



Die Charakterisierung des Transkriptionsfaktors Hdp2  
und dessen Rolle in der biotrophen Phase 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. Matteo Jurca**

aus

Mannheim

Dekan: Prof. Dr. Manfred Wilhelm

Referent: Prof. Dr. Jörg Kämper

Korreferent: Prof. Dr. Holger Puchta

Tag der mündlichen Prüfung: 19.07.2021

Die Untersuchungen zur vorliegenden Arbeit wurden zwischen dem 01. April 2017 und dem 30. April 2021 in der Abteilung Genetik am Institut für Angewandte Biowissenschaften des Karlsruher Instituts für Technologie in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Jörg Kämper durchgeführt.

Hiermit erkläre ich, dass ich meine Dissertation mit dem Titel „Die Charakterisierung des Transkriptionsfaktors Hdp2 und dessen Rolle in der biotrophen Phase 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), in gültiger Fassung vom 24.05.2018, habe ich beachtet.

---

Ort/Datum

---

Matteo Jurca

## Abkürzungen

bE	bEast	Hdp2 <sup>S</sup>	Genprodukt von <i>hdp2<sup>S</sup></i> bzw. <i>hdp2<sup>S</sup></i>
bW	bWest	Hdp2 <sup>L</sup>	Genprodukt von <i>hdp2<sup>u</sup></i> bzw. <i>hdp2<sup>L</sup></i>
<i>bbs</i>	b-Bindestelle	IP	Immunopräzipitation
ChIP	Chromatin- Immunopräzipitation	<i>ip</i> -Locus	Gen für Untereinheit der Sukzinat-Dehydrogenase
ChIP-Seq	Chromatin- Immunopräzipitation mit anschließender Sequenzierung	<i>ip<sup>r</sup>[...]ip<sup>s/s*n</sup></i>	einfache/multiple Integration im <i>ip</i> -Locus
CM	Komplexmedium	P <sub>xyz</sub>	Promotor
dpi	<i>days post infection</i> (Tage nach Infektion)	qChIP	quantitative Chromatin- Immunopräzipitation
hpi	<i>hours post infection</i> (Stunden nach Infektion)	qRT-PCR	quantitative Real-time-PCR
<i>hdp2<sup>S</sup></i>	gespleißtes Transkript von <i>hdp2</i>	<i>Rbs</i>	Rbf1-Bindestelle
<i>hdp2<sup>u</sup></i>	ungespleißtes (bzw. intronloses) Transkript von <i>hdp2</i>	RNA-Seq	RNA-Sequenzierung
<i>hdp2<sup>S</sup></i>	cDNA Transkript von Hdp2 <sup>S</sup>	üN	über Nacht
<i>hdp2<sup>L</sup></i>	cDNA Transkript von Hdp2 <sup>L</sup>	w.o.	<i>without</i> (ohne Zusätze)
		Δ	Deletion

## Zusammenfassung

*Ustilago maydis* ist ein phytopathogener Basidiomyzet, dessen dimorpher Lebenszyklus die sexuelle und pathogenen Entwicklung miteinander verknüpft und in Abhängigkeit des Wirts *Zea mays* abläuft. Die Transition von saprophytischer zu biotropher Phase erfordert hierbei eine streng regulierte und komplexe Integration verschiedenster Signalwege, die über ein hierarchisches Transkriptionsfaktornetzwerk realisiert wird.

Nach erfolgter Zellfusion zweier kompatibler Sporidien, die über ein Pheromon-/Rezeptorsystem vermittelt wird, bildet sich ein dikaryotisches Filament, welches die biotrophe Phase einleitet. Die hierbei eingesetzte Regulationskaskade unterliegt der Kontrolle der vom *b*-Locus kodierten, heterodimeren Transkriptionsfaktoren bE und bW, die neben dem filamentösen Wachstum und einem G2-Zellzyklusarrest die Induktion weiterer Transkriptionsfaktoren auslösen. Der bW/bE-abhängig exprimierte Zinkfingertranskriptionsfaktor Rbf1 steuert dabei als zentraler Regulator 90 % der *b*-regulierten Gene. Rbf1 ist, unabhängig von *b*, sowohl notwendig als auch ausreichend für die Initiation der pathogenen Entwicklung; für den weiteren Infektionsverlauf ist *b* notwendig. Die Expression von *rbf1* während der Infektion unterliegt einer strengen Kontrolle; während es auf der Blattoberfläche zur Induktion kommt, reprimiert die Interaktion zwischen bW/bE und Clp1, einem weiteren direkt *b*-induzierten Faktor, die *rbf1* Expression. Zwei Tage nach der Infektion ist keine *rbf1* Expression mehr nachweisbar.

Mikroskopische und qRT-PCR Analysen in dieser Arbeit konnten zeigen, dass *rbf1* lediglich für den Übergang zur biotrophen Phase benötigt wird, da eine prolongierte Expression zu einer aberranten Zellkernverteilung und zum Verlust der Virulenz führt. Während *rbf1* selbst jedoch unmittelbar nach der Penetration nicht mehr aktiv ist, werden ungefähr die Hälfte der *rbf1*-regulierten Gene auch im weiteren Infektionsverlauf *in planta* exprimiert. Diese Weiterführung der Regulation wird durch die *rbf1*-abhängigen Transkriptionsfaktoren Hdp2 und Biz1 realisiert. Neben Aufrechterhaltung der Expression *rbf1*-vermittelter Gene, treibt vor allem Hdp2 die biotrophe Phase von *U. maydis* voran. ChIP-Seq Analysen konnten die Bindung von Hdp2 an zahlreiche Promotoren von pathogenitätsrelevanten Genen *in planta* zeigen und deuten nicht nur auf eine Regulation von charakterisierten Effektoren, sondern auch auf eine Weiterführung der Signalkaskade durch die Kontrolle weiterer Transkriptionsfaktoren hin.

*hdp2* selbst unterliegt einer komplexen Kontrolle, die ein Zusammenspiel aus verschiedenen Transkriptionsfaktoren und zwei alternativen Promotoren erfordert. Auf der Blattoberfläche wird *hdp2* von Rbf1 induziert, das nach der Penetration der Pflanze von Biz1 abgelöst wird. Die Übernahme der Regulation durch Biz1 erfolgt, nachdem ein gewisser Schwellenwert von Biz1 erreicht ist und ist

gleichzeitig mit einem Wechsel der Promotoren verbunden. Während Rbf1 vor einem 5'-Exon von *hdp2* bindet, findet die Bindung von Biz1 innerhalb des Introns statt, wodurch ein Transkript entsteht, das ein alternatives Startcodon bei der Translation verwendet und Hdp2 um 55 Aminosäuren verlängert. Die beiden Hdp2 Isoformen, Hdp2<sup>S</sup> und Hdp2<sup>L</sup>, weisen keine signifikanten Unterschiede bezüglich konservierter Domänen auf und zeigen keine Unterschiede hinsichtlich der Induktion von Zielgenen oder der pathogenen Entwicklung. Die Proteinvarianten sind damit als Nebenprodukte der Verwendung von zwei unterschiedlichen entwicklungsabhängigen Promotoren zu interpretieren.

Die Verwendung alternativer Promotoren wurde genomweit analysiert und konnte bei weiteren pathogenitätsrelevanten Genen identifiziert werden. Dies liefert Hinweise auf eine stadienspezifische Regulation dieser Gene während der Transition von saprophytischer zu biotropher Phase von *U. maydis* und wird von den Hauptregulatoren Rbf1, Hdp2 und Biz1 maßgeblich kontrolliert. Die entwicklungspezifische Regulation besitzt dabei eine Ähnlichkeit mit der in höheren Eukaryoten und ist ein Novum in Pilzen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit tragen wesentlich dazu bei, das Verständnis für den regulatorischen Aspekt der frühen biotrophen Phase und deren beteiligte Faktoren näher zu erweitern, wodurch neue Anhaltspunkte für anschließende Untersuchungen der pathogenen Entwicklung von *U. maydis* erlangt werden konnten.

## Summary

*Ustilago maydis* is a phytopathogenic basidiomycete, whose life cycle links sexual and pathogenic development in dependency of its host *Zea mays*. The transition from the saprophytic to the biotrophic life style requires a strictly regulated and complex integration of various signaling pathways, which is realised by a hierarchical network of transcription factors.

After cell fusion of two compatible sporidia, facilitated via a pheromone/receptor system, a dicaryotic filament is formed, ushering in the biotrophic stage. The regulatory cascade employed in this process is subject to the control of heterodimeric transcription factors bE and bW encoded by the *b*-locus, which triggers the induction of other transcription factors in addition to filamentous growth and a G2 cell cycle arrest. In this context, the bE/bW-dependently expressed zinc finger transcription factor Rbf1 acts as the central regulator controlling 90 % of *b*-regulated genes. Rbf1, independent of *b*, is both required and sufficient for the initiation of pathogenic development; *b* is absolutely essential for the further course of infection. The expression of *rbf1* during infection is precisely controlled; while induction occurs on the plant surface, the interaction between bW/bE and Clp1, another *b*-regulated factor, represses *rbf1*. Two days post infection, *rbf1* expression is no longer detectable.

Microscopy and qRT-PCR experiments demonstrate, that *rbf1* is only required for the transition into the biotrophic stage, as prolonged expression leads to an aberrant distribution of nuclei and results in the loss of virulence. However, while *rbf1* itself is immediately inactivated after plant penetration, approximately half of the *rbf1*-regulated genes continue to be expressed *in planta* as infection progresses. The continuation of regulation is realised by the *rbf1*-dependent transcription factors Hdp2 and Biz1. Apart from maintaining expression of *rbf1*-mediated genes, Hdp2 in particular drives the biotrophic phase of *U. maydis*. ChIP-Seq analysis was able to show binding of Hdp2 to numerous promoters of pathogenicity-relevant genes *in planta*, suggesting not only regulation of well characterised effectors, but also continuation of the signaling cascade through control of additional transcription factors.

*hdp2* itself is subject to a complex regulation, necessitating an interplay of different transcription factors and two alternative promoters. On the plant surface *hdp2* is induced by Rbf1, which is superseded by Biz1 after plant penetration takes place. The accession of regulation by Biz1 occurs once a certain threshold of Biz1 is exceeded and is accompanied by a change of promoters. While Rbf1 binds upstream of a 5'-exon of *hdp2*, binding of Biz1 occurs within an intron, resulting in a transcript, which uses an alternative start codon at translation, elongating Hdp2 by 55 amino acids. Both Hdp2 isoforms, Hdp2<sup>S</sup> and Hdp2<sup>L</sup>, exhibit no significant disparities in terms of conserved domains and show no

differences regarding target gene induction or impact on pathogenic development. Thus, the protein variants can be interpreted as byproduct of the use of two different stage-specific promoters.

The use of alternative promoters was observed among other virulence-dependent genes by genome-wide analysis. This points to a stage-specific regulation during transition from saprophytic to biotrophic life style of *U. maydis* and is primarily controlled by the main regulators Rbf1, Hdp2 and Biz1. The development-specific regulation here has similarity to that in higher eukaryotes and is a novelty in fungi.

The findings of this work contributed substantially in comprehending the regulatory aspect during early stages of biotrophy and its involved factors, providing a new basis for subsequent studies of the pathogenic development of *U. maydis*.



# Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungen</b> .....	<b>I</b>
<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>II</b>
<b>Summary</b> .....	<b>IV</b>
<b>1. Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1 Phytopathogene Pilze.....	1
1.2 Lebenszyklus.....	5
1.3 Paarungstyploci – Verknüpfung von sexueller mit pathogener Entwicklung .....	7
1.3.1 Der <i>a</i> -Locus – Perzeption und Fusion kompatibler Partner .....	7
1.3.2 Der <i>b</i> -Locus – Zentraler Schalter der pathogenen Entwicklung.....	9
1.4 Die <i>b</i> -Regulationskaskade .....	11
1.5 Zielsetzung.....	17
<b>2. Ergebnisse</b> .....	<b>18</b>
2.1 Einfluss von <i>rbf1</i> auf die Etablierung der biotrophen Phase.....	18
2.1.1 Der zeitliche Rahmen der Rbf1 Aktivität ist stark limitiert.....	18
2.1.2 Die Expression von <i>rbf1</i> während der biotrophen Phase führt zum Verlust der Pathogenität .....	23
2.1.3 Die Hälfte der <i>rbf1</i> -regulierten Gene ist weiterhin <i>in planta</i> exprimiert .....	30
2.2 ChIP-Seq Analysen von <i>hdp2</i> und <i>biz1</i> <i>in planta</i> .....	35
2.2.1 Vergleich der <i>in vitro</i> und <i>in planta</i> ChIP-Seq von Hdp2/Biz1 mit Rbf1 .....	35
2.2.2 Hdp2 Bindung und Regulation von Zielgenen .....	37
2.2.3 Hdp2 hat <i>in vitro</i> und <i>in planta</i> ein spezifisches Bindeverhalten.....	43
2.2.4 Hdp2 Konsensussequenz.....	45
2.2.5 Biz1 Bindung und Regulation von Zielgenen .....	48
2.2.6 Biz1 Konsensussequenz .....	51
2.3 Regulation von <i>hdp2</i> .....	53
2.3.1 <i>hdp2</i> wird unabhängig von <i>rbf1</i> und <i>biz1</i> induziert .....	55
2.3.2 Die Rolle von Hdp2 <sup>S</sup> und Hdp2 <sup>L</sup> während der Pathogenität.....	63
2.3.3 Der Promotor von <i>hdp2</i> wird von Hdp2 selbst gebunden .....	68
2.4 Verwendung alternativer Promotoren in <i>U. maydis</i> .....	70

---

<b>3. Diskussion .....</b>	<b>76</b>
3.1 Rbf1 wird lediglich für die Transition und Etablierung der biotropen Phase benötigt .....	76
3.2 Hdp2 und Biz1 halten die Expression <i>rbf1</i> -regulierter Gene <i>in planta</i> aufrecht.....	81
3.3 Hdp2 treibt die biotrophe Phase nach der Penetration voran.....	85
3.3.1 Das Bindeverhalten von Hdp2 <i>in vitro</i> vs. <i>in planta</i> .....	87
3.3.2 Die Hdp2 Konsensussequenz.....	89
3.3.3 Angriff ist die beste Verteidigung - Hdp2 und Biz1 regulieren das Sekretom von <i>U. maydis</i> .....	90
3.3.4 Hdp2 beeinflusst die nächste Ebene an Transkriptionsfaktoren der Signalkaskade.....	94
3.4 Interagieren Biz1 und Hdp2 <i>in planta</i> miteinander?.....	99
3.5 Die Regulation von <i>hdp2</i> .....	100
3.5.1 Die <i>rbf1</i> - und <i>biz1</i> -abhängige <i>hdp2</i> Regulation .....	100
3.5.2 Reguliert sich <i>hdp2</i> selbst?.....	103
3.5.3 Hdp2 <sup>S</sup> und Hdp2 <sup>L</sup> sind lediglich Nebenprodukte der Regulation .....	105
3.6 Alternative Promotoren in <i>U. maydis</i> .....	108
<b>4. Material und Methoden.....</b>	<b>112</b>
4.1 Material und Bezugsquellen.....	112
4.1.1 Chemikalien, Puffer, Lösungen, Kits, Enzyme und Medien .....	112
4.1.2 Stämme .....	116
4.1.3 Nukleinsäuren, Oligonukleotide und Plasmide .....	121
4.1.4 Sonstige Materialien.....	133
4.2 Mikrobiologische und genetische Methoden .....	135
4.2.1 <i>Escherichia coli</i> .....	135
4.2.2 <i>Ustilago maydis</i> .....	136
4.3 Molekularbiologische Standardmethoden.....	139
4.3.1 Isolierung von Nukleinsäuren.....	139
4.3.2 Handhabung von Nukleinsäuren .....	141
4.3.3 <i>in vitro</i> Modifikationen von DNA (Sambrook <i>et al.</i> , 1989) .....	142
4.3.4 Auftrennung und Nachweis von DNA-Fragmenten.....	144
4.4 Biochemische Methoden.....	147
4.4.1 Isolierung von Gesamtprotein .....	147
4.4.2 Auftrennung und Nachweis von Proteinen (SDS-PAGE) .....	147
4.4.3 Nachweis von immobilisierten Proteinen (Western-Analyse) .....	148
4.4.4 Chromatinisolation und Chromatin-Immunopräzipitation .....	150

---

4.5	PCR-Techniken.....	153
4.5.1	Polymerase-Kettenreaktion (PCR) (Innis <i>et al.</i> , 1990).....	153
4.5.2	Real-Time-PCR (qRT-PCR) .....	153
4.5.3	PCR-Generierung von Gen-Deletionskonstrukten für <i>U. maydis</i> .....	154
4.5.4	PCR-Generierung von Fusionskonstrukten für <i>U. maydis</i> .....	155
4.5.5	Gibson Assembly® .....	156
4.6	Sequenzanalysen und <i>in silico</i> Methoden .....	157
<b>5.</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>160</b>
<b>6.</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>177</b>
6.1	Digitale Daten .....	184

# 1. Einleitung

## 1.1 Phytopathogene Pilze

Phytopathogene Pilze wurden spätestens mit der landwirtschaftlichen Revolution, die ca. 10.000 v. Chr. mit dem Ackerbau begann, zu einer Bedrohung der menschlichen Lebensmittelversorgung. Damals wusste man zwar bereits, dass auch Pflanzen genau wie Menschen und Tiere von Krankheiten befallen werden können, doch nicht, dass kleinste Lebewesen die Auslöser dafür sind. Erst in der Mitte des 17. Jahrhunderts erfuhr man von der Existenz von Bakterien durch erste mikroskopische Beobachtungen von Antoni van Leeuwenhoek und Robert Hooke (Chung und Liu, 2018). Doch es dauerte weitere 200 Jahre, bis Robert Koch den Zusammenhang zwischen Krankheit, deren Entstehung und Mikroorganismen als Erreger aufklärte. Seitdem hat sich unser Wissen um Mikroorganismen und deren verursachten Infektionen kontinuierlich erweitert. Dennoch wird die Rolle, die pathogene Pilze heutzutage in Anbetracht der immer wachsenden Weltbevölkerung, ihrer Ernährung und des drohenden Klimawandels einnehmen, zunehmend größer.

Während phytopathogene Pilze uns seit dem Neolithikum begleiten, treten humanpathogene erst seit dem 20. Jahrhundert mit dem erhöhten Aufkommen immunsuppressiver Umstände, wie HIV und Chemotherapie, ins Rampenlicht (Nucci und Marr, 2005; Low und Rotstein, 2011; Armstrong-James *et al.*, 2014). Eine Besserung ist nicht in Sicht, zumal vermutet wird, dass die Erderwärmung neue Formen pilzlicher Infektionskrankheiten mit sich bringt (Garcia-Solache und Casadevall, 2010) und die Resistenzen gegenüber den limitierten antimykotischen Pharmazeutika bereits steigen (Fairlamb *et al.*, 2016; Jensen, 2016; Perlin *et al.*, 2017). So fallen jetzt schon 1,5 Mio. Menschen Mykosen zum Opfer und weit über 1 Mrd. klagen über zahlreiche Leiden, die von Ascomyceten und Basidiomyceten herbeigeführt werden (zusammengefasst in Brown *et al.*, 2012). Am besten erforscht und am bedeutendsten sind hierbei *Aspergillus fumigatus* (Latge und Chamilos, 2019), *Candida albicans* (Poulain, 2015) und *Cryptococcus neoformans* (Kwon-Chung *et al.*, 2014).

Kein anderer Organismus löst mehr Krankheiten bei Pflanzen aus als Pilze. Allein in Nordamerika sind mehr als 8.000 Pilze für fast 100.000 Krankheiten verantwortlich (Agrios, 1997). Anfang des 21. Jahrhunderts wurde der weltweite Ernteverlust auf 13 % geschätzt (Oerke, 2006). Andere Berechnungen lassen noch höhere Einbußen vermuten (Fisher *et al.*, 2012). Um dem entgegenzuwirken, sind Fungizide die bisher bewährteste Lösung. Während der Verkauf von Fungiziden zur Jahrtausendwende noch bei knapp 5 Mrd. US\$ lag, hat er sich bis 2016 fast verdreifacht (Nishimoto, 2019). 2019 waren in Deutschland 30 % der zugelassenen Pflanzenschutzmittel Fungizide, mit einem Absatz von über 10.000 Tonnen (Bundesamt für Verbraucherschutz und

Lebensmittelsicherheit, 2020). Doch deren Effektivität nimmt aufgrund steigender Resistenzen, wie auch bei Antimykotika, stetig ab (Lucas *et al.*, 2015). Zudem ist der Einsatz nicht frei von Nebenwirkungen und hat auch Konsequenzen für andere Organismen. (Geno)toxische Effekte führen nicht nur zu Dysbalancen in den Ökosystemen, auch der Endverbraucher – also wir – bleibt nicht verschont (zusammengefasst in Shuping und Eloff, 2017).

Die Erforschung dieses Reichs ist somit längst unabdingbar geworden, um künftige Herausforderung der Moderne nicht nur in medizinischer, sondern auch in sozioökonomischer und ökologischer Hinsicht zu bewältigen.

### **Ustilago maydis**

*Ustilago maydis*, der Erreger des Maisbeulenbrandes, hat sich dabei innerhalb der letzten Jahrzehnte zu einem der vorherrschenden Vertreter in diesem Feld entwickelt. So repräsentiert *U. maydis* einen der zehn wichtigsten phytopathogenen Pilze (Dean *et al.*, 2012). Dies beruht nicht auf wirtschaftlicher Relevanz, sondern auf der Bedeutsamkeit die *U. maydis* als Modellorganismus innehat. Unter Laborbedingungen lässt sich *U. maydis* in der saprophytischen Form problemlos kultivieren und der kurze Lebenszyklus ist innerhalb von drei bis vier Wochen vollzogen (Banuett, 1995). Anhand des ebenfalls einfachen Umgangs mit Mais, lassen sich Pathogenitätsstudien unkompliziert durchführen. Der haploide Chromosomensatz, ein sequenziertes Genom (Kämper *et al.*, 2006) und eine hoch effiziente homologe Rekombination (Holliday, 1974) vereinfachen die Handhabung genetischer Manipulationen, wie z.B. Gendeletionen und -fusionen (Brachmann *et al.*, 2004; Feldbrügge *et al.*, 2004; Kämper, 2004). Für deren Selektion sind diverse Antibiotikaresistenzen (Keon *et al.*, 1991; Gold *et al.*, 1994; Kojic und Holloman, 2000), sowie ein Rekombinasesystem, zur Wiederverwertung dieser Marker (Khrunyk *et al.*, 2010), verfügbar. Seit der Etablierung des CRISPR/Cas9-Systems in *U. maydis* (Schuster *et al.*, 2016), lassen sich zudem mehrere Gene simultan und spezifischer editieren (Schuster *et al.*, 2018b; Zuo *et al.*, 2020). Neben metabolisch regulierbaren Promotoren (Banks *et al.*, 1993; Bottin *et al.*, 1996; Brachmann *et al.*, 2004), sind auch Promotoren beschrieben, die durch (noch unbekannte) Pflanzensignale spezifisch reguliert werden und für zell- und molekularbiologische Untersuchungen während der biotrophen Phase genutzt werden können (Farfsing *et al.*, 2005; Mendoza-Mendoza *et al.*, 2009; Schmitz *et al.*, 2020). Vor Kurzem wurde der molekulare Werkzeugkasten um eine zusätzliche Technik erweitert. Diese ermöglicht es polycistronische mRNA, die sonst in der Natur nur bei Prokaryoten<sup>1</sup> (und Plastiden) vorkommt, in *U. maydis* zu generieren. Dadurch kann bspw. eine präzise Expression von co-regulierten Genen erzielt werden (Müntjes *et al.*, 2020). Des Weiteren wurde in den letzten Jahren vermehrt ein Blick auf die

---

<sup>1</sup> Als Eukaryot bildet *Drosophila melanogaster* eine Ausnahme, wo auch dicistronische Transkripte beschrieben sind (Andrews *et al.*, 1996; Wall *et al.*, 2005).

Sekundärmetabolitproduktion von *U. maydis* geworfen. Allen voran die Produktion von Itaconsäure, die vorrangig als Plattformchemikalie in der Industrie eingesetzt wird (Becker *et al.*, 2020b; Becker *et al.*, 2020a; Demir *et al.*, 2021). Im Vergleich zu *Aspergillus itaconicus* und *Aspergillus terreus*, verwendet *U. maydis* dabei einen alternativen Syntheseweg (Geiser *et al.*, 2016).

Aufgrund der engen Wirtsspezifität, die sich lediglich auf Mais (*Zea mays*) und dessen Urform die Teosinte (*Euchlena mexicana*) bezieht (Doebley, 1992), ist eine Gefahr für andere Organismen ausgeschlossen und benötigt beim Umgang daher keine strengen Sicherheitsvorkehrungen.

Zusammen mit seinen nahen Verwandten *Ustilago hordei*, *Ustilago tritici*, *Sporisorium reilianum* zählt *U. maydis* zu den Ustilaginomycotina, den Brandpilzen, einem Subphylum der Basidiomycota. Bis auf die Gattung *Malassezia* sind alle Vertreter Phytopathogene, die hauptsächlich Süßgräser (Poaceae) befallen (Begerow *et al.*, 2006). Beim Maisbeulenbrand reagiert die Pflanze zunächst mit Bildung von Chlorosen und Anthocyanen an den Blättern. Spätere Zeitpunkte zeichnen sich durch die typischen Gallen (auch als Tumore bezeichnet) an Blättern, Stängeln und Kolben aus (Christensen, 1963). In ihnen reifen durch



**Abbildung 1.1: Mit *U. maydis* infizierter Maiskolben.** Die charakteristischen Gallen entstehen aus einem einzelnen Maiskorn und sind mit melanierten Teliosporen gefüllt, die der Verbreitung und Überdauerung dienen (Feld Böhl-Iggelheim, Baumann).

Karyogamie diploide melanierte Teliosporen heran. Diesen schwarzen Sporen verdanken die Brandpilze ihren Namen, da beim Aufplatzen der Gallen die Sporen auf der Pflanze verteilt werden und diese verbrannt aussehen lassen (Banuett, 1992). Während hierzulande *U. maydis* edler Cousin, der Steinpilz (*Boletus edulis*), den Ruf einer Delikatesse genießt, werden in Mexiko infizierte Maiskolben, bekannt als „Huitlacoche“ verspeist (Ruiz-Herrera und Martinez-Espinoza, 1998).

Der Dimorphismus und die damit verbundene Pathogenität, vergleichbar mit der vieler humanpathogener Pilze, rückt *U. maydis* ins Visier der Forscher. MAP-Kinase- und cAMP-Kaskaden sind evolutionär konserviert und stellen wichtige Komponenten der pathogenen Entwicklung dar, da sie beim Morphologiewechsel von hefeartigem zu filamentösem Wachstum essenziell sind (Madhani und Fink, 1998; Lengeler *et al.*, 2000). Auch das filamentöse Wachstum an sich ist von Interesse. Der dort stattfindende Langstreckentransport auf den Mikrotubuli gleicht Transportprozessen, die im Axon von Neuronen anzutreffen sind. Eine offene Mitose und DNA-Reparaturmechanismen kommen den von humanen Zellen ebenfalls nahe (zusammengefasst in Steinberg und Perez-Martin, 2008). Als Modellorganismus erleichtert *U. maydis* infolgedessen die

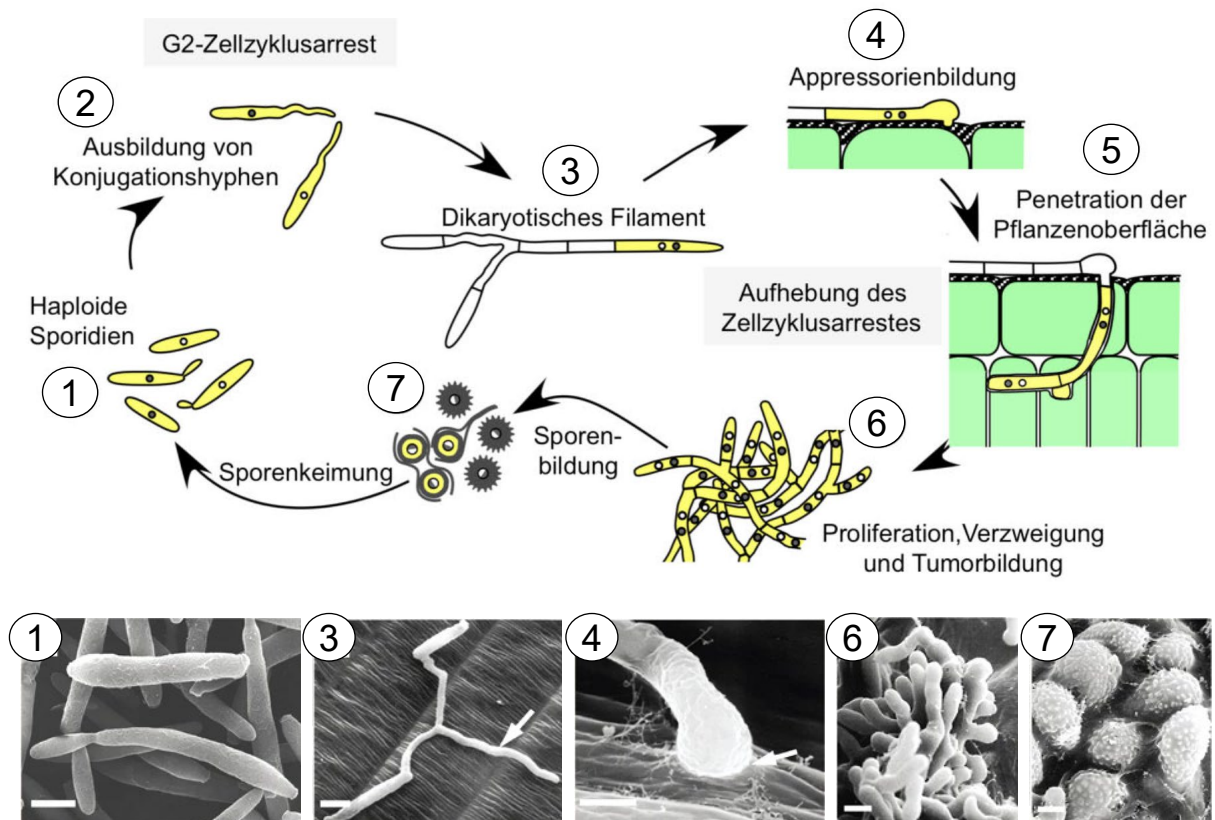
Untersuchung von konservierten Entwicklungsprozessen und pathogenitätsrelevanter Mechanismen und bildet daher eine Grundlage zur Entwicklung neuer Methoden, die der Bekämpfung von bedrohlichen und weniger zugänglichen Pathogenen dienen.

## 1.2 Lebenszyklus

Der Lebenszyklus von *U. maydis* zeichnet sich durch eine saprophytische und eine biotrophe Phase aus, deren Übergang einen Morphologiewechsel erfordert. In der saprophytischen Phase wächst *U. maydis* als haploide Sporidie und vermehrt sich vegetativ durch hefeartige Knospung. In diesem Stadium ist der Pilz apathogen und nicht auf seinen Wirt angewiesen. Die pathogene Phase verläuft in Abhängigkeit zur Pflanze und wird durch die Fusion zweier kompatibler Sporidien eingeleitet **(1)** (siehe Abbildung 1.2)(Snetselaar und Mims, 1992). Ein Pheromon-/Rezeptorsystem, kodiert durch den *a*-Locus (Bölker *et al.*, 1992), sorgt dabei für die Erkennung beider Zellen und ist, neben dem *b*-Locus, Teil des tetrapolaren Systems, das die Kompatibilität kontrolliert (Bölker, 2001; Feldbrügge *et al.*, 2004; Kahmann und Kämper, 2004). Besitzen beide Partner unterschiedliche Allele, wachsen sie mit Hilfe von Konjugationshyphen über einen Pheromongradienten aufeinander zu und verschmelzen (Snetselaar *et al.*, 1996). Zeitgleich wird der Zellzyklus arretiert **(2)** (Garcia-Muse *et al.*, 2003). Unter der Kontrolle des *b*-Locus, wächst das dikaryotische Filament durch Spitzenwachstum auf der Blattoberfläche weiter **(3)** (Spellig *et al.*, 1994b). Der Zellzyklusarrest wird dabei aufrechterhalten. Anstelle einer Zellteilung, findet eine Septierung statt, welche die Hyphe in Kompartimente unterteilt. Ausgehend vom apikalen Kompartiment, das als einziges Zytoplasma und die beiden Zellkerne enthält (Banuett und Herskowitz, 1994), können nun Appressorium-ähnliche Strukturen **(4)** zur Penetration der Pflanze ausgebildet werden **(5)**. Bei anderen phytopathogenen Pilzen findet in diesen Strukturen eine Melanineinlagerung, sowie eine Erhöhung des Turgordrucks durch Akkumulation von Osmolyten, statt (Bechinger *et al.*, 1999; Talbot, 2003). Dies ermöglicht es die Pflanze durch mechanische Krafteinwirkung zu penetrieren und somit zu infizieren. Bei *U. maydis* dienen Appressorien als Markierung für die Penetration, die vermutlich durch lytische Enzyme erfolgt und dem Wechsel der Polarität (Snetselaar und Mims, 1992, 1993; Kahmann und Kämper, 2004; Schirawski *et al.*, 2005). Nach dem Eindringen wird der Zellzyklusarrest aufgehoben und der Pilz wächst intrazellulär weiter. Die Plasmamembran der pflanzlichen Zelle bleibt hierbei intakt und es entsteht eine Interaktionszone, in der Signal- und Nährstoffe zwischen invasivem Pilz und angrenzender Pflanzenzelle ausgetauscht werden können (zusammengefasst in (Brefort *et al.*, 2009)). Die nun eingesetzte Proliferation der Pilzhyphe konzentriert sich primär auf nährstoffreiche Gewebe wie das der Leitbündel. Außerdem kommt es zu einer verstärkten Verzweigung des Myzels, das eine korrekte Zellkernverteilung benötigt **(6)** (Snetselaar und Mims, 1994; Banuett und Herskowitz, 1996). Diese wird, wie bei Basidiomyceten üblich, durch Schnallenzellen vermittelt (Scherer *et al.*, 2006). Infolgedessen tritt abgesehen von einer erhöhten Teilungsrate, auch eine Hypertrophie der infizierten Wirtszellen ein, die das Gewebe zu einem tumorartigen Gebilde anschwellen lassen. In diesen Tumoren reifen, durch Karyogamie und anschließender Differenzierung, die diploiden Teliosporen heran **(7)** (Snetselaar und Mims, 1993;



Banuett und Herskowitz, 1996). Sobald die Tumore aufplatzen, werden die Sporen über Wind, Wasser und Insekten verbreitet und können so bis zur Auskeimung überdauern. Aus dem diploiden Kern entstehen dabei nach einer Meiose vier haploide Kerne, die in eine Probasidie einwandern. Daraus knospen neue Sporidien ab, womit der Lebenszyklus von vorne beginnt (zusammengefasst in Christensen, 1963).



**Abbildung 1.2: Der Lebenszyklus von *U. maydis*.** Schematische Darstellung und elektronenmikroskopische Aufnahmen der unterschiedlichen Stadien während der pathogenen Entwicklung **(1)** Vegetatives Wachstum durch hefeartige Knospung **(2)** Ausbildung von Konjugationshyphen und Zellfusion **(3)** Filamentös wachsendes Heterodikaryon **(4)** Penetration der Pflanzenoberfläche mittels Appressorien **(5)** Aufhebung des Zellzyklusarrestes und Proliferation bei gleichzeitiger Schnallenbildung **(6)** Verzweigung des Myzels, Tumorbildung und Karyogamie **(7)** Differenzierung der Teliosporen (modifiziert nach Kämper *et al.*, 2006).

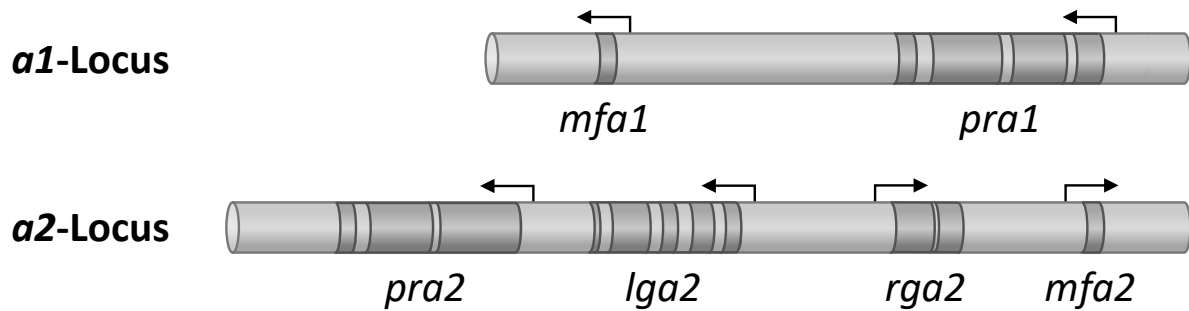
### 1.3 Paarungstyploci – Verknüpfung von sexueller mit pathogener Entwicklung

Die Kopplung von Pathogenität mit sexueller Entwicklung ist ein typisches Merkmal der Brandpilze (Bakkeren *et al.*, 2008). Koordiniert wird dieser komplexe Prozess von Paarungstyploci, die bei heterothallischen Spezies üblicherweise in einem tetrapolaren System vorkommen. So auch bei *U. maydis*, wo zwischen *a*- und *b*-Locus unterschieden wird (Kothe, 1996; Hsueh und Heitman, 2008). Von den beiden Paarungstyploci, werden ein Pheromon-/Rezeptorsystem und Homeodomänentranskriptionsfaktoren kodiert, die charakteristisch für dieses System in Basidiomyceten sind (Morrow und Fraser, 2009). Während Perzeption und Fusion vom biallelischen *a*-Locus kontrolliert werden, ist der multiallelische *b*-Locus an filamentösem Wachstum, Penetration und der weiteren pathogenen Entwicklung maßgeblich beteiligt (zusammengefasst in Bölker, 2001). Ein solch vielseitiges System verhindert die Kreuzung genotypisch gleicher Zellen und hält so die genetische Diversität aufrecht.

#### 1.3.1 Der *a*-Locus – Perzeption und Fusion kompatibler Partner

Die Zell/Zell-Erkennung der Sporidien wird durch den biallelischen *a*-Locus über ein Pheromon-/Rezeptorsystem gesteuert. Kodiert von den Allelen *a1* und *a2* (Abbildung 1.3), bilden das Pheromon Mfa (*mating factor a*) und dessen membranständiger Rezeptor Pra (*pheromon receptor a*) dieses System (Bölker *et al.*, 1992).

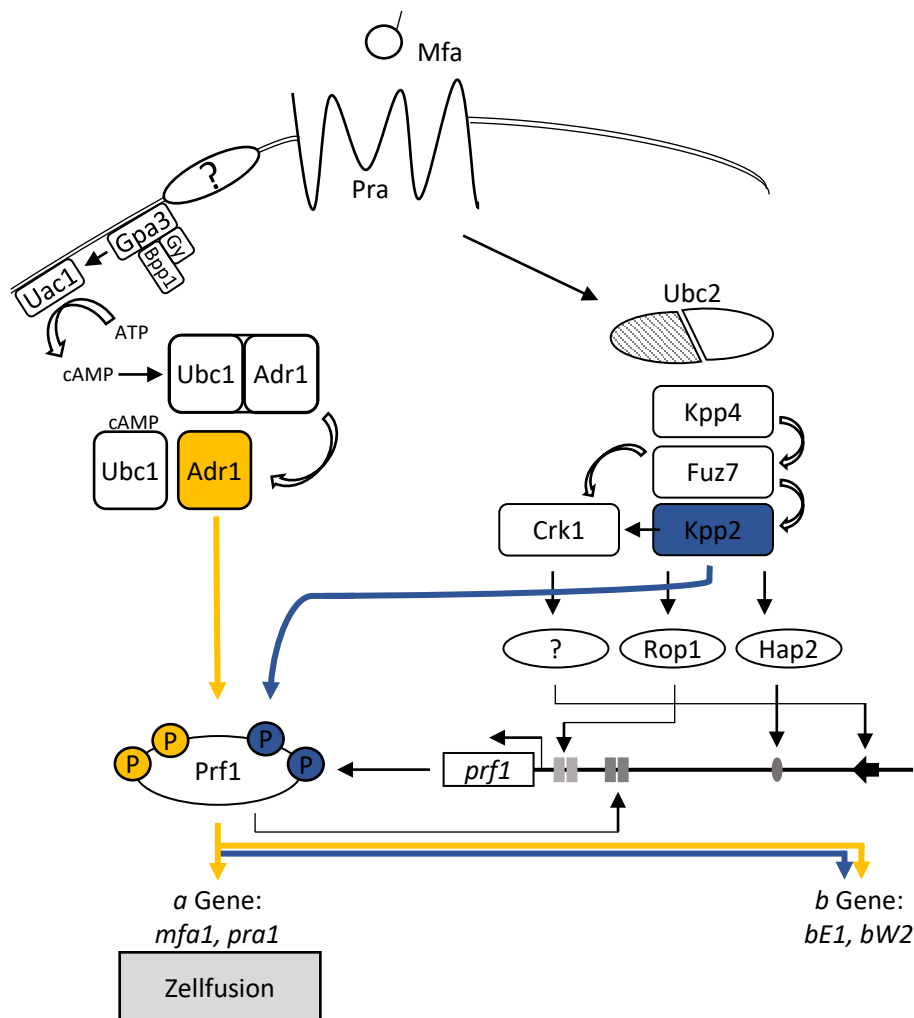
Die Peptide Mfa1 und Mfa2, bestehend aus 40 bzw. 38 Aminosäuren, stellen zunächst nur Vorläufermoleküle dar. Erst nach posttranslationaler Modifikationen am C-Terminus, wie Farnesylierung und Methylierung, ist ein voll funktionsfähiges Pheromon vorhanden, das daraufhin sekretiert wird (Spellig *et al.*, 1994a). Die Perzeption erfolgt durch den jeweils komplementären Rezeptor und resultiert in der Bildung von Konjugationshyphen. Die Sieben-Transmembrandomänen-Rezeptoren Pra1 und Pra2 (346 bzw. 357 Aminosäuren) weisen hohe Homologien zu anderen pilzlichen Pheromonrezeptoren auf und werden daher auch in die Familie der Ste3p-ähnlichen Rezeptoren aus *Saccharomyces cerevisiae* eingeordnet (Bölker *et al.*, 1992). Der *a2*-Locus beinhaltet zusätzlich die Gene *lga2* und *rga2* (Urban *et al.*, 1996a). Die daraus hervorgehenden Proteine lösen Fusions- und Spaltprozesse der Mitochondrien im fusionierten Dikaryon aus und regulieren somit die uniparentale Vererbung mitochondrieller DNA (Bortfeld *et al.*, 2004; Fedler *et al.*, 2009; Mahlert *et al.*, 2009).



**Abbildung 1.3: Schematische Darstellung der  $\alpha$ -Loci.** Beide Loci kodieren für einen Vorläufer des Pheromons Mfa und dessen Pheromonrezeptor Pra. Der  $\alpha 2$  Locus besitzt des Weiteren die Gene *lga2* und *rga2*, die für die mitochondriale Vererbung relevant sind (modifiziert nach Urban *et al.*, 1996b).

Befinden sich zwei kompatible Sporidien in räumlicher Nähe, nehmen diese sich über das Pheromon-/Rezeptorsystem wahr und bilden Konjugationshyphen aus, die entlang eines Pheromongradienten aufeinander zuwachsen bis sie letztlich fusionieren (Spellig *et al.*, 1994a; Snetselaar *et al.*, 1996). Um eine synchrone Entwicklung des Dikaryons sicherzustellen, wird der Zellzyklus darüber hinaus in der G2-Phase arretiert (Garcia-Muse *et al.*, 2003). Nach Bindung des Lipopeptidpheromons an den Rezeptor, läuft die weitere Signaltransduktion über eine cAMP-abhängige Proteinkinase A (PKA) (Hartmann *et al.*, 1999) und eine Mitogen-aktivierte Protein-Kinase-Kaskade (MAPK-Kaskade) (Müller *et al.*, 2003) ab. Beide führen zur Phosphorylierung des HMG-Transkriptionsfaktors Prf1 (*pheromone response factor 1*), dem zentralen Regulator der Pheromonkaskade (siehe Abbildung 1.4) (Hartmann *et al.*, 1996). Dabei spielt es eine Rolle, über welchen der beiden Wege Prf1 phosphoryliert wird. Phosphorylierung durch die PKA ADR1 reicht aus, um die  $\alpha$ -Gene zu induzieren. Um die  $\beta$ -Gene zu aktivieren, ist außerdem die Phosphorylierung der MAPK Kpp2 notwendig (Kaffarnik *et al.*, 2003). Für die Expression von *prf1* ist neben einem unbekanntem Faktor, Rop1 und Hap2, die alle drei von Kpp2 und Crk1 gesteuert werden, Prf1 selbst erforderlich (zusammengefasst in (Brefort *et al.*, 2009)). Nach posttranslationaler Phosphorylierung bindet Prf1 über Pheromon-Response-Elemente (PRE) und in Abhängigkeit des Phosphorylierungsstatus an verschiedene Zielgene (Hartmann *et al.*, 1996; Kaffarnik *et al.*, 2003; Zarnack *et al.*, 2008). Hierzu zählen die  $\alpha$ -Locus Gene *mfa*, *pra*, sowie *prf1* selbst, wodurch eine positive Rückkopplungsschleife entsteht, die die Pheromonantwort zunehmend amplifiziert und vermutlich auch das Wachstum der Konjugationshyphen vorantreibt (Snetselaar *et al.*, 1996; Hartmann, 1997). Die autokrine Stimulation wird erst mit der Expression kompatibler  $\beta$ -Gene nach der Fusion reprimiert (Urban *et al.*, 1996a). Obwohl in den Promotoren der  $\beta$ -Gene, sowie in dem vom Zinkfingertranskriptionsfaktor Rbf1, keine PREs zu finden sind, gehören sie zu weiteren (indirekten) Zielgenen von Prf1, die nicht nur das filamentöse Wachstum bestimmen, sondern die gesamte

nachfolgende pathogene Entwicklung (Hartmann *et al.*, 1996; Zarnack *et al.*, 2008; Heimel *et al.*, 2010b).



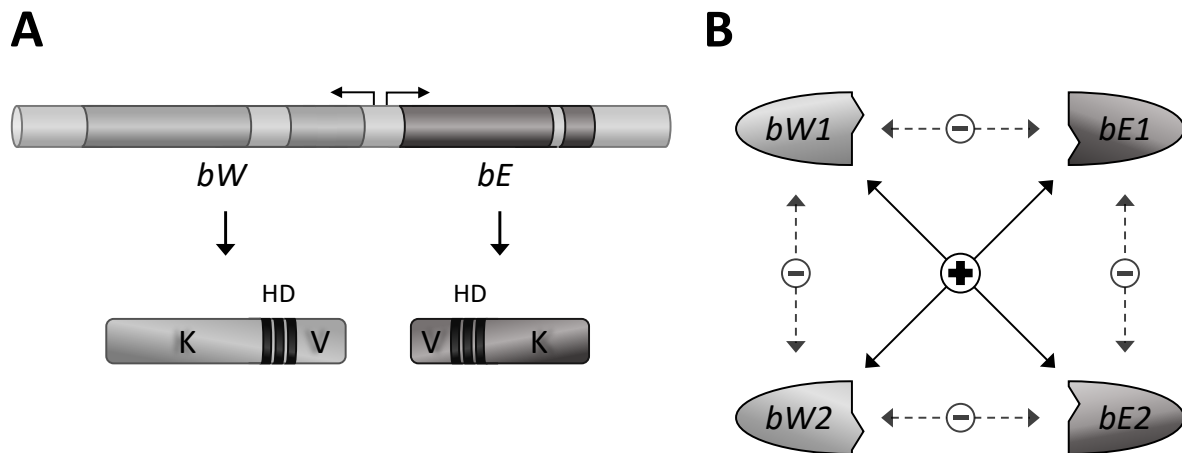
**Abbildung 1.4: Schematische Darstellung der a-vermittelten Pheromonkaskade.** Über die Proteine der MAPK Kaskade Ubc2, Kpp4, Fuz7 und Kpp2 wird, nach deren Aktivierung durch das Pheromon /Rezeptorsystem mittels Mfa und Pra, der zentrale Transkriptionsfaktor Prf1 phosphoryliert. Bindung an die Promotorregion von *prf1* durch die Kpp2 regulierten Proteine Rop1 und Hap2, einem unbekanntem Faktor, der von Crk1 aktiviert wird, sowie Prf1 selbst, führt zu dessen Expression. Erst nach Phosphorylierung ist Prf1 aktiv und in der Lage die Zellfusion, sowie, über die Bildung des bW/bE-Heterodimers, die *b*-Regulationskaskade zu beeinflussen. Die Phosphorylierung durch die PKA Adr1 (gelb) ist ausreichend, um die *a*-Gene zu induzieren. Ein heterotrimeres G-Protein dient hierbei als Relay für äußere Signale und gibt diese über die Adenylatzyklase Uac1 an die inhibitorische und katalytische Untereinheit der Proteinkinase weiter. Für die Induktion der *b*-Gene ist zusätzlich die Phosphorylierung durch die MAPK Kpp2 notwendig (blau) (modifiziert nach Fortenbacher, 2019).

### 1.3.2 Der *b*-Locus – Zentraler Schalter der pathogenen Entwicklung

Nach der Fusion zweier kompatibler Sporidien erfolgt die weitere Steuerung der pathogenen Entwicklung über den multiallelischen *b*-Locus (Bölker *et al.*, 1995). Dieser kodiert für die Homeodomänentranskriptionsfaktoren bWest (bW) und bEast (bE), die von einer gemeinsamen ca. 200 bp langen Promotorregion divergent transkribiert werden (Abbildung 1.5 A)

(Schulz *et al.*, 1990; Gillissen *et al.*, 1992). Obwohl den 473 (bE) und 645 (bW) Aminosäuren langen Proteinen größere Sequenzhomologien fehlen, ähneln sie sich in ihrer strukturellen Komposition. Der C-terminale Bereich ist zwischen den diversen Allelen hoch konserviert und enthält die, für die DNA-Bindung verantwortliche, Homeodomäne. Der N-terminale Bereich dagegen, ist variabel und beinhaltet Interaktionsdomänen, die für die Dimerisierung der beiden Homeodomänenproteine wichtig sind (Kronstad und Leong, 1990; Schulz *et al.*, 1990; Gillissen *et al.*, 1992). Denn nur wenn beide Proteine von unterschiedlichen Allelen stammen, bilden sie ein Heterodimer, das als Transkriptionsfaktor funktionell ist (Abbildung 1.5 B) (Kämper *et al.*, 1995). In der Natur sind bisher 19 verschiedene Allele des *b*-Locus beschrieben worden. Die evolutionär Jüngeren sind aus einzelnen Rekombinationsereignissen unterschiedlicher *b*-Allele entstanden. Die Komponenten in den variablen Domänen, die für die Dimerisierung entscheidend sind, werden bei der Rekombination in beiden *b*-Genen (*bW* und *bE*) simultan ausgetauscht bzw. „durchmischt“, wodurch die Selbst-/Nichtselbsterkennung modifiziert wird und neue Spezifitäten entstehen können (Kämper *et al.*, 2020).

Nach der Komplexbildung von kompatiblen bW- und bE-Proteinen, vermag das Heterodimer sequenzspezifisch an DNA zu binden, um die Expression von Zielgenen zu steuern (Romeis *et al.*, 2000; Brachmann, 2001; Heimel *et al.*, 2010b). Die Bindung erfolgt an konservierten Motiven, den b-Bindestellen (*bbs*) und bedarf die Homeodomäne beider b-Proteine (Romeis *et al.*, 1997; Schlesinger *et al.*, 1997; Romeis *et al.*, 2000). Die variable Domäne ist dagegen für die Funktion und Pathogenität nicht essenziell (Romeis *et al.*, 1997). Im Labor erzeugte haploide Stämme, die kompatible *b*-Loci besitzen, sind auch ohne Partner virulent (Bölker *et al.*, 1995; Kämper *et al.*, 2006) und zeigen damit, dass ein funktionelles b-Heterodimer notwendig und ausreichend für die Infektion ist. Solopathogene Stämme verhalten sich in späteren Stadien jedoch anders als gekreuzte haploide Stämme und weisen eine geringere Biomasse als diese auf (Lanver *et al.*, 2018), belegen allerdings die Bedeutsamkeit, die das b-Heterodimer als zentraler Schalter im sexuellen Zyklus und der pathogenen Entwicklung einnimmt (Bölker *et al.*, 1995; Brachmann, 2001; Heimel *et al.*, 2010b).



**Abbildung 1.5: Schematische Darstellung des *b*-Locus und die Kompatibilität dessen Produkte. A)** Darstellung der genomischen Struktur des *b*-Locus. Die Gene *bW* und *bE* werden divergent von einer gemeinsamen Promotorregion transkribiert. Die Homeodomäne (HD) befindet sich bei beiden Proteinen zwischen dem variablen (V) und konstanten (K) Bereich. **B)** Nur wenn die Homeodomänenproteine von unterschiedlichen Allelen stammen, kommt es zur Dimerisierung und zu einem funktionell aktiven Transkriptionsfaktor (Abbildung nach Brachmann, 2001).

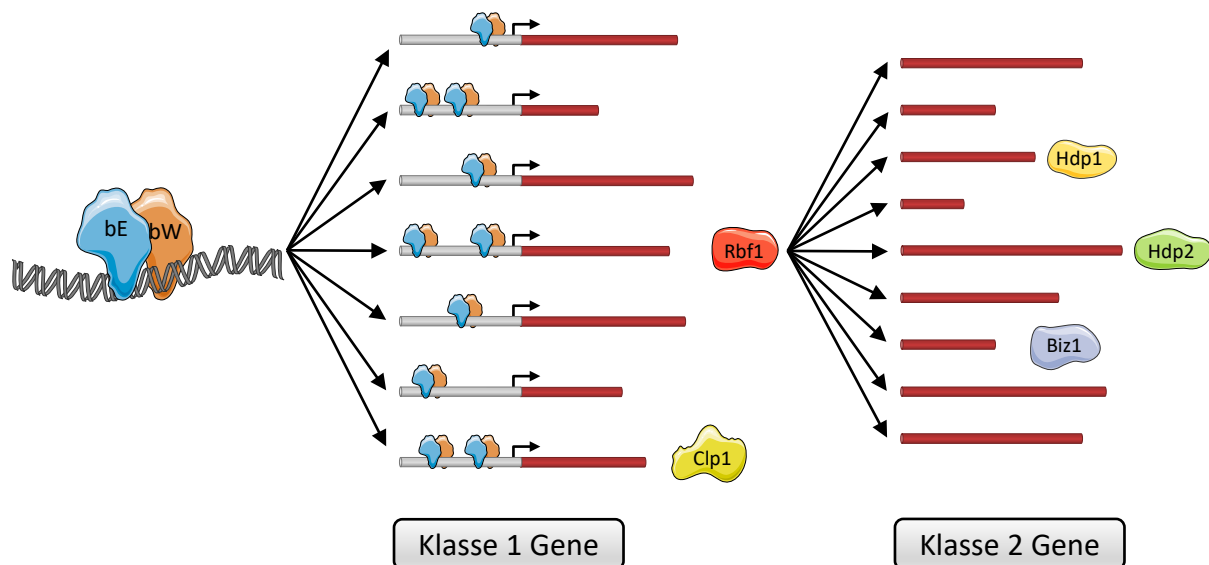
#### 1.4 Die *b*-Regulationskaskade

Das *b*-Heterodimer steht hierarchisch an der Spitze einer komplexen Regulationskaskade und ist Teil eines dichten Geflechts an Transkriptionsfaktoren, das den Übergang zwischen saprophytischer und biotropher Lebensweise einleitet. Die Expression ist verbunden mit einem ausgeprägten Spitzenwachstum, das in Filamentbildung bei gleichzeitiger Septierung und Bildung infektiöser Strukturen resultiert, einem G2-Zellzyklusarrest, der sicherstellt, dass dieser Morphologiewechsel korrekt verläuft und die Induktion weiterer pathogenitätsrelevanter Transkriptionsfaktoren (Brachmann, 2001; Scherer *et al.*, 2006; Heimel *et al.*, 2010b; Castanheira *et al.*, 2014; Castanheira und Perez-Martin, 2015).

Die 345 (Heimel *et al.*, 2010b) bzw. 184 (Ulrich, 2020) Gene<sup>2</sup>, die in genomweiten Expressionsanalysen als differenziell *b*-reguliert identifiziert wurden, können generell in zwei Gruppen eingeteilt werden. Klasse 1 Gene werden durch direkte Bindung des *b*-Heterodimers an *bbs* in den Promotorregionen der Gene induziert (Romeis *et al.*, 2000; Brachmann *et al.*, 2001). Klasse 2 Gene werden indirekt durch das Klasse 1 Gen *rbf1* reguliert und machen den Hauptteil der *b*-regulierten Gene aus, unter denen sich wiederum weitere Transkriptionsfaktoren befinden (Abbildung 1.6) (Heimel *et al.*, 2010b;

<sup>2</sup> Die Diskrepanz in der Anzahl der Gene ist vermutlich auf unterschiedliche Methodik, zeitliche Auflösung und Induktionsbedingungen zurückzuführen.

Ulrich, 2020). Diese Art der Signaltransduktion weist daraufhin, dass das b-Heterodimer eine transkriptionelle Regulationskaskade induziert.



**Abbildung 1.6: Darstellung der b-Regulationskaskade.** Klasse 1 Gene werden direkt *b*-reguliert und enthalten *bbs* in ihren Promotorregionen, welche vom b-Heterodimer gebunden werden können. Die meisten der *b*-regulierten Gene gehören zur Klasse 2 und werden nicht direkt durch *b*, sondern vom Klasse 1 Gen *rbf1* gesteuert (Abbildung modifiziert nach Kahmann und Kämper, 2004).

### Rbf1 als zentraler Regulator der Signalkaskade

Durch nachfolgende Untersuchungen der b-vermittelten Genregulation wurden weitere, für die Pathogenität maßgebliche, Faktoren identifiziert, allen voran die Klasse 1 Gene *clp1* (Scherer *et al.*, 2006) und *rbf1* (Heimel *et al.*, 2010b). *rbf1* (*regulator of b-filament 1*) kodiert für einen C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>-Zinkfingertranskriptionsfaktor und kontrolliert die Expression von ca. 90 % der *b*-abhängigen Gene (Heimel *et al.*, 2010b). In seinem N-Terminus besitzt das 404 Aminosäuren lange Proteine eine DNA-bindende Zinkfingerdomäne, die auch eine putative Kernlokalisationssequenz enthält, deren Funktion durch mikroskopische Analysen bestätigt werden konnte. Der C-terminale Bereich weist hingegen, bis auf glutaminreiche Sequenzen, keine Besonderheiten auf (Heimel *et al.*, 2010b). Die Promotorregion von *rbf1* enthält, wie qChIP-Analysen (quantitative Chromatin-Immunopräzipitation) zeigen konnten, drei *bbs* Motive, mit denen bE interagiert (Heimel *et al.*, 2010b). Jedoch sind nur zwei für die Expression von *rbf1* essenziell (Heimel *et al.*, 2010b; Ulrich, 2020). Bereits eine Stunde nach Induktion des b-Heterodimers, kann das Transkript von *rbf1* nachgewiesen werden. All dies spricht für eine direkt *b*-abhängige Regulation.

Eine Überexpression von *rbf1* löst, unabhängig vom b-Heterodimer, filamentöses Wachstum und einen G2-Zellzyklusarrest aus (Heimel *et al.*, 2010b), genügt aber nicht für die Kolonisation der Pflanze (Heimel *et al.*, 2010a; Wahl *et al.*, 2010a). Eine Deletion hingegen führt nicht nur zum Ausbleiben der Filament- und Appressorienbildung, sondern zum vollständigen Verlust der Pathogenität (Heimel *et al.*, 2010b). Damit ist *rbf1* notwendig und ausreichend für das *b*-vermittelte filamentöse Wachstum und den G2-Zellzyklusarrest (Heimel *et al.*, 2010b). Hinsichtlich dessen stellt es den zentralen Regulator der Signalkaskade und einen der wichtigsten Faktoren der pathogenen Entwicklung von *U. maydis* dar.

Aus Vorexperimenten (Heimel *et al.*, 2010b; Ulrich, 2015; Fortenbacher, 2016) war bereits bekannt, dass Rbf1 am Promotor von *dik6*, einem *b*-regulierten Gen unbekannter Funktion, das für ein Sieben-Transmembranprotein kodiert (Bohlmann, 1996; Weinzierl, 2001), bindet und dessen Expression induziert. Mit genomweiten Daten aus ChIP-Seq Experimenten (Chromatin-Immunopräzipitation mit anschließender DNA-Sequenzierung) wurde schließlich bioinformatisch ein Konsensusmotiv für Rbf1 ermittelt, welches unter anderem zweimal im Promotor von *dik6* vorkommt (Ulrich, 2015, 2020). Reporterassays verifizierten die Bindung von Rbf1 an den vorhergesagten Konsensusmotiven. Dabei konnte nachgewiesen werden, dass die Mutation bzw. Deletion einer der *Rbs* (*Rbf1 binding site*) die *dik6* Expression lediglich verringert. Erst die Veränderung beider Bindestellen, reduziert das Transkriptlevel an die Detektionsgrenze (Ulrich, 2020). Zudem half die Verknüpfung der ChIP-Seq Daten mit denen der RNA-Seq, die *b*-vermittelte transkriptionelle Signaltransduktion weiteraufzuschlüsseln, indem Expression und Bindung der beteiligten Transkriptionsfaktoren mit Induktion von Zielgenen besser korreliert werden konnte. Von den 184 *b*-regulierten Genen benötigen 162 die Anwesenheit von *rbf1*. Von diesen 162 Genen sind nur 40 direkte Zielgene von Rbf1 und gerade einmal 28 von den direkten Zielgenen weisen eine *Rbs* in ihren Promotoren auf (Ulrich, 2020). Die Signalkaskade implementiert demnach weitere Transkriptionsfaktoren, die die Zellzykluskontrolle, polares Wachstum, Appressorienbildung und somit die pathogene Entwicklung aufrechterhalten bzw. fortführen.

### **Biz1 steuert Zellzykluskontrolle und Appressorienbildung**

Ein Teil dieser Transkriptionsfaktoren wird *rbf1*-abhängig induziert. Nennenswert sind hier der C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>-Zinkfingertranskriptionsfaktor Biz1 und die beiden Homeodomänentranskriptionsfaktoren Hdp1 und Hdp2. Biz1 (*b-induziertes Zinkfingerprotein 1*) ist bei der korrekten Abfolge der Infektion involviert, indem es den Zellzyklus, die Entwicklung von Penetrationsstrukturen und Induktion weiterer pathogenitätsrelevanter Gene kontrolliert. Die Deletion führt zu einem deutlichen Rückgang gebildeter Appressorien, fehlendem invasiven Wachstum und Verlust der Pathogenität (Flor-Parra *et al.*, 2006). Gleichzeitig inhibiert Biz1 die Bildung von Appressorien während eines aktiven Zellzyklus



(de la Torre *et al.*, 2020). Für eine erfolgreiche Appressorienformation und Penetration der Pflanze muss der Zellzyklus arretiert werden (Castanheira *et al.*, 2014; Castanheira und Perez-Martin, 2015). Dies geschieht zum einen vor und nach der Fusion des Heterokaryons durch die Paarungstyploci (Brachmann, 2001; Garcia-Muse *et al.*, 2003; Heimel *et al.*, 2010b) und wird schließlich durch Biz1 aufrechterhalten, indem es das mitotische Cyclin Clb1, welches für die G2/M-Phasen Transition benötigt wird (Garcia-Muse *et al.*, 2004), reprimiert (Flor-Parra *et al.*, 2006; de la Torre *et al.*, 2020). Des Weiteren zeigten DNA-Microarray-Analysen, dass Biz1 eine Reihe sekretierter Proteine induziert (Vranes, 2006). Obwohl *biz1* *rbf1*-abhängig reguliert wird (Heimel *et al.*, 2010b), finden sich nach ChIP-Seq Daten keine signifikanten Rbf1 Bindungen im Promotor. Eine direkte Regulation durch *rbf1* erscheint daher eher unwahrscheinlich und erfordert einen (zusätzlichen) noch unbekanntem Faktor (Ulrich, 2020).

