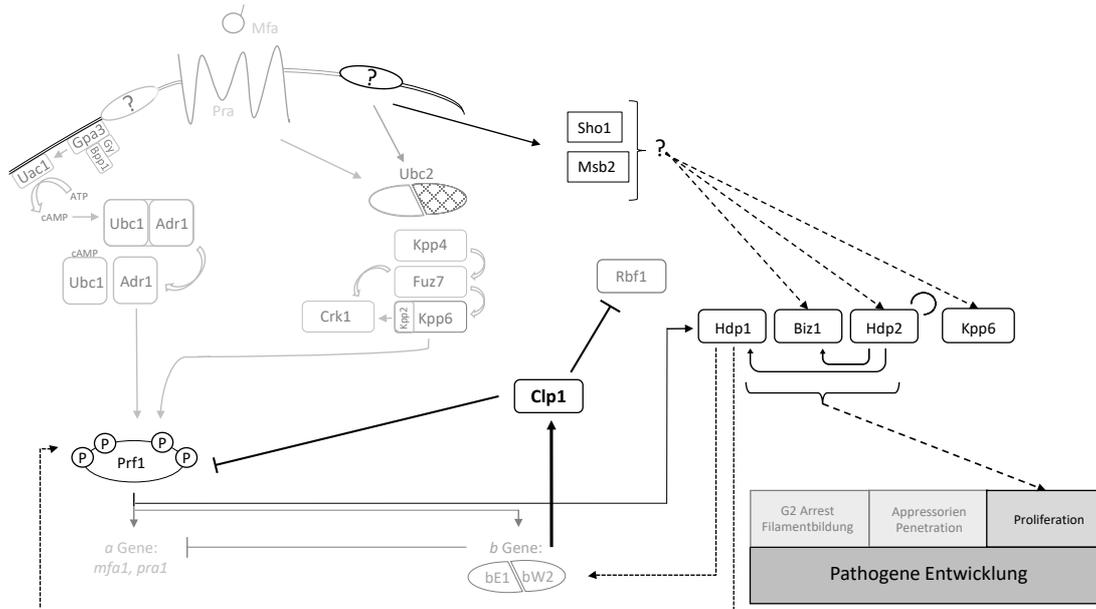


Abbildung 3.5: Schematische Darstellung der b-abhängigen Signalkaskade. Nach der Fusion zweier kompatibler Sporidien kann das bE/bW-Heterodimer gebildet werden. Als aktiver Transkriptionsfaktor bildet es so den zentralen Schalter der b-Kaskade. Die Gene *clp1* und *rbf1* werden direkt von b reguliert. Nach der Pflanzenpenetration wird Clp1 stabilisiert und sorgt so für die Aufhebung des G2-Zellzyklusarrests und somit für die Proliferation innerhalb der Pflanze. Clp1 reprimiert den a- und den b-Signalweg. Hdp1 hält vermutlich die *prf1* und b Expression aufrecht. Die Expression der *Rbf1*-Zielgene *hdp1*, *biz1* und *hdp2* wird ebenfalls aufrechterhalten. *hdp2* induziert sowohl *biz1* als auch *hdp1*. Außerdem bindet es in seinem eigenen Promotor was eine Autoregulation vermuten lässt. Die Pflanzensensoren Sho1 und Msb2 haben ebenfalls einen noch nicht genau verstandenen Einfluss auf die Expression der Gene *hdp2*, *biz1* und *kpp6*. Sie sichern die Appressorienbildung. (Modifiziert nach Brefort *et al.*, 2009).

Diese Rückkopplung von *hdp1* auf den a und b Signalweg, sowie die in (Pothiratana, 2008) beschriebene Funktion von *hdp1* im Zellzyklus lässt einen Einfluss auf die Pathogenität erwarten. Interessanterweise hat die *hdp1*-Deletion allerdings in Infektionsstudien keinen detektierbaren Einfluss auf die Pathogenität (Pothiratana, 2008). Der Phänotyp der *hdp1*-Deletion, dass nach der Fusion der Sporidien zum Heterokaryon vermehrt Hyphen mit mehr als 2 Kernen auftreten, lässt vermuten, dass *hdp1* eine Rolle bei der Synchronisation des Zellzyklus vor der Fusion spielt. Da sich Zellen in axenischer Kultur allerdings hauptsächlich in der G2-Phase befinden, ist die Synchronisation nur für einen kleinen Teil der Zellen relevant. In der natürlichen Situation, dem Treffen von zwei isolierten Sporidien auf der Pflanzenoberfläche, kann die Synchronisation durchaus relevant sein; unter Laborbedingungen, wo

Infektionen mit einem hohen Inokulum durchgeführt werden, kann eine Reduktion um wenige Prozent nicht detektiert werden.

Zusätzlich spielt *hdp1* vermutlich ebenfalls unabhängig von *a* oder *b* eine Rolle bei der Feinabstimmung des Zellzyklus bedingt durch Umweltfaktoren und Ernährungsstress (Pothiratana, 2008). Infektionsstudien mit geringen Zellzahlen und unter Mangelernährung angezogene Kulturen könnten Hdp1 für eine erfolgreiche Pflanzeninfektion benötigen. Auch in *Schizosaccharomyces pombe* wird Paarung durch Mangelbedingungen induziert (Mochizuki und Yamamoto, 1992). In *Ustilago maydis* führt die Deletion der G-Protein- α -Untereinheit *gpa3* zur Deregulation von Genen mit Funktionen in Bezug auf Metabolismus, Nährstofftransport und Morphologie. Dies steht im Einklang mit der Rolle von Gpa3 bei der Regulierung des cAMP-Signalwegs. Die Signalübertragung durch Gpa3 spiegelt den Nährstoffstatus der Zelle wieder und ist an der Glukoserepression von Genen beteiligt (Greilinger, 2007). Gpa3 wirkt epistatisch zu Adr1 auf Prf1 (vgl. Abbildung 3.5 (oben)) und so vermutlich auch indirekt auf die *hdp1*-Expression.

Für die *rbf1*-Expression lässt sich ebenfalls ein Effekt durch Mangelbedingungen beobachten. Die Rbf1-Expression ist in Minimal-Medium drastisch erhöht. Interessanterweise ist die Expression von *clp1*, ein weiteres direktes *b*-Zielgen, nicht so drastisch beeinflusst (Abbildung 6.11 A; Anhang). Dieser Effekt lässt sich nicht nur bei der induzierten *rbf1*-Expression, sondern auch für die Basalexpression beobachten (Abbildung 6.11 B; Anhang). Da Rbf1 der zentrale Regulator der Etablierung der Pathogenität ist, könnte so die pathogene Entwicklung bei Mangelbedingungen forciert werden. Die bisherigen limitierten Daten lassen Spekulieren, dass dieser Effekt durch gezielte, nährstoffabhängige Veränderung der Chromatinstruktur im *rbf1*-Promotor zu erklären ist. Ähnliches ist in Hefe beschrieben. Die beiden chromatinmodifizierenden Proteine Isw1p und Isw2p steuern Entwicklungsreaktionen auf Nährstoffmangel durch nährstoffabhängige Modellierung der Chromatinstruktur in Promotoren (Kent *et al.*, 2001).

3.3.3 Biz1 und Hdp2 übernehmen die zentrale Funktion von Rbf1

Sowohl *biz1* als auch *hdp2* können in axenischer Kultur über *rbf1* induziert werden (Heimel *et al.*, 2010b; RNA-Seq diese Arbeit). Betrachtet man jedoch transkriptionelle Veränderungen von *Ustilago maydis* während den Pflanzen assoziierten Phasen kann ca. drei Tage nach Infektion kein *rbf1* Transkript mehr identifiziert werden. *biz1* und *hdp2* werden in diesen Phasen allerdings deutlich höher exprimiert. Die Expression von *biz1* und *hdp2* wird während dieser Phase durch noch nicht genau verstandene Mechanismen *rbf1*-unabhängig gesteuert. *biz1* kann zu einem gewissen Maß über *hdp2* Überexpression induziert werden, der *hdp2*-Promotor weist Hdp2-Bindung in axenischer Kultur auf, was auf eine Autoregulation hinweisen könnte. Außerdem wird die *biz1*- und *hdp2*-Expression von Sho1 und Msb2 beeinflusst (Lanver *et al.*, 2014).

Ein Teil der Rbf1-gebundenen Promotoren kann ebenfalls von Biz1 und/oder Hdp2 gebunden werden. Dies lässt spekulieren, dass die beiden für die Pflanzeninfektion essentiellen Transkriptionsfaktoren Biz1 und Hdp2 in späteren Phasen der Infektion die zentrale Funktion von Rbf1 übernehmen.

3.3.4 Die *b*-abhängige Regulationskaskade ist modulär aufgebaut

Ustilago maydis verwendet unterschiedliche, z.T. kombinatorisch wirkende Regulatoren, um die verschiedenen Signale vor und nach der Infektion der Pflanze zu integrieren und/oder zu differenzieren. Dieses regulatorische Netzwerk ist hierarchisch aufgebaut und führt zu Wellen von stadienspezifisch exprimierten Genen (Abbildung 3.6 A). Grundsätzlich lassen sich drei Ebenen darstellen (die Gengruppen sind durch Großbuchstaben gekennzeichnet). Blau sind Gene die während der Paarung und zu Beginn des filamentösen Wachstums reguliert werden. Lila sind Gene der frühen, initialen Phasen der pathogenen Entwicklung (Deckung mit *rbf1*-Expression) auf und in der Pflanze und Türkis Gene der späteren Phasen.

Interessanterweise werden die Hauptregulatoren in Wellen exprimiert. Sowohl *rbf1* als auch *biz1* und *hdp2* werden jeweils bereits vor der Phase ihrer Hauptaktivität exprimiert, anschließend aber durch Integration weiterer Faktoren darüber hinaus zusätzlich induziert. *rbf1* wird bereits vor der Fusion über *a* induziert. Zu diesem Zeitpunkt kann allerdings kaum Protein in einem Westernblot nachgewiesen werden. Erst nach der Fusion wird *rbf1* stärker durch das nun funktionelle *b*-Heterodimer induziert. *biz1* und *hdp2* können über *rbf1* alleine induziert werden. Erst durch zusätzliche Pflanzensignale wird die Induktion jedoch deutlich verstärkt. Eine Funktion für die jeweilige schwache, vorgeschaltete Induktion dieser drei Transkriptionsfaktoren konnte bisher nicht festgestellt werden.

Das regulatorische Netzwerk aus Abbildung 3.6 A lässt sich in sogenannte Netzwerk motive aufgliedern (zusammengefasst in Alon, 2007). Neben negativer Rückkopplung (*clp1* und *b*, orange), positiver Rückkopplung (*b* → *rbf1* → *hdp1* → *b*, grün), Autoregulation (*hdp2*) und sogenannter *dense overlapping regulons* (*biz1*-, *hdp2*- und *rbf1*-Zielgene aus der untersten Ebene in Abbildung 3.6 A), können zahlreiche *feed forward loops* (FFL) identifiziert werden. Insgesamt können FFL in acht Typen aufgeteilt werden. Interessanterweise handelt es sich bei den beobachteten FFL immer um den Typ 1, *coherent*. Sie sind jeweils einzeln in Abbildung 3.6 B dargestellt.

Die Netzwerk motive der Hauptregulatoren *b*, *Rbf1*, *Hdp1*, *Biz1* und *Hdp2* sind besonders spannend. Sie weisen FFL Strukturen untereinander auf und

regulieren gemeinsam Gengruppen über *AND* und *OR gate functions* (Abbildung 3.7). b, Rbf1 und Hdp1 können dabei kombinatorisch binden. Es können wie oben diskutiert kooperative und kollaborative Bindemechanismen beobachtet werden. Rbf1, Biz1, und Hdp2 verwenden verschiedene Integrationspunkte am Promotor, sie interagieren nicht miteinander, können unabhängig voneinander binden und trennen so vermutlich verschiedene Inputsignale.

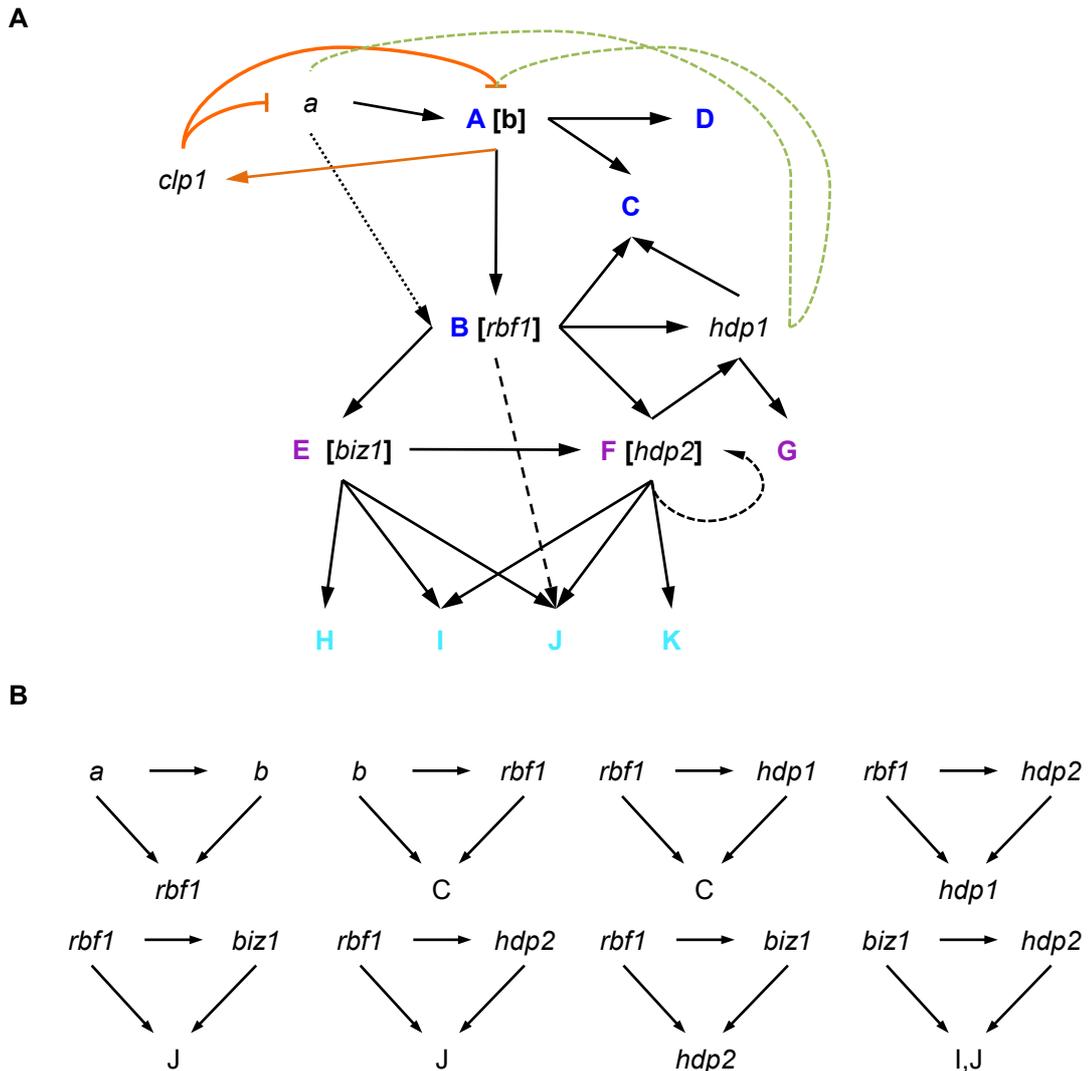


Abbildung 3.6: Schematische Darstellung des transkriptionellen Netzwerks für die pathogene Entwicklung von *Ustilago maydis*. (A) Gruppen von Genen (Großbuchstaben) lassen sich in drei Entwicklungsstadien-spezifische Ebenen einteilen (blau, lila, türkis). In Klammern dahinter stehen wichtige Transkriptionsfaktoren in dieser Gengruppe. Linien zeigen einen regulatorischen Effekt, für gestrichelte Linien ist die Regulation gezeigt, jedoch nicht vollständig aufgeklärt. Negative Rückkopplung ist orange, positive Rückkopplung grün eingezeichnet. (B) Innerhalb des transkriptionellen Netzwerks Lassen sich viele FFL-Motive (*feed forward loop*) identifizieren. Diese sind einzeln schematisch dargestellt.

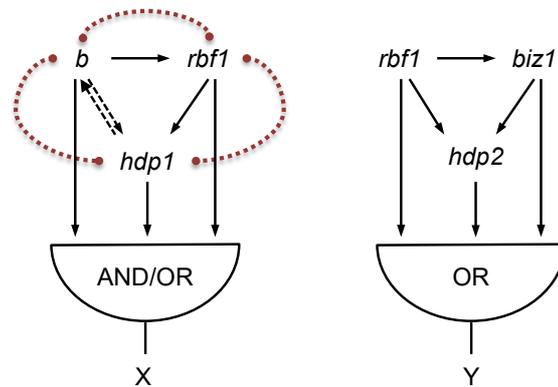


Abbildung 3.7: Schematische Darstellung der Regulationsnetzwerke der Hauptregulatoren b, Rbf1, Hdp1, Biz1 und Hdp2. b, Rbf1 und Hdp1 sowie Rbf1, Biz1 und Hdp2 weisen FFL-Motive (*feed forward loop*) auf und regulieren Gene über *AND* und *OR gate functions*. b, Rbf1 und Hdp1 bilden Komplexe, z.T. werden Zielgene durch kooperative oder kollaborative Bindung an Promotoren reguliert. Rbf1, Biz1 und Hdp2 verwenden klar getrennte Bindestellen in den Promotoren.

Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit durch integrative Analysen von RNA-Seq und ChIP-Seq Experimenten mit verschiedenen Kombinationen der Transkriptionsfaktoren Rbf1, bE/bW, Hdp1, Biz1 und Hdp2 das hierarchisch aufgebaute transkriptionelle Netzwerk, durch das die Transition von saprophytischem zu biotrophem Wachstum in *Ustilago maydis* kontrolliert wird, genauer beschrieben werden. Für weiterführende Experimente, bei denen die „gene centered“ Analyse von DNA-bindenden Proteinen im Vordergrund steht, wurde die Basis für ein CrisprCas basiertes System zur Anreicherung von Proteinen an Promotoren geschaffen; damit wird es möglich sein, weitere Knotenpunkte des Netzwerks zu identifizieren, mit dem Ziel, die Integration von essentiellen pflanzenspezifischen Signalen zu verstehen.

4. Material und Methoden

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

4.1 Material und Bezugsquellen

4.1.1 Chemikalien, Puffer, Lösungen; Enzyme, Kits und Medien

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 Einzelheiten siehe (Brachmann *et al.*, 2001)

Puffer und Lösungen

Standard-Puffer und Lösungen wurden nach (Ausubel *et al.*, 1987), (Sambrook *et al.*, 1989) und (Sambrook und Russell, 2001) hergestellt. Spezielle Puffer und Lösungen sind unter den jeweiligen Methoden aufgeführt.

Verwendete Kits

In dieser Arbeit wurden die Kits JETSORB (Genomed) zur Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen, TOPO TA Cloning Kit Dual Promotor (Invitrogen) zur Klonierung von DNA-Fragmenten, QiaQuick PCR Purification Kit (Qiagen) sowie RotiPrep Plasmid Mini (Carl Roth) für die Aufreinigung von Plasmiden und PCR Reaktionen, Qbit® dsDNA HS Assay Kit (Thermo Scientific) zur Messung von DNA Konzentrationen, BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific; Pierce) und Qbit® Protein Assay Kit (Thermo Scientific) zur Messung von Protein-Konzentrationen, Turbo DNase (Ambion) zur Entfernung von DNA aus Gesamt-RNA-Präparationen, ProtoScript AMV First Strand cDNA Synthesis Kit (NEB), SuperScript III First-Strand Synthesis System (Invitrogen) oder RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas) für die reverse Transkription von mRNA, und das MesaGreen qPCR MasterMix for SYBR Assay Kit (Eurogentech) für qRT-PCR Analysen verwendet. Kits für die RNA-Seq und CHIP-Seq sind in der jeweiligen Methodenbeschreibung angegeben.

Enzyme, Proteine und Antikörper

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

Tabelle 4.1: weitere verwendete Enzyme und Proteine und Beads

Name	Bezugsquelle
Albumin (aus Rinderserum)	Sigma, New England Biolabs
Antarctic Phosphatase	New England Biolabs
Anti-Digoxigenin, konjugiert mit alkaliner Phosphatase	Roche
Benzonase	Sigma-Aldrich
HA-Peptid	Sigma-Aldrich
Phusion DNA-Polymerase	New England Biolabs
Q5 DNA-Polymerase	New England Biolabs
Proteinase K	New England Biolabs
RNAse A	Sigma-Aldrich
T4 DNA-Ligase	New England Biolabs

Medien**Medien für die Kultivierung von *E. coli***(Sambrook *et al.*, 1989)

Für Selektionsmedien wurden nach dem Autoklavieren 100 µg/mL Ampicillin, 40 µg/mL Kanamycin oder 25 µg/mL Chloramphenicol zugegeben. Zur optischen Selektion wurden die Platten im Fall von Klonierungen mit dem TOPO-Kit mit 80 µl X-Gal Lösung (20mg/ml) beschichtet.

YT-Festmedium

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

dYT-Flüssigmedium

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

Medien für die Kultivierung von *Ustilago maydis*

Für Selektionsmedien wurden nach dem Autoklavieren 2 µg/mL Carboxin, 25 µg/ml Nurseothricin, 1000 µg/mL Geneticin, oder 200 µg/mL Hygromycin zugegeben. Für Festmedien wurde, wenn nicht anders angegeben, vor dem Autoklavieren 2 % (w/v) Agar bzw. für Wachstumstest 2 % (w/v) Noble Agar (Affymetrix) zugegeben.

YEPS Vollmedium (Tsukuda *et al.*, 1988)

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

CM-Komplexmedium (Holliday, 1974)

1.5 g NH₄NO
2.5 g Caseinhydrolysat
0.5 g DNA
1 g Yeast Extract
10 mL Vitamin-Lösung (s.u.)
62.5 mL Salz-Lösung (s.u.)
0.5 mL Spurenelement-Lösung
mit H₂O bid. auf 980 mL aufgefüllt und mit NaOH auf pH 7.0 eingestellt; nach dem Autoklavieren 20 mL 50% (w/v) Glukose zugefügt.

Glutamin-Minimalmedium

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

Nitrat-Minimalmedium

62,5 mL Salz-Lösung (s.u.)
0,3 % (w/v) KNO
mit H₂O bid. auf 980 mL aufgefüllt, pH Wert auf 7,0 mit NaOH eingestellt und sterilfiltriert.
Nach dem Sterilfiltrieren:
20 mL 50 % (w/v) Glukose-Lösung (f.c.1%) bzw. jeweils angegebenen Zucker hinzugefügt.

NSY-Glycerinmedium (Einfriermedium)

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

Salzlösung (Holliday, 1974)

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

Spurenelement-Lösung (Holliday, 1974)
 60 mg H₃BO₃
 191 mg MnCl₂
 400 mg ZnCl₂
 47 mg NaMoO₄ x 2 H₂O
 140 mg FeCl₃ x 6 H₂O
 557 mg CuSO₄ x 5 H₂O
 Mit H₂O bid. auf 1 L aufgefüllt und
 sterilfiltriert.

Vitamin-Lösung (Holliday, 1974)
 100 mg Thiamin
 20 mg Calciumpanthothenat
 50 mg p-Aminobenzoessäure
 20 mg Nikotinsäure
 20 mg Cholinchlorid
 40 mg myo-Inositol
 50 mg Folsäure
 Mit H₂O bid. auf 1 L aufgefüllt und
 sterilfiltriert

4.1.2 Stämme

E. coli- Stämme

Für die Propagierung von ccdB-Gen tragenden Plasmiden wurde der Stamm DB3.1™ (Invitrogen) verwendet, es handelt sich um folgenden Genotyp: F- gyrA462 endA1 Δ(sr1-recA) mcrB mrr hsdS20(rB-, mB-) supE44 ara-14 galK2 lacY1 proA2 rpsL20(SmR) xyl-5 λ- leu mtl. Zur Expression von rekombinanten Proteinen wurde der Stamm BL21 mit folgendem Genotyp: F- ompT gal dcm lon hsdSB(rB- mB-) λ(DE3) pLysS(cmR). (Novagen)

Sowie der Stamm Rosetta™ (Novagen): F- ompT hsdSB(rB- mB-) gal dcm λ(DE3 [lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5]) pLysSRARE (CmR) verwendet.

Für alle übrigen Klonierungen wurde der Stamm TOP10 (Invitrogen) verwendet, bei dem es sich um ein Derivat des *E. coli*-Stamms DH10B mit folgenden genetischen Markern handelt: F- mcrA Δ(mrrhsdRMS-mcrBC) f80lacZΔM15 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).

Ustilago maydis- Stämme

Tabelle 4.2: Verwendete Stämme

Stamm	Genotyp	Selektions- marker	Referenz
AB31	a2, Δb::P _{crg1} :bE1, P _{crg1} :bW2	Phleo ^R	(Brachmann <i>et al.</i> , 2001)
AB32	a2, Δb::P _{crg1} :bE2, P _{crg1} :bW2	Phleo ^R	(Brachmann <i>et al.</i> , 2001)
CP27	a2, Δb::P _{crg1} :rbf1	Hyg ^R	(Heimel <i>et al.</i> , 2010b)
FB1	a1, b1	-	(Banuett und Herskowitz, 1989)
FB2	a2, b2	-	(Banuett und Herskowitz, 1989)
JB2	a2, Δb	Hyg ^R	(Wahl <i>et al.</i> , 2010)
UMJ42	a2, Δb::P _{crg1} :rbf1:3xHA	Hyg ^R	Matteo Jurca

MS25	a2, Δb::P _{crG1} :bE1, P _{crG1} :bW2, Δrbf1	Phleo ^R , Hyg ^R	(Heimel <i>et al.</i> , 2010b)
SG200	a1:mfa2 bW2, bE1	Phleo ^R	(Kämper <i>et al.</i> , 2006)
UDS1	a2, Δb::P _{crG1} :bE1:3xHA, P _{crG1} :bW2	Phleo ^R , Hyg ^R	(Schuler, 2010)
UDS2	a2, Δb::P _{crG1} :bE1:3xMyc, P _{crG1} :bW2	Phleo ^R , Hyg ^R	(Schuler, 2010)
UDS4	a2, Δb::P _{crG1} :bE1:3xMyc, P _{crG1} :1bW2	Phleo ^R , Hyg ^R	(Schuler, 2010)
UDS5	a2, Δb::P _{crG1} :bE1, P _{crG1} :bW2, rbf1:3xHA	Phleo ^R , Hyg ^R	(Schuler, 2010)
UDS6	a2, Δb::P _{crG1} :bE1, P _{crG1} :bW2, rbf1:3xMyc	Phleo ^R , Hyg ^R	(Schuler, 2010)
UJF17	a2 Δb::P _{crG1} :rbf1 ip ^r [P _{dik6_816} Δ3:gfp]ip ^s	Hyg ^R , Cbx ^R	Julia Fortenbacher
UJF20	a2 Δb::P _{crG1} :rbf1 ip ^r [P _{dik6_816} Δ4:gfp]ip ^s	Hyg ^R , Cbx ^R	Julia Fortenbacher
UJF3	a2 Δb::P _{crG1} :rbf1 ip ^r [P _{dik6_816} Δ5:gfp]ip ^s	Hyg ^R , Cbx ^R	Julia Fortenbacher
UJF43	a2, Δb::P _{crG1} :bE1, P _{crG1} :bW2, P _{rbf1} :gfp	Phleo ^R , Hyg ^R	Julia Fortenbacher
CP34	a2 Δb::P _{crG1} :rbf1 ip ^r [P _{dik6_2448} :gfp]ip ^s	Hyg ^R , Cbx ^R	(Heimel <i>et al.</i> , 2010b)
CP38	a2 Δb::P _{crG1} :rbf1 ip ^r [P _{dik6_1386} :gfp]ip ^s	Hyg ^R , Cbx ^R	(Heimel <i>et al.</i> , 2010b)
CP40	a2 Δb::P _{crG1} :rbf1 ip ^r [P _{dik6_816} :gfp]ip ^s	Hyg ^R , Cbx ^R	(Heimel <i>et al.</i> , 2010b)
CP46	a2 Δb::P _{crG1} :rbf1 ip ^r [P _{dik6_638} :gfp]ip ^s	Hyg ^R , Cbx ^R	(Heimel <i>et al.</i> , 2010b)
CP47	a2 Δb::P _{crG1} :rbf1 ip ^r [P _{dik6_298} :gfp]ip ^s	Hyg ^R , Cbx ^R	(Heimel <i>et al.</i> , 2010b)
UMA11	a2 Δb::P _{crG1} :rbf1 ip ^r [P _{dik6_816_Mut1_Mut3} :gfp]ip ^s	Hyg ^R , Cbx ^R	Antonia Mangold
UKH205	a2 Δb::P _{crG1} :rbf1 ip ^r [P _{dik6_2448} Δ3:gfp]ip ^s	Hyg ^R , Cbx ^R	(Heimel <i>et al.</i> , 2010b)
UKH207	a2 Δb::P _{crG1} :rbf1 ip ^r [P _{dik6_2448} Δ4:gfp]ip ^s	Hyg ^R , Cbx ^R	(Heimel <i>et al.</i> , 2010b)
UKH209	a2 Δb::P _{crG1} :rbf1 ip ^r [P _{dik6_2448} Δ5:gfp]ip ^s	Hyg ^R , Cbx ^R	(Heimel <i>et al.</i> , 2010b)
UKH211	a2 Δb::P _{crG1} :rbf1 ip ^r [P _{dik6_2448} Δ6:gfp]ip ^s	Hyg ^R , Cbx ^R	(Heimel <i>et al.</i> , 2010b)

a, b - Paarungstyp-Loci, E1, W2 - Gene des *b*-Paarungstyp-Locus, Δ - Deletion; P – Promotor, P_{crG1} – konditionaler Arabinose-induzierbarer Promotor (Bottin *et al.*, 1996), :: - homologer Austausch, : - Fusion, Phleo^R– Phleomycin-Resistenz, Cbx^R – Carboxin Resistenz, Hyg^R – Hygromycin-Resistenz, Nat^R - Nourseothricin-Resistenz, (ip^r[...]ip^s)– ektopisch im *ip*-Locus integriert, **n* – mehrfache Integration.