### **Hdp1 moduliert das transkriptionelle Netzwerk**

Hdp1 (*homeodomain protein 1*) beeinflusst ähnlich wie Biz1 den Zellzyklus, hat aber insgesamt eine eher geringfügige Bedeutung auf den virulenten Prozess. Deletionsmutanten weisen verkürzte Filamente und eine gestörte Zellkernverteilung auf, was sich aber nicht auf die Fähigkeit auswirkt den Wirt zu befallen (Pothiratana, 2008). Induziert wird *hdp1* über den *a*- und *b*-Signalweg (Pothiratana, 2008; Heimel *et al.*, 2010b; Ulrich, 2020). Dies führt neben filamentösem Wachstum, auch zur Arretierung des Zellzyklus durch Repression von Clb1 (Pothiratana, 2008). Zudem wirkt sich Hdp1 positiv auf die Expression des Cyclins Pcl12 aus (Pothiratana, 2008; Ulrich, 2020), das mit Cdk5 interagiert (Flor-Parra *et al.*, 2007), einer essenziellen cyclinabhängigen Kinase mit regulatorischer Funktion in der Morphogenese von *U. maydis* (Castillo-Lluva *et al.*, 2007). Zwar scheint Hdp1 wenig Einfluss auf die *b*-vermittelte Genregulation zu nehmen, die gemeinsame Bindung mit Rbf1 und bW/bE an Promotoren deutet dennoch auf eine Kombinatorik im transkriptionellen Netzwerk hin (Ulrich, 2020). Darüber hinaus schlägt Hdp1 eine Brücke zurück zur Pheromonkaskade, da es auf (wahrscheinlich) indirektem Weg *prf1* induziert (Pothiratana, 2008; Ulrich, 2020). Die vorhergesagte Hdp1 Bindestelle im *b*-Promotor (Ulrich, 2020) ist ebenfalls nicht außer Acht zu lassen und ist Gegenstand derzeitiger Untersuchungen.

### **Hdp2 reguliert nachfolgende biotrophe Prozesse**

Im Gegensatz zu *hdp1*, ist *hdp2* essenziell für die Pathogenität, was sich unter anderem im Verlust der Appressorienbildung in Deletionsstämmen zeigt (Heimel *et al.*, 2010b; Lanver *et al.*, 2014). Außerdem wird die Expression einer Vielzahl sekretierter Proteine aufgrund der Deletion dereguliert. Darunter befinden sich Pit1 und Pit2, entscheidende Proteine für die Tumorbildung (Doehlemann *et al.*, 2011; Hampel *et al.*, 2016; Misas Villamil *et al.*, 2019), sowie Cmu1, einer Chorismatmutase die die pflanzliche Salizylsäuresynthese hemmt (Djamei *et al.*, 2011; Han *et al.*, 2019). Insbesondere sekretierte Proteine,

wie die Genannten und zellwanddegradierende Enzyme, unterliegen partiell einer gemeinsamen Steuerung von Hdp2 und Biz1 (M. Vraneš, unveröffentlicht), was auf eine Verbindung der beiden vermuten lässt. CHIP-Seq Daten unter axenischen Bedingungen deuten dabei auf eine direkte Regulation hin (Ulrich, 2020). Die Expression von *hdp2* wird nicht nur von Rbf1 reguliert (Heimel *et al.*, 2010b; Ulrich, 2020), sondern zusätzlich *b*-unabhängig durch die Proteine Sho1 und Msb2 (Lanver *et al.*, 2014). Beide spielen eine Rolle bei der Verknüpfung zwischen der Wahrnehmung von externen Signalen auf der Pflanzenoberfläche und der Appressorienbildung (Lanver *et al.*, 2010; Lanver *et al.*, 2014). Daneben existieren verschiedene *hdp2* Transkripte, die spatiotemporal exprimiert und gespleißt werden (Jurca, 2017). Die komplexe Regulation und die Funktion von *hdp2* beim Aufrechterhalten der biotrophen Phase sind zentrale Themen dieser Arbeit.

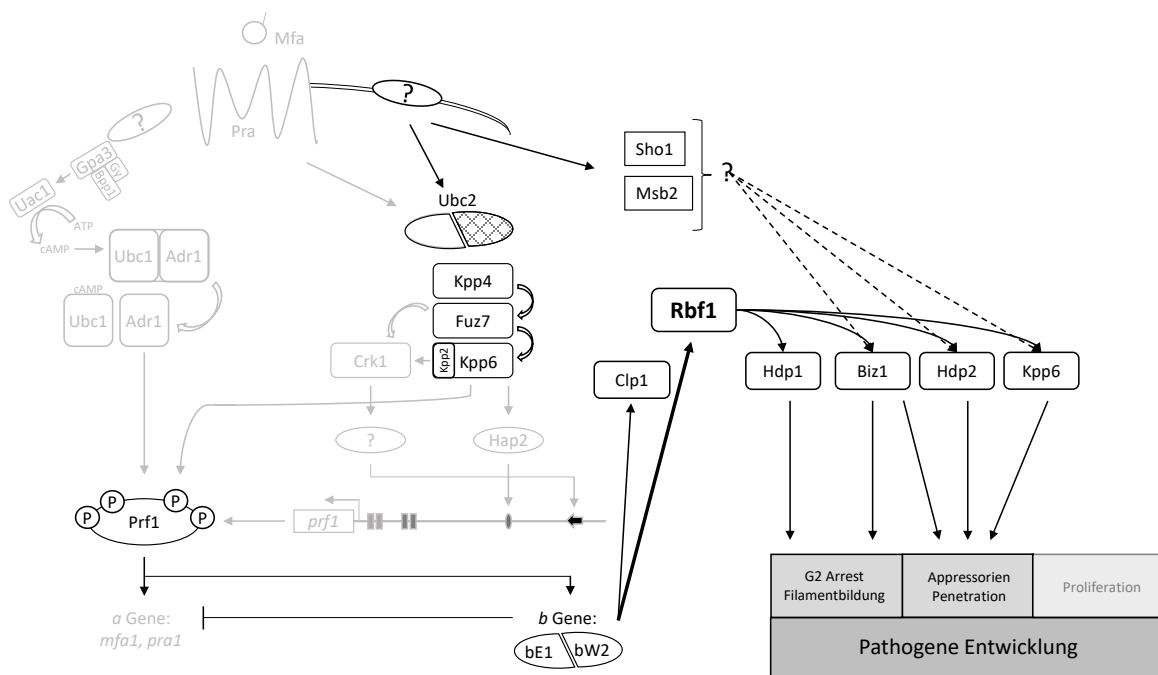
### **Clp1 (re)initiiert den Zellzyklus**

Ebenso wie *rbf1*, ist *clp1* (*clampless 1*) eines der wenigen direkt *b*-induzierten Gene (Scherer *et al.*, 2006; Heimel *et al.*, 2010b). Die vorhergesagten *bbs* im *clp1* Promotor konnten ebenfalls mittels CHIP bestätigt werden (Schuler, 2010; Fortenbacher, 2019). Clp1 besitzt Sequenzähnlichkeiten mit Clp1 aus *Coprinopsis cinerea* und ist wie dieses an der Ausbildung von Schnallenzellen beteiligt, die wie für Basidiomyceten typisch für die Zellkernverteilung zuständig sind (Inada *et al.*, 2001; Kamada, 2002). Wird *clp1* deletiert, bleibt die Schnallenbildung aus und die weitere Proliferation innerhalb der Pflanze wird verhindert (Scherer *et al.*, 2006). Expression von *clp1* kann schon früh nach Induktion durch bW/bE beobachtet werden, ein stabiles Protein ist allerdings erst nach der Penetration nachweisbar (Scherer *et al.*, 2006; Heimel *et al.*, 2010a). Sobald es stabilisiert vorliegt, wird der Zellzyklus reinitiiert und das Pilzmyzel fängt an sich innerhalb der Pflanze zu verzweigen. Zeitgleich kommt es durch Interaktion mit dem b-Heterodimer zur Repression von *rbf1* und infolgedessen auch zu der zahlreicher Zielgene der *b*-Kaskade (Scherer *et al.*, 2006; Heimel *et al.*, 2010a; Fortenbacher, 2019). Ferner hat Clp1 Einfluss auf die *unfolded protein response* (UPR) (Heimel *et al.*, 2013), einer konservierten Antwort auf zellulären Stress, die eingesetzt wird, um eine korrekte Homöostase im endoplasmatischen Retikulum wiederherzustellen (zusammengefasst in Walter und Ron, 2011). Die Interaktion mit dem Hauptregulator der UPR, dem bZIP-Transkriptionsfaktor Cib1, vermittelt somit die Kommunikation zwischen Stressbewältigung und Virulenz (Heimel *et al.*, 2010a; Heimel *et al.*, 2013; Hampel *et al.*, 2016).

### **Prf1 als Mediator der *a*- und *b*-Kaskade**

Allen voran gilt indes *prf1*, aufgrund der zahlreichen regulatorischen Ziele als Schlüsselkomponente beim *crossstalk* der *a*- und *b*-Signalkaskade (Feldbrügge *et al.*, 2004). So reprimiert ein aktives b-Heterodimer die *a*-Gene *mfa* und *pra* (Urban *et al.*, 1996a). Genauso verknüpft Hdp1 die beiden Kaskaden, vor allem weil es nicht nur *a*- und *b*-abhängig reguliert ist, sondern gleichzeitig *prf1* und

vermutlich auch *b* selbst induziert (Pothiratana, 2008; Heimel *et al.*, 2010b; Ulrich, 2020). Hinzu kommen die Proteine Kpp6 und Ubc2, die sich gleichermaßen in den Signalweg einfügen. Die MAPK Kpp6 hat Gemeinsamkeiten mit der MAPK Kpp2, die in der Signaltransduktion der Pheromonantwort involviert ist (Müller *et al.*, 2003), wird aber für eine effektivere Penetration der Pflanzenoberfläche benötigt (Brachmann *et al.*, 2003). Die Regulation ist von besonderem Interesse, da unterschiedlich lange Transkripte entstehen, die entweder über *prf1* oder *b*-abhängig über *rbf1* induziert werden (Brachmann *et al.*, 2001; Brachmann *et al.*, 2003; Heimel *et al.*, 2010b; Ulrich, 2020). Vom putativen Adaptorprotein Ubc2 wird vermutet, mehrere Funktionen zu besitzen. Während die N-terminale Domäne notwendig für die Kreuzung ist, hat der basidiomycetenspezifische C-Terminus diesbezüglich keine Relevanz, ist jedoch für die pathogene Entwicklung essenziell. Die Hypothese zur Funktion der beiden Domänen ist, je nach Entwicklungsstadium, die Zusammenkunft verschiedener MAPK-Komplexe herbeizuführen, um so die Richtung der Signaltransduktion zu lenken (zusammengefasst in (Brefort *et al.*, 2009). Ubc2 stellt dabei ein weiteres Beispiel dar, wie eng die Signalwege der beiden Paarungstyploci ineinandergreifen.



**Abbildung 1.7: Schematische Darstellung der *b*-abhängigen Genregulation.** Das *bW/bE*-Heterodimer wird nach der Fusion zweier kompatibler Sporidien gebildet. Ein aktives *b*-Heterodimer führt zur Repression der vorangegangenen *a*-Gene und zur Induktion der beiden direkten Zielgene *clp1* und *rbf1*. *Rbf1* wiederum induziert die Gene *biz1*, *hdp1*, *hdp2* und *kpp6*, die an filamentösem Wachstum, Zellzykluskontrolle, Appressorienbildung und Penetration der Pflanze beteiligt sind. *Sho1* und *Msb2* dienen als Relay äußerer Pflanzensignale und scheinen ebenfalls einen Einfluss auf die Expression von *biz1*, *hdp2* und *kpp6* zu haben. Ein stabiles *Clp1* Protein ist erst nach der Penetration der Pflanze vorhanden und ist an der Reinitiation des Zellzyklus beteiligt (modifiziert nach Ulrich, 2020).

## 1.5 Zielsetzung

Rbf1 ist nicht nur Teil eines streng regulierten und komplexen Netzwerks aus Transkriptionsfaktoren, die der Steuerung der pathogenen Entwicklung von *U. maydis* dienen, sondern gilt außerdem als zentraler Regulator der *b*-abhängigen Signalkaskade. Nachgeschaltete Gene wie *biz1*, *hdp1* und *hdp2* haben umfangreiche regulatorische Funktionen während den unterschiedlichen Stadien der Infektion und werden dabei auf der Pflanzenoberfläche, sowie bei der Proliferation innerhalb der Pflanze, bis hin zur Sporulation induziert. Bei einem solch elementaren Faktor wäre daher zu erwarten, dass *rbf1* in der gesamten oder zumindest einem Großteil der biotrophen Phase relevant und aktiv bleibt, nicht zuletzt auch, um die zuvor genannten Gene weiterhin zu induzieren. Expressionsanalysen zeigen jedoch, dass bereits zwei Tage nach der Infektion kaum noch *rbf1* Transkript detektierbar ist. Hinzu kommt, dass zuvor *rbf1*-regulierte Gene *in planta* weiterhin exprimiert werden (müssen). Eine der wesentlichen Fragestellungen dieser Arbeit war, die Identifikation des Zeitpunkts und die Notwendigkeit der *rbf1* Repression nach der Pflanzenpenetration, um die nachfolgende pathogene Entwicklung zu garantieren. Zudem sollte untersucht werden, wie die konsekutive Regulation pathogenitätsrelevanter Gene bei Abwesenheit von *rbf1* vollzogen werden kann. Darüber hinaus sollte der Homeodomänentranskriptionsfaktors Hdp2 umfassend charakterisiert werden. Neben der Identifizierung potenzieller Zielgene im Laufe der pflanzenassoziierten Lebensphase mittels CHIP-Seq, stand vor allem die ungewöhnliche Regulation der beiden spatiotemporalabhängig exprimierten Transkripte von *hdp2* im Fokus, die mit Hilfe von Expressionsanalysen aufgeklärt werden sollte. Dabei sollte durch biochemische Methoden und Infektionsstudien festgestellt werden, ob die Transkripte in unterschiedlichen Isoformen mit individuellen Funktionen resultieren und welche Rolle sie bei der Pathogenität spielen.

## 2. Ergebnisse

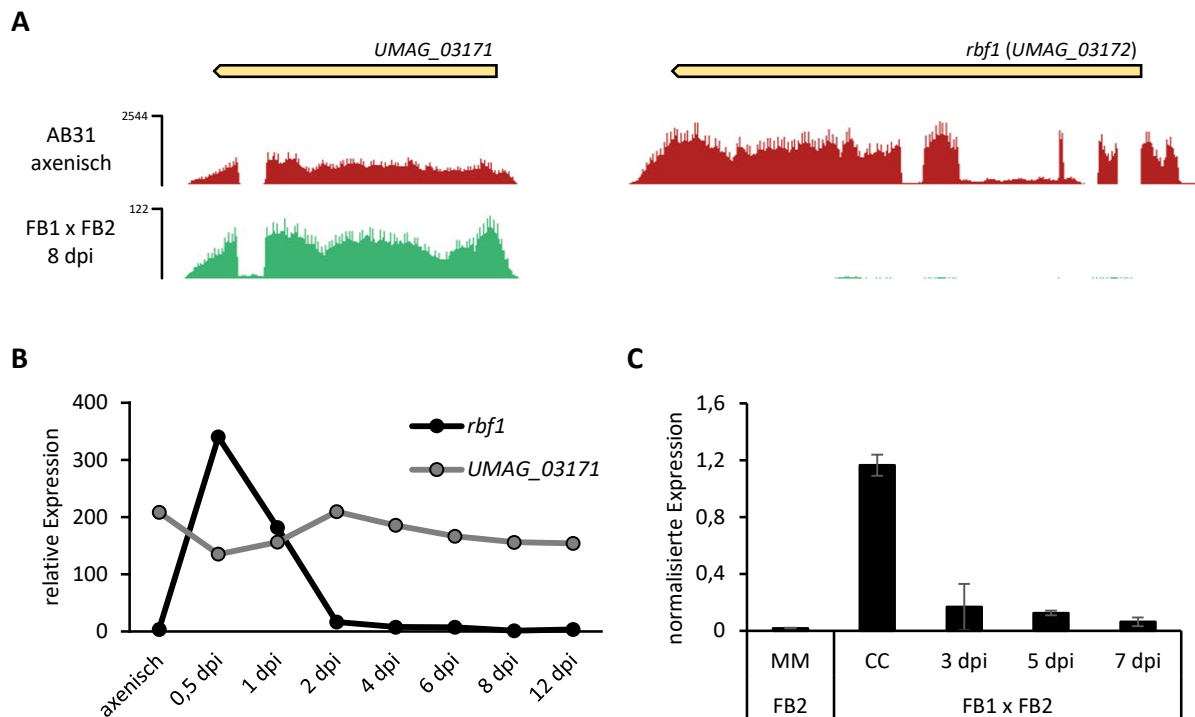
Der charakteristische Morphologiewechsel von *U. maydis* prägt dessen Lebenszyklus und ist zwingend erforderlich für die Infektion seines Wirtes *Zea mays*. Die Transition von saprophytischer zu biotropher Phase wird dabei durch eine, vom bW/bE-Heterodimer induzierte, komplexe Regulationskaskade aus vernetzten Transkriptionsfaktoren gesteuert. Rbf1 konnte hierbei als zentraler Regulator identifiziert werden, der die Expression von 90 % der *b*-vermittelten Gene steuert. Eine Deletion von *rbf1* führt nicht nur zum Ausbleiben des Zellzyklusarrests und dem filamentösen Wachstum, sondern zum Verlust der Pathogenität (Heimel *et al.*, 2010b). Die *b*-unabhängige *rbf1* Expression ist für diese Prozesse und die initiale Penetration der Pflanze, jedoch nicht für den nachfolgenden Infektionsverlauf ausreichend (Heimel *et al.*, 2010a; Wahl *et al.*, 2010a). Dies macht Rbf1 zu einem Schlüsselfaktor in der pathogenen Entwicklung und stellt die Frage, wie dessen Rolle sich über die biotrophe Lebensphase hinweg verändert.

### 2.1 Einfluss von *rbf1* auf die Etablierung der biotrophen Phase

#### 2.1.1 Der zeitliche Rahmen der Rbf1 Aktivität ist stark limitiert

Die Regulation von *rbf1* ist unter axenischen Konditionen hinreichend untersucht. So ist bekannt, dass bW/bE an drei *bbs* in der Promotorregion von *rbf1* bindet, von denen jedoch nur zwei essenziell für die Expression sind (Heimel *et al.*, 2010b; Ulrich, 2015). Eine Stunde nach Induktion des b-Heterodimers ist *rbf1* nachweisbar und erreicht sein Expressionsmaximum nach etwa fünf Stunden (Heimel *et al.*, 2010b). Die vorangegangene Pheromonstimulation wirkt sich gleichermaßen positiv auf die Expression von *rbf1* aus (Zarnack *et al.*, 2008). Microarrays zeigen, dass auch noch 16 h nach der Infektion *rbf1* Transkript gemessen werden kann (M. Vraneš, unveröffentlicht). Zu diesem Zeitpunkt befindet sich die Mehrheit der Hyphen auf der Blattoberfläche und es werden bereits Appressorien gebildet (Snetselaar und Mims, 1994). RNA-Seq Analysen ermöglichten, die genomweite Expression von *U. maydis* während der Infektion in einer höheren zeitlichen Auflösung zu verfolgen (Lanver *et al.*, 2018). Diese Daten decken sich mit Microarrays und anderen Expressionsanalysen, die zeigen, dass in späteren Stadien der Infektion kein *rbf1* Transkript mehr nachgewiesen werden kann (siehe Abbildung 2.1 A & B) (M. Vraneš, unveröffentlicht; Heimel *et al.*, 2010a; Tollot *et al.*, 2016). Der RNA-Seq Datensatz gibt die Expression von *U. maydis in planta* über eine Zeitspanne von zwölf Tagen wieder. Der axenische Wert zeigt nicht gekreuzte Stämme (FB1 bzw. FB2) und demnach keine *rbf1* Expression, da keine kompatiblen *b*-Gene vorliegen (siehe Abbildung 2.1 B). Alle verbleibenden Datenpunkte zeigen Werte nach Probennahme von Pflanzen, die mit einer Mischung aus den kompatiblen Stämmen FB1 (*a1 b1*) und FB2 (*a2 b2*) infiziert worden sind. Nach zwölf Stunden kann, wie schon in

Microarrays von solopathogenen Stämmen beobachtet wurde, das Transkript von *rbf1* detektiert werden (M. Vraneš, unveröffentlicht). Ein Tag nach der Infektion hat sich die Expression von *rbf1* halbiert und nach zwei Tagen ist sie auf 5 % des Anfangswertes bei 0,5 dpi (*days post infection*) gefallen. Anschließende Zeitpunkte zeigen mit der axenischen Probe vergleichbare geringe Expressionslevel. Im Vergleich zu *rbf1*, ist das Nachbargen *UMAG\_03171*, das für eine vermutete Untereinheit des eukaryotischen Translationsinitiationsfaktors eIF2B kodiert, durchgängig exprimiert.



**Abbildung 2.1: *rbf1* wird in planta nur zu frühen Zeitpunkten exprimiert.** **A)** AB31 (axenisch, rot) vs. FB1 x FB2 (grün) 8 dpi. Bei einem aktiven b-Heterodimer, das bei AB31 (*a2 P<sub>crG1</sub>:bW2, bE1*) unter dem Promotor des arabinoseinduzierbaren Gens *crG1* steht, ist eine starke Expression von *rbf1* zu sehen. 8 Tage nach Infektion mit den kompatiblen Stämmen FB1 x FB2 (*a1 b1 x a2 b2*) ist keine Expression nachweisbar (Datensätze aus Kellner *et al.*, 2014 und Tollot *et al.*, 2016). **B)** Zeitlicher Verlauf der *rbf1* und *UMAG\_03171* Expression in planta. Während das Gen *UMAG\_03171* die gesamte Zeit exprimiert wird, ist *rbf1* nur zwischen 0,5 und 2 dpi aktiv. Der axenische Wert bezieht sich auf FB1 bzw. FB2 in flüssig Medium (Datensatz aus Lanver *et al.*, 2018). **C)** Vergleich der *rbf1* Expression in axenischer Kultur, auf aktivkohlehaltigem Medium und in planta. Zu sehen ist die normalisierte Expression ( $\Delta Ct$ ) von *rbf1* in axenischer Kultur von FB2 (*a2 b2*) in flüssigem Minimalmedium (MM), FB1 x FB2 Kreuzung auf aktivkohlehaltigem Festmedium (CC), FB1 x FB2 Kreuzung 3, 5 und 7 Tage nach der Infektion (dpi). Im Vergleich zur Kontrolle ist die Expression auf Aktivkohlemedium am stärksten, während sie mit fortschreitender Infektion kontinuierlich abnimmt. Zur Normalisierung diente das Gen *eIF2B*. Das Experiment wurde in biologischen Triplikaten mit jeweils technischen Duplikaten durchgeführt. Dargestellt sind die Mittelwerte der biologischen Replikate. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung der Mittelwerte der biologischen Triplikate.

Die Daten wurden anschließend mit Hilfe von qRT-PCR Analysen (Kapitel 4.5.2) weiterführend analysiert. Dazu wurden Pflanzen mit FB1 x FB2 infiziert (Kapitel 4.2.2.5) und Proben nach 3, 5 und 7 Tagen entnommen (Kapitel 4.3.1.3). Um die *rbf1* Expression außerhalb der Pflanze durch ein aktives b-Heterodimer zu induzieren, wurde statt AB31, FB1 x FB2 auf aktivkohlehaltigem Medium verwendet. Stämme mit kompatiblen Paarungstypen sind in der Lage auf dieser Art von Medium zu fusionieren und filamentös zu wachsen, bilden jedoch keine Penetrationsstrukturen. Als Referenz diente FB2, angezogen in einer Schüttelkultur mit Minimalmedium.

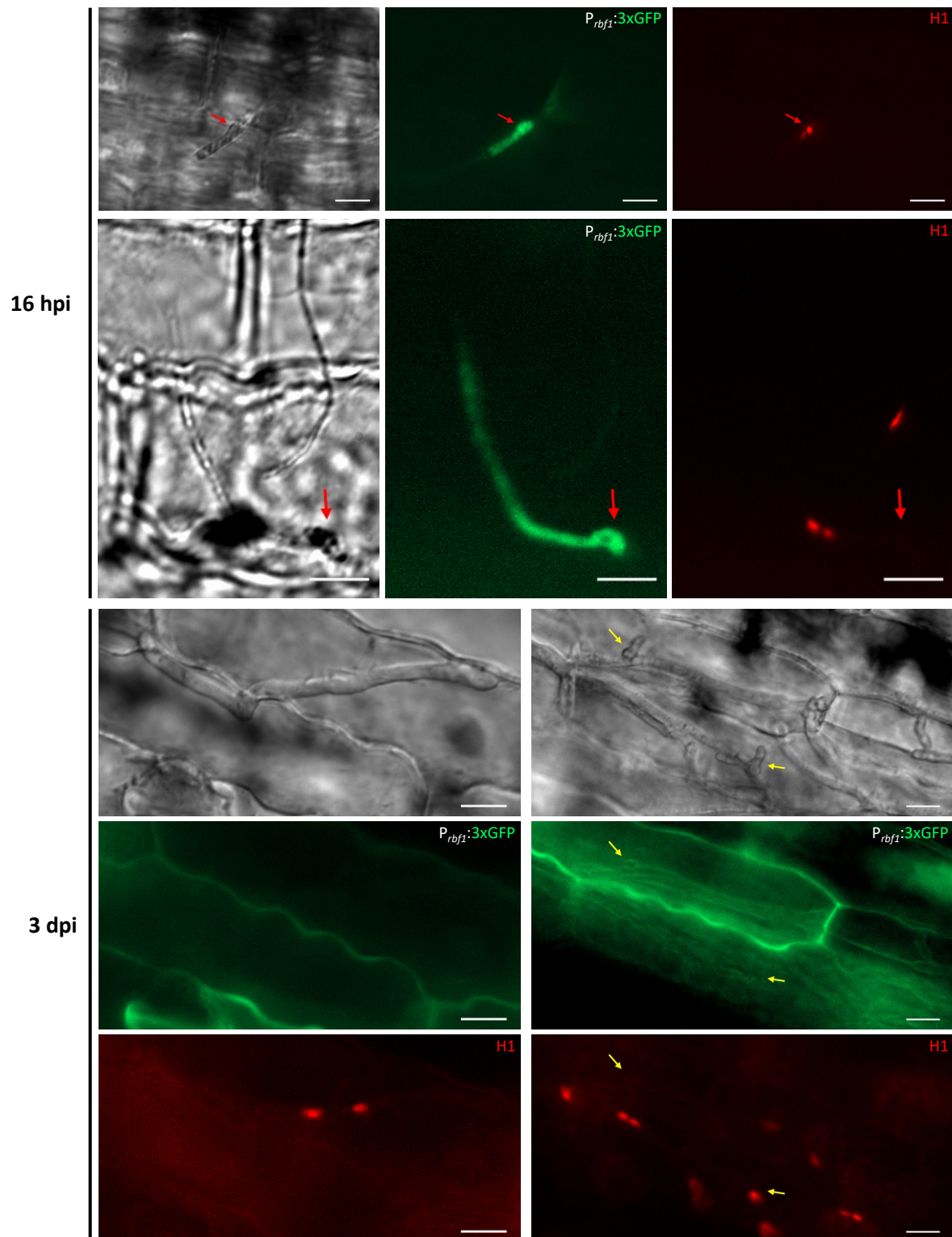
Abbildung 2.1 C zeigt die *rbf1* Expression zu unterschiedlichen Konditionen und bestätigt die Ergebnisse der genomweiten Expressionsanalysen. Entsprechend der Erwartungen, ist bei FB2 kaum *rbf1* Transkript in axenischer Kultur vorhanden, da ohne Kreuzungspartner ein aktives b-Heterodimer fehlt und damit die Induktion von *rbf1* ausbleibt. Im Gegensatz dazu ist *rbf1* bei der Kreuzung von FB1 und FB2 auf Aktivkohle stark induziert. Unter diesen Bedingungen können die kompatiblen Sporidien zu einem dikaryotischen Filament fusionieren und ein aktives b-Heterodimer ausbilden, das *rbf1* induziert. Die betrachteten Zeitpunkte der Infektion weisen hingegen ein insgesamt niedrigeres Transkriptlevel auf und zeigen keinen signifikanten Unterschied untereinander. Um auszuschließen, dass die höheren Transkriptmengen im Vergleich zu FB2 in axenischer Kultur darauf zurückzuführen sind, dass sich die einzelnen Hyphen auf und in der Pflanze in verschiedenen Stadien befinden und man daher die Expression dieser „Mischung“ als Gesamtheit misst, wurden mikroskopische Analysen mit Reporterstämmen durchgeführt.

Als Ausgang diente der Stamm UMJ9 (*a1 b1 Δrbf1::3xGFP ip<sup>r</sup>[P<sub>rbf1</sub>:rbf1]ip<sup>s</sup>*), bei dem das native *rbf1* durch 3xGFP ausgetauscht und im *ip*-Locus komplementiert wurde. Dadurch wird bei der Induktion von *rbf1*, GFP exprimiert, was in einer fluoreszierenden Hyphe resultiert und somit die *rbf1* Promotoraktivität visualisiert. UMJ9 wurde vor der Infektion der Pflanze mit dem Stamm UBF28 (*a2 b2 H1:3xmCherry*), bei dem das Histon H1 mit 3xmCherry markiert wurde, gekreuzt. Die Visualisierung der DNA innerhalb der Zellkerne durch das fluoreszenzmarkierte Histon verbesserte dabei die Identifikation der Hyphen in der Pflanze. 16 Stunden nach der Infektion hatten sich bereits die ersten filamentösen Dikaryen gebildet, was an zwei rot fluoreszierenden Zellkernen zu erkennen war (Abbildung 2.2). Außerdem konnte die Appressorienbildung der Hyphen beobachtet werden. Diese wurde von einem grünen Fluoreszenzsignal im Zytoplasma begleitet, das zeigt, dass der *rbf1* Promotor zu diesem Zeitpunkt aktiv ist. Kurz nach dem der Pilz die Pflanze penetriert hatte und die Proliferation innerhalb der Pflanze fortsetzte, waren sporadische GFP-Signale zu erkennen. Drei Tage nach der Infektion wurde die Bildung von Schnallenzellen beobachtet (Abbildung 2.2). Die Hyphen wiesen allerdings kein GFP-Signal mehr auf, was darauf hindeutete, dass der *rbf1*-Promotor zu diesem Zeitpunkt bereits abgeschaltet wurde. Vereinzelt konnten Pilzhypen beobachtet werden, die zu diesem Zeitpunkt weiterhin auf der Blattoberfläche lokalisierten und die Pflanze noch nicht penetriert

hatten. Diese Beobachtung war gekoppelt an ein grünes Fluoreszenzsignal, welches in späteren Stadien (> 3 dpi) jedoch nicht mehr festgestellt werden konnte.

Die fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen decken sich weitestgehend mit den Expressionsanalysen und veranschaulichen, dass *rbf1* induziert wird, sobald ein Dikaryon auf der Pflanzenoberfläche gebildet wurde. Die Expression wird hierbei über die Ausbildung von Appressorien bis kurz nach der Penetration aufrechterhalten. Beim anschließenden invasiven Wachstum mit anfänglicher Schnallenbildung und Verzweigung der Hyphen, war kein eindeutiges GFP-Signal mehr erkennbar, was demnach für ein kurzzeitiges Wirken von Rbf1 spricht. Diese streng getaktete zeitliche Regulation von *rbf1* führte zu der Fragestellung, ob die Repression des Masterregulators zu frühen Infektionsstadien für die weitere pathogene Entwicklung nötig ist.





**Abbildung 2.2: Der *rbf1*-Promotor ist nur bei frühen Infektionsstadien aktiv.** Für die Inokulation wurde eine Kreuzung der Stämme UMJ9 (*a1 b1 Δrbf1::3xGFP ip'[P<sub>rbf1</sub>:rbf1]ip<sup>s</sup>*) und UBF28 (*a2 b2 H1::3xmCherry*) verwendet. Anschließend wurden frische Blattschnitte bei 16 hpi und 3 dpi entnommen und mikroskopiert. 16 h nach der Infektion bildeten fusionierte Hyphen Appressorien (rote Pfeile) und ein zytoplasmatisches GFP-Signal war sichtbar, welches zeigt, dass der *rbf1* Promotor aktiv ist. 3 Tage nach der Infektion, konnten Schnallenzellen (gelbe Pfeile), jedoch kein grünes Fluoreszenzsignal mehr beobachtet werden. Zellkerne sind in Rot dargestellt. Der Maßstabsbalken entspricht 10  $\mu$ m.

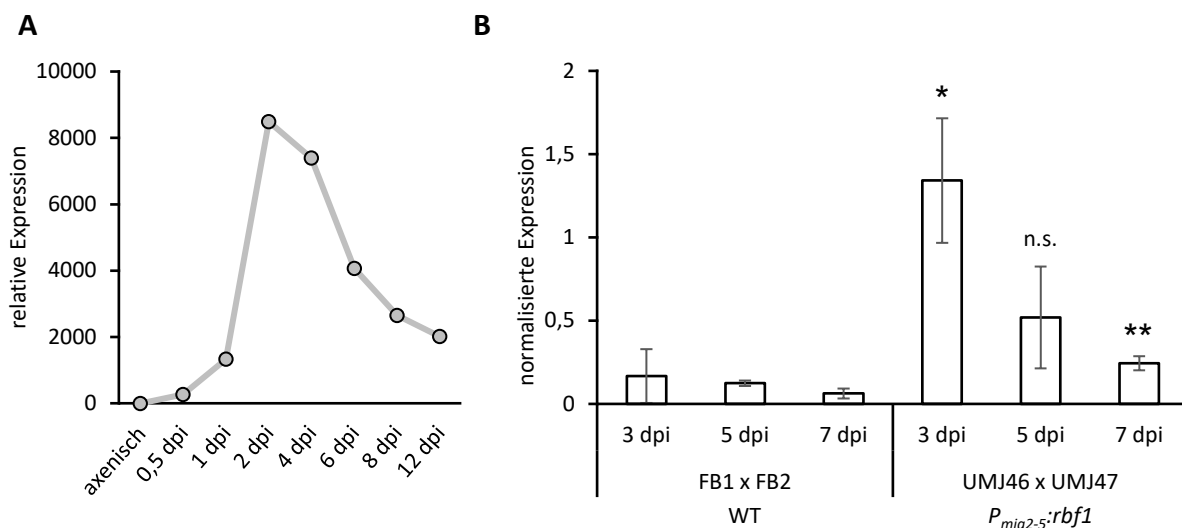
### 2.1.2 Die Expression von *rbf1* während der biotrophen Phase führt zum Verlust der Pathogenität

Infolge der temporären Expression von *rbf1*, wurde untersucht, ob die Repression von *rbf1* nach dem Eindringen von *U. maydis* in die Pflanze zwingend erforderlich ist, um die nachfolgende Entwicklung der biotrophen Phase zu gewährleisten. Daher wurde der Ansatz verfolgt, *rbf1* artifiziell *in planta* zu induzieren. Bisherige Vorhaben *rbf1* unter die Kontrolle konstitutiver Promotoren zu setzen, schlugen vermutlich wegen des *rbf1*-vermittelten Zellzyklusarrests fehl (Heimel *et al.*, 2010a). Weitere Versuche wurden mit dem Promotor des differentiell regulierten Gens *lga2* durchgeführt. Um *rbf1 in planta* *b*-unabhängig exprimieren zu können, wurde ein Konstrukt generiert bei dem *rbf1* unter der Kontrolle des *lga2* Promotors steht. Dieses Konstrukt wurde zusätzlich zum endogenen *rbf1* in den *b*-Locus integrierte, wodurch dieser deletiert wurde. Da *lga2* nicht nur direkt durch das b-Heterodimer induziert werden kann, sondern auch über den Pheromonsignalweg, kann die *rbf1* Expression allein durch Pheromon kontrolliert werden (Romeis *et al.*, 2000; Zarnack *et al.*, 2008; Heimel *et al.*, 2010b). Darüber hinaus kann *lga2* durch Rbf1 induziert werden, wodurch eine positive Rückkopplungsschleife entsteht. Durch Zugabe von Pheromon lässt sich auf diese Weise eine hohe *rbf1* Expression ohne *b* erzielen (Heimel *et al.*, 2010a). Hierbei konnte gezeigt werden, dass *rbf1* für die initiale Phase der pathogenen Entwicklung ausreichend ist. Weiteres invasives Wachstum blieb jedoch aus, da Stämme ohne intakten *b*-Locus den Lebenszyklus nicht vollständig durchlaufen können (Heimel *et al.*, 2010a; Wahl *et al.*, 2010a). Um diese Problematik zu umgehen und die *rbf1* Expression *in planta* aufrechterhalten zu können, wurde in nachfolgenden Experimenten das  $P_{lga2}:rbf1$  Konstrukt in den *ip*-Locus integriert. Die generierten Stämme waren zwar in der Lage den Lebenszyklus zu durchlaufen, jedoch wird bei einem aktiven b-Heterodimer *clp1* exprimiert, welches wiederum die beschriebene Rückkopplungsschleife unterbindet (Jurca, 2017). Der Einsatz dieses autokrinen Systems blieb gleichermaßen erfolglos, weshalb im Zuge dieser Arbeit eine neue Strategie entwickelt wurde, bei der *rbf1* mit Hilfe eines stadienspezifischen Promotors gesteuert werden sollte.

Dabei handelt es sich um die Promotorregion des Gens *mig2-5*, das einem Gencluster von *U. maydis* angehört, das spezifisch *in planta* induziert wird (Basse *et al.*, 2002). Das gesamte Cluster ist in der biotrophen Phase hoch exprimiert, jedoch nicht pathogenitätsrelevant (Basse *et al.*, 2002). Die Expressionsprofile der individuellen Gene unterscheiden sich dennoch, sowohl zeitlich als auch in ihrem Niveau. Während *mig2-1*, *mig2-2* und *mig2-3* erst ab 2 dpi induziert werden, hat *mig2-5* bei 0,5 dpi ein ähnliches Transkriptlevel wie *rbf1*. Allerdings steigt die Expression von *mig2-5* anschließend stark an und bleibt bis 12 dpi induziert (Abbildung 2.3 A). Für die gezielte Induktion von *rbf1 in planta* wurden daher 860 bp der Promotorregion von *mig2-5*, die als funktionell beschrieben ist (Scherer *et al.*, 2006), vor den offenen Leserahmen von *rbf1* kloniert und das entstandene Konstrukt in den *ip*-Locus von *U. maydis* integriert.

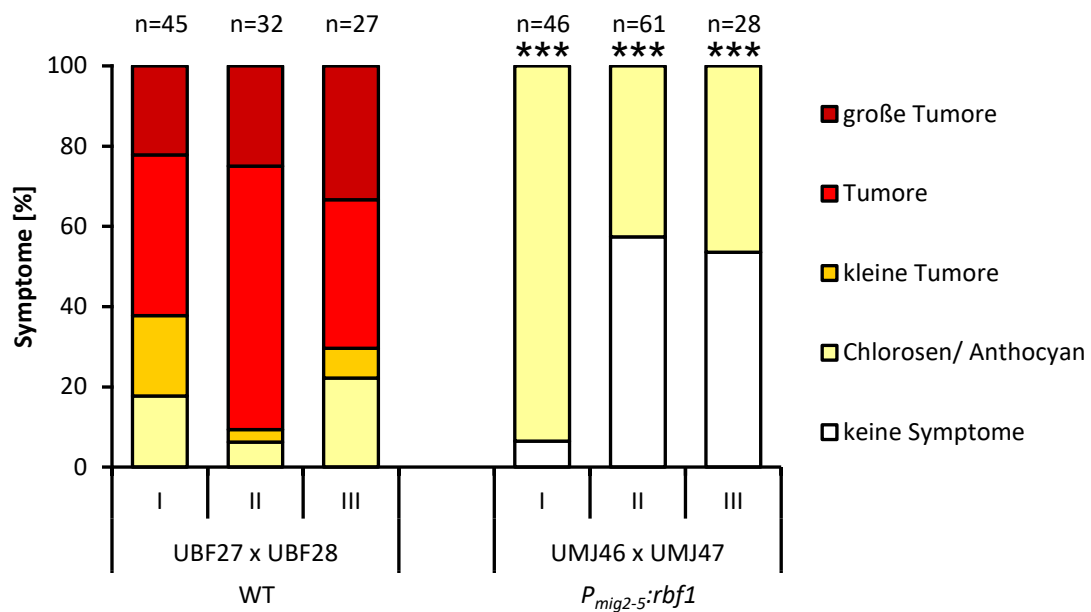
Die entstandenen Stämme UMJ46 (*a1 b1 H1:3xmCherry ip'[P<sub>mig2-5</sub>:rbf1:3xHA]ip<sup>s</sup>*) und UMJ47 (*a2 b2 H1:3xmCherry ip'[P<sub>mig2-5</sub>:rbf1:3xHA]ip<sup>s</sup>*) enthalten zudem noch das endogene *rbf1* im nativen Locus und ein fluoreszenzmarkiertes H1 Histon für mikroskopische Untersuchungen.

Um die Funktionalität zu testen, wurden zunächst Pflanzen mit den generierten Stämmen UMJ46 x UMJ47 infiziert. Als Kontrolle diente eine Kreuzung aus FB1 (*a1 b1*) und FB2 (*a2 b2*). Im Anschluss wurden Proben nach 3, 5 und 7 dpi entnommen und die Expression von *rbf1* mittels qRT-PCR überprüft. Betrachtet man die Ergebnisse der qRT-PCR, zeigte *P<sub>mig2-5</sub>:rbf1* eine deutlich erhöhte *rbf1* Expression (Abbildung 2.3 B). Drei Tage nach der Infektion überstieg die *rbf1* Expression von *P<sub>mig2-5</sub>:rbf1* die des Wildtyps um das Achtfache. Mit voranschreitender Infektion sank die Transkriptmenge, während sie beim Wildtyp konstant niedrig blieb. Zusätzlich zeigten Pflanzen, die mit UMJ46 x UMJ47 infiziert worden sind, stark reduzierte Symptome. Um den Einfluss der kontinuierlichen *rbf1* Expression auf die Kolonisation der Pflanze zu analysieren, wurden daher Infektionsstudien durchgeführt.



**Abbildung 2.3: A) Expressionsprofil von *mig2-5* in planta.** Unter axenischen Bedingungen ist *mig2-5* nicht exprimiert. Zum Zeitpunkt 0,5 dpi wird *mig2-5* bereits induziert und erreicht eine vergleichbare Transkriptmenge wie *rbf1* (nicht gezeigt). Danach steigt die Expression auf das 30-fache an und erreicht ihren Höhepunkt bei 2 dpi, bevor sie langsam wieder sinkt (Datensatz aus Lanver *et al.*, 2018). **B) Artificielle Expression von *rbf1* in planta unter dem Promotor von *mig2-5*.** Zu sehen ist die normalisierte Expression ( $\Delta Ct$ ) von *rbf1* in einer FB1 x FB2 (*a1 b1* x *a2 b2*) Kreuzung 3, 5 und 7 Tage nach der Infektion (WT) und von UMJ46 x UMJ47 (*a1 b1 H1:3xmCherry ip'[P<sub>mig2-5</sub>:rbf1:3xHA]ip<sup>s</sup>* x *a2 b2 H1:3xmCherry ip'[P<sub>mig2-5</sub>:rbf1:3xHA]ip<sup>s</sup>*) 3, 5 und 7 Tage nach der Infektion (*P<sub>mig2-5</sub>:rbf1*). Zur Normalisierung diente das Gen *eIF2B*. Das Experiment wurde in biologischen Triplikaten mit jeweils technischen Duplikaten durchgeführt. Dargestellt sind die Mittelwerte der biologischen Replikate. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung der Mittelwerte der biologischen Triplikate. Die Daten für WT (FB1 x FB2) wurden bereits in Abbildung 2.1 C verwendet und sind in dieser Abbildung zur Übersicht nochmals gezeigt. Statistische Signifikanz wurde mit dem studentsche *t*-Test ermittelt. \* *p*-Wert  $\leq 0,05$ ; \*\* *p*-Wert  $\leq 0,01$ ; n.s.: nicht signifikant

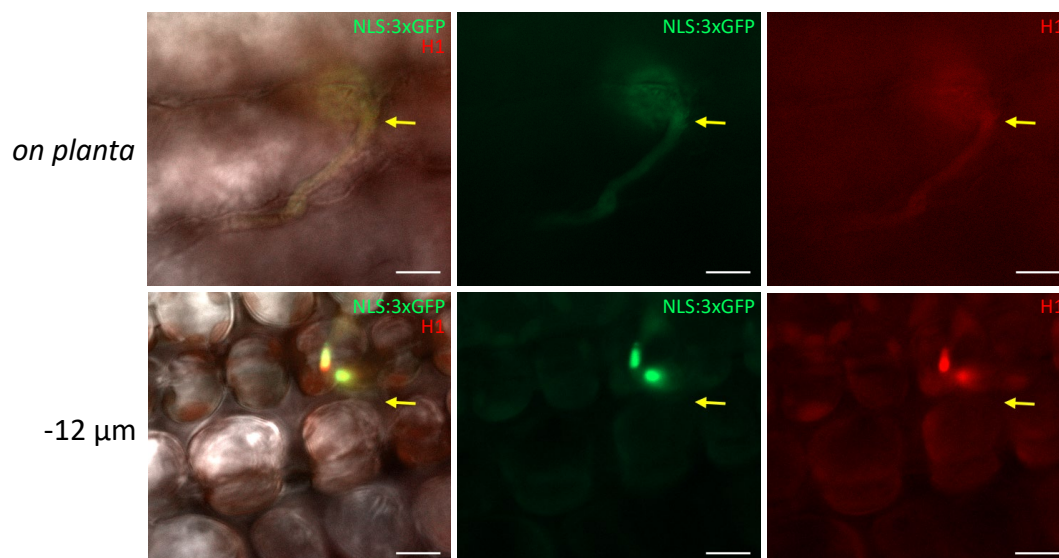
Für die Infektionsstudien wurden die Stämme UMJ46 x UMJ47 verwendet. Als Kontrolle dienten die Ausgangsstämme UBF27 (*a1 b1 H1:3xmCherry*) und UBF28 (*a2 b2 H1:3xmCherry*). Die Ergebnisse in Abbildung 2.4 bestätigen, dass Stämme mit dem *P<sub>mig2-5</sub>:rbf1* Konstrukt eine signifikant verringerte Pathogenität aufweisen. Im Gegensatz zum Wildtyp (UBF27 x UBF28), konnten bei UMJ46 x UMJ47 lediglich Chlorosen- und Anthocyanbildung beobachtet werden. Die Tumorformation blieb vollständig aus und bei zwei der drei Wiederholungen (II: n=61; III: n=28) waren bei über 50 % der infizierten Pflanzen überhaupt keine Symptome zu erkennen.



**Abbildung 2.4: Stämmen mit hinausgezügelter *rbf1* Expression sind in ihrer Pathogenität reduziert.** Pflanzen die mit UMJ46 x UMJ47 (*a1 b1 H1:3xmCherry ip<sup>r</sup>[P<sub>mig2-5</sub>:rbf1:3xHA]ip<sup>s</sup> x a2 b2 H1:3xmCherry ip<sup>r</sup>[P<sub>mig2-5</sub>:rbf1:3xHA]ip<sup>s</sup>*) infiziert wurden, weisen im Vergleich zum Wildtyp (UBF27 x UBF28; *a1 b1 H1:3xmCherry x a2 b2 H1:3xmCherry*) keinerlei Tumorbildung auf, lediglich Chlorosen und Anthocyan. Die Bonitur der infizierten Pflanzen erfolgte sieben Tage nach Inokulation. Das Experiment wurde drei Mal unabhängig durchgeführt und jede Wiederholung ist im Diagramm dargestellt (I, II, III). Die Anzahl der Pflanzen ist mit n über den jeweiligen Replikaten angegeben. Statistische Signifikanz wurde mit dem zweiseitigen Mann-Whitney-U Rangsummentest mit Kontinuitätskorrektur ermittelt und bezieht sich auf den Wildtyp. \*\*\* *p*-Wert  $\leq 0,001$ .

### 2.1.2.1 Die ektopische *P<sub>mig2-5</sub>:rbf1* Expression hat keinen Einfluss auf die frühe Infektionsphase, führt jedoch *in planta* zu einer aberranten Zellkernverteilung

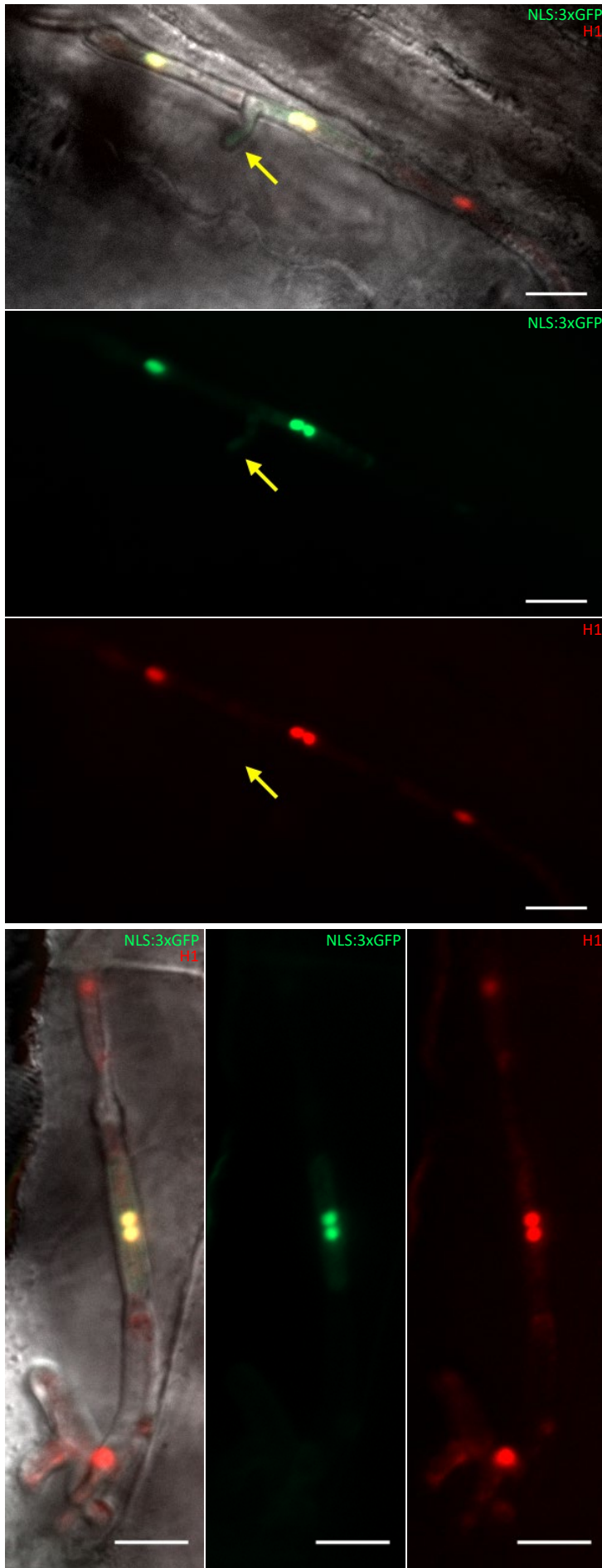
Aufgrund der ausbleibenden Tumorbildung bei Stämmen mit *P<sub>mig2-5</sub>:rbf1* sollte die Ursache dafür nachvollzogen und der Infektionsverlauf detailliert verfolgt werden. Dazu wurden die bereits beschriebenen Stämme mikroskopischen Untersuchungen unterzogen. Es wurden zusätzlich zu UMJ46 x UMJ47 (*a1 b1 H1:3xmCherry ip<sup>r</sup>[P<sub>mig2-5</sub>:rbf1:3xHA]ip<sup>s</sup>* x *a2 b2 H1:3xmCherry ip<sup>r</sup>[P<sub>mig2-5</sub>:rbf1:3xHA]ip<sup>s</sup>*), Pflanzen mit UBF30 x UMJ47 (*a1 b1 H1:3xmCherry ip<sup>r</sup>[P<sub>hxt1</sub>:NLS:GFP]ip<sup>s</sup>* x *a2 b2 H1:3xmCherry ip<sup>r</sup>[P<sub>mig2-5</sub>:rbf1:3xHA]ip<sup>s</sup>*) inokuliert und Blattsschnitte nach verschiedenen Zeitpunkten mikroskopiert.



**Abbildung 2.5: Penetration der Blattoberfläche von UBF30 x UMJ47.** Für die Inokulation wurde eine Kreuzung der Stämme UBF30 (*a1 b1 H1:3xmCherry ip<sup>r</sup>[P<sub>hxt1</sub>:NLS:GFP]ip<sup>s</sup>*) und UMJ47 (*a2 b2 H1:3xmCherry ip<sup>r</sup>[P<sub>mig2-5</sub>:rbf1]ip<sup>s</sup>*) verwendet. Frische Blattsschnitte wurden zwei Tage nach der Infektion mikroskopiert. Die Kreuzung ist in der Lage zu fusionieren und die Pflanzen zu penetrieren. Der gelbe Pfeil markiert die Eintrittsstelle auf der Blattoberfläche. Der Maßstabsbalken entspricht 10 µm.

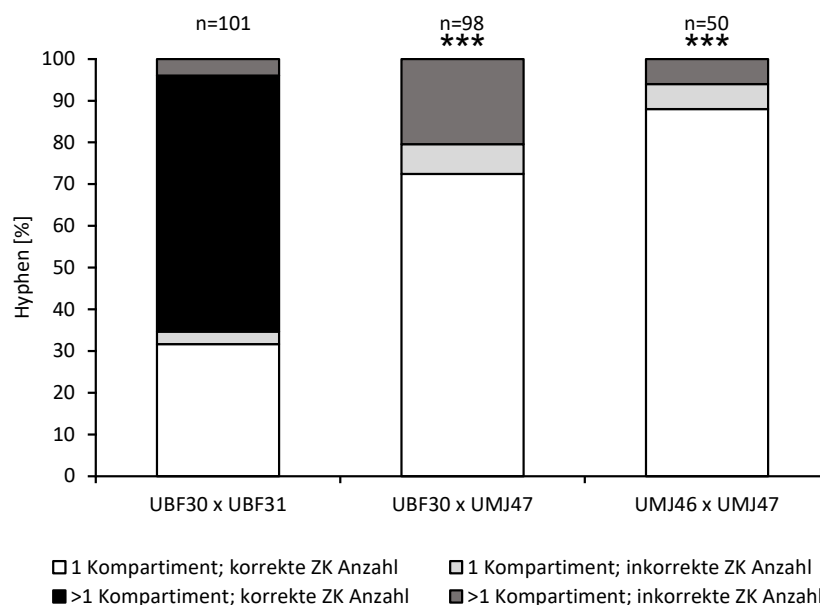
Bei frühen Zeitpunkten der Infektion konnte kein Unterschied, zwischen der in Abbildung 2.5 gezeigten Kreuzung UBF30 x UMJ47 und dem Wildtyp (UBF30 x UBF31; *a1 b1 H1:3xmCherry ip<sup>r</sup>[P<sub>hxt1</sub>:NLS:GFP]ip<sup>s</sup>* x *a2 b2 H1:3xmCherry ip<sup>r</sup>[P<sub>hxt1</sub>:NLS:GFP]ip<sup>s</sup>*) (nicht gezeigt) festgestellt werden. Die Kreuzung UBF30 x UMJ47 (und auch UMJ46 x UMJ47) ist weiterhin in der Lage zu fusionieren, filamentös zu wachsen und die Pflanze zu penetrieren. Nach fünf Tagen waren jedoch erste Unterschiede zu erkennen. Die Kreuzung UBF30 x UMJ47 hatte im Vergleich zum Wildtyp (UBF30 x UBF31) längere und dünnere Hyphen, die oft kollabiert und weniger verzweigt waren. Insgesamt konnte UBF30 x UMJ47 die Pflanze schlechter und weniger kolonisieren als der Wildtyp (Abbildung 6.1, Anhang).

Die Fähigkeit generell Schnallen zu bilden war nicht beeinträchtigt, jedoch konnte nur eine geringe Anzahl Hyphen mit Schnallenzellen beobachtet werden. Zudem wuchsen diese wenigen Schnallen mitunter in apikaler und damit entgegengesetzter Richtung (Abbildung 2.6). Durch das fluoreszenzmarkierte Histon H1 und ein konstitutiv exprimiertes GFP mit Kernlokalisationssequenz konnten die Zellkerne der Hyphen und damit ihre Distribution verfolgt werden. Dabei wurde sichtbar, dass die Hyphen von UBF30 x UMJ47 bzw. UMJ46 x UMJ47 eine aberrante Zellkernverteilung aufwiesen. So konnte beobachtet werden, dass vier Zellkerne auf drei Kompartimente aufgeteilt wurden, wobei häufig das mittlere Kompartiment zwei Zellkerne erhielt (Abbildung 2.6), wohingegen die Hyphen des Wildtyps zwei Zellkerne pro Kompartiment hatten. Die Kreuzung von UBF30 x UMJ47 erlaubt es darüber hinaus die Abstammung der Zellkerne in den einzelnen Kompartimenten eindeutig zuzuordnen. Zellkerne, welche von UBF30 abstammen, besitzen zusätzlich zu der H1:3xmCherry-Markierung ein GFP mit Kernlokalisationssequenz und vermitteln daher ein grünes Signal, die von UMJ47 sind ausschließlich rot. Das mittlere Kompartiment erhielt demnach nicht immer die Zellkerne beider Stämme. Während in Abbildung 2.6 bei der oberen Hyphe, das linke und mittlere Kompartiment ein deutliches GFP-Signal zeigen, ist bei der unteren Hyphe nur im mittleren Kompartiment ein GFP-Signal zu erkennen, die Zellkerne der beiden äußeren Kompartimente fluoreszieren lediglich in Rot. Eine Präferenz zur Zellkernverteilung, konnte nicht festgestellt werden.



**Abbildung 2.6: Die prolongierte Expression von *rbf1* beeinflusst die Zellkernverteilung *in planta*.** Für die Inokulation wurde eine Kreuzung der Stämme UBF30 (*a1 b1 H1:3xmCherry ip'[P<sub>hxt1</sub>:NLS:GFP]ip<sup>s</sup>*) und UMJ47 (*a2 b2 H1:3xmCherry ip'[P<sub>mig2-5</sub>:rbf1]ip<sup>s</sup>*) verwendet. Frische Blattsschnitte wurden fünf Tage nach der Infektion mikroskopiert. Die Hyphen zeigen eine abnorme Zellkernverteilung. Das mittlere Kompartiment mit zwei Zellkernen wurde dabei von zwei Kompartimenten flankiert, die jeweils nur einen Zellkern besaßen. Die Schnallenzelle (gelber Pfeil) war ebenfalls entgegen der normalen Wuchsrichtung ausgerichtet. Der Maßstabsbalken entspricht 10  $\mu\text{m}$ .

Um zu quantifizieren, wie oft eine Fehlverteilung vorkommt, wurde die Zellkernverteilung der Hyphen aus der Kreuzung UBF30 x UBF31, UBF30 x UMJ47 und UMJ46 x UMJ47 ermittelt. Fünf Tage nach der Infektion war zu sehen, dass 60 % der Hyphen des Wildtyphintergrundes (UBF30 x UBF31) (mindestens) eine Verdopplung der Zellkerne durchlaufen haben und nur sehr wenige davon eine falsche Verteilung bzw. fehlerhafte Verdopplung aufwiesen (Abbildung 2.7). Auch der Anteil abnormal vieler Zellkerne bei Hyphen, die nur ein Kompartiment hatten, war mit 3 % relativ gering. Die Kreuzungen aus UBF30 x UMJ47 und UMJ46 x UMJ47 hingegen zeigten, dass über 70 % der Hyphen nur ein Kompartiment besaßen und die Zellkerne noch nicht verdoppelt wurden. Weitere 7 % bzw. 6 % hatten dabei eine ungewöhnliche Anzahl an Zellkernen. Die 20 % der Hyphen bei der Kreuzung UBF30 x UMJ47, die eine Verdopplung der Zellkerne durchlaufen hatten, waren nicht korrekt verteilt. 90 % davon hatten die zuvor beschriebene Aufteilung, bei der vier Zellkerne auf drei Kompartimente verteilt wurden, wovon das mittlere Kompartiment zwei Zellkerne enthielt.



**Abbildung 2.7: Die prolongierte Expression von *rbf1* führt zu einer fehlerhaften Zellkernverteilung.** Für die Inokulation wurde eine Kreuzung der Stämme UBF30 x UBF31 (*a1 b1 H1:3xmCherry ip<sup>r</sup>[P<sub>hxt1</sub>:NLS:GFP]ip<sup>s</sup> x a2 b2 H1:3xmCherry ip<sup>r</sup>[P<sub>hxt1</sub>:NLS:GFP]ip<sup>s</sup>*), UMJ46 x UMJ47 (*a1 b1 H1:3xmCherry ip<sup>r</sup>[P<sub>mig2-5</sub>:rbf1]ip<sup>s</sup> x a2 b2 H1:3xmCherry ip<sup>r</sup>[P<sub>mig2-5</sub>:rbf1]ip<sup>s</sup>*) und UBF30 x UMJ47 verwendet. UBF30 x UMJ47 und UMJ46 x UMJ47 zeigen nicht nur eine fehlerhafte Zellkernverteilung im Vergleich zum Wildtyp, sondern besitzen auch weniger Hyphen mit mehr als einem Kompartiment. Frische Blattschnitte wurden fünf Tage nach der Infektion mikroskopiert. Gezählt wurden nur fusionierte Hyphen deren Zellkerne (ZK) und Abmessungen eindeutig erkennbar waren. Die Anzahl der Hyphen ist mit n über der jeweiligen Kreuzung angegeben. Statistische Signifikanz wurde mit dem zweiseitigen Mann-Whitney-U Rangsummentest mit Kontinuitätskorrektur ermittelt und bezieht sich auf den Wildtyp UBF30 x UBF31. \*\*\* *p*-Wert ≤ 0,001.

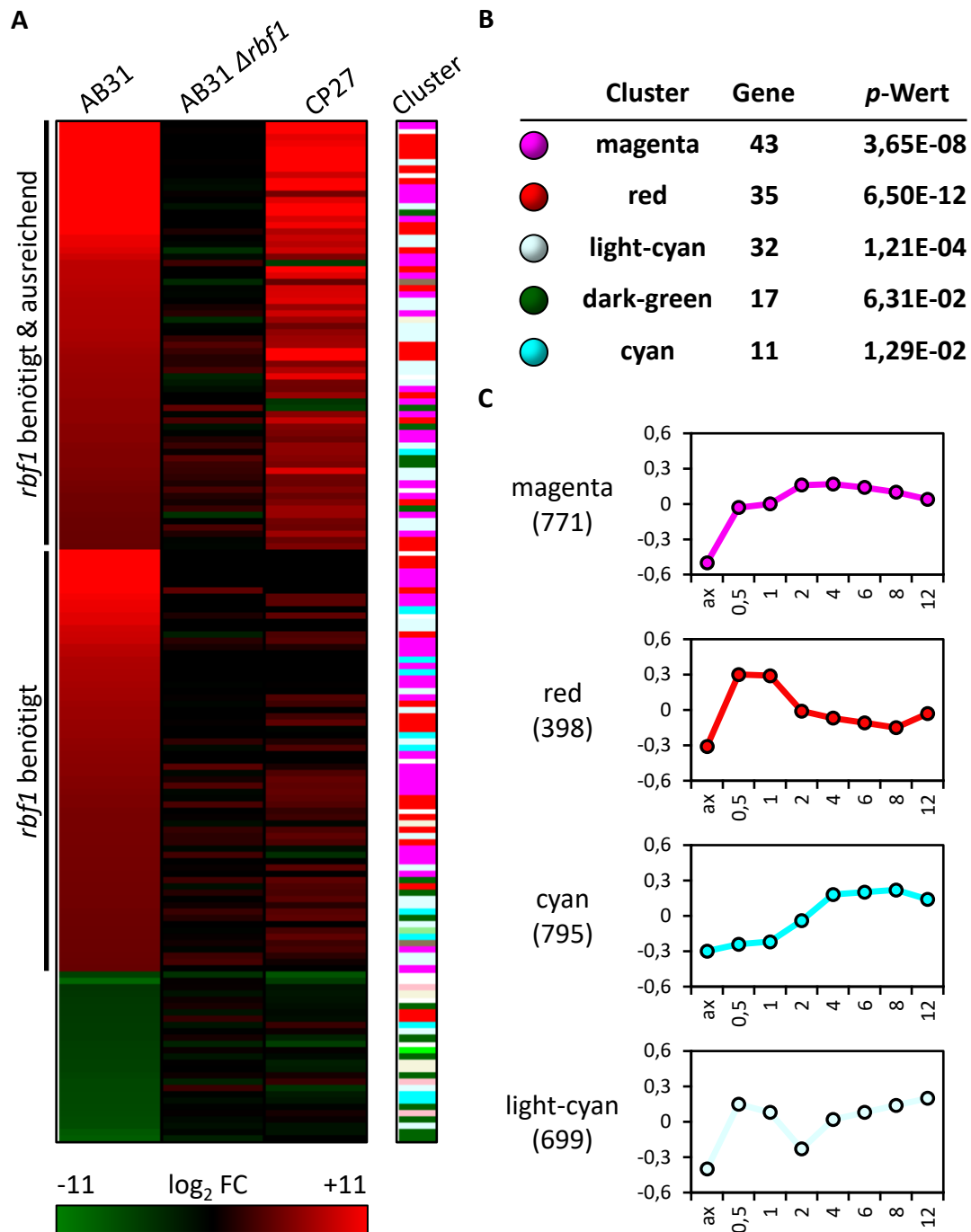


Die hier dargestellten Ergebnisse bestätigen nicht nur, dass *rbf1* lediglich in der frühen Infektionsphase exprimiert wird, wie verschiedene Arbeiten bereits zeigen konnten (M. Vraneš, unveröffentlicht; Heimel *et al.*, 2010a; Tollot *et al.*, 2016; Lanver *et al.*, 2018), sondern auch, dass eine erzwungene *rbf1* Expression *in planta* zu einer aberranten Zellkernverteilung und dem Verlust der Pathogenität führt. Dies verdeutlicht, dass die Repression von *rbf1* unabdingbar ist, um die weitere pathogene Entwicklung und den Vollzug des Lebenszyklus zu gewährleisten.