Tabelle 4.3: Während dieser Arbeit erstellte Stämme

Stamm	Ausgangs-stamm	Genotyp	Selektions- marker
UJU1	UDS1	a2, P _{crG1} :bE1:3xHA, P _{crG1} :bW2, Δrbf1	Phleo ^R , Hyg ^R , Nat ^R
UJU2	JB2	a2, Δb, ip ^r [P _{crG1} :hdp2:3xHA]ip ^s	Hyg ^R , Cbx ^R
UJU3	FB2	a2, b2, rbf1:3xHA	Hyg ^R
UJU4	JB2	a2, Δb, ip ^r [P _{crG1} :biz1:3xHA]ip ^s	Hyg ^R , Cbx ^R
UJU5	JB2	a2, Δb, ip ^r [P _{crG1} :hdp1:3xHA]ip ^s	Hyg ^R , Cbx ^R
UJU6	CP27	a2, Δb::P _{crG1} :rbf1, ip ^r [P _{dik6_816_Muti} :gfp]ip ^s	Hyg ^R , Cbx ^R
UJU7	CP27	a2, Δb::P _{crG1} :rbf1, ip ^r [P _{dik6_816_Muti} :gfp]ip ^s	Hyg ^R , Cbx ^R
UJU8	CP27	a2, Δb::P _{crG1} :rbf1, ip ^r [P _{dik6_816_Δ} :gfp]ip ^s	Hyg ^R , Cbx ^R
UJU9	UDS6	a2, Δb::P _{crG1} :bE1, P _{crG1} :bW2, rbf1:3xMyc, pJU31	Phleo ^R , Hyg ^R , Cbx ^R
UJU10	UDS6	a2, Δb::P _{crG1} :bE1, P _{crG1} :bW2, rbf1:3xMyc, pJU32	Phleo ^R , Hyg ^R , Cbx ^R
UJU11	UDS6	a2, Δb::P _{crG1} :bE1, P _{crG1} :bW2, rbf1:3xMyc, pJU33	Phleo ^R , Hyg ^R , Cbx ^R
UJU12	UDS6	a2, Δb::P _{crG1} :bE1, P _{crG1} :bW2, rbf1:3xMyc, pJU30	Phleo ^R , Hyg ^R , Cbx ^R
UJU13	UDS6	a2, Δb::P _{crG1} :bE1, P _{crG1} :bW2, rbf1:3xMyc, pNEBUC	Phleo ^R , Hyg ^R , Cbx ^R
UJU14	AB31	a2, Δb::P _{crG1} :bE1, P _{crG1} :bW2, pJU33	Phleo ^R , Cbx ^R
UJU15	AB32	a2, Δb::P _{crG1} :bE2, P _{crG1} :bW2, pJU33	Phleo ^R , Cbx ^R
UJU16	AB31	a2, Δb::P _{crG1} :bE1, P _{crG1} :bW2, ip ^r [P _{rbf1_WT} :gfp]ip ^s	Phleo ^R , Cbx ^R
UJU17	AB31	a2, Δb::P _{crG1} :bE1, P _{crG1} :bW2, ip ^r [P _{rbf1_ΔΔ} :gfp]ip ^s	Phleo ^R , Cbx ^R
UJU18	MS25	a2, Δb::P _{crG1} :bE1, P _{crG1} :bW2, Δrbf1, ip ^r [P _{rbf1_Δ1} :gfp]ip ^s	Phleo ^R , Hyg ^R , Cbx ^R
UJU19	MS25	a2, Δb::P _{crG1} :bE1, P _{crG1} :bW2, Δrbf1, ip ^r [P _{rbf1_Δ2} :gfp]ip ^s	Phleo ^R , Hyg ^R , Cbx ^R
UJU20	AB31	a2, Δb::P _{crG1} :bE1, P _{crG1} :bW2, ip ^r [P _{rbf1_Δ1} :gfp]ip ^s	Phleo ^R , Cbx ^R
UJU21	AB31	a2, Δb::P _{crG1} :bE1, P _{crG1} :bW2, ip ^r [P _{rbf1_Δ2} :gfp]ip ^s	Phleo ^R , Cbx ^R
UJU22	FB1	a1, b1, pJNEBUC	Cbx ^R
UJU23	FB1	a1, b1, pJU30	Cbx ^R
UJU24	FB1	a1, b1, pJU38	Cbx ^R
UJU25	FB1	a1, b1, pJU39	Cbx ^R
UJU26	FB1	a1, b1, pJU40	Cbx ^R
UJU28	UDS4	a2, Δb::P _{crG1} :bE1:3xMyc, P _{crG1} :bW2, pNEBUC	Phleo ^R , Hyg ^R , Cbx ^R

UJU29	UDS4	a2, Δb::P _{crG1} :bE2:3xMyc, P _{crG1} :bW2, pJU30	Phleo ^R , Hyg ^R , Cbx ^R
UJU30	UDS4	a2, Δb::P _{crG1} :bE2:3xMyc, P _{crG1} :bW2, pJU50	Phleo ^R , Hyg ^R , Cbx ^R
UJU31	UDS4	a2, Δb::P _{crG1} :bE2:3xMyc, P _{crG1} :bW2, pJU51	Phleo ^R , Hyg ^R , Cbx ^R
UJU32	UDS4	a2, Δb::P _{crG1} :bE2:3xMyc, P _{crG1} :bW2, pJU52	Phleo ^R , Hyg ^R , Cbx ^R
UJU33	UDS2	a2, Δb::P _{crG1} :bE1:3xMyc, P _{crG1} :bW2, pNEBUC	Phleo ^R , Hyg ^R , Cbx ^R
UJU34	UDS2	a2, Δb::P _{crG1} :bE1:3xMyc, P _{crG1} :bW2, pJU30	Phleo ^R , Hyg ^R , Cbx ^R
UJU35	UDS2	a2, Δb::P _{crG1} :bE1:3xMyc, P _{crG1} :bW2, pJU50	Phleo ^R , Hyg ^R , Cbx ^R
UJU36	UDS2	a2, Δb::P _{crG1} :bE1:3xMyc, P _{crG1} :bW2, pJU51	Phleo ^R , Hyg ^R , Cbx ^R
UJU37	UDS2	a2, Δb::P _{crG1} :bE1:3xMyc, P _{crG1} :bW2, pJU52	Phleo ^R , Hyg ^R , Cbx ^R
UJU41	AB31	a2, Δb::P _{crG1} :bE1, P _{crG1} :bW2, Δum11055	Phleo ^R , Gen ^R
UJU42	SG200	a1:mfa2 bW2, bE1, Δum11055	Phleo ^R , Gen ^R
UJU43	AB31	a2, Δb::P _{crG1} :bE1, P _{crG1} :bW2, Δum01042	Phleo ^R , Gen ^R
UJU44	SG200	a1:mfa2 bW2, bE1, Δum01042	Phleo ^R , Gen ^R
UJU45	AB31	a2, Δb::P _{crG1} :bE1, P _{crG1} :bW2, Δum04806	Phleo ^R , Gen ^R
UJU46	SG200	a1:mfa2 bW2, bE1, Δum04806	Phleo ^R , Gen ^R
UJU47	AB31	a2, Δb::P _{crG1} :bE1, P _{crG1} :bW2, Δum02857	Phleo ^R , Gen ^R
UJU48	SG200	a1:mfa2 bW2, bE1, Δum02857	Phleo ^R , Gen ^R
UJU49	AB31	a2, Δb::P _{crG1} :bE1, P _{crG1} :bW2, Δum02209	Phleo ^R , Gen ^R
UJU50	SG200	a1:mfa2 bW2, bE1, Δum02209	Phleo ^R , Gen ^R
UJU51	UDS6	a2, Δb::P _{crG1} :bE1, P _{crG1} :bW2, rbf1:3xMyc, pJU31	Phleo ^R , Hyg ^R , Cbx ^R
UJU52	AB31	a2, Δb::P _{crG1} :bE1, P _{crG1} :bW2, pJU31	Phleo ^R , Cbx ^R
UJU53	AB32	a2, Δb::P _{crG1} :bE2, P _{crG1} :bW2, pJU31	Phleo ^R , Cbx ^R
UJU54	AB31	a2, Δb::P _{crG1} :bE1, P _{crG1} :bW2, Δum05610	Phleo ^R , Gen ^R
UJU55	SG200	a1:mfa2 bW2, bE1, Δum05610	Phleo ^R , Gen ^R
UJU56	AB31	a2, Δb::P _{crG1} :bE1, P _{crG1} :bW2, Δum15078	Phleo ^R , Gen ^R
UJU57	SG200	a1:mfa2 bW2, bE1, Δum15078	Phleo ^R , Gen ^R
UJU58	AB31	a2, Δb::P _{crG1} :bE1, P _{crG1} :bW2, Δum05401	Phleo ^R , Gen ^R
UJU59	SG200	a1:mfa2 bW2, bE1, Δum05401	Phleo ^R , Gen ^R
UJU61	UDS1	a2, Δb::P _{crG1} :bE1:3xHA, P _{crG1} :bW2, hdp1:gfp	Phleo ^R , Gen ^R , Hyg ^R
UJU62	UDS5	a2, Δb::P _{crG1} :bE1, P _{crG1} :bW2, rbf1:3xHA, hdp1:gfp	Phleo ^R , Gen ^R , Hyg ^R
UJU63	UDS6	a2, Δb::P _{crG1} :bE1, P _{crG1} :bW2, rbf:3xMyc	Phleo ^R , Hyg ^R

UJU64	AB31	a2, Δb::P _{crG1} :bE1, P _{crG1} :bW2, Δum10578	Phleo ^R , Gen ^R
UJU65	AB31	a2, Δb::P _{crG1} :bE1, P _{crG1} :bW2, hdp1:3xHA	Phleo ^R , Gen ^R
UJU66	CP27	a2, Δb::P _{crG1} :rbf1, hdp1:3xHA	Gen ^R , Hyg ^R
UJU67.1	UDS6	a2, Δb::P _{crG1} :bE1, P _{crG1} :bW2, rbf1:3xMyc, leu2:: P _{dik6_816} :gfp ^{*21}	Phleo ^R , Gen ^R , Hyg ^R
UJU67.3	UDS6	a2, Δb::P _{crG1} :bE1, P _{crG1} :bW2, rbf1:3xMyc, leu2:: P _{dik6_816} :gfp ^s	Phleo ^R , Gen ^R , Hyg ^R
UJU67.7	UDS6	a2, Δb::P _{crG1} :bE1, P _{crG1} :bW2, rbf1:3xMyc, leu2:: P _{dik6_816} :gfp ^{*24}	Phleo ^R , Gen ^R , Hyg ^R
UJU68.3	UDS2	a2, Δb::P _{crG1} :bE1:3xMyc, P _{crG1} :bW2, leu2:: P _{um11413} :gfp ^{*n}	Phleo ^R , Gen ^R , Hyg ^R
UJU68.4	UDS2	a2, Δb::P _{crG1} :bE1:3xMyc, P _{crG1} :bW2, leu2:: P _{um11413} :gfp ^s	Phleo ^R , Gen ^R , Hyg ^R
UJU69	SG200	a1:mfa2 bW2, hdp1:3xHA	Phleo ^R , Gen ^R
UJU70	SG200	a1:mfa2 bW2, hdp1:gfp	Phleo ^R , Gen ^R
UJU71.2	AB31	a2, Δb::P _{crG1} :bE1, P _{crG1} :bW2, ip'[P _{crG1} :clp1:3xHA(pJF12)]ip ^{s*n}	Phleo ^R , Cbx ^R
UJU71.7	AB31	a2, Δb::P _{crG1} :bE1, P _{crG1} :bW2, ip'[P _{crG1} :clp1:3xHA(pJF12)]ip ^s	Phleo ^R , Cbx ^R
UJU72	AB31	a2, Δb::P _{crG1} :bE1, P _{crG1} :bW2, hdp1:gfp	Phleo ^R , Gen ^R
UJU73.3	JB2	a2, Δb, ip'[P _{crG1} :hdp1:gfp]ip ^s	Hyg ^R , Cbx ^R
UJU73.4	JB2	a2, Δb, ip'[P _{crG1} :hdp1:gfp]ip ^{*n}	Hyg ^R , Cbx ^R
UJU74.3	UDS1.8	a2, Δb::P _{crG1} :bE1:3xHA, P _{crG1} :bW2, Δrbf1, ip'[P _{crG1} :hdp1:gfp]ip ^s	Hyg ^R , Nat ^R , Cbx ^R
UJU74.4	UDS1.8	a2, Δb::P _{crG1} :bE1:3xHA, P _{crG1} :bW2, Δrbf1, ip'[P _{crG1} :hdp1:gfp]ip ^{s*n}	Hyg ^R , Nat ^R , Cbx ^R
UJU75	CP27	FB2 Δb::P _{crG1} :rbf1, ip'[P _{crG1} :hdp1:gfp]ip ^s	Hyg ^R , Cbx ^R
UJU76.9	MS25	a2, Δb::P _{crG1} :bE1, P _{crG1} :bW2, Δrbf1, ip'[P _{crG1} :hdp1:gfp]ip ^s	Phleo ^R , Hyg ^R , Cbx ^R
UJU76.7	MS25	a2, Δb::P _{crG1} :bE1, P _{crG1} :bW2, Δrbf1, ip'[P _{crG1} :hdp1:gfp]ip ^{s*n}	Phleo ^R , Hyg ^R , Cbx ^R
UJU77	AB31	a2, Δb::P _{crG1} :bE1, P _{crG1} :bW2, Δ10578_NEW	Phleo ^R , Gen ^R
UJU78	SG200	a1:mfa2 bW2, Δ10578_NEW	Phleo ^R , Gen ^R
UJU79.7	MS25	a2, Δb::P _{crG1} :bE1, P _{crG1} :bW2, Δrbf1, ip'[P _{crG1} :clp1]ip ^{s*n}	Phleo ^R , Hyg ^R , Cbx ^R
UJU79.3	MS25	a2, Δb::P _{crG1} :bE1, P _{crG1} :bW2, Δrbf1, ip'[P _{crG1} :clp1]ip ^s	Phleo ^R , Hyg ^R , Cbx ^R
UJU80.6	CP27	a2, Δb::P _{crG1} :rbf1, ip'[P _{crG1} :clp1]ip ^{s*n}	Hyg ^R , Cbx ^R
UJU80.2	CP27	a2, Δb::P _{crG1} :rbf1, ip'[P _{crG1} :clp1]ip ^s	Hyg ^R , Cbx ^R
UJU81.18	UDS5	a2, Δb::P _{crG1} :bE1, P _{crG1} :bW2, rbf1:3xHA, ip'[P _{crG1} :clp1]ip ^{s*n}	Phleo ^R , Hyg ^R , Cbx ^R

UJU81.6	UDS5	a2, Δb::P _{crG1} :bE1, P _{crG1} :bW2, rbf1:3xHA, ip ^s [P _{crG1} :clp1]ip ^s	Phleo ^R , Hyg ^R , Cbx ^R
UJU82.8	AB31	a2, Δb::P _{crG1} :bE1, P _{crG1} :bW2, ip ^s [P _{crG1} :clp1:3xHA]ip ^s ⁿ	Phleo ^R , Cbx ^R
UJU82.1	AB31	a2, Δb::P _{crG1} :bE1, P _{crG1} :bW2, ip ^s [P _{crG1} :clp1:3xHA]ip ^s	Phleo ^R , Cbx ^R
UJU83	SG200	a1:mfa2 bW2, Δhdp1	Phleo ^R , Gen ^R
UJU84	AB31	a2, Δb::P _{crG1} :bE1, P _{crG1} :bW2, Δhdp1	Phleo ^R , Gen ^R
UJU85	CP27	a2, Δb::P _{crG1} :rbf1, Δhdp1	Hyg ^R , Gen ^R
UJU86	UMJ42	a2, Δb::P _{crG1} :rbf1:3xHA, hdp1:gfp	Hyg ^R , Gen ^R
UJU87	CP27	a2, Δb::P _{crG1} :rbf1, hdp1:gfp	Hyg ^R , Gen ^R
UJU88	UJU67.1	a2, Δb::P _{crG1} :bE1, P _{crG1} :bW2, rbf1:3xMyc, leu2::P _{dik6_816} :GFP ²¹ , ip ^s [pJU90]ip ^s ⁿ	Phleo ^R , Hyg ^R , Gen ^R , Cbx ^R
UJU89	UJU67.1	a2, Δb::P _{crG1} :bE1, P _{crG1} :bW2, rbf1:3xMyc, leu2::P _{dik6_816} :GFP ²¹ , ip ^s [pJU92]ip ^s ⁿ	Phleo ^R , Hyg ^R , Gen ^R , Cbx ^R
UJU90	UJU67.1	a2, Δb::P _{crG1} :bE1, P _{crG1} :bW2, rbf1:3xMyc, leu2::P _{dik6_816} :GFP ²¹ , ip ^s [pJU91]ip ^s ⁿ	Phleo ^R , Hyg ^R , Gen ^R , Cbx ^R
UJU91	UJU68.3	a2, Δb::P _{crG1} :bE1:3xMyc, P _{crG1} :bW2, leu2::P _{um11413} :GFP ⁿ , ip ^s [pJU90]ip ^s ⁿ	Phleo ^R , Hyg ^R , Gen ^R , Cbx ^R
UJU92	UJU68.3	a2, Δb::P _{crG1} :bE1:3xMyc, P _{crG1} :bW2, leu2::P _{um11413} :GFP ⁿ , ip ^s [pJU93]ip ^s ⁿ	Phleo ^R , Hyg ^R , Gen ^R , Cbx ^R
UJU93	UJU68.3	a2, Δb::P _{crG1} :bE1:3xMyc, P _{crG1} :bW2, leu2::P _{um11413} :GFP ⁿ , ip ^s [pJU94]ip ^s ⁿ	Phleo ^R , Hyg ^R , Gen ^R , Cbx ^R
UJU94	UJU68.3	a2, Δb::P _{crG1} :bE1:3xMyc, P _{crG1} :bW2, leu2::P _{um11413} :GFP ⁿ , ip ^s [pJU95]ip ^s ⁿ	Phleo ^R , Hyg ^R , Gen ^R , Cbx ^R
UJU95.3	UJF43	a2, Δb::P _{crG1} :bE1, P _{crG1} :bW2, Prbf1:gfp, ip ^s [P _{crG1} :rbf1:3xHA]ip ^s	Phleo ^R , Hyg ^R , Cbx ^R
UJU95.10	UJF43	a2, Δb::P _{crG1} :bE1, P _{crG1} :bW2, Prbf1:gfp, ip ^s [P _{crG1} :rbf1:3xHA]ip ^s ⁿ	Phleo ^R , Hyg ^R , Cbx ^R
UJU96	UJU1.14	a2, Δb::P _{crG1} :bE1:3xHA, P _{crG1} :bW2, Δrbf1, ip ^s [P _{crG1} :hdp1:3xHA]ip ^s	Phleo ^R , Hyg ^R , Cbx ^R

a, b - Paarungstyp-Loci, E1, E2, W1, W2 - Gene des *b*-Paarungstyp-Locus, Δ - Deletion; P – Promotor, P_{crG1} – konditionaler Arabinose-induzierbarer Promotor (Bottin *et al.*, 1996), :: - homologer Austausch, : - Fusion, Phleo^R – Phleomycin-Resistenz, Cbx^R – Carboxin Resistenz, Hyg^R – Hygromycin-Resistenz, Gen^R – Geneticin-Resistenz, Nat^R - Nourseothricin-Resistenz (ip^s[...]ip^sⁿ) – ektopisch im *ip*-Locus integriert, leu2 – ektopisch im *leu2*-Locus integriert, ^s - singel-, ⁿ – mehrfache Integration.

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

4.1.3 Nukleinsäuren, Oligonukleotide und Plasmide

Für die Herstellung von CM-Medium wurde Heringssperma-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 Digoxigenin-markierte dUTPs (Jena Bioscience) verwendet. Als DNA-Größenstandard wurde der GeneRuler DNA Ladder Mix® (Thermo) verwendet.

Tabelle 4.4: In dieser Arbeit verwendete Oligonukleotide

Oligonukleotid/ Funktion	Sequenz (5' → 3')	Anmerku ng
dik6-Promotor Analyse		
Pdik6_1_F	TTCCGTTGATCCTCCTCAGATACG	1
Pdik6_1_R	GCAAGGATGCTTTGATCATCTCAGG	1
Pdik6_2_F	CCTGAGATGATCAAAGCATCCTTGC	1
Pdik6_2_R	GGCACGCTGTCCTGGTGACAT	1
Pdik6_3_F	ATGTCACCAGGACAGCGTGCC	1
Pdik6_3_R	CGTGACGACAATCGTGAATCACGA	1
Pdik6_4_F	TCGTGATTCACGATTGTCGTCACG	1
Pdik6_4_R	GCATTGTTCAAATGTACGTGGTGTG	1
Pdik6_5_F	CACACCACGTACATTTGAACAATGC	1
Pdik6_5_R	GTCGAGCGTCAGCTGGCTGAA	1
Pdik6_6_F	TTCAGCCAGCTGACGCTCGAC	1
Pdik6_6_R	CGGAAGGTTACACCGTGCAAGC	1
Pdik6_7_F	GCTTGCACGGTGTAACTTCCG	1
Pdik6_7_R	CCTGACAACATTCACCGTTTGAAGA	1
Pdik6_8_F	TCTTCAAACGGTGAATGTTGTCAGG	1
Pdik6_8_R	GGTATATATGCTTCAGCTTGGCTTGC	1
Pdik6_9_F	GCAAGCCAAGCTGAAGCATATATACC	1
Pdik6_9_R	GGATCGAATGGCTGTCTGTATCGC	1
Pdik6_up_F	CCATGATGCGGGAGTAGACACT	1
Pdik6_up_R	ATCGCGCTCCCAGTGACAAGA	1
Dik6_-4_R	TAGACCGCGGAGGATAGCAT	
Dik6_-4_F	TCTCCCATGATGCGGGAGTAG	
Dik6_-3_R	GCTGGGATTGGAATCGACAA	
Dik6_-3_F	CAATGCTATCCTCCGCGGTC	
Dik6_-2_R	CATCGACGATTCCAACACGG	

Dik6_-2_F	CGATTCCAATCCCAGCTTCG	
Dik6_-1_R	ACGGGATCTGACCCACCGC	
Dik6_-1_F	CCGTGTTGGAATCGTCGATG	
Dik6_0_R	TCGGTGCATAAAGGAAAGCACATCC	
Dik6_0_F	GCGGTGGGTCAGATCCCGT	

<i>prf1</i>-Promotor Analyse		
Pprf1_P1_up_R	CTTGCGGCTCCTACAACAG	
Pprf1_P1_up_F	TGCTCGGGAGGGTTCTTTC	
Pprf1_P1_Max_R	CCTGTACCTTGACGGAACAC	
Pprf1_P1_Max_F	CATGAGGTAGCCGCTATCG	
Pprf1_P1_down_R	ACACAACCGGAAGCAGGAC	
Pprf1_P1_down_F	CGAGCTTCATCGCGAACAGAC	

b2-Promotor Analyse		
Pb2_4_R	GACAGATCTTGAATGTTTCTCCG	
Pb2_4_F	GGTGCGGTTTGTGAGATTC	
Pb2_3_R	CCTCAGCACAGGTTCTTTG	
Pb2_3_F	TCGGAGAAACATTCAAGATCTG	
Pb2_2_R	TAGAGGCTAAAGGTGGGAGTG	
Pb2_2_F	AAAGAACCTGTGCTGAGGC	
Pb2_1_R	GTTGAGGCACTCCACAAAGC	
Pb2_1_F	CGCACTCCCACCTTTAGCC	

b1-Promotor Analyse		
Pb1_3_fw	CACCACCATCCTCAAGTTC	
Pb1_2_rv	AACAAAGAACCTGCGCTGAG	
Pb1_2_fw	GGGTGAAGTACCATTGGAATCG	
Pb1_1_rv	TCATTTCTTGCGCCGACAC	
Pb1_1_fw	ATTCGGGTCGCTGGACATTG	

<i>um11413</i>-Promotor Analyse		
Pum11413_6_RW	AACAACGGGATGTGTAGTCG	

Pum11413_6_FW	CATGTGCTCCAAGCCTAGTC	
Pum11413_5_RV	CCTCGATACCTAATCACGAATCAG	
Pum11413_5_FW	TTGCGCGTGTTCAGAAAGC	
Pum11413_4_RV	TTGTGCTGCCTGCAGCGATG	
Pum11413_4_FW	GCGGAACGATTAGGCAGTTG	
Pum11413_3_RV	GTCAACTGCCTAATCGTTCC	
Pum11413_3_FW	GAATCGCTTGTTCCGCAATG	
Pum11413_2_RV	GTTGCTGTGACGGGATGTG	
Pum11413_2_FW	GTAACGCTGGGCTGAGTACG	
Pum11413_1_RV	TGCCATCCATCCAGACAAG	
Pum11413_1_FW	AGTGGATTGCGAAGTGGAGAGTC	

dCas9 off-Target Analysen		
Dik6_0_0offT-262	ACCACAAACGGGTCAATCG	
Dik6_0_0offT-320	AGCGCTGAAGACACAAGAC	
Dik6_0_0offT-320	CCTGCGTGTTGTGACTCTG	
Dik6_0_0offT_R	ACGTGTCGTTGATCCGATTC	
Dik6_0_0offT_F	GTGTAGATGCTTCGGTGACCC	
offT_b1_1_1038_UP_r	TCTTCTTCTGGCCGTGGGCTTC	
offT_b1_1_1038_DOWN_fw	TCCAGTCCTCGAACGACAAG	
offT_b1_1_1038_UP_f	ACCGACAACAGGAGGACGAGAC	
offT_b1_1_1038_DOWN_rv	CAAGTACGCGACCTGGATAG	
offT_b1_11_1038_fw	GATGGTGGTGAGGATAATGG	
offT_b1_11_1038_rv	AGGATCTTCCTGGTCATCTG	
11413_10_0_offT_RV	GTCTCGTCAGCAACGATGTC	
11413_10_0_offT_FW	CGGGTTGACGATGGATAAAG	
11413_2_0_offT_RV	TGACGACGACGACGGGAATC	
11413_2_0_offT_FW	TACAAGCGCCACCACTCC	

qRT-PCR Analysen		
RT_elf2b_f	ATCCCGAACAGCCCAAAC	2
RT_elf2b_r	ATCGTCAACCGCAACCAC	2
RT_actin_f	CATGTACGCCGGTATCTCG	2
RT_actin_r	CTCGGGAGGAGCAACAATC	2
RT_rbf1-F	AGTACGAGCTACGACGGATTC	2
RT_rbf1-R	GGGTAGGTGTTGGACACATTC	2
RT_bE-F	GCACAACACCTTCCATTGAC	2

RT_bE-R	ACTGCTCCCGAATGTACT	2
Fw_RT_bW2 (neu 01/19)	TCGTGCAATGGATGGTAAGG	2
Rv_RT_bW2 (neu 01/19)	GAGTCGTGTGCCATCGAAG	2
rt_riz1-F*	AACATGCAAGGCTCAGGTAG	2
rt_riz1-R*	CTGTCCATCATTGGCTGATCC	2
RT_clp1_for	CCAGCGTCTACTCTTGATCC	2
RT_clp1_rev	GACGGTCCTCTTGCTCCTTG	2
RT_crg1_fw	TTGGTGCTGGCGTCATTG	2
RT_crg1_rv	CCGCGGTTATTGTATTCGTC	2
GFP_RT_for	GACCACTACCAGCAGAACAC	2
GFP_RT_rev	ATGTGATCGCGCTTCTCGTTG	2
RT-Hdp1-F6	CCGAAAGCGTCTGGGATGAG	2
RT-Hdp1-R6	TGCGTGCGTACATCGTACGG	2
RT_hdp2_F	GGCGCTTTGCATTGGAAC	2
RT_hdp2_R	AGCTTGAAGCCGATCGAC	2
RT_pra1_f	AACCGAAGGCATCTGCACTGC	2
RT_pra1_r	CCC GCATGTCGATGTCAGACT	2
RT_prf1_f	TCGGTAGAACGAGCTGTGATG	2
06181-RT-R	GTGGCCTCAGTCGAAGTAAG	2
06181-RT-F	GCTATGCCTCTCGGAGAATG	2
01796-RT-R	AGGCGTAACCGTAATTCTGC	2
01796-RT-F	GCGGATCTTATCGGCTAATG	2
06315-RT-R	TCGTGATACTGAGACTAGC	2
06315-RT-F	AACCACGTATCCTGTCTACC	2
02238-RT-R	TCTTCCTGCACTTCCTGAAC	2
02238-RT-F	CGCGAGATGCTACTTTAGAC	2
10528-RT-R	CCGACGACACTTATGTGTTT	2
10528-RT-F	CGGTAGCCGCTTTACTACAG	2
03923-RT-R	AAGGTGACGCTCGTCTCTTC	2
03923-RT-F	ACGGGCCAGATTAAGCTAGG	2
dCas9Dicod_RT_R	GGCAGCTTGATGATGAGGTC	2
dCas9Dicod_RT_F	CGGCATCACCATCATGGAG	2
Deletionen		
um11055_LB1	TGATCATCCCGAGCAATGAGG	
um11055_LB2	CGCGGCCATCTAGGCCGCAAAGATGTAGG GTGCAAGG	
um11055_RB1	CGCGGCCTGAGTGGCCATCGAGGATGTCA CGGATCAG	

um11055_RB2	CCTTCCTTCGGCTGAATACAGTG	
um01042_LB1	ACAGCGAAGCGAAGGAATGC	
um01042_LB2	CGCGGCCATCTAGGCCGCGCAACCTGGCA TCCTC	
um01042_RB1	CGCGGCCTGAGTGGCCGTGACAAGCCACG TTGCAAG	
um01042_RB2	CCAGCATCACTGGTCAACCGTAG	
um02857_LB1	ACGATCCACGACTCTGATTG	
um02857_LB2	CGCGGCCATCTAGGCCAGGGCAGAGCCG ACGAG	
um02857_RB1	CGCGGCCTGAGTGGCCTGAGTCATACGAC TCGGTGAAG	
um02857_RB2	GTTAGTCACGATCGGCTTTGAGG	
um10578_RB1	CGCGGCCTGAGTGGCCGCCTCTGACCCTG TCGTCTG	
um10578_RB2	CAACGGCATCTTGTTCCGGAGG	
um10578_LB1	CGTGCGATGGAGCTCAG	
um10578_LB2	CGCGGCCATCTAGGCCTTGACAGCGTTTG TGTCTC	
um04806_LB1	CGGAGACGGAACATCTATTCG	
um04806_LB2	CGCGGCCATCTAGGCCGATGGGAGACGTG ACGAG	
um04806_RB1	CGCGGCCTGAGTGGCCCCCAGACATTCAA AATGCAAG	
um04806_RB2	GGTGGTCTGGAGACCTGAAG	
um05601_LB1	CGGTCTACGTACCTACATTGG	
um05601_LB2	CGCGGCCATCTAGGCCTGCCTAGTCGTGT GACACCG	
um05601_RB1	CGCGGCCTGAGTGGCCCCTAATGACATCC TTCTCAGCC	
um05601_RB2	TCCTGGCAGTCGTCGTATG	
um15078_LB1	GACTTAAGCGAGCGGTTTG	
um15078_LB2	CGCGGCCATCTAGGCCAATGGGGATCGTT GTGGG	
um15078_RB1	CGCGGCCTGAGTGGCCAGCACTCTGAATC GGACTATG	
um15078_RB2	GCACGATGCGATTCCATCAC	
um05401_LB1	CGCGGGAAGAGGATGGTCTTG TG	
um05401_LB2	CGCGGCCATCTAGGCCACACACGCCCTG CACTG	
um05401_RB1	CGCGGCCTGAGTGGCCATGAATGGATTTTT TGCAGTTGCC	
um05401_RB2	GTCGCTTCGTGCGATCACAC	
um02209_LB1	ATGACGTGCATGTCCGTCAAG	
um02209_LB2	CGCGGCCATCTAGGCCGGCAGGAACAAAG GCGAGCTAC	

um02209_RB1	CGCGGCCTGAGTGGCCTTCTTGAGGAATT GGACC	
um02209_RB2	AGCATCCGCAGCATTG	
um10159_LB1	TCCGTGGCGTACAAATCAG	
um10159_LB2	CGCGGCCATCTAGGCCATCTCGACCTTGC AATTGCG	
um10159_RB1	CGCGGCCTGAGTGGCCTGCGGTGGAGAAA GAGCTTG	
um10159_RB2	TTGAAGCCAGTCACGAGTC	
KpnI_10578NewLB_FW	GCGGGTACCAAACCTCGAGGACAACAATGA TCGAACGAATG	
10578NewLB_Sfi_Mfe_RV	GCGCAATTGTCACGCCATGGTGGCCATCT AGGCCACTGCCGCTGCTGCGTACGTC	

<i>rbf1</i> Expression in <i>E. coli</i>		
attB-rbf_fw	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTT CATGGACATCTTGGAATA	
rbf-attB2_rev	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT CCTAGGCGCTCTGCAGTTGA	
NcoI_Rbfopt_fw	GCCCATGGATATTCTGGAAGTGGTTCATGA AGATC	
Rbfopt_Xho_rv	GCCTCGAGGGCGCTCTGCAGCTGTG	
attB1_rbfopt_ZF	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAG	
attb2_rbfopt_ZF	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT CCTAGCTCAGAATGGT	
Nde_rbf1_Fwd	GCCATATGGACATCTTGGGTAAG	
rbf1woSTOP_Sfi_r	GCGGCCGCGTTGGCCGCGGCGCTCTGCA GT	

Bandshift Sonden		
Mfe1_Pdik6_3_F	GAACAATTGATGTCACCAGGACAGCGTGC C	
Pdik6_4_R_Mfe1	GTTCAATTGGCATTGTTCAAATGTACGTGG TGTG	
Mfe1_Dik6_ORF2_F	GTTCAATTGTTGTTCCACCCATCCTTCACG C	
Dik6_ORF2_R_Mfe1	GAACAATTGCAGGTCGTGCTCCTCAGCTC	
Dik6_ORF1_R_Mfe1	GTTCAATTGGCGTGAGAGTTGATGACAG	
Mfe1_Dik6_ORF1_F	GAACAATTGGTGGCGAGCTACCTATTTG	
dik6_Sonde1_rv	GCGAATTCGGTCGAGCGTCAGCTGGC	
dik6_Sonde1_fw	GCGAATTCGTGATTCACGATTGTCGTC	
dik6_Sonde2_rv	CGGAATTCGGTCAAATCAATAAACGAAC	
dik6_Sonde2_fw	GCGAATTCGCGTAACCTTGGTGCTTG	
lga2_Sonde_rv	GCGAATTCCTGGCAGTAATTGACACC	
lga2_Sonde_fw	GCGAATTCGTATTCATCTGCCTCAGCAC	

um03923_Sonde_r	GCGAATTCCTAAAACCTTCCGCATCCAC	
um03923_Sonde_f	GCGAATTCCTAAAACCTTCCGCATCCAC	

Gibson Assembly P_{dik6}:gfp		
Deltra_LB_NEW	GGTCAAAGCGACATACAGTGCCTCAACTG GCATGATCGACTCGT	
Mut1_LB	AAGCGACATACAGTGCCTCAACTG ACTGGCATGATCGA	
Mut2_LB	AAGCGACATACAGTGCCTCAACTG ACTGGCATGATCGA	
Delta_RB_NEW	ACGAGTCGATCATGCCAGTTGACGCACTGT ATGTCGCTTTGACC	
Mut1_RB	TCGATCATGCCAGTTGAGATTTGGTATCGC ACTGTATGTCGCTT	
Mut2_RB	TCGATCATGCCAGTTGAGATTTGGTATCGC ACTGTATGTCGCTT	

Gibson Assembly P_{rbf1}:gfp		
1f-Prbf1-o(Vec)	GATTGTAAGTGCAGAGTGCACCACGCGGCAA CAGGCCGAGCTT	
1r-Prbf1-o(Vec)	CGAATTCCTGCAGCCCGGGTTTGGCAAA CTGTTTATCGACGCTTTGA	
BBS2_LB_Fse_oVec	TAATGCAGGTTAAGCGGC	
LB_Dbbs2_rev	GATGCCTGGTTTGTAGAAAGTGATTCGTA CAGCTGCCATCTGC	
RB_Dbbs2_fw	GCAGATGGCAGCTGTACGAATCACTTTCTA ACAAACCAGGCATCA	
BBS2_RB_Kpn_oVec	TTGAGCCTGTAGCGTGTGAATG	
BBS1_LB-Kpn_oVec	GAACAGACAAGTGGCATGGTAC	
LBDbbs1_rev	GAAATTCCTGACGAGGAGCAGGCCGTCCTG CGCTCGCCTTTGTCTG	
RB_Dbbs1_fw	GACAAACGCGAGCGACGGACGCCTGCTCC TCGTCAGAATTTCC	
BBS1_RB_nde_oVec	ATCGCTTGGACTTACCCAAGATG	

Gibson Assembly P_{dik6}:gfp in leu2		
leu2 fwd	GTGCTCTGTGAGATCTCTCGCTTCTCCGGC AGCAAGCC	
leu2 rev	TTGTCACGCACTATGTGAATTGGGGATTCTG CACGAATG	
GenR_Rev	AGGCCACCGCGTGTATTAATGCGGCCGC ACTCC	
GenR_fwd	ATCCCAATTCACATAGTGCCTGACAATTG CGGCCGC	
Pdik6_816_fwd	CGCATTAAATACACGCGGTGGGCCTAGATG GCCGATCAAAGCATCCTTGCAGC	

Pdik6_816_rev	AGCTCCTCGCCCTTGCTCACCATGGCCTG AGTGGCCCGCTGGGATCGAATGGCTG	
---------------	---	--

Gibson Assembly P_{um11413}:gfp in leu2		
GenR_rev o(Pum11413)	CTAGGCCCACTATGTGTATTAATGCGGCCG CACTCC	
Pum11413_fwd	CGCATTAAATACACATAGTGGGCCTAGATGG CCGACGCTTGCAGCTTTTTAAC	
Pum11413_rev	AGCTCCTCGCCCTTGCTCACCATGGCCTG AGTGGCCCTTGATGGTATGGAAGACTG	

Klonierung pNEBUN-dCas9		
NheI_CloNat_fw	GCGGGCTAGCTTGCACAAAGATCG	
CloNat_DraIII_rev	GCGCCACAAAGTGGAGACGAAAGGGCCTC GTGATAC	
CloNat_Mut_rev	GACTCTGGTGCGGTATCGGTAAGCCGTGT C	
CloNat_Mut_fw	GACACGGCTTACCGATACCGCACCAGTGT C	

Sequenzier Primer		
T7 Promotor	TAATACGACTCACTATAGGG	
T7 Terminator	GCTAGTTATTGCTCAGCGG	
Hdp2_SeqX	CTTCCGCACTCCGATGCGAATG	
Hdp1_Seq4-fw	GCGTACGTGTTGACGCGTTC	
cbx_Seq_rev	GCCAAGGAGTCTTGAACCTGAG	
cbx_Seq_fw	CAGAACACTGCCCTCATCTTGC	
dCas9_Seq6	GCACCCAAGTTAGTGAGAGTGAAG	
dCas9_Seq5	GCTTCTTTGACTTGCCCTTCTCC	
dCas9_Seq4	CCAGCTCGTACAGACATACAAC	
dCas9_Seq3	CCAGCGAGACGTTCCAATAAAG	
dCas9_Seq2	CTTGTCGCGGATACCGTTAATCAG	

*weitere allgemeine Sequenzierpreimer siehe Laborsammlung AG Kämper

weitere Klonierung		
Cas9-GW-FW	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCT GCTTTAATACGTTCCGTTCCGATGTAG	
Cas9-GW-RV	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT ATGAATTCTCATGTTTGACAGCTTATCATC	
OCP6 LB FW	TTGGCGGCTCTAGCGTGCGGTAAC	3

OCP4 RB RV	CGACAAGCCTATTCCGGTTGATCG	3
Hdp1_RB_FW	GCGGGCCTGAGTGGCCTCACTCTGCCGTG TTGGCAACGC	3
Hdp1_LB_RV	GCGCCGGATCTACCGGGGTTTCTTCCTCC TCCAGTTC	3

(1) – (Heimel *et al.*, 2010b), (2) – Laborbestand AG- Kämper, (3) – Chet Pothiratana, Laborbestand

Tabelle 4.5: In dieser Arbeit verwendete Plasmide

Bezeichnung	Beschreibung	Referenz	Sel. - marker
p123	Enthält eGFP unter Kontrolle des konstitutiv aktiven Potef-Promotors; homologe Integration in den ip Locus	(Aichinger <i>et al.</i> , 2003)	Amp ^R , Cbx ^R
pCR2.1	Vektor zur Klonierung von PCR Produkten mittels Topoisomerase-Aktivität. Blau/Weiß-Selektion möglich	Invitrogen	Amp ^R , Kan ^R
pDONR221	Vektor für die GATEWAY® in vitro Klonierung von PCR Fragmenten mittels BP Klonase. Trägt eine GATEWAY® Klonierungskassette mit Chloramphenicol-Resistenz und ccdB-Selbstmordgen.	Invitrogen	Amp ^R , Cm ^R
pET22b	Expressionsvektor zur C-terminalen Fusion von HIS, und N-terminaler Fusion von pelB unter der Kontrolle eines mit IPTG induzierbaren T7lac Promotors.	Novagen	Amp ^R
pFUS1	Enthält das hdp1:egfp Fusionskonstrukt mit Hygromycin-Resistenz-Kassette; homologe Integration in den hdp1 Locus	(Pothiratana, 2008)	Amp ^R , Kan ^R , Hyg ^R
pJF1	Enthält eGFP unter Kontrolle des 816bp Fragments des Pdik6-Promotors; homologe Integration in den ip Locus	(Fortenbacher, 2016)	Amp ^R
pJU4	Destination Vektor; Ermöglicht die LR-Klonase-vermittelte Integration von attB-flankierten PCR Amplifikaten zur N-terminalen Fusion von GST unter der Kontrolle eines mit IPTG induzierbaren Promotors. Trägt Amp- und Cm-Resistenz sowie das ccdB-Selbstmordgen.	(Ulrich, 2015)	Amp ^R , Cm ^R
pMF5-9g	Enthält eine 3xHA-Geneticin-Kassette als Sfil-Fragment für die C-terminale Fusion mit 3xHA	Matteo Jurca	Amp ^R , Gen ^R

pMS8	pCas9_sgRNA_0; enthält ein Ustilago maydis codon optimiertes NLS-cas9-HA-NLS unter der Kontrolle des konstitutiv aktiven Potef Promotors, über Acc65I kann desweiteren eine sgRNA unter der Kontrolle des PU6 Promotors eingebracht werden. Frei replizierendes Plasmid, vermittelt Carboxin-Resistenz	(Schuster <i>et al.</i> , 2016)	Amp ^R , Cbx ^R
pMS81	Enthält das Deletionskonstrukt von rbf1 mit Hygromycin-Resistenz-Kassette	Mario Scherer	Amp ^R , Hyg ^R
pMS83	Enthält rbf1 unter Kontrolle des induzierbaren <i>crg1</i> -Promotors; homologe Integration in den ip Locus	Mario Scherer	Amp ^R , Cbx ^R
pNEB-Cbx(+)	Enthält die Carboxin-Resistenzkassette als 1.939 bp NotI-Fragment aus pSL-Cbx(+) in die NotI-Schnittstelle von pNEB193-NotI inseriert.	(Brachmann, 2001)	Amp ^R , Cbx ^R
pNEBUC	frei replizierendes Plasmid mit Carboxin-Resistenz-Kassette	Laborsammlung	Amp ^R , Cbx ^R
pNEBUH	frei replizierendes Plasmid mit Hygromycin-Resistenz-Kassette	Laborsammlung	Amp ^R , Hyg ^R
pNEBUN	frei replizierendes Plasmid mit Nourseothricin-Resistenz-Kassette	Laborsammlung	Amp ^R , Nat ^R
pRU11 biz Strep	Enthält mit Strep-tag versehenes <i>biz1</i> unter Kontrolle des Arabinose induzierbaren <i>crg1</i> -Promotors für homologe Integration in den ip Locus	Miroslav Vranes	Amp ^R , Cbx ^R
pRU11_Hdp2:GF P	Enthält <i>hdp2:gfp</i> unter Kontrolle des Arabinose induzierbaren <i>crg1</i> -Promotors für homologe Integration in den ip Locus	Miroslav Vranes	Amp ^R , Cbx ^R
UMa 1057	Enthält eine Geneticin-Resistenz-Kassette als SfiI-Fragment zur Generierung von Deletionskonstrukten	(Baumann <i>et al.</i> , 2012)	Amp ^R , Gen ^R
pUMa 317	Enthält eine eGFP-Hygromycin-Kassette als SfiI-Fragment für die C-terminale Fusion mit eGFP	(Becht <i>et al.</i> , 2006)	Amp ^R , Hyg ^R
pUMa 731; pNEBUG	frei replizierendes Plasmid mit Geneticin-Resistenz-Kassette unter der Kontrolle des PgapDH-Promotors	Laborsammlung	Amp ^R , Gen ^R
pUMa 792	Enthält eine 3xHA-Hygromycin-Kassette als SfiI-Fragment für die C-terminale Fusion mit dem 3xHA-Tag	Philip Müller, AG Feldbrügge, Uni Düsseldorf	Amp ^R , Hyg ^R
pUMa 803	Enthält eine eGFP-Geneticin-Kassette als SfiI-Fragment für die C-terminale Fusion mit eGFP	AG Feldbrügge, Uni Düsseldorf	Amp ^R , Gen ^R
p123_BB_GW1	p123-Derivat zur Integration in den ip Locus. Enthält die GATEWAY-Leserahmen-Kassette B zur Integration einer beliebigen Sequenz über GATEWAY-LR in Vitro klonierung.	Laborsammlung	Amp ^R , Cbx ^R

Tabelle 4.6: Während dieser Arbeit erstellte Plasmide

Bez.	alt. Bezeichnung	Beschreibung	Sel.-marker
pJU5	pMS 81 Nat	Rbf1 K.O. Vektor. Entstanden aus einer Ligation mit dem mit SfiI linearisiertem Plasmid pMS 81 und einem mit SfiI ausgeschnittenem Fragment aus pUMa 262	Amp ^R
pJU6	pMK-RQ-rbfopt	Rbf1 cDNA codon optimiert für <i>E. coli</i> . Flankiert von attB Rekombinationsstellen	Amp ^R
pJU8	pEntry-rbf1opt	Entry-Vektor aus einer GATEWAY®-BP in vitro Klonierung mit dem Vektor pDONR221 und einem NcoI Fragment aus pJU6. Enthält die für <i>E. coli</i> codon optimierte cDNA des rbf1 ORF, flankiert von attL Rekombinationsstellen	Kan ^R
pJU9	pExpGEX-rbf_opt	Expressions-Vektor aus einer GATEWAY®-LR in vitro Klonierung mit den Plasmiden JU4 und JU8. Ermöglicht die IPTG induzierte Expression von <i>rbf1</i> mit N-terminal fusioniertem GST in <i>E. coli</i>	Amp ^R
pE_Rbf1 ZF	pEntry-rbf1opt_ZF	Entry-Vektor aus einer GATEWAY®-BP in vitro Klonierung mit dem Vektor pDONR221 und einem PCR Produkt das mit den Primern attB1_rbfopt_ZF und attB2_rbfopt_ZF von pJU6 amplifiziert wurde. Enthält die für <i>E. coli</i> codon optimierte Zinkfinger-Domäne von rbf1, flankiert von attL Rekombinationsstellen.	Kan ^R
pGEX_Rbf1ZF	pExpGEX-rbf1opt_ZF	Expressions-Vektor aus einer GATEWAY®-LR in vitro Klonierung mit den Plasmiden JU4 und pE_Rbf1ZF. Ermöglicht die IPTG induzierte Expression der Rbf1 Zinkfinger-Domäne mit N-terminal fusioniertem GST in <i>E. coli</i>	Amp ^R
pJU10	pRU11 biz1:3xHA	Entstanden aus einer Ligation mit dem mit AscI/SfiI linearisierten Plasmid pRU11-biz-Strep und einem mit AscI/SfiI verdauten PCR Produkt das mit den Primern Sfi_3xHA_fw und 3xHA_Asc_rv von pUMa 792 amplifiziert wurde. Enthält den ORF von <i>biz1</i> mit C-terminal fusioniertem 3xHA unter der Kontrolle des <i>crg1</i> - Promotors	Amp ^R
pJU11	pET22b rbf1opt	Entstanden aus einer Ligation mit dem mit NcoI/XhoI linearisierten Plasmid pET22b und einem mit NcoI/XhoI verdauten PCR Produkt das mit den Primern NcoI_Rbfopt_fw und Rbfopt_Xho_rv von pJU8 amplifiziert wurde. Ermöglicht die IPTG induzierte Expression von <i>rbf1</i> mit C-terminal fusioniertem HIS-Tag in <i>E. coli</i> .	Amp ^R
pJU12	pRU11 rbf1:3xHA	Entstanden aus einer Ligation mit dem mit NdeI/SfiI linearisierten Plasmid pJU10 und einem mit NdeI/SfiI verdauten PCR Produkt das mit den Primern Nde_rbf1_Fwd und rbf1woSTOP_Sfi_r von pMS83 amplifiziert wurde. Enthält den ORF von <i>rbf1</i> mit C-terminal fusioniertem 3xHA unter der Kontrolle des <i>crg1</i> -Promotors.	Amp ^R

pJU13	Hdp1 TOPO	Topoisomerase vermittelte Integration des PCR Produkts das mit den Primern Nde1_Hdp1_for und Hdp1_Sfi1_rev von <i>Ustilago maydis</i> gDNA amplifiziert wurde in den Vektor pCR2.1	Amp ^R
pJU14	pRU11 Hdp1:3xHA	Entstanden aus einer Ligation mit dem mit NdeI/SfiI linearisierten Plasmid pJU10 und einem NdeI/SfiI Fragment aus pJU13. Enthält den ORF von <i>hdp1</i> mit C-terminal fusioniertem 3xHA unter der Kontrolle des <i>crg1</i> -Promotors.	Amp ^R
pJU15	pRU11 Hdp2:3xHA	Entstanden aus einer Ligation mit dem mit NdeI/SfiI linearisierten Plasmid pJU10 und einem NdeI/SfiI Fragment aus pRU11_Hdp2:GFP. Enthält den ORF von <i>hdp2</i> mit C-terminal fusioniertem 3xHA unter der Kontrolle des <i>crg1</i> -Promotors.	Amp ^R
pJU16	p123 dik6 816 GFP DELTA	Entstanden durch Gibson Assembly® mit dem mit NdeI/NcoI linearisierten Plasmid p123 und den PCR Produkten, die mit den Primern Fw_LB-o(Vec) ¹ und Deltra_LB_NEW sowie Delta_RB_NEW und Rev_RB-o(Vec) ¹ von pJF1 amplifiziert wurden. Enthält den ORF von GFP unter der Kontrolle des 816er Fragments des Pdik6 Promotors mit deletierter Rbf1-Bindestelle	Amp ^R , Cbx ^R
pJU17	p123 dik6 816 GFP Mut1	Entstanden durch Gibson Assembly® mit dem mit NdeI/NcoI linearisierten Plasmid p123 und den PCR Produkten, die mit den Primern Fw_LB-o(Vec) ¹ und Mut1_LB sowie Mut1_RB und Rev_RB-o(Vec) ¹ von pJF1 amplifiziert wurden. Enthält den ORF von GFP unter der Kontrolle des 816er Fragments des P _{dik6} Promotors mit mutierter Rbf1-Bindestelle	Amp ^R , Cbx ^R
pJU18	p123 dik6 816 GFP Mut2	Entstanden durch Gibson Assembly® mit dem mit NdeI/NcoI linearisierten Plasmid p123 und den PCR Produkten, die mit den Primern Fw_LB-o(Vec) ¹ und Mut2_LB sowie Mut2_RB und Rev_RB-o(Vec) ¹ von pJF1 amplifiziert wurden. Enthält den ORF von GFP unter der Kontrolle des 816er Fragments des P _{dik6} Promotors mit mutierter Rbf1-Bindestelle	Amp ^R , Cbx ^R
pJU24	TOPO sgRNA_dik6_ 0_225	Topoisomerase vermittelte Integration des DNA Fragments sgRNA_Pdik6_0_225 (IDT) in den Vektor pCR2.1	Amp ^R
pJU25	TOPO sgRNA_dik6_ 0_0	Topoisomerase vermittelte Integration des DNA Fragments sgRNA_Pdik6_0_0 (IDT) in den Vektor pCR2.1	Amp ^R
pJU29	pMA_dCas9_ dicod	Enthält den für <i>Ustilago maydis</i> di-codon optimierten ORF von dCas9 ² (GeneArt)	Amp ^R , Cbx ^R
pJU30	pMS8_dCas9_ dicod	Entstanden aus einer Ligation mit dem mit BamHI/NsiI linearisierten Plasmid pMS8 und einem BamHI/NsiI Fragment aus pJU29. Enthält den für <i>Ustilago maydis</i> di-codon optimierten ORF von dCas9 mit C-terminal fusioniertem 3xHA -Tag und NLS, sowie N-terminal fusioniertem NLS unter der Kontrolle des Po2tef Promotors. Über Acc65I kann desweiteren eine sgRNA unter der Kontrolle des PU6 Promotors eingebracht werden. Frei replizierendes Plasmid, vermittelt Carboxin-Resistenz	Amp ^R , Cbx ^R

pJU31	pMS8_dCas9_ dicod sgRNA Pdik6_0_0	Entstanden durch Gibson Assembly® mit dem mit Acc65I linearisierten Plasmid pJU30 und dem DNA Fragment sgRNA_Pdik6_0_0 (IDT)	Amp ^R , Cbx ^R
pJU32	pMS8_dCas9_ dicod sgRNA Pdik6_0_225	Entstanden durch Gibson Assembly® mit dem mit Acc65I linearisierten Plasmid pJU30 und dem DNA Fragment sgRNA_Pdik6_0_225 (IDT)	Amp ^R , Cbx ^R
pJU33	pMS8_dCas9_ dicod sgRNA Pdik6_1_225	Entstanden durch Gibson Assembly® mit dem mit Acc65I linearisierten Plasmid pJU30 und dem DNA Fragment sgRNA_Pdik6_1_225 (IDT)	Amp ^R , Cbx ^R
pJU34	p123_Prbf1_all_ WT	Entstanden durch Gibson Assembly® mit dem mit BamHI/NdeI linearisierten Plasmid p123 und dem mit den Primern 1f-Prbf1-o(Vec) und 1r-Prbf1-o(Vec) von <i>Ustilago maydis</i> gDNA amplifizierten PCR Produkt. Enthält den ORF von GFP unter der Kontrolle des Prbf1 Promotors.	Amp ^R , Cbx ^R
pJU35	p123_Prbf1_all_ dd	Entstanden durch Gibson Assembly® mit dem mit BamHI/NdeI linearisierten Plasmid p123 und den PCR Produkten, die mit den Primern <i>BBS2_LB_Fse_oVec</i> und <i>LB_Dbbs2_rev</i> , <i>RB_Dbbs2_fw</i> und <i>BBS2_RB_Kpn_oVec</i> , <i>BBS1_LB-Kpn_oVec</i> und <i>LBDbbs1_rev</i> , sowie <i>RB_Dbbs1_fw</i> und <i>BBS1_RB_nde_oVec</i> amplifiziert wurden. Enthält den ORF von GFP unter der Kontrolle des Prbf1 Promotors mit deletierten b-Bindestellen (<i>bbs1</i> und <i>bbs2</i>)	Amp ^R , Cbx ^R
pJU36	p123_Prbf1_all_ d1	Entstanden aus einer Ligation mit dem mit KpnI/NcoI linearisierten Plasmid pJU34 und einem KpnI/NcoI Fragment aus JU35. Enthält den ORF von GFP unter der Kontrolle des Prbf1 Promotors mit deletierter b-Bindestellen (<i>bbs1</i>)	Amp ^R , Cbx ^R
pJU37	p123_Prbf1_all_ d2	Entstanden aus einer Ligation mit dem mit KpnI/NcoI linearisierten Plasmid pJU35 und einem KpnI/NcoI Fragment aus JU34. Enthält den ORF von GFP unter der Kontrolle des Prbf1 Promotors mit deletierter b-Bindestellen (<i>bbs2</i>)	Amp ^R , Cbx ^R
pJU38	pMS8_dCas9_d icod sgRNA Pb1_1_1038	Entstanden durch Gibson Assembly® mit dem mit Acc65I linearisierten Plasmid pJU30 und dem DNA Fragment sgRNA Pb1_1_1038 (IDT)	Amp ^R , Cbx ^R
pJU39	pMS8_dCas9_d icod sgRNA Pb1_6_1557	Entstanden durch Gibson Assembly® mit dem mit Acc65I linearisierten Plasmid pJU30 und dem DNA Fragment sgRNA Pb1_6_1557 (IDT)	Amp ^R , Cbx ^R
pJU40	pMS8_dCas9_d icod sgRNA Pb1_11_1038	Entstanden durch Gibson Assembly® mit dem mit Acc65I linearisierten Plasmid pJU30 und dem DNA Fragment sgRNA Pb1_11_1038 (IDT)	Amp ^R , Cbx ^R
pJU41	TOPO sgRNA Pb1_1_1038	Topoisomerase vermittelte Integration des DNA Fragments sgRNA_Pb1_1_1038 in den Vektor pCR2.1	Amp ^R
pJU42	TOPO sgRNA Pb1_6_1557	Topoisomerase vermittelte Integration des DNA Fragments sgRNA_Pb1_6_1557 in den Vektor pCR2.1	Amp ^R
pJU43	TOPO sgRNA Pb1_11_1038	Topoisomerase vermittelte Integration des DNA Fragments sgRNA_Pb1_11_1038 in den Vektor pCR2.1	Amp ^R

pKJ1 ³	pET22b-Hdp2	Expressions-Vektor entstanden aus einer Ligation mit dem mit BamHI/NotI linearisierten Plasmid pET-22b(+) und den mit BamHI/NcoI, NcoI/NsiI und NsiI/NotI geschnittenen DNA Fragmenten Hdp2_BamHI-NcoI, Hdp2_NcoI-NsiI und Hdp2_NsiI-NotI (IDT). Enthält den für <i>E. coli</i> codon optimierten ORF von <i>hdp2</i> mit C-terminaler Fusion von HIS und N-terminaler Fusion von <i>pelB</i> unter der Kontrolle eines mit IPTG induzierbaren T7lac Promotors.	Amp ^R
pKJ2 ³	pCR2.1-Hdp2	Topoisomerase vermittelte Integration des Ligationsproduktes der entsprechend geschnittenen DNA Fragmente Hdp2_BamHI-NcoI, Hdp2_NcoI-NsiI und Hdp2_NsiI-NotI in den Vektor pCR2.1	Amp ^R
pKJ3 ³	pCR2.1-Frag.1 (Hdp2)	Topoisomerase vermittelte Integration des DNA Fragment Hdp2_BamHI-NcoI (IDT) in den Vektor pCR2.1	Amp ^R
pKJ4 ³	pCR2.1-Frag.2 (Hdp2)	Topoisomerase vermittelte Integration des DNA Fragment Hdp2_NcoI-NsiI (IDT) in den Vektor pCR2.1	Amp ^R
pKJ5 ³	pCR2.1-Frag.3 (Hdp2)	Topoisomerase vermittelte Integration des DNA Fragment Hdp2_NsiI-NotI (IDT) in den Vektor pCR2.1	Amp ^R
pJU44	pNEB-C_pMS8_0	Entstanden aus einer Ligation mit dem mit MfeI/HindIII linearisierten Plasmid pNEB-C und einem MfeI/HindIII Fragment aus JU30. Enthält den für <i>Ustilago maydis</i> di-codon optimierten ORF von dCas9 mit C-terminal fusioniertem 3xHA -Tag und Nucleoplasmin, sowie N-terminal fusioniertem NLS unter der Kontrolle des Po2tef Promotors für eine homologe Integration in den ip Locus(MfeI)	Amp ^R , Cbx ^R
pJU45	pNEB-C_pMS8_0 Mut*_final	Entstanden aus einer Re-Ligation mit dem mit XmaI linearisierten und anschließend gebluntetem Plasmid pJU44. Enthält den für <i>Ustilago maydis</i> di-codon optimierten ORF von dCas9 mit C-terminal fusioniertem 3xHA -Tag und Nucleoplasmin, sowie N-terminal fusioniertem NLS unter der Kontrolle des Po2tef Promotors für eine homologe Integration in den ip Locus. Über Acc65I kann desweiteren eine sgRNA unter der Kontrolle des PU6 Promotors eingebracht werden (MfeI).	Amp ^R , Cbx ^R
pJU46	CloNat-TOPO	Topoisomerase vermittelte Integration des PCR Produkts das mit den Primern NheI_CloNat_fw und CloNat_DraIII_rev von pNEBUN amplifiziert wurde in den Vektor pCR2.1	Amp ^R , Nat ^R
pJU47	CloNat-TOPO Mut*_final	Entstanden durch Mutagenese PCR auf pJU46 mit den Primern CloNat_Mut_rev und CloNat_Mut_fw.	Amp ^R , Nat ^R
pJU48	pNEBUN_dCas9_0	Entstanden aus einer Ligation mit dem mit DraIII/NheI linearisierten Plasmid pJU30 und einem DraIII/NheI Fragment aus pJU47. Enthält den für <i>Ustilago maydis</i> di-codon optimierten ORF von dCas9 mit C-terminal fusioniertem 3xHA -Tag und NLS, sowie N-terminal fusioniertem NLS unter der Kontrolle des Po2tef Promotors. über Acc65I kann desweiteren eine sgRNA unter der Kontrolle des PU6 Promotors	Amp ^R , Nat ^R