### 2.1.3 Die Hälfte der *rbf1*-regulierten Gene ist weiterhin *in planta* exprimiert

Wie bereits beschrieben wurde, gilt *rbf1* als der Hauptregulator der *b*-abhängigen Signalkaskade (Heimel *et al.*, 2010b). Die Expression von *rbf1* ist jedoch auf einen kurzen Zeitraum beschränkt, da dessen Repression nach initialer Kolonisation der Pflanze notwendig für den weiteren Infektionsprozess ist. Diese Erkenntnis wirft neue Fragen auf, denn eine große Anzahl an *rbf1*-regulierten Genen werden bis in die späten Infektionsphasen exprimiert. Von 184 *b*-abhängigen Genen werden 162 *rbf1*-abhängig reguliert (Ulrich, 2020). Vergleicht man diesen Datensatz mit RNA-Seq Daten aus Pflanzeninfektionen (Lanver *et al.*, 2018), können 75 % der *rbf1*-regulierten Gene primär in vier Cluster eingeteilt werden – *red*, *magenta*, *light-cyan* und *cyan* ( $p$ -Wert  $\leq 0,05$ ) (Abbildung 2.8, B). Insgesamt wurden 14 verschiedene Cluster definiert, denen Gene zugewiesen werden konnten. Die Zuweisung erfolgte dabei in Abhängigkeit des Expressionsprofils in axenischer Kultur und während der Infektion. Gene mit einem ähnlichen Profil werden demnach in dasselbe Cluster eingeteilt. Die Gene in den genannten Cluster sind unter axenischen Bedingungen nicht exprimiert und werden erst im Verlauf der Infektion induziert. Während Gene des *red* Clusters nur auf der Blattoberfläche zwischen 0,5 - 1 dpi exprimiert werden, sind die Gene der restlichen drei Cluster darüber hinaus noch aktiv (Abbildung 2.8 C). Neben *rbf1* selbst, können 35 der 162 *rbf1*-regulierten Gene dem *red* Cluster zugeordnet werden ( $p$ -Wert:  $6,5 \times 10^{-12}$ ). Ein Viertel gehören dem *magenta* Cluster an (43 Gene,  $p$ -Wert:  $3,65 \times 10^{-8}$ ), das ab 0,5 dpi aktiv ist und bis 12 dpi stark exprimiert wird. Zusammen mit dem *light-cyan* (32 Gene,  $p$ -Wert:  $1,21 \times 10^{-4}$ ) und dem *cyan* (11 Gene,  $p$ -Wert: 0,0129) Cluster werden demnach mehr als die Hälfte aller *rbf1*-abhängigen Gene weiterhin in der Pflanze exprimiert. Folglich scheint ein neuer Satz an Transkriptionsfaktoren in der Regulationskaskade eingesetzt und benötigt zu werden.

Unter den 43 Genen des *magenta* Clusters befindet sich der Homeodomäentranskriptionsfaktor Hdp2 und der Zinkfingertranskriptionsfaktor Biz1. Beide sind essenzielle Regulatoren für die Infektion, da die Deletion (von einem der beiden) zum Verlust der Pathogenität führt (Flor-Parra *et al.*, 2006; Lanver *et al.*, 2014). Außerdem finden sich, abgesehen von *hdp1*, weitere Transkriptionsfaktoren, die dem *light-cyan* und *red* Cluster angehören, deren Deletion allerdings keinen Effekt auf die Virulenz haben (Abbildung 6.3, Anhang). Obwohl *biz1* *rbf1*-abhängig induziert wird, handelt es sich vermutlich um keine direkte Regulation und erfordert einen noch unbekanntem Faktor (Ulrich, 2020). Im Gegensatz dazu ist *hdp2* ein direktes Rbf1 Zielgen, dessen Regulation ein zentrales Thema dieser Arbeit ist und in einem späteren Kapitel genauer erläutert wird. Somit stellen beide Transkriptionsfaktoren nicht nur potenzielle Kandidaten zur Weiterführung der Signalkaskade dar, sondern vermögen auch die Expression der zuvor *rbf1*-regulierten Gene *in planta* aufrechtzuerhalten. CHIP-Seq Experimente gaben erste Hinweise bezüglich potenzieller Bindemodalitäten (Ulrich, 2020). Dabei wurde untersucht, welche Promotoren sich von Rbf1, als auch von Hdp2 und/oder Biz1 unter axenischen Bedingungen anreichern lassen.



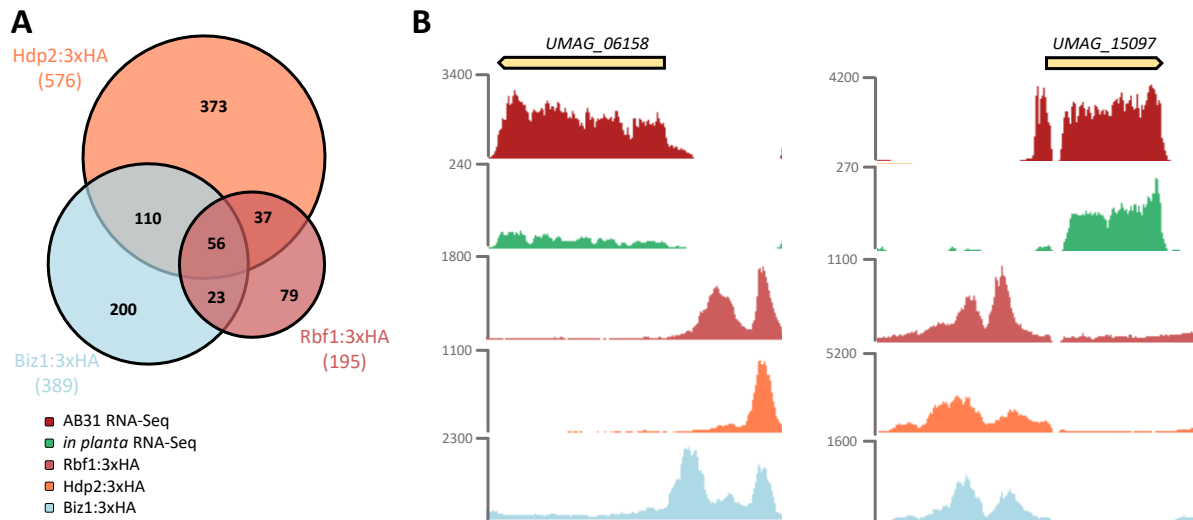
**Abbildung 2.8: Clusterzugehörigkeit *rbf1*-regulierter Gene.** **A)** Die *heatmap* der RNA-Seq von AB31 ( $a2 P_{crg1}:bW2, bE1$ ), AB31  $\Delta rbf1$  ( $a2 P_{crg1}:bW2, bE1 \Delta rbf1$ ) und CP27 ( $a2 \Delta b::P_{crg1}:rbf1$ ) zeigt die Veränderung ( $\log_2$  fold change (FC)  $>2$  bzw.  $<-2$ ) der Genexpression aller signifikanten *rbf1*-regulierten Gene (Abbildung modifiziert nach Ulrich, 2020). Der Datensatz der 162 *rbf*-regulierten Gene aus (Ulrich, 2020) wurde mit dem Datensatz aus (Lanver *et al.*, 2018) verglichen. Dabei wurde eine Einteilung der Gene in definierte Cluster vorgenommen, die neben den Expressionsprofilen zu sehen ist. **B)** Die Tabelle zeigt die fünf Cluster, die am häufigsten vertreten sind. Die Einteilung wurde mittels hypergeometrischer Verteilung auf ihre Signifikanz geprüft und ist als  $p$ -Wert angegeben. **C)** Die Diagramme zeigen die Expression des jeweiligen Clusters über die Zeit der Infektion. Die Zahl unterhalb der Clusterbezeichnung gibt die Gesamtzahl der Gene innerhalb des jeweiligen Clusters wieder. Eine Gemeinsamkeit der vier Cluster ist, dass zugehörige Gene unter axenischen Bedingungen nicht exprimiert werden und erst im Verlauf der Infektion induziert werden (Abbildungen modifiziert nach Lanver *et al.*, 2018).

Hierfür wurden Stämme verwendet, die durch einen Medienwechsel Rbf1:3xHA (indirekt über *b*), Hdp2:3xHA oder Biz1:3xHA (direkt) exprimieren. Die anschließende Chromatin-Immunopräzipitation und Sequenzierung erlaubte es die Anreicherung des jeweiligen Transkriptionsfaktors an Promotorregionen zu ermitteln. Dabei zeigte sich, dass 60 % (116) der Gene, deren Promotoren mit Rbf1:3xHA angereichert wurden, ebenso mit Hdp2:3xHA und/oder Biz1:3xHA angereichert werden konnten (Abbildung 2.9, A)<sup>3</sup>. Die absolute Schnittmenge von Genen, deren Promotoren von Rbf1:3xHA und Hdp2:3xHA angereichert wurden (93), war dabei größer als die von Rbf1:3xHA und Biz1:3xHA (79). Unabhängig von Rbf1 konnten auch 110 Promotoren von Genen mit Hdp2:3xHA und Biz1:3xHA angereichert werden. Insgesamt konnten 56 Gene identifiziert werden, bei denen eine gleichzeitige Anreicherung von Rbf1:3xHA, Biz1:3xHA und Hdp2:3xHA im Promotor festgestellt werden konnte. Abbildung 2.9 B zeigt dies beispielhaft an zwei Genloci. Hier ist sowohl die Bindung der drei Transkriptionsfaktoren Rbf1 (rot), Hdp2 (orange) und Biz1 (hellblau) an den jeweiligen Promotoren dargestellt, als auch die Expression der Gene unter verschiedenen Konditionen. *UMAG\_06158* und *UMAG\_15097* werden nach artifizierlicher *b*-Induktion in axenischer Kultur (AB31 RNA-Seq, dunkelrot), sowie acht Tage nach der Infektion (*in planta* RNA-Seq, grün) exprimiert. Hinzu kommen Microarrayanalysen, die zeigen, dass *UMAG\_06158* durch Biz1 und Hdp2 unabhängig voneinander und *UMAG\_15097* durch Hdp2 induziert werden (M. Vraneš, unveröffentlicht). Dies spricht nicht nur für eine direkte Rbf1 Regulation, sondern auch für eine direkte Regulation über Hdp2 und/oder Biz1.

Es gilt jedoch zu beachten, dass diese Versuche unter axenischen Bedingungen durchgeführt wurden. Mögliche Komplexbildung mit anderen Transkriptionsfaktoren, Beeinflussung pflanzlicher Signale und kooperative Bindung sind hierbei nicht vorhanden, wodurch zusätzliche Zielgene und damit Informationen eventuell verloren gehen. Nicht außer Acht zu lassen ist außerdem die Tatsache, dass bei den verwendeten Stämmen eine Überexpression der Transkriptionsfaktoren stattfindet, die unter Umständen zu Artefakten führen kann. Aus diesem Grund wurden im Zuge dieser Arbeit ChIP-Seq Analysen *in planta* unter Kontrolle des jeweils nativen Promotors durchgeführt, um die Bindung von Hdp2 und Biz1 im natürlichen Kontext zu untersuchen.

---

<sup>3</sup> Diese Analyse wurde bereits in Ulrich, 2020 durchgeführt. Die hier gezeigten Werte wurden mit demselben Datensatz ermittelt, weichen jedoch von denen in Ulrich, 2020 ab, da andere Filterkriterien angewandt wurden (siehe 4.6).



**Abbildung 2.9: A) Venn-Diagramm der ChIP-Seq Analysen mit Hdp2:3xHA, Biz1:3xHA und Rbf1:3xHA.** Hdp2:3xHA (Stamm UJU2;  $a2 \Delta b ip' [P_{crg1}:hdp2:3xHA] ip^s$ ) vs. Biz1:3xHA (Stamm UJU4;  $a2 \Delta b ip' [P_{crg1}:biz1:3xHA] ip^s$ ) vs. Rbf1:3xHA (Stamm UDS5;  $a2 P_{crg1}:bW2, bE1 rbf1:3xHA$ ). Die Zahlen beziehen sich auf Gene, deren Promotoren mit dem jeweiligen Transkriptionsfaktor 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. Diese Analyse wurde bereits in Ulrich, 2020 durchgeführt. Die hier gezeigten Werte wurden mit demselben Datensatz ermittelt, weichen jedoch von denen in Ulrich, 2020 ab, da andere Filterkriterien angewandt wurden (siehe Kapitel 4.6). **B) Visuelle Darstellung der Expression und Transkriptionsfaktorbindung von *rbf1*-regulierten Genen.** AB31 RNA-Seq (dunkelrot) stellt die Expression unter axenischen Bedingungen im Stamm AB31 ( $a2 P_{crg1}:bW2, bE1$ ) nach b-Induktion dar (Datensatz aus Kellner *et al.*, 2014). *In planta* RNA-Seq (grün) stellt die Expression *in planta* bei 8 dpi dar (Datensatz aus Tollot *et al.*, 2016). Rbf1:3xHA (rot) zeigt die Anreicherung von Rbf1 im Stamm UDS5 in der jeweiligen Promotorregion (Datensatz aus Ulrich, 2020). Hdp2:3xHA (orange) zeigt die Anreicherung von Hdp2 im Stamm UJU2 in der jeweiligen Promotorregion (Datensatz aus (Ulrich, 2020). Biz1:3xHA (hellblau) zeigt die Anreicherung von Biz1 im Stamm UJU4 in der jeweiligen Promotorregion (Datensatz aus Ulrich, 2020). *Reads* wurden mit Bowtie2 version 2.0.0-beta7 (Langmead und Salzberg, 2012) auf das *U. maydis* Genom (Ensembl Genomes 33 (Kersey *et al.*, 2018) aligniert. Zur visuellen Darstellung der *reads* wurde der Generic Genome Browser Version 2.33 verwendet. Profile von *peaks* sind repräsentiert durch normalisierte *read counts*.

## 2.2 ChIP-Seq Analysen von *hdp2* und *biz1* in *planta*

Die durch bW/bE ausgelöste Signalkaskade, welche für die Transition der biotrophen Lebensweise zuständig ist, wird primär vom Hauptregulator Rbf1 gesteuert. Hierbei ist Rbf1 vor allem für die Etablierung der pathogenen Phase von *U. maydis* verantwortlich, was in der nächsten Ebene der Kaskade resultiert. Wie im vorherigen Kapitel bereits erläutert, agiert *rbf1* jedoch nur in einem engen Zeitrahmen. Die Weiterführung der Kaskade, sowie die Aufrechterhaltung der Expression von *rbf1*-regulierten Genen in der Pflanze muss zwangsläufig von anderen Transkriptionsfaktoren übernommen werden. Potenzielle Kandidaten hierfür sind die *rbf1*-abhängigen Transkriptionsfaktoren Hdp2 und Biz1, deren Zielgene zum Teil mit denen von Rbf1, bezüglich Bindung und in einigen Fällen auch Regulation, zumindest unter axenischen Bedingungen, korrelieren.

Daher galt es nun die Bindung dieser pathogenitätsrelevanten Regulatoren im physiologischen Kontext der Pflanzeninfektion zu betrachten. Da *rbf1* nur sehr kurz auf der Blattoberfläche präsent ist, beschränkte sich die Analyse lediglich auf *hdp2* und *biz1*, mit primärem Fokus auf *hdp2*. Hierzu wurden Stämme generiert, in denen *hdp2* (UMJ14 u. UMJ15; *a1 b1 hdp2:3xHA*; *a2 b2 hdp2:3xHA*) bzw. *biz1* (UMJ28 u. UMJ29; *a1 b1 biz1:3xHA*; *a2 b2 biz1:3xHA*) im nativen Locus mit einem 3xHA-Tag versehen wurden. Sieben Tage alte Maispflanzen (Early Golden Bantam) wurden anschließend mit einer Kreuzung aus kompatiblen Stämmen infiziert und nach weiteren sieben Tagen wurden Proben entnommen (Details siehe 4.4.4). Die durch Chromatin-Immunopräzipitation angereicherte DNA wurde sequenziert und auf das Genom von *U. maydis* aligniert. Bereiche mit einer hohen Anreicherung werden dabei als *peak* dargestellt. Die *peaks* wurden im Anschluss unter Berücksichtigung bestimmter Kriterien (siehe 4.6) Genen zugeordnet. Anzucht und Infektion der Pflanzen sowie Chromatin-Immunopräzipitation erfolgte in zwei unabhängigen Experimenten.

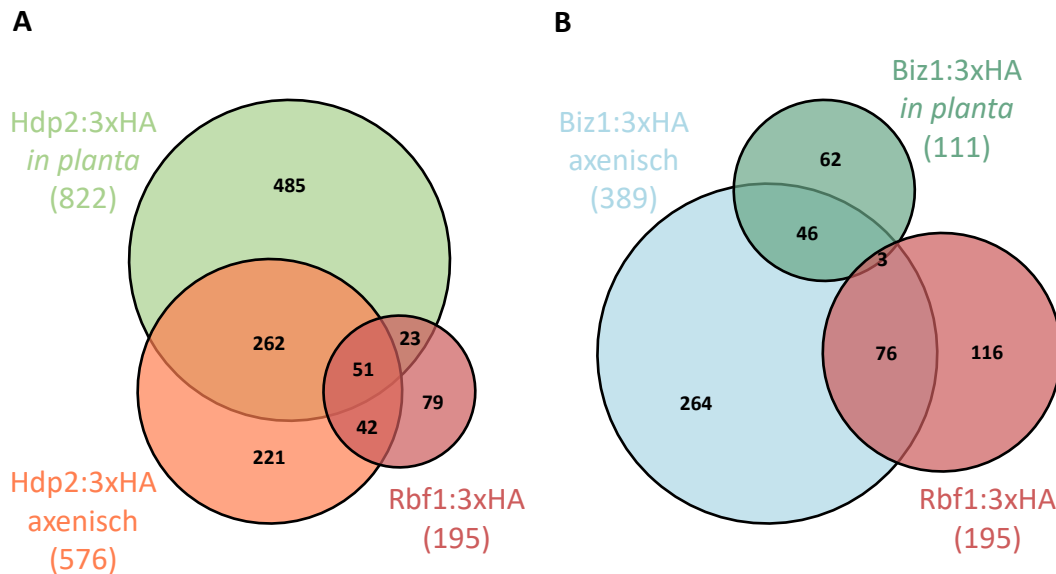
### 2.2.1 Vergleich der *in vitro* und *in planta* ChIP-Seq von Hdp2/Biz1 mit Rbf1

Durch die ChIP-Seq Analysen von Hdp2 und Biz1 *in planta* (7 dpi) konnten 822 bzw. 111 Gene mit Anreicherung von Hdp2 bzw. Biz1 in Promotorregionen identifiziert werden. Diese Daten wurden zunächst mit den ChIP-Seq Analysen aus (Ulrich, 2020) verglichen und sind als proportionales Venn-Diagramm in Abbildung 2.10 dargestellt. Hierbei wurden Schnittmengen zwischen Genen gebildet, deren Promotoren mit Rbf1:3xHA, Hdp2:3xHA bzw. Biz1:3xHA axenisch und Hdp2:3xHA bzw. Biz1:3xHA *in planta* angereichert werden konnten. Die größte Übereinstimmung konnte zwischen Hdp2:3xHA axenisch und Hdp2:3xHA *in planta* festgestellt werden. Eine detaillierte Analyse dazu ist in Kapitel 2.2.3 zu finden. Ein Vergleich der Hdp2:3xHA Bindung (axenisch und *in planta*) mit der Rbf1:3xHA Bindung, zeigte eine Anreicherung der meisten Promotoren (bzw. Gene) unter allen drei

Konditionen (Abbildung 2.10, A). Zusätzlich gibt es Promotoren (42), die mit Rbf1:3xHA und Hdp2:3xHA unter axenischen Bedingungen angereichert werden konnten, jedoch nicht *in planta*. Umgekehrt konnten mit Rbf1:3xHA und Hdp2:3xHA *in planta* 23 Promotoren angereichert werden, die unter axenischen Bedingungen nicht mit Hdp2:3xHA angereichert werden konnten. Demnach ist die Fraktion der Promotoren, an die neben Rbf1:3xHA auch Hdp2:3xHA bindet, *in vitro* größer als *in planta*.

Bei ChIP-Seq Analysen mit Biz1:3xHA konnte ebenfalls ein Überlapp zwischen *in vitro* und *in planta* nachgewiesen werden. Dieser fällt deutlich geringer aus als es für Hdp2:3xHA ermittelt wurde und beinhaltet lediglich 49 Gene. Die größte Schnittmenge findet sich zwischen Rbf1:3xHA und Biz1:3xHA in axenischer Kultur und enthält 79 Gene, deren Promotoren angereichert werden konnten. Drei dieser Promotorregionen lassen sich außerdem mit Biz1:3xHA *in planta* anreichern und sind die einzigen, die einen Überlapp zwischen der Bindung von Rbf1:3xHA und Biz1:3xHA *in planta* darstellen.

Zusammenfassend bestätigen diese Ergebnisse, dass Hdp2:3xHA und Rbf1:3xHA zum Teil an dieselben Promotoren binden. Abhängig von axenischer bzw. *in planta* Hdp2:3xHA Expression ändern sich diese Teilmengen jedoch, sodass von einem veränderten Bindungsverhalten von Hdp2 in den unterschiedlichen Konditionen auszugehen ist. Eine mögliche Erklärung hierfür ist die zuvor beschrieben potenzielle Präsenz von Faktoren, die erst im Zuge der Pflanzeninfektion das Bindeverhalten beeinflussen. Unter axenischen Bedingungen wird die Bindung von Hdp2 bzw. Biz1 sehr isoliert betrachtet. Dagegen werden im natürlichen Kontext (*in planta*) aufgrund pflanzlicher Signale oder weiterer Interaktionspartner neue Bindeverhalten sichtbar. Für Biz1 scheint jedoch keine pflanzenspezifische Bindung stattzufinden, da sich lediglich Promotoren von nur drei Genen mit Biz1:3xHA *in planta* anreichern lassen, an die auch Rbf1:3xHA bindet. Die geringe Qualität der ChIP-Seq von Biz1:3xHA *in planta* könnte hierbei im Zusammenhang stehen.



**Abbildung 2.10: Venn-Diagramme der Gene, deren Promotoren mit Rbf1:3xHA und Hdp2:3xHA bzw. Biz1:3xHA angereichert werden können.** **A)** Hdp2:3xHA *in planta* (UMJ14 x UMJ15; *a1 b1 hdp2:3xHA x a2 b2 hdp2:3xHA*) vs. Hdp2:3xHA axenisch (Stamm UJU2; *a2 Δb ip' [P<sub>crg1</sub>:hdp2:3xHA]ip<sup>s</sup>*) vs. Rbf1:3xHA (Stamm UDS5; *a2 P<sub>crg1</sub>:bW2, bE1 rbf1:3xHA*) **B)** Biz1:3xHA *in planta* (UMJ28 x UMJ29; *a1 b1 biz1:3xHA x a2 b2 biz1:3xHA*) vs. Biz1:3xHA axenisch (Stamm UJU4; *a2 Δb ip' [P<sub>crg1</sub>:biz1:3xHA]ip<sup>s</sup>*) vs. Rbf1:3xHA (Stamm UDS5; *a2 P<sub>crg1</sub>:bW2, bE1 rbf1:3xHA*). Die Zahlen beziehen sich auf Gene, deren Promotoren mit dem jeweiligen Transkriptionsfaktor 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. Für die ChIP-Seq *in planta* wurden Pflanzen mit den entsprechenden Kreuzungen inokuliert und Proben sieben Tage nach der Infektion entnommen. Für die ChIP-Seq unter axenischen Konditionen wurden die Transkriptionsfaktoren durch arabinoseinduzierbare Promotoren in den entsprechenden Stammhintergründen mittels Medienwechsel exprimiert. Datensatz Hdp2:3xHA axenisch, Biz1:3xHA axenisch und Rbf1:3xHA aus Ulrich, 2020.

### 2.2.2 Hdp2 Bindung und Regulation von Zielgenen

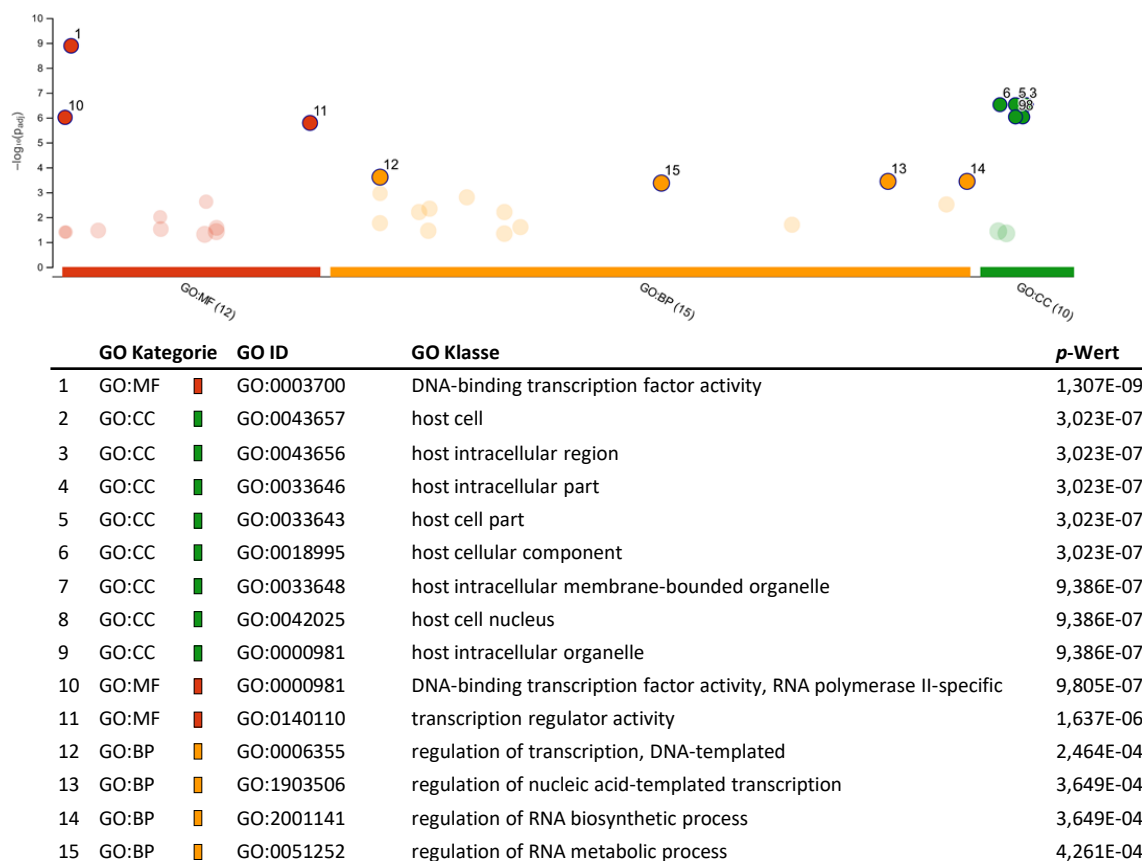
Insgesamt konnten 822 Gene identifiziert werden, deren Promotoren mit Hdp2:3xHA sieben Tage nach der Infektion angereichert werden konnten. Um einen Anhaltspunkt über die Beteiligung am Infektionsprozess und mögliche Funktionen dieser Gene zu erhalten, wurde der Datensatz einer Gene Ontology (GO) Analyse unterzogen. Dabei wurde untersucht, ob die durch Anreicherung der Promotorregion identifizierten Gene einer bestimmten molekularen Funktion (GO:MF), einem biologischen Prozess (GO:BP) oder einer zellulären Komponente (GO:CC) zugeordnet werden können. Diese Kategorien können weiter in Klassen unterteilt werden, die angeben, um welche Funktion, welchen Prozess und welche Komponente es sich handelt. Gene können mehr als einer Klasse zugewiesen werden und dadurch mehrmals in allen Kategorien vorkommen.

Die Zuordnung der 822 Gene ist in Abbildung 2.11 zu sehen und erfolgte in 37 verschiedene Klassen ( $p$ -Wert < 0,05). Dabei werden in diesem Kontext jedoch nur die 15 Klassen hervorgehoben, die einen



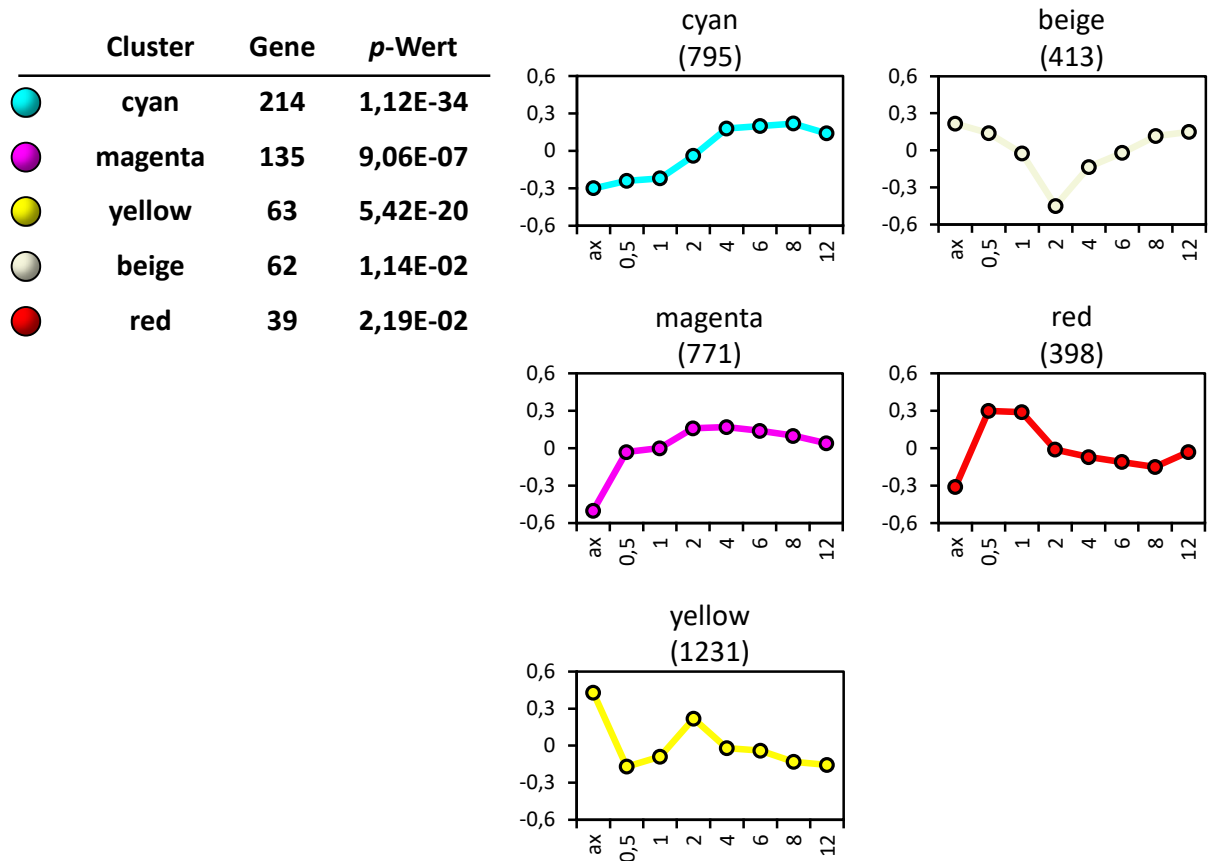
$p$ -Wert  $< 0,001$  aufweisen (Details siehe Tabelle 6.1.3, digitaler Anhang). Funktionen, bei denen es sich um Transkriptionsfaktoraktivität und -regulation handelt, traten vorwiegend auf. Die überprüften Gene werden hauptsächlich Prozessen zugeordnet, die mit Nukleinsäuren assoziiert sind. Bei der Lokalisation konnten insbesondere Klassen identifiziert werden, die mit Wirtszellen in Verbindung gebracht stehen.

Die GO Analyse zeigt eine deutliche Anreicherung von Transkriptionsfaktoren, denn bei 71 der 822 Gene ( $p$ -Wert:  $2,21 \times 10^{-7}$ ) handelt es sich um vorhergesagte Transkriptionsfaktoren. Ergänzend gehören auch putative sekretierte Proteine wie beispielweise Effektoren, die in die Wirtszelle eingeschleust werden und dort ihre Funktion verrichten, zu den möglichen Zielgenen von Hdp2.



**Abbildung 2.11: Gene Ontology Analyse.** 822 Gene, deren Promotoren mit Hdp2:3xHA *in planta* mittels ChIP angereichert werden konnten, wurden einer Gene Ontology (GO) Analyse unterzogen. Gene wurden dabei in die drei dargestellten Kategorien eingeteilt: Die Kategorie GO:MF (*molecular function*) gruppiert Gene über ihre molekulare Funktion, während GO:BP (*biological process*) angibt, in welchen biologischen Prozessen sie involviert sind und GO:CC (*cellular component*) teilt Gene in ihre Zelllokalisierung ein. Die Kategorien können weiter in Klassen aufgeteilt werden. Gene können in jeder Kategorie vorkommen und in mehrere Klassen eingeteilt werden. GO Klasseneinteilungen die einen  $p$ -Wert  $< 0,001$  haben sind im Diagramm hervorgehoben und in der Tabelle (unten) in absteigender Reihenfolge aufgelistet. Eine vollständige Liste befindet sich im Anhang (Tabelle 6.1.3, digitaler Anhang). Die Analyse wurde mittels g:profiler Version e104\_eg51\_p15\_3922dba durchgeführt (Raudvere *et al.*, 2019).

Die Bindung eines Transkriptionsfaktors an DNA reicht allerdings nicht aus, um Rückschlüsse auf potenzielle Zielgene zu ziehen, weshalb auch deren Regulation berücksichtigt werden muss. Zunächst wurde die generelle Regulation dieser Gene *in planta* betrachtet, indem eine Einteilung in die zuvor beschriebenen Cluster aus Lanver *et al.*, 2018 vorgenommen wurde. Von den 822 Genen konnten 598 neun Clustern ( $p$ -Wert  $< 0,05$ ) zugeordnet werden, von denen die fünf Anteilsgrößen in Abbildung 2.12 zu sehen sind. Mehr als ein Drittel der zugewiesenen Gene gehören dem *cyan* Cluster an (214 Gene,  $p$ -Wert:  $1,12 \times 10^{-34}$ ), das erst nach der Etablierung der biotrophen Phase (2 dpi) induziert wird und bis zur Sporulation aktiv bleibt (Lanver *et al.*, 2018). Das *magenta* Cluster, dem insgesamt 771 Gene angehören, bleibt ähnlich lange exprimiert, wird jedoch bereits zwischen 0,5 – 1 dpi induziert und zählt 135 Gene ( $p$ -Wert:  $9,06 \times 10^{-07}$ ). Anders als das *magenta* und *cyan*, ist das *yellow* Cluster (63 Gene,  $p$ -Wert:  $5,42 \times 10^{-20}$ ) bereits ohne Wirt aktiv. Gene, die in diesem Cluster vorkommen sind primär mit Aminosäuren- und Nukleinsäurebiosynthese, Translation, Zellteilung und weiteren metabolischen Prozessen assoziiert. Aufgrund des Zellzyklusarrests von *U. maydis* auf der Pflanze, sinkt die Expression deshalb zwischen 0,5 – 1 dpi, um nach Reinitiation des Zellzyklus wieder anzusteigen (Lanver *et al.*, 2018). Folglich wird, bis auf die Gene im *red* Cluster (39,  $p$ -Wert:  $2,19 \times 10^{-02}$ ) (das *beige* Cluster wird ähnlich reguliert wie *yellow*), die Mehrheit der Gene, deren Promotor mit Hdp2:3xHA angereichert werden konnte, während der biotrophen Phase exprimiert.



**Abbildung 2.12: Tabelle der Clustereinteilung und Expressionsprofile der Cluster.** Die 822 Gene, deren Promotoren mit Hdp2:3xHA *in planta* angereichert werden konnten, wurden mit dem Datensatz aus Lanver *et al.*, 2018 verglichen. Dabei wurde eine Einteilung der Gene in definierte Cluster vorgenommen. Die Tabelle zeigt die fünf Cluster, die am häufigsten vertreten sind. Die Einteilung wurde mittels hypergeometrischer Verteilung auf ihre Signifikanz geprüft und ist als *p*-Wert angegeben. Die Diagramme zeigen die Expression des jeweiligen Clusters über die Zeit der Infektion. Die Zahl unterhalb der Clusterbezeichnung gibt die Gesamtzahl der Gene innerhalb des jeweiligen Clusters wieder (Abbildungen modifiziert nach Lanver *et al.*, 2018).

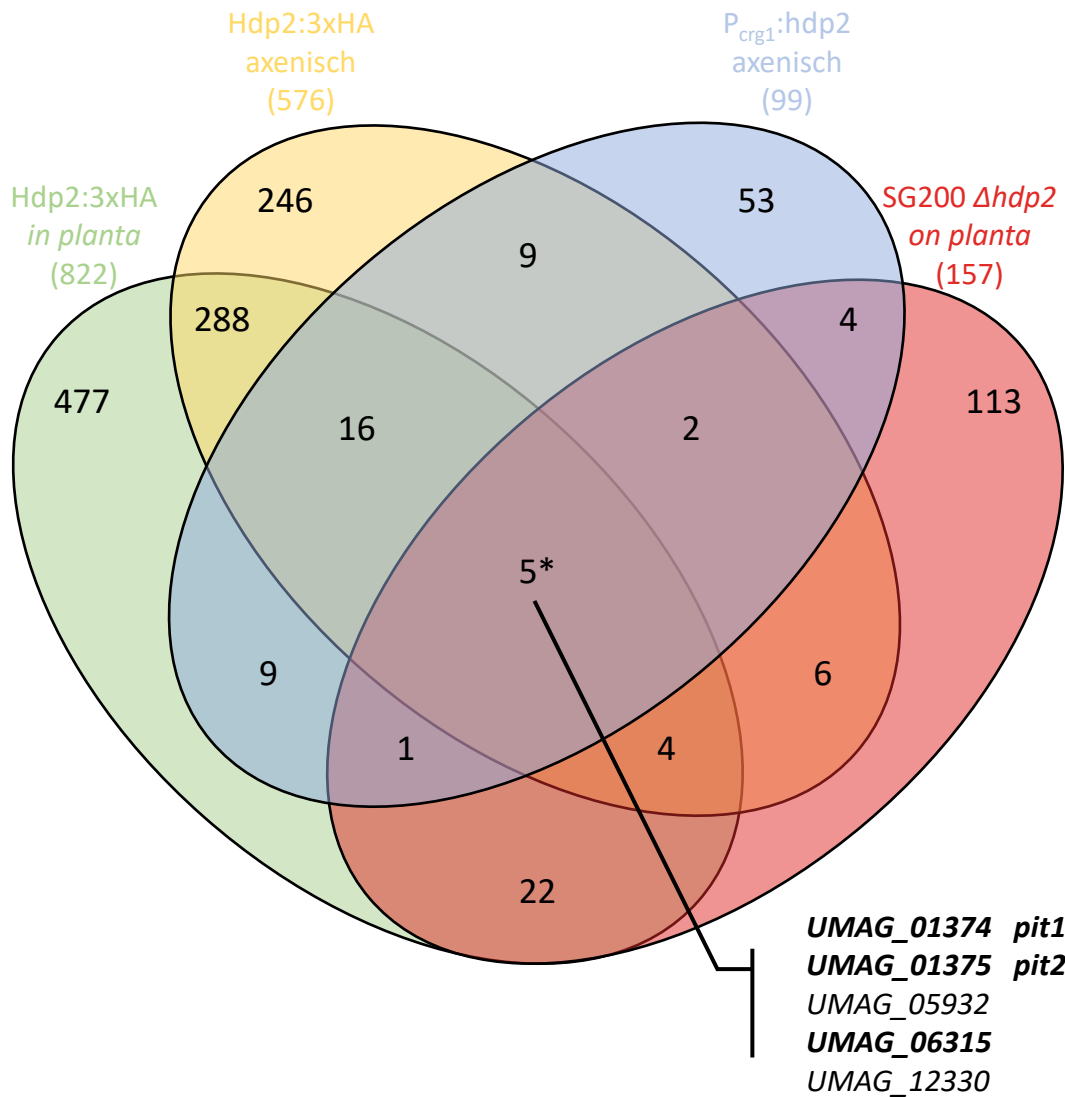
Um eine Aussage über die Beteiligung von *hdp2* an der Regulation treffen zu können, müssen Gene auf ihre differentielle Regulation in An- bzw. Abwesenheit von *hdp2* untersucht werden. Diesbezüglich standen bereits Microarrayanalysen zur Verfügung. Zum einen wurde die Expression von Genen untersucht, die nach der Induktion von *hdp2* differentiell reguliert sind (M. Vraneš, unveröffentlicht). Dazu wurde der Stamm AB32  $P_{crg1}:hdp2$  ( $a2 P_{crg1}:bW2$ ,  $bE2 ip^r[P_{crg1}:hdp2]ip^s$ ) verwendet, bei dem *hdp2* unter Kontrolle des *crg1*-Promotor steht. Dieser erlaubt es, durch einen Wechsel der Kohlenstoffquelle von Glukose zu Arabinose, *hdp2* direkt zu induzieren. Ein weiterer Datensatz vergleicht die Expression des solopathogenen Stamms SG200 ( $a1:mfa2 bE1 bW2$ ) mit SG200  $\Delta hdp2$  *on planta* (16 hpi) und ermittelt dabei welche Gene nach der Deletion von *hdp2* nicht mehr exprimiert werden (M. Vraneš, unveröffentlicht).

Um mögliche Schlussfolgerungen auf direkte Zielgene von Hdp2 ziehen zu können, wurden die Datensätze der CHIP-Seq Analysen aus (Ulrich, 2020) und dieser Arbeit mit den genannten Microarrays verglichen (Abbildung 2.13). Der Überlapp der beiden CHIP-Seq Analysen wird, wie bereits beschrieben, im nächsten Kapitel behandelt. Stellt man die Microarrays  $P_{crg1}:hdp2$  und SG200  $\Delta hdp2$  gegenüber, findet man zwölf Gene, die nicht nur *hdp2*-abhängig induziert werden, sondern deren Expression durch die *hdp2* Deletion auch ausbleibt. Somit ist *hdp2* notwendig und ausreichend für die Regulation dieser Gene. Zieht man die Daten der CHIP-Seqs hinzu, wird deutlich, dass der Anteil an Überschneidungen zwischen Bindung und Expression mit 7 % minimal ausfällt. Der größte Überlapp befindet sich zwischen  $P_{crg1}:hdp2$  und axenischer CHIP, sowie *in planta* CHIP und SG200  $\Delta hdp2$  mit jeweils 32 Genen. Die Promotoren von 31 Genen lassen sich *in planta* mit Hdp2:HA anreichern und sind nach direkter Hdp2 Induktion differenziell reguliert. 21 finden sich in beiden CHIP-Seq Datensätzen sowie in  $P_{crg1}:hdp2$ . Diese Gruppe ist von besonderem Interesse, da neun dieser Gene dem Sekretom<sup>4</sup> von *U. maydis* zugeordnet werden können, von denen fünf bereits als pathogenitätsrelevante Effektoren bekannt sind. Die Korrelation von Bindung und Regulation ist ein starkes Indiz dafür, dass betroffene Promotoren zu direkten Zielgenen von *hdp2* gehören. Dies ist vor allem in der Schnittmenge aus allen Konditionen zu beobachten. In diesem Fall bindet Hdp2:3xHA nicht nur an die Promotoren der Gene, sondern *hdp2* ist auch ausreichend und notwendig für deren Expression. Lediglich fünf Gene gehören in diese Kategorie – *pit1*, *pit2*, *UMAG\_06315*, *UMAG\_05932* und *UMAG\_12330*. Zusätzlich konnte die Bindung von Hdp2:3xHA an den Promotoren von *pit1/2*<sup>5</sup> und *UMAG\_06315* mittels qCHIP Analyse (quantitative Chromatin-Immunopräzipitation) verifiziert werden (Abbildung 6.4, Anhang).

---

<sup>4</sup> Nach der Einteilung von Lanver *et al.*, 2018

<sup>5</sup> Die Gene *pit1* und *pit2* werden divergent transkribiert und teilen sich einen 1813 bp langen intergenischen Bereich.

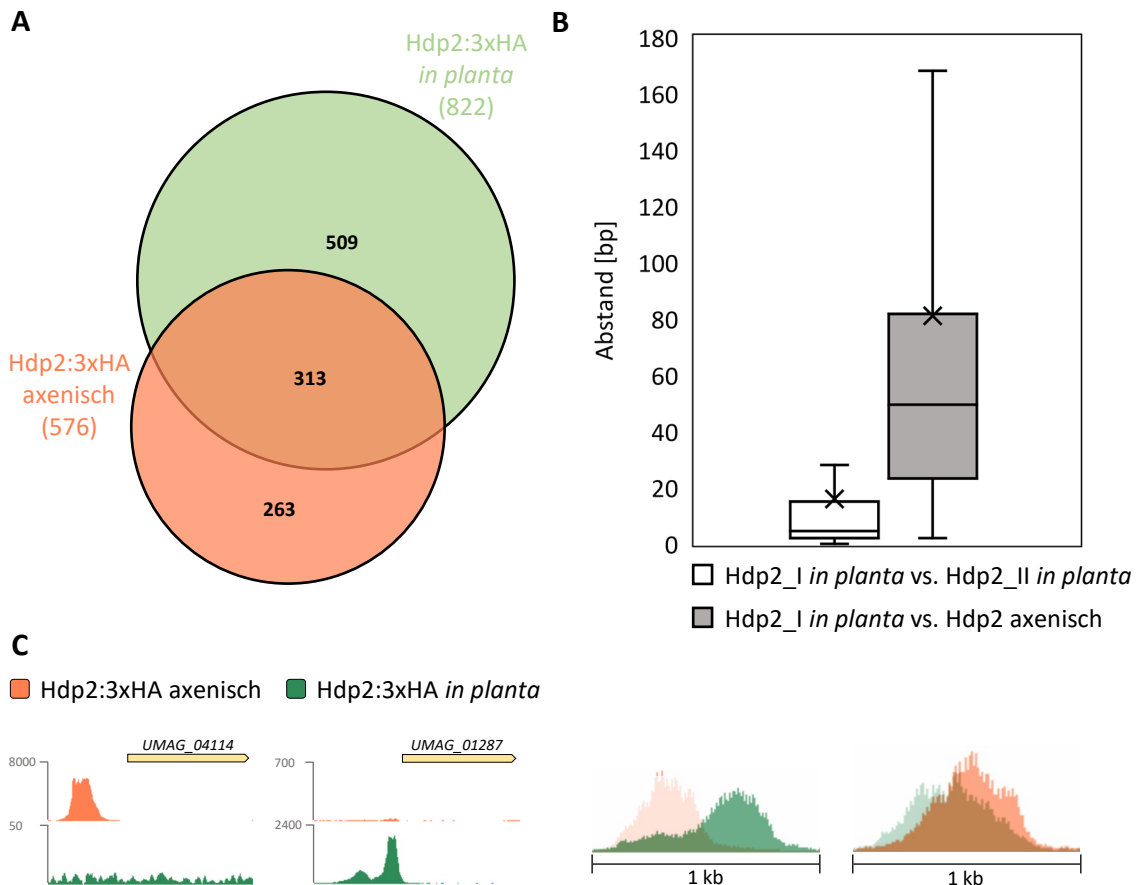


**Abbildung 2.13: Venn-Diagramm der Gene, die *hdp2*-abhängig reguliert werden und deren Promotoren mit Hdp2:3xHA angereichert werden können.** Hdp2:3xHA *in planta* beinhaltet 822 Gene, deren Promotoren mit Hdp2:3xHA 7 dpi *in planta* angereichert werden konnten (diese Arbeit). Die Pflanzen wurden mit einer Kreuzung der Stämme UMJ14 x UMJ15 (*a1 b1 hdp2:3xHA* x *a2 b2 hdp2:3xHA*) inokuliert. Sieben Tage nach der Infektion wurden Proben entnommen. Hdp2:3xHA axenisch beinhaltet 576 Gene deren Promotoren mit Hdp2:3xHA unter axenischen Bedingungen im Stamm UJU2 (*a2  $\Delta b ip'[P_{crg1}:hdp2:3xHA]ip^s$* ) angereichert werden konnten (Datensatz aus Ulrich, 2020). Promotoren können dabei mehr als einen *peak* beinhalten. Derselbe *peak* kann außerdem, im Fall von divergenten Promotoren, auf zwei Gene bezogen sein.  $P_{crg1}:hdp2$  axenisch beinhaltet 99 Gene, die durch artifizielle Induktion von *hdp2* unter axenischen Bedingungen im Stamm AB32  $P_{crg1}:hdp2$  (*a2  $P_{crg1}:bW2, bE2 ip'[P_{crg1}:hdp2]ip^s$* ) signifikant induziert werden (M. Vraneš, unveröffentlicht). SG200  $\Delta hdp2$  on planta beinhaltet 157 Gene, deren Expression sich bei der Deletion von *hdp2* im Stamm SG200  $\Delta hdp2$  (*a1:mfa2 bE1 bW2  $\Delta hdp2$* ) 16 hpi signifikant ändert (M. Vraneš, unveröffentlicht). Die Schnittmenge 5\* ist weiter aufgeschlüsselt und beinhaltet die Gene, die in allen Konditionen vorkommen. Für die fettgedruckten, wurde die Bindung mittels qChIP bestätigt.

### 2.2.3 Hdp2 hat *in vitro* und *in planta* ein spezifisches Bindeverhalten

Vergleicht man die ChIP-Seq Daten von Hdp2:3xHA *in planta* (diese Arbeit) mit denen aus axenischer Kultur (Ulrich, 2020), stehen 822 Gene, deren Promotoren mit Hdp2:3xHA sieben Tage nach der Infektion angereichert werden konnten gegenüber 576 Genen, deren Promotoren unter axenischen Bedingungen mit Hdp2:3xHA angereichert wurden. Die Schnittmenge davon beinhaltet 313 Gene und ist als proportionales Venn-Diagramm in Abbildung 2.14 A dargestellt. Die Promotoren von über 60 % bzw. 45 % der Gene werden demnach nur *in planta* bzw. *in vitro* von Hdp2:3xHA gebunden. Dies ist beispielhaft in Abbildung 2.14 C auf der linken Seite gezeigt. Während im Promotor von *UMAG\_04114* eine Anreicherung von Hdp2:3xHA in axenischer Kultur beobachtet werden kann, fehlt sie *in planta*. Vice versa ist bei *UMAG\_01287* lediglich *in planta* die Bindung in Form eines *peaks* von Hdp2:3xHA zu sehen. Ein Großteil der Promotoren ist hiernach nur *in planta* von Hdp2:3xHA gebunden, was darauf zurückzuführen sein kann, dass mehr Möglichkeiten hinsichtlich kooperativer Bindung und Komplexbildung mit anderen Transkriptionsfaktoren vorhanden sind.

Es scheinen sich jedoch nicht nur die Ziele für Hdp2:3xHA zu unterscheiden, sondern auch die Position innerhalb desselben Promotors bei unterschiedlichen Konditionen. In Abbildung 2.14 C (rechts) sind *peaks* beider Bedingungen am selben Promotor dargestellt. Hdp2:3xHA bindet an diese Promotoren *in planta*, sowie *in vitro*, aber die einzelnen *peaks* sind dabei entweder verschoben (links) oder die *peaks* überlappen größtenteils noch und lediglich die Gipfel sind verschoben (rechts). Um diese Verschiebung zu quantifizieren, wurde der Abstand zwischen den Gipfeln der *peaks* ermittelt. Hierzu wurden 82 Gene, deren Promotoren mit Hdp2:3xHA unter axenischen Bedingungen und *in planta* angereichert werden konnten, ausgewählt, die einen *pz-score* (*peakzilla score* (Bardet et al., 2013)) > 150 besitzen und einen einzigen signifikanten *peak* in ihrem Promotor unter der jeweiligen Kondition aufweisen. Anschließend wurde der Abstand der Gipfel unter den biologischen Duplikaten der ChIP-Seq *in planta* berechnet (Abbildung 2.14 B, weiß), sowie der Abstand zwischen eines der Replikate der ChIP-Seq *in planta* mit der ChIP-Seq unter axenischen Bedingungen und als Boxplot dargestellt. Der Vergleich „Hdp2\_I *in planta* vs. Hdp2\_II *in planta*“ gibt die Variation zwischen den einzelnen Duplikaten wieder und zeigt eine deutlich geringere Streuung der Abstände als der Vergleich „Hdp2\_I *in planta* vs. Hdp2 axenisch“. So ist bereits das untere Quartil des Vergleichs „*in planta* vs. *axenisch*“ (grau) mit 23,3 bp höher als das obere Quartil von „*in planta* vs. *in planta*“ mit 15 bp (weiß). Auch das Maximum liegt mit 168 bp deutlich höher. Damit konnte gezeigt werden, dass Hdp2:3xHA *in planta* und *in vitro* an denselben Promotoren bindet, jedoch in den meisten Fällen nicht an derselben Position. Auch dies könnte ein Resultat der Interaktion bzw. Kooperation mit anderen Transkriptionsfaktoren sein, da sich dadurch das Bindeverhalten der beteiligten Proteine verändern kann.



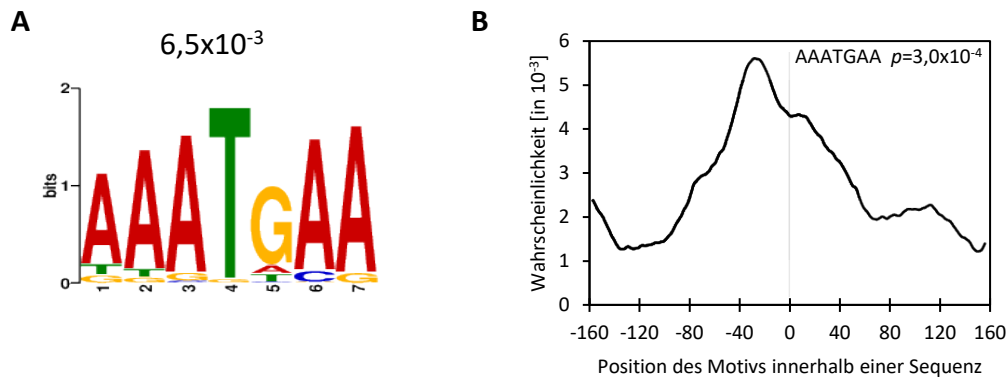
**Abbildung 2.14: Unterschiedliches Bindeverhalten von Hdp2.** **A) Venn-Diagramm der Hdp2 Bindung.** Hdp2:3xHA *in planta* (UMJ14 x UMJ15; *a1 b1 hdp2:3xHA* x *a2 b2 hdp2:3xHA*) vs. Hdp2:3xHA axenisch (Stamm UJU2; *a2 Δb ip<sup>f</sup>[P<sub>crg1</sub>:hdp2:3xHA]ip<sup>s</sup>*). Die Zahlen beziehen sich auf Gene, deren Promotoren mit Hdp2:3xHA 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. Für die ChIP-Seq *in planta* wurden Pflanzen mit den entsprechenden Kreuzungen inokuliert und Proben wurden sieben Tage nach der Infektion entnommen. Für die ChIP-Seq unter axenischen Konditionen wurde Hdp2:3xHA mittels Medienwechsel induziert. **B) Boxplot der Abstände zwischen den Gipfeln der Hdp2 peaks.** Zur Berechnung wurden 82 Gene ausgewählt, deren Promotoren mit Hdp2:3xHA in axenischer Kultur sowie *in planta* angereichert werden konnten. Dabei hatte jeder Promotor einen einzigen *peak* je Kondition mit einem *pz-score* > 150. Anschließend wurde der Abstand zwischen den Gipfeln der *peaks* ermittelt. Für den *in planta* Wert (weiß) wurden die beiden biologischen Duplikate der ChIP-Seq *in planta* miteinander verrechnet. Für den axenischen Wert (grau) wurde eines der Duplikate der ChIP-Seq *in planta* mit der ChIP-Seq axenisch verrechnet. **C) Visuelle Darstellung der Hdp2 Bindung *in planta* und axenisch.** Hdp2:3xHA axenisch (orange) zeigt die Anreicherung von Hdp2:3xHA im Stamm UJU2 in der jeweiligen Promotorregion. Hdp2:3xHA *in planta* (grün) zeigt die Anreicherung von Hdp2:3xHA *in planta* 7 dpi (UMJ14 x UMJ15) in der jeweiligen Promotorregion. *Reads* wurden mit Bowtie2 version 2.0.0-beta7 (Langmead und Salzberg, 2012) auf das *U. maydis* Genom (Ensembl Genomes 33 (Kersey *et al.*, 2018)) aligniert. Zur visuellen Darstellung der *reads* wurde der Generic Genome Browser Version 2.33 verwendet. Profile von *peaks* sind repräsentiert durch normalisierte *read counts*. Datensatz Hdp2:3xHA axenisch aus Ulrich, 2020.

#### 2.2.4 Hdp2 Konsensussequenz

Eine Konsensussequenz für Hdp2 konnte bereits ermittelt werden (Ulrich, 2020). Die genutzten Daten basieren jedoch auf *in vitro* durchgeführten ChIP-Seq Analysen. Dabei wurde *hdp2* direkt über den *crg1* Promotor induziert, der eine sehr starke Induktion vermittelt, was in einer Überexpression und schließlich einer höheren Proteinabundanz resultiert. Eine höhere Proteinkonzentration kann dazu führen, dass Hdp2 an weniger affine Sequenzmotive bindet, die unter physiologischen Konditionen nicht gebunden werden. Da die ChIP-Seq Analysen dieser Arbeit mit nativer *hdp2* Expression und im natürlichen Kontext erfolgten, sollte mit den generierten Daten das Bindemotiv verifiziert werden.

Für die Identifizierung von Hdp2 Bindemotiven *in planta* wurden die Sequenzen der *peaks* mit STREME (Sensitive, Thorough, Rapid, Enriched Motif Elicitation) (Bailey, 2021), FIMO (Find Individual Motif Occurrences) (Grant *et al.*, 2011) und CentriMo (Local Motif Enrichment Analysis) (Bailey und Machanick, 2012) der MEME-Suite analysiert. Für STREME wurden *peaks* verwendet, die in beiden biologischen Duplikaten vorhanden waren, einen *pz-score* > 150 aufwiesen und nicht mit Biz1:3xHA *peaks* überlappten. Als Input dienten 376 bp lange Sequenzen um die Maxima der ausgewählten *peaks*. Als Kontrolle wurden zufällig 376 bp lange Sequenzen aus Promotoren von Genen ausgewählt, die weder Hdp2 oder Biz1 *peaks* besitzen noch während der biotrophen Phase differenziell reguliert sind. Das ermittelte 7 bp Motiv ( $p$ -Wert:  $6,5 \times 10^{-3}$ ) ähnelt dem, das basierend auf der ektopischen Expression von Hdp2 unter axenischen Bedingungen identifiziert werden konnte (Abbildung 2.15 A) (Ulrich, 2020). Auch die CentriMo Analyse ergab, dass das Motiv in den vorgelegten Sequenzen zentral angereicht ist (Abbildung 2.15 B,  $p$ -Wert:  $3 \times 10^{-4}$ ). Eine zentrale Anreicherung des Bindemotivs ist ein weiteres Indiz dafür, dass es sich hierbei um ein *bona fide* Motiv handelt. Mittels FIMO wurde anschließend untersucht, wie häufig das identifizierte Motiv als *best match* in intergenischen Bereichen von *U. maydis* vorkommt. Insgesamt kommt das *best match* Motiv in 936 Promotoren mindestens einmal vor. Davon können 287 mit Hdp2:3xHA *in planta* angereichert werden ( $p$ -Wert:  $2,37 \times 10^{-58}$ ), was 42 % aller Hdp2:3xHA angereicherten Promotoren entspricht.

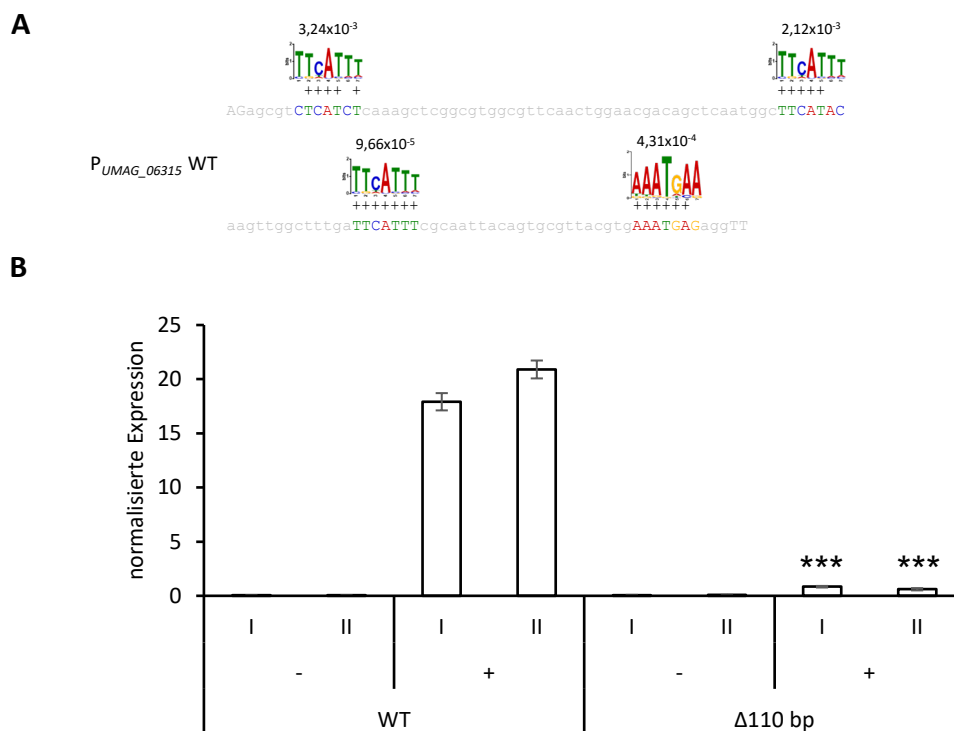




**Abbildung 2.15: A) Hdp2 Konsensussequenz.** Die Konsensussequenz wurde mit STREME erstellt und ist als *position weight matrix* dargestellt. Diese gibt die Wahrscheinlichkeit für das Vorkommen eines Nukleotids innerhalb der Konsensussequenz an, repräsentiert durch die Höhe der Darstellung des jeweiligen Nukleotids bezogen auf das gesamte Motiv. Als Input dienten 376 bp lange Sequenzen um die Maxima der Hdp2:3xHA *peaks* (*cookie cuts*), die in beiden biologischen Duplikaten präsent sind, einen *pz-score* > 150 haben und nicht mit Biz1:3xHA *peaks* überlappen. Als Kontrolle dienten zufällig ausgewählte 376 bp lange Sequenzen aus Promotoren von Genen, die weder Hdp2 oder Biz1 *peaks* besitzen noch während der biotrophen Phase differenziell reguliert sind. Der über dem Motiv angegebene *p*-Wert basiert auf dem exakten Fischer-Test, der berechnet, ob das Motiv in den Input Sequenzen im Vergleich zu den Kontrollsequenzen angereichert ist. **B) Motiv-Wahrscheinlichkeits-Diagramm.** Angegeben ist die Wahrscheinlichkeit an welcher Position das Motiv innerhalb der *cookie cuts* relativ zum Maximum vorkommt. Der *p*-Wert gibt die Signifikanz der zentralen Anreicherung an. Die Berechnung erfolgte mit Hilfe von CentriMo und es wurden dieselben Input Sequenzen wie für STREME verwendet.