		eingbracht werden. Frei replizierendes Plasmid, vermittelt Nurseothricin-Resistenz	
pJU49	pNEBUN_dCas 9 sgRNA_Pdik6_1_225	Entstanden durch Gibson Assembly® mit dem mit Acc65I linearisierten Plasmid pJU48 und dem DNA Fragment sgRNA sgRNA_Pdik6_1_225 (IDT)	Amp ^R , Nat ^R
pJU50	pNEBUC_dCas 9 sgRNA_Pum11 413_2_0	Entstanden durch Gibson Assembly® mit dem mit Acc65I linearisierten Plasmid pJU30 und dem DNA Fragment sgRNA_Pum11413_2_0 (IDT)	Amp ^R , Cbx ^R
pJU51	pNEBUC_dCas 9 sgRNA_Pum11 413_10_0	Entstanden durch Gibson Assembly® mit dem mit Acc65I linearisierten Plasmid pJU30 und dem DNA Fragment sgRNA_Pum11413_10_0 (IDT)	Amp ^R , Cbx ^R
pJU52	pNEBUC_dCas 9 sgRNA_Pum11 413_13_0	Entstanden durch Gibson Assembly® mit dem mit Acc65I linearisierten Plasmid pJU30 und dem DNA Fragment sgRNA_Pum11413_13_0 (IDT)	Amp ^R , Cbx ^R
pJU58	um11055 K.O. TOPO	Topoisomerase vermittelte Integration des Ligationsprodukts aus der Ligation eines Sfil geschnittenen 1 kb Fragments der 5'Flanke von UMAG_11055, eines mit Sfil geschnittenen 1 kb Fragments der 3'Flanke von UMAG_11055 und der durch Sfil aus dem Vektor pUMa 1057 gewonnenen Geneticin-Resistenzkassette in den Vektor pCR2.1. Ermöglicht die Amplifikation des UMAG_11055 Deletionskonstrukts für Ustilago maydis Transformationen	Amp ^R , Gen ^R
pJU59	um01042 K.O. TOPO	Topoisomerase vermittelte Integration des Ligationsprodukts aus der Ligation eines Sfil geschnittenen 1 kb Fragments der 5'Flanke von UMAG_01042, eines mit Sfil geschnittenen 1 kb Fragments der 3'Flanke von UMAG_01042 und der durch Sfil aus dem Vektor pUMa 1057 gewonnenen Geneticin-Resistenzkassette in den Vektor pCR2.1. Ermöglicht die Amplifikation des UMAG_01042 Deletionskonstrukts für Ustilago maydis Transformationen	Amp ^R , Gen ^R
pJU60	pUMa 731 Potef (pNEBUG)	Entstanden aus einer Ligation mit dem mit NotI linearisierten Plasmid pUMa 731 und einem NotI Fragment aus pUMa 1057. Frei replizierendes Plasmid das Geneticin-Resistenz vermittelt	Amp ^R , Gen ^R
pJU61	um02857 K.O. TOPO	Topoisomerase vermittelte Integration des Ligationsprodukts aus der Ligation eines Sfil geschnittenen 1 kb Fragments der 5'Flanke von UMAG_02857, eines mit Sfil geschnittenen 1 kb Fragments der 3'Flanke von UMAG_02857 und der durch Sfil aus dem Vektor pUMa 1057 gewonnenen Geneticin-Resistenzkassette in den Vektor pCR2.1. Ermöglicht die Amplifikation des UMAG_02857 Deletionskonstrukts für Ustilago maydis Transformationen	Amp ^R , Gen ^R

pJU62	pUMa 803 Potef RC	Entstanden aus einer Ligation mit dem mit NotI linearisierten Plasmid pUMa 803 und einem NotI Fragment aus pUMa 1057. Für C-terminale GFP Fusion mittels pUMa-SfiI-System; vermittelt Geneticin-Resistenz	Amp ^R , Gen ^R
pJU63	pUMa 803 Potef	Entstanden aus einer Ligation mit dem mit NotI linearisierten Plasmid pUMa 731 und einem NotI Fragment aus pUMa 1057. Frei replizierendes Plasmid das Geneticin-Resistenz vermittelt	Amp ^R , Gen ^R
pJU64	um04806 K.O. TOPO	Topoisomerase vermittelte Integration des Ligationsprodukts aus der Ligation eines SfiI geschnittenen 1 kb Fragments der 5'Flanke von UMAG_04806, eines mit SfiI geschnittenen 1 kb Fragments der 3'Flanke von UMAG_04806 und der durch SfiI aus dem Vektor pUMa 1057 gewonnenen Geneticin-Resistenzkassette in den Vektor pCR2.1. Ermöglicht die Amplifikation des UMAG_04806 Deletionskonstrukts für Ustilago maydis Transformationen	Amp ^R , Gen ^R
pJU65	um02209 K.O. TOPO	Topoisomerase vermittelte Integration des Ligationsprodukts aus der Ligation eines SfiI geschnittenen 1 kb Fragments der 5'Flanke von UMAG_02209, eines mit SfiI geschnittenen 1 kb Fragments der 3'Flanke von UMAG_02209 und der durch SfiI aus dem Vektor pUMa 1057 gewonnenen Geneticin-Resistenzkassette in den Vektor pCR2.1. Ermöglicht die Amplifikation des UMAG_02209 Deletionskonstrukts für Ustilago maydis Transformationen	Amp ^R , Gen ^R
pJU66	um05401 K.O. TOPO	Topoisomerase vermittelte Integration des Ligationsprodukts aus der Ligation eines SfiI geschnittenen 1 kb Fragments der 5'Flanke von UMAG_05401, eines mit SfiI geschnittenen 1 kb Fragments der 3'Flanke von UMAG_05401 und der durch SfiI aus dem Vektor pUMa 1057 gewonnenen Geneticin-Resistenzkassette in den Vektor pCR2.1. Ermöglicht die Amplifikation des UMAG_05401 Deletionskonstrukts für Ustilago maydis Transformationen	Amp ^R , Gen ^R
pJU67	um05610 K.O. TOPO	Topoisomerase vermittelte Integration des Ligationsprodukts aus der Ligation eines SfiI geschnittenen 1 kb Fragments der 5'Flanke von UMAG_05610, eines mit SfiI geschnittenen 1 kb Fragments der 3'Flanke von UMAG_05610 und der durch SfiI aus dem Vektor pUMa 1057 gewonnenen Geneticin-Resistenzkassette in den Vektor pCR2.1. Ermöglicht die Amplifikation des UMAG_05610 Deletionskonstrukts für Ustilago maydis Transformationen	Amp ^R , Gen ^R

pJU68	um10578 K.O. TOPO	Topoisomerase vermittelte Integration des Ligationsprodukts aus der Ligation eines Sfil geschnittenen 1 kb Fragments der 5'Flanke von UMAG_10578, eines mit Sfil geschnittenen 1 kb Fragments der 3'Flanke von UMAG_10578 und der durch Sfil aus dem Vektor pUMa 1057 gewonnenen Geneticin-Resistenzkassette in den Vektor pCR2.1. Ermöglicht die Amplifikation des UMAG_10578 Deletionskonstrukts für Ustilago maydis Transformationen	Amp ^R , Gen ^R
pJU69	um15078 K.O. TOPO	Topoisomerase vermittelte Integration des Ligationsprodukts aus der Ligation eines Sfil geschnittenen 1 kb Fragments der 5'Flanke von UMAG_15078, eines mit Sfil geschnittenen 1 kb Fragments der 3'Flanke von UMAG_15078 und der durch Sfil aus dem Vektor pUMa 1057 gewonnenen Geneticin-Resistenzkassette in den Vektor pCR2.1. Ermöglicht die Amplifikation des UMAG_15078 Deletionskonstrukts für Ustilago maydis Transformationen	Amp ^R , Gen ^R
pJU70	pFUS1 GenR	Entstanden aus einer Ligation mit dem mit Sfil linearisierten Plasmid pFUS1 und einem Sfil Fragment aus pJU63. Für die homologe Integration einer C-terminalen <i>hdp1:gfp</i> Fusion in <i>locus</i> . Vermittelt Geneticin-Resistenz	Amp ^R , Gen ^R
pJU71	pFUS1 HA	Entstanden aus einer Ligation mit dem mit Sfil linearisierten Plasmid pFUS1 und einem Sfil Fragment aus pMF5-9g. Für die homologe Integration einer C-terminalen <i>hdp1:3xHA</i> Fusion in <i>locus</i> . Vermittelt Geneticin-Resistenz	Amp ^R , Gen ^R
pJU72	pJU45 sgRNA_Pum11 413_2_0	Entstanden durch Gibson Assembly® mit dem mit Acc65I linearisierten Plasmid pJU45 und dem DNA Fragment sgRNA_Pum11413_2_0 (IDT)	Amp ^R , Cbx ^R
pJU73	pJU45 sgRNA_Pum11 413_10_0	Entstanden durch Gibson Assembly® mit dem mit Acc65I linearisierten Plasmid pJU45 und dem DNA Fragment sgRNA_Pum11413_10_0 (IDT)	Amp ^R , Cbx ^R
pJU74	pJU45 sgRNA_Pum11 413_13_0	Entstanden durch Gibson Assembly® mit dem mit Acc65I linearisierten Plasmid pJU45 und dem DNA Fragment sgRNA_Pum11413_13_0 (IDT)	Amp ^R , Cbx ^R
pJU75	pJU45 sgRNA_Pdik6_1 _225	Entstanden durch Gibson Assembly® mit dem mit Acc65I linearisierten Plasmid pJU45 und dem DNA Fragment sgRNA_Pdik6_1_225 (IDT)	Amp ^R , Cbx ^R
pJU76	pJU45 sgRNA_Pdik6_0 _0	Entstanden durch Gibson Assembly® mit dem mit Acc65I linearisierten Plasmid pJU45 und dem DNA Fragment sgRNA_Pdik6_0_0 (IDT)	Amp ^R , Cbx ^R
pJU77	pJU45 sgRNA_Pb1_1_ 1038	Entstanden durch Gibson Assembly® mit dem mit Acc65I linearisierten Plasmid pJU45 und dem DNA Fragment sgRNA_Pb1_1_1038 (IDT)	Amp ^R , Cbx ^R
pJU78	pJU45 sgRNA_Pb1_6_ 1557	Entstanden durch Gibson Assembly® mit dem mit Acc65I linearisierten Plasmid pJU45 und dem DNA Fragment sgRNA_Pb1_6_1557 (IDT)	Amp ^R , Cbx ^R

pJU79	pJU45 sgRNA_Pb1_11_1038	Entstanden durch Gibson Assembly® mit dem mit Acc65I linearisierten Plasmid pJU45 und dem DNA Fragment sgRNA_Pb1_11_1038 (IDT)	Amp ^R , Cbx ^R
pJU80	p123_BB GenR_leu2 Pdik6_816:GFP	Entstanden durch Gibson Assembly® mit dem mit NruI/NcoI linearisierten Plasmid p123 und den PCR Fragmenten die mit den Primern leu2_fwd und leu2_rev, GenR_rev und GenR_fwd, sowie Pdik6_816_fwd und Pdik6_816_rev amplifiziert wurden. Enthält den ORF von eGFP unter der Kontrolle des Pdik6 Promotors für eine homologe Integration in den <i>leu2</i> Locus, vermittelt Geneticin-Resistenz.	Amp ^R , Gen ^R
pJU81	p123_BB GenR_leu2 P11413:GFP	Entstanden durch Gibson Assembly® mit dem mit NruI/NcoI linearisierten Plasmid p123 und den PCR Fragmenten die mit den Primern leu2_fwd und leu2_rev, GenR_rev α (Pum11413) und GenR_fwd, sowie Pum11413_fwd und Pum11413_rev amplifiziert wurden. Enthält den ORF von eGFP unter der Kontrolle des Pum11413 Promotors für eine homologe Integration in den <i>leu2</i> Locus (Pf1MI), vermittelt Geneticin-Resistenz. Der Promotor kann mit SfiI, die Resistenzkassette mit DraIII ausgetauscht werden.	Amp ^R , Gen ^R
pJU82	pJU14 GFP	Entstanden aus einer Ligation mit dem mit AscI/SfiI linearisierten Plasmid pJU14 und einem AscI/SfiI Fragment aus pRU11_Hdp2:GFP. Enthält den ORF von <i>hdp1</i> mit C-terminal fusioniertem eGFP unter der Kontrolle des <i>crg1</i> -Promotors für die homologe Integration in den <i>ip</i> Locus	Amp ^R , Cbx ^R
pJU83	um10578 K.O. TOPO_NEW	Entstanden aus einer Ligation mit dem mit KpnI/MfeI linearisierten Plasmid pJU68 und einem mit KpnI/MfeI verdauten PCR Produkt das mit den Primern KpnI_10578NewLB_FW und 10578NewLB_Sfi_Mfe_RV von <i>Ustilago maydis</i> gDNA amplifiziert wurde. Ermöglicht die Amplifikation des UMAG_15078_NEW Deletionskonstrukts für <i>Ustilago maydis</i> Transformationen	Amp ^R , Gen ^R
pJU88	Hdp1 KO	Topoisomerase vermittelte Integration des Ligationsprodukts aus der Ligation eines SfiI geschnittenen 1 kb Fragments der 5'Flanke von <i>hdp1</i> , eines mit SfiI geschnittenen 1 kb Fragments der 3'Flanke von <i>hdp1</i> und der durch SfiI aus dem Vektor pUMa 1057 gewonnenen Geneticin-Resistenzkassette in den Vektor pCR2.1. Ermöglicht die Amplifikation des <i>hdp1</i> Deletionskonstrukts für <i>Ustilago maydis</i> Transformationen.	Amp ^R , Gen ^R
pJU89	pENTRY Cas9	Entry-Vektor aus einer GATEWAY®-BP in vitro Klonierung mit dem Vektor pDONR221 und einem PCR Produkt das mit den Primern Cas9-GW-FW und Cas9-GW-RV von pJU30 amplifiziert wurde. Enthält den für <i>Ustilago maydis</i> di-codon optimierten ORF von dCas9 mit C-terminal fusioniertem 3xHA -Tag und NLS, sowie N-terminal fusioniertem NLS unter der Kontrolle des Po2tef Promotors. Über Acc65I kann	Kan ^R

		desweiteren eine sgRNA unter der Kontrolle des PU6 Promotors eingebracht werden.	
pJU90	pExCas9_final_EV	Expressions-Vektor aus einer GATEWAY®-LR in vitro Klonierung mit den Plasmiden p123_BB_GW1 und pJU89. Enthält den für <i>Ustilago maydis</i> di-codon optimierten ORF von dCas9 mit C-terminal fusioniertem 3xHA -Tag und NLS, sowie N-terminal fusioniertem NLS unter der Kontrolle des Po2tef Promotors. Über Acc65I kann desweiteren eine sgRNA unter der Kontrolle des PU6 Promotors eingebracht werden. Für die homologe Integration in den ip Locus. Vermittelt Carboxin-Resistenz.	Amp ^R , Cbx ^R
pJU91	pExCas9 0_0	Entstanden durch Gibson Assembly® mit dem mit Acc65I linearisierten Plasmid pJU90 und dem DNA Fragment sgRNA_Pdik6_0_0 (IDT)	Amp ^R , Cbx ^R
pJU92	pExCas9 1_225	Entstanden durch Gibson Assembly® mit dem mit Acc65I linearisierten Plasmid pJU90 und dem DNA Fragment sgRNA_Pdik6_1_225 (IDT)	Amp ^R , Cbx ^R
pJU93	pExCas9 0_2	Entstanden durch Gibson Assembly® mit dem mit Acc65I linearisierten Plasmid pJU90 und dem DNA Fragment sgRNA_Pum11413_2_0 (IDT)	Amp ^R , Cbx ^R
pJU94	pExCas9 0_10	Entstanden durch Gibson Assembly® mit dem mit Acc65I linearisierten Plasmid pJU90 und dem DNA Fragment sgRNA_Pum11413_10_0 (IDT)	Amp ^R , Cbx ^R
pJU95	pExCas9 0_13	Entstanden durch Gibson Assembly® mit dem mit Acc65I linearisierten Plasmid pJU90 und dem DNA Fragment sgRNA_Pum11413_13_0 (IDT)	Amp ^R , Cbx ^R

AmpR: Ampicillin-Resistenz, KanR: Kanamycin-Resistenz, CmR: Chloramphenicol-Resistenz, CbxR – Carboxin-Resistenz, HygR – Hygromycin-Resistenz, GenR – Geneticin-Resistenz, NatR - Nourseothricin-Resistenz

1: Julia Fortenbacher Masterarbeit, 2: dCas9; deaktiviertes Cas9 mit den Mutationen H840A und D10A, 3: Julia Koch F3 Praktikum

Alle Klonierungsschritte wurden anhand von Restriktionsanalysen überprüft, eingebrachte PCR-Produkte wurden sequenziert.

4.1.4 Sonstige Materialien

Filterpapier 3MM (Whatman), Glasperlen 150-212 microns (Sigma), Roti®-Nylon plus Membran (Carl Roth) für den Transfer von DNA oder DNA-Proteinkomplexen (Sother-Blot; EMSA), Roti®-PVDF-Membran (Carl Roth) für den Transfervon Proteinen (Westernblot), Papierfilter (S&S 595), 1,5 ml-Reaktionsgefäße (Greiner,Eppendorf) und 2 ml-Reaktionsgefäße (Greiner), 0,2 ml PCR Reaktionsgefäße (Biozym), 96-well PCR-Platten (Biozym) für qRT-PCR, Standard Universal Pipettenspitzen (0,5-10 µl, 2-200 µl und 100-1000µl) (Carl Roth,Greiner), Kapillarspitzen (Biozym), Petrischalen (Greiner), 15 ml und 50 ml PPN-Röhrchen (Greiner),1,5 ml Polystyrol-Küvetten (Greiner), 0,20 µm Sterilfilter (Carl Roth), 1 ml Einmalspritzen (Dispomed). Falls nicht gesondert erwähnt, wurden alle weiteren verwendeten Labormaterialien bei den Firmen Carl-Roth, Hartenstein, Thermo Fischer, Biozym und NeoLab bezogen.

4.2 Mikrobiologische und genetische Methoden

4.2.1 *Escherichia coli*

Kultivierung von *E. coli*

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

Bestimmung der Zelldichte

Die Zelldichte von Flüssigkulturen wurde photometrisch in einem Pharmacia LKB Ultraspec III Photometer bei einer Wellenlänge von 600 nm bestimmt. Um eine lineare Abhängigkeit sicherzustellen, wurden für die Messung der OD₆₀₀ die Kulturen durch entsprechende Verdünnung auf einen Wert unterhalb von 0,5 verdünnt. Als Nullwert wurde die OD₆₀₀ des jeweiligen Kulturmediums verwendet, eine OD₆₀₀ = 1,0 entspricht etwa 10⁹ Zellen/ml.

RbCl-Transformation von *E. coli*

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

Zur Herstellung transformationskompetenter Bakterien-zellen wurden 100 ml LB-Medium, dem je 10 mM MgCl₂ und MgSO₄ zugesetzt wurde, mit 1 ml einer frischen TOP10-Übernachtskultur angeimpft und bis zu einer OD₆₀₀ = 0,5 bei 37°C und 180 Rpm inkubiert. Die Zellen wurden für 15 min bei 3.000 Rpm und 4°C pelletiert und in 33 ml eiskalter RF1-Lösung resuspendiert. Nach 30 bis 60 min Inkubation auf Eis wurden die Zellen erneut abzentrifugiert (15 min, 3.000 Rpm, 4°C), der Überstand abgenommen, die Zellen in 5 ml eiskalter RF2-Lösung resuspendiert und 15 min 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 5-30 min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock von 60 sec bei 42°C wurde der Transformationsansatz zur phänotypischen Expression der durch das eingebrachte Plasmid vermittelten Antibiotikum-Resistenz mit 500 µl dYTMedium versetzt und 30 min bei 500 Rpm und 37°C in einem Eppendorf-Wärmeblock inkubiert. 200µl des Transformations-ansatzes wurden auf YT-Platten mit 100 µg/ml Ampicillin ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Auf diese Weise konnte eine Transformationsrate von 10⁶ Transformanden pro 1 µg eingesetzter Plasmid-DNA erreicht werden.

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 H₂Obid. mit Essigsäure auf pH 5,8
eingestellt und sterilfiltriert.

RF2-Lösung:

10 mM MOPS
10 mM RbCl
75mM CaCl₂ x 2 H₂O
15 % (v/v) Glycerin
in H₂Obid. mit NaOH auf pH 6,5
eingestellt und sterilfiltriert.

Expression rekombinanter Proteine in *E. coli*

modifiziert nach *pGEX-2T GST Expression Vektor Manual* (GE Healthcare) und *pET System Manual 11th Edition* (Novagen)

Zur heterologen Expression von Rbf1, bzw. der Zinkfingerdomäne von Rbf1, mit GST-Tag wurden die Plasmide pJU9 bzw. pGEX_Rbf1ZF in *E. coli* BL21(DE3) und RosettaTM verwendet. Dazu wurden kompetente Zellen wie oben beschrieben transformiert und die Expression induziert. Als Kontrollen dienten jeweils mit Leervektor (pGEX-2T) transformierte Stämme und Wildtypstämme. Es wurde jeweils ein Klon einer frischen Transformation in 2 ml dYT-Flüssigmedium mit entsprechenden Antibiotika überführt und über Nacht bei 37°C mit 180 Rpm inkubiert. Am nächsten Tag wurden in Schikanenkolben jeweils 50 ml dYT-Flüssigmedium mit entsprechenden Antibiotika mit 500 µl der Vorkultur beimpft (1:100) und ca. 2 Stunden bei 37°C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6 geschüttelt. Durch Zugabe von 250-500 µl 0,1M IPTG (Endkonzentration: 0,5-1mM) wurde die Proteinexpression gestartet. Die Expressionskultur wurde 4 h bis über Nacht bei RT, 28 oder 37°C inkubiert. Es wurde jeweils 1 ml Probe vor der Induktion und 30, 60, 180 und 240 min bzw. ca. 18 Stunden nach der Induktion entnommen und Zellen wurden durch Zentrifugation (13.000 Rpm, 1 min, Heraeus Biofuge pico) geerntet. Vor der Probeentnahme wurde die optische Dichte bestimmt. Anschließend wurden die Zellen aufgeschlossen (4.4.2) und durch einen Westernblot (4.4.6) auf die Expression von Rbf1 getestet. Die genauen Expressionsbedingungen müssen für jedes Protein individuell ermittelt werden. Zur Expression in präparativem Maßstab wurden 200 ml Kultur bei einer OD₆₀₀ von 0,6 induziert. Aus dem so gewonnenen Protein Lysat konnte anschließend Rbf1 über den GST-Tag aufgereinigt werden und stand somit weiteren Experimenten zur Verfügung.

4.2.2 *Ustilago maydis*

Kultivierung von *Ustilago maydis*

Ustilago maydis-Stämme wurden standardmäßig entweder als Schüttelkulturen bei 200 Rpm oder auf Festmedien unter aeroben Bedingungen bei 28 °C kultiviert. Übernachtskulturen wurden entweder aus bei -80 °C gelagerten Glycerinkulturen oder von bewachsenen PD- oder CM- Platten, die weniger als einen Monat bei 4 °C gelagert waren, angeimpft. Zur langfristigen Lagerung von Stämmen wurden Glycerinkulturen aus 50 % NSY-Glycerin, 50 % Yeps light-Übernachtskultur bei -80°C gelagert.

Bestimmung der Zelldichte von *Ustilago maydis* Kulturen

Die Zelldichte von Flüssigkulturen wurde photometrisch in einem Pharmacia LKB Ultraspec III Photometer bei einer Wellenlänge von 600 nm bestimmt. Um eine lineare Abhängigkeit sicherzustellen, wurden für die Messung der OD₆₀₀ die Kulturen durch entsprechende Verdünnung auf einen Wert unterhalb von 0,4 verdünnt. Als Nullwert wurde die OD₆₀₀ des jeweiligen Kulturmediums verwendet, eine OD₆₀₀ = 1,0 entspricht etwa 1-5 x 10⁷ Zellen/ml.

Induktion von Stämmen (Expression rekombinanter Proteine)

Die zu induzierenden Stämme wurden aus Vorkulturen in Flüssigmedien angeimpft, die reprimierende Bedingungen boten (im Falle des *crg1*-Promotors mit Glukose als einziger

Kohlenstoffquelle) und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 bis 0,8 bei 28°C und 180 Rpm inkubiert. Die Zellen wurden daraufhin abzentrifugiert (3.500 Rpm, 5 min, RT), der Überstand verworfen und die Zellen in gleichem Volumen H₂O_{bid.} resuspendiert. Nach erneuter Pelletierung wurden die Zellen in Flüssigmedium resuspendiert, das induzierende Bedingungen bot (im Falle des *crg1*-Promotors mit Arabinose als einziger Kohlenstoffquelle). Die Kulturen wurden dann bei 28°C und 180 Rpm für die erforderliche Zeit inkubiert. Für die Probenentnahme zur Isolation von RNA oder Proteinen wurde die Kultur abzentrifugiert (3.500 Rpm, 5 min, RT), der Überstand dekantiert und die Zellpellets in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Zellpellets können einige Monate bei -80°C gelagert werden.

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

Herstellung von Protoplasten von *U. maydis*

Von einer auf Platte wachsenden Kultur wurde eine 10 ml YEPSlight-Flüssigkultur angesetzt und für 8-10 h bei 28 °C geschüttelt. Diese Vorkultur wurde anschließend in 50 ml frischem YEPSlight-Medium verdünnt und bei 28 °C bis zu einer Zelldichte von 1 - 2 x 10⁷ Zellen/ml (bis OD₆₀₀ = 0,6-1,0) geschüttelt. Nach Erreichen des optimalen Zelltiters wurden die Zellen durch Zentrifugation (3.500 Rpm, 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) Novozym oder 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 Rpm 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). 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 Rpm. Zellen wurden in 500 µl STC-Puffer resuspendiert und auf Eis gehalten, je 50 µl Zellen wurden in 2-ml Reaktionsgefäße portioniert. 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 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.

Antibiotika Konz. in Bottom Agar Platten:

Carboxin: 4 µg/ml
Hygromycin: 400 µg/ml
Nourseothricin: 100 µg/ml
Geneticin: 1000 µg/ml

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 $OD_{600} = 0,5$ angezogen. Die Zellen wurden pelletiert (13.000 Rpm, 1 min, RT) und in $H_2O_{bid.}$ aufgenommen, und die Zelldichte auf eine $OD_{600} = 1,0$ eingestellt. Bei Ko-Inokulationen wurden gleiche Volumina beider Kreuzungspartner in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß gemischt. Von jedem Ansatz wurden 3-5 µl auf eine CM- -Platte mit Aktivkohle getropft. Die Platte wurde mit Parafilm versiegelt und für 24-48 h bei 22°C inkubiert.

Pflanzeninfektionen

Für Pathogenitätstests wurde eine Spritzinfektion verwendet, bei der 300 µl einer Pilzsuspension in das Innere des Blattwirtels sieben Tage alter Maispflanzen (Early Golden Bantam) injiziert wurden. Die entsprechenden Stämme wurden in $YEPS_{light}$ -Flüssigmedium bis zu einer $OD_{600} = 0,8$ angezogen, durch Zentrifugation (3000 Rpm, 5 min, RT) pelletiert und in $H_2O_{bid.}$ aufgenommen ($OD_{600} = 3,0$). Für Kreuzungen wurden die kompatiblen Stämme vor der Infektion 1:1 gemischt. Die Bonitur erfolgte 7 Tage nach Infektion.

DAPI-Färbung

Um Zellkerne anzufärben wurden den zu untersuchenden Zellen etwa 20 µl einer 4', 6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI) Färbelösung (Vectashield) zugegeben. Für die fluoreszenzmikroskopische Betrachtung der Zellkerne wurde ein Filter mit einem Anregungsspektrum von 358 nm und einem Emissionsmaximum von 461 nm eingesetzt.

Mikroskopie und Bildverarbeitung

Die zellmorphologische Betrachtung von *U. maydis* erfolgte an einem Lichtmikroskop (Axiophot oder AxioImager 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 ($OD_{600} = 0,3-0,5$) in CM-Glucose oder CM-Arabinose Medium wurden zur Analyse auf Agarose-beschichtete Objektträger getropft oder die Zellen wurden auf dem Objektträger durch Trocknen an der Luft auf dem Objektträger fixiert. Für die Fluoreszenzmikroskopie wurden Filter mit folgendem Anregungs- und Emissionsspektrum eingesetzt: eGFP: 450-490 nm und 515-565 nm, DAPI: 365 nm und 397 nm. 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).

Platereader GFP-Fluoreszenzmessung

Auf eine 96 Well Platte wurden je 200 μl der auf eine optische Dichte von 1,0 eingestellten Proben á 10 Replikate aufgetragen. Als Blank wurde in jeder Spalte zweimal 200 μl $\text{d}_2\text{H}_2\text{O}$ verwendet. Nach Befüllen der Platte wurde diese mit optischem Verschlussband versiegelt. Mit dem EnSpire Multimode Plate Reader wurden die Zelldichte durch Absorptionsmessungen mit der Wellenlänge 600nm mit 100 *flashes*, sowie die GFP-Fluoreszenz durch Absorptionsanregungen mit der Wellenlänge 488 nm und anschließenden Emissionsmessungen der Wellenlänge 509 nm mit 500 *flashes* bestimmt. Die gemessenen Zelldichten der Proben wurden mit der Absorption des Wasser Blanks normalisiert. Anschließend konnten die gemessenen GFP-Signale der Proben mit den normalisierten Zelldichten normalisiert werden. Von diesen normalisierten GFP-Signalen wurde der Durchschnittswert der normalisierten GFP-Signale der negativ Kontrolle abgezogen und die Durchschnittswerte der Replikate für jede Probe errechnet. Der Durchschnittswert für jede Probe stellt die jeweilige relative GFP-Signalstärke dar.

4.3 Molekularbiologische Standardmethoden

4.3.1 Isolierung von Nukleinsäuren

Präparation von Plasmid-DNA aus *E.coli*

(Sambrook *et al.*, 1989)

Die Isolierung erfolgte durch "Lyse durch Kochen" nach. 1,5 ml einer *E.coli*-Übernachtskultur wurden 30 sec bei 14.000 Rpm (RT, Heraeus Biofuge pico) pelletiert. Das Zellpellet wurde in 350 µl STET resuspendiert, nach Zugabe von 25 µl Lysozym-Lösung kräftig geschüttelt und anschließend 45 sec bei 95°C in einem Eppendorf-Heizblock inkubiert. Die lysierten Zellen und die denaturierte genomische DNA wurden 10 min bei 14.000 Rpm abzentrifugiert (Heraeus Biofuge pico) und danach mit einem sterilen Zahnstocher aus der wässrigen Lösung entfernt. Die Reinigung der Plasmid-DNA erfolgte durch Fällung mit 40 µl 3 M Na-Acetat, pH 5,3 und 420 µl Isopropanol bei RT für 5 min und anschließender Zentrifugation für 5 min bei 14.000 Rpm (Heraeus Biofuge pico). Das Pellet wurde mit 70 % Ethanol gewaschen und nach Trocknung in 50 - 100 µl TE-Puffer mit 50 µg/ml RNase A aufgenommen. Mit dieser Methode gelang es routinemäßig, aus 1,5 ml Übernachtskultur etwa 50 µg Plasmid-DNA zu isolieren.