Die hier gezeigten Ergebnisse stimmen, bezüglich des Konsensusmotivs, mit den Daten aus Ulrich, 2020 überein. Um nun die Funktionalität der Bindung von Hdp2 an der identifizierten Konsensussequenz zu verifizieren, wurden Reporterassays mit dem Promotor des Gens *UMAG\_06315* durchgeführt. Die Bindung von Hdp2 am *UMAG\_06315*-Promotor konnte bereits mehrfach gezeigt werden (2.2.2; Abbildung 6.4, Anhang). Zudem scheint *hdp2* notwendig und ausreichend für die Expression von *UMAG\_06315* zu sein (Abbildung 2.13). Allerdings bindet Hdp2:3xHA in axenischer Kultur an einer anderen Position innerhalb des Promotors als *in planta*. Eine FIMO Analyse ergab, dass sich mehrere Konsensusmotive im Promotor von *UMAG\_06315* befinden; unter anderem zwei 199 bp voneinander entfernt liegende *best match* Motive (AAATGAA), eines davon im axenischen *peak* und eines im *peak* der *in planta* ChIP-Seq. In Abbildung 2.16 A ist ein Ausschnitt aus dem Promotor von *UMAG\_06315* gezeigt. Der Ausschnitt befindet sich ungefähr in der Mitte des axenischen *peaks* und zeigt vier unterschiedlich stark konservierte Konsensusmotive mit den jeweiligen *p*-Werten. Für die Reporterassays wurde ein 955 bp langes Promotorfragment, in dem die vier gezeigten Konsensusmotive enthalten sind, vor GFP kloniert und in den *ip*-Locus von *U. maydis* eingebracht. Im generierten Stamm UTab4 (*a2 b2 P<sub>crg1</sub>:hdp2 ip'[P<sub>UMAG\_06315</sub>:GFP]ip<sup>s</sup>*) kann durch Wechsel der Kohlenstoffquelle *hdp2* direkt induziert werden. Nach fünfstündiger Induktion und anschließender qRT-PCR konnte die Transkriptmenge des GFP-Reporters bestimmt werden.

UTaB4 wurde dabei mit UTaB5 (*a2 b2 P<sub>crq1:hdp2 ip'</sub>[P<sub>UMAG\_06315Δ110bp</sub>:GFP]ip<sup>s</sup>*) verglichen, bei dem 110 bp deletiert wurden, in denen sich die Konsensusmotive befinden. Betrachtet man die Ergebnisse der qRT-PCR, erkennt man, dass die Expression von GFP in der Deletion signifikant reduziert ist (Abbildung 2.16 B). Induktionskontrollen zeigten, dass die *P<sub>crq1:hdp2</sub>* und native *UMAG\_06315* Expression in beiden Stämmen und Duplikaten ungefähr gleich war (Abbildung 6.5, Anhang). Beim Wildtyp (UTaB4) ist nach *hdp2* Induktion in beiden biologischen Duplikaten eine starke GFP Expression zu sehen, während die Deletion (UTaB5) 25-mal weniger GFP Transkript aufweist. Zum einen zeigt dies, dass das 955 bp lange Promotorfragment von *UMAG\_06315* im *ip*-Locus funktionell ist und zum anderen, dass die Deletion der vier Hdp2 Konsensusmotive die Bindung und damit die *hdp2*-abhängige Expression verhindert. Die Ergebnisse sind ein weiterer Hinweis dafür, dass es sich bei *UMAG\_06315* um ein direktes Hdp2 Zielgen handelt und dass das vorhergesagte Hdp2 Konsensusmotiv eine funktionelle Notwendigkeit für die Expression darstellt.



**Abbildung 2.16: A) Verteilung der Hdp2-Konsensussequenzen im Promotor von *UMAG\_06315*.** Dargestellt ist ein Ausschnitt des *UMAG\_06315* Promotors mit vier unterschiedlich stark konservierten Bindemotiven von Hdp2. Die Übereinstimmung der einzelnen Basen zum Motiv wird als + angegeben. Die Kleinbuchstaben entsprechen dem Bereich, der in UTaB5 deletiert wurde. **B) qRT-PCR von GFP im *UMAG\_06315* Promotor Assay.** Zu sehen ist die normalisierte Expression ( $\Delta$ Ct) von GFP in UTaB4 (*a2 b2 P<sub>crq1:hdp2 ip'</sub>[P<sub>UMAG\_06315</sub>:GFP]ip<sup>s</sup>*) (WT) und UTaB5 (*a2 b2 P<sub>crq1:hdp2 ip'</sub>[P<sub>UMAG\_06315Δ110bp</sub>:GFP]ip<sup>s</sup>*) ( $\Delta$ 110 bp) unter nicht induzierten (-) und induzierten (+) Konditionen. Zur Normalisierung diente das Gen *eIF2B*. Das Experiment wurde in biologischen Duplikaten (I, II) mit jeweils technischen Duplikaten durchgeführt. Dargestellt sind die Mittelwerte der technischen Replikate. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung der Mittelwerte der technischen Duplikate. Statistische Signifikanz wurde mit dem studentsche *t*-Test ermittelt. \*\*\* *p*-Wert  $\leq 0,001$

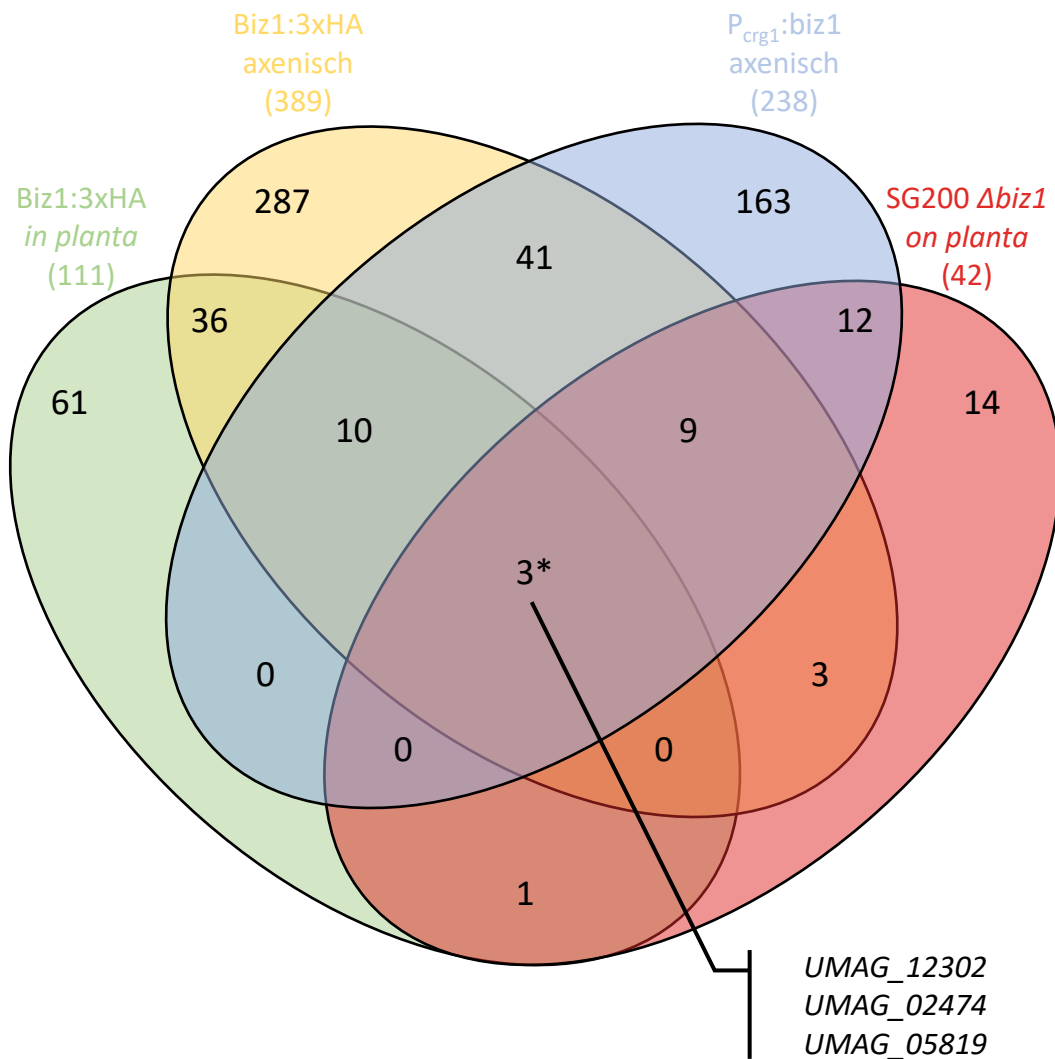
### 2.2.5 Biz1 Bindung und Regulation von Zielgenen

Neben *hdp2* ist *biz1* ebenfalls an der Kontrolle von *rbf1*-regulierten Genen beteiligt. Es ist bereits bekannt, dass *biz1* essenziell für die Pathogenität ist, da die Deletion zu einer drastischen Reduktion der Appressorienbildung führt (Flor-Parra *et al.*, 2006). Obwohl *biz1* *rbf1*-abhängig reguliert wird, handelt es sich nicht um ein direktes *rbf1* Zielgen (Ulrich, 2020). Dennoch sollte die Rolle von *biz1* in der frühen pathogenen Entwicklung, hinsichtlich Aufrechterhaltung und Weiterführung der *b*-vermittelten Signalkaskade untersucht werden. In (Ulrich, 2020) und 2.2.1 wurde bereits gezeigt, dass Biz1 und Rbf1 teilweise an dieselben Promotoren binden; zumindest unter axenischen Bedingungen, *in planta* hingegen konnte kaum ein Überlapp zu Rbf1-angereicherten Promotoren gezeigt werden. Dies kann auf die geringe Qualität der ChIP-Seq Analyse von Biz1:3xHA zurückzuführen sein und resultiert durch die geringe Anzahl an identifizierten Genen womöglich auch in einer ergebnislosen GO Analyse. Somit konnten auf Grundlage dieser Daten keine Rückschlüsse auf die Funktion oder Lokalisation der Genprodukte etwaiger Zielgene gezogen werden.

In Bezug auf die Regulation der identifizierten Gene wurde eine Einteilung in die Cluster aus Lanver *et al.*, 2018 vorgenommen. Die 111 Gene, deren Promotoren mit Biz1:3xHA angereichert werden konnten, können in lediglich zwei Cluster eingeteilt werden. 46 Gene lassen sich dem *cyan* ( $p$ -Wert:  $8,87 \times 10^{-16}$ ) und 25 dem *magenta* ( $p$ -Wert:  $3,37 \times 10^{-04}$ ) Cluster zuteilen. Beide Cluster haben ein vergleichbares Expressionsprofil mit dem Unterschied, dass das *cyan* Cluster einen Tag später aktiv wird. Ähnlich wie bei Hdp2, werden demnach mehr als 60 % der Gene, deren Promotor von Biz1:3xHA gebunden wird, mit Etablierung der biotrophen Phase induziert und deren Expression bis zur Sporulation aufrechterhalten.

Um eine Aussage über *biz1* Zielgene treffen zu können, wurden Microarrays von *biz1*-abhängigen Genen (M. Vraneš, unveröffentlicht) mit ChIP-Seq Daten abgeglichen. Für die Microarrays wurden die Stämme AB32 *P<sub>crg1</sub>:biz1* (*a2 P<sub>crg1</sub>:bW2, bE2 ip<sup>r</sup>[P<sub>crg1</sub>:biz1]ip<sup>s</sup>*) und SG200  $\Delta$ *biz1* (*a1:mfa2 bE1 bW2  $\Delta$ biz1*) verwendet, die es erlauben differenziell regulierte Gene in An- und Abwesenheit von *biz1* zu identifizieren. In AB32 *P<sub>crg1</sub>:biz1* kann in axenischer Kultur *biz1* direkt über einen Medienwechsel induziert werden, während die Stämme SG200 und SG200  $\Delta$ *biz1* verglichen wurde, um zu ermitteln welche Gene durch die Deletion 16 h *on planta* nicht mehr exprimiert werden. Die Gegenüberstellung der Microarrays und ChIP-Seq Analysen ist als Venn-Diagramm in Abbildung 2.17 dargestellt. Aufgrund der geringen Datenmenge, die die ChIP-Seq aus der Pflanze generierte, fallen die Schnittmengen mit den übrigen Datensätzen verhältnismäßig klein aus. Vergleicht man die Microarrays miteinander, findet man 24 Gene, bei denen *biz1* notwendig und ausreichend für die Expression ist. Unter diesen Genen befinden sich neben Endoglukanasen auch Gene aus dem *mig*-Cluster.

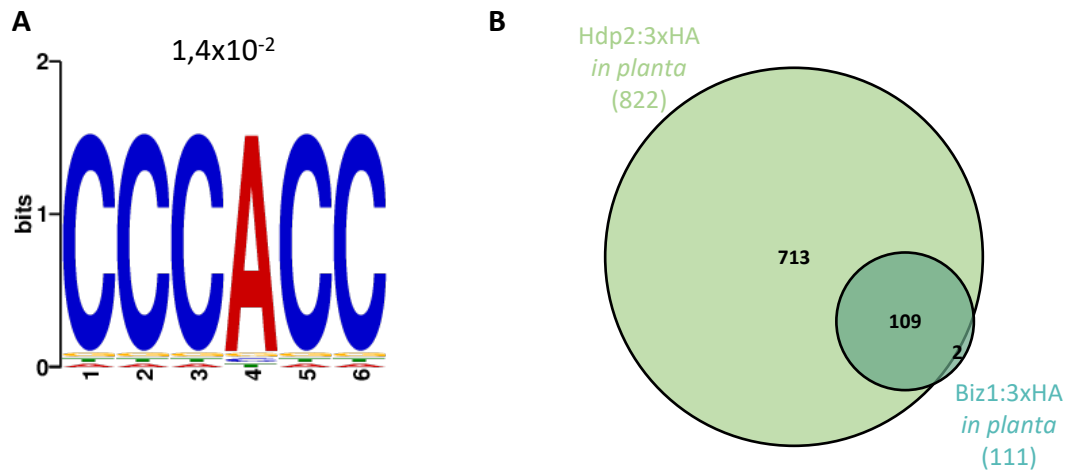
Die ChIP-Seq Daten zeigen, dass Biz1:3xHA in der Lage ist die Promotoren von 49 Genen *in planta* und *in vitro* anzureichern. Werden Bindung und Regulation gemeinsam betrachtet, können 63 (axenisch) bzw. 13 (*in planta*) Promotoren von Genen angereichert werden, die nach *biz1* Induktion exprimiert werden. Die 13 Gene der *in planta* ChIP sind dabei auch Teil der axenischen ChIP. Von den Genen, die sich in dieser Gruppe befinden ist neben den Genen für bekannte Effektoren *stp1*, *cmu1* und *pep1* vor allem *hdp2* von besonderem Interesse und wird daher im nächsten Kapitel ausführlicher untersucht. Die drei Gene *UMAG\_12302*, *UMAG\_02474* und *UMAG\_05819* lassen sich als einzige in allen Konditionen wieder finden und sind damit sehr wahrscheinlich direkte Ziele von Biz1.



**Abbildung 2.17: Venn-Diagramm der Gene, die *biz1*-abhängig reguliert werden und deren Promotoren mit Biz1:3xHA angereichert werden konnten.** Biz1:3xHA *in planta* beinhaltet 111 Gene, deren Promotoren mit Biz1:3xHA 7 dpi *in planta* angereichert werden konnten (diese Arbeit). Pflanzen wurden mit einer Kreuzung der Stämme UMJ28 x UMJ29 (*a1 b1 biz1:3xHA* x *a2 b2 biz1:3xHA*) inokuliert. Sieben Tage nach der Infektion wurden Proben entnommen. Biz1:3xHA axenisch beinhaltet 389 Gene, deren Promotoren mit Biz1:3xHA unter axenischen Bedingungen im Stamm UJU4 (*a2 Δb ip'[P<sub>crg1</sub>:biz1:3xHA]ip<sup>s</sup>*) angereichert werden konnten (Datensatz aus Ulrich, 2020). Promotoren können dabei mehr als einen *peak* beinhalten. Derselbe *peak* kann außerdem, im Fall von divergenten Promotoren, auf zwei Gene bezogen sein.  $P_{crg1}:biz1$  axenisch beinhaltet 238 Gene, die durch artifizielle Induktion von *biz1* unter axenischen Bedingungen im Stamm AB32  $P_{crg1}:biz1$  (*a2 P<sub>crg1</sub>:bW2, bE2 ip'[P<sub>crg1</sub>:biz1]ip<sup>s</sup>*) signifikant exprimiert werden (M. Vraneš, unveröffentlicht). SG200  $\Delta biz1$  *on planta* beinhaltet 42 Gene, deren Expression sich bei der Deletion von *biz1* im Stamm SG200  $\Delta biz1$  (*a1:mfa2 bE1 bW2 Δbiz1*) 16 hpi signifikant ändert (M. Vraneš, unveröffentlicht). Die Schnittmenge 3\* ist weiter aufgeschlüsselt und beinhaltet Gene, die in allen Konditionen vorkommen.

## 2.2.6 Biz1 Konsensussequenz

Ein Bindemotiv für Biz1 wurde bereits bioinformatisch bestimmt (Finkernagel, 2006) und experimentell mittels CHIP-Seq nachgewiesen (Ulrich, 2020). In beiden Arbeiten stützt sich die Analyse auf Datensätze, die unter axenischen Bedingungen generiert wurden. In Anbetracht der bereits beschriebenen Problematik, sollte das Bindemotiv mit Daten aus CHIP-Seq Analysen *in planta* bestätigt werden. Für die Untersuchung wurde, wie auch für Hdp2, STREME, FIMO und CentriMo verwendet. Als Input dienten 380 bp lange Sequenzen um die Maxima aller Biz1:3xHA *peaks*, die in beiden biologischen Duplikaten präsent waren und den gesetzten Kriterien entsprachen (Kapitel 4.6). Als Kontrolle wurden zufällig 376 bp lange Sequenzen aus Promotoren von Genen ausgewählt, die weder Hdp2 oder Biz1 *peaks* besitzen noch während der biotrophen Phase differenziell reguliert sind. Das ermittelte 6 bp lange Motiv ( $p$ -Wert:  $1,4 \times 10^{-2}$ ) entspricht dabei der bereits bestimmten Konsensussequenz (Finkernagel, 2006; Ulrich, 2020) (Abbildung 2.18 A). Insgesamt konnte das Bindemotiv in 1927 Promotoren mindestens einmal nachgewiesen werden. Von den 89 Promotoren die mit Biz1:3xHA angereicht werden konnten, enthalten 67 das Motiv als *best match* ( $p$ -Wert:  $1,82 \times 10^{-13}$ ). Allerdings konnte mittels CentriMo keine zentrale Anreicherung festgestellt werden. Mit Hilfe der STREME Analyse wurden Bindemotive gefunden, welche dem Motiv von Hdp2 deutlich ähneln ( $p$ -Wert:  $1,9 \times 10^{-2}$ ) (Daten nicht gezeigt). Ein außergewöhnlich hoher Anteil dieser Promotoren wurden ebenfalls von Hdp2 gebunden, was diese Beobachtung erklären könnte. 98 % der Gene, deren Promotoren mit Biz1:3xHA *in planta* angereichert werden konnten, wurden auch von Hdp2:3xHA *in planta* gebunden (Abbildung 2.18 B). Die Abstände der ermittelten *peak* Maxima zwischen Hdp2:3xHA und Biz1:3xHA wichen dabei kaum voneinander ab. (Abbildung 6.6, Anhang). 29 der 109 Gene enthalten zusätzlich das Hdp2 Bindemotiv (Kapitel 2.2.4) als *best match* im Promotor. Dies lässt vermuten, dass Biz1 und Hdp2 möglicherweise miteinander interagieren und gemeinsam an Promotoren binden. Vorläufige *in vitro* Co-Immunopräzipitationen der beiden Transkriptionsfaktoren konnten allerdings keine Protein-Protein-Interaktion zeigen (Daten nicht gezeigt).



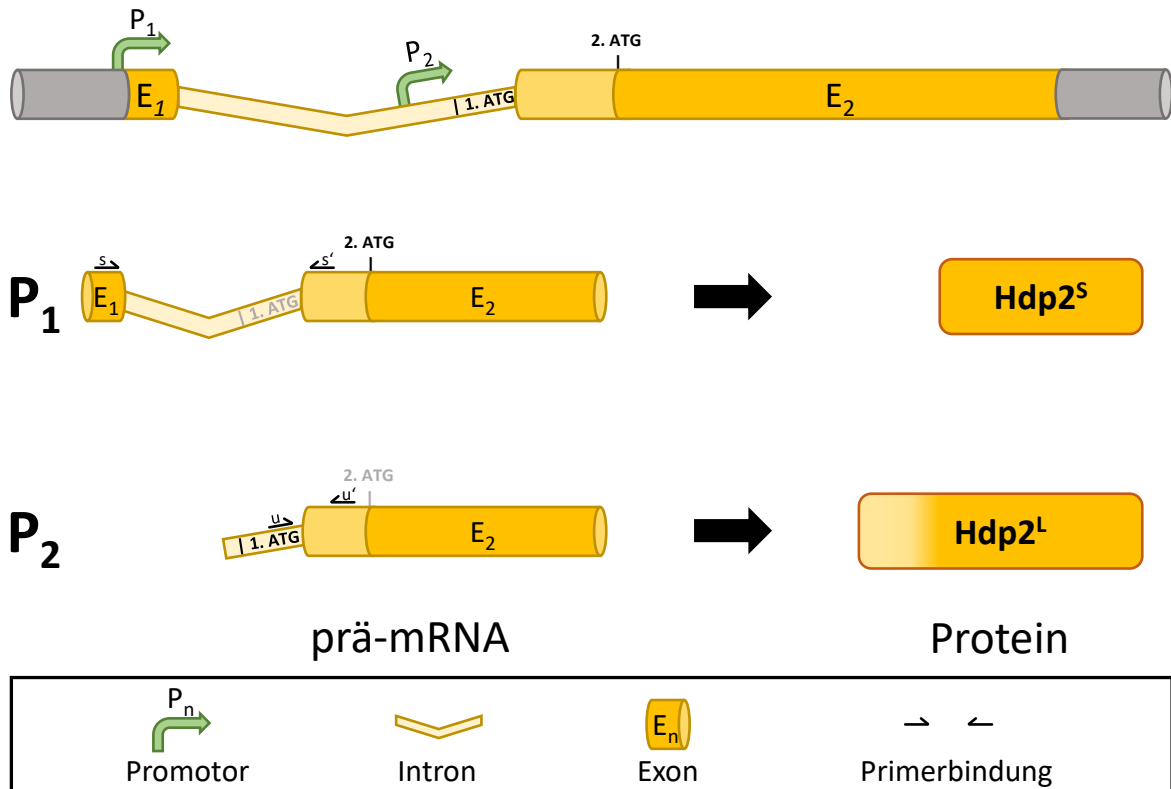
**Abbildung 2.18: A) Biz1 Konsensussequenz.** Die Konsensussequenz wurde mit STREME erstellt und ist als *position weight matrix* dargestellt. Diese gibt die Wahrscheinlichkeit für das Vorkommen eines Nukleotids innerhalb der Konsensussequenz an, repräsentiert durch die Höhe der Darstellung des jeweiligen Nukleotids bezogen auf das gesamte Motiv. Als Input dienen 380 bp lange Sequenzen um die Maxima der Biz1:3xHA *peaks* (*cookie cuts*), die in beiden biologischen Duplikaten präsent waren. Als Kontrolle dienen zufällig ausgewählte 376 bp lange Sequenzen aus Promotoren von Genen, die weder Hdp2 oder Biz1 *peaks* besitzen noch während der biotrophen Phase differenziell reguliert sind. Der über dem Motiv angegebene *p*-Wert basiert auf dem exakten Fischer-Test, der berechnet, ob das Motiv in den Input Sequenzen im Vergleich zu den Kontrollsequenzen angereichert ist. **B) Venn-Diagramm der gemeinsamen Bindung von Biz1:3xHA und Hdp2:3xHA.** Hdp2:3xHA *in planta* (UMJ14 x UMJ15; a1 b1 hdp2:3xHA x a2 b2 hdp2:3xHA) vs. Biz1:3xHA *in planta* (UMJ28 x UMJ29; a1 b1 biz1:3xHA x a2 b2 biz1:3xHA). Die Zahlen beziehen sich auf Gene, deren Promotoren mit dem jeweiligen Transkriptionsfaktor 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.

Die Ergebnisse legen nahe, dass Hdp2 und Biz1 Rbf1, bezüglich der Rolle als Masterregulator der *b*-vermittelten Signalkaskade, *in planta* ablösen. Sie scheinen nicht nur die Expression von *rbf1*-regulierten Genen aufrechtzuerhalten und die Expression von pathogenitätsrelevanten Effektoren zu steuern, sondern integrieren sich auch als nächste Stufe in die Signalkaskade, indem sie diese durch die Regulation weiterer Transkriptionsfaktoren weiterführen. Beide werden jedoch selbst *rbf1*-abhängig reguliert und es stellt sich die Frage, wie deren Expression nach Repression von *rbf1* beibehalten wird.

### 2.3 Regulation von *hdp2*

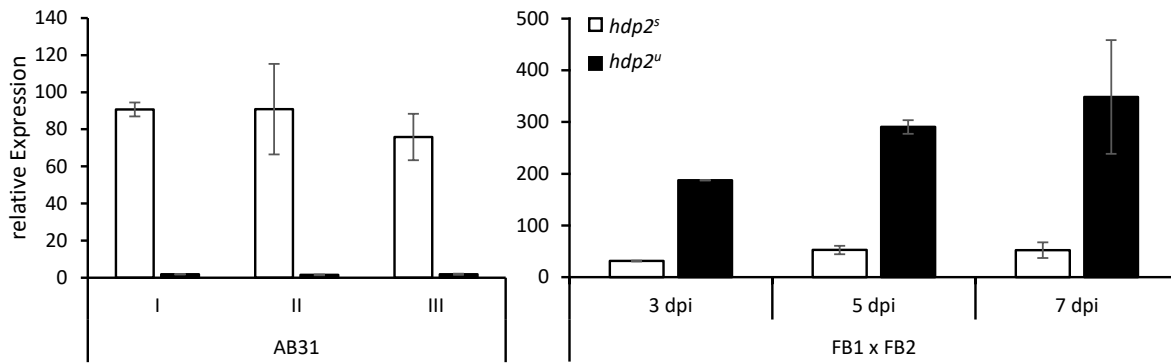
Die Relevanz des Homeodomänentranskriptionsfaktor Hdp2 für die biotrophe Phase von *U. maydis* hat sich bereits in Vorarbeiten erwiesen. Dabei konnte eine Funktion bei der Appressorienbildung beschrieben werden, die ausbleibt sobald *hdp2* deletiert wird und somit zum Verlust der Pathogenität führt (Heimel *et al.*, 2010b; Lanver *et al.*, 2014). Expressionsanalysen weisen jedoch auf weitere wichtige Funktionen während der pathogenen Entwicklung hin. So wird insbesondere die Expression von Effektoren wie *pit1*, *pit2* und *cmu1* von Hdp2 kontrolliert (M. Vraneš, unveröffentlicht). Die Expression von *hdp2* wird *rbf1*-abhängig gesteuert (Heimel *et al.*, 2010b; Ulrich, 2020) und kann bereits zwölf Stunden nach der Pflanzeninfektion nachgewiesen werden (Lanver *et al.*, 2018). Da die Expression kontinuierlich bis zum Maximum bei 8 dpi steigt und anschließend weiterhin bestehen bleibt, spricht dies für die Notwendigkeit der Hdp2 Funktion während der gesamten Infektion. Die zentrale Fragestellung hierbei, ist, wie die Regulation von *hdp2* aufrecht erhalten wird, zu einem Zeitpunkt, an dem *rbf1* bereits nicht mehr aktiv ist. In Vorarbeiten (Jurca, 2017) wurde ein neues Genmodell von *hdp2* präsentiert und gezeigt, dass die Expression über zwei verschiedene Promotoren gesteuert wird, wodurch zwei Transkripte entstehen, die sich in ihrer RNA-Prozessierung unterscheiden (Abbildung 2.19). Die Verwendung zweier Promotoren könnte die Fragestellung klären, da dadurch ein nahtloser Übergang der Signaltransduktion garantiert wird. Dabei konnte gezeigt werden, dass der *upstream* gelegene Promotor ( $P_1$ ) ein Transkript generiert (*hdp2<sup>s</sup>*), welches aus einem 5'-Exon ( $E_1$ ), einem Intron und einem zweiten Exon ( $E_2$ ) besteht. Nach dem Spleißen des Introns dienen das 5'-Exon ( $E_1$ ) und Teile des  $E_2$  als 5'-UTR; das ATG liegt 147 bp hinter der 3'-Spleißstelle, was in einem 1029 Aminosäuren langen Protein resultiert (Hdp2<sup>s</sup>). Der zweite Promotor ( $P_2$ ) befindet sich hingegen im Intron von *hdp2*, wodurch der Spleißvorgang nicht mehr stattfinden kann und ein kürzeres Transkript entsteht (*hdp2<sup>u</sup>*). Allerdings kann dadurch ein ATG als Startcodon bei der Translation genutzt werden, welches sich 18 bp vor der 3'-Intron/Exon-Grenze befindet und *in frame* zum 2. ATG ist. Folglich dient die ein Teil von  $E_2$  nicht mehr als 5'-UTR, sondern wird stattdessen translatiert, was in einem 55 Aminosäuren längeren Protein resultiert (Hdp2<sup>l</sup>).





**Abbildung 2.19: Schematische Darstellung des *hdp2*-Locus und der Genprodukte.** Der *hdp2*-Locus besteht aus den Exons  $E_1$  und  $E_2$ , einem Intron und einer Region, die entweder als 5'-UTR dient oder translatiert wird. Zudem existieren zwei *in frame* Translationsstartpunkte. Welches der beiden Startcodons genutzt wird hängt davon ab, ob  $P_1$  oder  $P_2$  als Promotor verwendet wird.  $P_1$  befindet sich vor  $E_1$  und bildet eine prä-mRNA die aus den beiden Exons und dem Intron besteht. Nach Spleißen des Introns, geht das 1. ATG als Start verloren und  $E_1$  und ein Teil von  $E_2$  dienen als 5'-UTR. Somit entsteht ein 1029 Aminosäuren langes Protein ( $Hdp2^S$ ). Der Transkriptionsstart von  $P_2$  befindet sich im Intron, wodurch kein Spleißvorgang an der prä-mRNA stattfinden kann. Dadurch kann das 1. ATG als Translationsstart genutzt werden. Dies resultiert in einem 55 Aminosäuren längeren Protein ( $Hdp2^L$ ), da ein Teil von  $E_2$  ebenfalls translatiert wird (modifiziert nach Jurca, 2017).

Wie die beiden Promotoren angesteuert werden hängt von der jeweiligen Kondition ab. Ein aktives b-Heterodimer ist hierbei in der Lage das Transkript (*hdp2<sup>S</sup>*) von  $P_1$  aus zu induzieren (Jurca, 2017). Das kürzere Transkript ohne Intron (*hdp2<sup>u</sup>*) konnte dagegen nur *in planta* nachgewiesen werden. Zur Bestätigung der Ergebnisse wurde das Experiment wiederholt. Hierzu wurde der Stamm AB31 ( $\alpha 2 P_{crg1}:bW2, bE1$ ) verwendet, der es erlaubt, ein aktives b-Heterodimer durch den Wechsel der Kohlenstoffquelle zu induzieren. Als Vergleich diente eine Pflanzeninfektion mit der Kreuzung aus FB1 ( $\alpha 1 b1$ ) x FB2 ( $\alpha 2 b2$ ). Die Expression beider Transkripte wurde anschließend mittels qRT-PCR in AB31 und FB1 x FB2 gemessen. Damit *hdp2<sup>S</sup>* und *hdp2<sup>u</sup>* zu unterscheiden sind, wurden zwei verschiedene Primerpaare verwendet. Um *hdp2<sup>S</sup>* nachweisen zu können, wurde der *forward* Primer so ausgewählt, dass die Bindung nur beim gespleißten Transkript erfolgen kann (s in Abbildung 2.19). Der Primer für *hdp2<sup>u</sup>* bindet hingegen 26 bp vor dem Intron/Exon-Übergang (u in Abbildung 2.19).



**Abbildung 2.20: Die Expression beider *hdp2* Transkripte kann nur *in planta* beobachtet werden.** Zu sehen ist die relative Expression ( $\Delta\Delta Ct$ ) von *hdp2<sup>s</sup>* und *hdp2<sup>u</sup>* in AB31 (*a2 P<sub>crg1</sub>:bw2, bE1*) und einer FB1 x FB2 (*a1 b1 x a2 b2*) Kreuzung 3, 5 und 7 Tage nach der Infektion. Zur Normalisierung diente das Gen *elF2B*. Die Berechnung erfolgte bei AB31 relativ zur jeweiligen nicht induzierten Probe, bei FB1 x FB2 erfolgte sie relativ zu FB2 in Minimalmedium. Das Experiment wurde in biologischen Triplikaten mit jeweils technischen Duplikaten durchgeführt. Bei AB31 sind die Mittelwerte der technischen Duplikate aller biologischen Replikate (I, II, III) dargestellt. Bei FB1 x FB2 sind die Mittelwerte der biologischen Triplikate zum jeweiligen Zeitpunkt dargestellt. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung der Mittelwerte der technischen Duplikate (AB31) bzw. biologischen Triplikate (FB1 x FB2).

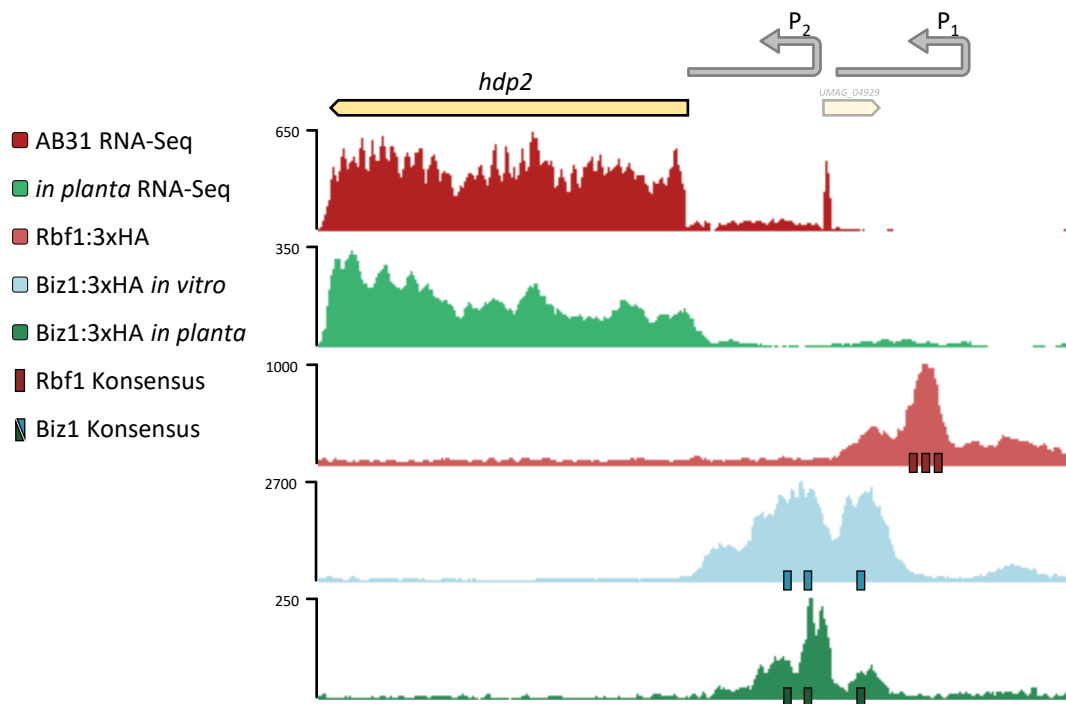
Die Ergebnisse der qRT-PCR veranschaulichen die Expression der beiden *hdp2* Transkripte (Abbildung 2.20). Nach fünfstündiger *b*-Induktion in AB31 ist die Expression von *hdp2<sup>s</sup>* um mindestens das 75-fache im Vergleich zum nicht induzierten Zustand gestiegen. Bei FB1 x FB2 ist die Induktion von *hdp2<sup>s</sup>* zwar nicht so stark wie bei AB31, insgesamt besitzt die Kreuzung aber eine höhere Transkriptmenge (Daten nicht gezeigt). Das entscheidende Ergebnis dieser Versuchsreihe ist jedoch, dass die Expression von *hdp2<sup>u</sup>* nur *in planta* stattfindet und dass hierzu ein (zweiter) Promotor innerhalb des Introns nötig ist.

### 2.3.1 *hdp2* wird unabhängig von *rbf1* und *biz1* induziert

Die Rolle der *b*-Kaskade in der Regulation von *hdp2* ist evident. Aus vorherigen Arbeiten (Heimel *et al.*, 2010b; Ulrich, 2020) war nicht nur bekannt, dass *rbf1* notwendig und ausreichend für die Expression von *hdp2* ist, sondern dass Rbf1 auch am Promotor von *hdp2* bindet (Ulrich, 2020)<sup>6</sup>. Dies bot wichtige Anhaltspunkte für weitere Untersuchungen, um eine präzisere Aussage über die beteiligten Faktoren treffen zu können.

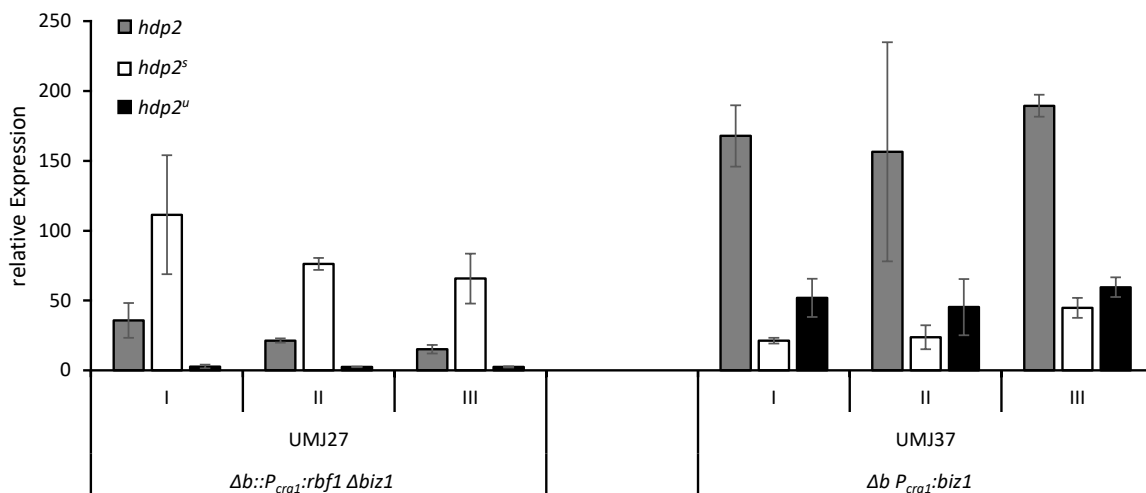
<sup>6</sup> Aus den gefilterten Datensätzen geht nicht hervor, dass *hdp2* (UMAG\_04928) einen Rbf1 *peak* oder eine Rbs im Promotor besitzt. Dies kann auf den falsch annotierten offenen Leserahmens von UMAG\_04929 zurückgeführt werden, wodurch keine automatische Zuweisung der Rbf1 *peaks* zu *hdp2* erfolgen konnte.

In Abbildung 2.21 ist die Rbf1 Bindung anhand eines eindeutigen *peak* in  $P_1$  zu erkennen. Zudem weist die DNA drei Rbf1-Bindemotive (*Rbs*) an dieser Position auf ( $p$ -Wert  $\leq 0,001$ ). Die Vermutung lag also nahe, dass Rbf1 ausschließlich für die Expression von *hdp2<sup>s</sup>* verantwortlich ist. Rbf1 scheint jedoch nicht für die Expression von *hdp2<sup>u</sup>* notwendig zu sein, da die *rbf1* und  $P_2$  Aktivität negativ korreliert ist und sich in  $P_2$  weder ein *peak* für die Rbf1 Bindung noch eine *Rbs* befindet. Demzufolge muss ein weiterer Faktor für die Expression von *hdp2<sup>u</sup>* zuständig sein. ChIP-Seq Daten (Ulrich, 2020; diese Arbeit) zeigten, dass Biz1 in der Lage ist, sowohl *in vitro* als auch *in planta* an beide *hdp2* Promotoren zu binden und dass sich in beiden *peaks* konservierte Biz1 Bindemotive (Finkernagel, 2006; Ulrich, 2020) ( $p$ -Wert  $\leq 0,0001$ ) befinden. Zudem zeigen Microarray Analysen eine *biz1*-abhängige *hdp2* Induktion (M. Vraneš, unveröffentlicht).



**Abbildung 2.21: Visuelle Darstellung der Rbf1 und Biz1 Bindung an den zwei *hdp2* Promotoren.** AB31 RNA-Seq (dunkelrot) stellt die Expression unter axenischen Bedingungen im Stamm AB31 ( $a2 P_{crg1}:bW2$ ,  $bE1$ ) nach *b*-Induktion dar (Datensatz aus Kellner *et al.*, 2014). *In planta* RNA-Seq (grün) stellt die Expression *in planta* bei 8 dpi dar (Datensatz aus Tollot *et al.*, 2016). Rbf1:3xHA (rot) zeigt die Anreicherung von Rbf1 im Stamm UDS5 ( $a2 P_{crg1}:bW2$ ,  $bE1 rbf1:3xHA$ ) an  $P_1$  von *hdp2* (Datensatz aus Ulrich, 2020). Biz1:3xHA *in vitro* (hellblau) zeigt die Anreicherung von Biz1 im Stamm UJU4 an  $P_1$  und  $P_2$  von *hdp2* (Datensatz aus Ulrich, 2020). Biz1:3xHA *in planta* (dunkelgrün) zeigt die Anreicherung von Biz1:HA *in planta* 7 dpi (UMJ28 x UMJ29;  $a1 b1 biz1:3xHA$  x  $a2 b2 biz1:3xHA$ ) in  $P_1$  und  $P_2$  von *hdp2*. UTMAG\_04929 ist durch Automation fälschlicherweise als offener Leseraster annotiert, stellt allerdings kein echtes Gen dar. Reads wurden mit Bowtie2 version 2.0.0-beta7 (Langmead und Salzberg, 2012) auf das *U. maydis* Genom (Ensembl Genomes 33 (Kersey *et al.*, 2018) aligniert. Zur visuellen Darstellung der reads wurde der Generic Genome Browser Version 2.33 verwendet. Profile von *peaks* sind repräsentiert durch normalisierte *read counts*.

Zur Überprüfung der Expression beider *hdp2* Transkripte wurden die Stämme UMJ27 ( $\alpha 2 \Delta b::P_{crg1}:rbf1 \Delta biz1$ ) und UMJ37 ( $\alpha 2 \Delta b P_{crg1}:biz1 ip^r[P_{hdp2-1854}:GFP]ip^s$ )<sup>7</sup> verwendet. Beide sind in der Lage in einem *b*-Deletionshintergrund *rbf1* bzw. *biz1* durch Wechsel der Kohlenstoffquelle zu induzieren. Da *biz1* ebenfalls *rbf1*-abhängig reguliert wird, wurde bei UMJ27 zusätzlich *biz1* deletiert, um eine *biz1*-abhängige *hdp2* Expression in diesem Stamm auszuschließen. Nach fünfstündiger Induktion mit jeweils drei biologischen Replikaten wurden qRT-PCR Analysen durchgeführt.



**Abbildung 2.22: Die Expression der *hdp2* Transkripte erfolgt nach *rbf1* oder *biz1* Induktion.** Zu sehen ist die relative Expression ( $\Delta\Delta Ct$ ) von *hdp2*, *hdp2<sup>s</sup>* und *hdp2<sup>u</sup>* in UMJ27 ( $\alpha 2 \Delta b::P_{crg1}:rbf1 \Delta biz1$ ) und UMJ37 ( $\alpha 2 \Delta b P_{crg1}:biz1 ip^r[P_{hdp2-1854}:GFP]ip^s$ ). Zur Normalisierung diente das Gen *eIF2B*. Die Berechnung erfolgte relativ zur jeweiligen nicht induzierten Probe. Das Experiment wurde in biologischen Triplikaten mit jeweils technischen Duplikaten durchgeführt. Dargestellt sind die Mittelwerte der technischen Duplikate aller biologischen Replikate (I, II, III). Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung der Mittelwerte der technischen Duplikate.

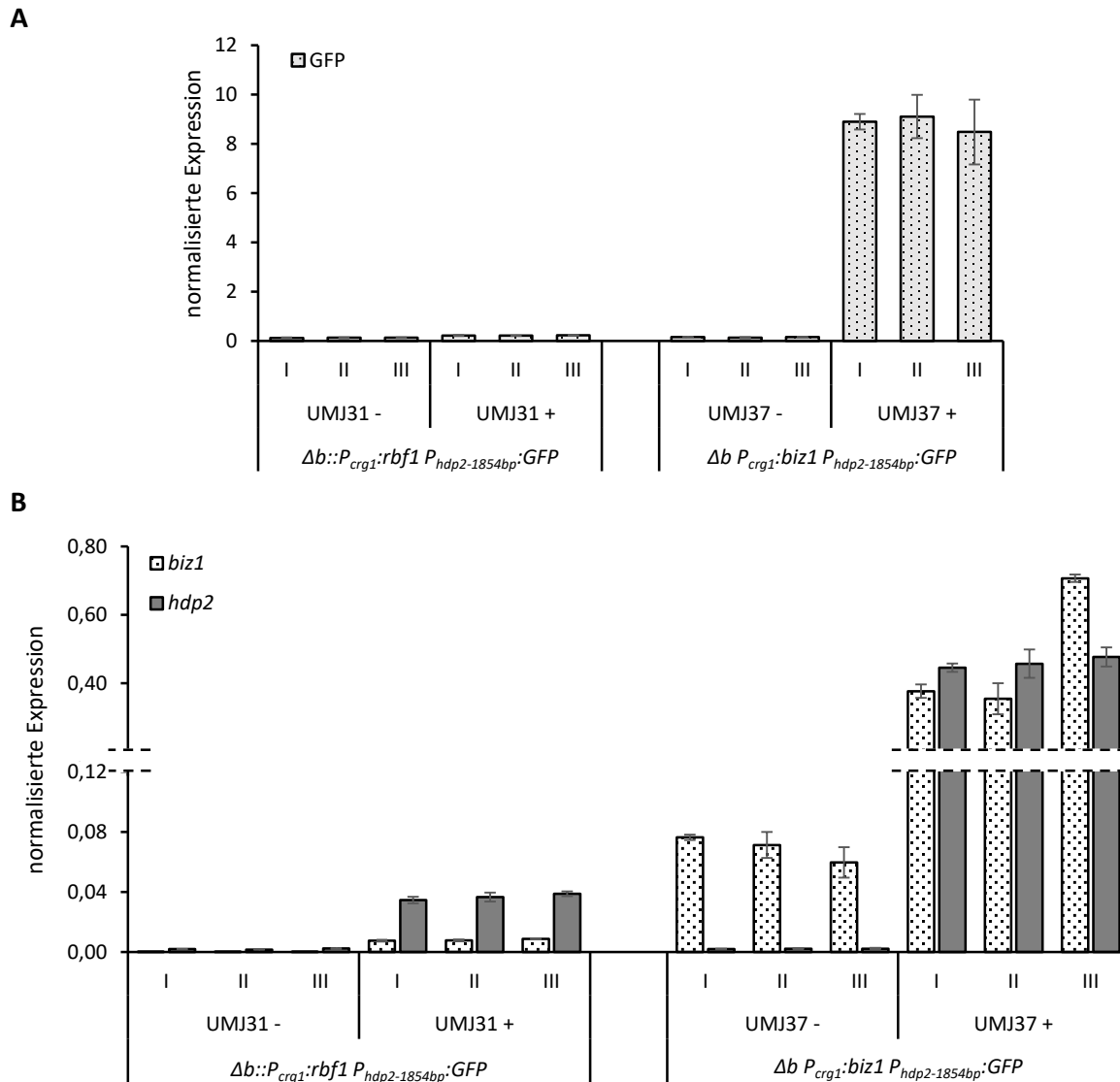
Durch eine qRT-PCR wurde die Expression der verschiedenen *hdp2* Transkripte nach *rbf1* bzw. *biz1* Induktion analysiert. Neben den spezifischen *hdp2<sup>s</sup>* und *hdp2<sup>u</sup>* Transkriptvarianten wurde mittels *hdp2* auch die Gesamtexpression von *hdp2* über beide Varianten gemessen. Da das Primerpaar am 3'-Ende bindet und somit beide Transkriptversionen amplifiziert, kann die Gesamtmenge an *hdp2* ermittelt werden. Dabei fällt auf, dass nach *biz1* Induktion *hdp2* stärker exprimiert wurde als nach *rbf1* Induktion. Außerdem führt die *Biz1* Induktion in UMJ37 zur Expression von *hdp2<sup>s</sup>* sowie *hdp2<sup>u</sup>*. Im Vergleich dazu wird in UMJ27 über *Rbf1* nur *hdp2<sup>s</sup>* exprimiert. Insofern bestätigen die Ergebnisse die Annahme, dass *Biz1* durch Wechseln des Promotors, die Expression von *hdp2* induziert, wenn *rbf1* nicht mehr exprimiert wird.

<sup>7</sup> UMJ37 hat zusätzlich im *ip*-Locus ein Reporterkonstrukt mit einem *hdp2* Promotorfragment. Dies ist jedoch hinsichtlich dieses Experiments irrelevant und sollte keine Auswirkungen darauf haben.

### 2.3.1.1 Die *biz1*-abhängige *hdp2* Expression ist mengenabhängig

Wie bereits gezeigt wurde (Abbildung 2.20), wird nach *b*-Induktion in AB31 nur *hdp2<sup>s</sup>* exprimiert. Gleichzeitig wird jedoch *biz1* induziert (Heimel *et al.*, 2010b; Ulrich, 2020), wodurch die Grundvoraussetzung für eine Expression von *hdp2<sup>u</sup>* ebenfalls gegeben sein sollte. Auch im Stamm CP27 (*α2 Δb::P<sub>crg1</sub>:rbf1*) kann nach direkter *rbf1* Induktion kein *hdp2<sup>u</sup>* nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Um auszuschließen, dass die gleichzeitige Bindung von Rbf1 und Biz1 die Expression von *hdp2<sup>u</sup>* nicht beeinträchtigt, wurden Stämme mit GFP-Reporterkonstrukten im *ip*-Locus ohne die Rbf1 Bindestelle verwendet. UMJ31 (*α2 Δb::P<sub>crg1</sub>:rbf1 ip<sup>r</sup>[P<sub>hdp2-1854</sub>:GFP]ip<sup>s</sup>*) und UMJ37 (*α2 Δb P<sub>crg1</sub>:biz1 ip<sup>r</sup>[P<sub>hdp2-1854</sub>:GFP]ip<sup>s</sup>*) besitzen jeweils ein 1854 bp langes Promotorfragment von *hdp2* (ab dem 1.ATG), welches lediglich den Teil von P<sub>1</sub> enthält, der von Biz1 gebunden wird. Dadurch sollte ausschließlich die *biz1*-abhängige Expression mittels qRT-PCR ermittelt werden. Der Einfluss von Rbf1 wirkt sich hierbei nur indirekt über die Induktion von *biz1* auf die *hdp2* Expression aus, da keine direkte Bindung von Rbf1 am *hdp2* Promotor stattfinden kann.

Abbildung 2.23 A zeigt die qRT-PCR nach fünfstündiger Induktion von UMJ31 und UMJ37. Es kann eindeutig nachgewiesen werden, dass GFP nur nach direkter *biz1* Induktion in UMJ37 vorhanden ist. Hierbei fällt vor allem auf, dass die *biz1* Menge in UMJ31 im induzierten Zustand weitaus geringer ausfällt als bei den nicht induzierten Proben von UMJ37 (Abbildung 2.23 B). Trotz höherer *biz1* Level im uninduzierten Zustand von UMJ37 findet dennoch keine *hdp2* Expression statt, wie sie nach *rbf1* Induktion in UMJ31 zu beobachten ist. Die *biz1* Menge in UMJ31 ist demnach nicht für die *hdp2* Expression ausreichend und verläuft in diesem Fall rein *rbf1*-abhängig. Somit scheint die *biz1*-abhängige *hdp2* Expression erst ab einem bestimmten Schwellenwert ausgelöst zu werden.

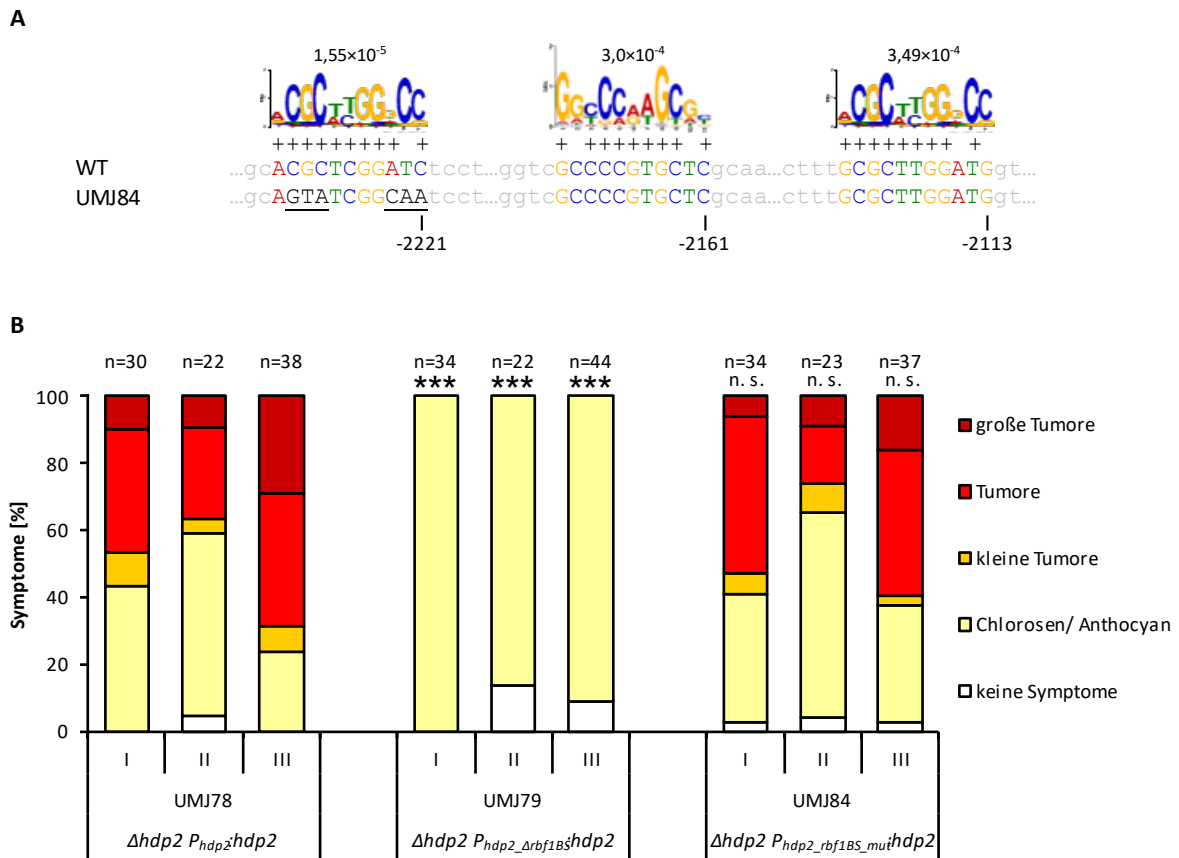


**Abbildung 2.23: Die *rbf1*-abhängige *biz1*-Induktion ist nicht ausreichend für die *hdp2* Expression.**  
**A) Expression des GFP-Reporters nach *rbf1* bzw. *biz1* Induktion.** Zu sehen ist die normalisierte Expression ( $\Delta Ct$ ) von GFP in UMJ31 ( $\alpha 2 \Delta b::P_{crg1}:rbf1 ip^r[P_{hdp2-1854}:GFP]ip^s$ ) und UMJ37 ( $\alpha 2 \Delta b P_{crg1}:biz1 ip^r[P_{hdp2-1854}:GFP]ip^s$ ).  
**B) Expression von *biz1* und *hdp2*, nach *rbf1* und *biz1* Induktion.** Zu sehen ist die normalisierte Expression ( $\Delta Ct$ ) von *biz1* und *hdp2* in UMJ31 und UMJ37. Zur Normalisierung diente das Gen *eIF2B*. Das Experiment wurde in biologischen Triplikaten mit jeweils technischen Duplikaten durchgeführt. Dargestellt sind die Mittelwerte der technischen Duplikate der induzierten (+) und nicht induzierten (-) biologischen Replikate (I, II, III). Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung der Mittelwerte der technischen Duplikate.

### 2.3.1.2 Die Deletion der Rbf1 Bindestellen im *hdp2* Promotor führt zum Verlust der Pathogenität

Da *hdp2* durch Rbf1 oder Biz1 induziert werden kann, sollte untersucht werden, ob die *biz1*-abhängige Regulation ausreichend ist oder ob die *rbf1*-abhängige Induktion eine Relevanz für die weitere pathogene Entwicklung hat. Hierfür wurden in  $\Delta hdp2$  Stämmen Komplementationen des offenen Leserahmens von *hdp2* mit unterschiedlichen Promotorlängen in den *ip*-Locus eingebracht, um anschließende Pathogenitätstests durchzuführen. Es wurde bereits gezeigt, dass für die ektopische Expression von *hdp2* ein Promotorfragment mit ca. 2500 bp (ab dem 1. ATG) ausreichend ist (Lanver *et al.*, 2014). Während in UMJ78 ( $a1 b1 \Delta hdp2 ip^r[P_{hdp2}:hdp2]ip^s$ ) ebenfalls ein Fragment mit 2513 bp Länge (ab dem 1. ATG) verwendet wurde, fehlt in UMJ79 ( $a1 b1 \Delta hdp2 ip^r[P_{hdp2\_\Delta rbf1BS}:hdp2]ip^s$ ) die Region, an die Rbf1 bindet (ca. 2004 – 2324 bp ab dem 1. ATG). Der deletierte Bereich ist etwa 400 bp (ab einer BamHI Schnittstelle 2107 bp ab dem 1. ATG) lang und enthält drei unterschiedlich stark konservierte *Rbs* (Abbildung 2.24 A). Da durch das Entfernen eines Bereichs dieser Größenordnung möglicherweise auch andere regulatorische Elemente verloren gehen könnten, wurde im Stamm UMJ84 ( $a1 b1 \Delta hdp2 ip^r[P_{hdp2\_rbf1BS\_mut}:hdp2]ip^s$ ) spezifisch die am stärksten konservierte *Rbs* mutiert. Alle genannten Stämme wurden vor Inokulation mit FB2  $\Delta hdp2$  ( $a2 b2 \Delta hdp2$ ) gekreuzt.

Die Infektionsstudie zeigte eine deutliche Auswirkung der fehlenden *Rbs* auf die Pathogenität. Während die Deletion aller drei potenzieller *Rbs* (UMJ79) eine signifikant verringerte Virulenz verursachte, hatte die Mutation der einzelnen *Rbs* (UMJ84) keinen Effekt. Expressionsanalysen mittels qRT-PCR nach artifizierlicher *b*-Induktion lassen den Rückschluss zu, dass der Verlust der Pathogenität mit dem Ausbleiben der *hdp2* Expression zusammenhängt (Abbildung 6.7, Anhang). Die Mutation der *Rbs* zeigte hingegen keine signifikante Veränderung der Expressionsstärke. Die Rbf1-Bindestellen im *hdp2* Promotor sind demnach nicht nur notwendig für die Expression von *hdp2*, sondern auch für die Virulenz.

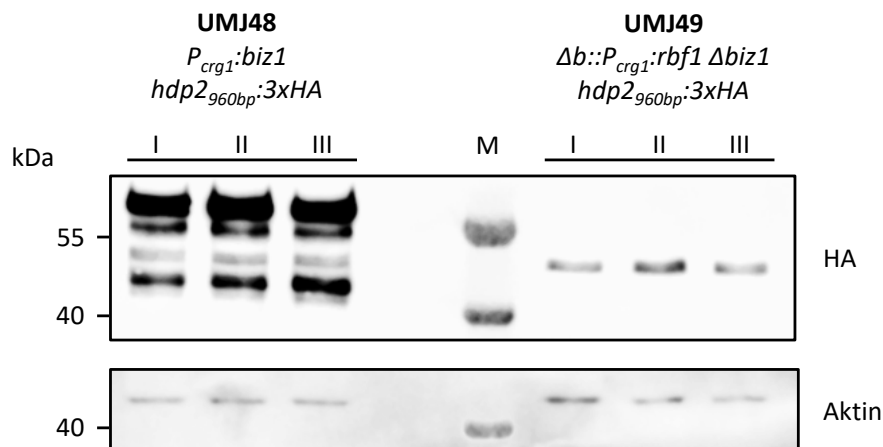


**Abbildung 2.24: Die Rbf1 Bindestellen im *hdp2* Promotor haben einen Einfluss auf die Pathogenität von *U. maydis*.** **A) Überblick der Rbf1 Konsensussequenzen im Promotor von *hdp2*.** Gezeigt sind alle Rbs innerhalb des Rbf1 peaks des *hdp2* Promotors. Das Rbf1 Bindemotiv (Ulrich, 2020) ist als *position weight matrix* mit dem *p*-Wert an der jeweiligen Position angegeben. Die Übereinstimmung der einzelnen Basen zum *best match* Motiv ist als + angegeben. Die schwarz unterstrichenen Basen in UMJ84 zeigen die entsprechenden Mutationen in dem Stamm. Die Zahlen unterhalb der Sequenzen geben die Position im Genom relativ zum 1. ATG von *hdp2* an. **B) Pathogenität von Stämmen mit deletierten und mutierten Rbf1-Bindemotiven.** UMJ78: UMJ78 x FB2  $\Delta hdp2$  (*a1 b1  $\Delta hdp2 ip'$ [ $P_{hdp2zhdp2}$ ]:*hdp2*]*ip*<sup>s</sup> x *a2 b2  $\Delta hdp2$* ), UMJ79: UMJ79 x FB2  $\Delta hdp2$  (*a1 b1  $\Delta hdp2 ip'$ [ $P_{hdp2\_rbf1BSshdp2}$ ]:*hdp2*]*ip*<sup>s</sup> x *a2 b2  $\Delta hdp2$* ), UMJ84: UMJ84 x FB2  $\Delta hdp2$  (*a1 b1  $\Delta hdp2 ip'$ [ $P_{hdp2\_rbf1BS\_mutihdp2}$ ]:*hdp2*]*ip*<sup>s</sup> x *a2 b2  $\Delta hdp2$* ). Die Bonitur der infizierten Pflanzen erfolgte sieben Tage nach Inokulation. Das Experiment wurde drei Mal unabhängig durchgeführt und jede Wiederholung ist im Diagramm dargestellt (I, II, III). Die Anzahl der Pflanzen ist mit n über den jeweiligen Replikaten angegeben. Statistische Signifikanz wurde mit dem zweiseitigen Mann-Whitney-U Rangsummentest mit Kontinuitätskorrektur ermittelt und bezieht sich auf den Wildtyp UMJ78. \*\*\* *p*-Wert  $\leq 0,001$ , n.s.: nicht signifikant.***



### 2.3.1.3 Die verschiedenen Translationsstartpunkte von *hdp2<sup>S</sup>* und *hdp2<sup>L</sup>* führen zu unterschiedlich langen Proteinen

Die Überprüfung der Translation von *hdp2<sup>S</sup>* und *hdp2<sup>L</sup>* mittels Western-Blot Analysen führte zu dem Problem, dass Hdp2<sup>S</sup> (Genprodukt von *hdp2<sup>S</sup>*) mit 1029 und Hdp2<sup>L</sup> (Genprodukt von *hdp2<sup>L</sup>*) mit 1084 Aminosäuren ein nur geringfügiges unterschiedliches Molekulargewicht von 110 kDa bzw. 116 kDa aufweisen. In diesem Größenbereich ist die Auflösung von 6 kDa Unterschied mit einer gewöhnlichen SDS-PAGE nicht aussagekräftig. Aus diesem Grund wurde ein Konstrukt generiert, das den nativen ORF von *hdp2* auf 960 bp (ab dem 2. ATG) verkürzt und die Genprodukte mit einem 3xHA-Tag versieht. Inklusive des 3xHA-Tags führt dies zu Proteinen mit einem errechneten Gewicht von 39 kDa (Hdp2<sup>S</sup>) bzw. 45 kDa (Hdp2<sup>L</sup>) und erleichtert die Differenzierung der beiden Isoformen. Bei der Integration des Konstrukts bleiben die Promotoren P<sub>1</sub> und P<sub>2</sub> vollständig intakt, was die Regulation von *hdp2* somit nicht beeinflussen sollte. Das Verkürzungskonstrukt wurde in Stämme eingebracht, die *rbf1* bzw. *biz1* mittels Medienwechsel induzieren können. Nach siebenstündiger Induktion in CM Arabinose wurden Gesamtproteinextrakte der Stämme UMJ48 (*α2 Δb P<sub>crg1</sub>:biz1 hdp2<sub>1-960bp</sub>:3xHA*) und UMJ49 (*α2 Δb::crg1:rbf1 Δbiz1 hdp2<sub>1-960bp</sub>:3xHA*) mittels SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend per Western-Blot analysiert.