STET-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 1 x TE-Puffer

Minilysat(III)-Lösung

3 M NaAc,
pH 4,8 in H₂O_{bid.}

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

Diese Methode orientiert sich am Protokoll der Trizol Herstellerfirma (Invitrogen) und wurde zur Präparation von Gesamt-RNA aus *Ustilago maydis* Flüssigkulturen verwendet. Es wurde ausschließlich Nuklease-freies Verbrauchsmaterial verwendet. 50 ml Zellkultur (auch induzierte Kulturen) wurden in CM-Medium bis zu einer OD₆₀₀ = 0,5 angezogen und pelletiert (3.500 Rpm, 5 min, RT, Heraeus Multifuge 4 KR). Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in flüssigem Stickstoff schockgefroren (ggf. wurde das Pellet bei -80°C gelagert). Auf das tiefgefrorene Pellet wurden 2 ml Trizol (Invitrogen) pipettiert, dieser Ansatz kurz gevortext und nach Zugabe von ca. 300 mg Glasperlen (150-200 µm Ø) wurden die Zellen in einer Kugelmühle (Retsch) bei 30 Hz aufgeschlossen. Der Zellaufschluss wurde in zwei frische 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt, um die Glasperlen aus dem Ansatz zu entfernen. Nach fünfminütiger Inkubation bei RT wurden pro Ansatz (ein ml Trizol) 200 µl Chloroform zugesetzt, kurz gevortext und drei Minuten bei RT inkubiert. Nach Zentrifugation (15 min, 13.000 Rpm, RT, Heraeus Biofuge pico) wurde die wässrige Phase abgenommen, in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und nach Zugabe von 500 µl Isopropanol für mindestens zehn Minuten bei RT gefällt. Nach erneuter Zentrifugation (15 min, 13.000 Rpm, RT, Heraeus Biofuge pico) wurde die pelletierte RNA mit 75 % Ethanol gewaschen und erneut zentrifugiert (5 min, 13.000 Rpm, RT, Heraeus Biofuge pico). Der Überstand wurde verworfen und das RNA-Pellet wurde für fünf Minuten bei RT getrocknet, anschließend in 50 µl Nuklease-freiem Wasser (Ambion) aufgenommen und für zehn Minuten bei 55°C in einem Eppendorf-Heizblock

gelöst. Eine Qualitäts- und Quantitätskontrolle erfolgte durch photometrische Messung am NanoDrop ND-1000 Spektrophotometer sowie durch Analyse auf einem Agilent 2100-Bioanalyser (siehe Angaben des Herstellers).

4.3.2 Handhabung von Nukleinsäuren

Fällung von DNA

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

Alternativ erfolgte eine Fällung durch Zugabe eines halben Volumen einer 30 % PEG 8000/30 mM MgCl₂ Lösung. Die Mischung wurde gründlich gemischt, 15 min bei RT inkubiert und das Präzipitat durch Zentrifugation pelletiert (13000 Rpm, 15 min, Heraeus Biofuge pico). Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und das Pellet in TE-Puffer gelöst.

Phenol/Chloroform-Extraktion von DNA

Proteine und andere Verunreinigungen wurden aus wässrigen DNA-Lösungen durch Extraktion mit Phenol entfernt. Die Probe wurde mit gleichem Volumen TE-Phenol kräftig gemischt. Die Phasentrennung erfolgte durch Zentrifugation (13.000 Rpm, 5 min, Heraeus Biofuge pico) und die obere wässrige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt. In einem zweiten Schritt wurde die Probe mit dem gleichen Volumen PC ausgeschüttelt (Sambrook *et al.*, 1989). Die so gereinigten Nukleinsäuren wurden anschließend mit Ethanol präzipitiert (s.o.).

Konzentrationsbestimmung von DNA

Die Konzentration von Nukleinsäuren wurde photometrisch bestimmt. Bei einer Wellenlänge von 260 nm und einer Schichtdicke von 1 cm entspricht ein Absorptionswert von 1 einer Konzentration von etwa 50 µg/ml doppelsträngiger DNA und 33 µg/ml einzelsträngiger DNA. Als Maß für die Reinheit der Desoxyribonukleinsäuren diente der Quotient aus den optischen Dichten bei den Wellenlängen 260 nm und 280 nm. Für reine DNA sollte er bei etwa 1,8 liegen. Niedrigere Werte deuten Verunreinigungen mit Proteinen, höhere Werte zeigen Verunreinigungen mit Salzen oder Zuckern an.

Alle Messungen erfolgten an einem Nanodrop-ND1000-Spektralphotometer.

Zur Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren in geringen Konzentrationen (10 pg/µl–100 ng/µl) wurde das Qbit® dsDNA HS Assay Kit (Invitrogen) verwendet.

4.3.3 In vitro-Modifikationen von DNA (Sambrook *et al.*, 1989)

Restriktion von DNA

Zur Spaltung von doppelsträngiger DNA wurden Typ II-Restriktionsendonukleasen unter den vom Hersteller empfohlenen Pufferbedingungen eingesetzt.

Ein analytischer Ansatz enthielt:

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

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

Dephosphorylierung linearer DNA-Fragmente

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

Ein typischer Reaktionsansatz enthielt:

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

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

Auffüllen von 5'-überhängenden DNA-Fragmentenden

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

Ein typischer Reaktionsansatz enthielt:

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

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

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

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

Ein typischer Reaktionsansatz enthielt:

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

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

Ligation von DNA-Fragmenten

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

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

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

GATEWAY® BP Clonase Reaktion

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

1-7 µL attB-PCR-Produkt
1 µL pDONR221 (150 ng/µl)
8 µL TE Puffer, pH 8.0
2 µL Clonase II Enzym Mix
Inkubation für 1 – 12 h bei RT.

Für eine Standard-Reaktion erfolgte die Zugabe von 1 µL Proteinase K Lösung und 10 min Inkubation bei 37 °C, anschließend erfolgte die Transformation von 1 µL der Klonasereaktion in *E. coli*. Für eine „OneTube“-Reaktion erfolgte keine Addition von Proteinase K, stattdessen wurde der Ansatz direkt in eine LR-Reaktion eingesetzt.

GATEWAY® LR Clonase Reaktion

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

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

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

Auftrennung und Nachweis von DNA-Fragmenten

Nicht-denaturierende Agarose-Gelelektrophorese

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

Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

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

4.4 Biochemische Methoden

4.4.1 Isolierung von Gesamtprotein

A: *Ustilago maydis*

Analytischer Maßstab

Gesamtprotein aus *Ustilago maydis* wurde aus etwa 50 ml Flüssigkultur bei OD₆₀₀ 0,6-0,8 durchgeführt. Die Zellen wurden pelletiert (3.500 rpm, 4 min, Thermo Scientific Sorvall RC 6+ Zentrifuge), dreimal mit TBS gewaschen und schließlich in 1,5 ml IP Puffer (nach Pierce) mit Proteinase-Inhibitoren aufgenommen. Diese Suspension wurde in die mit flüssigem Stickstoff vorgekühlten metallene Mahlbecher (25 ml, MM200, Retsch) überführt, in denen sich zwei Mahlkugeln (Ø 10 mm rostfrei, Retsch) befanden. Die Zellen wurden in der Schwingmühle (MM200, Retsch) für 5 min bei einer Frequenz von 30 Hz geöffnet. Das Zellextrakt wurde auf Eis aufgetaut, in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt und für 30 Minuten bei 22.000 Rpm (Heraeus Biofuge stratos) und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde in frische Reaktionsgefäße überführt und bei -20°C weggefroren oder mit der entsprechenden Menge Laemmli-Puffer versetzt und für die Auftrennung in SDS-haltigen Polyacrylamid-Gelen weiterverwendet. Als Proteinase-Inhibitor wurde in der Regel 1x Complete EDTA-free (Roche) verwendet.

Präparativer Maßstab

Zur Isolation von Gesamtprotein aus *Ustilago maydis* in präparativem Maßstab wurde 500 ml Flüssigkultur bei OD₆₀₀ 0,6-0,1 in zwei Durchgängen bei 3500 Rpm abzentrifugiert (Thermo Scientific Sorvall RC 6+ Zentrifuge). Der dabei entstandene Überstand wurde verworfen. Das Zellpellet wurde zum Waschen in 50ml PBS aufgenommen und anschließend in ein 50ml Greiner Gefäß überführt. Nach einem weiteren Zentrifugierschritt (3500 Rpm, 8 min, Heraeus Laborfuge 400R) wurde der Überstand entfernt und die sauberen Zellen in 5ml IP Puffer (nach Pierce) mit Proteinase-Inhibitoren aufgenommen. Die Zellen wurden in einer French Press (American instrument company) bei einem Druck von 1.500 PSIG in drei Durchgängen aufgeschlossen. Das resultierende Zellysat wurde in 1,5ml Eppendorf Reaktionsgefäße überführt und in einer Heraeus Biofuge stratos bei 22.000 Rpm für 30 min pelletiert. Der Überstand enthält lösliche Proteine und kann bei -20°C gelagert werden. Als Proteinase-Inhibitor wurde in der Regel 1x Complete EDTA-free (Roche) verwendet.

IP-Puffer

25 mM Tris-HCl

150 mM NaCl

1 mM EDTA

1 % NP-40

5 % Glycerol

Mit H₂O_{bid.} angesetzt und pH-Wert auf 7.4 eingestellt

B: *E. coli***Analytischer Maßstab**

modifiziert nach *pET System Manual 11th Edition* (Novagen)

Die Isolierung von löslichen Proteinen aus dem Cytoplasma erfolgte durch rLysozym Behandlung und wiederholtes Einfrieren und Auftauen. Geerntete Zellpallets wurden dabei bei -80°C komplett eingefroren und bei RT in *E.coli*-Lysispuffer mit Proteaseinhibitoren durch Auf- und Abpipettieren resuspendiert. Dabei wurden 7 ml Lysispuffer pro 1 g Zellpallet verwendet. Da die verwendeten *E. coli* Stämme BL21 und Rosetta™ die Plasmide pLysS bzw. pLysE enthalten, muss kein Lysozym zugegeben werden. Die Suspension wurde mehrmals eingefroren und aufgetaut. Anschließend wurde 1 µl DNase pro OD₆₀₀ von 0,5 zugegeben und inkubiert (950 rpm, RT, 20 min, Thermomixer comfort, Eppendorf). Als Proteinase-Inhibitor wurde in der Regel 1x Complete EDTA-free (Roche) verwendet.

Das Einfrieren und Auftauen zerstört die Zellmembran und erlaubt so rLysozym den Zugang zur Zellwand.

Unlösliche Proteine und Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation (22.000 Rpm, 4°C, 30 min, Heraeus Biofuge stratos) abgetrennt und der Überstand in ein frisches 1,5 ml Eppendorf-Gefäß transferiert. Das so gewonnene Protein-Lysat kann bei -20°C aufbewahrt werden.

Optimale Expressions- und Aufschlussbedingungen wurden durch eine SDS-PAGE Analyse (4.4.4) mit anschließendem Westernblot (4.4.6) ermittelt.

Präparativer Maßstab

Zur Expression in präparativem Maßstab wurden 200 ml Kultur bei einer OD₆₀₀ von 0,6 induziert. Die Zellen wurden dann in einer Thermo Scientific Sorvall RC 6+ Zentrifuge in zwei Durchgängen bei 3500 Rpm abzentrifugiert. Der dabei entstandene Überstand wurde verworfen. Das Zellpellet wurde zum Waschen in 50ml ddH₂O aufgenommen und anschließend in ein 50ml Greiner Gefäß überführt. Nach einem weiteren Zentrifugierschritt bei 3500Rpm in einer Heraeus Laborfuge 400R wurde der Überstand entfernt und die sauberen Zellen in 3 ml *E.coli*-Lysispuffer mit Proteaseinhibitoren pro 1 g Zellpallet aufgenommen. Die Zellen wurden in einer French Press (American instrument company) bei einem Druck von 1.500 PSIG in drei Durchgängen aufgeschlossen. Das resultierende Zelllysate wurde in 1,5ml Eppendorf Reaktionsgefäße überführt und unlösliche Proteine und Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation (22.000 Rpm, 4°C, 30 min, Heraeus Biofuge stratos) abgetrennt. Der Überstand wurde in ein frisches 1,5 ml Eppendorf-Gefäß transferiert. Als Proteinase-Inhibitor wurde in der Regel 1x Complete EDTA-free (Roche) verwendet. Das so gewonnene Protein-Lysat kann bei -20°C aufbewahrt oder weiter analysiert bzw. aufgereinigt werden.

***E.coli*-Lysispuffer**

50 mM Tris-HCl

5 % glycerol

50 mM NaCl

1 mM EDTA

Mit H₂O_{bid.} angesetzt und pH-Wert auf 7.4 eingestellt

4.4.3 Aufreinigung und Analyse von Proteinen und Proteinkomplexen

Immunoprecipitation (pull-down) von Proteinkomplexen aus *E. coli*

100 µl einer mit Glutathion gekoppelten *Magnetic Beads* Lösung (Pierce 88821) wurden in einem 1,5ml Eppendorf Reaktionsgefäß dreimal mit 300 µl Waschpuffer. Die Waschung erfolgte durch das Zugeben des Puffers und der anschließenden Invertierung des Reaktionsgefäßes (10 bis 15x). Anschließend wurden die Magnet-Beads auf einem *Magnetic-Stand* gesammelt und der Überstand verworfen. 50 µl des proteinhaltigen Überstands aus der Gesamtproteinpräparation wurde mit 250 µl Bindepuffer gemischt und auf die vorgereinigten Magnet Beads gegeben und bei 4°C auf einem vertikalen Drehrad für eine Stunde inkubiert. Anschließend wurden die Magnet-Beads erneut auf einem *Magnetic-Stand* gesammelt. Der Überstand wurde aufbewahrt (Durchfluss). Die Magnet-Beads wurden dreimal mit 300 µl Waschpuffer gewaschen, Überstände wurden jeweils aufbewahrt (Wasch1-3). Um die gebundenen Proteine von dem, an die Magnet-Beads gekoppelten, Glutathion zu lösen, wurde 200 µl Elutionspuffer hinzugegeben und fünf Minuten bei RT auf einem Thermomixer comfort der Firma Eppendorf bei 950 Rpm geschüttelt. Das resultierende „saubere“ Proteingemisch wurde direkt im EMSA (4.4.7) eingesetzt oder bei -20°C eingefroren. Als Kontrolle wurden Überstände der einzelnen Fraktionen (Input, Durchfluss, Waschschriffe, Eluat und übrige Magnet-Beads) mit der entsprechenden Menge 4x Laemmli Puffer (Roth) versetzt und 3 min bei 95°C aufgekocht. Mit diesen Proben wurde eine SDS-Page und anschließende Silber- oder Coomassiefärbung durchgeführt.

Wasch-/Bindepuffer

125mM Tris, pH 8.0
150mM NaCl

Elutionspuffer (frisch herstellen)

50mM reduziertes Glutathion (Roche)
In Wasch-/Bindepuffer

Immunoprecipitation (pull-down) von Proteinkomplexen aus *Ustilago maydis*

50 µl Pierce™ Anti-HA-gekoppelte magnetische Beads (Thermo Scientific) wurden dreimal mit PBS (1 ml) und anschließend mit 1 ml IP-Puffer mit 1xPI gewaschen. Nach Zugabe von 500 µl Proteinlysate 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 Waschschriffe 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 Waschschriffe vereint. Der gesamte Überstand wurde abgenommen und die Beads in 40 µl 1x Lämmli-Probenpuffer 3 Minuten bei 85 °C aufgekocht. Das aufgekochte Lysat wurde abgenommen und kann so bei -20 °C aufbewahrt werden. 18 µl der aufgekochten Probe wurde auf ein 10 %-iges Polyacrylamidgel aufgetragen (4.4.4.). Als Inputkontrolle wurde jeweils 1/10 der für die IP eingesetzten Proteinmenge aufgetragen.

Eine sanftere Elution am Ende der Co-IP ist für manche Antikörper Kombinationen und für nachfolgende LC-MS von Vorteil. Hierbei werden die an die Beads gekoppelten Antikörper nicht mit eluiert und verursachen bei der folgenden Applikationen keine Kreuzreaktionen. Für die Elution wurden die fertig Immunopräzipitierten Beads in 100 µl TE 1 % SDS aufgenommen und bei 65°C für 10 Minuten und 950 rpm auf einem Heizblock inkubiert. Der Überstand wurde

abgenommen und der Elutionsschritt wiederholt, hierbei wurden die Eluate vereint. Anschließend kann das Eluat mittels der Chloroform-Methanol Proteinfällung präzipitiert werden.

Um die gebundenen Proteine von dem an die Agarose gebundenen Antikörper zu lösen, ohne sie zu denaturieren, wurde den Beads 20 µl einer HA-Peptidlösung (2,5mg/ml in PBS) zugegeben. Die Elution erfolgte in einem Thermomixer comfort der Firma Eppendorf bei 30°C für 40min. Dabei wurde das Gerät so eingestellt, dass alle 60s ein Schüttelschritt von 5s bei 1000Rpm erfolgte. Dieser Schüttelschritt verhinderte das Absetzen der Agarose. Um die Proteinlösung von der Anti HA-Agarose zu trennen, wurde das Gemisch nun über eine zweifach mit IP-Puffer (nach Pierce) gewaschene Mobitec T100 Säule aufgereinigt. Für alle Waschschriffe und die folgende Proteinreinigung wurde die Säule je 1min bei 8000 Rpm zentrifugiert (Heraeus Biofuge pico). Das resultierende aufgereinigte Proteingemisch wurde direkt im EMSA (4.4.7) eingesetzt oder bei -20°C eingefrohren.

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 Rpm, 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 gevortext und bei 4°C abzentrifugiert (13.000 Rpm, 10 Minuten). Das Protein bildet nun ein Pellet. Der Überstand kann abgenommen werden, das restliche Methanol muss abdampfen, bevor das Pellet in 40 µl 1xLämmli-Probenpuffer 3 Minuten bei 85°C gelöst werden kann.

In-Gel Trypsinverdau von Proteinen nach (Shevchenko et al., 1996)

Die betreffenden Proben wurden zunächst in die Taschen eines 10 %-igen SDS-Gels geladen und bei 100 V so lange aufgetrennt, bis die Lauffront 1,5 bis 2 cm in das Trenngel eingelaufen ist (vgl. 4.4.4). Dabei wurden die Proben immer mit mindestens einer Tasche Abstand beladen, um eine Vermischung der Proben zu verhindern. Anschließend wurde die Elektrophorese gestoppt. Um die Proteine im Gel zu fixieren wurde das Gel mit Fixierlösung überschichtet und für 1 h bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Fixierlösung verworfen und durch ddH₂O_{bid.} ersetzt. Die Inkubation erfolgte für mindestens 30 min bei RT oder ÜN bei 4°C. Jede Gelspur mit Probe wurde anschließend in acht Stücke geschnitten, horizontale Begrenzungen bildeten dabei der Lauf-/Trenngelrand bis zur Lauffront, vertikale Begrenzung jeweils der Rand der anschließenden Taschen (frische Skalpellklinge je Probe). Die Gelstücke wurden in je ein 1,5ml Eppendorf Gefäß überführt und mit 200 µl Acetonitril (Roth) überschichtet. Die Inkubation erfolgte für 10 min bei RT. Um die Gelstücke komplett zu trocknen wurde der Überstand verworfen und die Stücke in der Speed Vac bei hoher Temperatur für 20 min inkubiert. Zur Reduzierung der Proben wurden 300 µl DTT (in 100 mM Ammoniumhydrogencarbonat (Roth)) zugesetzt. Die Inkubation erfolgte für 1 h bei 56°C. Nach dem Entfernen des Überstandes wurden die Proben mit 300 µl 55 mM Iodocetamid (in 100 mM Ammoniumhydrogencarbonat (Roth)) alkyliert. Dies geschah bei RT im Dunkeln für 45 min. Nach dem Entfernen des Überstandes wurden 300 µl 100 mM Ammoniumhydrogencarbonat zugesetzt und für 10 min bei RT inkubiert. Der Überstand wurde

verworfen. Es wurden nun 300 µl Acetonitril (Roth) zugesetzt und erneut für 10 min bei RT inkubiert. Die Waschschritte mit Ammonium Hydrogencarbonat und Acetonitril wurden ein weiteres Mal wiederholt. Anschließend konnten die Gelstücke erneut bei hoher Temperatur in der Speed Vac getrocknet werden (20 min). Nun wurden 150 µl Trypsinlösung (25 µg Trypsin in 80 µl Promega Resuspension Buffer, 1:20 mit 100 mM Ammoniumhydrogencarbonat verdünnt) zugegeben. Die Inkubation erfolgte für 45 min auf Eis. Die überschüssige Trypsinlösung wurde verworfen. Für die anschließende Inkubation ÜN bei 37°C wurden die Gelstücke mit 100 µl 50 mM Ammoniumhydrogencarbonat überschichtet. Die Proben wurden nun kurz mit 13000 Rpm pelletiert und der Überstand (enthält Peptide) je in ein neues 1,5ml Eppendorf Reaktionsgefäß überführt. Anschließend wurden 70 µl 20 mM Ammoniumhydrogencarbonat auf die Gelstücke gegeben. Die Inkubation erfolgte für 10 min bei RT. Der Überstand wurde dann mit dem vorherigen vereint. Nun wurden 90µl einer Lösung aus 50 % Acetonitril, 5 % Ameisensäure (Roth) zu den Gelstücken gegeben. Nach einer 20 minütigen Inkubation bei RT wurde erneut kurz bei 13000 Rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde erneut mit den vorherigen vereint. Dieser Extraktionsschritt wurde so lange wiederholt (mindestens 2 mal), bis die Gelstücke innen weiß wurden. Nachdem alle Überstände vereint waren, konnte die Peptidlösung vollständig eingetrocknet werden. Dies erfolgte in der Speed Vac für ca. 5h (je nach Menge) bei höchster Temperatur. Die gewonnen Peptidpellets konnten nun verschickt werden. Die anschließenden massenspektroskopischen Analysen wurden mit unseren Kooperationspartnern in Göttingen durchgeführt (siehe unten).

Massenspektroskopische Anlyse (LC-MS)

RSLCnano Ultimate 3000 system und Q Exactive HF

Die durch den Trypsin-Verdau entstandenen Peptidpallets wurden zunächst mit der C18 stage tipping Methode aufgereinigt (Rappsilber *et al.*, 2003), (Rappsilber *et al.*, 2007). Die dadurch entstandene Peptidlösung wurde über einen Vacuum-Konzentrator vollständig getrocknet und in Probenpuffer (2 % Acetonitril, 0.1 % Ameisensäure) für die LC-MS Analyse aufgenommen. Diese wurde mit einer Nanoflow-Flüssigchromatographie, gekoppelt mit einem Nano-Elektrospray Massenspektrometer durchgeführt. Dazu wurden 4 µl Peptidlösung auf eine Acclaim® PepMAP RSLC Säule (75 µm x 50 cm (#164540), C18, 3 µm, 100 Å, Thermo Fisher Scientific) mit 0.07 % Trifluoressigsäure bei einer Durchflussrate von 20 µl/min für 3 min geladen. Die Peptide wurden mittels Reversed-Phase Chromatographie über eine Acclaim® PepMAP RSLC Säule (75 µm x 50 cm (#164540), C18, 3 µm, 100 Å, Thermo Fisher Scientific) mit einem Gradienten von 96 % Lösungsmittel A (0.1 % Ameisensäure) und 4 % Lösungsmittel B (80 % Acetonitril, 0.1 % Ameisensäure) bis 45 % Lösungsmittel B für 82 min und anschließend in 90 % Lösungsmittel B für 12 min und einem Kontrastfluss von 3 min in 90 % Lösungsmittel B aufgetrennt. Die Flussrate des Gradienten betrug dabei 300 nl/min. Eluierende Proteine wurden on-line durch Nanoelektro-Spray bei 1.5 kV mit einer Nanospray Flex™ Ionenquellen (Thermo Fisher Scientific) ionisiert und stetig in das Massenspektrometer (Q Exactive HF, Thermo Scientific) überführt. Full scans wurden für einen Massenbereich von 300-1,800 m/z mit einem Orbitrap-FT Analyzer bei einer Auflösung von 60,000 und paralleler data-dependent top 10 MS2-Fragmentierung (HCD) durchgeführt. Die Auflösung der dd-MS2 scans betrug 15,000. Programmierung und Datenerfassung wurde mit der XCalibur 4.0 Software (Thermo Scientific) durchgeführt.

4.4.4 Auftrennung und Nachweis von Proteinen (SDS-PAGE)

Zur Auftrennung von Proteinen wurde die Methode der diskontinuierlichen SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) angewendet (Laemmli, 1970). Als Laufkammer diente eine Mini Protean II Apparatur (BioRad). Die Auftrennung erfolgte bei 25 mA (pro Gel) für 25-30 Minuten bis die Auftragspufferbande die Trenngel-Schicht erreicht hatte. Die Auftrennung im Trenngel erfolgte standardmäßig bei 40 mA für 45 Minuten oder bei 30 mA (pro Gel) für 60 Minuten. Standardmäßig wurden Gele mit 10 % Acrylamid hergestellt.

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.

Laufpuffer für Protein-Gele

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

Laemmli-Puffer

60 mM Tris-HCl, pH 6,8
2 % (v/v) SDS
10 % (v/v) Glyzerin
5 % (v/v) β-Mercaptoethanol
0,01 % (w/v) Bromphenolblau

Als Größenstandard für die Proteingele wurde der Pageruler prestained Proteinmarker (Fermentas/Thermo) verwendet. Zur Detektion der Proteinbanden wurden die Gele nach der Auftrennung gefärbt.

Coomassie-Färbung von Proteingelen

Für die Coomassie Färbung von Proteinen wurde Roti®Blue quick (Carl Roth) verwendet. Hierzu wurde das Gel in eine Färbeschale gegeben und mit Roti-blue quick Lösung übergossen. Die Färbung erfolgte für 15 min bis ÜN bei RT. Bei Bedarf kann mit in 20 % EtHO entfärbt werden.

4.4.6 Nachweis von immobilisierten Proteinen (Western-Analyse)

(Nach Garic *et al.*, 2013)

Der Transfer von Proteinen aus SDS-Polyacrylamid-Gelen auf eine PVDF-Membran (Roti®-PVDF (Carl Roth)) mittels Elektro-Blot in einer Semi-Dry Blotting Apparatur für 1 h mit 2 mA pro cm² PVDF-Membran. Der Blot von der Kathode in Richtung Anode wurde für das Fastblot Puffersystem folgendermaßen aufgebaut:

- zwei Lagen Whatman 3MM (in Fastblotpuffer getränkt)
- SDS-Polyacrylamid-Gel (für 5 min in Fastblotpuffer äquilibriert)
- PVDF-Membran (1 min in Methanol aktiviert, 5 min in Fastblotpuffer äquilibriert)
- zwei Lagen Whatman 3MM (in Fastblotpuffer getränkt)

Der spezifische, immunologische Nachweis der immobilisierten Proteine erfolgte mit Hilfe der an einen sekundären Antikörper konjugierten Meerrettich-Peroxidase (HRP). Nach dem Elektro-Blot wurde die PVDF-Membran zunächst für 30 Minuten in 5 % (w/v) Magermilchpulver oder BSA in TBST-Puffer geblockt, um eine unspezifische Bindung der Antikörper an die Membran zu verhindern. Anschließend wurde die Membran für eine Stunde bis über Nacht mit 3 ml des primären Antikörpers (verdünnt in TBST mit 5 % Milchpulver oder BSA) bei 4°C (30-60 min bei RT) auf einem Taumelrollenmischer inkubiert. Die Membran wurde danach für drei mal 10 Minuten in TBST-Puffer gewaschen und für eine Stunde mit 3 ml des sekundären Antikörpers (verdünnt in TBST mit 5 % Milchpulver oder BSA) inkubiert. Es folgten drei Waschschriffe für jeweils 10 Minuten in TBST-Puffer und ein Waschschriff in TBS-Puffer.

Tabelle 4.7: Bei Western-Analysen verwendete Antikörper

Antikörper	Wirt	Verdünnung	Bezugsquelle
Primäre Antikörper			
anti HA-Antikörper	Maus	1:2000	Sigma-Aldrich
anti HA-Antikörper	Kaninchen	1:3000	Cell Signaling
anti Myc-Antikörper	Maus	1:3000	Cell Signaling
anti Myc-Antikörper	Kaninchen	1:3000	Cell Signaling
anti GFP-Antikörper	Kaninchen	1:3000	Sigma-Aldrich
anti GST-Antikörper	Kaninchen	1:2000	Cell Signaling
anti Actin-Antikörper	Kaninchen	1:3000	Cell Signaling
Sekundäre Antikörper			
anti-Maus IgG, konjugiert mit HRP	Ziege	1:3000	Promega
anti-Kaninchen IgG, konjugiert mit HRP	Ziege	1:3000	Promega

Für die Detektion wurden je 1 ml ECL 1- und ECL 2-Lösung gemischt, gleichmäßig auf der Membran verteilt und für zwei Minuten bei RT inkubiert. Die Membran wurde luftblasenfrei in einen Plastikbeutel eingeschweißt und das Signal mit Hilfe der Chemilumineszenz-Anlage CHEMI-SMART-5100 (PeqLab) über eine CCD-Kamera mit einer durchschnittlichen

Belichtungsdauer von 1-20 min detektiert. Mit der Software Chemi-Capt (PeqLab) konnten digitale Aufnahmen bearbeitet oder für eine weitere Bearbeitung exportiert werden.

Fastblotpuffer	ECL 1-Lösung
45 mM Tris	10 ml 100 mM Tris-HCl pH 8,5
20 mM HEPES	44 µl 90 mM Coumarinsäure
20 % (v/v) Methanol	100 µl 250 mM Luminol
in H ₂ O _{bid.}	
	ECL 2-Lösung
TBST-Puffer	10 ml 100 mM Tris-HCl pH 8,5
20 mM Tris-HCl, pH 7,9	6 µl 30 % H ₂ O _{bid.}
136 mM NaCl	
0,05 % (v/v) Tween-20	

4.4.7 Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)

Nach (An *et al.*, 1997), DIG Gel Shift Kit, 2nd Generation Manual Version 09, Roche

Die *In-vitro*-Analyse mittels EMSA dient dem Nachweis spezifischer DNA-Bindungen von Proteinen.

Nachweis von Nukleinsäuren (DIG-Protokoll)

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

Sondengenerierung

Dazu wurden die Fragmente über eine PCR Reaktion generiert (4.5.1). Als Template diente hierbei genomische DNA (521). Es wurden zwei unspezifische Fragmente (ohne Rbf-Bindestelle) aus dem ORF von *rbf1* mit den Primern Mfe1_Pdik6_ORF1_F und Pdik6_ORF1_R_Mfe1 sowie Mfe1_Pdik6_ORF2_F und Pdik6_ORF2_R_Mfe1 und ein spezifisches Fragment (mit Rbf1-Bindestelle) mit den Primern Pdik6_4_R_Mfe1 und Mfe1_Pdik6_3_F generiert und mit Mfe1-Schnittstellen versehen. Die PCR Produkte wurden durch Agarose-Gelelektrophorese verifiziert. Durch Verdau mit Mfe1 wurden 5'-Überhänge generiert (C'AATTG) und je 500 ng DNA wurden nach Aufreinigung mit dem QiaQuick PCR Purification Kit (Qiagen) mit dem Klenow-Fragment der DNA Polymerase I aus *E. coli* in einer sog. Auffüllreaktion ("fill in"-Reaktion) mit Digoxigenin markiert:

X µl gereinigte DNA
10 µl 10 x NEB Puffer 2
3,3 µl 10 x DIG-dUTP-Mix
1 µl Klenow-Polymerase
H₂O auf 100 µl

Die Reaktion erfolgte 90 min bei 37°C und wird durch Hitzeinaktivierung des Enzyms (20 min. bei 75°C) gestoppt.

Zum Test der markierten Sonden wurden mit H₂O in verschiedenen Verdünnungsstufen (1:10, 1:50, 1:100) auf eine Nylon-Membran gespottet und anschließend mittels UV-Licht fixiert.

Detektion

Für die Detektion wurde die Membran bei RT in einer Hybridisierungs-Röhre in den folgenden Lösungen inkubiert: fünf Minuten DIG-Waschpuffer, 30 Minuten DIG2-Lösung, 30 Minuten Antikörper-Lösung (1:20000 Anti-DIG Antikörper in DIG2-Lösung; Anti-Digoxigenin-Fab-Fragmente(Roche)), und zwei Mal 15 Minuten in DIG-Waschpuffer. Anschließend wurde die Membran für fünf Minuten in DIG3-Lösung äquilibriert und für fünf Minuten in Chemilumineszenz-Lösung (1:500 CDP-Star Lösung (New England Biolabs) in DIG3) inkubiert. Die Membran wurde luftblasenfrei in einen Plastikbeutel eingeschweißt und das Signal mit Hilfe der Chemilumineszenz-Anlage CHEMI-SMART-5100 (PeqLab) über eine CCD-Kamera mit einer durchschnittlichen Belichtungsdauer von 1-20 min. detektiert. Mit der Software Chemi-Capt (PeqLab) konnten digitale Aufnahmen bearbeitet oder für eine weitere Bearbeitung exportiert werden.

DIG 1

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

DIG-Waschpuffer

0,3 % (v/v) Tween-20
in DIG1

DIG 2

5 % (v/v) Blockierungslösung
in DIG 1

10 x DIG-dUTP-Mix

8 µL 25 mM dATP
8 µL 25 mM dCTP
8 µL 25 mM dGTP

DIG 3

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

5,2 µL 25 mM dTTP
70 µL 1 mM DIG-dUTP
200 µL Nuclease freies Wasser

Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)

Für die Analyse wurden 10 %ige, nicht denaturierende Polyacrylamidgele verwendet. Als Laufkammer diente eine PerfectBlue Dual Gel System Twin S Apparatur (PeqLab). Zunächst wurde ein Vorlauf mit 0,5 -1 x TBE als Laufpuffer bei 8 V / cm durchgeführt. Die Auftrennung erfolgte bei 8 V/cm bei 4°C bis RT für 1-2 Stunden bis die Auftragspufferbande das Gelende erreicht hatte. Auf das Gel wurden 20 µl Bindereaktion aufgetragen. Für die Bindereaktion wurden 5 µl 4x Bindepuffer, 1 µl Poly(dI-dC) (Sigma-Aldrich P4929), 1 µl BSA (6 mg/ml), 4-8 ng Sonde, und verschiedene Konzentrationen von isoliertem Protein bzw. Gesamtproteinextrakt mit *E. coli* Lysispuffer bzw. IP Puffer (nach Pierce) auf 20 µl aufgefüllt und 30 min bei 25°C inkubiert. Der Transfer von Protein-DNA Komplexen aus nicht denaturierende Polyacrylamidgelen auf eine Nylon-Membran (Roti®-Nylon plus-Membran, Carl-Roth) erfolgte mittels Elektro-Blot in einer Semi-Dry Blotting Apparatur für 30 min bei 300 mA bzw. 4 mA/cm². Der Aufbau des Blots von der Kathode in Richtung Anode geschah folgendermaßen:

2 Lagen Whatman (3mm)-Papier, in 0,5 TBE getränkt
 Polyacrylamid-Gel
 Nylon-Membran
 2 Lagen Whatman (3mm)-Papier in 0,5 TBE getränkt

Anschließend wurden die DNA-Protein-Komplexe mit der Membran im Strato-Crosslinker quervernetzt. Der spezifische Nachweis erfolgte über die DIG-markierten Sonden wie oben beschrieben. Die optimalen Bedingungen der Bindereaktion (Proteinmenge, Sondenmenge, BSA, Dauer, und Temperatur), sowie die TBE Konzentration im Gel und die Temperatur der Elektrophorese müssen für jedes Protein empirisch ermittelt werden.

Polyacrylamidgele	4x Bindepuffer
5 % Polyacrylamid (Stammlösung: 30 % Acrylamid/Bisacrylamid 37,5:1)	80 mM HEPES, mit KOH auf pH 7,9
0,5 -1 x TBE	200 mM KCl
0,1 % APS	8 mM MgCl ₂
0,05 % TEMED	40 % Glycerol
Mit H ₂ O auf 10 ml auffüllen	0,4 mM EDTA
	4 mM DTT

Bestimmung von Proteinkonzentrationen

Protein-Konzentrationen wurden mit dem BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific, Pierce) oder mit dem Qbit Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific) gemessen.

4.4.8 Chromatinisolation und Chromatin-Immunopräzipitation

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 behandelte Flüssigkultur bei OD₆₀₀ 0,6-1,0 durchgeführt. Die fixierten Zellen wurden pelletiert (3.500 rpm, 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 der Zelmühle überführt, in denen sich zwei kleine Metallkugeln befanden. Die Zellen wurden in der Zelmühle (Retsch MM200) I 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 rpm, 15 min, 4°C, Eppendorf Centrifuge 5417R). Das Pellet wurde in 1ml 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 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 rpm, 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 in TE 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 ProteinaseK (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 25 µl anti-HA Agarose Suspension (Sigma) gegeben, welche zuvor dreimal in FA-Lysepuffer mit Proteinaseinhibitoren gewaschen wurden. Der Ansatz wurde üN bei 4°C unter langsamem Drehen inkubiert. Zur Anreicherung des gebundenen Chromatins wurden die Agarose Beads abzentrifugiert (7000 rpm, 30 sec, 4°C, ELMI CM70M) und 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 Waschschrirte 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. Die Proben wurden dann erneut zentrifugiert (14000 rpm, 2 min, 4°C), der Überstand so vollständig wie möglich abgenommen und die pelletierten Beads in 100 µl ChIP Elutionspuffer 15 min bei 65°C inkubiert. Die Elutionslösung wurde nach Zentrifugation in ein frisches Eppendorfgefäß transferiert und die pelletierten Beads in 150 µl TE/ 0,67 % SDS für weitere 10 min bei 65°C inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation wurde der resultierende Überstand 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 ProteinaseK (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 können nun über qRT-PCR (4.5.2) oder mittels NGS (*next generation sequencing*) (4.6) 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

ChIP Waschpuffer

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

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 Elutionspuffer

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

Chromatin-Immunopräzipitation (EnChIP)

Für die EnChIP-MS Analyse wurde die Chromatin Immunopräzipitation wie oben beschrieben durchgeführt. Verwendet wurde hierbei 3 min sonifizierte Chromatinlösung mit Fragmentlängen von 1000 bis 3000 bp. Außerdem wurde allen Waschpuffern Protease Inhibitoren (2x Complete) zugefügt.

Nach der Immunopräzipitation wurde das Chromatin über Nacht bei -20°C mit Isopropanol präzipitiert. Dafür wurde den Eluaten (200 µl) 500 µl Isopropanol, 25 µl 3 M NaAc (pH 5.2) und 2,5 µl Glycogen (20 mg/µl) zugefügt. Nach anschließender Zentrifugation bei 25000 rpm, 1 h, 4°C wurde das Pallet zwei mal mit 80 % Ethanol gewaschen, in 40 µl 2x Lämmli Puffer (Roth) aufgenommen und für 15 min auf einem Vibrax-VXR Schüttler geschüttelt. Die Proben wurden für 30 min bei 95°C inkubiert um die Fixierung aufzuheben. Die Proben können nun mittels Westernblot (4.4.6) oder LC-MS (4.4.3, unten) analysiert werden.

4.5 PCR-Techniken

4.5.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR) (Innis et al., 1990)

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

Als Standard-Protokoll wurden folgende Ansätze verwendet:

100 ng	Matritzen-DNA
2 U	Taq-DNA-Polymerase
0,4 µl	25 mM dNTPs
0,5 µl	je Primer (100 pmol/µl)
in 50 µl	Taq-PCR-Puffer
94 °C / 5 min - [94 °C / 1 min – 65 °C / 1 min – 72 °C / 1 min] x 30 – 72 °C / 10 min	

Alternativ wurde die PHUSION Polymerase von Finnzymes verwendet:

100 ng	Matritzen-DNA
2 U	PHUSION DNA Polymerase
0,4 µl	25 mM dNTPs
0,5 µl	je Primer (100 pmol/µl)
in 50 µl	PHUSION-Puffer (New England Biolabs)
98 °C / 30 sec - [98 °C / 10 sec – 62 °C / 15 sec – 72 °C / 30 sec] x 30 – 72 °C / 10 min	

4.5.2 Real-Time-PCR (qRT-PCR)

DNase-Behandlung und Reverse Transkription

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

Real-Time-PCR

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

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

Im Anschluss hieran wurde die Spezifität der Amplifikation anhand einer Schmelzkurve am BioRad CFX96 -System überprüft. Zur Kalkulation des CT-Wertes (Threshold Cycle), der den Wert bzw. Zyklus beschreibt, bei dem die Fluoreszenz zum ersten Mal signifikant über die Hintergrundfluoreszenz steigt, wurde die BioRad-Software Version 3.0a verwendet. Die Berechnung der relativen Expressionswerte erfolgte mit dem Programm Bio-Rad Gene Expression Macro der Firma Biorad.

4.5.3 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 Primerpaare 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 werden zusammen mit genomischer DNA von *U. maydis* als Matrize in einer PCR-Reaktion eingesetzt. Die Produkte werden 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 werden zusammen mit genomischer DNA von *U. maydis* als Matrize in die PCR-Reaktion eingesetzt. Die Produkte werden auf einem Agarosegel überprüft und das gewünschte 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 Ligations-Bande aufgereinigt und direkt in pCR2.1-Vektor („TOPO“, Invitrogen) kloniert. Das Ligationsprodukt kann auch zunächst über PCR amplifiziert werden. Dafür wurden nested Primer verwendet, um eine effiziente Amplifikation zu gewährleisten. Nach Aufreinigung über QiaQuick PCR Purification MinElute-Säulen (Qiagen) wurde das PCR Produkt in einen pCR2.1-Vektor („TOPO“, Invitrogen) kloniert.

4.5.4. PCR-Generierung von Fusions-Konstrukten 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-Kassettsystems 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 oben beschrieben.

4.5.5 Gibson Assembly®

Die Gibson assembly (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 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 Primerpaare lassen sich einfach Bereiche deletieren, oder zusätzliche Restriktionschnittstellen einbringen.

Ein typischer Reaktionsansatz enthielt:

5 µl	DNA (Gesamtmenge aller Fragmentstücke 20-200 ng)
15 µl	Master Mixture

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 buffer:

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

Master Mixture:

- 320 µl 5x ISO buffer
- 0.64 µl 10 U/µl T5 exonuclease
- 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

4.6 Sequenzanalysen und *in silico* Methoden

Sequenzierung von Plasmid-DNA

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

Es wurden folgende Ansätze verwendet:

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

Die erhaltenen Sequenz-Rohdaten konnten zur weiteren Bearbeitung in Sequencher 4.9 (Gene Codes Corporation) importiert werden.

Sequenzierung und Analyse von Chromatin-Immunopräzipitierter DNA

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

Für die generierung von Bibliotheken aus Chromatin-Immunopräzipitierter DNA wurde das NEBNext 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 25 Millionen raw reads für alle individuellen Proben generiert.

Die reads wurden anschließend mit Bowtie2 version 2.0.0-beta7 (Langmead und Salzberg, 2012) 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*, GitHub commit version (Bardet *et al.*, 2013) durchgeführt. Es wurden nur *Peaks*, die in beiden Duplikaten identifiziert wurden und jeweils einen pz-score von ≥ 80 für bE:HA und Rbf1:HA bzw. ≥ 150 für Hdp1:HA 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-Motive 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).

Eine Übersicht aller ChIP-Seq Experimente und die *PeakZilla raw-files* sind auf dem Datenträger im Ordner: „ChIP-Seq“ hinterlegt.

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 OD600 = 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 (4.3.1).

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

Zur mRNA Anreicherung wurde das NEB Next Poly(A) mRNA Magnetic Isolation Module (NEB) verwendet. Es wurden 5 µg Gesamt-RNA eingesetzt. Strnagspezifische 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) berechnet. Differentielle Expression wurde mit DESeq2 (Love *et al.*, 2014) bei einem FDR (false discovery rate) threshold von 0.05 and einem log₂ fold change threshold von eins bzw. zwei festgelegt.

Eine Übersicht aller RNA-Seq Experimente und das DESeq2 *raw-file* sind auf dem Datenträger im Ordner: „RNA-Seq“ hinterlegt.

Analyse von LC-MS Daten

Die LC-MS Daten Analyse wurde mit MaxQuant (Tyanova *et al.*, 2015) (<https://maxquant.org>) 1.6.0.16 (Parameter file auf dem Datenträger) durchgeführt. Zur Analyse wurde die label-free quantification Methode angewendet. Für statistische Analysen des MaxQuant outputs wurde Perseus (1.6.2.3) (Tyanova *et al.*, 2015)

verwendet. Die Protein-Sequenzen (FASTA Format) von *Ustilago maydis* stammen von UniProt (Universal Protein Resource) (<http://www.uniprot.org>).

Eine Übersicht aller LC-MS Experimente und die *.sps-files* der Auswertung, sowie das FASTA-*file* der *Ustilago maydis* Proteinsequenzen und die Einstellungen für MaxQuant sind auf dem Datenträger im Ordner: „LC-MS“ hinterlegt.

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.

BLAST2 (Basic Local Alignment Search Tool) (Altschul *et al.*, 1990); (Altschul *et al.*, 1997); (Gish und States, 1993) zur Identifizierung ähnlicher Proteine oder DNA-Sequenzen in den öffentlichen Datenbanken.

BOXshade zur graphischen Darstellung von mit CLUSTAL W oder CLUSTAL X erstellten multiplen Sequenzalignments.

CloneManager (Version 9.0, Sci Ed Central Software) zur Erstellung und Bearbeitung von Plasmid- und genomischen Sequenzen, zum Erstellen von Oligonukleotiden und Zeichnen von Plasmidkarten.

CLUSTAL W und **CLUSTAL X** (Goujon *et al.*, 2010); (Larkin *et al.*, 2007) zum automatisierten Sequenzabgleich mehrerer Proteinsequenzen.

Dicodon-Optimierungs-Tool (Finkernagel, pers. Mitteilung) zur Erstellung von Dicodonoptimierten DNA-Sequenzen

ELM; The Eukaryotic Linear Motif Resource (Dinkel *et al.*, 2014) zur Vorhersage konservierter Proteindomänen und putativer Bindemotive in Proteinen.

MFOLD (Zuker, 2003) zur Bestimmung von Sekundärstrukturen in qPCR-Amplifikaten und mRNAs.

PFAM (Sonnhammer *et al.*, 1997) zur Vorhersage konservierter Proteindomänen bzw. zur Identifikation von Proteinen mit ähnlichen Domänen oder ähnlicher Domänenstruktur.

Rare Codon Calculator (RaCC) zur Detektion von *rare codons* in DNA Sequenzen. (NIH MBI Laboratory for Structural Genomics and Proteomics)

SEQUENCHER 5.3 (GENECODES) zur Bearbeitung von Sequenzrohdaten und zum Vergleich von DNA-Sequenzen.

SMART (Simple Modular Architecture Research Tool) (Schultz *et al.*, 1998) zur Identifizierung konservierter Domänen in Proteinen bzw. zur Identifizierung von Proteinen mit ähnlichen Domänen oder ähnlicher Domänenstruktur

Die folgenden Datenbanken wurden zur Identifizierung von orthologen Proteinsequenzen anhand annotierter Funktionen und zur Analyse von DNA- und Protein-Sequenzdaten verwendet.

***Ustilago maydis* Genome:** NCBI, National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/70>

Saccharomyces Genome Database (SGD): <http://www.yeastgenome.org>

5. Literaturverzeichnis

Aichinger, C., Hansson, K., Eichhorn, H., Lessing, F., Mannhaupt, G., Mewes, W., und Kahmann, R. (2003). Identification of plant-regulated genes in *Ustilago maydis* by enhancer-trapping mutagenesis. *Mol. Gen. Genomics* **270**, 303-314.

Almeida, F., Rodrigues, M.L., und Coelho, C. (2019). The Still Underestimated Problem of Fungal Diseases Worldwide. *Front Microbiol* **10**, 214.

Alon, U. (2007). Network motifs: theory and experimental approaches. *Nat. Rev. Genet.* **8**, 450-461.

Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., und Lipman, D.J. (1990). Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* **215**, 403-410.

Altschul, S.F., Madden, T.L., Schaffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., und Lipman, D.J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* **25**, 3389-3402.

An, Z., Zhao, Q., McEvoy, J., Yuan, W.M., Markley, J.L., und Leong, S.A. (1997). The second finger of Urbs1 is required for iron-mediated repression of *sid1* in *Ustilago maydis*. *Proc-Natl-Acad-Sci-U-S-A* **94**, 5882-5887.

Ausubel, M.A., Ausubel, M.A., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidmann, J.G., und Smith, J.A., eds. (1987). Current protocols in molecular biology (John Wiley & Sons, Inc.).

Badis, G., Berger, M.F., Philippakis, A.A., Talukder, S., Gehrke, A.R., Jaeger, S.A., Chan, E.T., Metzler, G., Vedenko, A., Chen, X., et al. (2009). Diversity and complexity in DNA recognition by transcription factors. *Science* **324**, 1720-1723.

Bailey, T.L., Boden, M., Buske, F.A., Frith, M., Grant, C.E., Clementi, L., Ren, J., Li, W.W., und Noble, W.S. (2009). MEME SUITE: tools for motif discovery and searching. *Nucleic Acids Res* **37**, W202-208.

Bakkeren, G., Kämper, J., und Schirawski, J. (2008). Sex in smut fungi: Structure, function and evolution of mating-type complexes. *Fungal genetics and biology : FG & B* **45 Suppl 1**, S15-21.

Banks, G.R., Shelton, P.A., Kanuga, N., Holden, D.W., und Spanos, A. (1993). The *Ustilago maydis nar1* gene encoding nitrate reductase activity: sequence and transcriptional regulation. *Gene* **131**, 69-78.

Banuett, F. (1992). *Ustilago maydis*, the delightful blight. *Trends Genet.* **8**, 174-180.

- Banuett, F. (1995).** Genetics of *Ustilago maydis*, a fungal pathogen that induces tumors in maize. *Annu. Rev. Genet.* **29**, 179-208.
- Banuett, F. (1998).** Signalling in the yeasts: an informational cascade with links to the filamentous fungi. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**, 249-274.
- Banuett, F., und Herskowitz, I. (1989).** Different *a* alleles of *Ustilago maydis* are necessary for maintenance of filamentous growth but not for meiosis. *Proc Natl Acad Sci USA* **86**, 5878-5882.
- Banuett, F., und Herskowitz, I. (1994).** Morphological transitions in the life cycle of *Ustilago maydis* and their genetic control by the *a* and *b* loci. *Exp. Mycology* **18**, 247-266.
- Banuett, F., und Herskowitz, I. (1996).** Discrete developmental stages during teliospore formation in the corn smut fungus, *Ustilago maydis*. *Development* **122**, 2965-2976.
- Bardet, A.F., Steinmann, J., Bafna, S., Knoblich, J.A., Zeitlinger, J., und Stark, A. (2013).** Identification of transcription factor binding sites from ChIP-seq data at high resolution. *Bioinformatics* **29**, 2705-2713.
- Baumann, S., Pohlmann, T., Jungbluth, M., Brachmann, A., und Feldbrügge, M. (2012).** Kinesin-3 and dynein mediate microtubule-dependent co-transport of mRNPs and endosomes. *J. Cell Sci.*
- Becht, P., König, J., und Feldbrugge, M. (2006).** The RNA-binding protein Rrm4 is essential for polarity in *Ustilago maydis* and shuttles along microtubules. *J. Cell Sci.* **119**, 4964-4973.
- Begerow, D., Stoll, M., und Bauer, R. (2006).** A phylogenetic hypothesis of Ustilaginomycotina based on multiple gene analyses and morphological data. *Mycologia* **98**, 906-916.
- Bobola, N., und Merabet, S. (2017).** Homeodomain proteins in action: similar DNA binding preferences, highly variable connectivity. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **43**, 1-8.
- Bölker, M. (2001).** *Ustilago maydis*--a valuable model system for the study of fungal dimorphism and virulence. *Microbiology* **147**, 1395-1401.
- Bölker, M., Genin, S., Lehmler, C., und Kahmann, R. (1995).** Genetic regulation of mating, and dimorphism in *Ustilago maydis*. *Can. J. Bot.* **73**, 320-325.
- Bölker, M., Urban, M., und Kahmann, R. (1992).** The *a* mating type locus of *U. maydis* specifies cell signaling components. *Cell* **68**, 441-450.
- Bortfeld, M., Auffarth, K., Kahmann, R., und Basse, C.W. (2004).** The *Ustilago maydis* *a*2 mating-type locus genes *Iga2* and *rga2* compromise pathogenicity in the absence of the mitochondrial p32 family protein Mrb1. *Plant Cell* **16**, 2233-2248.

- Bottin, A., Kämper, J., und Kahmann, R. (1996).** Isolation of a carbon source-regulated gene from *Ustilago maydis*. *Mol. Gen. Genet.* **253**, 342-352.
- Brachmann, A. (2001).** Die frühe Infektionsphase von *Ustilago maydis*: Genregulation durch das bW/bE-Heterodimer. München, Ludwig-Maximilians-Universität. *Ludwig-Maximilians-Universität München*.
- Brachmann, A., König, J., Julius, C., und Feldbrügge, M. (2004).** A reverse genetic approach for generating gene replacement mutants in *Ustilago maydis*. *Mol. Gen. Genomics* **272**, 216-226.
- Brachmann, A., Schirawski, J., Müller, P., und Kahmann, R. (2003).** An unusual MAP kinase is required for efficient penetration of the plant surface by *Ustilago maydis*. *EMBO J.* **22**, 2199-2210.
- Brachmann, A., Weinzierl, G., Kämper, J., und Kahmann, R. (2001).** Identification of genes in the bW/bE regulatory cascade in *Ustilago maydis*. *Mol. Microbiol.* **42**, 1047-1063.
- Brauer, V.S., Rezende, C.P., Pessoni, A.M., De Paula, R.G., Rangappa, K.S., Nayaka, S.C., Gupta, V.K., und Almeida, F. (2019).** Antifungal Agents in Agriculture: Friends and Foes of Public Health. *Biomolecules* **9**.
- Brefort, T., Doehlemann, G., Mendoza-Mendoza, A., Reissmann, S., Djamei, A., und Kahmann, R. (2009).** *Ustilago maydis* as a Pathogen. *Annu. Rev. Phytopathol.* **47**, 423-445.
- Brefort, T., Muller, P., und Kahmann, R. (2005).** The high-mobility-group domain transcription factor Rop1 is a direct regulator of prf1 in *Ustilago maydis*. *Eukaryot. Cell* **4**, 379-391.
- Carey, M. (1998).** The enhanceosome and transcriptional synergy. *Cell* **92**, 5-8.
- Christensen, J.J. (1963).** Corn smut induced by *Ustilago maydis*. *Amer Phytopathol Soc Monogr* **2**.
- Cohen, S.N., Chang, A.C., und Hsu, L. (1972).** Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **69**, 2110-2114.
- Demerec, M., Adelberg, E.A., Clark, A.J., und Hartman, P.E. (1966).** A proposal for a uniform nomenclature in bacterial genetics. *Genetics* **54**, 61-76.
- Deplancke, B., Alpern, D., und Gardeux, V. (2016).** The Genetics of Transcription Factor DNA Binding Variation. *Cell* **166**, 538-554.
- Dinkel, H., Van Roey, K., Michael, S., Davey, N.E., Weatheritt, R.J., Born, D., Speck, T., Kruger, D., Grebnev, G., Kuban, M., et al. (2014).** The eukaryotic linear motif resource ELM: 10 years and counting. *Nucleic Acids Res* **42**, D259-266.

Dobin, A., Davis, C.A., Schlesinger, F., Drenkow, J., Zaleski, C., Jha, S., Batut, P., Chaisson, M., und Gingeras, T.R. (2013). STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics* **29**, 15-21.

Doebley, J. (1992). Mapping the genes that made maize. *Trends in genetics : TIG* **8**, 302-307.

Fedler, M., Luh, K.S., Stelter, K., Nieto-Jacobo, F., und Basse, C.W. (2009). The *a2* mating-type locus genes *Iga2* and *rga2* direct uniparental mitochondrial DNA (mtDNA) inheritance and constrain mtDNA recombination during sexual development of *Ustilago maydis*. *Genetics* **181**, 847-860.

Feldbrügge, M., Kämper, J., Steinberg, G., und Kahmann, R. (2004). Regulation of mating and pathogenic development in *Ustilago maydis*. *Curr. Opin. Microbiol.* **7**, 666-672.

Finkernagel, F. (2006). *in silico*-DNA-Bindemotivsuche in *Ustilago maydis*: DNA-Bindemotiv des b-induzierten Transkriptionsfaktors Biz1. *Max Plank Institute for terrestrial Microbiology, Marburg*.

Flor-Parra, I., Castillo-Lluva, S., und Perez-Martin, J. (2007). Polar growth in the infectious hyphae of the phytopathogen *Ustilago maydis* depends on a virulence-specific cyclin. *Plant Cell* **19**, 3280-3296.

Flor-Parra, I., Vranes, M., Kämper, J., und Perez-Martin, J. (2006). Biz1, a zinc finger protein required for plant invasion by *Ustilago maydis*, regulates the levels of a mitotic cyclin. *Plant Cell* **18**, 2369-2387.

Fornes, O., Castro-Mondragon, J.A., Khan, A., van der Lee, R., Zhang, X., Richmond, P.A., Modi, B.P., Correard, S., Gheorghe, M., Baranasic, D., et al. (2019). JASPAR 2020: update of the open-access database of transcription factor binding profiles. *Nucleic Acids Res.*

Fortenbacher, J. (2016). Charakterisierung der Rbf1-Bindestelle durch *sliding window* Promotor-Analysen. *Karlsruher Institut für Technologie (KIT), Karlsruhe*.

Fujita, T., Asano, Y., Ohtsuka, J., Takada, Y., Saito, K., Ohki, R., und Fujii, H. (2013). Identification of telomere-associated molecules by engineered DNA-binding molecule-mediated chromatin immunoprecipitation (enChIP). *Sci Rep* **3**, 3171.

Fujita, T., und Fujii, H. (2013). Efficient isolation of specific genomic regions and identification of associated proteins by engineered DNA-binding molecule-mediated chromatin immunoprecipitation (enChIP) using CRISPR. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **439**, 132-136.

Fujita, T., und Fujii, H. (2014). Identification of proteins associated with an IFN γ -responsive promoter by a retroviral expression system for enChIP using CRISPR. *PLoS One* **9**, e103084.

- Fuxman Bass, J.I., Pons, C., Kozlowski, L., Reece-Hoyes, J.S., Shrestha, S., Holdorf, A.D., Mori, A., Myers, C.L., und Walhout, A.J. (2016).** A gene-centered *C. elegans* protein-DNA interaction network provides a framework for functional predictions. *Mol Syst Biol* **12**, 884.
- Garcia-Muse, T., Steinberg, G., und Perez-Martin, J. (2003).** Pheromone-induced G2 arrest in the phytopathogenic fungus *Ustilago maydis*. *Eukaryot. Cell* **2**, 494-500.
- Garic, D., Humbert, L., Fils-Aime, N., Korah, J., Zarfabian, Y., Lebrun, J.J., und Ali, S. (2013).** Development of buffers for fast semidry transfer of proteins. *Anal. Biochem.* **441**, 182-184.
- Garvie, C.W., Hagman, J., und Wolberger, C. (2001).** Structural studies of Ets-1/Pax5 complex formation on DNA. *Mol. Cell* **8**, 1267-1276.
- Gibson, D.G., Young, L., Chuang, R.Y., Venter, J.C., Hutchison, C.A., 3rd, und Smith, H.O. (2009).** Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases. *Nat Methods* **6**, 343-345.
- Gillissen, B., Bergemann, J., Sandmann, C., Schröer, B., Bölker, M., und Kahmann, R. (1992).** A two-component regulatory system for self/non-self recognition in *Ustilago maydis*. *Cell* **68**, 647-657.
- Gish, W., und States, D.J. (1993).** Identification of protein coding regions by database similarity search. *Nat. Genet.* **3**, 266-272.
- Gold, S.E., Bakkeren, G., Davies, J.E., und Kronstad, J.W. (1994).** Three selectable markers for transformation of *Ustilago maydis*. *Gene* **142**, 225-230.
- Goujon, M., McWilliam, H., Li, W., Valentin, F., Squizzato, S., Paern, J., und Lopez, R. (2010).** A new bioinformatics analysis tools framework at EMBL-EBI. *Nucleic Acids Res.* **38**, W695-699.
- Grandel, A., Romeis, T., und Kämper, J. (2000).** Regulation of pathogenic development in the corn smut fungus *Ustilago maydis*. *Mol Plant Path* **1**, 61-66.
- Greilinger, D. (2007).** Charakterisierung von frühen Komponenten der Signaltransduktion in *Ustilago maydis* Philipps-Universität Marburg.
- Gualdi, R., Bossard, P., Zheng, M., Hamada, Y., Coleman, J.R., und Zaret, K.S. (1996).** Hepatic specification of the gut endoderm in vitro: cell signaling and transcriptional control. *Genes Dev.* **10**, 1670-1682.
- Guarro, J., GeneJ, und Stchigel, A.M. (1999).** Developments in fungal taxonomy. *Clin. Microbiol. Rev.* **12**, 454-500.
- Hamidian, A., Vaapil, M., von Stedingk, K., Fujita, T., Persson, C.U., Eriksson, P., Veerla, S., De Preter, K., Speleman, F., Fujii, H., et al. (2018).** Promoter-associated proteins of EPAS1 identified by enChIP-MS - A putative role of HDX as a negative regulator. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **499**, 291-298.