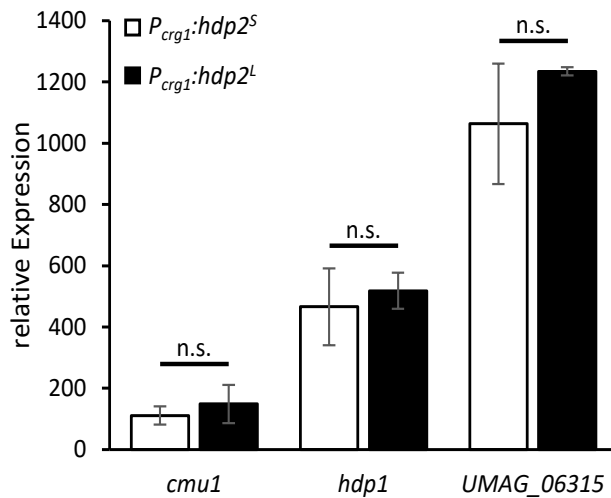
**Abbildung 2.25: Die Induktion von *rbf1* und *biz1* führt zu unterschiedlichen Hdp2 Isoformen.** Die Stämme UMJ48 (*α2 Δb P<sub>crg1</sub>:biz1 hdp2<sub>1-960bp</sub>:3xHA*) und UMJ49 (*α2 Δb::crg1:rbf1 Δbiz1 hdp2<sub>1-960bp</sub>:3xHA*) wurden als biologische Triplikate (I, II, III) in CM Glukose angezogen und anschließend sieben Stunden in CM Arabinose inkubiert. Nach der Zellernte und Proteinextraktion wurden die Proben über eine SDS-PAGE (10 %) aufgetrennt und mittels Western-Blot analysiert. Zur Detektion der beiden Hdp2 Isoformen wurden anti-HA Antikörper verwendet. Die Proteine haben eine errechnete Größe von 39 kDa (Hdp2<sup>S</sup>) und 45 kDa (Hdp2<sup>L</sup>). Als Ladekontrolle diente anti-Aktin. M: Größenstandard PageRuler™ Prestained Protein Ladder, 10 to 180 kDa.

Der in Abbildung 2.25 dargestellte Western-Blot zeigt, dass die Induktion bei UMJ48 und UMJ49 zu unterschiedlich langen Proteinen führt, die sich außerdem in ihrer Abundanz unterscheiden. Die Bandengrößen weichen allerdings von den errechneten Proteingrößen von 39 kDa und 45 kDa ab. Die größte Bande kann nach *biz1* Induktion bei ca. 60 kDa beobachtet werden, während nach *rbf1* Induktion eine einzige Bande bei 52 kDa zu sehen ist. Zudem sind nach *biz1* Induktion bei UMJ48 weitere Banden sichtbar, die wahrscheinlich auf Proteindegradation zurückzuführen sind. Daher kann keine sichere Aussage darüber getroffen werden, ob nach *biz1* Induktion ebenfalls zwei unterschiedlich lange Proteine gebildet werden, wovon jedoch auszugehen ist. Aufgrund des vorzeitig auftretenden Startcodons bei *hdp2<sup>l</sup>* entsteht dennoch, im Vergleich zu *hdp2<sup>s</sup>*, ein größeres und abundanteres Protein nach *biz1* Induktion als nach *rbf1* Induktion.

### 2.3.2 Die Rolle von Hdp2<sup>S</sup> und Hdp2<sup>L</sup> während der Pathogenität

Die Regulation von *hdp2* erweist sich als komplexes Zusammenspiel verschiedener Transkriptionsfaktoren, Promotoren und Transkripte. Dies wirft die Frage auf, welche biologische Funktion diese Art der Genexpression erfüllt. Die Ausübung unterschiedlicher Aufgaben durch die Isoformen von Hdp2 ist die naheliegendste Erklärung für diese Form der Regulation. Hdp2<sup>L</sup> ist am N-Terminus 55 AS länger als Hdp2<sup>S</sup>, was, auf das gesamte Protein gerechnet, einen Unterschied von lediglich 5 % ergibt. Bioinformatische Analysen identifizierten, mit Ausnahme eines MAPK-Interaktionsmotivs, keine zusätzlichen Domänen oder Signalsequenzen von besonderem Interesse in diesem Bereich (Daten nicht gezeigt). Ob die zusätzlichen Aminosäuren für Protein-Protein-Interaktionen zwischen spezifischen Transkriptionsfaktoren eine Rolle spielen, kann allerdings nicht ausgeschlossen werden und bedarf weiterführender Untersuchungen.

Mit Hilfe der Stämme UMJ11 (*hdp2:GFP ip<sup>r</sup>[P<sub>crg1</sub>:hdp2<sup>S</sup>]ip<sup>S</sup>*) und UMJ12 (*hdp2:GFP ip<sup>r</sup>[P<sub>crg1</sub>:hdp2<sup>L</sup>]ip<sup>S</sup>*) konnten die cDNA Transkripte von Hdp2<sup>S</sup> und Hdp2<sup>L</sup> (fortan bezeichnet als *hdp2<sup>S</sup>* und *hdp2<sup>L</sup>*) unter der Kontrolle des *crg1*-Promotors direkt induziert werden. Die Induktion von *hdp2<sup>S</sup>* und Hdp2<sup>L</sup> zeigte dabei keinen Unterschied in der Expression der Hdp2 Zielgene, *cmu1*, *hdp1* und *UMAG\_06315* (Abbildung 2.26).



**Abbildung 2.26: Die Induktion von *hdp2* Zielgenen ist nicht abhängig von der Proteinisoform.** Zu sehen ist die relative Expression ( $\Delta\Delta Ct$ ) von *cmu1*, *hdp1* und *UMAG\_06315* in UMI11 (*hdp2::GFP ip<sup>r</sup>[P<sub>crg1</sub>:hdp2<sup>S</sup>]ip<sup>s</sup>*) ( $P_{crg1}:hdp2^S$ ) und UMI12 (*hdp2::GFP ip<sup>r</sup>[P<sub>crg1</sub>:hdp2<sup>L</sup>]ip<sup>s</sup>*) ( $P_{crg1}:hdp2^L$ ). Zur Normalisierung diente das Gen *eIF2B*. Die Berechnung erfolgte relativ zur jeweiligen nicht induzierten Probe. Die Expression der dargestellten *hdp2* Zielgene zeigte keinen Unterschied durch die Induktion von Hdp2<sup>S</sup> oder Hdp2<sup>L</sup>. Das Experiment wurde in biologischen Triplikaten mit jeweils technischen Duplikaten durchgeführt. Dargestellt sind die Mittelwerte der biologischen Replikate. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung der Mittelwerte der biologischen Triplikate. Statistische Signifikanz wurde mit dem studentische t-Test ermittelt. n.s.: nicht signifikant

Bei dem in Abbildung 2.26 dargestellten Induktionsexperiment handelt es sich allerdings wiederum um *in vitro* Versuche, bei denen Pflanzensignale fehlen und die Interaktionsmöglichkeiten mit anderen pathogenitätsrelevanten Transkriptionsfaktoren limitiert sind. Daher sollten Deletionen der einzelnen Isoformen vorgenommen werden, um anschließend Pathogenitätstests durchzuführen und die Auswirkungen im natürlichen Kontext der Pflanzeninteraktion betrachten zu können.

### 2.3.2.1 Die Mutation des 2. ATGs von Hdp2 führt zum Verlust der Pathogenität

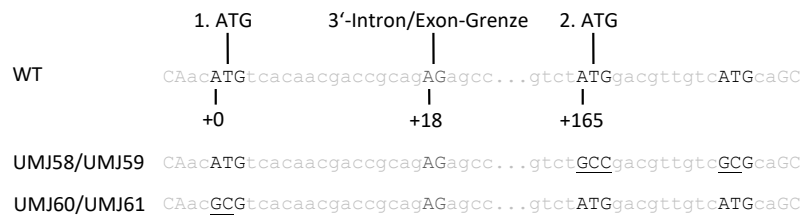
Angesichts der komplexen Regulation und der Tatsache, dass der Unterschied zwischen Hdp2<sup>S</sup> und Hdp2<sup>L</sup> im N-Terminus liegt, konnten keine simplen Deletionen des Bereichs für Pathogenitätstests durchgeführt werden, ohne die Promotorstruktur zu beeinflussen. Folglich wurden lediglich die Translationsstarts von *hdp2* mutiert. Es wurden Stämme generiert bei denen entweder das 1. oder 2. ATG so mutiert wurde, dass statt einem Methionin ein Alanin abgelesen wird (Abbildung 2.27 A). Dadurch wird der Translationsstart zum nächstmöglichen ATG verschoben. Bei den kompatiblen Stämmen UMI58 (*a1 b1 Δhdp2::Hdp2<sup>2.ATGmut</sup>*) und UMI59 (*a2 b2 Δhdp2::Hdp2<sup>2.ATGmut</sup>*) ist das 2. ATG<sup>8</sup> mutiert. So würde das Transkript *hdp2<sup>u</sup>* weiterhin das 1. ATG als Start verwenden und Hdp2<sup>L</sup> bilden. Bei *hdp2<sup>S</sup>* hingegen kann weder das 1. noch das 2. ATG verwendet werden, wodurch das nächstmögliche Startcodon genutzt wird. Dies führt jedoch zu einer Verschiebung des Leserahmens

<sup>8</sup> Es existiert ein 3. ATG 9 bp nach dem 2. ATG, das ebenfalls *in frame* ist und daher mutiert wurde. Aus Übersichtsgründen werden das 2. ATG und 3. ATG zusammengefasst und als 2. ATG bezeichnet.

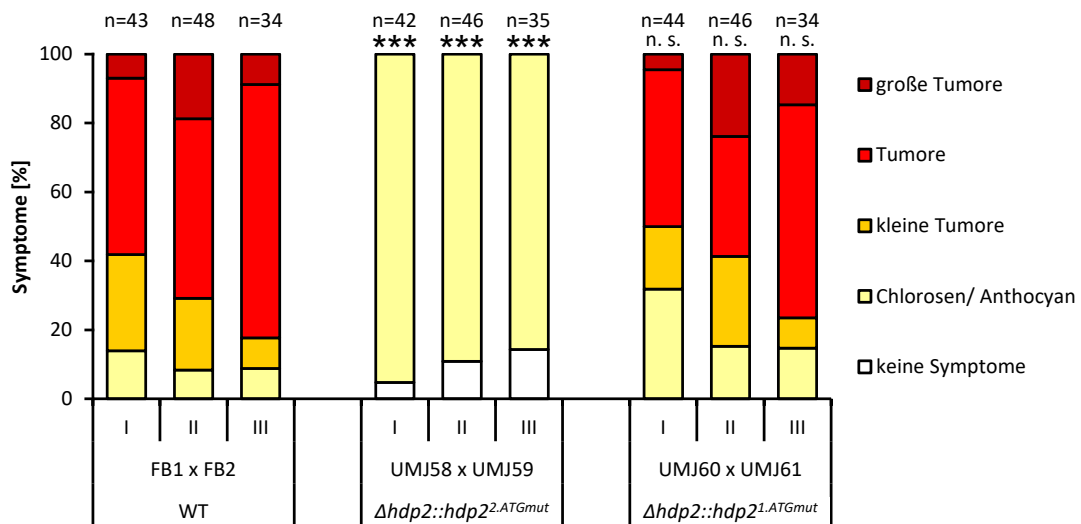
und aufgrund der dadurch fehlenden Homeodomäne zu einem *nonsense* Protein. UMJ58 und UMJ59 sind demnach nur in der Lage Hdp2<sup>L</sup> als funktionelles Protein zu bilden. Bei den kompatiblen Stämmen UMJ60 (*a1 b1 Δhdp2::Hdp2<sup>1.ATGmut</sup>*) und UMJ61 (*a2 b2 Δhdp2::Hdp2<sup>1.ATGmut</sup>*) ist das 1. ATG mutiert. Dadurch wird bei *hdp2<sup>s</sup>* sowie *hdp2<sup>u</sup>* das 2. ATG als Translationsstart verwendet und nur Hdp2<sup>S</sup> gebildet. Zusätzlich wurde die Resistenzkassette mit Hilfe des FLP/FRT-Rekombinasesystems wieder entfernt (Khrunyk *et al.*, 2010), um etwaige Auswirkungen auf die Chromatinstruktur und Genexpression zu vermeiden (Schmitz *et al.*, 2020).

Maispflanzen wurden mit UMJ58 x UMJ59, UMJ60 x UMJ61 und der Kontrolle FB1 x FB2 (*a1 b1 x a2 b2*) infiziert und auftretende Symptome wurden nach sieben Tagen bewertet (Abbildung 2.27 B). Im Vergleich zum Wildtyp (FB1 x FB2) zeigt die Kreuzung aus UMJ58 x UMJ59 (kann nur Hdp2<sup>L</sup> bilden) eine signifikant verringerte Virulenz. UMJ60 x UMJ61 (kann nur Hdp2<sup>S</sup> bilden) hingegen zeigt hinsichtlich der Fähigkeit die Pflanze zu befallen keinen Unterschied zum Wildtyp. Entweder ist die reduzierte Pathogenität in UMJ58 x UMJ59 auf den Mangel an Hdp2<sup>S</sup> zurückzuführen oder es kann überhaupt kein Hdp2 gebildet werden, da P<sub>1</sub> kein funktionelles Protein generiert und P<sub>2</sub> erst *in planta* aktiv wird. Wohingegen bei UMJ60 x UMJ61 beide Promotoren zur Synthese von Hdp2 (bzw. Hdp2<sup>S</sup>) genutzt werden können. Um diese Theorie zu überprüfen, sollten Hdp2<sup>S</sup> bzw. Hdp2<sup>L</sup> temporär gebildet werden, um den *hdp2<sup>2.ATGmut</sup>* Phänotyp zu komplementieren.

A



B

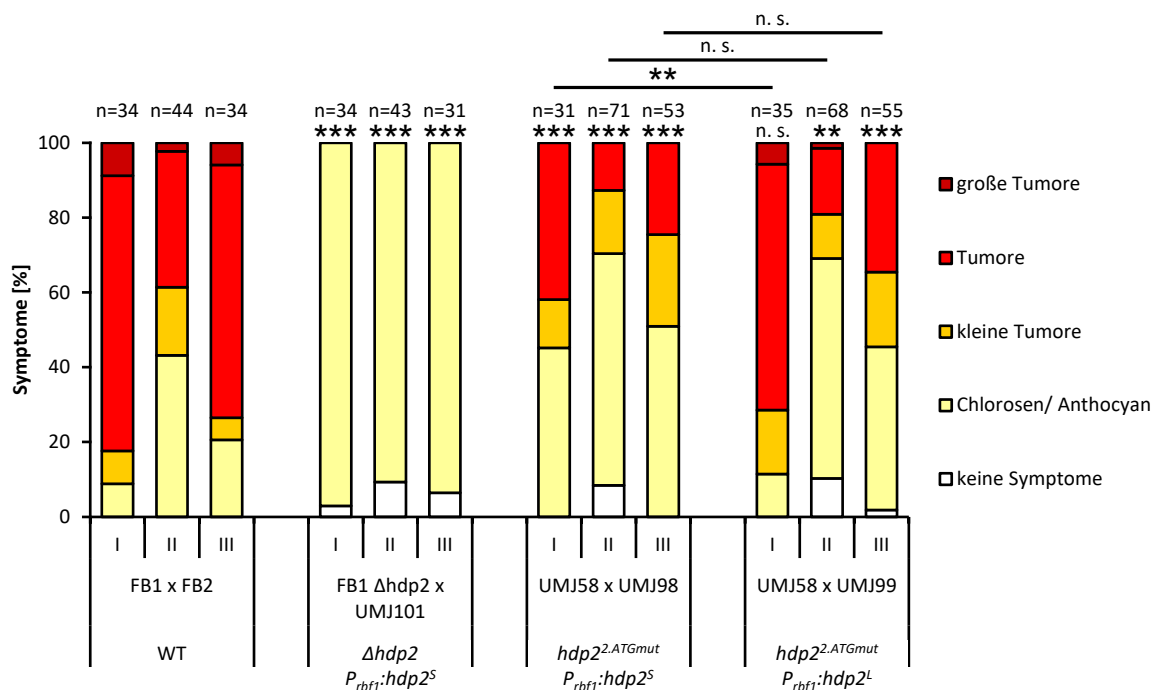


**Abbildung 2.27: Die beiden Hdp2 Isoformen haben unterschiedliche Relevanz für die Pathogenität von *U. maydis*.** A) Überblick der Startcodons und deren Mutationen. Die Translationsstarts sind als schwarze Großbuchstaben hervorgehoben. Die schwarz unterstrichenen Basen zeigen die entsprechend eingebrachten Mutationen im jeweiligen Stamm. Die Zahlen unterhalb der Wildtypsequenz geben die Position im Genom relativ zum 1. ATG von *hdp2* an. B) Pathogenität von Stämmen mit unterschiedlich mutierten Startcodons. FB1 x FB2 ( $a1 b1 \times a2 b2$ ) vs. UMJ58 x UMJ59 ( $a1 b1 \Delta hdp2::hdp2^{2.ATGmut} \times a2 b2 \Delta hdp2::hdp2^{2.ATGmut}$ ) vs. UMJ60 x UMJ61 ( $a1 b1 \Delta hdp2::hdp2^{1.ATGmut} \times a2 b2 \Delta hdp2::hdp2^{1.ATGmut}$ ). Die Bonitur der infizierten Pflanzen erfolgte sieben Tage nach Inokulation. Das Experiment wurde drei Mal unabhängig durchgeführt und jede Wiederholung ist im Diagramm dargestellt (I, II, III). Die Anzahl der Pflanzen ist mit n über den jeweiligen Replikaten angegeben. Statistische Signifikanz wurde mit dem zweiseitigen Mann-Whitney-U Rangsummentest mit Kontinuitätskorrektur ermittelt und bezieht sich auf den Wildtyp. \*\*\* p-Wert  $\leq 0,001$ , n.s.: nicht signifikant.

### 2.3.2.2 Partielle Komplementation des *hdp2*<sup>2.ATGmut</sup> Phänotyps

Um zu überprüfen, ob  $P_2$  nur *in planta* aktiv ist und ob Hdp2<sup>S</sup> lediglich für die Transition zwischen saprophytischer und biotropher Phase benötigt und gebildet wird, sollte der *hdp2*<sup>2.ATGmut</sup> Phänotyp temporär komplementiert werden. Gleichzeitig würde dies zeigen, dass beide Hdp2 Isoformen lediglich ein Produkt der Regulation darstellen und keine unterschiedlichen Aufgaben wahrnehmen. Hierzu wurden die Stämme UMJ98 ( $a2 b2 \Delta hdp2::hdp2^{2.ATGmut} ip'[P_{rbf1}:hdp2^S]ip^s$ ) und UMJ99 ( $a2 b2 \Delta hdp2::hdp2^{2.ATGmut} ip'[P_{rbf1}:hdp2^L]ip^s$ ) generiert. Als Derivate von UMJ59 enthalten beide einen modifizierten *hdp2* Locus, bei dem das 2. ATG mutiert wurde und können daher ausschließlich Hdp2<sup>L</sup>

bilden. Während UMJ98 ein Konstrukt im *ip*-Locus enthält, bei dem *hdp2<sup>S</sup>* unter der Kontrolle des *rbf1*-Promotors steht, wird bei UMJ99 die Induktion von *hdp2<sup>L</sup>* vom *rbf1*-Promotor im *ip*-Locus gesteuert. Da gezeigt wurde, dass *rbf1* nur bis 2 dpi aktiv ist, erlaubt die zusätzliche ektopische *hdp2* Kopie unter Kontrolle des *rbf1*-Promotors somit eine temporäre Synthese von Hdp2<sup>S</sup> (UMJ98) bzw. Hdp2<sup>L</sup> (UMJ99). UMJ98 und UMJ99 wurden vor Inokulation mit UMJ58 (*a1 b1 Δhdp2::hdp2<sup>2.ATGmut</sup>*) gekreuzt; auch hier wurde das 2. ATG von *hdp2* mutiert. Als Negativkontrolle diente der Stamm UMJ101 (*a2 b2 Δhdp2 ip<sup>r</sup>[P<sub>rbf1</sub>:hdp2<sup>S</sup>]*ip<sup>S</sup>**), der zwar ebenfalls das Konstrukt P<sub>rbf1</sub>:hdp2<sup>S</sup> im *ip*-Locus besitzt, dessen nativer *hdp2* Locus allerdings deletiert wurde. UMJ101 wurde mit FB1 *Δhdp2* (*a1 b1 Δhdp2*) als kompatibler Partner gekreuzt.



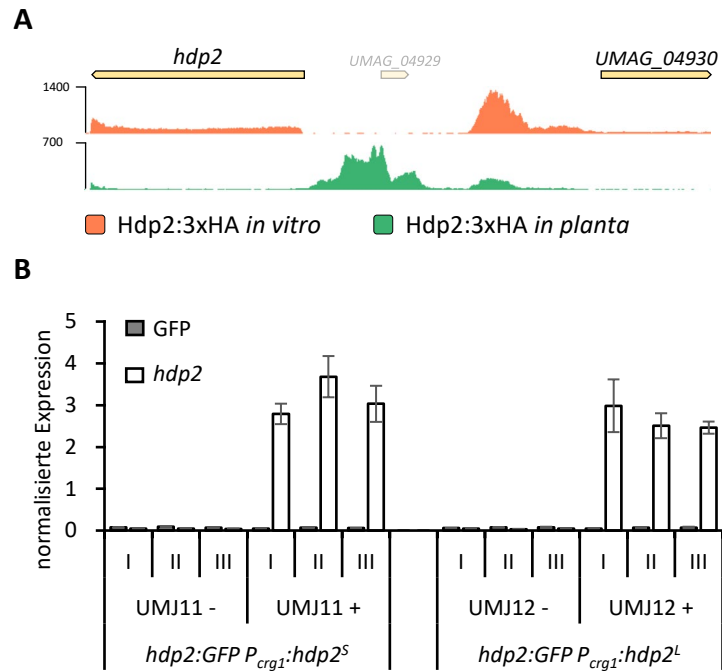
**Abbildung 2.28: Die Expression von *hdp2<sup>S</sup>* während der frühen Infektionsphase komplementiert *hdp2<sup>2.ATGmut</sup>* partiell.** FB1 x FB2 (*a1 b1* x *a2 b2*) vs. FB1 *Δhdp2* x UMJ101 (*a1 b1 Δhdp2* x *a2 b2 Δhdp2 ip<sup>r</sup>[P<sub>rbf1</sub>:hdp2<sup>S</sup>]*ip<sup>S</sup>**) vs. UMJ58 x UMJ98 (*a1 b1 Δhdp2::hdp2<sup>2.ATGmut</sup>* x *a2 b2 Δhdp2::hdp2<sup>2.ATGmut</sup> ip<sup>r</sup>[P<sub>rbf1</sub>:hdp2<sup>S</sup>]*ip<sup>S</sup>**) vs. UMJ58 x UMJ99 (*a1 b1 Δhdp2::hdp2<sup>2.ATGmut</sup>* x *a2 b2 Δhdp2::hdp2<sup>2.ATGmut</sup> ip<sup>r</sup>[P<sub>rbf1</sub>:hdp2<sup>L</sup>]*ip<sup>S</sup>**). Die Bonitur der infizierten Pflanzen erfolgte sieben Tage nach Inokulation. Das Experiment wurde drei Mal unabhängig durchgeführt und jede Wiederholung ist im Diagramm dargestellt (I, II, III). Die Anzahl der Pflanzen ist mit n über den jeweiligen Replikaten angegeben. Statistische Signifikanz wurde mit dem zweiseitigen Mann-Whitney-U Rangsummentest mit Kontinuitätskorrektur ermittelt. Das Signifikanzniveau, angegeben als Asterisk (\*) oder n.s., unmittelbar über den Diagrammbalken bezieht sich auf den Wildtyp. Asteriske (bzw. n.s.) über den schwarzen Balken geben die Signifikanzunterschiede zwischen UMJ58 x UMJ98 und UMJ58 x UMJ99 wieder. \*\*\* *p*-Wert ≤ 0,001; \*\* *p*-Wert ≤ 0,01; n.s.: nicht signifikant.

In Abbildung 2.28 sind die Ergebnisse des Pathogenitätstests von UMJ98, UMJ99 und UMJ101 dargestellt. Bei UMJ101 ist eine stark reduzierte Virulenz zu beobachten, was zeigt, dass das  $P_{rbf1}:hdp2^S$  Konstrukt die *hdp2* Deletion nicht komplementieren kann. Bis auf eines der Replikate (I, UMJ58 x UMJ99) kann bei UMJ98 und UMJ99 ebenfalls eine reduzierte Pathogenität festgestellt werden. Im Vergleich zum Wildtyp (FB1 x FB2), können mehr Pflanzen mit Chlorosen beobachtet werden, die Ausbildung von Tumoren bleibt jedoch nicht völlig aus. Dies zeigt, dass sowohl  $P_{rbf1}:hdp2^S$  als auch  $P_{rbf1}:hdp2^L$  in der Lage sind den  $hdp2^{2.ATGmut}$  Phänotyp teilweise zu komplementieren. Demnach wird  $Hdp2^S$  *in planta* nicht zwingend benötigt und gleichzeitig erweist sich  $Hdp2^L$  als ausreichend für den Übergang zur biotrophen Phase.

### 2.3.3 Der Promotor von *hdp2* wird von $Hdp2$ selbst gebunden

Wie in Kapitel 2.3.1 beschrieben wurde, binden Rbf1 und Biz1 an den Promotor von *hdp2*, um somit die Expression zu steuern. Die Bindung erfolgt dabei an den beiden Promotoren  $P_1$  und  $P_2$ . CHIP-Seq Analysen zeigen, dass zudem  $Hdp2:3xHA$  selbst sowohl *in vitro* als auch *in planta* an beiden Promotoren angereichert werden kann (Abbildung 2.29 A). Während  $Hdp2:3xHA$  unter axenischen Bedingungen an  $P_1$  zu binden scheint, kann die Bindung *in planta* an  $P_2$  beobachtet werden. Der *peak in planta* überschneidet sich dabei mit dem *peak* von  $Biz1:3xHA$ . In keinem der *peaks* konnte jedoch ein  $Hdp2$  Konsensusmotiv als *best match* identifiziert werden (Daten nicht gezeigt).

Die Bindung von  $Hdp2$  an den eigenen Promotor gab Grund zur Annahme, dass bei *hdp2* eine mögliche Autoregulation vorliegt. Daher sollte überprüft werden, ob *hdp2* in der Lage ist sich selbst zu induzieren. Hierfür wurden die Stämme UMJ11 ( $hdp2:GFP ip'[P_{crg1}:hdp2^S]ip^S$ ) und UMJ12 ( $hdp2:GFP ip'[P_{crg1}:hdp2^L]ip^S$ ) verwendet, bei denen das native *hdp2* mit einem GFP-Gen fusioniert ist, während eine zweite *hdp2* Kopie als  $hdp2^S$  bzw.  $hdp2^L$  im *ip*-Locus unter der Kontrolle des *crg1* Promotors eingebracht wurde. Nach Induktion von  $hdp2^S$  bzw.  $hdp2^L$  konnte jedoch keine Expression von GFP beobachtet werden (Abbildung 2.29 B). Dies bedeutet, dass weder  $Hdp2^S$  noch  $Hdp2^L$  das native *hdp2* unter axenischen Bedingungen induzieren kann und spricht demnach gegen eine Autoregulation. Die Möglichkeit, dass sich *hdp2 in planta* selbst induziert und die Relevanz der Bindestelle dafür, wurde bisher nicht untersucht.



**Abbildung 2.29: Die Induktion *hdp2<sup>S</sup>* oder *hdp2<sup>L</sup>* zeigt keinen Einfluss auf die Expression auf *hdp2*.**  
**A) Visuelle Darstellung der Hdp2 Bindung am *hdp2* Promotor.** Hdp2:3xHA *in vitro* (orange) zeigt die Anreicherung von Hdp2:3xHA im Stamm UJU2 (*a2 Δb ip<sup>r</sup>[P<sub>crg1</sub>:hdp2:3xHA]ip<sup>S</sup>*) an P<sub>1</sub> von *hdp2* (Datensatz aus Ulrich, 2020). Hdp2:3xHA *in planta* (grün) zeigt die Anreicherung von Hdp2:3xHA *in planta* 7 dpi (UMJ14 x UMJ15; *a1 b1 hdp2:3xHA* x *a2 b2 hdp2:3xHA*) in P<sub>2</sub> von *hdp2*. *UMAG\_04929* ist durch Automation fälschlicherweise als offener Leserahmen annotiert. *Reads* wurden mit Bowtie2 version 2.0.0-beta7 (Langmead und Salzberg, 2012) auf das *U. maydis* Genom (Ensembl Genomes 33 (Kersey *et al.*, 2018) aligniert. Zur visuellen Darstellung der *reads* wurde der Generic Genome Browser Version 2.33 verwendet. Profile von *peaks* sind repräsentiert durch normalisierte *read counts*. **B) qRT-PCR der nativen *hdp2* Expression nach artifizierlicher *hdp2* Induktion.** Zu sehen ist die normalisierte Expression ( $\Delta Ct$ ) von *hdp2* und GFP in UMJ11 (*hdp2:GFP ip<sup>r</sup>[P<sub>crg1</sub>:hdp2<sup>S</sup>]ip<sup>S</sup>*) und UMJ12 (*hdp2:GFP ip<sup>r</sup>[P<sub>crg1</sub>:hdp2<sup>L</sup>]ip<sup>S</sup>*). Zur Normalisierung diente das Gen *eIF2B*. Das Experiment wurde in biologischen Triplikaten mit jeweils technischen Duplikaten durchgeführt. Dargestellt sind die Mittelwerte der technischen Duplikate der induzierten (+) und nicht induzierten (-) biologischen Replikate (I, II, III). Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung der Mittelwerte der technischen Duplikate.

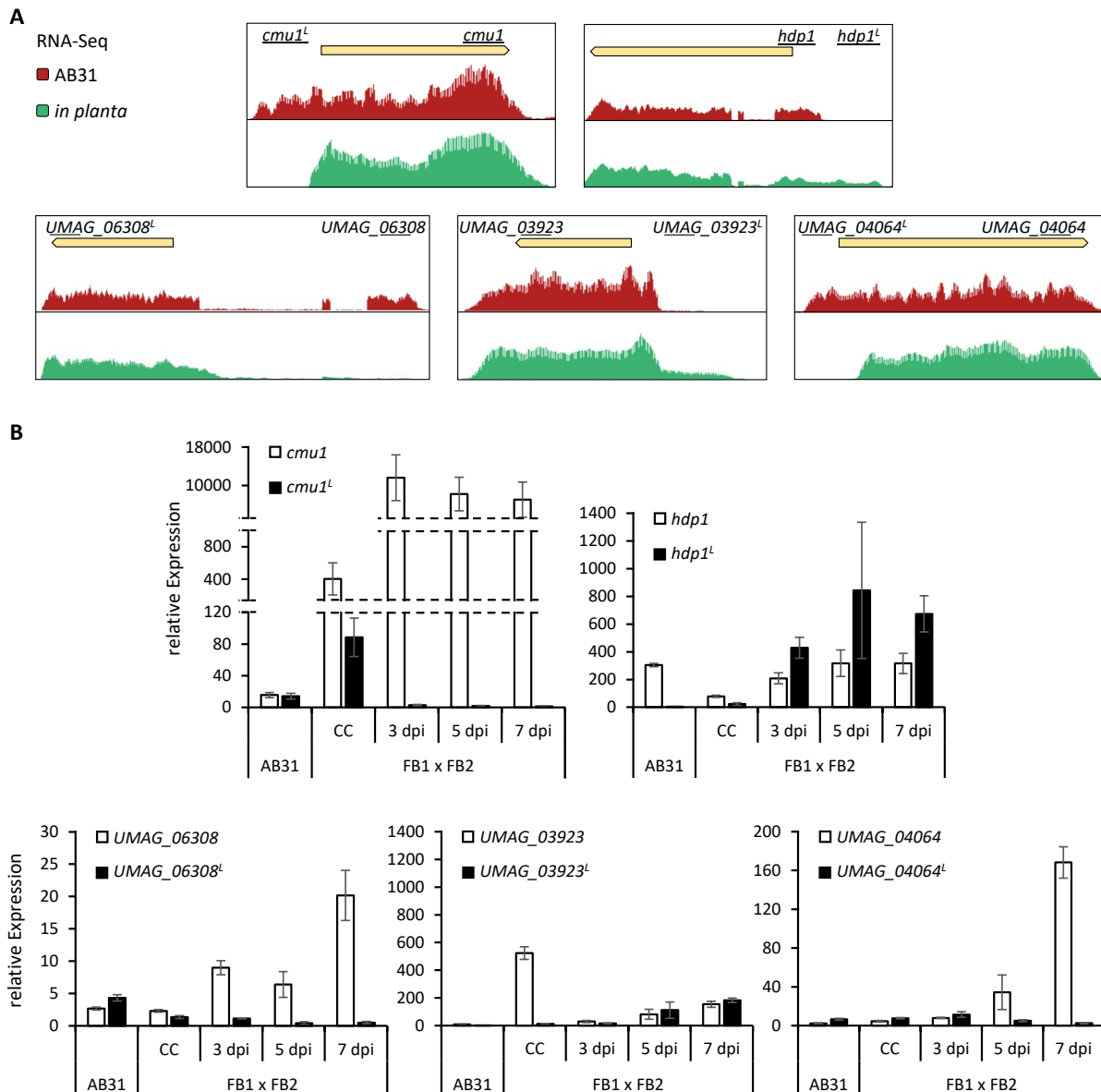
Die Regulation von *biz1* bleibt ebenfalls ein Rätsel. Der Zinkfingertranskriptionsfaktor ist zwar, genauso wie *hdp2*, *rbf1*-reguliert, jedoch finden sich weder *Rbs* noch signifikante *Rbf1 peaks* im *biz1* Promotor (Ulrich, 2020). Darüber hinaus ist *biz1* weiterhin *in planta* exprimiert. Interessanterweise befinden sich *in planta* zwei signifikante Hdp2 *peaks* im *biz1* Promotor, die allerdings nicht mit den gefundenen Hdp2 Konsensusmotiven, die sich im Promotor befinden, korrelieren. Zudem befindet sich *biz1* nicht unter den Genen, die in Expressionsanalysen differentiell von *hdp2* unter axenischen Bedingungen reguliert werden (M. Vraneš, unveröffentlicht).



## 2.4 Verwendung alternativer Promotoren in *U. maydis*

Die Verwendung alternativer Promotoren zur Kontrolle der Expression ist in höheren Eukaryoten ein gängiger Mechanismus und bereits mehrfach beschrieben. In niederen Eukaryoten wie Pilzen tritt diese Art der Genregulation eher selten auf. Der Transkriptionsfaktor Hdp2 in *U. maydis* stellt hierbei eine dieser Ausnahmen dar. Wie in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, wird *hdp2* von zwei Promotoren kontrolliert, die von den Zinkfingertranskriptionsfaktoren Rbf1 und Biz1 bedient werden. Die dabei entstehenden Transkripte führen zu unterschiedlich langen Proteinen, die sich allerdings nicht in ihrer Funktion zu unterscheiden scheinen. Bei der Auswertung diverser RNA-Seq Analysen konnten weitere Gene identifiziert werden, die ähnlich wie *hdp2* reguliert werden. Die Expression der Transkripte ist ebenfalls davon abhängig, ob eine Induktion über das b-Heterodimer in axenischer Kultur oder *in planta* erfolgt. Hierzu zählen neben einem uncharakterisierten Gen (*UMAG\_03923*), einer membranständige Glucoamylase (*UMAG\_04064*) und einem *winged-helix* Transkriptionsfaktor (*UMAG\_06308*), auch der Homeodomänentranskriptionsfaktor Hdp1 und der Effektor Cmu1. Während *hdp1* zwar keinen Verlust der Pathogenität bei einer Deletion mit sich führt, gilt es als Modulator der *b*-abhängigen Signalkaskade und verbindet diese durch diverse *feed forward loops* mit der *a*-Kaskade (Pothiratana, 2008; Ulrich, 2020). Das Gen *cmu1* kodiert für eine sekretierte Chorismatmutase, die die Salizylsäuresynthese der Pflanze hemmt und bei Deletion zu einer verringerten Pathogenität von *U. maydis* führt (Djamei *et al.*, 2011).

Während bei *cmu1*, *UMAG\_06308* und *UMAG\_04064* nach *b*-Induktion in AB31 (*a2 P<sub>crg1</sub>:bW2, bE1*) ein längeres Transkript entsteht als 8 dpi *in planta* (FB1 x FB2; *a1 b1* x *a2 b2*), ist es bei *hdp1* und *UMAG\_03923* umgekehrt (Abbildung 2.30 A). Durch die RNA-Seq Analyse von AB31 ist bei *UMAG\_06308* zudem zu erkennen, dass das Transkript aus drei Exons und zwei Introns besteht. Im Gegensatz dazu wird *in planta* nur das größte der drei Exons exprimiert. Zur Verifikation der RNA-Seq Daten wurden bei allen Genen qRT-PCRs mit zwei verschiedenen Primerpaaren durchgeführt. Eines der Paare bindet dabei in einem Bereich des offenen Leserahmes, der es ermöglicht beide Transkripte zu amplifizieren. Das andere Primerpaar bindet im jeweils längeren 5'-Bereich des Transkripts und amplifiziert damit lediglich die längere Version. Bei der Expression der Transkripte wurde zwischen außerhalb und innerhalb der Pflanze unterschieden. Um die Kondition außerhalb der Pflanze widerzuspiegeln, wurde AB31 und eine Kreuzung von FB1 x FB2 auf aktivkohlehaltigem Medium verwendet. Die Inkubation von AB31 in Arabinose sowie die Anzucht von FB1 x FB2 auf Aktivkohlemedium ermöglichen die Induktion eines aktiven b-Heterodimers. Um die Expression *in planta* zu ermitteln, wurden Maispflanzen mit FB1 x FB2 infiziert und Proben nach mehreren Zeitpunkten entnommen.



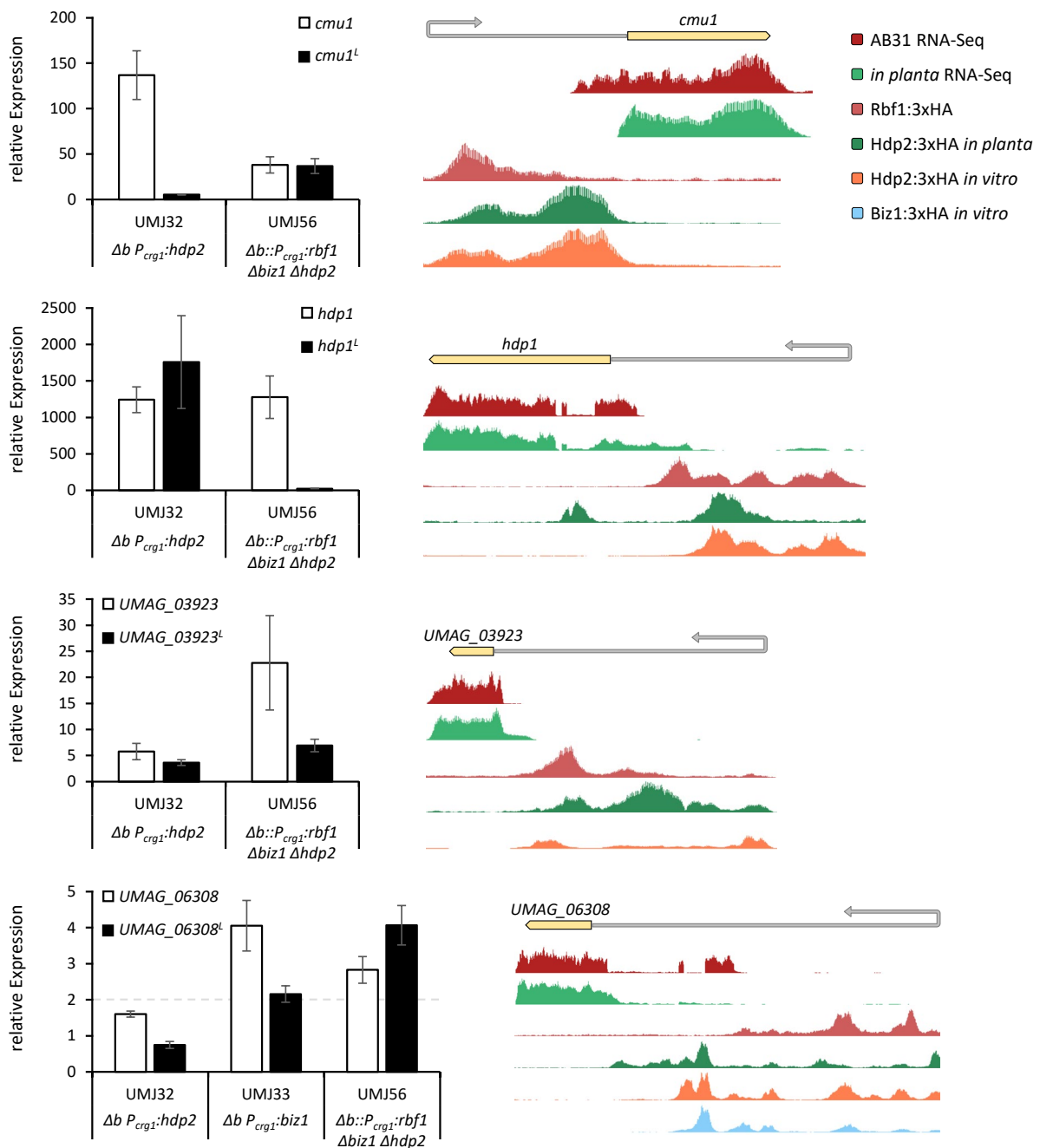
**Abbildung 2.30: Die Transkriptlänge der gezeigten Gene ist abhängig von der jeweiligen Kondition.**

**A)** RNA-Seq AB31 (axenisch, rot) vs. RNA-Seq FB1 x FB2 (grün) 8 dpi. Nach Induktion eines aktiven b-Heterodimers, das bei AB31 ( $a2 P_{crg1}:bW2$ ,  $bE1$ ) unter dem Promotor des arabinoseinduzierbaren Gens *crg1* steht und 8 Tage nach der Infektion mit den kompatiblen Stämmen FB1 x FB2 ( $a1 b1 \times a2 b2$ ) sind für die untersuchten Gene unterschiedlich lange Transkripte nachweisbar. Der unterstrichene Teil des Gennamens gibt die Position der, in der qRT-PCR, verwendeten Primer an. (Datensätze aus Kellner *et al.*, 2014 und Tollot *et al.*, 2016). **B)** Zu sehen ist die relative Expression ( $\Delta\Delta C_t$ ) von *cmu1*, *hdp1*, *UMAG\_06308*, *UMAG\_03923* und *UMAG\_04064* als Gesamttranskriptmenge und der jeweils längeren Transkriptvariante in AB31 und FB1 x FB2 auf Aktivkohlemedium (CC) sowie 3, 5 und 7 Tage nach der Infektion. Zur Normalisierung diente das Gen *eIF2B*. Die Berechnung erfolgte bei AB31 relativ zur nicht induzierten Probe und bei FB1 x FB2 relativ zu FB2 ( $a2 b2$ ) in axenischer Kultur mit Minimalmedium. Das Experiment wurde in biologischen Triplikaten mit jeweils technischen Duplikaten durchgeführt. Dargestellt sind die Mittelwerte der biologischen Replikate. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung der Mittelwerte der biologischen Triplikate.

Bei allen gezeigten Genen konnten mittels qRT-PCR zwei verschiedene Transkripte nachgewiesen werden (Abbildung 2.30 B). Bei *cmu1* findet man die längere Variante *cmu1<sup>L</sup>* lediglich nach b-Induktion in AB31 und in FB1 x FB2 auf Aktivkohlemedium (CC). Sobald *U. maydis* die Pflanze infiziert hat, ist davon auszugehen, dass die Primer für *cmu1<sup>L</sup>* kein Amplifikat mehr generieren können und lediglich das kurze Transkript in hohem Maße gebildet wird. Umgekehrt ist bei *hdp1* nach sehr geringer Expression von *hdp1<sup>L</sup>* bei CC, ein starker Anstieg ab 3 dpi zu erkennen. Die Expression von *UMAG\_06308* ist in allen Konditionen nachweisbar, nimmt jedoch während der Pflanzeninfektion deutlich zu. Die höchste Induktion von *UMAG\_06308<sup>L</sup>* war hingegen bei AB31 (4,3-fach) zu beobachten. Die Induktion der Kreuzung auf Aktivkohlemedium (1,35-fach) und *in planta* (<1,15-fach) lagen darunter. Das Gen *UMAG\_03923* wird in AB31 gering exprimiert, auf Aktivkohlemedium steigt die Expression jedoch um das 50-fache im Vergleich zu AB31 an. Während der Pflanzeninfektion ist die Expression wiederum geringer, steigt aber mit der Zeit an. Wie die RNA-Seq bereits zeigte, wird *UMAG\_03923<sup>L</sup>* hauptsächlich *in planta* 5 und 7 dpi gebildet. Die Glucoamylase *UMAG\_04064* scheint ein spätreguliertes Gen zu sein, da eine hohe Expression erst ab 5 dpi gemessen werden kann. Das Transkript *UMAG\_04060<sup>L</sup>* ist nach b-Induktion und bei frühen Zeitpunkten der Infektion exprimiert, sieben Tage nach der Infektion aber kaum noch vorhanden. Insgesamt konnten bei allen Genen verschieden lange Transkripte unter den jeweiligen Konditionen nachgewiesen werden. Bei keinem der längeren Transkripte konnten jedoch zusätzliche Startcodons *in frame* identifiziert werden. Ob diese Transkripte zu anderen (längeren) Proteinisoformen führen bleibt daher fraglich und wurde nicht weiter untersucht.

Da die gezeigten Gene eindeutig durch die *b*-Kaskade reguliert werden, wurde mit Hilfe von CHIP-Seq Daten überprüft, welche der beteiligten Faktoren Einfluss auf die Expression dieser Gene nehmen. Abbildung 2.31 zeigt, dass sowohl Rbf1:3xHA als auch Hdp2:3xHA an den Promotoren von *cmu1*, *hdp1*, *UMAG\_06308* und *UMAG\_03923* angereichert werden können. Am Promotor von *UMAG\_06308* konnte zusätzlich eine Bindung von Biz1:3xHA *in vitro* festgestellt werden. Vergleicht man die Position des Rbf1 und Hdp2 *peaks* in den jeweiligen Promotoren, erkennt man, dass diese entweder verschoben sind oder im Fall von *UMAG\_06308* und *hdp1* zwar zum Teil überlappen, hier aber weitere Hdp2:3xHA *peaks* vorhanden sind. Die Bindung von Biz1:3xHA überlappt bei *UMAG\_06308* dabei teilweise mit der Bindung von Hdp2:3xHA. Die Bindung von Hdp2:3xHA unterscheidet sich ebenfalls, abhängig von der Kondition. Bei *hdp1* kann *in planta* ein zusätzlicher Hdp2:3xHA *peak* im Intron beobachtet werden, während *in vitro* ein *upstream* gelegener *peak* mit der Bindung von Rbf1:3xHA überlappt. Dasselbe konnte bei *UMAG\_06308* gezeigt werden, hier bindet Hdp2:3xHA jedoch in beiden Konditionen innerhalb des Introns. Der Promotor von *UMAG\_03923* hingegen kann nur mit Hdp2:3xHA *in planta* (und Rbf1:3xHA) angereichert werden.

Um festzustellen, ob die genannten Gene *rbf1*- und *hdp2/biz1*-abhängig reguliert werden, wurden die Stämme UMJ32 ( $a2 \Delta b ip^r[P_{crq1}:hdp2]ip^s$ ), UMJ33 ( $a2 \Delta b ip^r[P_{crq1}:biz1]ip^s$ ) und UMJ56 ( $a2 \Delta b::P_{crq1}:rbf1 \Delta biz1 \Delta hdp2$ ) verwendet. Die Stämme sind in der Lage *hdp2* bzw. *biz1* bzw. *rbf1* durch den Wechsel der Kohlenstoffquelle zu induzieren. Bei UMJ56 wurde zusätzlich *biz1* und *hdp2* deletiert, um eine indirekte Induktion der Zielgene auszuschließen. Nach fünfstündiger Induktion wurden qRT-PCRs durchgeführt, bei denen dieselben Primerpaare wie zuvor (siehe Abbildung 2.30) benutzt wurden.



**Abbildung 2.31: Rbf1, Hdp2 und Biz1 induzieren unterschiedlich lange Transkripte.** Zu sehen ist die relative Expression ( $\Delta\Delta Ct$ ) von *cmu1*, *hdp1*, *UMAG\_06308* und *UMAG\_03923* und des jeweils längeren Transkripts in UMJ32 (*a2 Δb ip'[P<sub>crq1</sub>:hdp2]ip<sup>s</sup>*), UMJ33 (*a2 Δb ip'[P<sub>crq1</sub>:biz1]ip<sup>s</sup>*) und UMJ56 (*a2 Δb::P<sub>crq1</sub>:rbf1 Δbiz1 Δhdp2*). Zur Normalisierung diente das Gen *eIF2B*. Die Berechnung erfolgte relativ zur jeweils nicht induzierten Probe. Das Experiment wurde in biologischen Triplikaten mit jeweils technischen Duplikaten durchgeführt. Dargestellt sind die Mittelwerte der biologischen Replikate. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung der Mittelwerte der biologischen Triplikate. AB31 RNA-Seq (dunkelrot) stellt die Expression unter axenischen Bedingungen im Stamm AB31 (*a2 P<sub>crq1</sub>:bW2, bE1*) nach *b*-Induktion dar (Datensatz aus Kellner *et al.*, 2014). *In planta* RNA-Seq (grün) stellt die Expression *in planta* bei 8 dpi dar (Datensatz aus Tollot *et al.*, 2016). Rbf1:3xHA (rot) zeigt die Anreicherung von Rbf1:3xHA im Stamm UDS5 (*a2 P<sub>crq1</sub>:bW2, bE1 rbf1:3xHA*) in der jeweiligen Promotorregion (Datensatz aus Ulrich, 2020). Hdp2:3xHA *in planta* (dunkelgrün) zeigt die Anreicherung von Hdp2:3xHA *in planta* 7 dpi (UMJ14 x UMJ15; *a1 b1 hdp2:3xHA x a2 b2 hdp2:3xHA*) in der jeweiligen Promotorregion. Hdp2:3xHA *in vitro* (orange) zeigt die Anreicherung von Hdp2:3xHA im Stamm UJU2 (*a2 Δb ip'[P<sub>crq1</sub>:hdp2:3xHA]ip<sup>s</sup>*) in der jeweiligen Promotorregion (Datensatz aus Ulrich, 2020). Biz1:3xHA *in vitro* zeigt die Anreicherung von Biz1:3xHA im Stamm UJU4 (*a2 Δb ip'[P<sub>crq1</sub>:biz1:3xHA]ip<sup>s</sup>*) in der jeweiligen Promotorregion (Datensatz aus Ulrich, 2020) *Reads* wurden mit Bowtie2 version 2.0.0-beta7 (Langmead und Salzberg, 2012) auf das *U. maydis* Genom (Ensembl Genomes 33 (Kersey *et al.*, 2018) aligniert. Zur visuellen Darstellung der *reads* wurde der Generic Genome Browser Version 2.33 verwendet. Profile von *peaks* sind repräsentiert durch normalisierte *read counts*. Die Spuren AB31 RNA-Seq und *in planta* RNA-Seq wurden bereits in Abbildung 2.30 verwendet und sind in dieser Abbildung zur Übersicht nochmals gezeigt.

Die qRT-PCRs zeigen, dass Hdp2, Biz1 und Rbf1 in der Lage sind, die untersuchten Gene zu induzieren (Abbildung 2.31). Der Einfluss der Biz1 Induktion wurde nur bei *UMAG\_06308* untersucht. Zudem konnte festgestellt werden, welcher der Transkriptionsfaktoren zu einem längeren Transkript führt. Das Gen *cmu1* wird stärker durch Hdp2 induziert als durch Rbf1, allerdings ist die Induktion von *cmu1<sup>L</sup>* in UMJ56 wesentlich höher. Im Gegensatz dazu wird *hdp1<sup>L</sup>* in UMJ56 kaum (20-fach) exprimiert, während *hdp1* in UMJ32 und UMJ56 ungefähr gleich stark induziert wird. Trotz Bindung von Hdp2:3xHA am Promotor von *UMAG\_06308*, scheint das Gen lediglich durch Rbf1 und Biz1 induziert zu werden. In UMJ32 werden *UMAG\_06308* und *UMAG\_06308<sup>L</sup>* nicht mehr als 1,6- bzw. 0,75-fach, im Vergleich zur nicht induzierten Probe, induziert. Nach Biz1 Induktion verdoppelt sich die Expression von *UMAG\_06308<sup>L</sup>* lediglich, während sie sich nach Rbf1 Induktion vervierfacht. Die Expression von *UMAG\_03923* und *UMAG\_03923<sup>L</sup>* kann in UMJ32 und UMJ56 induziert werden. Im Fall von *cmu1* und *hdp1* korreliert die Expression des längeren Transkripts mit dem weiter *upstream* bindenden Transkriptionsfaktor. Bei *cmu1* scheint Hdp2:3xHA in unmittelbarer Nähe des Transkriptionsstarts (TSS) von *cmu1<sup>L</sup>* zu binden, *cmu1<sup>L</sup>* wird jedoch durch Rbf1, was weiter *upstream* als Hdp2 bindet, induziert. Umgekehrt führt Hdp2 zur Induktion von *hdp1<sup>L</sup>*, während Rbf1:3xHA weiter *downstream* von Hdp2:3xHA (mit Ausnahme des Hdp2:3xHA *peaks* im Intron) im TSS von *hdp1<sup>L</sup>* bindet. Die relative Nähe der Bindeposition zum TSS (oder ORF) ist demnach nicht ausschlaggebend, welcher Transkriptionsfaktor das jeweilige Gen induziert.

Zusammen mit *hdp2* konnten in dieser Arbeit mehrere Beispiele für alternative Promotoren in *U. maydis* identifiziert werden. Der genaue Zweck dieser Promotoren und welchen Einfluss die resultierenden Genprodukte letzten Endes haben, bleibt Spekulation und erfordert daher weitere Untersuchungen.

### 3. Diskussion

In dieser Arbeit wurden neue Einblicke in das frühe Stadium der pathogenen Entwicklung und der dabei involvierten Transkriptionsfaktoren von *U. maydis* gewonnen. Die Transition von saprophytischer zu biotropher Lebensphase wird durch die *b*-vermittelte Signalkaskade und ihrem Masterregulator Rbf1 ausgelöst (Heimel *et al.*, 2010b). Der Zinkfingertranskriptionsfaktor Rbf1 ist hierbei sowohl notwendig als auch ausreichend für die Initialisierung und Etablierung der pathogenen Phase, da er essenzielle Schritte wie filamentöses Wachstum, G2-Zellzyklusarrest, Appressorienbildung und Penetration der Pflanzenoberfläche einleitet. Obwohl der Übergang zur Biotrophie nicht ohne *rbf1* vollzogen werden kann (Heimel *et al.*, 2010b), ist dessen zeitliche Aktivität streng limitiert, da eine erzwungene prolongierte Expression zu einer aberranten Zellkernverteilung und Verlust der Pathogenität führt.

ChIP-Seq- und Expressionsanalysen deuten darauf hin, dass die Expression von zuvor *rbf1*-regulierten Genen hierbei zum Teil von den ebenfalls *rbf1*-abhängigen Transkriptionsfaktoren Hdp2 und Biz1 *in planta* aufrechterhalten wird. Neben der Regulation dieser Gene, treiben Hdp2 und Biz1 die biotrophe Phase durch Induktion pathogenitätsrelevanter Effektoren und Fortführung der Signalkaskade voran. Der Homeodomänentranskriptionsfaktor Hdp2 wird nicht nur durch *rbf1*-abhängig reguliert, sondern *in planta* durch Bindung von Biz1 an einen alternativen Promotor im Intron von *hdp2* induziert. Der Einsatz von zwei verschiedenen Promotoren resultiert dabei in Transkripten mit unterschiedlicher RNA-Prozessierung. Die entstehenden Protein-Isoformen weichen zwar um 55 AS im N-Terminus voneinander ab, scheinen allerdings dieselben Funktionen zu übernehmen. Die Verwendung alternativer Promotoren konnte bei weiteren Genen von *U. maydis* gezeigt werden und ähnelt der entwicklungspezifischen Genregulation höherer Eukaryoten.

#### 3.1 Rbf1 wird lediglich für die Transition und Etablierung der biotrophen Phase benötigt

Es ist bekannt, dass Rbf1 der Masterregulator der *b*-vermittelten Signalkaskade und notwendig für die pathogene Entwicklung ist, da die Deletion von *rbf1* zum Verlust der Virulenz führt (Heimel *et al.*, 2010b). Für die Initiation der pathogenen Phase ist *rbf1* ausreichend, da Stämme ohne *b*-Locus weiterhin im Stande sind die Pflanze zu penetrieren, die anschließende Proliferation bleibt jedoch aufgrund des fehlenden *b*-Heterodimers aus (Heimel *et al.*, 2010a; Wahl *et al.*, 2010a). Microarraydaten zeigen, dass *rbf1* Transkripte bereits eine Stunde nach artifizierlicher *b*-Induktion detektiert werden können (Heimel *et al.*, 2010b). Wie Expressionsanalysen und fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen zeigen, wird *rbf1* während des Infektionsprozesses nur

zwischen 0,5 und 2 dpi exprimiert (Abbildung 2.1 & Abbildung 2.2). In diesem Zeitraum beginnen Hyphen Appressorien auszubilden und die Pflanzenoberfläche zu penetrieren, wofür ein in G2 arretierter Zellzyklus notwendig ist (Castanheira *et al.*, 2014; Castanheira und Perez-Martin, 2015). Der Arrest wird bereits mit der Pheromonkaskade eingeleitet (Garcia-Muse *et al.*, 2003) und nach erfolgreicher Paarung zweier kompatibler Sporidien durch *b* bzw. *rbf1* aufrechterhalten, indem die Cycline Cln1, Clb1 und Clb2 (Garcia-Muse *et al.*, 2004; Castillo-Lluva und Perez-Martin, 2005) reprimiert werden (Heimel *et al.*, 2010b). Die prognostizierte Aktivität von *rbf1* während der Appressorienbildung konnte anhand der beobachteten Promotoraktivität in Abbildung 2.2 bestätigt werden. Das durch den *rbf1*-Promotor exprimierte GFP-Signal, welches dadurch das Aktivitätsmuster von *rbf1* abbildet, war zwar während der Bildung der Appressorien vorhanden, drei Tage nach der Infektion konnte bei Hyphen, die *in planta* proliferierten, jedoch keine Fluoreszenz mehr festgestellt werden. *U. maydis* scheint hierbei gewährleisten zu wollen, dass *rbf1* nur zu spezifischen Zeitpunkten exprimiert wird. Um anschließend innerhalb der Pflanze proliferieren zu können, muss der G2-Zellzyklusarrest, der unter anderem durch *rbf1* ausgelöst wird, wieder aufgehoben werden. Dies wird durch die Interaktion zwischen bW/bE und dem Protein Clp1 in Form einer negativen Rückkopplungsschleife vermittelt (Heimel *et al.*, 2010a). Als eines der wenigen direkt *b*-abhängigen Gene wird *clp1* zwar schon früh exprimiert, ein stabiles Protein liegt jedoch erst zum Zeitpunkt der Pflanzenpenetration vor (Scherer *et al.*, 2006). Zusammen mit dem b-Heterodimer werden *b*-abhängige Prozesse, wie der Zellzyklusarrest, auf transkriptioneller Ebene blockiert (Heimel *et al.*, 2010a; Fortenbacher, 2019). Zu den Zielgenen des bW/bE-Clp1 Komplexes gehört auch *rbf1*. Nach Bindung von bW/bE-Clp1 an den *rbf1*-Promotor wird *rbf1* durch einen noch ungeklärten Mechanismus reprimiert und nimmt dabei eine Sonderposition ein, da es als einziges bW/bE-Clp1-reprimiertes Gen durchgängig *in planta* (ab 3 dpi) inaktiv bleibt (Fortenbacher, 2019). Die *unfolded protein response* (UPR), die eine korrekte Homöostase im endoplasmatischen Retikulum bei Stress garantiert (Walter und Ron, 2011), nimmt hier eine wesentliche Rolle ein. Der Hauptregulator der UPR, der bZIP-Transkriptionsfaktor Cib1, ist für die Stabilisierung von Clp1 durch gemeinsame Interaktion verantwortlich (Heimel *et al.*, 2010a; Heimel *et al.*, 2013). Zudem kann eine Deregulation der *b*-Kaskade durch die Aktivierung der *cib1*-vermittelten UPR Antwort in einer dosisabhängigen (und *clp1*-unabhängigen) Weise beobachtet werden (Heimel *et al.*, 2013). Diese Deregulation findet dabei vermutlich nach der Pflanzenpenetration statt und unterstützt somit die *clp1*-abhängige Repression von *rbf1*. Des Weiteren konnte mit Hilfe von konditionellen *rbf1* Deletionsmutanten gezeigt werden, dass *rbf1* nach erfolgreicher Pflanzenpenetration *in planta* deletiert werden kann, ohne negative Auswirkungen auf die weitere Entwicklung zu haben (de la Torre *et al.*, 2021, eingereicht).



*U. maydis* scheint demnach mehrere Mechanismen einzusetzen, um sicherzustellen, dass *rbf1* zum korrekten Zeitpunkt reprimiert wird, da eine prolongierte Expression von *rbf1* gravierende Folgen für die pathogene Entwicklung hat, wie in Kapitel 2.1.2 gezeigt werden konnte. Während die Bildung von Appressorien nicht beeinträchtigt ist, führt die konstitutive Expression von *rbf1* im weiteren Verlauf des Lebenszyklus zum Verlust der Pathogenität (Abbildung 2.4). Begleitet wird dies neben dem Ausbleiben weiterer Kernteilungen auch von einer aberranten Verteilung. Normalerweise liegen die Hyphen von *U. maydis* als Heterokaryon vor, bei dem die zwei Zellkerne von je einem parentalen Partner stammen. Während der Propagation *in planta* gewährleisten Schnallenzellen, die *clp1*-abhängig gebildet werden, die korrekte Verteilung der Zellkerne auf die einzelnen Kompartimente (Scherer *et al.*, 2006). Wie dabei die Zellkernidentität zustande kommt, ist noch unbekannt. Bei der korrekten Verteilung der Zellkerne müssen demnach folgende Zustände überprüft werden: 1. Wie viel Zellkerne enthält ein Kompartiment? 2. Hat ein Kompartiment Zellkerne beider Parental-Typen? Im Fall von UBF30 x UMJ47 (*a1 b1 H1:3xmCherry ip<sup>r</sup>[P<sub>hxt1</sub>:NLS:GFP]ip<sup>s</sup> x a2 b2 H1:3xmCherry ip<sup>r</sup>[P<sub>mig2-5</sub>:rbf1:3xHA]ip<sup>s</sup>) werden vier Zellkerne auf drei Kompartimente aufgeteilt, wovon meist das mittlere Kompartiment zwei Zellkerne erhält (Abbildung 2.6). Es kommt vor, dass die beiden Zellkerne des mittleren Kompartiments von UBF30 stammten und somit homokaryotisch vorliegen, während die flankierenden Kompartimente jeweils einen Zellkern von UMJ47 enthalten. Demnach scheinen gleich beide Kontrollpunkte der Verteilung beeinträchtigt zu sein. Die Deletion von *clp1* hat ebenfalls Auswirkungen auf die Kernmigration. Bereits vor der Schnallenzellenbildung, konnte bei  $\Delta clp1$  Stämmen beobachtet werden, dass die Zellkerne zum Zeitpunkt der Penetration in ihrer Migration blockiert sind und im Appressorium verweilen (Faist, 2017).*

Interessanterweise führt die *rbf1* Expression *in planta* beim solopathogenen Stamm UMJ44 ebenfalls zum Verlust der Pathogenität (Abbildung 6.2, Anhang). Die Zellkernverteilung konnte aufgrund des experimentellen Aufbaus zwar nicht untersucht werden, als solopathogener Stamm ist UMJ44 jedoch haploid und benötigt daher nicht dieselbe komplexe Koordination der Zellkerne nach der Mitose wie diploide Zellen. Der Grund für die drastisch reduzierte Virulenz scheint demnach der fortwährende G2-Zellzyklusarrest, der durch die prolongierte Expression von *rbf1* aufrechterhalten wird, zu sein. Der *rbf1*-ausgelöste Zellzyklusarrest und der Einfluss von Clp1 auf die Zellzykluskontrolle, die mit der Kernmigration gekoppelt ist, stehen im engen Verhältnis zueinander. Wie bereits erwähnt, wird *rbf1* im Wildtyp *clp1*-abhängig reprimiert (Heimel *et al.*, 2010a; Fortenbacher, 2019). Daraufhin wird der Zellzyklus reinitiiert und das Myzel beginnt sich innerhalb der Pflanze zu verzweigen. Hierbei kann nicht ausgeschlossen werden, dass Clp1 neben der Repression von *rbf1* zusätzliche positive Einflüsse auf die Wiederaufnahme des Zellzyklus hat. In UBF30 x UMJ47 wird die endogene *rbf1* Expression von Clp1 (zusammen mit bW/bE) zwar blockiert, das ektopisch integrierte *rbf1* unter Kontrolle des *mig2-5*-Promotors bleibt davon jedoch unbeeinflusst. Somit kommt es womöglich zu einem Konflikt

an Signalen, die die Synchronisation und Distribution der beiden mitotischen Kerne stört. Die zusätzliche Expression von *rbf1* in UBF30 x UMJ47 stellt anfänglich keine Probleme dar, da hierbei ein aktiver Zellzyklusarrest benötigt wird, weshalb die Ausbildung von Appressorien nicht negativ beeinflusst wird. Nach anschließender Penetration der Blattoberfläche reprimiert Clp1 die Expression des nativen *rbf1*-Gens und reinitiiert den Zellzyklus, woraufhin der Pilz in der Lage ist zumindest eine Teilung der Zellkerne zu vollziehen. Es konnte gezeigt werden, dass Rbf1 während der Appressorienbildung und kurz darauf noch vorhanden ist (Abbildung 2.2). Gleichzeitig wird Clp1 zum selben Zeitpunkt für die Migration der Kerne aus dem Appressorium benötigt (Faist, 2017). Dies legt nahe, dass eine gewisse Übergangphase zwischen der Stabilisierung von Clp1 und der Repression von *rbf1* besteht. Dies könnte erklären, warum niedrige *rbf1* Level noch toleriert werden, die es zulassen wenigstens eine Kernteilung zu absolvieren. Da das *P<sub>mig2-5</sub>:rbf1* Expressionsniveau höher als das des nativen *rbf1* liegt, kommt es dennoch zur Beeinträchtigung der Zellkernverteilung. Nachfolgende *rbf1* Level arretieren aufgrund der starken Induktion des *mig2-5*-Promotors und der fehlenden Repression durch Clp1 den Zellzyklus irreversibel, wodurch der Lebenszyklus nicht vollendet werden kann. Ein vergleichbarer Phänotyp kann bei  $\Delta clp1$  Stämmen beobachtet werden. Die Symptome von infizierten Pflanzen beschränken sich lediglich auf Chlorosen; weiteres invasives Wachstum von *U. maydis* nach der Penetration der Blattoberfläche kann nicht beobachtet werden (Scherer *et al.*, 2006). Zudem sind Zellen, die konstitutiv *rbf1* exprimieren, aufgrund des ausgelösten Zellzyklusarrests nicht lebensfähig (Heimel *et al.*, 2010b). Die Kontrolle des Arrests kann hierbei auf mehreren Wegen ablaufen. Nach Induktion des b-Heterodimers kommt es zu einer Repression der Zykline Cln1, Clb1 und Clb2, bei der *rbf1* notwendig und ausreichend ist (Heimel *et al.*, 2010b). Allein die Repression von *clb1* führt zu einem Zellzyklusarrest (Garcia-Muse *et al.*, 2004). Eine direkte Regulation durch Rbf1 kann vermutlich ausgeschlossen werden, da Rbf1 nicht am Promotor von *clb1* bindet (Ulrich, 2020). Der *rbf1*-abhängige Faktor Biz1 ist ebenfalls an der Repression von *clb1* beteiligt (Flor-Parra *et al.*, 2006; de la Torre *et al.*, 2020), doch auch dieser Einfluss scheint indirekt zu wirken, da Biz1 ebenso wenig am Promotor von *clb1* bindet (Ulrich, 2020)(diese Arbeit). Eine weitere Möglichkeit den Zellzyklus anzuhalten wäre über die Induktion von *hdp1*. Hdp1 reprimiert nicht nur *clb1*, sondern induziert auch das Zyklin Pcl12 (Pothiratana, 2008), das mit der zyklinabhängigen Kinase Cdk5 interagiert (Flor-Parra *et al.*, 2007). Während *clb1* vor und im Verlauf der Infektion eine stabile Expression aufweist, wird *pcl12* erst pflanzenassoziiert auf der Blattoberfläche zwischen 0,5 – 1 dpi stark exprimiert und korreliert hierbei zeitlich mit dem Einsetzen des Zellzyklusarrests im dikaryotischen Filament; zu späteren Zeitpunkten wird eine verminderte, aber durchgängige Expression verzeichnet (Lanver *et al.*, 2018). Da gezeigt werden konnte, dass die Überexpression von *pcl12* den Zellzyklus arretiert, erweckt es den Anschein, maßgeblich am *rbf1*-vermittelten G2-Zellzyklusarrest beteiligt zu sein (Flor-Parra *et al.*, 2007). Um dies zu überprüfen, könnte in nachfolgenden Experimenten *pcl12*,

mangels pathogenitätsrelevanter Bedeutung, deletiert werden (Flor-Parra *et al.*, 2007), um eine mögliche Suppressormutation in Stämmen mit prolongierter *rbf1* Expression zu generieren.

All dies spricht dafür, dass die aberrante Zellkernverteilung lediglich ein Nebenprodukt von kollidierenden Signalen der Zellzykluskontrolle, ausgelöst durch den *rbf1* induzierten G2-Zellzyklusarrest, ist und dass dieser die Ursache für den Verlust der Pathogenität ist. Die Repression von *rbf1 in planta* scheint demnach nicht nur hinnehmbar, sondern muss zwingend sichergestellt werden, um die weitere pathogene Entwicklung von *U. maydis* zu gewährleisten.

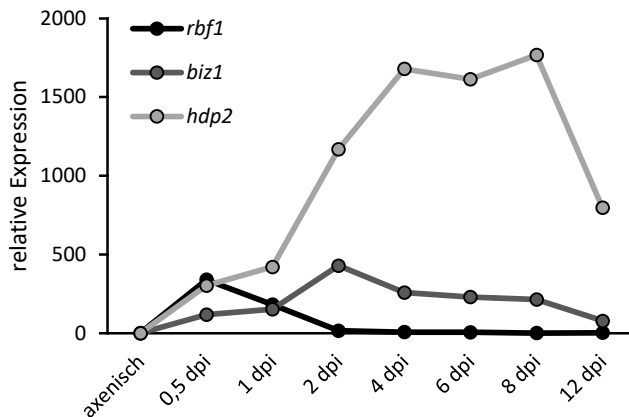
### 3.2 Hdp2 und Biz1 halten die Expression *rbf1*-regulierter Gene *in planta* aufrecht

Durch genomweite Expressionsanalysen konnten nach Induktion eines aktiven b-Heterodimers 345 (Heimel *et al.*, 2010b) bzw. 184 (Ulrich, 2020) differenziell *b*-regulierte Gene identifiziert werden. Ungeachtet der abweichenden Anzahl an Genen, was auf unterschiedliche Methodik und Medien zurückzuführen ist, steuert Rbf1 die Expression von 90 % dieser Gene. 75 % der 162 *rbf1*-abhängig regulierten Gene können in definierte Cluster (Lanver *et al.*, 2018) eingeordnet werden (Abbildung 2.8). Die Cluster gruppieren Gene nach ihrem Expressionsprofil in axenischer Kultur und während des Infektionsprozesses bis 12 dpi. Neben anderen Transkriptionsfaktoren wird *rbf1* hierbei als Haupteinflussfaktor für die Expression der Gene im *red* Cluster, die lediglich auf der Blattoberfläche zwischen 0,5 und 1 dpi induziert werden, diskutiert (Lanver *et al.*, 2018). In diesem Cluster befinden sich vorwiegend Gene für hydrolytische Enzyme wie Cutinasen, Lipasen und Peptidasen, die womöglich bei der Zersetzung der pflanzlichen Cuticula eine Rolle spielen und somit auf die Penetration vorbereiten. Die Appressorium-ähnlichen Strukturen, die *rbf1*-abhängig (Heimel *et al.*, 2010b) in *U. maydis* gebildet werden, unterscheiden sich im Vergleich zu anderen phytopathogenen Pilzen. In *Magnaporthe grisea* und *Colletotrichum spp.* finden Melanineinlagerungen und eine Erhöhung des Turgordrucks in den Appressorien statt, um die Blattoberfläche mittels mechanischer Krafteinwirkung zu penetrieren (Talbot, 2003). Bei *U. maydis* erfolgt die Penetration stattdessen vermutlich durch lytische Enzyme (Kahmann und Kämper, 2004; Schirawski *et al.*, 2005). 12 der 35 *rbf1*-regulierten Gene im *red* Cluster besitzen ein putatives Sekretionssignal. Da *rbf1* selbst dem *red* Cluster angehört und der zeitliche Rahmen von beiden miteinander korreliert, stellt *rbf1* durchaus einen geeigneten Kandidaten als Hauptregulator des *red* Clusters dar. Allerdings muss berücksichtigt werden, dass die Genexpression nach axenischer *rbf1* Induktion mit der natürlichen Expression auf der Blattoberfläche verglichen wird. Phytopathogene Pilze nutzen die Wahrnehmung von pflanzlichen Oberflächenmolekülen, um auf ihr Umfeld reagieren zu können und sich auf die Kolonisation der Pflanze, in Form der Appressorienbildung, vorzubereiten (Tucker und Talbot, 2001). Die Erkennung von hydrophoben Oberflächen und Cutinmonomeren (wie Hexadecansäure) führen in *U. maydis* nicht nur zur Induktion von zellwanddegradierenden Enzymen und Effektoren, sondern ändert die Expression von ca. 20 % aller Gene (Mendoza-Mendoza *et al.*, 2009; Lanver *et al.*, 2014). Solche Signalmoleküle fehlen in axenischer Kultur oder können nur eingeschränkt imitiert werden, wodurch nicht alle *rbf1* Zielgene adäquat stimuliert werden können. Dies zeigen Microarrayanalysen des solopathogenen Stamms SG200. Wird *rbf1* in SG200 deletiert, finden sich 16 Stunden nach Infektion 82 deregulierte Gene, die nicht in, unter axenischen Bedingungen durchgeführten, Expressionsanalysen als *rbf1*-abhängig kategorisiert wurden (Heimel *et al.*, 2010b; Ulrich, 2020) (M. Vraneš, unveröffentlicht).

Die meisten der *rbf1*-regulierten Gene werden dem *magenta* Cluster zugeordnet, die ab 0,5 dpi bis 12 dpi exprimiert werden. Trotz der hohen Anzahl an Genen im *magenta* Cluster die *rbf1*-abhängig reguliert werden, konnten Analysen keine Verbindung zwischen *rbf1* um dem *magenta* Cluster identifizieren (Lanver *et al.*, 2018). Diese Untersuchungen beruhen ausschließlich auf der Koexpression von Transkriptionsfaktoren unter physiologischen Bedingungen. Wie zuvor diskutiert, ist es für die Infektion zwingend erforderlich, dass *rbf1* 3 dpi reprimiert wird. Gene des *magenta* Clusters werden hingegen zwischen 0,5 und 12 dpi exprimiert und sind mit der Etablierung und Instandhaltung der biotrophen Phase assoziiert (Lanver *et al.*, 2018). Die fehlende Verbindung zwischen *rbf1* und dem *magenta* Cluster kommt möglicherweise dadurch zustande, dass die meisten pathogenitätsrelevanten bzw. pflanzeninduzierten Transkriptionsfaktoren nicht mit *rbf1* koexprimiert, sondern *rbf1*-abhängig reguliert werden. Zusammen mit dem *light-cyan* und *cyan* Cluster, die beide ebenfalls bis 12 dpi aktiv sind, werden die Hälfte der 162 *rbf1*-regulierten Gene weiterhin *in planta* exprimiert. Demnach braucht es ergänzende Transkriptionsfaktoren, welche die Expression der genannten Cluster steuern und die *b*-vermittelte Signalkaskade weiterführen. Durch die systematische Deletion von *rbf1*-abhängigen Transkriptionsfaktoren, konnten potenzielle Kandidaten ermittelt werden. Die Deletionen von *hdp1* (Pothiratana, 2008), *UMAG\_04581*, *UMAG\_00473*, *UMAG\_05486* und *UMAG\_03296* zeigten keine Auswirkung auf die Pathogenität (Abbildung 6.3, Anhang). Der Fokus richtete sich daher auf *hdp2* und *biz1*, da beide essenziell für die Virulenz von *U. maydis* sind (Flor-Parra *et al.*, 2006; Heimel *et al.*, 2010b; Lanver *et al.*, 2014).

ChIP-Seq Daten konnten zeigen, dass 60 % der Gene, deren Promotoren mit Rbf1:3xHA unter axenischen Bedingungen angereichert werden konnten, ebenso von Hdp2:3xHA und/oder Biz1:3xHA gebunden wurden (Abbildung 2.9). Die Zahlen beruhen hierbei auf die in (Ulrich, 2020) generierten Daten und weichen aufgrund anderer Filterkriterien von der ursprünglichen Analyse ab. Durch die in dieser Arbeit durchgeführten ChIP-Seq Experimente *in planta* konnten dabei weitere Gene identifiziert werden (Abbildung 2.10). Durch die *in planta* ChIP-Seq Experimente mit Hdp2:3xHA und Biz1:3xHA konnten zusätzlich 23 Promotoren bzw. 3 Promotoren mit einer Bindung von Rbf1:3xHA identifiziert werden. Bei diesem Vergleich konnte zudem festgestellt werden, dass Hdp2 *in vitro* und *in planta* ein verändertes Bindeverhalten aufweist. Dies wird jedoch in einem späteren Kapitel separat diskutiert. Die marginale Überschneidung zwischen den Rbf1:3xHA und Biz1:3xHA *in planta* gebundenen Promotoren ist möglicherweise auf die geringe Qualität der ChIP-Seq und den Zeitpunkt zurückzuführen. Um eine ausreichende Menge an Biz1 für die Durchführung der ChIP akkumulieren zu können, wurden die Proben für die ChIP-Seq sieben Tage nach der Infektion entnommen, da sich zu diesem Zeitpunkt genügend pilzliche Biomasse gebildet hatte. Das Expressionsmaximum für *biz1* liegt allerdings bei 2 dpi (siehe Abbildung 3.1), einem Zeitpunkt, an dem nur wenig Protein für die ChIP-Seq Experimente zur Verfügung steht und daher nicht untersucht wurde. Gleichzeitig impliziert die

Expressionsabnahme ab 2 dpi, dass *biz1* vorwiegend im frühen Stadium der Infektion benötigt wird und sich damit die Anzahl an potenziellen Zielgenen im Verlauf verringert.



**Abbildung 3.1: Expression von *rbf1*, *biz1* und *hdp2* in planta.** Bereits zu Beginn der Infektion bei 0,5 dpi werden *rbf1*, *biz1* und *hdp2* exprimiert. Anschließend sinkt die Expression von *rbf1* und ist ab 2 dpi nicht mehr vorhanden. Im Gegensatz dazu werden *biz1* und *hdp2* weiterhin induziert. Während das Maximum von *biz1* bereits bei 2 dpi liegt, ist die Expression von *hdp2* zu diesem Zeitpunkt nicht nur höher, sondern steigt bis 8 dpi rapide an (Datensatz aus Lanver *et al.*, 2018).

Nur neun Gene, deren Promotoren von Rbf1, sowie Hdp2 bzw. Biz1 gebunden werden, werden durch die genannten Faktoren auch reguliert, was etwa 6 % entspricht. Die Gene *UMAG\_05528*, *UMAG\_10000* und *hdp2* werden unabhängig von Rbf1 und Biz1 induziert. Rbf1 und Hdp2 induzieren die Gene *UMAG\_03923*, *UMAG\_06308*, *UMAG\_15097* und *hdp1*. Die beiden Gene *UMAG\_06158* und *cmu1* werden durch alle drei Faktoren reguliert. Auf die Regulation von *cmu1*, *hdp1*, *hdp2*, *UMAG\_03923* und *UMAG\_06308* wird in späteren Kapiteln näher eingegangen. Bis auf *UMAG\_15097*, dem keine Funktion zugeschrieben werden kann, kodieren die restlichen Genen entweder für putativ sekretierte Proteine oder Transkriptionsfaktoren. Die Gene *UMAG\_10000* und *UMAG\_05528* kodieren für vorhergesagte Glykosidasen, die Kohlenhydrate bzw. Hemicellulose als Substrat hydrolysieren. *UMAG\_06158* ist eine putativ sekretierte Glutaminase, deren *biz1*-abhängige Regulation bereits gezeigt werden konnte und vor der Sekretion womöglich glykosyliert werden muss (Marin-Menguiano *et al.*, 2019). *UMAG\_03923* besitzt lediglich ein vorhergesagtes Sekretionssignal. *Cmu1* ist eine Chorismatmutase, welche die pflanzliche Salizylsäuresynthese hemmt (Djamei *et al.*, 2011).

An dieser Stelle kann nun argumentiert werden, dass die Induktion dieser Gene nicht unabhängig abläuft, sondern rein über Hdp2 oder Biz1. Rbf1 würde bei deren Regulation lediglich eine untergeordnete Rolle spielen, da *hdp2* und *biz1* selbst *rbf1*-abhängig reguliert werden. Die Bindung von Rbf1 an den Promotoren wäre hierbei unterstützend und trägt keine Relevanz bei der Induktion der Gene. Dies kann beispielsweise bei *rop1* beobachtet werden. Rbf1 bindet zwar an dessen Promotor, für die Induktion ist jedoch Hdp1 erforderlich, welches wiederum *rbf1*-reguliert ist (Ulrich, 2020). Expressions- und ChIP-Seq-Analysen der Gene *UMAG\_03923*, *UMAG\_06308*, *hdp1*, *hdp2* und *cmu1* zeigen (Abbildung 2.22 & Abbildung 2.31), dass Rbf1, Biz1 und Hdp2 durchaus

unabhängig voneinander an dieselben Promotoren binden und zur Induktion der entsprechenden Zielgene führen.

Dennoch scheint die Zahl der gemeinsam regulierten Gene von Rbf1 und Hdp2/Biz1 niedrig auszufallen. Dies stößt jedoch abermals auf dieselbe Problematik, dass die Induktion der Transkriptionsfaktoren unter axenischen Bedingungen eine isolierte Betrachtungsweise darstellt. So fehlen nicht nur pflanzliche Signale, sondern auch mögliche Interaktionspartner, die über andere, nicht Paarungstyp-vermittelte, Transduktionskaskaden induziert werden. Die Transmembranproteine Sho1 und Msb2 erkennen nicht näher definierte Signalmoleküle auf der Blattoberfläche und agieren, durch die Weiterleitung der Signale an die MAP-Kinasen Kpp2 und Kpp6 (Brachmann *et al.*, 2003), dabei als Relais (Lanver *et al.*, 2010). Angesichts der Interaktion mit den beiden MAP-Kinasen und der Tatsache, dass  $\Delta sho1 \Delta msb2$  Stämme die Pflanze nicht penetrieren können, sind Sho1 und Msb2 essenziell für die Appressorienbildung (Lanver *et al.*, 2010). Zudem konnte gezeigt werden, dass sie als *b*-unabhängige Faktoren zur Induktion von *hdp2* und *biz1* führen und somit in der Lage sind in die *b*-Kaskade einzugreifen. Nichtsdestotrotz konnte zumindest für eine Teilmenge an *rbf1*-regulierten Genen gezeigt werden, dass deren Regulation von Hdp2 und/oder Biz1 *in planta* weitergeführt wird, nachdem *rbf1* inaktiviert wird. Dies bestärkt die Annahme, dass *rbf1* lediglich für die Etablierung der biotrophen Phase verantwortlich ist und vor allem *hdp2* die pathogene Entwicklung von *U. maydis* vorantreibt.

### 3.3 Hdp2 treibt die biotrophe Phase nach der Penetration voran

Im Rahmen dieser Arbeit konnten mit Hilfe von ChIP-Seq Analysen 822 Gene identifiziert werden, deren Promotoren von Hdp2 gebunden werden. Fast 600 dieser Gene können in die bereits beschriebenen Clustern aus (Lanver *et al.*, 2018) eingeteilt werden. Eines der anteilsgrößten Cluster ist hierbei das *magenta* Cluster, das ab 0,5 dpi exprimiert wird. Wie im vorherigen Kapitel diskutiert wurde, werden die meisten *rbf1*-regulierten Gene diesem Cluster zwar zugeordnet, allerdings wird Rbf1 nicht als potenzieller Regulator dieses Clusters diskutiert (Lanver *et al.*, 2018). Aufgrund der frühen Repression von *rbf1*, kann die Expression der *rbf1*-regulierten Gene im *magenta* Cluster über den gesamten Zeitraum ohne weitere Transkriptionsfaktoren nicht gewährleistet werden. Umso wahrscheinlicher ist es, dass Hdp2 die Regulation dieser Gene übernimmt. Hdp2 könnte zusätzlich am Neustart des Zellzyklus und der initialen Propagation *in planta* beteiligt sein. 63 Gene sind im *yellow* Cluster, dem größten der 14 Cluster, zu finden. Die darin vorkommenden Gene werden bereits ohne Wirt exprimiert und sind mit metabolischen Prozessen, wie Aminosäure- und Nucleinsäurebiosynthese, Translation oder Zellteilung assoziiert (Lanver *et al.*, 2018). Auf der Blattoberfläche zwischen 0,5 und 1 dpi, sinkt die Expression dieser Gene drastisch; einem Zeitpunkt, an dem der Zellzyklus durch die Paarungstypocli arretiert ist (Garcia-Muse *et al.*, 2003; Heimel *et al.*, 2010b). Nach Penetration der Pflanze und Auflösung des Zellzyklusarrests, steigt die Expression des *yellow* Clusters kurzfristig wieder an. Auf der Blattoberfläche erleidet *U. maydis* einen Nährstoffmangel. Um daher nach dem Eindringen die Verzweigung und Proliferation des Myzels schnellstmöglich vorantreiben zu können, müssen verstärkt metabolische Prozesse mobilisiert werden. *S. cerevisiae* gleicht solch einen Defizit mit einer erhöhten Transkriptionsrate der beteiligten Gene aus (Conway *et al.*, 2012). Eine Beteiligung von *hdp2* an der Zellzykluskontrolle kann außerdem anhand der Regulation von *pcl12* beobachtet werden. Wie zuvor erwähnt, wird *pcl12* *hdp1*-abhängig induziert (Pothiratana, 2008), dessen Expression wiederum direkt über Hdp2 gesteuert wird (siehe Abbildung 2.31). Der *pcl12*-vermittelte Zellzyklusarrest stellt daher einen möglichen Grund dar, weshalb Zellen mit konstitutiv aktiven *hdp2* nicht lebensfähig sind. Darüber hinaus wird *pcl12* auf der Blattoberfläche verstärkt induziert, sobald *hdp2* deletiert wird (M. Vraneš, unveröffentlicht). Diese ambivalente Beziehung könnte eine Feinabstimmung darstellen, die eine Balance der Zellzykluskontrollkomponenten nach der Pflanzenpenetration gewährleistet.

Mehr als ein Viertel aller Gene, deren Promotoren mit Hdp2 angereichert werden können, werden dem *cyan* Cluster zugeteilt. Da es zeitlich mit der Tumorbildung korreliert, gilt es als Hauptmodul der biotrophen Phase (Lanver *et al.*, 2018). Zusammen mit dem *magenta* Cluster, kann eine Überrepräsentation an sekretierten Proteinen festgestellt werden. Dies kann ebenfalls in der Gene Ontology Analyse beobachtet werden (Abbildung 2.11). Die vorwiegende Lokalisation der



Genprodukte potenzieller Zielgene von Hdp2 wird in Kompartimenten und Zellorganellen der Wirtszellen vermutet. Zudem kann eine Anreicherung von Klassen mit Assoziationen zu Nukleinsäuren, DNA-Bindung und Transkriptionsfaktoraktivität beobachtet werden. Die Expressionsprofile von Hdp2 Zielgenen während des Infektionsprozesses und die prognostizierte Lokalisation sowie Funktion der entsprechenden Proteine, lässt darauf schließen, dass Hdp2 für die Regulation von sekretierten Proteinen sowie weiteren Transkriptionsfaktoren verantwortlich ist. Die putative Funktion und das auf den Infektionsprozess bezogene zeitliche Expressionsmuster der Zielgene, unterstreichen die Rolle von Hdp2 in der biotrophen Phase und werden in separaten Kapiteln diskutiert.

Die Bindung von Transkriptionsfaktoren an Promotoren, garantiert nicht die Expression des entsprechenden Gens. Die Kombination aus ChIP-Seq, Expressions- und bioinformatischen Analysen grenzt potenzielle Zielgene zwar näher ein, aufgrund der limitierten Expressionsdaten differenzieller Hdp2 Induktion konnte das volle Spektrum jedoch nicht ausgeschöpft werden. Die axenische Induktion von *hdp2* lässt hinsichtlich der bereits genannten Gründe bezüglich fehlender Pflanzensignale wenig Schlussfolgerungen zu. Microarraydaten von  $\Delta hdp2$  Stämmen auf der Pflanzenoberfläche werden zwar unter physiologischen Bedingungen ermittelt, jedoch können keine späteren Zeitpunkte betrachtet werden. Die Deletion von *hdp2* führt zum Ausbleiben der Appressorienbildung, woraufhin *U. maydis* nicht mehr in der Lage ist die Pflanze zu penetrieren und den Lebenszyklus zu vollenden (Heimel *et al.*, 2010b; Lanver *et al.*, 2014). Zudem kann die differenzielle Expression der Gene, die von mehr als einem Transkriptionsfaktor reguliert werden, zu diesem Zeitpunkt nicht erfasst werden. Wie gezeigt wurde, können Rbf1 und Hdp2 unabhängig voneinander Gene induzieren (Abbildung 2.31). Sind Rbf1 und Hdp2 demnach gleichzeitig anwesend, würde die Deletion von *rbf1* oder *hdp2* nur einen geringen Einfluss auf die Expression der Zielgene haben.

Die Expression von *hdp2* erreicht acht Tage nach der Infektion ihr Maximum, ohne dabei anschließend völlig auszusetzen. Dies impliziert, dass *hdp2* bis zur Sporulation hin relevant bleibt und *U. maydis* auch während dem invasiven Wachstum auf die regulatorische Funktion von *hdp2* angewiesen ist. Hemibiotrophe Phytopathogene wie *Colltotrichum spp.* (O'Connell *et al.*, 2012) und *Phytophthora capsici* (Jupe *et al.*, 2013), sowie Pilze mit dimorphen Lebenszyklen wie das opportunistische Humanpathogen *C. albicans* (Rodriguez *et al.*, 2020) erfordern beim Wechsel ihres Lebensstils einen völlig neuen Satz an Genen, der exprimiert werden muss. Um sich diesem Wandel anpassen zu können, braucht es daher genomweite Umgestaltungen der Transkription und ihrer Maschinerie. Der Wechsel von saprophytischer zu biotropher Phase bei *U. maydis* bildet dabei keine Ausnahme. In Anbetracht der frühzeitigen Expression von *hdp2*, die bis zur Sporulation aufrechterhalten wird, ist es sehr wahrscheinlich, dass Hdp2 Gene induziert, die auf der Blattoberfläche sowie *in planta* benötigt werden. Um die Zielgene identifizieren zu können, die erst *in planta* exprimiert werden, wäre es notwendig, *hdp2* nach dem Eindringen in die Pflanze

abzuschalten, damit eine Veränderung der Expression beobachtet werden kann. Der Einsatz konditioneller Deletionsmutanten erlaubt es, Gene stadien- oder gewebespezifisch zu deletieren und ist eine weitverbreitete Technik, die vor allem bei der Forschung im Maussystem zum Einsatz kommt (Bouabe und Okkenhaug, 2013). In *U. maydis* konnte die Anwendbarkeit dieser Methode ebenfalls gezeigt werden (de la Torre *et al.*, 2021, eingereicht). Dies würde es ermöglichen, *hdp2 in planta* zu deletieren und die Auswirkung der Deletion auf die Expression von Zielgenen zu bestimmen. Um den Einfluss von *hdp2* auf die biotrophe Phase und deren beteiligte Gene weiter entschlüsseln zu können, verspricht die Kombination aus stadienspezifischen Promotoren und Rekombinasesystemen daher ein vielversprechendes Werkzeug zu sein.

### 3.3.1 Das Bindeverhalten von Hdp2 *in vitro* vs. *in planta*

Durch den Vergleich, der *in vitro* ChIP-Seq Daten (Ulrich, 2020) mit den *in planta* (diese Arbeit) erhobenen ChIP-Seq Daten konnte festgestellt werden, dass die Hdp2 Bindung von der jeweiligen Kondition abhängt (Abbildung 2.14). Dabei ändern sich nicht nur die Zielgene, sondern auch die Position am selben Promotor. Variierende Zielgene können dahingehend erklärt werden, dass *U. maydis* sich an veränderte Umwelteinflüsse anpasst, indem andere transkriptionelle Protokolle ausgeführt werden. Während der Pilz auf der Blattoberfläche speziell auf Hydrophobine (Wösten *et al.*, 1996; Teertstra *et al.*, 2006), Adhäsionsproteine (Hofmann, 2012) und zellwanddegradierende Enzyme (Schauwecker *et al.*, 1995; Lanver *et al.*, 2014) angewiesen ist, kommt *in planta* ein zusätzlicher Satz an Genen zum Einsatz. Innerhalb der Pflanze liegt der Fokus auf der Akquirierung von Kohlenstoffquellen und anderer Nährstoffe, weswegen vermehrt Zucker- und Ionentransporter (Eichhorn *et al.*, 2006; Wahl *et al.*, 2010b; Schuler *et al.*, 2015) benötigt werden. Effektoren spielen hierbei eine ebenso wichtige Rolle, da sie oft eine Verteidigung gegen die pflanzliche Immunabwehr vermitteln (Djamei *et al.*, 2011; Hemetsberger *et al.*, 2012; Misas Villamil *et al.*, 2019). Auch hier findet eine Art gewebespezifische Expression statt, die sich vom jeweils infizierten Organ unterscheidet. So konnte gezeigt werden, dass *U. maydis* für die Infektion der Blütenstände Effektoren exprimiert, die bei der Infektion von Blättern nicht verwendet werden und umgekehrt (Schilling *et al.*, 2014). Wenn man davon ausgeht, dass die *hdp2* Expression unter axenischen Bedingungen, abzüglich der pflanzenspezifischen Signale, die Situation auf der Blattoberfläche widerspiegelt, wäre dies eine Erklärung für abweichende Bindungen von Hdp2. Die Tatsache, dass Rbf1 und Hdp2, bezüglich der Bindung am selben Promotor, gemeinsame Ziele besitzen (Abbildung 2.10) und dass die Deletion von *hdp2* *U. maydis* bereits früh in der Infektion blockiert (Heimel *et al.*, 2010b; Lanver *et al.*, 2014), bestätigt, dass Hdp2 bereits auf der Blattoberfläche für die Induktion von Genen benötigt wird. Die pathogenitätsrelevante Eisenpermease Fer2 (Eichhorn *et al.*, 2006) wird

beispielsweise zwischen 0,5 - 1 dpi verstärkt induziert (Lanver *et al.*, 2018) und wird bei  $\Delta hdp2$  Stämmen *on planta* dereguliert. Die Bindung von Hdp2 an unterschiedliche Zielgene *in vitro* und *in planta* könnte auch mit dem Methylierungsstatus der DNA erklärt werden, da die Methylierung eines Transkriptionsfaktorbindemotivs entweder notwendig oder inhibitorisch für die Bindung sein kann (Hu *et al.*, 2013; Domcke *et al.*, 2015). So könnte das Fehlen oder Vorhandensein einer methylierten Hdp2 Konsensussequenz *in vitro* zur Bindung führen, *in planta* jedoch nicht, da die benötigte DNA-Modifikation nicht vorliegt und vice versa.

Eine weiterer wichtiger Aspekt ist die Bindspezifität von Homeodomänentranskriptionsfaktoren. Diese beruht weniger stark auf der Homeodomäne selbst, sondern auf der Rekrutierung und Interaktion anderer Regulatoren, sowie der Beschaffenheit der Chromatinstruktur (Bobola und Merabet, 2017). So könnten *in planta* weitere *hdp2*-abhängige Zielgene hinzukommen, da auch zusätzliche Transkriptionsfaktoren exprimiert werden, die wiederum neue Interaktionsmöglichkeiten mit Hdp2 darbieten. Alternativ findet eine zunehmende Öffnung des Chromatins statt, die Zugang zu neuen Bindestellen gewährt.

Chromatinstruktur und genomischer Kontext sind insbesondere bei pflanzeninduzierten Genen ein entscheidendes Kriterium für die Expression (Meile *et al.*, 2020). In *U. maydis* konnte gezeigt werden, dass die Präsenz eines Resistenzmarkers oder der genomische Locus die Promotoraktivität beeinflussen kann (Schmitz *et al.*, 2020). Werden die effektorcodierenden Gene *pit1* und *pit2* samt nativen Promotor (Doehlemann *et al.*, 2011) in den *ip*-Locus eingebracht, steigt die Expression auf das 400- bzw. 800-fache im Vergleich zum endogenen Locus. Die Anwesenheit einer Resistenzkassette in der Nähe des nativen Locus hat einen ähnlichen Effekt, der reversibel ist, sobald der Marker mittels Rekombinasesystem wieder entfernt wird (Schmitz *et al.*, 2020).

Eine sich verändernde Chromatinstruktur während dem Verlauf der Infektion könnte ebenfalls eine mögliche Erklärung für die Verschiebung der *peak* Maxima von Hdp2 *in vitro* und *in planta* sein (Srivastava und Mahony, 2020). Im Promotor des Gens *UMAG\_06315* sind solche verschobenen *peak* Maxima zu beobachten. Der *in vitro peak*, als auch der *in planta peak* weisen eine Reihe von Hdp2 Konsensussequenzen auf. Zudem konnte gezeigt werden, dass die Konsensussequenzen im *in vitro peak* notwendig für die Expression sind (Abbildung 2.16). Die Verschiebung der *peak* Maxima könnte entweder durch die Windung und Verpackung der DNA um die Nukleosome entstehen oder durch die kooperative Bindung mit anderen Transkriptionsfaktoren, die nur während der Infektion anwesend sind. Zudem muss beachtet werden, dass die CHIP-Seq Experimente *in vitro* mittels Überexpression von *hdp2* durchgeführt wurden. Dadurch können möglicherweise weniger affine Bindestellen, die sich in räumlicher Nähe im selben Promotor befinden, bedient werden, was unter physiologischen Bedingungen *in planta* sonst nicht geschehen würde (Kribelbauer *et al.*, 2019).

Reporterassays mit infizierten Maispflanzen, bei denen die Hdp2 Bindemotive im *in vitro peak* und *in planta peak* des *UMAG\_06315* Promotors unabhängig voneinander mutiert bzw. deletiert werden, könnten zeigen, ob beide Bindestellen einen funktionellen Einfluss auf die Expression während der Infektion haben.

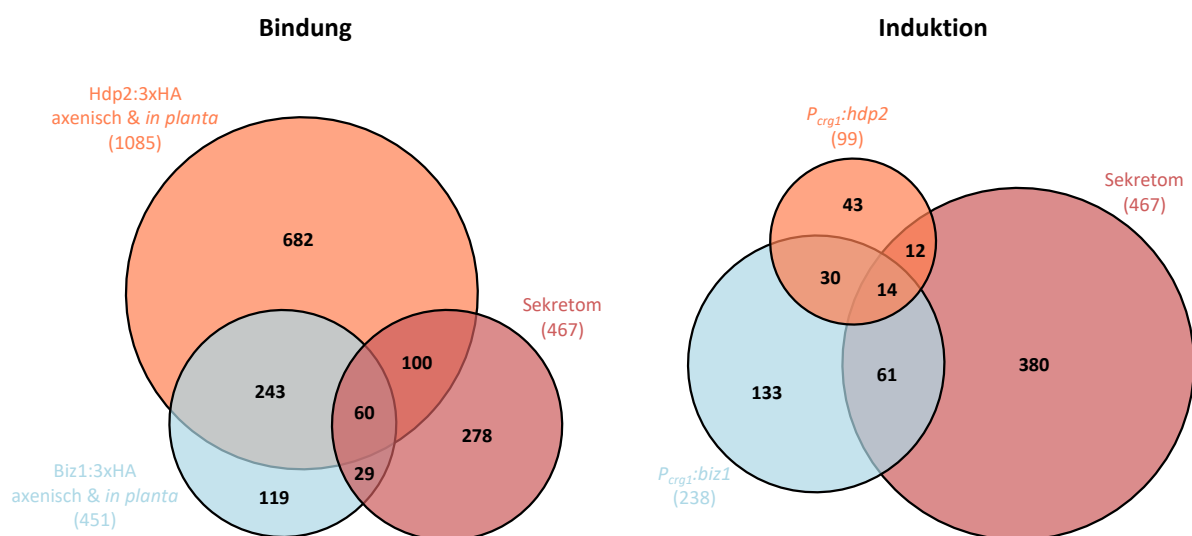
### 3.3.2 Die Hdp2 Konsensussequenz

Ein Hdp2 Bindemotiv konnte bereits in früheren Arbeiten, durch experimentelle Ansätze *in vitro*, ermittelt werden (Ulrich, 2020). Der Vergleich mit den *in planta* ChIP-Seq Analysen aus dieser Arbeit bestätigte die bisherigen Ergebnisse, zeigte dabei jedoch ein verändertes Bindeverhalten von Hdp2 unter axenischen Bedingungen und *in planta*. Eine Modifizierung des Motivs konnte allerdings nicht festgestellt werden. Homeodomänentranskriptionsfaktoren haben generell ein sehr ähnliches Bindemotiv. Die Spezifität wird durch die Interaktion mit anderen Faktoren und der Chromatinstruktur bestimmt (Bobola und Merabet, 2017). So konnte gezeigt werden, dass Hdp2 und Hdp1, ein weiterer Homeodomänentranskriptionsfaktor, eine fast identische AT-reiche Bindesequenz besitzen, die gebundenen Bereiche der beiden Transkriptionsfaktoren sich hingegen unterscheiden (Ulrich, 2020).

Sowohl die Bindung von Hdp2 am Promotor von *UMAG\_06315*, als auch dessen *hdp2*-abhängige Expression konnte mehrfach gezeigt werden (Abbildung 2.13, Abbildung 2.16, Abbildung 6.4, Anhang (Brenner, 2017)). *UMAG\_06315* hat Ähnlichkeiten zu einer RNA Helikase aus *Ustilago bromivora* und besitzt bis auf eine glutaminreiche Region keine konservierten Domänen. Die Promotorbereiche, die von Hdp2 dabei gebunden werden, weichen abhängig davon, ob *hdp2* unter axenischen Bedingungen oder *in planta* exprimiert wird, geringfügig voneinander ab. In beiden *peaks* konnten jedoch unterschiedlich stark konservierte Hdp2 Bindemotive identifiziert werden. Die Konsensusmotive innerhalb des axenischen *peak* sind hierbei funktionell notwendig, da die Deletion der vier Motive zum Ausbleiben der Expression führt. Ob die Bindemotive innerhalb des *in planta peak* ebenfalls notwendig für die Expression sind, wurde nicht untersucht. Da der deletierte Bereich, 110 bp umfasst, kann nicht ausgeschlossen werden, dass auch Komponenten des Basalpromotors von der Deletion betroffen sind. Somit könnte der Verlust der Expression auch auf fehlende regulatorische Elemente zurückzuführen sein, die vom Präinitiationskomplex benötigt werden, um die Bindung und Rekrutierung der allgemeinen Transkriptionsfaktoren zu ermöglichen. Dennoch sprechen diese Ergebnisse, die zentrale Anreicherung innerhalb der *peaks* und das Vorkommen der Konsensussequenz in 42 % aller Hdp2 angereicherten Promotoren dafür, dass es sich um ein *bona fide* Motiv handelt.

### 3.3.3 Angriff ist die beste Verteidigung - Hdp2 und Biz1 regulieren das Sekretom von *U. maydis*

Die Kombination aus CHIP-Seq- und Expressionsdaten aus Microarray Analysen ermöglichte die Identifikation potenzieller Hdp2 und Biz1 Zielgene. Unter den gefundenen Genen befinden sich zahlreiche, die für sekretierte Proteine oder Transkriptionsfaktoren kodieren und entweder dem *magenta* oder dem *cyan* Cluster zugeordnet werden können (Lanver *et al.*, 2018). Demnach werden die meisten Hdp2/Biz1-regulierten Gene während der biotrophen Phase zwischen 0,5 dpi - 12 dpi exprimiert. Der Vergleich von insgesamt 1085 bzw. 451 Genen, deren Promotoren mit Hdp2 bzw. Biz1 unter axenischen Bedingungen und *in planta* angereichert werden konnten, veranschaulicht, dass fast 40 % des Sekretoms eine Hdp2 und/oder Biz1 Bindung in den Promotoren aufweist (Abbildung 3.2). Microarray Daten (M. Vraneš, unveröffentlicht) zeigten, dass von 467 Genen für potenziell sekretierte Proteine (Lanver *et al.*, 2018), 87 nach der Induktion von Hdp2 oder Biz1 exprimiert werden. Bei 61 dieser Gene konnte eine zusätzliche Bindung von Hdp2 und/oder Biz1 in den Promotoren gezeigt werden. Die Verknüpfung von Bindung und Regulation ist hierbei ein starkes Indiz, dass es sich um direkte Zielgene der beiden Transkriptionsfaktoren handelt.



**Abbildung 3.2: Hdp2 und Biz1 haben einen großen Einfluss auf das Sekretom von *U. maydis*.** Hdp2:3xHA axenisch & *in planta* umfasst 1085 Gene, deren Promotoren mit Hdp2:3xHA 7 dpi *in planta* (diese Arbeit) oder unter axenischen Bedingungen (Ulrich, 2020) angereichert werden konnten. Biz1:3xHA axenisch & *in planta* beinhaltet 451 Gene deren Promotoren mit Biz1:3xHA 7 dpi *in planta* (diese Arbeit) oder unter axenischen Bedingungen (Ulrich, 2020) angereichert werden konnten. Das Sekretom umfasst 467 Gene mit einem putativen Sekretionssignal (Lanver *et al.*, 2018). Hdp2 bindet hierbei an den Großteil der Promotoren.  $P_{crg1:hdp2}$  umfasst 99 Gene, die durch artifizielle Induktion von *hdp2* unter axenischen Bedingungen exprimiert werden (M. Vraneš, unveröffentlicht).  $P_{crg1:biz1}$  umfasst 238 Gene, die durch artifizielle Induktion von *biz1* unter axenischen Bedingungen exprimiert werden (M. Vraneš, unveröffentlicht). Bei der Induktion des Sekretoms spielt *biz1* eine entscheidende Rolle, da 75 Gene nach Biz1 Induktion exprimiert werden.

Es fällt auf, dass während Hdp2 an fast doppelt so vielen Promotoren des Sekretoms zugehöriger Gene bindet wie Biz1, die Induktion von Biz1 jedoch bei einer größeren Anzahl von Genen zu einer Expressionserhöhung führt. Dies ist wahrscheinlich auf die zeitliche Aktivität der beiden Transkriptionsfaktoren zurückzuführen. Wie bereits diskutiert wurde, liegt das *biz1* Expressionsmaximum bei 2 dpi. Die Durchführung der ChIP erfolgte hingegen mit Proben, die bei 7 dpi entnommen wurden. Dies hatte womöglich Einfluss auf die Qualität der ChIP-Seq und letztendlich auf die Anzahl der identifizierten Ziele. Dahingegen weichen das *hdp2* Expressionsmaximum (8 dpi) und der Zeitpunkt der Probenentnahme um lediglich einen Tag ab und stellen somit einen optimalen Ausgangspunkt dar. Bei der Induktion kann ein umgekehrtes Verhältnis beobachtet werden. Die Expressionsmaxima spielen hier ebenfalls eine Rolle, wenn die Induktion in Flüssigkultur mehr oder weniger die Situation auf der Blattoberfläche darstellt. Der Großteil der *hdp2*-abhängigen Gene wird vermutlich nicht *on planta*, sondern nach der Penetration *in planta* induziert, weshalb auch die absolute Zahl an exprimierten Genen nach Hdp2 Induktion (99 Gene) geringer ist als nach Biz1 Induktion (238 Gene).

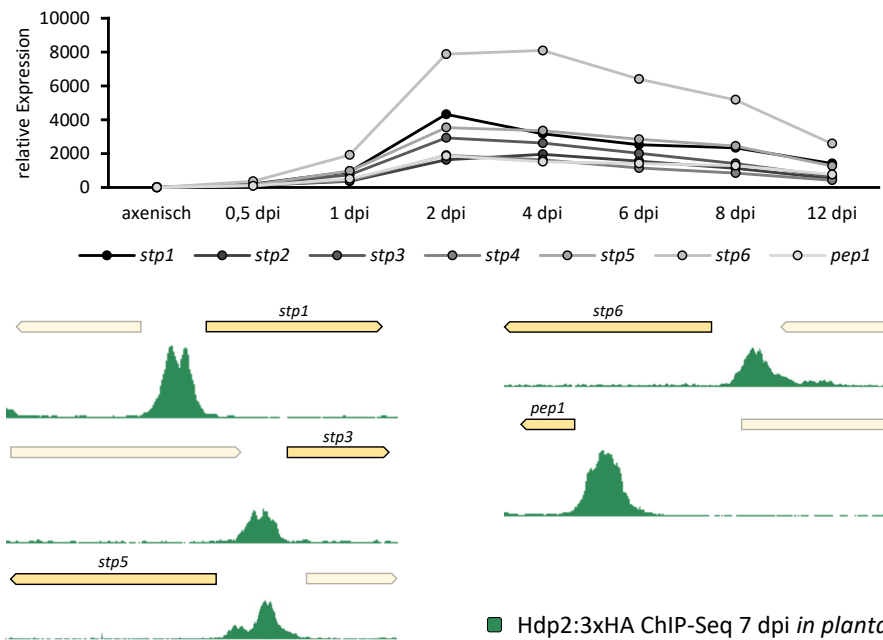
Hdp2 ist sicherlich nicht der einzige Regulator des Sekretoms, da vor allem auch sekretierte Proteine außerhalb der pathogenen Phase benötigt werden, wie zum Beispiel die Endoglukanase UMAG\_04368, die nur im saprophytischen Stadium exprimiert wird (Lanver *et al.*, 2018). Dennoch ist die Relevanz von Hdp2, bezüglich der Kontrolle pathogenitätsrelevanter Faktoren, evident. Unter den Genen, bei denen Bindung und Induktion von Hdp2 bzw. Biz1 korrelieren, befinden sich eine Reihe an bereits charakterisierten Effektoren. Zu den prominentesten zählen *cmu1* (Djamei *et al.*, 2011; Han *et al.*, 2019), *pit1*, *pit2* (Doehlemann *et al.*, 2011; Mueller *et al.*, 2013; Misas Villamil *et al.*, 2019), *pep1* (Doehlemann *et al.*, 2009; Hemetsberger *et al.*, 2012), *stp1* (Schipper, 2009; Liang, 2012), *stp3* (Ludwig *et al.*, 2021), *tin1-1* und *tin3* (Brefort *et al.*, 2014). Die Bindung von Hdp2 am Promotor von *pit1/2* konnte zudem mittels qChIP verifiziert werden (Abbildung 6.4, Anhang). Die *hdp2*-abhängige Regulation von *cmu1* (Abbildung 2.31), sowie die von *pit1/2* konnte bereits zuvor unabhängig gezeigt werden (Lanver *et al.*, 2014; M. Vraneš, unveröffentlicht).

Viele der Effektoren haben einen Einfluss auf die Virulenz von *U. maydis*, da sie in irgendeiner Form Angriffs- oder Verteidigungsmechanismen gegenüber der pflanzlichen Immunabwehr bieten. Pep1 schützt *U. maydis* vor reaktiven Sauerstoffspezies, indem das Protein die Maisperoxidasen durch direkte Interaktion hemmt. Die Deletion von *pep1* führt hingegen zu einer hypersensitiven Reaktion an infizierten Stellen der Pflanze (Hemetsberger *et al.*, 2012). Das apoplastische Protein Pit2 bindet durch molekulares Mimikry als Substrat an Papain-like-Cysteinproteasen, die eine Rolle bei der Apoptose, sowie dem Ethylen- und Salizylsäureweg spielen (Liu *et al.*, 2018). Nach Spaltung des

vermeintlichen Substrats, bleibt ein inhibitorischer Teil von Pit2 im aktiven Zentrum der Protease zurück, wodurch sie in ihrer Funktion blockiert wird (Misas Villamil *et al.*, 2019). Auch der Salizylsäuresignalweg, der vor allem bei der Infektion mit Pathogenen zum Einsatz kommt (Kumar, 2014), wird von *U. maydis* ausgehebelt. Die Chorismatmutase Cmu1 wird von *U. maydis* in pflanzliche Zellen transloziert, um dort die Salizylsäuresynthese zu supprimieren, indem der gemeinsame Ausgangsstoff Chorismat in den alternativen Shikimatweg abgeführt wird (Djamei *et al.*, 2011). Auch weniger erforschte Gene wie *UMAG\_05964* stehen mit der Wahrnehmung von Salizylsäure in Verbindung (Rabe *et al.*, 2016). Einige der Effektoren sind auch bei der Infektion spezifischer Maislinien relevant. So konnte gezeigt werden, dass *UMAG\_02297* einen Einfluss auf Prozesse des Pflanzenhormons Auxin in der Maislinie CML322 besitzt, jedoch nicht in allen weiteren getesteten Maislinien (Schurack *et al.*, 2021).

#### Hdp2 kontrolliert einen pathogenitätsrelevanten Effektorkomplex

Hdp2 ist zusätzlich an der Regulation eines gesamten Effektorkomplexes beteiligt. Eine kürzlich publizierte Arbeit konnte zeigen, dass die Effektoren Stp1, Stp2, Stp3, Stp4 (Cce1) (Seitner *et al.*, 2018), Stp5, Stp6 und Pep1 einen pathogenitätsrelevanten Komplex bilden (Ludwig *et al.*, 2021). Die Deletion einer der Komponenten reicht dabei aus, um die Virulenz drastisch zu verringern. Der Komplex ist in der Membran von *U. maydis* verankert und vermittelt vermutlich die Translokation weiterer Effektoren via der pflanzlichen Plasmamembran in die Wirtszellen. Alle sieben Effektoren scheinen dabei koreguliert zu sein. Hdp2 (und zum Teil auch Biz1) könnte hierbei der primäre Regulator des Komplexes sein, da an fünf der sieben Gene eine Bindung von Hdp2 am jeweiligen Promotor beobachtet werden kann (Abbildung 3.3).



**Abbildung 3.3: Hdp2 bindet an fünf der sieben Effektorkomplexkomponenten.** Alle Komponenten des Effektorkomplexes werden erst bei der Infektion exprimiert und teilen ein ähnliches Expressionsprofil (Datensatz aus Lanver *et al.*, 2018). Hdp2:3xHA *in planta* (dunkelgrün) zeigt die Anreicherung von Hdp2:3xHA *in planta* 7 dpi (UMJ14 x UMJ15; a1 b1 hdp2:3xHA x a2 b2 hdp2:3xHA) in der jeweiligen Promotorregion. Neben der Bindung an *pep1* und *stp1* konnte bei *stp3*, *stp5* und *stp6* zusätzlich das Hdp2 Bindemotiv im Promotor identifiziert werden. Reads wurden mit Bowtie2 version 2.0.0-beta7 (Langmead und Salzberg, 2012) auf das *U. maydis* Genom (Ensembl Genomes 33 (Kersey *et al.*, 2018) aligniert. Zur visuellen Darstellung der reads wurde der Generic Genome Browser Version 2.33 verwendet. Profile von *peaks* sind repräsentiert durch normalisierte *read counts*.

Hdp2 bindet hierbei an die Promotoren von *stp1*, *stp3*, *stp5*, *stp6* und *pep1*. Die Promotoren von *stp2* und *stp4* weisen zwar ebenfalls einen Hdp2 *peak* auf, der *pz-score* liegt allerdings unter den gesetzten Kriterien. Zusätzlich enthält der *peak* bei *stp1*, *stp3*, *stp5* und *stp6* das Hdp2 Bindemotiv als *best match*. Microarrays zeigen, dass *stp1*, *stp3* und *pep1* nach der Induktion von Hdp2 in axenischer Kultur exprimiert werden (M. Vraneš, unveröffentlicht). Auch Biz1 bindet an drei der gezeigten Promotoren und kann vier der genannten Effektoren induzieren. Die Induktion kann jedoch auch indirekt über Hdp2 ablaufen, da *hdp2* *biz1*-abhängig induziert wird (siehe Abbildung 2.22). Eine Beteiligung von Biz1 ist dennoch nicht von der Hand zu weisen.

Neben den Effektoren im genannten Komplex sind *cmu1* und Weitere in der Abteilung der (sequenzierten) Basidiomyceten konserviert und gelten daher als Kerneffektoren (Schuster *et al.*, 2018a). Als Regulatoren zahlreicher (Kern)Effektoren, haben Hdp2 und Biz1 demnach eine essenzielle Bedeutung in der biotrophen Phase, was sie zu den wichtigsten Transkriptionsfaktoren der pathogenen Entwicklung von *U. maydis* macht.



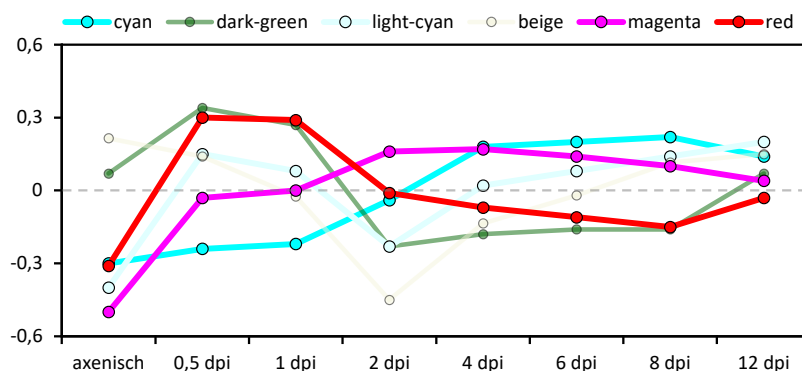
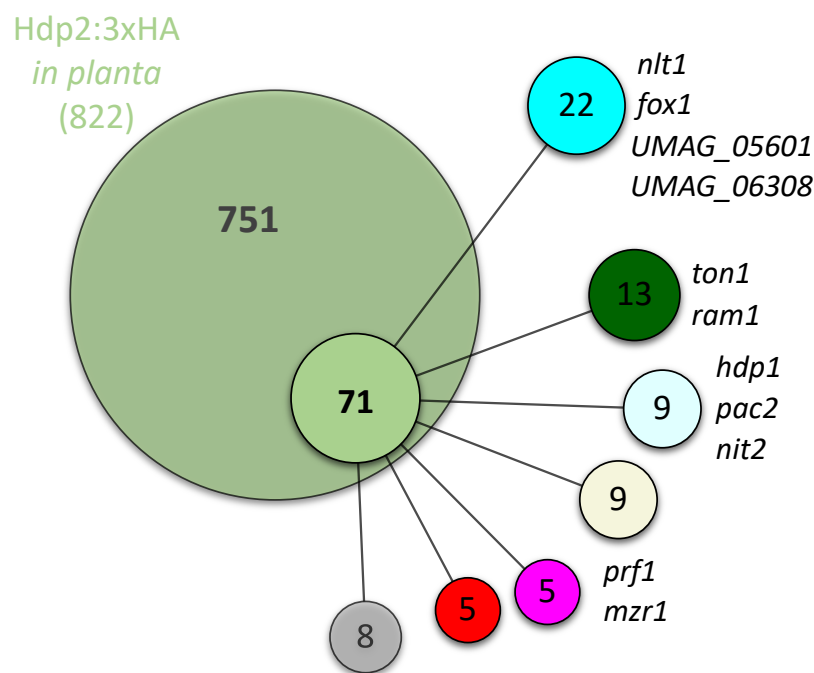
### 3.3.4 Hdp2 beeinflusst die nächste Ebene an Transkriptionsfaktoren der Signalkaskade

Neben der Regulation zahlreicher Effektoren und sekretierter Proteinen, ist Hdp2 an der Kontrolle der nächsten Ebene der *b*-vermittelten Signalkaskade beteiligt. 71 der 822 Gene, die mittels ChIP-Seq von Hdp2 identifiziert wurden, sind (putative) Transkriptionsfaktoren. Die durchgeführte Gene Ontology Analyse konnte ebenso eine Anreicherung an Genen prognostizieren, die mit Nukleinsäuren sowie Transkriptionsfaktoraktivität und -Regulation assoziiert sind (Abbildung 2.11). Da mehr als die Hälfte der Gene ab 2 dpi exprimiert werden, konnte aufgrund der limitierten Microarraydaten, bis auf zwei Ausnahmen, keine differenzielle Regulation bei An- und Abwesenheit von *hdp2* dieser Transkriptionsfaktoren gezeigt werden. Außerdem kann die Induktion von Zielgenen bei frühen Zeitpunkten (< 2 dpi) über *rbf1* ablaufen. Ein Beispiel hierfür ist *cmu1*, welches eindeutig *rbf1*- und *hdp2*-abhängig reguliert wird (Abbildung 2.31), beim Vergleich SG200 vs. SG200  $\Delta hdp2$  16 hpi *on planta* jedoch nicht unter den deregulierten Genen vorhanden ist (M. Vraneš, unveröffentlicht).

Wie bereits diskutiert wurde sind eine geschlossene Chromatinstruktur und der genomische Kontext bei pflanzeninduzierten Genen, wie z.B. Effektoren, entscheidende Kriterien. Hierbei ist anzunehmen, dass die Regulatoren dieser Gene gleichermaßen strikt gesteuert sein müssen, solange *U. maydis* nicht in Kontakt mit seinem Wirt tritt. Daher kann keine Expression etwaiger Transkriptionsfaktoren nach Induktion von Hdp2 in axenischer Kultur beobachtet werden. Nichtsdestotrotz können einige Vermutungen über die Beteiligung von Hdp2 an der Kontrolle der gefundenen Gene aufgestellt werden.

Die Gene *hdp1* und *pac2* sind, nach den präsentierten Daten, die einzigen, die neben der Bindung von Hdp2 am Promotor, eine Form der *hdp2*-abhängigen Regulation aufweisen. Expressionsanalysen zeigen, dass *hdp1* nach der Induktion von Hdp2 exprimiert wird, während *pac2* nach der Deletion von *hdp2* eine erhöhte Induktion aufweist. Beide Transkriptionsfaktoren üben einen Einfluss auf die  $\alpha$ -Kaskade aus, indem sie an der Regulation von *prf1* beteiligt sind. So führt die Induktion von Hdp1 *rop1*-abhängig zur Expression von *prf1* (Pothiratana, 2008), wohingegen Pac2 als Repressor von *prf1* fungiert (Elias-Villalobos *et al.*, 2011). Zusätzlich konnte in den Promotoren von *prf1* und *rop1* ebenfalls ein Hdp2 *peak* identifiziert werden, jedoch ohne Bindemotiv. Dies könnte eine mögliche Verbindung von Hdp2 zur  $\alpha$ -Kaskade und damit via *prf1* zur Regulation von *b* darstellen, indem Hdp2 hierbei als Plattform für andere Transkriptionsfaktoren dient. Das b-Heterodimer wird primär auf der Pflanzenoberfläche benötigt, indem es den G2-Zellzyklus, filamentöses Wachstum und die Expression weiterer Transkriptionsfaktoren der Signalkaskade steuert (Bölker *et al.*, 1995; Brachmann *et al.*, 2001; Heimel *et al.*, 2010b). Nachdem *U. maydis* die Pflanze penetriert hat, wird die Expression von *b* zwar reduziert (Lanver *et al.*, 2018), jedoch ein Basallevel aufrechterhalten, der für die Proliferation des

Myzels in der Pflanze absolut notwendig ist; mittels temperatursensitiver *b*-Mutanten konnte gezeigt werden, dass das Pilzwachstum bei einer restriktiven Temperatur innerhalb der Pflanze blockiert ist (Wahl *et al.*, 2010a). Die konstitutive Expression von *pac2* führt aufgrund ausbleibender *prf1* und *b* Expression ebenfalls zu einer verringerten Virulenz. Hdp2 und Hdp1 könnten somit theoretisch über die Repression von *pac2* und die Induktion von *prf1*, die *b* Expression *in planta* aufrechterhalten. Dies scheint allerdings unwahrscheinlich, da zumindest die Deletion von *hdp1*, sowie die Mutation einer potenziellen Hdp1 Bindestelle im *b*-Promotor, kaum Einfluss auf die Pathogenität zu haben scheint (Pothiratana, 2008); L. Baumann, persönliche Mitteilung).



**Abbildung 3.4: Hdp2 bindet an 71 Promotoren von Genen, die für (putative) Transkriptionsfaktoren kodieren.** Hdp2:3xHA *in planta* beinhaltet 822 Gene, deren Promotoren mit Hdp2:3xHA 7 dpi *in planta* angereichert werden konnten. Die Pflanzen wurden mit einer Kreuzung der Stämme UMJ14 x UMJ15 (*a1 b1 hdp2:3xHA* x *a2 b2 hdp2:3xHA*) inokuliert. Identifizierte Gene wurden den Clustern aus Lanver *et al.*, 2018 zugeordnet. Mehr als die Hälfte der Gene werden erst mit dem Einsetzen der pathogenen Phase induziert und gehören dem cyan, light-cyan, red oder magenta Cluster an. Das cyan Cluster, dessen Gene zwischen 2 - 12 dpi exprimiert werden ist hierbei das Anteilgrößte.

Weitere pathogenitätsrelevante Transkriptionsfaktoren, bei deren Regulation Hdp2 eine Rolle spielen könnte sind *fox1*, *mzr1*, *nlt1*, *nit2*, *ton1*, *ram1*, *UMAG\_05601* und *UMAG\_06308*. Fox1 wird für die vollständige Pathogenität von *U. maydis* benötigt, da die Expression essenzieller Effektoren, welche die pflanzliche Immunabwehr supprimieren, bei einer Deletion ausbleibt. Somit besitzt *fox1* einen ähnlichen Phänotyp und Zielgene wie *hdp2*, allerdings wird *fox1* nicht *b*-abhängig reguliert, womit eine *hdp2*-abhängige Regulation unwahrscheinlich, aber (*in planta*) nicht unmöglich erscheint (Zahiri *et al.*, 2010).

Der Transkriptionsfaktor Mzr1 ist für die Expression der *mig*-Clustergene *mig2-4* und *mig2-5* notwendig und besitzt acht gemeinsame Zielgene mit Hdp2, darunter *stp1* und *pep1* (Zheng *et al.*, 2008). Die beiden Effektoren Stp1 und Pep1 sind jedoch nicht ausschließlich auf die Regulation von Mzr1 angewiesen, da die Deletion von *stp1* bzw. *pep1* zum Verlust der Virulenz führt (Doehlemann *et al.*, 2009; Schipper, 2009), während  $\Delta mzr1$  keine Auswirkung darauf hat (Zheng *et al.*, 2008). Hdp2 und Biz1 können den  $\Delta mzr1$  Phänotyp hierbei wahrscheinlich kompensieren, da zumindest *stp1* und *pep1* *biz1*- und *hdp2*-abhängig reguliert werden.

Neben *UMAG\_05601* und *UMAG\_6308*, wird *Nlt1* als Hauptregulator des *cyan* Clusters diskutiert (Lanver *et al.*, 2018). *Nlt1* und Hdp2 teilen sich vier gemeinsame potenzielle Zielgene, *UMAG\_02297*, *UMAG\_05312*, *UMAG\_05929* und *UMAG\_11415*, wovon *UMAG\_02297* auch *hdp2*-abhängig reguliert wird. Die Virulenz von  $\Delta nlt1$  Stämmen ist reduziert und Kreuzungsstämme sind nicht in der Lage Blattnumore zu bilden. Die Tumorbildung an der Basis der Sprossachse, Blütenständen sowie Kolben ist jedoch nicht eingeschränkt, wodurch  $\Delta nlt1$  Mutanten weiterhin den Lebenszyklus vollziehen können (Lanver *et al.*, 2018; Lin *et al.*, 2021).