- Hartmann, H.A. (1997).** Die Pheromonantwort in *Ustilago maydis*: Kontrolle von Zellfusion und Pathogenität. Ludwig-Maximilians-Universität München
- Hartmann, H.A., Kahmann, R., und Bölker, M. (1996).** The pheromone response factor coordinates filamentous growth and pathogenicity in *Ustilago maydis*. *EMBO J.* **15**, 1632-1641.
- Hartmann, H.A., Kruger, J., Lottspeich, F., und Kahmann, R. (1999).** Environmental signals controlling sexual development of the corn smut fungus *Ustilago maydis* through the transcriptional regulator prf1. *Plant Cell* **11**, 1293-1306.
- Heigwer, F., Kerr, G., und Boutros, M. (2014).** E-CRISP: fast CRISPR target site identification. *Nat Methods* **11**, 122-123.
- Heimel, K. (2010).** Regulationsmechanismen der biotrophen Entwicklung von *Ustilago maydis* Philipps Universität Marburg.
- Heimel, K., Scherer, M., Schuler, D., und Kämper, J. (2010a).** The *Ustilago maydis* Clp1 protein orchestrates pheromone and *b*-dependent signaling pathways to coordinate the cell cycle and pathogenic development. *Plant Cell* **22**, 2908-2922.
- Heimel, K., Scherer, M., Vranes, M., Wahl, R., Pothiratana, C., Schuler, D., Vincon, V., Finkernagel, F., Flor-Parra, I., und Kämper, J. (2010b).** The transcription factor Rbf1 is the master regulator for *b*-mating type controlled pathogenic development in *Ustilago maydis*. *PLoS Pathog.* **6**, e1001035.
- Hewald, S., Linne, U., Scherer, M., Marahiel, M.A., Kämper, J., und Bölker, M. (2006).** Identification of a gene cluster for biosynthesis of mannosylerythritol lipids in the basidiomycetous fungus *Ustilago maydis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**, 5469-5477.
- Holliday, R. (1974).** *Ustilago maydis*. In Handbook of Genetics, R.C. King, ed. (New York, USA: Plenum Press), pp. 575-595.
- Hsueh, Y.P., und Heitman, J. (2008).** Orchestration of sexual reproduction and virulence by the fungal mating-type locus. *Curr. Opin. Microbiol.* **11**, 517-524.
- Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J., und White, T.J., eds. (1990).** PCR Protocols: a guide to methods and applications. (San Diego, USA: Academic Press).
- Inukai, S., Kock, K.H., und Bulyk, M.L. (2017).** Transcription factor-DNA binding: beyond binding site motifs. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **43**, 110-119.
- Jensen, R.H. (2016).** Resistance in human pathogenic yeasts and filamentous fungi: prevalence, underlying molecular mechanisms and link to the use of antifungals in humans and the environment. *Dan Med J* **63**.

- Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J.A., und Charpentier, E. (2012).** A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science* **337**, 816-821.
- Kaffarnik, F., Müller, P., Leibundgut, M., Kahmann, R., und Feldbrügge, M. (2003).** PKA and MAPK phosphorylation of Prf1 allows promoter discrimination in *Ustilago maydis*. *EMBO J.* **22**, 5817-5826.
- Kahmann, R., und Kämper, J. (2004).** *Ustilago maydis*: how its biology relates to pathogenic development. *New Phytol.* **164**, 31-42.
- Kamada, T. (2002).** Molecular genetics of sexual development in the mushroom *Coprinus cinereus*. *BioEssays* **24**, 449-459.
- Kämper, J. (2004).** A PCR-based system for highly efficient generation of gene replacement mutants in *Ustilago maydis*. *Mol. Gen. Genomics* **271**, 103-110.
- Kämper, J., Kahmann, R., Bölker, M., Ma, L.J., Brefort, T., Saville, B.J., Banuett, F., Kronstad, J.W., Gold, S.E., Müller, O., et al. (2006).** Insights from the genome of the biotrophic fungal plant pathogen *Ustilago maydis*. *Nature* **444**, 97-101.
- Kämper, J., Reichmann, M., Romeis, T., Bölker, M., und Kahmann, R. (1995).** Multiallelic recognition: nonself-dependent dimerization of the bE and bW homeodomain proteins in *Ustilago maydis*. *Cell* **81**, 73-83.
- Kent, N.A., Karabetsou, N., Politis, P.K., und Mellor, J. (2001).** In vivo chromatin remodeling by yeast ISWI homologs Isw1p and Isw2p. *Genes Dev.* **15**, 619-626.
- Keon, J.P., White, G.A., und 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*. *Curr. Genet.* **19**, 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., et al. (2018).** Ensembl Genomes 2018: an integrated omics infrastructure for non-vertebrate species. *Nucleic Acids Res* **46**, D802-D808.
- Koerber, R.T., Rhee, H.S., Jiang, C., und Pugh, B.F. (2009).** Interaction of transcriptional regulators with specific nucleosomes across the *Saccharomyces* genome. *Mol. Cell* **35**, 889-902.
- Kohler, J.R., Hube, B., Puccia, R., Casadevall, A., und Perfect, J.R. (2017).** Fungi that Infect Humans. *Microbiol Spectr* **5**.
- Kojic, M., und Holloman, W.K. (2000).** Shuttle vectors for genetic manipulations in *Ustilago maydis*. *Can. J. Microbiol.* **46**, 333-338.
- Kothe, E. (1996).** Tetrapolar fungal mating types: sexes by the thousands. *FEMS Microbiol. Rev.* **18**, 65-87.

- Kronstad, J.W., und Leong, S.A. (1990).** The *b* mating-type locus of *Ustilago maydis* contains variable and constant regions. *Genes Dev.* **4**, 1384-1395.
- Kurjan, J. (1993).** The pheromone response pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *Annu. Rev. Genet.* **27**, 147-179.
- Laemmli, U.K. (1970).** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Lam, S.S., Martell, J.D., Kamer, K.J., Deerinck, T.J., Ellisman, M.H., Mootha, V.K., und Ting, A.Y. (2015).** Directed evolution of APEX2 for electron microscopy and proximity labeling. *Nat Methods* **12**, 51-54.
- Langmead, B., und Salzberg, S.L. (2012).** Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nat Methods* **9**, 357-359.
- Lanver, D., Berndt, P., Tollot, M., Naik, V., Vranes, M., Warmann, T., Munch, K., Rossel, N., und Kahmann, R. (2014).** Plant surface cues prime *Ustilago maydis* for biotrophic development. *PLoS Pathog.* **10**, e1004272.
- Lanver, D., Muller, A.N., Happel, P., Schweizer, G., Haas, F.B., Franitza, M., Pellegrin, C., Reissmann, S., Altmüller, J., Rensing, S.A., et al. (2018).** The Biotrophic Development of *Ustilago maydis* Studied by RNA-Seq Analysis. *Plant Cell* **30**, 300-323.
- Larkin, M.A., Blackshields, G., Brown, N.P., Chenna, R., McGettigan, P.A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I.M., Wilm, A., Lopez, R., et al. (2007).** Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* **23**, 2947-2948.
- Liao, Y., Smyth, G.K., und Shi, W. (2013).** The Subread aligner: fast, accurate and scalable read mapping by seed-and-vote. *Nucleic Acids Res* **41**, e108.
- Love, M.I., Huber, W., und Anders, S. (2014).** Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol* **15**, 550.
- Madhani, H.D., und Fink, G.R. (1998).** The control of filamentous differentiation and virulence in fungi. *Trends Cell Biol.* **8**, 348-353.
- Mahlert, M., Vogler, C., Stelter, K., Hause, G., und Basse, C.W. (2009).** The *a2* mating-type-locus gene *Iga2* of *Ustilago maydis* interferes with mitochondrial dynamics and fusion, partially in dependence on a Dnm1-like fission component. *J. Cell Sci.* **122**, 2402-2412.
- Mendoza-Mendoza, A., Berndt, P., Djamei, A., Weise, C., Linne, U., Marahiel, M., Vranes, M., Kämper, J., und Kahmann, R. (2009).** Physical-chemical plant-derived signals induce differentiation in *Ustilago maydis*. *Mol. Microbiol.* **71**, 895-911.
- Mochizuki, N., und Yamamoto, M. (1992).** Reduction in the intracellular cAMP level triggers initiation of sexual development in fission yeast. *Mol. Gen. Genet.* **233**, 17-24.

- Morrow, C.A., und Fraser, J.A. (2009).** Sexual reproduction and dimorphism in the pathogenic basidiomycetes. *FEMS Yeast Res.* **9**, 161-177.
- Myers, S.A., Wright, J., Peckner, R., Kalish, B.T., Zhang, F., und Carr, S.A. (2018).** Discovery of proteins associated with a predefined genomic locus via dCas9-APEX-mediated proximity labeling. *Nat Methods* **15**, 437-439.
- Novac, N., und Heinzl, T. (2004).** Nuclear receptors: overview and classification. *Curr. Drug Targets Inflamm. Allergy* **3**, 335-346.
- Oerke, E.C. (2005).** Crop losses to pests. *The Journal of Agricultural Science* **144**, 31-43.
- Pothiratana, C. (2008).** Functional characterization of the homeodomain transcription factor Hdp1 in *Ustilago maydis*. In Max-Planck Institute for terrestrial Microbiology (Marburg: Philipps-University Marburg).
- Rappsilber, J., Ishihama, Y., und Mann, M. (2003).** Stop and go extraction tips for matrix-assisted laser desorption/ionization, nanoelectrospray, and LC/MS sample pretreatment in proteomics. *Anal. Chem.* **75**, 663-670.
- Rappsilber, J., Mann, M., und Ishihama, Y. (2007).** Protocol for micro-purification, enrichment, pre-fractionation and storage of peptides for proteomics using StageTips. *Nat Protoc* **2**, 1896-1906.
- Reeves, R. (2010).** Nuclear functions of the HMG proteins. *Biochim. Biophys. Acta* **1799**, 3-14.
- Romeis, T., Brachmann, A., Kahmann, R., und Kämper, J. (2000).** Identification of a target gene for the bE/bW homeodomain protein complex in *Ustilago maydis*. *Mol. Microbiol.* **37**, 54-66.
- Romeis, T., Kämper, J., und Kahmann, R. (1997).** Single-chain fusions of two unrelated homeodomain proteins trigger pathogenicity in *Ustilago maydis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 1230-1234.
- 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.
- Ruiz-Herrera, J., und Martinez-Espinoza, A.D. (1998).** The fungus *Ustilago maydis*, from the aztec cuisine to the research laboratory. *International microbiology : the official journal of the Spanish Society for Microbiology* **1**, 149-158.
- Sambrook, J., Frisch, E.F., und Maniatis, T. (1989).** Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbour, New York: Cold Spring Harbour Laboratory Press).
- Sambrook, J., und Russell, D.W. (2001).** Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd edn (Cold Spring Harbour, New York: Cold Spring Harbour Laboratory Press).

- Scherer, M., Heimel, K., Starke, V., und Kämper, J. (2006).** The Clp1 protein is required for clamp formation and pathogenic development of *Ustilago maydis*. *Plant Cell* **18**, 2388-2401.
- Schirawski, J., Böhnert, H.U., Steinberg, G., Snetselaar, K., Adamikowa, L., und Kahmann, R. (2005).** Endoplasmic reticulum glucosidase II is required for pathogenicity of *Ustilago maydis*. *Plant Cell* **17**, 3532-3543.
- Schultz, J., Milpetz, F., Bork, P., und Ponting, C.P. (1998).** SMART, a simple modular architecture research tool: identification of signaling domains. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**, 5857-5864.
- Schulz, B., Banuett, F., Dahl, M., Schlesinger, R., Schäfer, W., Martin, T., Herskowitz, I., und Kahmann, R. (1990).** The *b* alleles of *U. maydis*, whose combinations program pathogenic development, code for polypeptides containing a homeodomain-related motif. *Cell* **60**, 295-306.
- Schuster, M., Schweizer, G., Reissmann, S., und Kahmann, R. (2016).** Genome editing in *Ustilago maydis* using the CRISPR-Cas system. *Fungal Genet. Biol.* **89**, 3-9.
- Schuster, M., Trippel, C., Happel, P., Lanver, D., Reißmann, S., und Kahmann, R. (2018).** Single and Multiplexed Gene Editing in *Ustilago maydis* Using CRISPR-Cas9. *Bio-Protocol* **8**.
- Shevchenko, A., Wilm, M., Vorm, O., und Mann, M. (1996).** Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. *Anal. Chem.* **68**, 850-858.
- Shokri, L., Inukai, S., Hafner, A., Weinand, K., Hens, K., Vedenko, A., Gisselbrecht, S.S., Dainese, R., Bischof, J., Furger, E., et al. (2019).** A Comprehensive *Drosophila melanogaster* Transcription Factor Interactome. *Cell Rep* **27**, 955-970 e957.
- Siggers, T., und Gordan, R. (2014).** Protein-DNA binding: complexities and multi-protein codes. *Nucleic Acids Res* **42**, 2099-2111.
- Snetselaar, K.M., Bölker, M., und Kahmann, R. (1996).** *Ustilago maydis* mating hyphae orient their growth toward pheromone sources. *Fungal Genet. Biol.* **20**, 299-312.
- Snetselaar, K.M., und Mims, C.W. (1992).** Sporidial fusion and infection of maize seedlings by the smut fungus *Ustilago maydis*. *Mycologia* **84**, 193-203.
- Snetselaar, K.M., und Mims, C.W. (1993).** Infection of maize stigmas by *Ustilago maydis*: Light and electron microscopy. *Phytopathology* **83**, 843.
- Sonnhammer, E.L., Eddy, S.R., und Durbin, R. (1997).** Pfam: a comprehensive database of protein domain families based on seed alignments. *Proteins* **28**, 405-420.

- Spellig, T., Bölker, M., Lottspeich, F., Frank, R.W., und Kahmann, R. (1994a).** Pheromones trigger filamentous growth in *Ustilago maydis*. *EMBO J.* **13**, 1620-1627.
- Spellig, T., Regenfelder, E., Reichmann, M., Schauwecker, F., Bohlmann, R., Urban, M., Bölker, M., Kämper, J., und Kahmann, R. (1994b).** Control of mating and development in *Ustilago maydis*. *Antonie Leeuwenhoek* **65**, 191-197.
- Traven, A., Jelacic, B., und Sopta, M. (2006).** Yeast Gal4: a transcriptional paradigm revisited. *EMBO Rep.* **7**, 496-499.
- Trinkle-Mulcahy, L. (2019).** Recent advances in proximity-based labeling methods for interactome mapping. *F1000Res* **8**.
- Tsukuda, T., Carleton, S., Fotheringham, S., und Holloman, W.K. (1988).** Isolation and characterization of an autonomously replicating sequence from *Ustilago maydis*. *Mol. Cell. Biol.* **8**, 3703-3709.
- Tucker, S.L., und Talbot, N.J. (2001).** Surface attachment and pre-penetration stage development by plant pathogenic fungi. *Annu. Rev. Phytopathol.* **39**, 385-417.
- Tusher, V.G., Tibshirani, R., und Chu, G. (2001).** Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**, 5116-5121.
- Tyanova, S., Temu, T., Carlson, A., Sinitcyn, P., Mann, M., und Cox, J. (2015).** Visualization of LC-MS/MS proteomics data in MaxQuant. *Proteomics* **15**, 1453-1456.
- Ulrich, J. (2015).** Identifizierung von Rbf1- Bindestellen in *Ustilago maydis*. Karlsruher Institut für Technologie (KIT).
- Urban, M., Kahmann, R., und Bölker, M. (1996).** Identification of the pheromone response element in *Ustilago maydis*. *Mol. Gen. Genet.* **251**, 31-37.
- van der Lee, R., Buljan, M., Lang, B., Weatheritt, R.J., Daughdrill, G.W., Dunker, A.K., Fuxreiter, M., Gough, J., Gsponer, J., Jones, D.T., et al. (2014).** Classification of intrinsically disordered regions and proteins. *Chem Rev* **114**, 6589-6631.
- Vanden Bossche, H., Dromer, F., Improvisi, I., Lozano-Chiu, M., Rex, J.H., und Sanglard, D. (1998).** Antifungal drug resistance in pathogenic fungi. *Med. Mycol.* **36 Suppl 1**, 119-128.
- Vranes, M. (2006).** Transkriptom-Analyse der frühen Infektionsphase von *Ustilago maydis*: Identifikation neuer pathogenitätsrelevanter Gene. Philipps-Universität Marburg.

Wahl, R., Zahiri, A., und Kämper, J. (2010). The *Ustilago maydis* *b* mating type locus controls hyphal proliferation and expression of secreted virulence factors *in planta*. *Mol. Microbiol.* **75**, 208-220.

Walhout, A.J. (2011). What does biologically meaningful mean? A perspective on gene regulatory network validation. *Genome Biol* **12**, 109.

Weinzierl, G. (2001). Isolierung und Charakterisierung von Komponenten der b-vermittelten Regulationskaskade in *Ustilago maydis*. Philipps-Universität Marburg).

Yamamoto, I., Adachi, T., Kishiro, Y., Fujiwara, M., und Gohda, E. (1997). Interleukin-2-dependent augmentation of the anti-TNP antibody production by sodium butyrate in cultured murine splenic B cells. *International Journal Of Immunopharmacology. Jun* **19**, 347-354.

Yu, L., und Morse, R.H. (1999). Chromatin opening and transactivator potentiation by RAP1 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **19**, 5279-5288.

Zaret, K.S., und Carroll, J.S. (2011). Pioneer transcription factors: establishing competence for gene expression. *Genes Dev.* **25**, 2227-2241.

Zarnack, K., Eichhorn, H., Kahmann, R., und Feldbrügge, M. (2008). Pheromone-regulated target genes respond differentially to MAPK phosphorylation of transcription factor Prf1. *Mol. Microbiol.* **69**, 1041-1053.

Zarnack, K., Maurer, S., Kaffarnik, F., Ladendorf, O., Brachmann, A., Kämper, J., und Feldbrügge, M. (2006). Tetracycline-regulated gene expression in the pathogen *Ustilago maydis*. *Fungal Genet. Biol.* **43**, 727-738.

Zuker, M. (2003). Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Res* **31**, 3406-3415.

6. Anhang

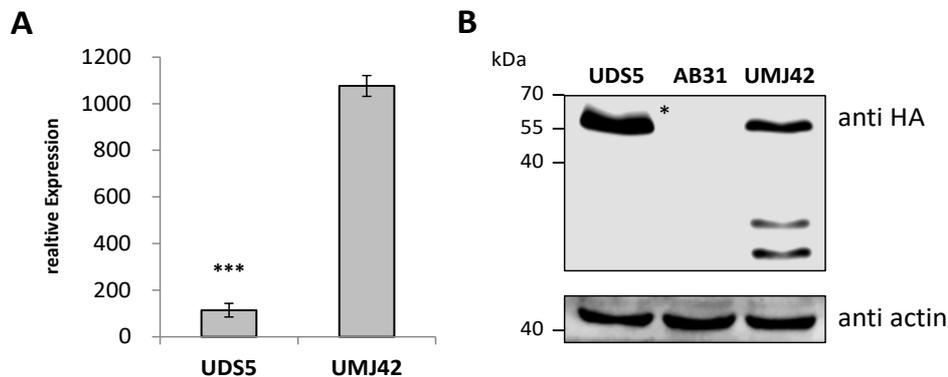


Abbildung 6.1: Vergleich der *rbf1* Transkript- und Proteinmengen bei *b*-abhängiger (UDS5) und direkter (UMJ42) *rbf1*-Induktion. (A) Transkriptmengen wurden mittels qRT-PCR analysiert. Die *rbf1*-Expression ist in UMJ42 ca. 9-fach höher als in UDS5. *eIF2b* (*umag_04869*) wurde als Haushaltsgen zur Normalisierung verwendet. Das Experiment wurde mit je zwei biologischen Duplikaten in technischen Duplikaten durchgeführt. Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung der Mittelwerte der biologischen Duplikate. Statistische Signifikanz wurde mit dem *Student's t*-Test ermittelt. *** *p*-value ≤ 0.001 . **(B)** Proteinmengen wurden mittels Westernblot analysiert. In UDS5 kann trotz geringerer *rbf1*-Transkriptmenge (A) mehr intaktes Rbf1-Protein nachgewiesen werden. Die Proben wurden über eine SDS-PAGE (10 %) aufgetrennt. Für die Detektion wurde ein anti-HA bzw. ein anti-Aktin Antikörper verwendet. Als Negativkontrolle wurde der Stamm AB31 mitgeführt (gleicher Genotyp allerdings ohne HA-Tag). Der Stern zeigt das Vollängen-Rbf1:3xHA Fusionsprotein mit einer berechneten Größe von ~49 kDa. Aktin dient als Ladekontrolle.

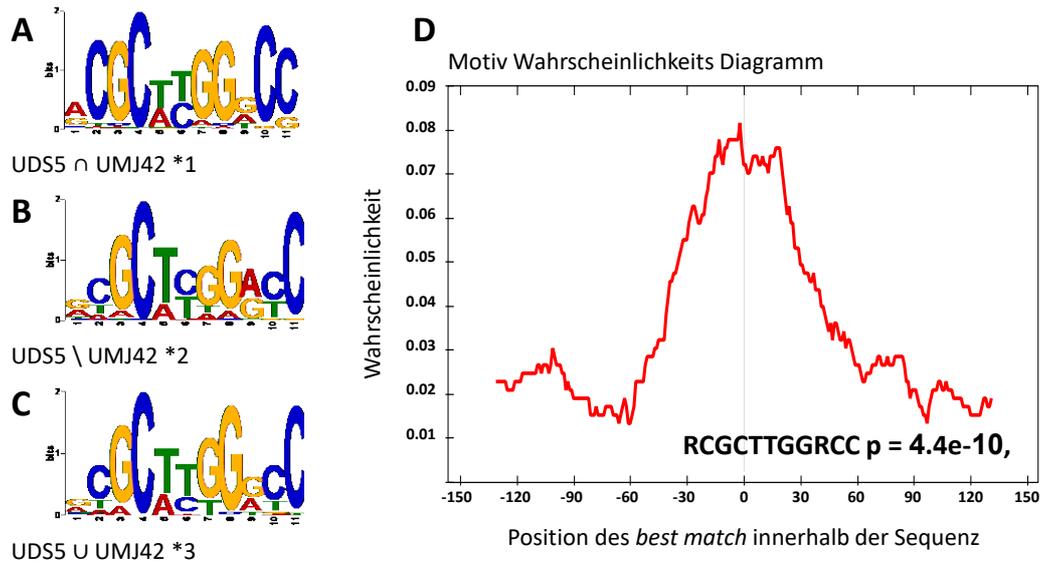


Abbildung 6.2: (A-C) Rbf1-Konsensussequenz in *Peaks* der in **Abbildung 2.1 A** dargestellten Teilmengen. Die Konsensussequenzen wurden mit MEME ermittelt und sind als *position weight matrix* dargestellt. Als Input für die MEME-Analyse wurden 328 bp lange Sequenzen um die Maxima der Rbf1:3xHA *Peaks* (*cookie cuts*) aus den Teilmengen *1 UDS5 \cap UMJ42 (Schnittmenge), *2 UDS5 \setminus UMJ42 (Differenzmenge) und *3 UDS5 \cup UMJ42 (Vereinigungsmenge) der in **Abbildung 2.1 A** dargestellten Experimente verwendet. **(D) Motiv-Wahrscheinlichkeits-Diagramm.** Exemplarisch für alle drei Motive ist das Motiv aus C dargestellt. Angegeben ist die Wahrscheinlichkeit seines Vorhandenseins an einer bestimmten Position innerhalb der *cookie cuts* in Relation zum Maximum des jeweiligen *Peaks*, und der *p-value*, der die Signifikanz der zentralen Anreicherung beschreibt. Die Rbf1-Konsensussequenz Motive weisen keinen signifikanten Unterschied auf (vgl. Tabelle 6.1).

Tabelle 6.1: TOMTOM (Motif Comparison Tool) Analyse der in Abbildung 6.2 dargestellten Rbf1-Konsensusmotive.

Q:Query; T:Target; Die Werte repräsentieren die Signifikanz der Ähnlichkeit. Die drei verglichenen Motive weisen keine signifikanten Unterschiede auf.

Q_ID	T_ID	<i>p-value</i>	<i>E-value</i>	<i>q-value</i>	Overlap	Q_consensus	T_consensus	Orientation
*1	*1	4.8E-14	1.4E-13	2.9E-13	11	ACGCTTGGGCC	ACGCTTGGGCC	+
*1	*3	2.5E-07	7.5E-07	7.5E-07	11	ACGCTTGGGCC	GCGCTTGGGCC	-
*1	*2	1.3E-04	3.8E-04	2.5E-04	11	ACGCTTGGGCC	GCGCTAGGACC	-
*3	*3	1.5E-12	4.6E-12	9.2E-12	11	GGCCAAGCGC	GGCCAAGCGC	+
*3	*1	3.6E-07	1.1E-06	1.1E-06	11	GGCCAAGCGC	GGCCAAGCGT	-
*3	*2	3.2E-05	9.5E-05	6.3E-05	11	GGCCAAGCGC	GGTCCTAGCGC	+
*2	*2	1.3E-14	4.0E-14	7.9E-14	11	GGTCCTAGCGC	GGTCCTAGCGC	+
*2	*3	8.6E-06	2.6E-05	2.6E-05	11	GGTCCTAGCGC	GGCCAAGCGC	+
*2	*1	4.8E-05	1.4E-04	9.5E-05	11	GGTCCTAGCGC	GGCCAAGCGT	-

Tabelle 6.2: Liste der Schnittmenge der LC-MS Analyse von UDS5 (Rbf1:3xHA) und UDS1(bE:3xHA).

Die beiden Immunopräzipitierten Proteine Rbf1 (UMAG_03172) und bE (UMAG_12052) sind orange hinterlegt. Die Tabelle wurde absteigend nach PSMs (*peptide spectrum matches*) der Rbf1:3xHA IP sortiert. PSMs entsprechen der gesamten Anzahl an identifizierten Peptid-Sequenzen eines Proteins. Sowohl bE1 als auch bW2 konnten mit Rbf1:3xHA co-immunopräzipitiert werden. Putative Transkriptionsfaktoren sind blau hinterlegt.

ID	DNA- Bindedomäne	Annotation	PSMs Rbf IP	PSMs bE IP
UMAG_12024	homeodomain	- hdp1	44	20
UMAG_10578	Zn(2)-C6 fungal-type	- related to PRIB protein (fragment)	28	42
UMAG_02718		- related to PIF1 protein precursor	24	18
UMAG_03172	zinc finger, C2H2-type	- rbf1	24	0
UMAG_11261		- probable RPS17B - ribosomal protein S17.e.B	22	26
UMAG_01250		- probable delta-1-pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase	14	10
UMAG_02438		- related to clp1, essential for A-regulated sexual development	13	2
UMAG_00578	homeodomain	- bW1 - b locus protein W1	12	16
UMAG_02857	zinc finger, C2H2-type	- hypothetical protein	12	14
UMAG_12052	homeodomain	- bE1 - b locus protein E1	12	142
UMAG_00082		- putative protein	10	4
UMAG_03365		- putative protein	10	8
UMAG_04382		- probable methylcrotonoyl-CoA carboxylase	10	12
UMAG_11190		- putative protein	10	6
UMAG_02164		- probable NDE1 - mitochondrial NADH dehydrogenase	9	2
UMAG_00026		- related to FK506-binding protein (FKBP)	8	7
UMAG_06055		- probable RPP0 - acidic ribosomal protein L10.e	8	2
UMAG_01042	fork head	- putative protein	6	2
UMAG_01341		- probable to iron inhibited ABC transporter 2	6	4
UMAG_02347		- conserved hypothetical protein	6	6
UMAG_03280		- putative protein	6	4
UMAG_04080		- putative protein	6	18
UMAG_05401	Zn(2)-C6 fungal-type	- putative protein	6	6
UMAG_10159	Zn(2)-C6 fungal-type	- related to transcription activator amyR	6	2
UMAG_00955		- probable stearoyl-CoA desaturase	4	6
UMAG_02209	Zn(2)-C6 fungal-type	- putative protein	4	4
UMAG_03728		- conserved hypothetical protein	4	2
UMAG_04374		- Erg9 - Farnesyl-diphosphate farnesyltransferase	4	2
UMAG_05601	Zn(2)-C6 fungal-type	- putative protein	4	6
UMAG_06102		- related to Glucan 1,3-beta-glucosidase precursor	4	2
UMAG_10488		- conserved hypothetical protein	4	2
UMAG_10926		- probable TFP1p - H+-ATPase V1 domain 69 KD catalytic subunit	4	2
UMAG_11495		- hypothetical protein	4	2
UMAG_04806	Zn(2)-C6 fungal-type	- conserved hypothetical protein	2	2
UMAG_10441		- putative protein	2	2

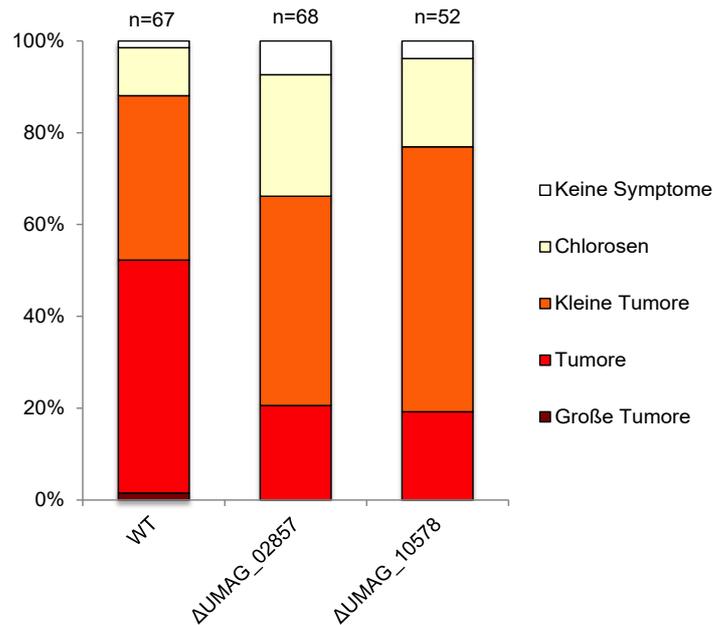


Abbildung 6.3: Infektionsstudien weisen auf eine Verringerung der Pathogenität durch die Deletionen von *UMAG_02857* und *UMAG_10578* hin. Sieben Tage alte Maiskeimlinge wurden mit dem solopathogenen Stamm SG200 als Kontrolle und SG200 Δ UMAG_02857 bzw. SG200 Δ UMAG_10578 infiziert. Weitere sieben Tage nach Infektion wurden die Krankheitssymptome der infizierten Maispflanzen nach (Kämper *et al.*, 2006) quantifiziert. Die Symptome der Pflanzen wurden je nach Stärke in verschiedene Kategorien unterteilt. Gezeigt ist jeweils der Anteil an Pflanzen mit den durch die verschiedenen Farben angegebenen Symptomen. n steht für die Anzahl der ausgewerteten Pflanzen.