*Nit2* ist ein essenzieller Regulator, um ungünstige Stickstoffquellen für den Katabolismus zur Verfügung zu stellen. Die Deletion von *nit2* führt zu einer Reduktion des filamentösen Wachstums und der Virulenz (Horst *et al.*, 2012). Das Gen *ton1* ist ein Ziel von *Nit2* und ist unter Stickstoffmangel an der Expression von *rrm4* beteiligt (Horst *et al.*, 2012), einem Gen, das für ein RNA-bindendes Protein kodiert (Becht *et al.*, 2005). Die Deletion von *ton1* besitzt allerdings keinen Deletionsphänotyp (Horst *et al.*, 2012). Der GAL4-ähnliche Transkriptionsfaktor *Ram1* wird für den Metabolismus von trans-Aconitat benötigt und zeigt ebenfalls keinen Einfluss auf die Pathogenität (Büttner, 2020).

Die beiden uncharakterisierten Gene *UMAG\_05601* und *UMAG\_06308* werden, wie *nlt1*, beide als potenzielle Einflussfaktoren des *cyan* Clusters diskutiert (Lanver *et al.*, 2018). *UMAG\_05601* wird zwar nicht über die *b*-Kaskade reguliert, jedoch konnten LC-MS Analysen (Flüssigchromatographie gekoppelt mit Massenspektrometrie) eine Interaktion mit dem bW/bE-Rbf1-Komplex zeigen

(Ulrich, 2020). Die Deletion hat allerdings keine Auswirkung auf die Pathogenität (Abbildung 6.3, Anhang). Im Gegensatz dazu führt die Deletion von *UMAG\_06308* zu einer reduzierten Virulenz (M. Moretti und R. Kahmann, persönliche Mitteilung). RNA-Seq Analysen zeigen, dass *UMAG\_06308* verschiedene Transkripte bildet. Nach *b*-Induktion entsteht ein längeres Transkript mit zwei zusätzlichen Exons, die *in planta* fehlen (siehe Abbildung 2.30). Während Rbf1 in der Lage ist *UMAG\_06308* zu induzieren, ist nach Induktion von Hdp2, trotz Bindung am Promotor, lediglich eine geringe Expression von *UMAG\_06308* zu beobachten. Dagegen führt die *biz1*-abhängige Induktion zu einer vierfach erhöhten Expression. Hdp2 könnte hierbei eine unterstützende Funktion, bezüglich der Bindung, haben, da sich die Bindepositionen mit denen von Biz1 decken. Diese Überschneidung von Biz1 und Hdp2 Bindestellen findet gehäuft statt und wird an einer anderen Stelle diskutiert.

Eine alternative Erklärung für das effektlose Bindeverhalten von Hdp2, hinsichtlich der Expression von Zielgenen, wäre demnach die Unterstützung anderer Transkriptionsfaktoren, bezüglich deren Bindung an DNA. Indem Hdp2 entweder kooperativ mit anderen Transkriptionsfaktoren bindet oder direkt mit ihnen interagiert, ohne selbst an DNA zu binden, öffnen sich nicht nur neue Bindeverhalten der beteiligten Faktoren, sondern resultiert gleichzeitig in einer Stabilisierung der Protein-DNA-Interaktion (Inukai *et al.*, 2017; Morgunova und Taipale, 2017). Eine derartige unterstützende Funktion von Hdp2 könnte bei den Promotoren der genannten Gene wie *fox1*, *nlt1* oder *mzr1* erfolgen. In den Promotoren dieser Gene konnten zwar keine Bindemotive für Hdp2 identifiziert werden, jedoch kann sich dieses durch die Kooperation mit anderen Faktoren ändern. In einer Analyse mit humanen Zelllinien konnten 315 Interaktionen zwischen Transkriptionsfaktorpaaren identifiziert werden, die 618 Motive als Heterodimer erkennen. Die meisten dieser Motive entstehen dabei aus einer Komposition von individuellen Erkennungssequenzen der beteiligten Transkriptionsfaktoren (Jolma *et al.*, 2015). Zudem sind Transkriptionsfaktoren beschrieben, die spezifisch zwei distinkte Konsensusmotive erkennen können (Nakagawa *et al.*, 2013). Ein Beispiel für die Kooperation von Transkriptionsfaktoren in *U. maydis* ist die Rbf1-bW/bE Kombinatorik, die für die identifizierten Bindemotive durch drei Grundmodelle beschrieben werden kann: 1) Rbf1 bindet *b*-unabhängig an die *Rbs*. 2) bW/bE bindet an die *bbs*, Rbf1 ist in 90 % der Fälle am Bindekomplex beteiligt, hat jedoch weder Auswirkung auf die *b*-Bindung noch auf die Expression von *b*-Zielgenen. 3) Die Bindung beider Transkriptionsfaktoren ist notwendig und findet in unmittelbarer Nähe an ihren jeweiligen Erkennungssequenzen statt. Eine vergleichbare Modulation des Bindeverhaltens kann auch bei der Interaktion zwischen Rbf1 und Hdp1 beobachtet werden (Ulrich, 2020).

Wenn die Bindung von Hdp2 unter physiologischen Bedingungen *in planta* tatsächlich zu einer Expression der entsprechenden Gene führt, reguliert Hdp2 nicht nur die genannten Transkriptionsfaktoren, sondern gleichzeitig deren Ziele. Solche *feed forward loops* können in unterschiedlich Strukturen vorkommen (Alon, 2007). Ihr Einsatz kann nicht nur die Induktion der

Zielgene beschleunigen, sondern vermittelt auch eine gewisse Redundanz, die die Genregulation gegen etwaige Umwelteinflüsse sichern und stabilisieren kann. Bei der Infektion der Pflanze werden Phytopathogene mit Zellstress jeglicher Art konfrontiert, weshalb ein robustes Kontrollsystem benötigt wird. Unterstützt wird dies von der UPR, welche die Homöostase im ER aufrechterhält und während dem Infektionsprozess zum Einsatz kommt (Heimel *et al.*, 2013; Hampel *et al.*, 2016). *U. maydis* hat zahlreiche redundante Signaltransduktionswege (Garcia-Pedrajas *et al.*, 2008), was insbesondere bei Transkriptionsfaktoren, aber auch bei Effektoren beobachtet werden kann. Als Beispiel kann hier die Beziehung zwischen Rbf1 und Hdp2/Biz1 genannt werden. Obwohl *hdp2* und *biz1* *rbf1*-abhängig exprimiert werden, binden und induzieren diese Faktoren teilweise dieselben Ziele. Während Rbf1 und Biz1 unabhängig voneinander *hdp2* regulieren, können Rbf1 und Hdp2 *hdp1* sowie *cmu1* unabhängig induzieren. *rbf1* kann wiederum durch Prf1 und bW/bE, das selbst *prf1*-abhängig reguliert wird, induziert werden (Zarnack *et al.*, 2008; Heimel *et al.*, 2010a; Heimel *et al.*, 2010b). Auch andere Organismen wie *Caenorhabditis elegans* besitzen solche redundanten Systeme, um beispielsweise die Muskelentwicklung sicherzustellen (Fukushige *et al.*, 2006; Kuntz *et al.*, 2012).

Hdp2 bindet an eine Vielzahl von Promotoren, deren Gene für Transkriptionsfaktoren verschiedenster Klassen kodieren. Ob hierbei eine direkte Regulation der betroffenen Gene vorliegt oder Hdp2 lediglich indirekt die Bindung anderer Transkriptionsfaktoren durch kooperative Mechanismen unterstützt, leistet Hdp2 gleichermaßen einen wesentlichen Beitrag für das Transkriptionsfaktornetzwerk der biotrophen Phase.

### 3.4 Interagieren Biz1 und Hdp2 *in planta* miteinander?

Bei der Analyse der ChIP-Seq Daten von Biz1 *in planta* und dessen Konsensussequenz, die bereits bioinformatisch und experimentell nachgewiesen wurde (Finkernagel, 2006; Ulrich, 2020), konnten auch Hdp2-ähnliche Bindemotive identifiziert werden. Da 109 von 111 Promotoren, die von Biz1 angereichert wurden, auch mit Hdp2 angereichert werden konnten und ein Viertel davon ein Hdp2 Bindemotiv als *best match* aufwies, lag die Vermutung nahe, dass dies der Grund dafür war. Weitere Untersuchungen ergaben, dass die Bindestellen von Biz1 und Hdp2 sich hinsichtlich der Gipfelabstände nicht signifikant unterscheiden und in den meisten Fällen um weniger als 20 bp voneinander abweichen (Abbildung 6.6, Anhang). Deshalb wurde die Annahme über eine mögliche Interaktion der beiden Transkriptionsfaktoren getroffen, die sich mittels Co-IP aus axenischer Kultur allerdings nicht bestätigen ließ (Daten nicht gezeigt). Die Abwesenheit der DNA könnte hier ein entscheidendes Kriterium darstellen. DNA besitzt eine aktive Rolle bezüglich der Kooperation von Transkriptionsfaktoren, da sie die Interaktion mancher Faktoren überhaupt erst ermöglicht (Jolma *et al.*, 2015). Interaktionen finden zudem für gewöhnlich zwischen Transkriptionsfaktoren derselben strukturellen Familie statt, kann allerdings auch klassenübergreifend beobachtet werden wie bei bW/bE (Homeo) und Rbf1 (Zinkfinger) (Ulrich, 2020) oder in Endothelzellen zwischen Ets *winged helix* und *forkhead* Transkriptionsfaktoren (De Val *et al.*, 2008).

Die hier gezeigten Daten der *peak* Abstände widersprechen zudem den Untersuchungen aus Ulrich, 2020. Der dortige Vergleich der Biz1 und Hdp2 ChIP-Seq Daten ergab, dass in nur zehn Fällen der Abstand geringer als 50 bp betrug und die gebundenen Bereiche meist deutlich voneinander getrennt liegen. Daraufhin wurde geschlossen, dass eine Interaktion zwischen Biz1 und Hdp2 als unwahrscheinlich gilt. Diese Daten beruhen jedoch auf ChIP-Seq Analysen, die in axenischer Kultur durchgeführt wurden. Wie bereits in Kapitel 3.3.1 diskutiert wurde, unterscheidet sich das Bindeverhalten von Hdp2 *in vitro* und *in planta* deutlich, weshalb es sehr wahrscheinlich zu dieser Diskrepanz kommt. Zusammen mit dem Co-IP Experiment legen die Daten nahe, dass sich eine Interaktion von Biz1 und Hdp2 unter axenischen Bedingungen nicht ereignet. Eine Interaktion *in planta* schließt dies hingegen nicht aus und erfordert für die Aufklärung daher Folgeexperimente.

### 3.5 Die Regulation von *hdp2*

#### 3.5.1 Die *rbf1*- und *biz1*-abhängige *hdp2* Regulation

Wie in Vorarbeiten bereits gezeigt werden konnte, werden bei der Expression von *hdp2* zwei verschiedene Transkripte gebildet, die sich in ihrer RNA-Prozessierung unterscheiden (Jurca, 2017). Die Expression der Transkripte ist dabei abhängig, von dem angesteuerten Promotor ( $P_1$  &  $P_2$ ). So kann nach b-Induktion in axenischer Kultur die Expression von *hdp2<sup>s</sup>*, die gespleißte Variante, beobachtet werden, während *in planta* *hdp2<sup>s</sup>* sowie *hdp2<sup>u</sup>*, die ungespleißte Variante, exprimiert wird (Abbildung 2.20). Das Genprodukt von *hdp2<sup>s</sup>*, Hdp2<sup>s</sup>, ist dabei trotz längeren Transkripts, 55 Aminosäuren kürzer als Hdp2<sup>l</sup> (Genprodukt von *hdp2<sup>u</sup>*). Grund dafür ist ein im Intron befindliches *in frame* Startcodon das bei der Prozessierung von *hdp2<sup>s</sup>* durch Spleißen entfernt wird. Der *brlA* Locus in *Aspergillus nidulans* besitzt einen ähnlichen Aufbau, bei dem sich die Transkripte *brlA $\alpha$*  und *brlA $\beta$*  überlappen. Der Transkriptionsstart von *brlA $\alpha$*  befindet sich hierbei im Intron von *brlA $\beta$* , wodurch die resultierende Proteine sich in 23 Aminosäuren unterscheiden. Beide Transkripte sind essenziell für die sexuelle Entwicklung, da eine Deletion eine der beiden Varianten zur Beeinträchtigung der Konidiophorenbildung führt (Prade und Timberlake, 1993).

Weiterführende Untersuchungen ergaben, dass Rbf1 und Biz1 an beide Promotoren von *hdp2* binden und somit *hdp2<sup>s</sup>* und *hdp2<sup>u</sup>* induzieren (Abbildung 2.21 & Abbildung 2.22). Die Bindestellen von Rbf1 und Biz1 sind dabei klar voneinander getrennt. Der durch ChIP-Seq Analysen identifizierte Rbf1 *peak* befindet sich vor dem 5'-Exon in  $P_1$ , ungefähr 2 kb vom 1. ATG entfernt und beinhaltet zusätzlich drei *Rbs*, die essenziell für die Pathogenität sind. Die Deletion der drei *Rbs* führt zum Verlust der Virulenz, wohingegen die Mutation der am stärksten konservierten *Rbs* keinen Effekt zeigte (Abbildung 2.24). Der Pathogenitätsverlust ist hierbei höchstwahrscheinlich auf das Ausbleiben der *hdp2* Expression vor der Penetration zurückzuführen (siehe Abbildung 6.7, Anhang). Allerdings könnte die fehlende *hdp2* Expression und der damit verbundene Verlust der Pathogenität auch mit der Größe des deletierten Bereichs zusammenhängen. Da mehr als 400 bp des 2500 bp langen Promotorfragments entfernt wurden, ist die Wahrscheinlichkeit hoch, dass die Deletion ebenfalls Auswirkungen auf regulatorische Elemente des Basalpromotors oder die Chromatinstruktur hat. Expressionsanalysen zeigen, dass die Deletion zu einer höheren Basalexpression von *hdp2* führt und ist damit ein Hinweis, dass das Chromatin durch die Deletion offener vorliegt (Abbildung 6.7, Anhang). Warum die Mutation der *Rbs* keinen Effekt zeigte, könnte indessen durch die Kompensation der anderen beiden *Rbs* erklärt werden. Dies konnte bereits am Promotor des Gens *dik6* beobachtet werden. Die Mutation bzw. Deletion der darin befindlichen *Rbs* reduziert die Expression des Reportergens lediglich. Erst wenn eine zweite

benachbarte *Rbs* zusätzlich mutiert bzw. deletiert wird, sinkt das Expressionslevel an die Detektionsgrenze (Ulrich, 2020).

Unter axenischen Bedingungen können zwei distinkte Bereiche im *hdp2* Promotor ausgemacht werden, an die Biz1 bindet. Ein *peak* befindet sich unmittelbar vor dem *Rbf1 peak* in  $P_1$ . Der zweite befindet sich hingegen innerhalb des Introns, das gleichzeitig den zweiten Promotor  $P_2$  darstellt. Dieser Bereich wird auch von Biz1 *in planta* gebunden. In beiden Regionen konnten Biz1 Bindemotive identifiziert werden. Ob diese gleichermaßen essenziell für die Virulenz sind, wurde bisher nicht untersucht, wird jedoch als höchstwahrscheinlich eingestuft. Biz1 ist zwar in der Lage die Expression von *hdp2<sup>s</sup>* sowie *hdp2<sup>u</sup>* zu induzieren, Reportergerassays zeigen allerdings, dass dies mit der *biz1* Menge korreliert (Abbildung 2.23). Die *biz1*-abhängige *hdp2* Expression scheint somit erst ab einem gewissen Schwellenwert ausgelöst zu werden. Ein ähnlicher Mechanismus ist auch für den Transkriptionsfaktor NF-AT in T-Lymphozyten beschrieben (Fiering *et al.*, 1990). Eine Dimerisierung von Biz1, die ein höheres Level an verfügbarem Protein benötigt, bevor die Bindung zur Expression führt, wäre ebenfalls eine Erklärung. Der breitere der beiden *peaks* mit zwei Biz1 Bindemotiven innerhalb des *hdp2* Introns legt eine Homodimerisierung von Biz1 nahe. Eine Dimerisierung von Biz1 könnte mittels Co-IP nachgewiesen werden, indem das native *biz1*, sowie eine zusätzliche ektopische Kopie, mit unterschiedlichen Markierungen (bspw. mit einem HA- und Myc-Tag) versehen werden. Konzentrationsabhängige Dimerisierungen, die verschiedene Funktionen vermitteln, sind beispielsweise vom Homeodomänentranskriptionsfaktor WUS in *Arabidopsis thaliana* bekannt. Als Monomer wirkt WUS als Aktivator von CLV3, während höhere Konzentrationen eine Dimerisierung herbeiführen und reprimierend auf CLV3 wirken (Perales *et al.*, 2016). In *S. cerevisiae* existieren „frühe“ und „späte“ pheromonabhängige Promotoren. Eine geringe Konzentration an Pheromon, wie sie vor der Kreuzung vorliegt, führt zur Aktivierung von frühen Genen in der Signalkaskade, während eine vorangeschrittene Paarung höhere Konzentrationen aufweist und daher spät regulierte Gene induziert (Aymoz *et al.*, 2018).

Diese konzentrationsabhängige Induktion von Biz1 könnte auch die redundante Regulation von *hdp2* erklären und warum die *Rbs* bzw. *rbf1*-abhängige *hdp2* Expression essenziell für die Pathogenität ist. Die *rbf1*-abhängige *biz1* Expression erreicht das Level nicht, das nötig ist, um *hdp2* *biz1*-abhängig zu induzieren (Abbildung 2.23). Die *hdp2* Regulation könnte daher wie folgt aussehen. Auf der Blattoberfläche wird *hdp2<sup>s</sup>* ausschließlich über *Rbf1* induziert, da zu diesem Zeitpunkt die Konzentration an Biz1 nicht ausreicht. Microarray Analysen von SG200  $\Delta$ *biz1* bestätigen, dass 16 Stunden nach der Infektion *on planta* die *hdp2* Expression unbeeinflusst bleibt und somit hauptsächlich über *Rbf1* abläuft (M. Vraneš, unveröffentlicht). Nach Penetration der Pflanze wird *rbf1* reprimiert, parallel dazu steigt die Expression von *biz1* (durch einen bisher unbekanntem Faktor) auf ein Niveau, das ausreichend für die Induktion von *hdp2<sup>u</sup>* ist. Dies ist gleichzeitig mit einem Wechsel der



Promotoren verbunden, um einen fließenden Übergang zu gewährleisten. Dieser birgt allerdings auch die Gefahr, die Transkription und die damit beteiligten Faktoren zu beeinträchtigen. Die Bindung von Rbf1 und Biz1 am *hdp2* Promotor führt zu zwei distinkten Transkriptionsstarts. Demnach werden aller Wahrscheinlichkeit nach auch zwei voneinander abgegrenzte Präinitiationskomplexe etabliert, die jeweils eine eigene RNA-Polymerase II rekrutieren. Würde die Transkription beider Komplexe simultan starten, kollidieren die RNA-Polymerasen demnach möglicherweise. Die Kollision von zwei (co-direktionalen) RNA-Polymerasen führt zum Anhalten der folgenden Polymerase, sobald sie auf die Führende trifft, da diese ein unüberwindbares Hindernis darstellt (Saeki und Svejstrup, 2009). Die Transkription wird dabei nicht abgebrochen, sondern lediglich verzögert. Die Konsequenzen, die entstehen, wenn ein RNA-Polymerase II Elongationskomplex auf einen Präinitiationskomplex trifft, sind jedoch nicht bekannt. Die Transkription könnte dabei stärker verzögert werden, was zur Degradation der RNA-Polymerase führen würde (Wilson *et al.*, 2013). Die andere Möglichkeit, die sich hieraus ergibt, ist, dass die hintere RNA-Polymerase den vorderen Präinitiationskomplex auflöst, indem sie die allgemeinen Transkriptionsfaktoren von der DNA verdrängt. Die Dislokation der Histone H2A und H2B, durch RNA-Polymerase Komplexe, ist ein bekannter Mechanismus, da die Histone bzw. Nukleosome während der Transkription ein Hindernis darstellen können (Kulaeva *et al.*, 2010).

Die mengenabhängige Biz1 Induktion von *hdp2* stellt dabei sicher, dass Kollisionen und andere etwaige Komplikationen vermieden werden. Indem *hdp2<sup>u</sup>* *in planta* erst ab einem bestimmten Biz1 Level induziert wird, kann garantiert werden, dass die Expression von *hdp2<sup>s</sup>* durch Rbf1 auf der Blattoberfläche ohne Beeinträchtigung erfolgt. Da P<sub>2</sub> sich *downstream* von P<sub>1</sub> befindet, wird außerdem sichergestellt, dass transiente Bindungen von DNA-bindenden Faktoren in P<sub>1</sub> die Expression von *hdp2* (bzw. *hdp2<sup>u</sup>*) nicht negativ beeinflussen. Eine höhere zeitliche Auflösung, die frühere Zeitpunkte *in planta* zeigt (Abbildung 2.20) als bisher dargestellt, würde vermutlich eine Verlagerung der exprimierten Transkripte offenbaren. Warum allerdings *in planta* weiterhin *hdp2<sup>s</sup>* gebildet wird, bleibt ungeklärt. Analysen mittels qRT-PCR mit genomischer DNA als Template konnten eine unspezifische Bindung der eingesetzten Primer ausschließen (Daten nicht gezeigt). Die *hdp2<sup>s</sup>* Expression *in planta* könnte auf eine „Mischung“ an Hyphen zugrunde liegen, die sich auf und in der Pflanze in verschiedenen Stadien befinden. Dadurch wird jedoch nicht erklärt, weshalb Biz1 unter axenischen Bedingungen ebenfalls *hdp2<sup>s</sup>* induziert. Die Biz1 Bindestelle im *hdp2* Promotor, die sich vor dem 5'-Exon befindet, ist lediglich *in vitro* vorhanden und könnte möglicherweise eine *low affinity* Bindestelle sein. Diese wird nur aufgrund der Überexpression von Biz1 unter axenischen Konditionen gebunden, jedoch nicht unter physiologischen Bedingungen. Da sich in dieser Region bereits Elemente eines Basalpromotors befinden (die bei der Bindung von Rbf1 benötigt werden), führt die Bindung von Biz1 an dieser Stelle zur Induktion von *hdp2* (bzw. *hdp2<sup>s</sup>*).

Ob *hdp2 in planta* weiterhin von Biz1 induziert wird, ist ebenso fraglich. RNA-Seq Untersuchungen lassen das Gegenteil vermuten. Während die *hdp2* Expression zwischen 0,5 – 8 dpi konstant steigt, ist das Expressionsmaximum von *biz1* bereits bei 2 dpi erreicht und anschließende Transkriptlevel bleiben niedrig (Abbildung 3.1). Dies ist widersprüchlich zu der Erkenntnis, dass hohe Konzentrationen an Biz1 nötig sind, um *hdp2* zu induzieren und wirft die Frage auf, ob ein weiterer Faktor an der Regulation von *hdp2 in planta* beteiligt ist. Der WOPR Transkriptionsfaktor Ros1, der für die Sporulation essenziell ist, bindet ebenfalls in P<sub>2</sub> von *hdp2*. RNA-Seq Analysen zeigen jedoch, dass sich die Deletion von *ros1* nicht auf die Expression von *hdp2* auswirkt (Tollot *et al.*, 2016). Außerdem hat Ros1 einen negativen Effekt auf die Komponenten der *b*-Kaskade, da die Überexpression von *ros1* zur Deregulation von *rbf1*, *biz1* und *hdp1* führt (Tollot *et al.*, 2016). Ein weiterer Faktor, der am *hdp2* Promotor bindet, ist Hdp1. Die Bindung erfolgt dabei in Abhängigkeit von *rbf1*, wahrscheinlich an oder mit Rbf1 in einer kooperativen Weise (Ulrich, 2020) und hat vermutlich keine Auswirkung auf die *hdp2* Expression *in planta*, da die Deletion von *hdp1* die Virulenz von *U. maydis* nicht beeinträchtigt (Pothiratana, 2008). Zudem zeigen CHIP-Seq Analysen, dass Hdp2 selbst an den Promotor von *hdp2* bindet (Abbildung 2.29), was für eine Autoregulation sprechen könnte und in einem separaten Kapitel diskutiert wird.

Insgesamt zeigen die hier präsentierten Ergebnisse, dass die *rbf1*-abhängige Induktion von *hdp2* lediglich eine Überbrückung darstellt, bis ein gewisser Schwellenwert von Biz1 erreicht ist. Dies ist gleichzeitig eine Sicherheitsvorkehrung, um den nahtlosen Wechsel der Promotoren und damit eine konstante *hdp2* Expression zu gewährleisten.

### 3.5.2 Reguliert sich *hdp2* selbst?

Zahlreiche Transkriptionsfaktoren wie Rbf1, Biz1, Hdp1 und Ros1 binden am Promotor von *hdp2*. Auch Hdp2 selbst bindet an den eigenen Promotor. Die Position der Bindung ist abhängig davon, ob Hdp2 *in vitro* oder *in planta* exprimiert wird. Unter axenischen Bedingungen bindet Hdp2 vor dem 5'-Exon (etwa 2,65 kb vor dem 1. ATG) in P<sub>1</sub>. CHIP-Seq Analysen *in planta* (7 dpi) zeigen hingegen eine Bindung im Intron (P<sub>2</sub>), die der von Biz1 ähnelt. Dieses Bindeverhalten und die Vermutung, dass die Biz1 Induktion *in planta* nicht ausreichend für eine durchgängige *hdp2* Expression während des gesamten Infektionsprozesses ist, gab Grund zur Annahme, dass Hdp2 sich möglicherweise selbst reguliert.

Die Hdp2 Bindestelle in P<sub>1</sub> ist hierbei allerdings nicht essenziell. Das verwendete Promotorfragment in UMJ78, das erfolgreich zur Komplementation von  $\Delta hdp2$  genutzt wurde (Abbildung 2.24), enthält diese Bindestelle nicht, was bereits in anderen Arbeiten gezeigt werden konnte (Lanver *et al.*, 2014). Außerdem liegt diese Bindestelle näher am Transkriptionsstart des Gens *UMAG\_04930*, das für eine Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase kodiert. *UMAG\_04930* besitzt antioxidative Eigenschaften und ist

in der Bildung von NADPH involviert. Die Regulation erfolgt nicht über die *b*-Kaskade, sondern wird von Yap1, einem pathogenitätsrelevanten Transkriptionsfaktor, der für die Detoxifikation von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> verantwortlich ist, vermittelt (Molina und Kahmann, 2007). Zudem zeigt weder die (ektopische) Induktion von Hdp2<sup>S</sup> noch Hdp2<sup>L</sup> *in vitro* eine Expression von nativen *hdp2* (Abbildung 2.29).

Über die Relevanz der Hdp2 Bindung innerhalb des Introns kann nur spekuliert werden. Da dieser *peak*, wie auch der axenische, kein Hdp2 Konsensusmotiv aufweist, liegt die Vermutung nahe, dass Hdp2 hierbei nicht direkt an DNA bindet. Die Hdp2 Bindung überschneidet sich mit der von Biz1, somit könnte Hdp2 an oder zusammen mit Biz1 an den eigenen Promotor binden. Dies könnte durch qChIP Experimente *in vitro* überprüft werden, indem *hdp2:3xHA biz1*-abhängig exprimiert wird. Ob die Hdp2 Bindung dabei zusätzliche Pflanzensignale benötigt, kann jedoch nicht festgestellt werden.

Autoregulation spielt vor allem bei der Differenzierung und *cell fate determination* während der Morphogenese höherer eukaryotischer Zellen eine wichtige Rolle; nicht nur bei der Initiierung der Zelldifferenzierung, sondern auch bei der Erhaltung. Indem das vom Transkriptionsfaktor ausgehende Signal sich durch eine positive Rückkopplungsschleife selbst amplifiziert, werden schwache und transiente Inputs in eine stabile und terminale Richtung gelenkt. Dadurch werden Wege, die kein „Zurück“ ermöglichen, aufgrund schwacher Expression des Regulators nicht irrtümlicherweise freigeschaltet. Zudem ist diese Art der Signaltransduktion nach einem anfänglichen Impuls keiner Hierarchie untergeordnet, was eine autarke und robuste Genexpression ermöglicht (Crews und Pearson, 2009; Leyva-Diaz und Hobert, 2019). Auch *U. maydis* durchläuft mit der Bildung des dikaryotischen Filaments eine Morphogenese mit einem *point of no return*. Es erscheint demnach durchaus plausibel, dass das komplexe regulatorische Transkriptionsfaktornetzwerk, das dabei zum Einsatz kommt, positive Rückkopplungen, nicht nur in Form zahlreicher *feed forward loops* (Ulrich, 2020), sondern auch durch Autoregulation der beteiligten Faktoren integriert. Die *b*-Kaskade mit *b*, *rbf1* und *biz1* könnten den initialen Impuls darstellen, der benötigt wird, um *hdp2* zu exprimieren, bevor eine positive Rückkopplung durch Hdp2 selbst *in planta* einsetzt.

### 3.5.3 Hdp2<sup>S</sup> und Hdp2<sup>L</sup> sind lediglich Nebenprodukte der Regulation

Durch den Wechsel der Promotoren P<sub>1</sub> und P<sub>2</sub> von *hdp2* entstehen unterschiedliche Transkripte, die wiederum in unterschiedlich langen Proteinen resultieren. Induziert werden diese Genprodukte durch Rbf1 sowie Biz1 (Kapitel 2.3.1). Analysen der beiden Proteinisoformen, Hdp2<sup>S</sup> und Hdp2<sup>L</sup>, ergaben, dass kein Unterschied in der Expression der untersuchten Zielgene unter axenischen Bedingungen festgestellt werden konnte (Abbildung 2.26). Die Mutation jeweils eines der Translationsstartcodons, sodass nur eine der Isoformen im Verlauf der Pflanzeninfektion gebildet wird, hatte hingegen Auswirkungen auf die Pathogenität. Während die Mutation des 1. ATGs, wodurch nur die kürzere Isoform Hdp2<sup>S</sup> gebildet werden kann, keinen Effekt zeigte, führte die Mutation des 2. ATGs, bei der nur Hdp2<sup>L</sup> entsteht, zum Verlust der Virulenz (Abbildung 2.27). Dennoch wurde die Hypothese verfolgt, dass beide Isoformen nur ein Nebenprodukt der komplexen Regulation von *hdp2* darstellen und dass der Verlust der Pathogenität auf das vollständigen Ausbleiben der Hdp2 Protein-Expression zurückzuführen ist und nicht auf das Fehlen essenzieller Funktionen von Hdp2<sup>S</sup>.

Auf der Blattoberfläche ist ausschließlich P<sub>1</sub> aktiv, wodurch das 1. ATG durch Spleißen entfernt wird und lediglich das 2. ATG als Translationsstart genutzt werden kann. Die Mutation des 2. ATG hat hierbei zur Folge, dass kein funktionelles Hdp2 Protein gebildet wird. Die vorliegenden Daten zeigen, dass *hdp2<sup>S</sup>* nach b-Induktion in AB31 und somit vermutlich nur während der Transitionsphase auf der Blattoberfläche exprimiert wird, nachdem sich ein dikaryotisches Filament gebildet hat. Zu diesem Zeitpunkt wird die Expression von Rbf1 gesteuert und läuft *biz1*-unabhängig ab. Die Tatsache, dass SG200  $\Delta biz1$  16 hpi *on planta* keine Deregulation von *hdp2* zeigt (M. Vraneš, unveröffentlicht), befürwortet dies. Zudem hängt die *biz1*-abhängige Induktion, die primär in der Expression von *hdp2<sup>u</sup>* resultiert, von einem gewissen Schwellenwert von Biz1 ab. Basierend auf RNA-Seq Daten müsste die höchste Konzentration an Biz1 bei 2 dpi zum Zeitpunkt des Expressionsmaximums sein (Lanver *et al.*, 2018). Die Theorie, dass nur P<sub>1</sub> auf der Blattoberfläche aktiv ist, wird dahingehend unterstützt, dass die Deletion der *Rbs* im *hdp2* Promotor zum Verlust der Pathogenität führt, obwohl die *biz1* abhängige Induktion von *hdp2* davon unbeeinflusst bleibt. Um ausreichend Biz1 zur Verfügung zu stellen, sind vermutlich zusätzliche Signale notwendig, die die *biz1* Expression amplifizieren und erst mit oder kurz nach der Penetration der Pflanze ausgelöst werden. Gleichzeitig wird *hdp2* für die Penetration benötigt.

Rbf1 induziert demnach *hdp2* (bzw. *hdp2<sup>S</sup>*) auf der Blattoberfläche, um in die Pflanze eindringen zu können, wodurch das Biz1 Level ansteigen kann, um nachfolgend die *hdp2* (bzw. *hdp2<sup>u</sup>*) Expression, aufgrund der zwingend notwendigen *rbf1* Repression, zu übernehmen. Demzufolge erscheint Hdp2<sup>S</sup> notwendig für die Transition von saprophytischer zu biotropher Phase, da auf der Blattoberfläche kein Hdp2<sup>L</sup> gebildet werden kann.

Die temporäre ektopische Expression von *hdp2<sup>S</sup>* (entspricht dem nativen *hdp2<sup>S</sup>*) bzw. *hdp2<sup>L</sup>* (entspricht dem nativen *hdp2<sup>U</sup>*) zeigt zudem, dass beide Isoformen in der Lage sind den Übergang im *hdp2<sup>2.ATGmut</sup>* Hintergrund zu überbrücken (Abbildung 2.28). Dabei ist *Hdp2<sup>S</sup>* für den Übergang nicht nur entbehrlich, sondern *Hdp2<sup>L</sup>* ist auch ausreichend für die Infektion und biotrophe Phase. Der *hdp2<sup>2.ATGmut</sup>* Phänotyp kann hierbei allerdings nicht vollständig komplementiert werden, was wahrscheinlich auf das artifizielle System zurückzuführen ist. Um *hdp2<sup>S</sup>* bzw. *hdp2<sup>L</sup>* lediglich temporär exprimieren zu können, wurde der *rbf1* Promotor verwendet, da bekannt war, dass dieser im *ip*-Locus funktionsfähig und ab 2 dpi nicht mehr aktiv ist (Heimel *et al.*, 2010b; Lanver *et al.*, 2018). Dadurch wird *hdp2<sup>S</sup>* bzw. *hdp2<sup>L</sup>* bereits nach b-Induktion induziert und umgeht somit den Schritt über *Rbf1*. Es ist daher ersichtlich, dass der Eingriff in eine streng getaktete Signalkaskade mit komplexer Regulation und der Verwendung eines minutiös abgestimmten Promotors in einem artifiziellen System nicht ohne Konsequenzen bleibt. Transkriptionelle Regulation, insbesondere die in der Entwicklung, erfordert höchste Präzision bezüglich Zeit, Ort und Niveau, um eine effektive Propagation zu gewährleisten und katastrophale Folgen zu vermeiden (zusammengefasst in Lee und Young, 2013).

Die *Hdp2* Isoformen stellen insofern lediglich ein Nebenprodukt der Regulation dar und erfüllen keine unterschiedlichen Aufgaben. Die Verwendung alternativer Promotoren kommt insbesondere bei entwicklungspezifischen Genen höherer Eukaryoten vor. Dies resultiert überwiegend (60 - 80 %) in der Bildung von Transkripten mit unterschiedlich langen 5'-UTRs, aber identischen offenen Leserahmen (Landry *et al.*, 2003) und kann beispielsweise beim Transkriptionsfaktor *Otx2* und der Cytochrom-P450-Aromatase in Mäusen beobachtet werden. Die drei Transkripte von *Otx2* werden in Abhängigkeit des Entwicklungsstadiums in unterschiedlichen Bereichen des Hirns exprimiert (Courtois *et al.*, 2003). Das Gen *Cyp19* kodiert für die Cytochrom-P450-Aromatase, die das Schlüsselenzym der Östrogenbiosynthese darstellt und von drei verschiedenen Promotoren gesteuert wird. Alle drei Transkripte kodieren für dasselbe Protein, werden jedoch entweder in den Ovarien, Testis oder Hirn exprimiert (Golovine *et al.*, 2003).

Unabhängige Promotoren erfordern komplett neue Sätze an allgemeinen und spezifischen Transkriptionsfaktoren, wodurch eine autarke Genregulation, die zu spezifischen Zeitpunkten und/oder Geweben präzise gesteuert werden kann, erzielt wird. Die Transkription erfolgt in kurzen Schüben, in denen mehrere Initiationsereignisse stattfinden. Elemente des Basalpromoters regulieren hierbei die Anzahl an transkribierenden RNA-Polymerasen, während Enhancer (bzw. spezifische Transkriptionsfaktoren) die Frequenz dieser Schübe kontrollieren, wodurch die Promotoraktivität gesteuert und die Expressionsstärke entsprechend angepasst werden kann (Haberle und Stark, 2018). Im Fall von *hdp2* vermittelt der Einsatz von alternativen Promotoren einen schnelleren Austausch der beteiligten Regulatoren, wodurch eine verzögerungsfreie Expression beim Übergang zur biotrophen Phase gewährleistet wird. Der sprunghafte Anstieg der *hdp2* Expression ab 2 dpi deutet dabei parallel

auf eine Anpassung der Expressionsstärke hin. Hohe Hdp2 Level vor der Penetration könnten möglicherweise die Entwicklung beeinträchtigen, weshalb zu diesem Zeitpunkt ein „schwacher“ Promotor aktiv ist. Innerhalb der Pflanze wird eine stärkere Expression benötigt, die durch den Wechsel der Promotoren auf dynamische Weise vermittelt wird. Infektionsstudien mit Stämmen, bei denen *hdp2* unter der Kontrolle des *egl1* Promotors liegt, bieten hierfür erste Hinweise. Obwohl der *egl1* Promotor über den gesamten Infektionsverlauf aktiv ist, sind die Stämme apathogen (Daten nicht gezeigt). Die *egl1* Expression übersteigt die von *hdp2* bereits auf der Blattoberfläche um ein Vielfaches und könnte möglicherweise der Grund für den Verlust der Pathogenität sein (Lanver *et al.*, 2018).

Zudem realisiert ein redundantes System eine stabile Genexpression. Wie bereits diskutiert, sind Phytopathogene bei der Infektion ihrer Wirte enormem Zellstress ausgesetzt. Die Perzeption von MAMPs/PAMPs (*microbe/pathogen-associated-molecular-pattern*) wie z.B. pilzliches Chitin setzt die Pflanze bereits frühzeitig in Alarmbereitschaft und sie reagiert daraufhin mit Impulsen von ROS (reaktive Sauerstoffspezies). Zudem kommt es zum Influx von  $\text{Ca}^{2+}$  und der Aktivierung von MAPK-Kaskaden, wodurch der Jasmonat- und Salizylsäuresignalweg aktiviert werden, die schließlich Gene der pflanzlichen Immunabwehr induzieren (zusammengefasst in Nishad *et al.*, 2020). Um der Abwehr standzuhalten, entgegnet *U. maydis* mit einem Repertoire an Effektoren. Eine effiziente Sekretion dieser Effektoren, trotz Zellstress, wird neben der UPR durch eine stabile Genregulation, bestehend aus *feed forward loops*, Autoregulation und Redundanz, erzielt. Hdp2 ist im Besonderen entscheidend für die Expression pathogenitätsrelevanter Effektoren, weshalb eine robuste Kontrolle dieses Transkriptionsfaktors und seiner Ziele gewährleistet sein muss.

### 3.6 Alternative Promotoren in *U. maydis*

In dieser Arbeit konnten, inklusive *hdp2*, diverse Beispiele für die Verwendung von alternativen Promotoren in *U. maydis* präsentiert werden. Expressionsanalysen konnten zeigen, dass die Gene *cmu1*, *hdp1*, *UMAG\_06308*, *UMAG\_03923* und *UMAG\_04064* stadienspezifische Transkripte bilden (Abbildung 2.30), die sich dabei in der Länge ihrer 5'-UTR unterscheiden. Weitere Gene der *b*-Kaskade konnten bereits in vorherigen Arbeiten einem ähnlichen Regulationsschema zugeordnet werden. Neben *goh1* (Brachmann *et al.*, 2001), weisen die pathogenitätsrelevanten Gene *clp1* und *kpp6* ebenfalls unterschiedlich lange Transkripte auf (Brachmann *et al.*, 2003; Scherer *et al.*, 2006). Sowohl die Transkripte von *clp1* als auch von *kpp6* werden entweder *a*- oder *b*-abhängig induziert; bei beiden Genen entsteht jedoch ein einziges Protein. Während beide *kpp6* Transkripte für dasselbe Protein kodieren, wird das *a*-abhängige *clp1* Transkript aufgrund eines fehlenden Stoppcodons nicht translatiert (Brachmann *et al.*, 2003; Scherer *et al.*, 2006).

Weitere Untersuchungen ergaben, dass die Transkriptionsfaktoren Rbf1, Biz1 und Hdp2 an die Promotoren der Gene *cmu1*, *hdp1*, *UMAG\_06308* und *UMAG\_03923* binden und für Expression der Transkriptvarianten verantwortlich sind (Abbildung 2.31). Hierbei fällt auf, dass sich die Bindepositionen von Rbf1 und Hdp2/Biz1 nicht nur gegenseitig ausschließen, sondern auch mit der Transkriptlänge korrelieren. Im Fall von *cmu1* bedeutet dies, dass Rbf1 die Expression des längeren Transkripts steuert, während Hdp2 *downstream* von Rbf1 bindet und das kürzere Transkript von *cmu1* induziert. Durch die weiter *downstream* gelegene Bindeposition wird der Transkriptionsstartpunkt des längeren Transkripts vermutlich von Hdp2 blockiert, wodurch die Initiation der Transkription an dieser Stelle verhindert wird. Stattdessen verschiebt sich die Position des Transkriptionsstarts und ein kürzeres Transkript wird gebildet. Bei *UMAG\_03923* erfolgt die Regulation im Hinblick auf Hdp2 hingegen umgekehrt, während zusätzlich Rbf1 weiterhin die Expression des längeren Transkripts induziert. Hier ist der Abstand zwischen Bindung und TSS wahrscheinlich noch ausreichend, um die Transkription zu initiieren, die Expression durch Induktion von Hdp2 ist jedoch vermutlich aufgrund dieses größeren Abstandes stärker. Bei *hdp1* bindet Rbf1 und bei *UMAG\_06308* binden Hdp2/Biz1 hinter dem jeweiligen Transkriptionsstart des längeren Transkripts. Im Fall von *UMAG\_06308* werden dadurch zwei Exons übersprungen. Da die Bindeposition von Biz1 (und Hdp2) innerhalb des ersten Introns liegt, wird der Transkriptionsstartpunkt in das zweite Intron verschoben, wodurch das mittlere und vordere 5'-Exon ausgelassen werden.

Die Korrelation zwischen Bindung und Expression der beteiligten Transkriptionsfaktoren lässt auf eine direkte Induktion der betroffenen Zielgene hindeuten. Dies bestärkt die Annahme, dass Hdp2 und Biz1 die Regulation eines Teils der *rbf1*-regulierten Gene *in planta* übernehmen. Für *cmu1* und *UMAG\_06308* ist dies von essenzieller Bedeutung, da beide Gene relevant für die Pathogenität sind

(Djamei *et al.*, 2011) (M. Moretti und R. Kahmann, persönliche Mitteilung). Die Kontrolle von Zielgenen (*cmu1*, *hdp1*, etc.) durch mehr als einen Regulator (Rbf1, Hdp2, Biz1) stellt ein *dense overlapping regulon* dar, während die parallele Induktion eines Zielgens (*cmu1*) und dessen Regulators (Hdp2) durch Rbf1 als *feed forward loop* bezeichnet werden kann (für Details siehe Alon, 2007). Diese Ergebnisse stützen die Schlussfolgerung, dass *U. maydis* eine Kombination dieser Module in der *b*-vermittelten Regulationskaskade einsetzt (Ulrich, 2020).

Zusätzlich ist die Übernahme der Regulation, wie bereits bei *hdp2* beobachtet, gleichzeitig mit einem Wechsel der Promotoren verbunden. Ob hierbei dieselben konzentrationsabhängigen Mechanismen relevant werden, wurde nicht untersucht. Der Grund für die Verwendung von zwei Promotoren bei diesen Genen ist ebenso ungeklärt. Die naheliegendste Erklärung wäre die Synthese von Proteinisoformen, die sich durch zusätzliche Domänen oder Signalsequenzen, in der Funktion oder Lokalisation unterscheiden.

Wie bereits diskutiert spielen alternative Promotoren vor allem bei der Entwicklung höherer Eukaryoten eine Rolle, indem sie als zusätzliche Ebene der Genregulation fungieren. Als eigenständiger Mechanismus oder in Kombination mit alternativem Spleißen bieten sie außerdem die Möglichkeit eine Vielzahl an Proteinisoformen am selben Genlocus zu generieren. Das humane Genom besitzt beispielsweise ca. 20.000 Gene, die für 80.000 Transkripte kodieren, aus denen wiederum 250.000 - 1.000.000 Proteine synthetisiert werden (de Klerk und t Hoen, 2015). Allein im menschlichen Gehirn besitzen 60 % der Gene alternative Promotoren (Pardo *et al.*, 2013). Ein Beispiel dafür stellen die  $\alpha$ - und  $\gamma$ -Protocadherine dar, welche zur Gruppe der Adhäsionsproteine gehören, die Zell-Zellverbindungen in Neuronen von Säugetieren vermitteln. Ihre Variabilität erlangen sie durch die Kombination aus konstanten und variablen Exons, von denen jedes über einen eigenen vorangestellten Promotor verfügt (Tasic *et al.*, 2002). Besonders bemerkenswert ist das Gen *Dscam1* in *D. melanogaster*, welches mittels alternativem Spleißen 38.000 Isoformen bilden kann (Schmucker *et al.*, 2000). Dieser Mechanismus erlaubt auch Isoformen mit differenzieller Funktion zu synthetisieren, wie es beispielsweise beim Transkriptionsfaktor Clste12p in *Colletotrichum lindemuthianum* beobachtet werden kann. Durch alternatives Spleißen wird das dritte Exon von *CLSTE12* ausgelassen, wodurch zwei verschiedene Transkripte entstehen. Während die Deletion von *CLSTE12* zum Verlust der Pathogenität führt, sind Stämme, in denen das Exon deletiert wurde, lediglich attenuiert. Die Transkripte sind hierbei unterschiedlich reguliert, da die Überexpression des Transkripts ohne Exon 3 einen negativen Effekt auf die Pathogenität zeigt und vermutlich andere Funktionen ausübt als das längere Transkript (Hoi *et al.*, 2007).



Innerhalb der DNA-Bereiche der untersuchten Gene konnten jedoch keine zusätzlichen ATGs identifiziert werden, die bei der Transkription der alternativen (längeren) Transkripte als Start für die Translation genutzt werden könnten. Lediglich *UMAG\_04064* besitzt einen alternativen *in frame* Translationsstart der vermutlich *in planta* genutzt wird, sich allerdings hinter dem annotierten Startcodon des offenen Leserahmes befindet. Ob dadurch Domänen oder Signalsequenzen wegfallen, die Auswirkungen auf die Funktion oder Lokalisation des Proteins haben, wurde bisher nicht untersucht. Dieser *gain/loss of function/localisation* kann beispielsweise häufig durch alternatives Spleißen bei *Schizophyllum commune* beobachtet werden (Gehrmann *et al.*, 2016). Über die Auswirkung der Bindung von Hdp2 innerhalb der Introns von *hdp1* und *UMAG\_06308* kann nach aktuellem Kenntnisstand ebenfalls nur spekuliert werden. Die Bindeposition von Hdp2 im Intron von *hdp1* ist hierbei besonders interessant, da dies zu einem Genprodukt ohne funktionierende Homeodomäne führen würde. Für *hdp1* konnten mittels strangspezifischer RNA-Seq drei antisense Transkripte identifiziert werden (Donaldson *et al.*, 2017), die durch Chromatin-Remodellierung, Maskierung spezifischer Sequenzen oder transkriptionelle Interferenz Einfluss auf die Genexpression nehmen könnten (zusammengefasst in Donaldson und Saville, 2012). Die Bindung von Hdp2 im Intron könnte möglicherweise die Bildung dieser antisense Transkripte fördern oder verhindern, um somit die *hdp1* Expression *in planta* präziser zu steuern.

Statt des konventionellen Startcodons ATG (bzw. AUG) könnten jedoch auch ACG, CUG oder GUG als alternative Translationsstarts gelesen werden (Touriol *et al.*, 2003). Die Verwendung von Non-AUG-Codons konnte beispielsweise beim bZIP-Transkriptionsfaktor CPC1 in *Neurospora crassa* gezeigt werden, der ähnlich wie Gcn4 in Hefe eine Rolle im Aminosäurestoffwechsel spielt. Auch im 5'-Bereich des *cpc-1* Homologs in *U. maydis* konnten solche alternativen Startcodons identifiziert werden; eine tatsächliche Funktion dieser wurde jedoch noch nicht nachgewiesen (Ivanov *et al.*, 2017).

Die 5'-UTRs der untersuchten Transkripte könnten darüber hinaus in Form ihres strukturellen Aufbaus als weiterer Mechanismus der Regulation dienen. Zum Beispiel kann die Stabilität einer mRNA durch bestimmte Sequenzen innerhalb der 5'-UTR zur Degradation oder einer verringerten Halbwertszeit der mRNA führen (Jia *et al.*, 2020). Die Präsenz von  $\mu$ ORFs innerhalb der 5'-UTR spielt gleichermaßen eine entscheidende Rolle und ist in Pilzen weitverbreitet. Diese führen meist zu einer geringeren Translationseffizienz, wirken sich im Fall von Gcn4 in *S. cerevisiae* allerdings positiv auf die Translation während Stressbedingungen aus. Indem unter Aminosäuremangel die Translation der  $\mu$ ORFs 2-4 weniger effizient abläuft, wird der primäre offene Leserahmen besser erkannt, was eine schnelle Anpassung erlaubt. Beim Transkriptionsfaktor ATF4, welcher Gene der Stressantwort in Säugetieren reguliert, kann dieser Mechanismus ebenfalls beobachtet werden (zusammengefasst in Barbosa *et al.*, 2013). In *Metarhizium robertsii* ist die präzise Regulation des Membranproteins Mr-OPY2 durch  $\mu$ ORFs essenziell für den Übergang der pathogenen Phase. Ein  $\mu$ ORF in einer von zwei Transkriptvarianten

inhibiert die Translation des primären ORFs, um die Proteinmenge niedrig zu halten. Ein hohes Level an Mr-OPY2 wird erst in der pathogenen Phase benötigt, weshalb beim Übergang vermehrt ein kürzeres Transkript, ohne den inhibierenden  $\mu$ ORF, exprimiert wird (Guo *et al.*, 2017).

Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit die Relevanz der *rbf1* Repression verdeutlicht werden. Die Kombination aus CHIP-Seq- und Expressionsanalysen zeigten dabei, dass Biz1 und Hdp2 die Regulation von zuvor *rbf1*-abhängigen Genen aufrechterhalten und dass Hdp2 für weitere Prozesse der biotrophen Phase, durch Regulation zahlreicher Effektoren und Transkriptionsfaktoren, verantwortlich ist. Diese Übernahme der Regulation ist in manchen Fällen mit einem Wechsel der Promotoren verbunden, was zu unterschiedlichen Transkripten führt, wie es am Beispiel von *hdp2* gezeigt werden konnte. Hierbei scheint es ein spezifisches Phänomen zu sein, dass *U. maydis* bei der Transition von saprophytischer zu biotropher Phase, alternative Promotoren einsetzt, um Transkriptvarianten zu generieren. Welche der diskutierten Mechanismen hierbei zum Einsatz kommen und ob dadurch die Regulation bzw. Translation modifiziert wird, bleibt ohne nachfolgende Untersuchungen weiterhin Spekulation.

## 4. Material und Methoden

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

### 4.1 Material und Bezugsquellen

#### 4.1.1 Chemikalien, Puffer, Lösungen, Kits, Enzyme 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, Turbo DNFree (Ambion) zur Entfernung von DNA aus Gesamt-RNA-Präparationen, RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas) für die reverse Transkription von mRNA, und das MesaGreen qPCR MasterMix for SYBR Assay Kit (Eurogentec) für qRT-PCR Analysen verwendet.

Kits für die 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

<b>Name</b>	<b>Hersteller</b>
Antarktische Phosphatase	New England Biolabs
Anti-Digoxigenin-AP Fab Fragment	Roche
BSA (Rinder Serum Albumin) Lösung	New England Biolabs
CDP-Star	Roche
Klenow Fragment	New England Biolabs
Lysing Enzyme	Sigma-Aldrich
Lysozym (aus Hühnerei)	Merck
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 (20 mg/ml) beschichtet.

**YT-Festmedium**

10 g Trypton  
5 g Hefeextrakt  
10 g NaCl  
15 g Bacto Agar  
mit H<sub>2</sub>O<sub>bid.</sub> auf 1 l, autoklaviert

**SOB-Medium**

20 g Trypton  
5 g Hefeextrakt  
0,58 g NaCl  
0,19 g KCl  
mit H<sub>2</sub>O<sub>bid.</sub> auf 1 l, autoklaviert

**dYT-Flüssigmedium**

6 g Trypton  
10 g Hefeextrakt  
5 g NaCl  
mit H<sub>2</sub>O<sub>bid.</sub> auf 1 l, autoklaviert

Medien für die Kultivierung von *Ustilago maydis*

Für Selektionsmedien wurden nach dem Autoklavieren 2 µg/mL Carboxin, 50 µg/ml Nourseothricin, 250 µg/mL Geneticin, oder 200 µg/mL Hygromycin zugegeben. Für Festmedien wurde, wenn nicht anders angegeben, vor dem Autoklavieren 2 % (w/v) Agar zugegeben.

**YEPS<sub>light</sub>-Flüssigmedium (Tsukuda *et al.*, 1988)**

10 g Hefeextrakt  
4 g Pepton  
4 g Saccharose  
mit H<sub>2</sub>O<sub>bid.</sub> auf 1 l, autoklaviert

**Glutamin-Minimalmedium**

62,5 ml Salz-Lösung (s.u.)  
30 mM L-Glutamin  
mit H<sub>2</sub>O<sub>bid.</sub> auf 980 ml aufgefüllt, pH-Wert auf 7,0 mit NaOH eingestellt und sterilfiltriert.

**CM-Komplexmedium (Holliday, 1974)**

1,5 g NH<sub>4</sub>NO  
2,5 g Caseinhydrolysat  
0,5 g DNA aus Heringssperma  
1 g Hefeextrakt  
10 ml Vitamin-Lösung (s.u.)  
62,5 ml Salz-Lösung (s.u.)  
0,5 ml Spurenelement-Lösung  
mit H<sub>2</sub>O<sub>bid.</sub> auf 980 ml aufgefüllt und mit NaOH auf pH 7,0 eingestellt; nach dem Autoklavieren 20 ml 50 % (w/v) Glukose zugefügt.

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 Hefeextrakt  
5 g Saccharose  
800 ml 87 % Glycerin  
mit H<sub>2</sub>O<sub>bid.</sub> auf 1 l

**Salzlösung (Holliday, 1974)**

8 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$   
2 g  $\text{Na}_2\text{SO}_4$   
1 g  $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$   
4 g  $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$   
1,32 g  $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$   
mit  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bid.}}$  auf 1 l, autoklaviert

**Spurenelement-Lösung (Holliday, 1974)**

60 mg  $\text{H}_3\text{BO}_3$   
191 mg  $\text{MnCl}_2$   
400 mg  $\text{ZnCl}_2$   
47 mg  $\text{NaMoO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$   
140 mg  $\text{FeCl}_3 \times 6 \text{H}_2\text{O}$   
557 mg  $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$   
mit  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bid.}}$  auf 1 l, 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  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bid.}}$  auf 1 l, sterilfiltriert

**Regenerationsgar<sub>light</sub> (Schulz *et al.*, 1990)**

- a) Top-Agar:  
15 g Bacto-Agar  
182,2 g Sorbitol  
10 g Hefeextrakt  
4 g Pepton  
4 g Saccharose  
mit  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bid.}}$  auf 1 l auffüllen  
autoklavieren
- b) Bottom-Agar:  
Wie a), zusätzlich Antibiotikum  
zugegeben (s. o.)

#### 4.1.2 Stämme

##### *E. coli* Stämme

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  $\Delta$ (mrrhsdRMS-mcrBC)  $\phi$ 80lacZ $\Delta$ M15  $\Delta$ lacX74 nupG recA1 araD139  $\Delta$ (ara-leu)7697 galE15 galK16 rpsL(StrR) endA1  $\lambda$ -.

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

##### *U. maydis* Stämme

Tabelle 4.2: In dieser Arbeit verwendeten Stämme

Stamm	Genotyp	Resistenz	Referenz
FB1	<i>a1 b1</i>	-	(Banuett und Herskowitz, 1989)
FB2	<i>a2 b2</i>	-	(Banuett und Herskowitz, 1989)
JB2	<i>a2 <math>\Delta</math>b</i>	Hyg <sup>R</sup>	(Wahl <i>et al.</i> , 2010a)
FB1 hdp2:GFP	<i>a1 b1 hdp2:GFP</i>	Hyg <sup>R</sup>	(Goos, 2007)
FB2 hdp2:GFP	<i>a2 b2 hdp2:GFP</i>	Hyg <sup>R</sup>	(Goos, 2007)
FB1 $\Delta$ hdp2	<i>a1 b1 <math>\Delta</math>hdp2</i>	Hyg <sup>R</sup>	(Goos, 2007)
FB2 $\Delta$ hdp2	<i>a2 b2 <math>\Delta</math>hdp2</i>	Hyg <sup>R</sup>	(Goos, 2007)
AB31	<i>a2 P<sub>crq1</sub>:bW2, bE1</i>	Phleo <sup>R</sup>	(Brachmann <i>et al.</i> , 2001)
CP27	<i>a2 <math>\Delta</math>b::P<sub>crq1</sub>:rbf1</i>	Hyg <sup>R</sup>	(Heimel <i>et al.</i> , 2010b)
SG200	<i>a1:mfa2 bE1 bW2</i>	Phleo <sup>R</sup>	(Bölker <i>et al.</i> , 1995)
UTaB1	<i>a2 b2 P<sub>crq1</sub>:biz1</i>	Hyg <sup>R</sup>	(Brenner, 2017)
UBF27	<i>a1 b1 H1:mCherry</i>	Hyg <sup>R</sup>	(Faist, 2017)
UBF28	<i>a2 b2 H1:mCherry</i>	Hyg <sup>R</sup>	(Faist, 2017)
UBF30	<i>a1 b1 H1:3xmCherry ip<sup>r</sup>[P<sub>hxt1</sub>:NLS:GFP]ip<sup>s</sup></i>	Hyg <sup>R</sup> , Cbx <sup>R</sup>	(Faist, 2017)
UBF31	<i>a2 b2 H1:3xmCherry ip<sup>r</sup>[P<sub>hxt1</sub>:NLS:GFP]ip<sup>s</sup></i>	Hyg <sup>R</sup> , Cbx <sup>R</sup>	(Faist, 2017)
FB1 otef:GFP	<i>a1 b1 ip<sup>r</sup>[P<sub>otef</sub>:GFP]ip<sup>s</sup></i>	Cbx <sup>R</sup>	(Spellig <i>et al.</i> , 1996)
UMJ9	<i>a1 b1 <math>\Delta</math>rbf1::3xGFP ip<sup>r</sup>[P<sub>rbf1</sub>:rbf1]ip<sup>s</sup></i>	Cbx <sup>R</sup> , Hyg <sup>R</sup>	(Jurca, 2017)

UTaB4	$a2 b2 P_{crg1}:hdp2 ip^r[P_{UMAG\_06315}:GFP]ip^s$	(Brenner, 2017)
UTaB5	$a2 b2 P_{crg1}:hdp2 ip^r[P_{UMAG\_06315\Delta110bp}:GFP]ip^s$	(Brenner, 2017)

$a$ ,  $b$  – Paarungstyp-Loci, E1, W2 – Gene des  $b$ -Paarungstyp-Locus,  $\Delta$  – Deletion; P – Promotor,  $P_{crg1}$  – konditionaler arabinoseinduzierbarer Promotor (Bottin *et al.*, 1996),  $::$  – homologer Austausch,  $:$  – Fusion, Phleo<sup>R</sup> - Phleomycin-Resistenz, Cbx<sup>R</sup> – Carboxin Resistenz, Hyg<sup>R</sup> – Hygromycin-Resistenz, Nat<sup>R</sup> – Nourseothricin-Resistenz, ( $ip^r[...]$  $ip^s$ ) – ektopisch im  $ip$ -Locus integriert,  $*n$  – mehrfache Integration.