Die Deletionen weisen auf eine Verringerung, jedoch nicht auf Verlust der Pathogenität hin. Für eine quantitative Aussage zur Virulenz reicht der Stichprobenumfang allerdings nicht aus.

Bbs ~100 % cons: residues: CA NNNNNN NAT C

221 . . 234

```

b12 AGTCTCATCA C-----TCT GCCGCACCAC CGAA
b17 AGTCGTAT-G C-----TCT GCCGCACCAC CAAA
b18 GATCTGTTCT C-----TTT GCAACACCAAT CACA
b19 GATCATCTAT CGCAGCAGCA GCAAGCAGCAT CACC
b3 GATCTTTTCT C-----TCT ACAACATCAT CACA
b6 GATCTTTTCT C-----TCT ACAACATCAT CACA
b9 GATCTTTTCT C-----TCT ACAACATCAT CACA
b5 TATATTTTCT C-----TCT GCAACATCAT CACA
b6a TATATTTTCT C-----TCT GCAACATCAT CACA
b6b TATATTTTCT C-----TCT GCAACATCAT CACA
b6c TATATTTTCT C-----TCT GCAACATCAT CACA
b16 TATATTTTCT C-----TCT GCAACATCAT CACA
b2 GATCTTCTAT C-----TCT GCAACATCAT CACA
b4b GATATATTCT C-----TCT GCAACATCAT CACA
b10 GATATATTCT C-----TCT GCAACATCAT CACA
b10a GATATATTCT C-----TCT GCAACATCAT CACA
b7 GATCTTCTAT C-----TCA GCAACATCAT CACA *
b14 GATCTTTTAT C-----TCA GCAACATCAT CACA *
b15 AGTCTTTTGT C-----TCT GAAACACCAAT CACA
b18a AGTCTTTTGT C-----TCT GAAACACCAAT CACA
b4 GATCTTTTCT C-----TCT TCAATATCAG CACC
b4a GATCTTTTCT C-----TCT TCAATATCAG CACC
b13 GATCTTTTCT C-----TCT TCAATATCAG CACC
b11 GATCTTTTCT C-----TCT TCAATATCAG CACC
b1 GAACCTTTTCT C-----TCA GCAACATCAT CACA *
b8 GATCTTTTCT C-----TCA GAAACATCAT CACA *

```

H1bs-Best fit TCA TTT

111 . . 150

```

b12 T-CGCGCACCA TGTTTACGAC TCGTGAA CG TTT CCTTGCG
b17 T-CGCGCACCA CATTACAGAC TCGTGA TCA TTT CCTTGCG *
b18 G-TGCACACA CA----- TCA TTT CCTTGCG *
b19 T-TGCACACA CA----- TCA TTT CCTTGCT *
b3 T-TGCACACA CA----- TCA CT CCTCGCG
b6 T-TGCACACA CA----- TCA CT CCTCGCG
b9 T-TGCACACA CA----- TCA CT CCTCGCG
b5 T-TGCACACA CA----- TCA TTT TCTTGCG *
b6a T-TGCACACA CA----- TCA TTT TCTTGCG *
b6b T-TGCACACA CA----- TCA TTT TCTTGCG *
b6c T-TGCACACA CA----- TCA TTT TCTTGCG *
b16 T-TGCACACA CA----- TCA TTT TCTTGCG *
b2 T-TGTGCACA CA----- TCA TTT CTTTGCG *
b4b TGCACACACA CA----- TCA TTT TCTTGCG *
b10 TGCACACACA CA----- TCA TTT TCTTGCG *
b10a TGCACACACA CA----- TCA TTT TCTTGCG *
b7 T-TGCGCACA CA----- TCA TTT CCTAGCG *
b14 T-TGCGCACA CA----- TCA TTT CCTTGCG *
b15 T-TGCACACG CA----- TCA TTT TCTTGCG *
b18a T-TGCACACG CA----- TCA TTT TCTTGCG *
b4 T-TGCACACG CA----- TCA TTT TCTTGCG *
b4a T-TGCACACG CA----- TCA TTT TCTTGCG *
b13 T-TGCACACG CA----- TCA TTT TCTTGCG *
b11 T-TGCACACG CA----- TCA TTT TCTAGCG *
b1 T-TGCACACA CA----- TCA TTT CCTTGCG *
b8 T-TGCACACG CA----- TCT TTT CCTTGCG

```

Abbildung 6.4: *b*-Promotoren Alignment. Ausschnitt aus dem Alignment aller *b*-Promotoren. Gefundene *b*-Konsensusmotive (oben) und Hdp1-Konsensusmotive (unten) sind farbig markiert. Mit * markierte Sequenzen stimmen im fall von *b* mit allen 100 % konservierten Nukleotiden des Motivs überein. Für Hdp1 stimmen sie zu 100 % mit dem *best-fit* des Motives überein.

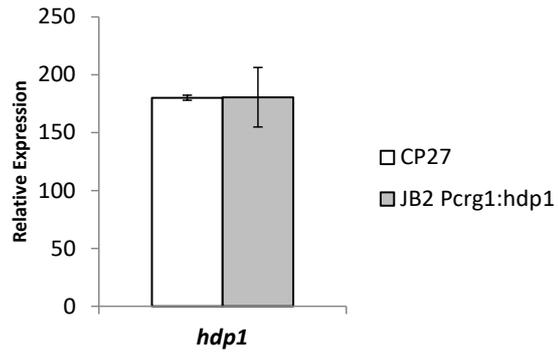


Abbildung 6.5: Identische *hdp1*-Transkriptmengen nach *rbf1*- bzw. direkter Induktion. Reads aus den RNA-Seqs mit den Stämmen CP27 und JB2 PcrG1:hdp1 wurden wie beschrieben aufgearbeitet (4.6). In der Abbildung sind normalisierte *read-counts* (CPM; *counts per million*) als Mittelwerte biologischer Triplikate des Gens *hdp1* dargestellt. Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung der Mittelwerte. In CP27 wird *hdp1* indirekt über *rbf1* induziert, das über den *crg1*-Promotor mit Arabinose induziert wird. In JB2 PcrG1:hdp1 wird *hdp1* direkt über den Arabinose induzierbaren *crg1*-Promotor induziert. Die Menge an *hdp1*-Transkript ist in beiden Stämmen nahezu identisch.

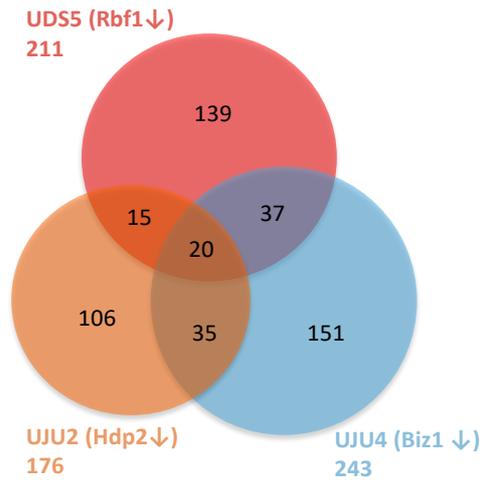


Abbildung 6.6: Überlapp von Genen mit Rbf1-, Biz1- und Hdp2-Peaks im Promotor. Die eingezeichneten Zahlen beziehen sich auf Gene, deren Promotoren mit dem jeweiligen Transkriptionsfaktor signifikant angereichert werden konnten (mindestens ein *Peak* mit : Rbf1-3xHA: pz-score > 80, Hdp2- und Biz1-3xHA : pz-score > 300). Rbf1 wurde in UDS5 durch Medienwechsel indirekt über b induziert. Hdp2 und Biz1 wurden in UJU2 bzw. UJU4 direkt durch Medienwechsel induziert. In der Abbildung sind proportionale Überlappungen dargestellt. Die Promotoren von 58 Genen lassen sich sowohl mit Hdp2:3xHA als auch mit Biz1:3xHA anreichern. Die Promotoren von 23 Genen lassen sich zusätzlich auch mit Rbf1:3xHA anreichern.

> *U. maydis* dicodon optimiert *NLS-dcas9-HA-NLS*

ATG**CGCCCAAGAAGAAGCGCAAGGTCGAG**GACAAGAAGTACTCGATCGGTCTC**GCC**ATCGGCACCAACTCGGTGGCTGGGC
 CGTCATCACCGACGAGTACAAGGTGCCCTCGAAAAAGTTCAAGGTGCTCGGCAACACCGACCGCCACTCGATCAAGAAGAACC
 TCATCGGTGCGTCTCTCGACTCGGGCGAGACCGCCGAGGCCACGCGTCTCAAGCGCACCGCTCGTCTGCTACACGCGT
 CGCAAGAACCAGTCTGCTACCTCCAGGAGATCTTCTCAACGAGATGGCCAAGGTCGACGACTCGTTCTCCACCGTCTCGA
 GGAGTGGTCTCTCGTCGAGGAGGACAAGAAGCACGAGCGCCACCCATCTTTGGCAACATCGTCGACGAGGTCGCCACACG
 AAAAGTACCCACCATCTACCACCTGCGCAAGAAGCTCGTCGACTCGACCGACAAGGCCGACCTGCGTCTCATCTACCTGGCG
 CTCGCCACATGATCAAGTCCGCGGTCACTTCTCATCGAGGGCGACCTCAACCCGACAACCTCGGACGTCGACAAGCTCTT
 CATCCAGCTCGTCCAGACCTACAACCAGCTCTTCGAGGAGAACCCCATCAACGCTCGGGTGTGACGCGCAAGGCCATCCTCT
 CGGCGGCTCTCTCAAGTCTCGTCTCGAGAACCTCATCGCCAGCTCCCGGTGAAAAGAAGAACGGTCTCTTTGGCAAC
 CTCATCGGCTCTCGTCTCGTCTCACGCCAACTTCAAGTCAACTTTGACCTCGCCGAGGACGCAAGCTCCAGCTCTCCAA
 GGACACCTACGACGACGACCTCGACAACCTGCTCGCCAGATCGGCGACCACTACGCCGACCTTCTCGCCGCAAGAACC
 TCTCGGACGCATCTGCTCTCGGACATCTGCGCGTCAACCCGAGATCACCAAGGCTCCGCTCTCGGCTCGATGATCAAG
 CGCTACGACGAGCACCAAGGACTCACGCTGCTCAAGGCGCTCGTCCGCCAGCAGCTCCCGGAGAAGTACAAGGAGATCTT
 CTTGACCAAGTCCAAGAACGGCTACGCCGGTACATCGACGGCGGTGCTCGCAGGAGGAGTTTACAAGTTCATCAAGCCCA
 TCCTCGAGAAGTGGACGCGCACCGAGGAGTGTCTGTCGCAAGTCAACCGCGAGGACCTGTCGCAAGCAGCGCACCTTTGAC
 AACGGCTCGATCCCGACAGATCCACTCGGCGAGTCCAGCCATCTCGGCTCGTCAGGAGGACTTACCCCTTCTCAAG
 GGACAACCGCGAGAAGATCGAGAAGATCTCACCTTCCGATCCCTACTACGTCGCTCGGTCGCTCGGCAACTCGCGCT
 TCGCTGGATGACGCGCAAGTGGAAAGAGACCATCACGCCCTGGAACCTTTGAGGAGGTCGTCGACAAGGGTGCCTCGGCGCAG
 TCGTTCATCGAGCGCATGACCAACTTTGACAAGAACCCTGCCAACGAAAAGGTGCTGCCAAGCACTCGCTCTCTACGAGTA
 CTTACCGTCTACAACGAGCTCACCAAGGTCAGTACGTCACCGAGGGCATGCGCAAGCCCGCTTCTCTCGGCGAGCAGA
 AGAAGGCCATCGTCGACTGCTCTCAAGACCAACCGCAAGGTCACCGTCAAGCAGCTCAAGGAGGACTACTTCAAGAAGATC
 GAGTGTCTCGACTCGGTCGAGATCTCGGGTGTGAGGACCGCTTCAACGCTCGCTCGGCACTTACCACGACCTGCTCAAGAT
 CATCAAGGACAAGGACTTCTCGACAACGAGGAGAACGAGGACATCTCGAGGACATCGTGTACGCTCACGCTCTTCGAGG
 ACCCGGAGATGATCGAGGAGCTCTCAAGACCTACGCCACCTTTCGACGACAAGGTCATGAAGCAGCTCAAGGCTCGGCT
 TACACGGGCTGGGTCGCTCTCGCGCAAGCTCATCAACGGCATCCCGCAGCAAGCAGTCCGGCAAGACCATCTCGACTTCT
 CAAGTCCGACGGCTTCCGCAACCGCAACTTCTGACGCTCATCCACGACGACTCGCTCACCTTCAAGGAGGACATCCAGAAGG
 CGCAGGTCCTCGGTCAGGGCGACTCGCTCCACGAGCACATCGCCAACCTCGCCGGCTCGCCGCCATCAAGAAGGGCATCCTC
 CAGACCGTCAAGGTCGTCGACGAGCTGTCAGGTCATGGTGTGTCACAAGCCGAGAACATCGTCATCGAGATGGCTCGCGA
 GAACAGACACCCAGAAGGGTCAGAAGAAGTCCGCGAGCGCATGAAGCGCATCGAGGAGGGCATCAAGGAGCTCGGCTCGC
 AGATCTCAAGGAGCACCCGTCGAGAACACGAGCTCCAGAACGAAAAGCTTACTCTACTACCTCCAGAACGGTCTGAC
 ATGTACGTCGACCAAGGAGCTCGACATCAACCGTCTCTCGACTACGACGTCGAC**GCC**ATCGTCCCCAGTGGTCTCTCAAGGA
 CGACTCGATCGACAACAAAGGTCTCACGCGCAGCGACAAGAACCCTCGCAAGTGGACAACTCGGCAAGGAGGTCGCTCA
 AGAAGATGAAGAAGTACTGGGTCAGTGTCTCAACGCCAAGCTCATCACCCAGCGCAAGTTTGACAACCTCACCAAGCCGAG
 CGTGGTGGTCTCTCGAGCTCGACAAGGCCGGTTCATCAAGCGTCAGCTCGTCGAGACGCGTCAGATCACCAAGCACGTCGC
 CCAGATCTCGACTCGCGCATGAACACCAAGTACGACGAGAACGACAAGCTCATCCGCGAGGTCAGGTCATCACGCTCAAGA
 GCAAGTCTGTCGACTTCCGCAAGGACTTCCAGTCTACAAGGTGCGCGAGATCAACAACCTACCACCACGCCACGACGCC
 TACCTCAACGCCGTCGTCGGCACGGGCTCATCAAGAAGTACCCAAAGCTCGAGTCGGAGTTTGTCTACGGCGACTACAAGGT
 CTACGACGTCGCAAGATGATCGCAAGTCCGAGCAGGAGATCGGCAAGGCCACCGCAAGTACTTCTTCTACTCGAACATCA
 TGAACCTTTTCAAGACCGAGATCACGCTCGCCAACGGCGAGATCCGCAAGCGTCTCTCATCGAGACCAACGGCGAGACGGGC
 GAGATCGTCTGGGACAAGGGTCTGACTTTGCCACCGTCCGCAAGGTGCTCTCGATGCCGAGGTCACATCGTCAAGAAGAC
 CGAGGTGACAGCCGGTGGTTCTCAAGGAGTCGATCTTCCGCAAGCGCAACTCGGACAAGTTCATCGTCTGCAAGAAGGACT
 GGGACCCCAAGAAGTACGGTGGTTCGACTCGCCACCGTTCGCTACTCGGTGCTCGTCTCGCCAAGGTCGAGAAGGGCAAG
 AGCAAGAAGTCAAGTCCGTCAGGAGTGTCTCGGCATCACCATCATGGAGCGATCGTCTGAGAAGAACCCTCATGACTT
 CCTCGAGGCCAAGGGTACAAGGAGGTCAGAAGGACCTCATCATCAAGTGCCTCAAGTACTCGCTCTTCGAGCTCGAGAAGC
 GTCGCAAGCGCATGCTCGCTCGGCCGCGAGCTCCAGAAGGGCAACGAGCTGGCGCTCCCTCGAAATACGTCAACTTCTC
 TACCTCGCTCGACTACGAGAAGTCAAGGGTCTGCCGAGGACAACGAGCAGAAGCAGCTCTTGTGTCGAGCAGCACAAGCA
 CTACCTCGACGAGATCATCGAGCAGATCTCGGAGTCTTCAAGCGTGTATCTCGCCGACGCCAACCTCGACAAGGTGCTCT
 CGGCTACAACAAGCACCCGCGACAAGCCATCCGCGAGCAGGCCGAGAATCATCCACCTTTCACGCTCACCAACCTCGGT
 GCTCCCGCCGCTTCAAGTACTTTGACACCCACCATCGACCGCAAGCGCTACACCTCGACCAAGGAGGTCGTCGACGCCACGCT
 CATCCACAGTCGATCACCGTCTCTACGAGACGCGCATCGACCTCTCGAGCTCGGTGGTAC**TCGGGTGGCTACCCCTACG**
ACGTGCCGACTACGCCTCGGGTGGCAAGCGTCCCGCCGCCACCAAGAAGGCCGGTCAGGCCAAGAAGAAGAAGTGA

Abbildung 6.7: NLS-dcas9-HA-NLS Sequenz, dicodon optimiert für *Ustilago maydis*. Die NLS aus der *S. cerevisiae* GAL4 Aktivierungsdomäne ist gelb hinterlegt, der Hämmagglutinin Tag grün, und die nucleoplasm NLS lila. Die beiden Triplets die für die Mutationen D10A und H840A verantwortlich sind wurden blau markiert.

CAAAATTCCATTCTACAACG_TARGET_SEQUENZ_GTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGT
 CCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGC_TTTTTTCTAGACCCAGCTTTCTTGACAAAGTTGGCA
 TTAGTACCCGTACCGAGCTCGAC

Target Sequenz:

P_{dik6}:

sgRNA 0_0	GATTCGTAATTCAAGCACCA
sgRNA 1_225	GTATTATTGCTTAGCATCCT
sgRNA 2_225	GGCCAAGTTAAGCTCGCGCC

P₁₁₄₁₃:

sgRNA 2_0	GGCTGAGTACGGCGTACTGG
sgRNA 10_0	GTCTCACCAATCACCACACA
sgRNA 13_0	GTGGAGCTTCAGTCATTGAT

Abbildung 6.8: Sequenz-Muster für die Synthese von Doppelstrang sgRNA Fragmenten für das Gibson Assembly in den Vektor pJU30(sgRNA_0). Mögliche Positionen für sgRNAs wurden mit dem E-CRISP *tool* (Heigwer *et al.*, 2014) bestimmt. Die 20 bp lange homologen Bereiche zum Vektor sind blau hinterlegt. Die benötigte scaffold Sequenz ist grün, der U6 Terminator rot und die stuffer Sequenz lila markiert vgl. (Schuster *et al.*, 2016). Aufgelistet sind anschließend alle in dieser Arbeit für sgRNAs verwendete Target Sequenzen.

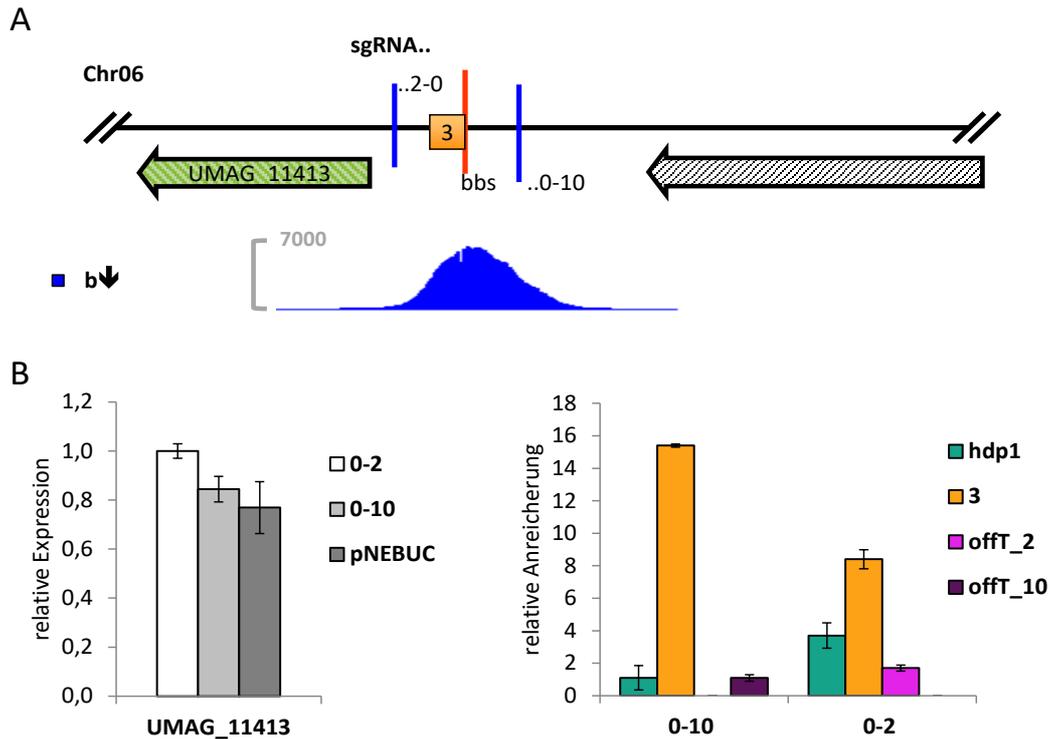


Abbildung 6.9: Evaluation der sgRNAs zur Anreicherung des *umag_11413*-Promotors.

(A): Schematische Darstellung des *umag_11413*-Locus von *Ustilago maydis*. Oben: Schematisch dargestellt ist der Locus von *UMAG_11413* mit Bindestellen der mit dem E-CRISP *tool* vorhergesagten und anschließend synthetisierten sgRNAs 0-2 und 0-10. Bindepotionen der verwendeten sgRNAs sind blau, die b-Bindestelle ist rot in den dargestellten Locus eingezeichnet. ORFs sind durch Pfeile dargestellt. **(A), Unten: Peaks** im *umag_11413*-Promotor der ChIP-Seq mit UJU1.14 ($b\downarrow$, $\Delta rbf1$) sind blau dargestellt, die Immunpräzipitation wurde mit bE1:HA durchgeführt. **(B), links: qRT Analyse des dCas9 Einflusses auf *umag_11413*** Die Stämme UJU92 (0-2) und UJU93 (0-10) exprimieren jeweils *dcas9* und die entsprechende sgRNA, UJU90 (pNEBUC) dient als Kontrolle der *umag_11413* Induktion, es wird lediglich die Carboxin Resistenz vermittelt, *dcas9* wird nicht exprimiert. Transkriptmengen wurden mittels qRT-PCR analysiert. *eIF2b* (*UMAG_04869*) wurde als Haushaltsgen zur Normalisierung verwendet. Die Expression von *dcas9* hat keinen signifikanten Einfluss auf die *umag_11413* Expression. **(B) rechts: qRT Analyse der ChIP mit dCas9:3xHA mit verschiedenen sgRNAs.** Die Anreicherungen sind relativ zum Vorkommen des Actin ORF-Fragments angegeben. Als Referenzreaktionen für die einzelnen Primer wurde Input-DNA (entnommen vor der IP) als Template eingesetzt. *hdp1* dient als Negativkontrolle. Der amplifizierte Bereich 3 ist in A als farbiger Kasten dargestellt. Der *umag_11413*-Promotor lässt sich mit beiden sgRNAs anreichern. Die qRT-Analysen wurden mit technischen Duplikaten durchgeführt. Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung der Mittelwerte der technischen Duplikate.

Beide getesteten sgRNAs sind geeignet um den *umag_11413*-Promotor anzureichern. sgRNA 0-10 ist jedoch spezifischer.

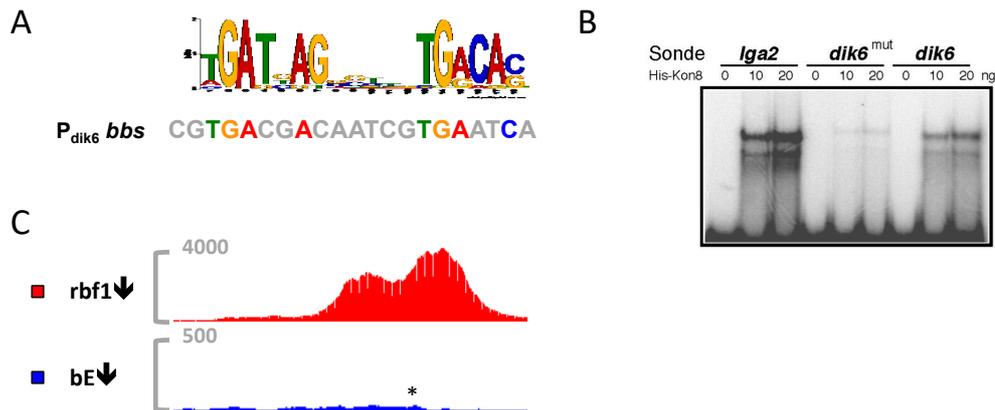


Abbildung 6.10: Eine *bbs* ist *in vivo* nicht ausreichend für *b*-Bindung. (A): Gezeigt ist die in dieser Arbeit ermittelte *b*-Konsensussequenz (vgl. Abbildung 2.3), dargestellt als *position weight matrix*. Darunter die Sequenz der putativen *bbs* im *dik6*-Promotor (Weinzierl, 2001). (B) zeigt eine Gelretardierungsanalyse mit einem *dik6*-Promotorfragment das die *bbs* enthält und von einem heterolog exprimierten *bE*-*bW*-Fusionsprotein (Kon8) gebunden wird. Bei Kon8 handelt es sich um ein verkürztes, jedoch biologisch aktives *bE*-*bW*-Fusionsprotein (Weinzierl, 2001). (C): In C sind die *Peak*-Profile im *dik6*-Promotor aus den ChIP-Seqs mit UDS5 (*b*, *rbf1*↓) (rot) und UDS1 (*b*↓, *rbf1*) (blau) dargestellt. Die Position der *bbs* ist mit * markiert. *b* bindet trotz *bbs* *in vivo* nicht im *dik6*-Promotor.

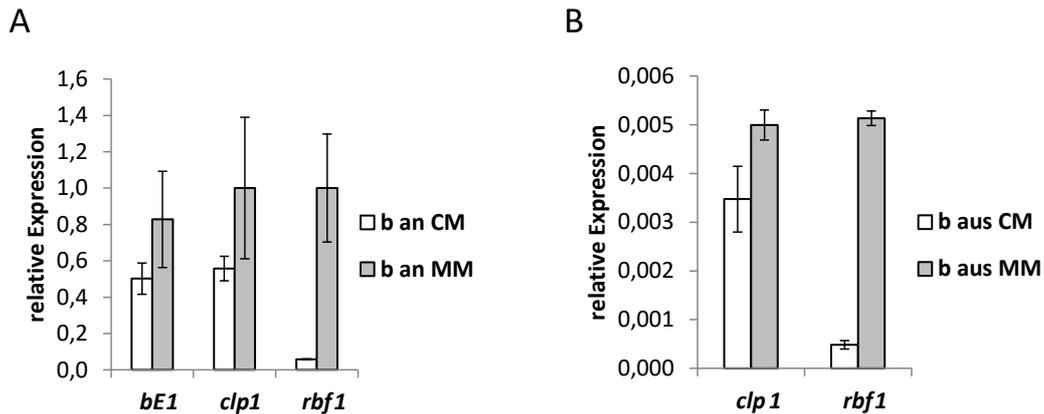


Abbildung 6.11: Die Rbf1-Expression ist in Minimal-Medium drastisch erhöht. Transkriptmengen wurden mittels qRT-PCR analysiert. Die Experimente wurden mit je zwei biologischen Duplikaten in technischen Duplikaten durchgeführt. Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung der Mittelwerte der biologischen Duplikate. **(A) Vergleich der b-abhängigen Expression der direkten b-Zielgene *clp1* und *rbf1* in verschiedenen Medien.** Verwendet wurde der Stamm AB31 (*a2*, *P_{crg1}:bW2*, *P_{crg1}:bE1*). *bE1* und *bW2* werden durch den Arabinose-abhängigen *crg1*-Promotor induziert. Die Rbf1-Expression ist in Minimal-Medium (MM) verglichen zu Komplex-Medium (CM) drastisch erhöht. Die Expression von *clp1* ist nicht beeinflusst. **(B) Vergleich der basalen Expression von *clp1* und *rbf1*.** Verwendet wurde der Stamm AB32 (*a2*, *P_{crg1}:bW2*, *P_{crg1}:bE2*), der die inkompatible Kombination *bE2* und *bW2* induziert. *clp1* und *rbf1* können nicht über b-induziert werden. Transkriptmengen entsprechen der basalen Expression in Abhängigkeit vom Medium. Die Basale Expression von *rbf1* ist in MM deutlich erhöht.

6.1 Digitale Daten

- **Tabellen:**

- Tabelle 6.1.1: Rbf1 Einfluss auf die Expression von *b*-abhängig regulierten Genen
- Tabelle 6.1.2: Überschneidung *b*-regulierter Gene mit Rbf1-*Peak*
- Tabelle 6.1.3: Rolle von *hdp1* auf die durch die *b*-Kaskade vermittelte Genexpression
- Tabelle 6.1.4: *b*-abhängig regulierte Gene, für deren Expression *hdp1* benötigt wird.
- Tabelle 6.1.5: Hdp1 Einfluss auf die Expression *rbf1*-abhängig regulierten Gene.
- Tabelle 6.1.6: Rbf1 verhindert die *hdp1*-abhängige Regulation
- Tabelle 6.1.7: durch *b*-Inaktivierung differentiell regulierte Gene *in planta*

- **Ordner:**

- **ChIP-Seq**
 - ChIP-Seq_overview
 - JU1 -14 filtered (14)
 - JU19_Hdp2 filtered
 - JU20 Biz1 filterd
- **RNA-Seq**
 - RNA-Seq_overview
 - DESeq2_Genes_EnsemblGenome_Ustilago_maydis_33f
- **LC-MS**
 - LC-MS_overview
 - LC-MS_JUXX_Results.sps (4)
 - MaxQuant_Einstellungen
 - Ust. maydis p3.fasta

- **Digitale Version dieser Arbeit**