Tabelle 4.3: In dieser Arbeit hergestellten Stämme

Stamm	Genotyp	Resistenz	Ausgangsstamm
UMJ11	$a1 b1 hdp2:GFP ip^r[P_{crg1}:hdp2^S]ip^s$	Hyg <sup>R</sup> , Cbx <sup>R</sup>	FB1 Hdp2:GFP
UMJ12	$a1 b1 hdp2:GFP ip^r[P_{crg1}:hdp2^L]ip^s$	Hyg <sup>R</sup> , Cbx <sup>R</sup>	FB1 Hdp2:GFP
UMJ14	$a1 b1 hdp2:3xHA$	Hyg <sup>R</sup>	FB1
UMJ15	$a2 b2 hdp2:3xHA$	Hyg <sup>R</sup>	FB2
UMJ16	$a2 P_{crg1}:bW2, bE1 hdp2:3xHA$	Hyg <sup>R</sup> , Phleo <sup>R</sup>	AB31
UMJ17	$a1 b1 ip^r[P_{hdp2}:hdp2]ip^s$	Cbx <sup>R</sup>	FB1
UMJ18	$a2 b2 ip^r[P_{hdp2}:hdp2]ip^s$	Cbx <sup>R</sup>	FB2
UMJ19	$a1 b1 ip^r[P_{crg1}:rbf1:ER]ip^s$	Cbx <sup>R</sup>	FB1
UMJ20	$a1 b1 ip^r[P_{crg1}:rbf1:NLSER]ip^s$	Cbx <sup>R</sup>	FB1
UMJ21	$a1 b1 ip^r[P_{crg1}:NLSGFP:ER]ip^s$	Cbx <sup>R</sup>	FB1
UMJ22	$a1 b1 \Delta hdp2s::NLS3xGFP ip^r[P_{hdp2}:hdp2]ip^s$	Hyg <sup>R</sup> , Cbx <sup>R</sup>	UMJ17
UMJ23	$a2 b2 P_{crg1}:hdp2 P_{crg1}:biz1$	Gen <sup>R</sup> , Hyg <sup>R</sup>	UTaB1
UMJ24	$a1 b1 hdp2:GFP P_{crg1}:biz1$	Gen <sup>R</sup> , Hyg <sup>R</sup>	FB1 Hdp2:GFP
UMJ25	$a1 b1 hdp2:GFP P_{crg1}:biz1 ip^r[P_{crg1}:hdp2^S]ip^s$	Gen <sup>R</sup> , Hyg <sup>R</sup> , Cbx <sup>R</sup>	UMJ11
UMJ26	$a1 b1 hdp2:GFP P_{crg1}:biz1 ip^r[P_{crg1}:hdp2^L]ip^s$	Gen <sup>R</sup> , Hyg <sup>R</sup> , Cbx <sup>R</sup>	UMJ12
UMJ27	$a2 \Delta b::P_{crg1}:rbf1 \Delta biz1$	Gen <sup>R</sup> , Hyg <sup>R</sup>	CP27
UMJ28	$a1 b1 biz1:3xHA$	Hyg <sup>R</sup>	FB1
UMJ29	$a2 b2 biz1:3xHA$	Hyg <sup>R</sup>	FB2
UMJ30	$a2 P_{crg1}:bW2, bE1 biz1:3xHA$	Hyg <sup>R</sup> , Phleo <sup>R</sup>	AB31
UMJ31	$a2 \Delta b::P_{crg1}:rbf1 ip^r[P_{hdp2-1854}:GFP]ip^s$	Cbx <sup>R</sup> , Hyg <sup>R</sup>	CP27
UMJ32	$a2 \Delta b ip^r[P_{crg1}:hdp2]ip^s$	Cbx <sup>R</sup> , Hyg <sup>R</sup>	JB2
UMJ33	$a2 \Delta b ip^r[P_{crg1}:biz1]ip^s$	Cbx <sup>R</sup> , Hyg <sup>R</sup>	JB2
UMJ34	$a2 b2 ip^r[P_{crg1}:mfa1:3'UTR]ip^s*n$	Cbx <sup>R</sup>	FB2
UMJ35	$a2 \Delta b P_{crg1}:biz1$	Gen <sup>R</sup> , Hyg <sup>R</sup>	JB2
UMJ36	$a1 b1 hdp2:GFP ip^r[P_{crg1}:biz1:3xHA]ip^s$	Cbx <sup>R</sup> , Hyg <sup>R</sup>	FB1 Hdp2:GFP



UMJ37	<i>a2 Δb P<sub>crq1</sub>:biz1 ip<sup>f</sup>[P<sub>hdp2-1854</sub>:GFP]ip<sup>s</sup></i>	Cbx <sup>R</sup> , Gen <sup>R</sup> , Hyg <sup>R</sup>	UMJ35
UMJ38	<i>a2 b2 ip<sup>f</sup>[P<sub>tef</sub>:NLS-GFP]ip<sup>s</sup></i>	Cbx <sup>R</sup>	FB2
UMJ39	<i>a2 b2 ip<sup>f</sup>[P<sub>tef</sub>:GFP:NLS-ER]ip<sup>s</sup></i>	Cbx <sup>R</sup>	FB2
UMJ40	<i>a2 b2 ip<sup>f</sup>[P<sub>tef</sub>:NLS-GFP:ER]ip<sup>s</sup></i>	Cbx <sup>R</sup>	FB2
UMJ41	<i>a2 b2 Δmfa2::P<sub>crq1</sub>:mfa1</i>	Gen <sup>FRT</sup>	FB2
UMJ42	<i>a2 Δb::P<sub>crq1</sub>:rbf1:3xHA</i>	Hyg <sup>R</sup>	FB2
UMJ43	<i>a1:mfa2 bE1 bW2 ip<sup>f</sup>[P<sub>mig2.5</sub>:rbf1]ip<sup>s</sup>*n</i>	Cbx <sup>R</sup> , Phleo <sup>R</sup>	SG200
UMJ44	<i>a1:mfa2 bE1 bW2 ip<sup>f</sup>[P<sub>mig2.5</sub>:rbf1:3xHA]ip<sup>s</sup></i>	Cbx <sup>R</sup> , Phleo <sup>R</sup>	SG200
UMJ45	<i>a2 b2 ip<sup>f</sup>[P<sub>tef</sub>:sGFP]ip<sup>s</sup></i>	Cbx <sup>R</sup>	FB2
UMJ46	<i>a1 b1 H1:3xmCherry ip<sup>f</sup>[P<sub>mig2.5</sub>:rbf1:3xHA]ip<sup>s</sup></i>	Cbx <sup>R</sup> , Hyg <sup>R</sup>	UBF27
UMJ47	<i>a2 b2 H1:3xmCherry ip<sup>f</sup>[P<sub>mig2.5</sub>:rbf1:3xHA]ip<sup>s</sup></i>	Cbx <sup>R</sup> , Hyg <sup>R</sup>	UBF28
UMJ48	<i>a2 Δb P<sub>crq1</sub>:biz1 hdp2<sub>1-960bp</sub>:3xHA</i>	Gen <sup>R</sup> , Hyg <sup>R</sup> , Nat <sup>R</sup>	UMJ35
UMJ49	<i>a2 Δb::P<sub>crq1</sub>:rbf1 Δbiz1 hdp2<sub>1-960bp</sub>:3xHA</i>	Gen <sup>R</sup> , Hyg <sup>R</sup> , Nat <sup>R</sup>	UMJ27
UMJ50	<i>a2 b2 Δmfa2::P<sub>crq1</sub>:mfa1 ip<sup>f</sup>[P<sub>crq1</sub>:rbf1:3xHA]ip<sup>s</sup></i>	Cbx <sup>R</sup> , Gen <sup>FRT</sup>	UMJ41
UMJ51	<i>a1 b1 Δhdp2::hdp2<sup>2.ATGmut</sup></i>	Gen <sup>FRT</sup>	FB1 Δhdp2
UMJ52	<i>a2 b2 Δhdp2::hdp2<sup>2.ATGmut</sup></i>	Gen <sup>FRT</sup>	FB2 Δhdp2
UMJ53	<i>a1 b1 Δhdp2::hdp2<sup>1.ATGmut</sup></i>	Gen <sup>FRT</sup>	FB1 Δhdp2
UMJ54	<i>a2 b2 Δhdp2::hdp2<sup>1.ATGmut</sup></i>	Gen <sup>FRT</sup>	FB2 Δhdp2
UMJ55	<i>a2 Δb::P<sub>crq1</sub>:rbf1 Δhdp2</i>	Hyg <sup>R</sup> , Nat <sup>R</sup>	CP27
UMJ56	<i>a2 Δb::P<sub>crq1</sub>:rbf1 Δbiz1 Δhdp2</i>	Gen <sup>R</sup> , Hyg <sup>R</sup> , Nat <sup>R</sup>	UMJ27
UMJ57	<i>a2 Δb::P<sub>crq1</sub>:rbf1 ip<sup>f</sup>[P<sub>crq1</sub>:biz1]ip<sup>s</sup></i>	Cbx <sup>R</sup> , Hyg <sup>R</sup>	CP27
UMJ58	<i>a1 b1 Δhdp2::hdp2<sup>2.ATGmut</sup></i>	-	UMJ51
UMJ59	<i>a2 b2 Δhdp2::hdp2<sup>2.ATGmut</sup></i>	-	UMJ52
UMJ60	<i>a1 b1 Δhdp2::hdp2<sup>1.ATGmut</sup></i>	-	UMJ53
UMJ61	<i>a2 b2 Δhdp2::hdp2<sup>1.ATGmut</sup></i>	-	UMJ54
UMJ62	<i>a2 b2 Δmfa2::P<sub>crq1</sub>:mfa1</i>	-	UMJ41
UMJ63	<i>a2 Δb::P<sub>crq1</sub>:rbf1 Δum04581</i>	Hyg <sup>R</sup> , Gen <sup>R</sup>	CP27
UMJ64	<i>a1:mfa2 bE1 bW2 Δum04581</i>	Phleo <sup>R</sup> , Gen <sup>R</sup>	SG200
UMJ65	<i>a2 Δb::P<sub>crq1</sub>:rbf1 Δum05486</i>	Hyg <sup>R</sup> , Gen <sup>R</sup>	CP27
UMJ66	<i>a1:mfa2 bE1 bW2 Δum05486</i>	Phleo <sup>R</sup> , Gen <sup>R</sup>	SG200
UMJ67	<i>a2 Δb::P<sub>crq1</sub>:rbf1 Δum00473</i>	Hyg <sup>R</sup> , Gen <sup>R</sup>	CP27
UMJ68	<i>a1:mfa2 bE1 bW2 Δum00473</i>	Phleo <sup>R</sup> , Gen <sup>R</sup>	SG200
UMJ69	<i>a2 Δb::P<sub>crq1</sub>:rbf1 Δum03926</i>	Hyg <sup>R</sup> , Gen <sup>R</sup>	CP27
UMJ70	<i>a1:mfa2 bE1 bW2 Δum03926</i>	Phleo <sup>R</sup> , Gen <sup>R</sup>	SG200
UMJ71	<i>a2 b2 Δhdp2::hdp2<sup>2.ATGmut</sup>:GFP</i>	Hyg <sup>R</sup>	UMJ52

UMJ72	<i>α2 b2 Δhdp2::hdp2<sup>2.ATGmut</sup>:GFP ip<sup>r</sup>[P<sub>crq1</sub>:rbf1:3xHA]ip<sup>s</sup>*<sub>n</sub></i>	Cbx <sup>R</sup> , Hyg <sup>R</sup>	UMJ71
UMJ73	<i>α2 b2 Δhdp2::hdp2<sup>2.ATGmut</sup>:GFP ip<sup>r</sup>[P<sub>crq1</sub>:biz1]ip<sup>s</sup></i>	Cbx <sup>R</sup> , Hyg <sup>R</sup>	UMJ71
UMJ74	<i>α1 b1 Δhdp1</i>	Gen <sup>R</sup>	FB1
UMJ75	<i>α2 b2 Δhdp1</i>	Gen <sup>R</sup>	FB2
UMJ76	<i>α2 b2 ip<sup>r</sup>[P<sub>crq1</sub>:hdp1:3xHA]ip<sup>s</sup>*<sub>n</sub></i>	Cbx <sup>R</sup>	FB2
UMJ77	<i>α2 b2 Δprf1</i>	Gen <sup>R</sup>	FB2
UMJ78	<i>α1 b1 Δhdp2 ip<sup>r</sup>[P<sub>hdp2</sub>:hdp2]ip<sup>s</sup></i>	Cbx <sup>R</sup> , Hyg <sup>R</sup>	FB1 Δhdp2
UMJ79	<i>α1 b1 Δhdp2 ip<sup>r</sup>[P<sub>hdp2Δrbf1BS</sub>:hdp2]ip<sup>s</sup></i>	Cbx <sup>R</sup> , Hyg <sup>R</sup>	FB1 Δhdp2
UMJ80	<i>α2 Δb::P<sub>crq1</sub>:rbf1 Δhdp2 ip<sup>r</sup>[P<sub>hdp2</sub>:hdp2]ip<sup>s</sup></i>	Cbx <sup>R</sup> , Hyg <sup>R</sup> , Nat <sup>R</sup>	UMJ55
UMJ81	<i>α2 Δb::P<sub>crq1</sub>:rbf1 Δhdp2 ip<sup>r</sup>[P<sub>hdp2Δrbf1BS</sub>:hdp2]ip<sup>s</sup></i>	Cbx <sup>R</sup> , Hyg <sup>R</sup> , Nat <sup>R</sup>	UMJ55
UMJ82	<i>α1 b1 Δhdp2 ip<sup>r</sup>[P<sub>mig2.5</sub>:hdp2<sup>S</sup>]ip<sup>s</sup></i>	Cbx <sup>R</sup> , Hyg <sup>R</sup>	FB1 Δhdp2
UMJ83	<i>α1 b1 Δhdp2 ip<sup>r</sup>[P<sub>mig2.5</sub>:hdp2<sup>L</sup>]ip<sup>s</sup></i>	Cbx <sup>R</sup> , Hyg <sup>R</sup>	FB1 Δhdp2
UMJ84	<i>α1 b1 Δhdp2 ip<sup>r</sup>[P<sub>hdp2_rbf1BS_mut</sub>:hdp2]ip<sup>s</sup></i>	Cbx <sup>R</sup> , Hyg <sup>R</sup>	FB1 Δhdp2
UMJ85	<i>α2 Δb::P<sub>crq1</sub>:rbf1:3xHA ip<sup>r</sup>[P<sub>crq1</sub>:UMAG_05601:3xmyc]ip<sup>s</sup></i>	Cbx <sup>R</sup> , Hyg <sup>R</sup>	UMJ42
UMJ86	<i>α1 b1 ΔUMAG_05601</i>	Gen <sup>R</sup>	FB1
UMJ87	<i>α2 b2 ΔUMAG_05601</i>	Gen <sup>R</sup>	FB2
UMJ88	<i>α2 b2 rbf1:GFP</i>	Nat <sup>R</sup>	FB2
UMJ89	<i>α1 b1 ip<sup>r</sup>[P<sub>um01779</sub>:mCherry]ip<sup>s</sup></i>	Cbx <sup>R</sup>	FB1
UMJ90	<i>α2 b2 hdp2:GFP</i>	Nat <sup>R</sup>	FB2
UMJ91	<i>α1 b1 rbf1:GFP</i>	Nat <sup>R</sup>	FB1
UMJ92	<i>α2 b2 biz1:GFP</i>	Nat <sup>R</sup>	FB2
UMJ93	<i>α1 b1 hdp2:GFP ip<sup>r</sup>[P<sub>um01779</sub>:mCherry]ip<sup>s</sup></i>	Cbx <sup>R</sup> , Nat <sup>R</sup>	FB1 hdp2:GFP
UMJ94	<i>α1 b1 hdp2:3xHA biz1:3xMyc</i>	Hyg <sup>R</sup> , Nat <sup>R</sup>	UMJ14
UMJ95	<i>α2 b2 hdp2:3xHA biz1:3xMyc</i>	Hyg <sup>R</sup> , Nat <sup>R</sup>	UMJ15
UMJ96	<i>α1 b1 Δhdp2 Δegl1::hdp2<sup>S</sup></i>	Hyg <sup>R</sup> , Gen <sup>FRT</sup>	FB1 Δhdp2
UMJ97	<i>α1 b1 Δhdp2 Δegl1::hdp2<sup>L</sup></i>	Hyg <sup>R</sup> , Gen <sup>FRT</sup>	FB1 Δhdp2
UMJ98	<i>α2 b2 Δhdp2::hdp2<sup>2.ATGmut</sup> ip<sup>r</sup>[P<sub>rbf1</sub>:hdp2<sup>S</sup>]ip<sup>s</sup></i>	Cbx <sup>R</sup>	UMJ59
UMJ99	<i>α2 b2 Δhdp2::hdp2<sup>2.ATGmut</sup> ip<sup>r</sup>[P<sub>rbf1</sub>:hdp2<sup>L</sup>]ip<sup>s</sup></i>	Cbx <sup>R</sup>	UMJ59
UMJ100	<i>α2 Δb::P<sub>crq1</sub>:rbf1 Δhdp2 ip<sup>r</sup>[P<sub>hdp2_rbf1BS_mut</sub>:hdp2]ip<sup>s</sup></i>	Cbx <sup>R</sup> , Hyg <sup>R</sup> , Nat <sup>R</sup>	UMJ55
UMJ101	<i>α2 b2 Δhdp2 ip<sup>r</sup>[P<sub>rbf1</sub>:hdp2<sub>s</sub>]ip<sup>s</sup></i>	Cbx <sup>R</sup> , Hyg <sup>R</sup>	FB2 Δhdp2
UMJ102	<i>α2 Δb::P<sub>crq1</sub>:rbf1 Δbiz1 Δhdp2 ip<sup>r</sup>[P<sub>hdp2</sub>:hdp2]ip<sup>s</sup></i>	Cbx <sup>R</sup> , Gen <sup>R</sup> , Hyg <sup>R</sup> , Nat <sup>R</sup>	UMJ80
UMJ103	<i>α2 Δb::P<sub>crq1</sub>:rbf1 Δbiz1 Δhdp2 ip<sup>r</sup>[P<sub>hdp2Δrbf1BS</sub>:hdp2]ip<sup>s</sup></i>	Cbx <sup>R</sup> , Gen <sup>R</sup> , Hyg <sup>R</sup> , Nat <sup>R</sup>	UMJ81
UMJ104	<i>α2 Δb::P<sub>crq1</sub>:rbf1 Δbiz1 Δhdp2 ip<sup>r</sup>[P<sub>hdp2_rbf1BS_mut</sub>:hdp2]ip<sup>s</sup></i>	Cbx <sup>R</sup> , Gen <sup>R</sup> , Hyg <sup>R</sup> , Nat <sup>R</sup>	UMJ100
UMJ105	<i>α2 P<sub>crq1</sub>:bW2, bE1 ip<sup>r</sup>[P<sub>hdp2</sub>:hdp2]ip<sup>s</sup></i>	Cbx <sup>R</sup> , Phleo <sup>R</sup>	AB31
UMJ106	<i>α2 P<sub>crq1</sub>:bW2, bE1 ip<sup>r</sup>[P<sub>hdp2Δrbf1BS</sub>:hdp2]ip<sup>s</sup></i>	Cbx <sup>R</sup> , Phleo <sup>R</sup>	AB31

UMJ107	$a2 P_{crg1}:bW2, bE1 ip^r[P_{hdp2\_rbf1BS\_mut}:hdp2]ip^s$	Cbx <sup>R</sup> , Phleo <sup>R</sup>	AB31
--------	---	---------------------------------------	------

$a, b$  – Paarungstyp-Loci, E1, E2, W1, W2 – Gene des  $b$ -Paarungstyp-Locus,  $\Delta$  – Deletion; P – Promotor, P<sub>crg1</sub> – konditionaler arabinoseinduzierbarer Promotor (Bottin *et al.*, 1996), :: – homologer Austausch, : – Fusion, Phleo<sup>R</sup> – Phleomycin-Resistenz, Cbx<sup>R</sup> – Carboxin Resistenz, Hyg<sup>R</sup> – Hygromycin-Resistenz, Gen<sup>R</sup> – Geneticin-Resistenz, Gen<sup>FRT</sup> – Geneticin-Resistenz flankiert von FRT-Sequenzen, Nat<sup>R</sup> – Nourseothricin-Resistenz ( $ip^r[...ip^{s/*n}]$ ) – ektopisch im  $ip$ -Locus integriert, \* $n$  – 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.

#### Oligonukleotide

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

Tabelle 4.4: In dieser Arbeit verwendete Oligonukleotide

Bezeichnung	Nukleotidsequenz (5' – 3')	OMJ
<b>qRT-PCR-Analysen</b>		
Hdp2_RT_Exon1_fw	CACCTCGTTTAGACTGTACGAC	64
hdp2_wo_Intr_fw1	ACTGTACGACAAGAGAGCCG	15
hdp2_wo_Intr_fw2	ACGACAAGAGAGCCGC	16
hdp2_wo_Intr_rv	TTCTCCGTCGTACCTTCG	17
hdp2_in_Intr_fw2	TCGGTGGGAAATGTCTACG	18
hdp2_in_Intr_rv2	GAGCATTCCCAGGAGTAACG	19
hdp2_borders_fw	GCACCTTGCACTTCTTG	20
hdp2_borders_rv	ATGGATGCCTGCGAGTC	21
RT_3xHA_rv	GGGTAGGCCGCGTTGG	101
RT_3xHA_2_rv	AGGCGGCACCGGCATAG	102
RT_rbf1_3xHA_fw	TACACCCGACCTCACTCAG	103
RT_rbf1_3'UTR_rv	GGAGCCGAATGACGATTTG	104
RT_00715_Hdp2BS_fw	CCAGTGCATTCGTGATTCTC	110
RT_00715_Hdp2BS_rv	ATGTAGGGACAAGTCGGTAG	111
RT_01374_Hdp2BS_fw	CAAACCGATTCTGGCGTAAC	112
RT_01374_Hdp2BS_rv	ACCAGTCGTTCACTTCAG	113
RT_02238_Hdp2BS_fw	AACGAGCGAGCTCATTTG	114
RT_02238_Hdp2BS_rv	CAGGCGTTCAGTAGCAAATG	115
RT_06315_Hdp2BS_fw	CACGCAGTCAAGAAGCAAG	116
RT_06315_Hdp2BS_rv	GCCGAGCTTTGAGATGAGAC	117
RT_PPI_fw	ACATCGTCAAGGCTATCG	118
RT_PPI_rv	AAAGAACACCGGACTTGG	119
RT_ZM_GAPDH_fw	CTTCGGCATTGTTGAGGGTTTG	120
RT_ZM_GAPDH_rv	TCCTTGCTGAGGGTCCGTC	121

RT_UMAG_01779_fw	GCGCTCCCGGTTAC	123
RT_UMAG_01779_rv	TGTTGCTGCCGCTCTTC	124
RT_Pum01820_fw	TGGTTTGCATGCATGTC	161
RT_Pum01820_rv	GGTGGGACTCTCATTACG	162
RT_Pum05294_fw	GCGGCATTTACGTTGACTG	163
RT_Pum05294_rv	CATTGAACTCGACCCGAGAC	164
RT_UMAG_12024_LT_fw	CTGCTACCACCACCTTGAC	169
RT_UMAG_12024_LT_rv	CTTTGGCGAACAAGACTGC	170
RT_UMAG_12024_ST_fw	AACATCGCGCCTCATCTC	171
RT_UMAG_12024_ST_rv	GGTGAGACAGGTGGATGAG	172
RT_UMAG_05731_LT_fw	CAAGTGGATCGGAATTGTG	173
RT_UMAG_05731_LT_rv	TCGCTCCAACCTCGTCTTC	174
RT_UMAG_05731_fw	ACACCTCTCCGCAACGAC	175
RT_UMAG_05731_rv	CTTCGATTTGGGTGGTGATG	176
RT_kpp6_fw	TGTCGGCTTATCACGATCC	177
RT_kpp6_rv	GCGGCTGAAATTCTGTACC	178
RT_kpp6_LT_fw	GTGTTCACCTCGATCAC	179
RT_kpp6_LT_rv	GATGTACAAGCGGATGGAC	180
RT_UMAG_03923_fw	CATGCCAGCTTGAGCAAAC	181
RT_UMAG_03923_rv	GGGACGACTACATTGTTG	182
RT_UMAG_03923_LT_fw	GCTGGACTCGATGAAGTAGC	183
RT_UMAG_03923_LT_rv	TTCCTTGACGGCTCGTTTG	184
RT_UMAG_04064_fw	CGTGGCAGTCTGGAAATC	185
RT_UMAG_04064_rv	TTGATGGCGGTAGTGAGG	186
RT_UMAG_04064_LT_fw	TTCGACCTTCGCTCATTG	187
RT_UMAG_04064_LT_rv	GCCAGATCCGGGAAGAAAAG	188
RT_UMAG_06308_fw	ACGCCTTTCGTGGCAAC	189
RT_UMAG_06308_rv	GCAGCAGGATTTGACTACC	190
RT_UMAG_06308_LT_fw	TGGTCGGTGTGTGAATG	191
RT_UMAG_06308_LT_rv	ACTGGCACGCAGCTAAG	192
RT_UMAG_05601_fw	AAGGGATGCACGTCTCG	206
RT_UMAG_05601_rv	AAGGCGTGAAGTGCATTCG	207
RT_actin_f	CATGTACGCCGGTATCTCG	
RT_actin_r	CTCGGGAGGAGCAACAATC	
RT_bE-F	GCACAACACCTTCCATTGAC	
RT_bE-R	ACTGCTCCCGAATGTACT	
RT_bW-F (alt)	GATCTCACCCAGCCAATCAC	
Fw_RT_bW2 (neu 01/19)	TCGTGCAATGGATGGTAAGG	
RT_bW-R (alt)	GAGTTGATCGAGCCGAATG	
Rv_RT_bW2 (neu 01/19)	GAGTCGTGTGCCATCGAAG	
rt_riz1-F ( <i>biz1</i> )	AACATGCAAGGCTCAGGTAG	

rt_riz1-R ( <i>biz1</i> )	CTGTCCATCATTGGCTGATCC	
RT_Crg1_fw	TTGGTGCTGGCGTCATTG	
RT_Crg1_rv	CCGCGGTTATTGTATTCGTC	
RT_eIF2B_f	ATCCCGAACAGCCCAAAC	
RT_eIF2B_r	ATCGTCAACCGCAACCAC	
GFP_RT_for	GACCACTACCAGCAGAACAC	
GFP_RT_rev	ATGTGATCGCGCTTCTCGTTG	
RT_hdp1_fw	CGTCGATCCATCGCATAACG	
RT_hdp1_rv	TGAGCGAACGTCATTCTG	
RT_hdp2_F	GGCGCTTTCATTGGAAC	
RT_hdp2_R	AGCTTGAAGCCGATCGAC	
RT_Hdp2_2_fw	TTCATCTTCGCGCTCGCTC	218
RT_NosT_rv	GTTTGAACGATCGCCGGG	217
RT_rbf1-F	AGTACGAGCTACGACGGATTC	
rt-rbf1-R	GGGTAGGTGTTGGACACATTC	
06315-RT-R	TCGTCGATACTGAGACTAGC	
06315-RT-F	AACCACGTATCCTGTCTACC	
02238-RT-R	TCTTCTGCACTTCTGAAC	
02238-RT-F	CGCGAGATGCTACTTTAGAC	

<b>Gibson-Assembly Hdp2<sup>1./2.ATGmut</sup></b>		
1f-Hdp2-o(Vec)	ACGGCCGCCAGTGTGCTGGATGGACCGTGCCTAGCTAC	71
1r-Hdp2-o(Hdp2_2ATG)_2	GGACGCTGCGCGACAACGTCGGCAGACGG	105
2f-Hdp2-o(Hdp2_2ATG)	TGTCGCGCAGCGTCCCAGCCATCAGGACC	73
2r-Hdp2-o(Vec)	TGATGGATATCTGCAGGGCCATCTAGGCCTTAGGGTTCAGCAGCGGCA GCGT	74
1r-Hdp2-o(Hdp2_1ATG)	TTGTGACGCGTTGGTTACAAAGTGAATG	75
2f-Hdp2-o(Hdp2_1ATG)	TGTAACCAACGCGTCACAACGACCGCAGAG	76
1r-TOPO_Hdp2_-o(pUMA1441_G)	TCTGGCCATCTAGGCCTTAGGGTTCA	86
2f-pUMA1441_G-o(TOPO_Hdp2_)	AGGCCTAGATGGCCAGAAGTTCCTATT	87
2r-pUMA1441_G-o(TOPO_Hdp2_)	TCGGCCACTCAGGCCAGAAGTTCCTATA	88
3f-TOPO_Hdp2_-o(pUMA1441_G)	GGCCTGAGTGGCCGACTCGGCTTACA	89
3r-TOPO_Hdp2_-o(Vec)	AGCGGCCGCCAGTGTGATGGATATCTGCAGGCCAAGGCGTGTGTTGAAC C	90

<b>Gibson-Assembly P<sub>crg1</sub>:mfa1</b>		
1f-a2_Locus-o(Vec)	ACGGCCGCCAGTGTGCTGGCTCAATCTTACCCAATGTCC	78
1r-a2_Locus-o(pRU11_mfa1)	TTGAGGATCATTGGACGTGATGTAAGGT	79
2f-pRU11_mfa1-o(a2_Locus)	TCACGTCCAAATGATCCTCAAGATCCCAGGATAC	80
2r-pRU11_mfa1-o(pUMA1441_N)	TCTAGGCCTCCCCATCGAATTGGCCGCAATTCT	81
3f-pUMA1441_N-o(pRU11_mfa1)	CGATGGGGAGGCCTAGATGGCCAGAAGTTCCTATT	82
3r-pUMA1441_N-o(a2_Locus)	AAGCACATGGCCACTCAGGCCAGAAGTTCCTATA	83

4f-a2_Locus-o(pUMA1441_N)	TGAGTGGCCATGTGCTTTAGTGTGCACAGACC	84
4r-a2_Locus-o(Vec)	CAGTGTGATGGATATCTGCAGTTCTTGGGCAGTGTCTCGATGA	85

<b>Gibson-Assembly <i>rbf1</i> BS Mut in pMJ8</b>		
1f-pMJ8_p123-o(Vec)	TTGTAAGCTGAACAGCGCAACC	196
1r-pMJ8-O- <i>rbf1</i> BS_mut	GGATTGCCGATACTGCTGCTAAAGAC	197
2f-pMJ8-O- <i>rbf1</i> BS_mut	GCAGTATCGGCAATCTACAAGAGCTACA	198
2r-pMJ8_p123-o(Vec)	GGGGCTGAAGAAGCAAGAGGATCCGAGACCATCCAAG	199

<b>Deletionen</b>		
um00473_LB_fw	TCCACTCGTGAAGTGTGTTG	139
um00473_LB_rv_Sfil	ACAGGCCATCTAGGCCGTTCTGTGTGAAATGTAGGC	140
um00473_RB_fw_Sfil	ATTGGCCTGAGTGGCCCTGGCGGATATAGATGCG	141
um00473_RB_rv	AAGGCGACACCTCGATTAG	142
um03296_LB_fw	ACACATAACAACCGTCGATGG	143
um03296_LB_rv_Sfil	TTAGGCCATCTAGGCCGAGTTTGACGATGAGGG	144
um03296_RB_fw_Sfil	TATGGCCTGAGTGGCCCAACGGTGATGGACGTCC	145
um03296_RB_rv	CAAGGCGTCTCTGAACTCC	146
um04581_LB_fw	AATGCCCACTTGTTCTCTG	147
um04581_LB_rv_Sfil	TTAGGCCATCTAGGCCCTTGCTGTACTGACGGTTTAG	148
um04581_RB_fw_Sfil	TTTGGCCTGAGTGGCCGCCGACCCGCACGTC	149
um04581_RB_rv	CGGAACGTGCCATCTTTG	150
um05486_LB_fw	CGTTCGCACGTTGAACAC	151
um05486_LB_rv_Sfil	TTTGGCCATCTAGGCCCTGTATCCACGCTGGTGTC	152
um05486_RB_fw_Sfil	ATCGGCCTGAGTGGCCAACACCCTGGGCAATCAATC	153
um05486_RB_rv	CTCGAGTCGTTCTCAACTAC	154
UMAG_05601_LB_fw	CATTCCTCACAACGATACG	202
UMAG_05601_LB_Sfil_rv	CACGCCATCTAGGCCCGTGCCTAGTCGTGTG	203
Sfil_UMAG_05601_RB_fw	ATAGGCCTGAGTGGCCTCCTTCTCAGCCATGTTC	204
UMAG_05601_RB_rv	AAAGACAGCGCGAGCGAAG	205
Egl1_LB_fw	CGGCGTTTCAGGAACTTAC	208
Egl1_LB_rv_Sfil	AGAGGCCATCTAGGCCTGGTTGCTAAAATTATGGGTTATG	209
Sfil_Egl1_RB_fw	ACTGGCCTGAGTGGCCTCGCGAATCGCCGGCATC	210
Egl1_RB_rv	CCACCGTGAATCACGAATACC	211
LB_UMAG_03749_fw	GAGGGCCATCAGATATGTTC	212
LB_UMAG_03749_Sfil_rv	ATAGGCCATCTAGGCCCTCTGTTGCTCTGCCTG	213
Sfil_RB_UMAG_03749_fw	ATAGGCCTGAGTGGCCCTCGGCCATTCGACTG	214
RB_UMAG_03749_rv	CTCGGACTCTTCGACCCTAC	215

<b>Tamoxifen</b>		
Tamo_fw_Sfil	ACCGGCCAACGCGGCCAACGCAACGAGATGGGCG	34
Tamo_rv	TTGCTTAAGTTAGATGGTGTGGG	35
Tamo_fw_Sfil_2	ACCGGCCAACGCGGCCCGCAACGAGATGGGCG	42
NLS_Tamo_fw_Sfil	ACCGGCCAACGCGGCCATGGTCGAGCCTCAAAAAAGAAGAGAAAGGT CGAATTCGGCCGCAACGAGATGGGCG	43
Tamoxifen_Seq_fw	GGCATGGTCGAGATCTTTG	46
NLSGFP_fw_Ndel	CCACCACATATGGTCGAGCCTCC	36
NLSGFP_fw_Ndel_2	CCACCACATATGGTCGAGCCTCAAA	37
NLSGFP_rv_Sfil	TGTGGCCGCGTTGGCCCTGTACAGCTCGTCCATGC	38
GFP_fw_Ndel	AGAGGACATATGGTGAGCAAGGGCGAG	44
GFP_rv_Sfil	GAGGGCCGCGTTGGCCAGCTTGTACAGCTCGTCCATGC	45
<b>Hdp2 Promotoranalyse</b>		
PwB_001_fw	AGAGGTACCCAGCCCAATGCTGCTCAATAG	58
PwB_002_fw	AGCGGTACCTTCATCTCTTTCGCCCTATTCC	59
PwB_001_002_rv	AGACCATGGGTTGGTTACAAAGTGAATGCAAGG	60
PwB_003_004_fw	ACAGGTACCGATGGCTTATGTAGTCGAGGTG	61
PwB_003_rv	AGACCATGGAGAAGTAGAGGTGGGCTTCAG	62
PwB_004_rv	ACGCCATGGTAGGGCGAAAGAGATGAAC	63
P1Hdp2_fw_Ndel	GGCATATGTAAGCTGAACAGCGCAACC	29
<b>Hdp2 Expression</b>		
Hdp2_s_fw_Ndel	CGCATATGGACGTTGTCATGCAGCG	22
Hdp2_L_fw_Ndel	CGCATATGTCACAACGACCGCAGAG	23
Hdp2_rv_Sfil	TTGGCCGCGTTGGCCTTGGGTTTCAGCAGCGGCAG	24
Hdp2_rv_AflII	CGCTTAAGTTAGGGTTTCAGCAGCGG	25
Sspl_Hdp2_s_fw	CACAATATTATGGACGTTGTCATGCAGC	193
Sspl_Hdp2_L_fw	CACAATATTATGTCACAACGACCGCAGAG	194
Hdp2_stop_rv_Sspl	CACAATATTTTAGGGTTTCAGCAGCGG	195
<b>Hdp2 in Locus</b>		
Hdp2_rv_Sfil	TTGGCCGCGTTGGCCTTGGGTTTCAGCAGCGGCAG	24
Hdp2_Lbfus_fw	CAAACATGCCGACTTCAACC	26
Hdp2_RB_fw_Sfil	TTGGCCTGAGTGGCCGACTCGGCTTACATCGCACG	27
Hdp2_RB_rv	GCCAAGGCGTGTGTTGAACC	28
Hdp2_in_Intron_fw	CCAGCAGACAGCCATATCG	39
Hdp2_LB_sKI_Sfil	AGAGGCCGCGTTGGCCAGACGGCGAGCTTCTTC	40
Hdp2_LB_LKI_Sfil	AGAGGCCGCGTTGGCCGTTGGTTACAAAGTGAATGCAAGG	41
Hdp2_LB_fw	AGCCAGCAGACAGCCATATC	65
Hdp2_LB_rv_Sfil_B	ACAGGCCATCTAGGCCGTTGGTTACAAAGTGAATGCAAG	66



Hdp2_2ATG_fw	ATGGACGTTGTCATGCAGCG	95
Hdp2_960bp_Sfil_rv	AGAGGCCGCGTTGGCCGTGCAGATGAGCGGCGAC	96
Hdp2_960bp_nested_fw	AGGCGGAAACGTCAACTC	106
Hdp2_RB_nested_rv	TGACGCTTGCTGACTAGTTG	107
Hdp2_LBfusTAA_SfiB_rv	TTAGGCCATCTAGGCCTTAGGGTTCAGCAGCGGC	122
<b>Biz1 in Locus</b>		
Biz1_LBfus_fw	CCCATCGGGACCTAGTACAC	48
Biz1_LBfus_rv_Sfil	ACAGGCCGCGTTGGCCGACCAACGACGGCTGGTG	49
Biz1_RB_fw_Sfil	AACGGCCTGAGTGGCCAGCATGGGCGAAAGCTG	50
Biz1_RB_rv	TTGCACGCCGTTCTTTG	51
Biz1_P_LB_fw	ATCCCGTCTGCATGTTT	52
Biz1_P_LB_rv_Sfil	ACAGGCCATCTAGGCCGCTGTTTCAAGCACACTGG	53
Biz1_RBfus_fw_Sfil	AGAGGCCTGAGTGGCCATGTCGATGCTTAGCACACG	54
Biz1_RBfus_rv	CATTGTGGGCGTAGATCGG	55
Biz1_LB_n_fw	GCCAACAATGGGCATGTG	56
Biz1_RB_n_rv	AGTGGTATGAGAGCGATGAG	57
<b>Sequenzierungen</b>		
Hdp2_Intron_seq_fw	ACCAGCAGCAGAACAGAC	47
M13_for	GTA AACGACGGCCAG	
M13_rev	CAGGAAACAGCTATGAC	
pHxt_seq_f	GCCTATCCTTCCCTCTTCAAG	
Nos_rev	CAAGACCGCAACAGGATTCAATC	
p123GFP_rev	CTGAACTTGTGGCCGTTTACGTCG	
JF62 (pMig25_f)	GCTCTAGACATAAAAGCTCCTCGTTCATCC	
crg seq	CAGTCTGGAGGCTCAAGACAAAGCG	
p123_ORF_Potef_for	CCAGCGAGACGTTCCAATAAAGGG	
Seq_Gen_fw	GTACGGGTACATCGGATCTG	
<b>Sonstige</b>		
NLSGFP_fw_BglII	GGAGATCTATGGTCGAGCCTCCAAAAAAG	30
NLSGFP_rv_XbaI	GGTCTAGAGCGGCCCAATTCTCATG	31
Mfa1_fw_NdeI	CAGGACCATATGCTTTGATCTTCGCTCAGAC	32
Mfa1_rv_AflII	CACCTTAAGCTAGGCAACAACACAGCTGG	33
pUMA1441_NotI_mut_fw	CATGCTCGAGAGGCCGCCAG	69
pUMA1441_XhoI_rv	ACTCACATCTGCCGCACTC	70
mfa1_3UTR_rv_AscI	ACAAGGCGCGCCGTGATGGTTCACGCCAAACG	77
Sspl_Pcrg_kurz_fw	GATGAATATTGTTGCCAATGCCCTGGCGTAAG	91
NosT_Sspl_rv	GGCCAATATTCATCGAATTCTCATGTTTGAC	92
EcoRV_NcoI_rbf1_fw	ATAGATATCCATGGACATCTTGGGTAAGTCCAAGC	93

Rbf1_AscI_rv	ATAGGCGCGCCCTAGGCGCTCTGCAGTTG	94
b_LB_fw	GCGAGAGCAGAGGTTGAAG	97
b_LB_rv	TTTCAGTGATACGTTTAGTCCC	98
b_RB_fw	TGGCGTCGGCTGACTTTG	99
b_RB_rv	AAAGTGGGTGAGGTTCTTGC	100
AfIII_pUMA1441_GenR_fw	ACACTTAAGGGCCTAGATGGCCAG	108
pUMA1441_GenR_KpnI_rv	ACTGGTACCGGCCACTCAGGCCAGAAG	109
BamHI_Sfil_FLP_fw	ACAGGATCCGGCCTAGATGGCCATGCCGAGTTTGGCATC	137
FLP_woSTOP_rv_NcoI	ATACCATGGAGATGCGACGGTTGATGTACG	138
NdeI_UMAG_05601_fw	ACACATATGCCATCCAGCAGTC	200
UMAG_05601_Sfil_rv	ACAGGCCGCGTTGGCCAGAAACAGAGAGAATCCAAAGTC	201
NosT_fw	CCGCCCGCGATCGTTC	216

Tabelle 4.5: In dieser Arbeit verwendete Plasmide

Bezeichnung	Beschreibung	Selektionsmarker	Referenz
p123	Enthält eGFP unter Kontrolle des konstitutiv aktiven $P_{otef}$ -Promotors; homologe Integration in den <i>ip</i> -Locus	Amp <sup>R</sup> , Cbx <sup>R</sup>	(Aichinger <i>et al.</i> , 2003)
pBF14	Enthält NLS:3xGFP unter der Kontrolle des konstitutiv aktiven $P_{hxt}$ -Promotors; homologe Integration in den <i>ip</i> -Locus	Amp <sup>R</sup> , Cbx <sup>R</sup>	(Faist, 2017)
pCU3	Enthält eGFP unter Kontrolle des konstitutiv aktiven $P_{tef}$ -Promotors; homologe Integration in den <i>ip</i> -Locus	Amp <sup>R</sup> , Cbx <sup>R</sup>	(Brachmann <i>et al.</i> , 2001)
pDL39	Enthält mcherry unter Kontrolle des $P_{um01779}$ -Promotors; homologe Integration in den <i>ip</i> -Locus	Amp <sup>R</sup> , Cbx <sup>R</sup>	Lanver, pers. Mitteilung
pJF2	Enthält Konstrukt zur Deletion von <i>prf1</i>	Amp <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup> , Gen <sup>R</sup>	(Fortenbacher, 2016)
pJU10	Enthält den ORF von <i>biz1</i> mit C-terminal fusioniertem 3xHA unter der Kontrolle des <i>crg1</i> -Promotors	Amp <sup>R</sup> , Cbx <sup>R</sup>	(Ulrich, 2020)
pJU12	Enthält den ORF von <i>rbf1</i> mit C-terminal fusioniertem 3xHA unter der Kontrolle des <i>crg1</i> -Promotors	Amp <sup>R</sup> , Cbx <sup>R</sup>	(Ulrich, 2020)
pJU14	Enthält den ORF von <i>hdp1</i> mit C-terminal fusioniertem 3xHA unter der Kontrolle des <i>crg1</i> -Promotors	Amp <sup>R</sup> , Cbx <sup>R</sup>	(Ulrich, 2020)
pJU88	Enthält Konstrukt zur Deletion von <i>hdp1</i>	Amp <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup> , Gen <sup>R</sup>	(Ulrich, 2020)
pMS76	Enthält NLS:3xGFP unter der Kontrolle des $P_{mig2.5}$ -Promotors; homologe Integration in den <i>ip</i> -Locus	Amp <sup>R</sup> , Cbx <sup>R</sup>	(Scherer <i>et al.</i> , 2006)
pMS85	Enthält Konstrukt zur Fusion von GFP an <i>rbf1</i> im nativen Locus	Amp <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup> , Hyg <sup>R</sup>	(Heimel <i>et al.</i> , 2010b)
pRbf1	Enthält den ORF von <i>rbf1</i> und 3 kb des 5' Bereichs	Amp <sup>R</sup> , Cbx <sup>R</sup>	(Heimel <i>et al.</i> , 2010b)

pRU11	Enthält sGFP unter Kontrolle des arabinoseinduzierbaren $P_{crg1}$ -Promotors; homologe Integration in den <i>ip</i> -Locus	Amp <sup>R</sup> , Cbx <sup>R</sup>	(Brachmann <i>et al.</i> , 2001)
pRU11 Pcrg1:biz1	Enthält den ORF von <i>biz1</i> unter Kontrolle des arabinoseinduzierbaren $P_{crg1}$ -Promotors; homologe Integration in den <i>ip</i> -Locus	Amp <sup>R</sup> , Cbx <sup>R</sup>	Vraneš, pers. Mitteilung
pUC57RE	Enthält Tamoxifenbindedomäne	Amp <sup>R</sup>	Perez-Martin, pers. Mitteilung
pUMA262	Enthält eine Nourseothricin-Resistenz-Kassette als Sfil-Fragment zur Generierung von Deletionskonstrukten	Amp <sup>R</sup> , Nat <sup>R</sup>	(Brachmann <i>et al.</i> , 2004)
pUMA317	Enthält eine eGFP-Hygromycin-Kassette als Sfil-Fragment für die C-terminale Fusion mit eGFP	Amp <sup>R</sup> , Hyg <sup>R</sup>	(Becht <i>et al.</i> , 2006)
pUMA321	Enthält eine $P_{crg1}$ -Kassette als Sfil-Fragment zum Austausch von Promotoren	Amp <sup>R</sup> , Nat <sup>R</sup>	(Brachmann <i>et al.</i> , 2004)
pUMA389	Enthält eine eGFP-Nourseothricin-Kassette als Sfil-Fragment für die C-terminale Fusion mit eGFP	Amp <sup>R</sup> , Nat <sup>R</sup>	(Becht <i>et al.</i> , 2006)
pUMA792	Enthält eine 3xHA-Hygromycin-Kassette als Sfil-Fragment für die C-terminale Fusion mit dem 3xHA-Tag	Amp <sup>R</sup> , Hyg <sup>R</sup>	Baumann, MPI Marburg
pUMA793	Enthält eine 3xHA-Nourseothricin-Kassette als Sfil-Fragment für die C-terminale Fusion mit dem 3xHA-Tag	Amp <sup>R</sup> , Nat <sup>R</sup>	Philip Müller, MPI Marburg
pUMA797	Enthält eine 3xMyc-Nourseothricin-Kassette als Sfil-Fragment für die C-terminale Fusion mit dem 3xMyc-Tag	Amp <sup>R</sup> , Nat <sup>R</sup>	Philip Müller, MPI Marburg
pUMA1057	Enthält eine Geneticin-Resistenz-Kassette als Sfil-Fragment zur Generierung von Deletionskonstrukten	Amp <sup>R</sup> , Gen <sup>R</sup>	(Baumann <i>et al.</i> , 2012)
pUMA1441	Enthält eine Hygromycin-Resistenz-Kassette, flankiert von FRT-Sequenzen, als Sfil-Fragment zur Generierung von Deletionskonstrukten	Amp <sup>R</sup> , Hyg <sup>R</sup>	(Khrunyk <i>et al.</i> , 2010)
pUMA1446	Enthält FLP-Rekombinase unter Kontrolle des arabinoseinduzierbaren $P_{crg1}$ -Promotors; homologe Integration in den <i>ip</i> Locus	Amp <sup>R</sup> , Cbx <sup>R</sup>	(Khrunyk <i>et al.</i> , 2010)
pVV17	Enthält Konstrukt zur Deletion des <i>b</i> -Locus	Amp <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup>	Vincon, pers. Mitteilung
pCR 2.1	Vektor zur Klonierung von PCR Produkten mittels Topoisomerase-Aktivität. Blau/Weiß-Selektion möglich	Amp <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup>	Invitrogen

Tabelle 4.6: In dieser Arbeit erstellte Plasmide

Bezeichnung	Beschreibung	Klonierung	Selektionsmarker
pMJ6	Kurze Protein Version von <i>hdp2</i> unter $P_{crg1}$ in <i>ip</i> -Locus	Insert mittels PCR mit OMJ22 + OMJ25 (auf gDNA 521) amplifiziert (3103 bp) in TOPO pCR 2.1 kloniert und mit NdeI und AflIII wieder herausgeschnitten und in pRU11 (7966 bp) ligiert	Amp <sup>R</sup> , Cbx <sup>R</sup>

pMJ7	Lange Protein Version von <i>hdp2</i> unter $P_{crg1}$ in <i>ip</i> -Locus	Insert mittels PCR mit OMJ23 + OMJ25 (auf gDNA 521) amplifiziert (3268 bp), in TOPO pCR 2.1 kloniert und mit NdeI und AflIII wieder herausgeschnitten und in pRU11 (7966 bp) ligiert	Amp <sup>R</sup> , Cbx <sup>R</sup>
pMJ8	Gesamter ORF von <i>hdp2</i> + 1,2 kb Promotor vor (upstream) dem 5' Exon zur Integration in <i>ip</i> -Locus	Insert mittels PCR mit OMJ29 + OMJ25 (auf gDNA 521) amplifiziert (5782 bp), in TOPO pCR 2.1 kloniert und mit NdeI und AflIII wieder herausgeschnitten und in p123 (4489 bp) ligiert	Amp <sup>R</sup> , Cbx <sup>R</sup>
pMJ9	3xHA-Tag Fusion an <i>hdp2</i> in Locus	Flanken des Fusionskonstrukts mittels PCR mit OMJ26 + OMJ24 bzw. OMJ27 + OMJ28 (auf gDNA 521) amplifiziert (1018 bp), mit 3xHA-Tag aus pUMa792 (SfiI-Fragment) ligiert und in TOPO pCR 2.1 über TOPO TA cloning kit kloniert	Amp <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup> , Hyg <sup>R</sup>
pMJ10	Deletion der kurzen <i>hdp2</i> Protein Version durch Ersetzen von NLS3xGFP	Flanken des Knock-In-Konstrukts mittels PCR mit OMJ39 + OMJ40 bzw. OMJ27 + OMJ28 (auf gDNA 521) amplifiziert (1104 bp bzw. 1003 bp), mit NLS3xGFP aus pMJ5 (SfiI-Fragment) ligiert und in TOPO pCR 2.1 über TOPO TA cloning kit kloniert; ist fw im TOPO	Amp <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup> , Hyg <sup>R</sup>
pMJ13	NLSGFP mit Tamoxifenbindedomäne unter $P_{crg1}$ in <i>ip</i> -Locus	Insert NLSGFP mit OMJ37 + OMJ38 (auf pMS76) und Tamoxifen binding domain mit OMJ34 + OMJ35 (auf pUC57RE) mittels PCR amplifiziert, NLSGFP mit NdeI & SfiI und Tamoxifen binding domain mit SfiI & AflIII geschnitten und in pRU11 (7966 bp) kloniert.	Amp <sup>R</sup> , Cbx <sup>R</sup>
pMJ14	<i>rbf1</i> mit Tamoxifenbindedomäne unter $P_{crg1}$ in <i>ip</i> -Locus	Insert Tamoxifen binding domain mit OMJ42 + OMJ35 (auf pUC57RE) mittels PCR amplifiziert, Tamoxifen binding domain mit SfiI & AflIII geschnitten und in pJU12 kloniert.	Amp <sup>R</sup> , Cbx <sup>R</sup>
pMJ15	<i>rbf1</i> mit NLS-Tamoxifenbindedomäne unter $P_{crg1}$ in <i>ip</i> -Locus	Insert NLS-Tamoxifen binding domain mit OMJ43 + OMJ35 (auf pUC57RE) mittels PCR amplifiziert, NLS-Tamoxifen binding domain mit SfiI & AflIII geschnitten und in pJU12 kloniert.	Amp <sup>R</sup> , Cbx <sup>R</sup>
pMJ17	<i>crg1</i> -Promotor Fusion vor <i>biz1</i> in Locus	Flanken des Fusionskonstrukts mittels PCR mit OMJ52 + OMJ53 bzw. OMJ54 + OMJ55 (auf gDNA 521) amplifiziert, mit $P_{crg1}$ Nat-Kassette aus pUMa321 (2897 bp SfiI-Fragment) ligiert und in TOPO pCR 2.1 über TOPO TA cloning kit kloniert	Amp <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup> , Nat <sup>R</sup>
pMJ18	<i>crg1</i> -Promotor Fusion vor <i>biz1</i> in Locus	$P_{crg1}$ Gen <sup>R</sup> -Kassette wurde aus pUMa1759 als SfiI-Fragment ausgeschnitten und in pMJ17 eingesetzt.	Amp <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup> , Gen <sup>R</sup>
pMJ19	3xHA-Tag Fusion an <i>biz1</i> in Locus	Flanken des Fusionskonstrukts mittels PCR mit OMJ48 + OMJ49 bzw. OMJ50 + OMJ51 (auf gDNA 521) amplifiziert, mit 3xHA-Tag aus pUMa792 (SfiI-Fragment) ligiert und in TOPO pCR 2.1 über TOPO TA cloning Kit kloniert	Amp <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup> , Hyg <sup>R</sup>

pMJ20	<i>biz1</i> Deletion	Flanken des Fusionskonstrukts mittels PCR mit OMJ52 + OMJ53 bzw. OMJ50 + 51 (auf gDNA 521) amplifiziert, mit GenKO aus pUMA1057 (pMF-1g) (2,1 kb Sfi-Fragment) ligiert. Mit Nested Primer OMJ56 + OMJ57 (auf 3-Fragment-Ligationsprodukt) amplifiziert und in TOPO pCR 2.1 über TOPO TA cloning Kit kloniert	Amp <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup> , Gen <sup>R</sup>
pMJ21	<i>mfa1</i> + 3' UTR unter $P_{crg1}$ in <i>ip</i> -Locus	Insert mittels PCR mit OMJ32 + OMJ77 (auf gDNA 521) amplifiziert ( $\approx$ 780 bp), mit NdeI und Ascl geschnitten und in pJU10 (8 kb) kloniert.	Amp <sup>R</sup> , Cbx <sup>R</sup>
pMJ22	NLSGFP mit Tamoxifenbindedomäne unter $P_{tef}$ in <i>ip</i> -Locus	NLSGFP mit Tamoxifenbindedomäne unter Tef-Promotor in <i>ip</i> -Locus. Insert NLSGFP mit OMJ37 + OMJ38 (auf pMS76) und Tamoxifen binding domain mit OMJ34 + OMJ35 (auf pUC57RE) mittels PCR amplifiziert, NLSGFP mit NdeI & SfiI und Tamoxifen binding domain mit SfiI & AflII geschnitten und in pCU3 kloniert.	Amp <sup>R</sup> , Cbx <sup>R</sup>
pMJ23	GFP mit NLS-Tamoxifenbindedomäne unter $P_{tef}$ in <i>ip</i> -Locus	GFP mittels PCR mit OMJ44 + OMJ45 (auf p123) und NLS-ER mit OMJ43 + OMJ35 (auf pUC57RE) amplifiziert. GFP mit NdeI & SfiI, NLS-ER mit SfiI und AflII geschnitten und in pCU3 kloniert	Amp <sup>R</sup> , Cbx <sup>R</sup>
pMJ24	<i>rbf1</i> :3xHA unter $P_{crg1}$ in <i>b</i> -Locus	Insert ( $P_{crg1}$ : <i>rbf1</i> :3xHA) wurde mittels PCR mit OMJ91 + OMJ92 (auf pJU12) amplifiziert (3,7 kb), die Enden mit SspI blunt restringiert und in Stul geöffneten Vektor pVV17 kloniert.	Amp <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup> , Hyg <sup>R</sup>
pMJ25	<i>Mfa1</i> + 3' UTR unter $P_{crg1}$ mit FRT-Geneticinkassette in <i>mfa2</i> -Locus	Inserts wurden mittels PCR generiert und anschließend über Gibson assembly in EcoRI geöffneten TOPO pCR 2.1 Vektor kloniert. OMJ78 + OMJ79 auf FB2 gDNA (Fragment 1); OMJ80 + OMJ81 auf pMJ21 (Fragment 2); OMJ82 + OMJ83 auf pUMa1441 GenR (Fragment 3); OMJ84 + OMJ85 auf FB2 gDNA (Fragment 4)	Amp <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup> , Gen <sup>FRT</sup>
pMJ26	<i>rbf1</i> unter $P_{mig2.5}$ in <i>ip</i> -Locus	Insert wurde mittels PCR mit OMJ93 + OMJ94 (auf gDNA 521) amplifiziert, mit NcoI & Ascl geschnitten und in pMS76 kloniert.	Amp <sup>R</sup> , Cbx <sup>R</sup>
pMJ27	<i>rbf1</i> :3xHA unter $P_{mig2.5}$ in <i>ip</i> -Locus	Insert wurde mittels PCR mit OMJ93 + OMJ92 (auf pJU12) amplifiziert, mit NcoI & Ascl geschnitten und in pMS76 kloniert.	Amp <sup>R</sup> , Cbx <sup>R</sup>
pMJ28	Verkürztes <i>hdp2</i> mit 3xHA-Tag in Locus	Flanken des Fusionskonstrukts wurden mittels PCR mit (LB) OMJ95 + OMJ96 (auf gDNA) bzw. (RB) OMJ27 + OMJ28 (auf gDNA) amplifiziert und mittels TOPO TA cloning in TOPO pCR2.1 kloniert. Der Topo-Vector mit der LB wurde mittels SfiI und DraIII geöffnet (diente als Backbone) während die RB mit diesen Enzymen aus dem TOPO (als Insert) herausgeschnitten wurde. LB (Backbone) und RB (Insert)	Amp <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup> , Nat <sup>R</sup>

		wurden zusammen mit Sfil-Fragment aus pUMA793 (1,8 kb) ligiert.	
pMJ29	<i>hdp2</i> mit mutiertem 2. ATG	LB von <i>hdp2</i> (OMJ71 + OMJ105) und <i>hdp2</i> ORF (OMJ73 + OMJ74) wurden mittels Gibson-Assembly in pCR2.1 kloniert. Dieser Vektor wurde mit Sfil und DrallI geöffnet und mit Sfil-Fragment aus pUMA1441 GenR (2,2 kb) und Sfil DrallI Fragment aus TOPO <i>hdp2</i> RB (1,5 kb) ligiert.	Amp <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup> , Gen <sup>FRT</sup>
pMJ30	<i>hdp2</i> mit mutiertem 1. ATG	LB von <i>hdp2</i> (OMJ71 + OMJ75) und <i>hdp2</i> ORF (OMJ76 + OMJ74) wurden mittels Gibson-Assembly in pCR2.1 kloniert. Aus diesem Vektor wurde ein Agel Sall Fragment (2,4 kb) geschnitten und in pMJ29 kloniert.	Amp <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup> , Gen <sup>FRT</sup>
pMJ31	<i>hdp2</i> Deletion	LB von <i>hdp2</i> (OMJ65 + OMJ66 auf gDNA521) wurde in TOPO pCR2.1 kloniert und anschließend mit Sfil + DrallI geöffnet. <i>hdp2</i> RB (OMJ27 + OMJ28 auf gDNA521) wurde ebenfalls mit Sfil + DrallI aus einem TOPO pCR2.1 Vektor geschnitten (1494 bp) und zusammen mit einem Sfil-Fragment aus pUMa262 (1437 bp) in den geöffneten Vektor ligiert.	Amp <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup> , Nat <sup>R</sup>
pMJ32	<i>UMAG_04581</i> Deletion	LB von <i>UMAG_04581</i> (OMJ147+ OMJ148 auf gDNA 521) wurde zusammen mit RB (OMJ149 + OMJ150 auf gDNA 521) und Sfil-Fragment aus pUMa1057 (2,2 kb) ligiert und in TOPO pCR 2.1 über TOPO TA cloning Kit kloniert	Amp <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup> , Gen <sup>R</sup>
pMJ33	<i>UMAG_05486</i> Deletion	LB von <i>UMAG_05486</i> (OMJ151+ OMJ152 auf gDNA 521) wurde zusammen mit RB (OMJ153 + OMJ154 auf gDNA 521) und Sfil-Fragment aus pUMa1057 (2,2 kb) ligiert und in TOPO pCR 2.1 über TOPO TA cloning Kit kloniert	Amp <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup> , Gen <sup>R</sup>
pMJ34	<i>UMAG_00473</i> Deletion	LB von <i>UMAG_00473</i> (OMJ139+ OMJ140 auf gDNA 521) wurde zusammen mit RB (OMJ141 + OMJ142 auf gDNA 521) und Sfil-Fragment aus pUMa1057 (2,2 kb) ligiert und in TOPO pCR 2.1 über TOPO TA cloning Kit kloniert	Amp <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup> , Gen <sup>R</sup>
pMJ35	<i>UMAG_03926</i> Deletion	LB von <i>UMAG_03926</i> (OMJ143+ OMJ144 auf gDNA 521) wurde zusammen mit RB (OMJ145 + OMJ146 auf gDNA 521) und Sfil-Fragment aus pUMa1057 (2,2 kb) ligiert und in TOPO pCR 2.1 über TOPO TA cloning Kit kloniert	Amp <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup> , Gen <sup>R</sup>

pMJ36	GFP-Tag Fusion an <i>hdp2</i> in Locus	3xHA Tag aus pMJ9 wurde mit SfiI herausgeschnitten (3102 bp) und mit GFP-Tag aus pUMa 317 (SfiI-Fragment) ersetzt.	Amp <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup> , Hyg <sup>R</sup>
pMJ39	Gesamtes <i>hdp2</i> + 1,2 kb Promotor (ohne <i>rbf1</i> Konsensus) vor (upstream) dem 5' Exon zur Integration in <i>ip</i> -Locus	Vektor pMJ8 wurde mit BamHI und NdeI geöffnet, wodurch 409 bp rausfallen. Anschließend wurden die Überhänge entfernt und der Vektor religiert.	Amp <sup>R</sup> , Cbx <sup>R</sup>
pMJ42	Kurze Protein Version von <i>hdp2</i> unter <i>P<sub>mig2.5</sub></i> in <i>ip</i> -Locus	Insert (3,1 kb) wurde mittels PCR (OMJ193 + 195 auf gDNA 521) amplifiziert mit SspI geschnitten und in pMS76 (5606 bp, mit NcoI + AscI geöffnet und Überhänge entfernt) ligiert.	Amp <sup>R</sup> , Cbx <sup>R</sup>
pMJ43	Lange Protein Version von <i>hdp2</i> unter <i>P<sub>mig2.5</sub></i> in <i>ip</i> -Locus	Insert (3,25 kb) wurde mittels PCR (OMJ194 + 195 auf gDNA 521) amplifiziert mit SspI geschnitten und in pMS76 (5606 bp, mit NcoI + AscI geöffnet und Überhänge entfernt) ligiert.	Amp <sup>R</sup> , Cbx <sup>R</sup>
pMJ44	Gesamtes <i>hdp2</i> + 1,2 kb Promotor ( <i>rbf1</i> Konsensus mutiert) vor (upstream) dem 5' Exon zur Integration in <i>ip</i> -Locus	Inserts (OMJ196 + 197, OMJ198 + 199, auf pMJ8) wurden mittels PCR generiert und anschließend per Gibson assembly in Vektor pMJ8 (BamHI und NdeI geöffnet) kloniert.	Amp <sup>R</sup> , Cbx <sup>R</sup>
pMJ45	<i>UMAG_05601</i> mit 3x Myc-Tag unter <i>P<sub>crG1</sub></i> in <i>ip</i> -Locus.	Insert (3,2 kb) wurde mittels PCR (OMJ200 + 201 auf gDNA 521) amplifiziert, mit NdeI und SfiI geschnitten und in Vektor pBF10 ligiert	Amp <sup>R</sup> , Cbx <sup>R</sup>
pMJ46	<i>UMAG_05601</i> Deletion	LB von <i>UMAG_05601</i> (OMJ202 + 203 auf gDNA 521) wurde zusammen mit RB (OMJ204 + 205 auf gDNA 521) und SfiI-Fragment aus pUMa1057 (2,2 kb) ligiert und in TOPO pCR 2.1 über TOPO TA cloning Kit kloniert	Amp <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup> , Gen <sup>R</sup>
pMJ47	1xGFP-Tag Fusion an <i>hdp2</i> in Locus	Vektor pMJ9 wurde mittels SfiI geöffnet und mit SfiI Fragment (2,5 kb) aus pUMa389 zusammen ligiert.	Amp <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup> , Nat <sup>R</sup>
pMJ48	1xGFP-Tag Fusion an <i>biz1</i> in Locus	Vektor pMJ19 wurde mittels SfiI geöffnet und mit SfiI Fragment (2,5 kb) aus pUMa389 zusammen ligiert.	Amp <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup> , Nat <sup>R</sup>
pMJ51	<i>egl1</i> Deletion	LB von <i>egl1</i> (OMJ208 + 209 auf gDNA 521) wurde zusammen mit RB (OMJ210 + 211 auf gDNA 521) und SfiI-Fragment aus pUMa1441 GenR (2,2 kb) ligiert und in TOPO pCR.21 über TOPO TA cloning Kit kloniert.	Amp <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup> , Gen <sup>FRT</sup>
pMJ54	3xMyc-Tag Fusion an <i>biz1</i> in Locus	Vektor pMJ19 wurde mittels SfiI geöffnet und mit SfiI Fragment (1,8 kb) aus pUMa797 zusammen ligiert.	Amp <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup> , Nat <sup>R</sup>
pMJ55	<i>egl1</i> Deletion durch Ersetzen mit kurzer <i>hdp2</i> Version	Vektor pMJ51 wurde mittels StuI geöffnet und dephosphoryliert. Das Insert (OMJ193 + OMJ195 auf gDNA 521) wurde mittels SspI geschnitten und blunt in den geöffneten Vektor ligiert.	Amp <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup> , Gen <sup>FRT</sup>

pMJ56	<i>egl1</i> Deletion durch Ersetzen mit langer <i>hdp2</i> Version.	Vektor pMJ51 wurde mittels StuI geöffnet und dephosphoryliert. Das Insert (OMJ194 + OMJ195 auf gDNA 521) wurde mittels SspI geschnitten und blunt in den geöffneten Vektor ligiert.	Amp <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup> , Gen <sup>FRT</sup>
pMJ58	Kurze <i>hdp2</i> Version unter <i>P<sub>rbf1</sub></i> in <i>ip</i> -Locus	Vektor Prbf1_rbf1 wurde NdeI & NotI geöffnet, Überhänge entfernt und dephosphoryliert. Das Insert (OMJ193 + OMJ195 auf gDNA 521) wurde mittels SspI geschnitten und blunt in den geöffneten Vektor ligiert.	Amp <sup>R</sup> , Cbx <sup>R</sup>
pMJ59	Lange <i>hdp2</i> Version unter <i>P<sub>rbf1</sub></i> in <i>ip</i> -Locus	Vektorrückgrat Prbf1_rbf1 wurde durch PCR (OMJ2 + OMJ216 auf Prbf1_rbf1) erzeugt. Das Insert (OMJ194 + OMJ195 auf gDNA 521) wurde mittels SspI geschnitten und blunt in den geöffneten Vektor ligiert.	Amp <sup>R</sup> , Cbx <sup>R</sup>
p123_PwB_001	<i>hdp2</i> Promotorfragment vor GFP im <i>ip</i> -Locus	PCR Fragment (OMJ58 + OMJ60 auf gDNA 521) wurde mit NcoI & KpnI geschnitten und in p123 kloniert	Amp <sup>R</sup> , Cbx <sup>R</sup>
pUMA1441 mut	Deletionskassette flankiert von FRT-Sequenzen	NotI-Schnittstelle vor der SfiI-Schnittstelle wurde mit Hilfe der Primer OMJ 69 & OMJ70 mutiert	Amp <sup>R</sup> , Hyg <sup>FRT</sup>
pUMA1441 GenR	Deletionskassette flankiert von FRT-Sequenzen	NotI-Fragment (2028 bp) aus pUMa1057 wurde in pUMa1441 mut kloniert	Amp <sup>R</sup> , Gen <sup>FRT</sup>
pUMA1759_2	<i>crg1</i> Promotorfusionskassette	NotI-Fragment (2028 bp) aus pUMa1057 wurde in pUMa321 kloniert	Amp <sup>R</sup> , Gen <sup>R</sup>
pMF5-9g	C-Terminale 3xHA Fusionskassette	NotI-Fragment (2028 bp) aus pUMa1057 wurde in pUMa792 kloniert	Amp <sup>R</sup> , Gen <sup>R</sup>

Amp<sup>R</sup> – Ampicillin-Resistenz, Kan<sup>R</sup> – Kanamycin-Resistenz, Cbx<sup>R</sup> – Carboxin-Resistenz, Hyg<sup>R</sup> – Hygromycin-Resistenz, Hyg<sup>FRT</sup> – Hygromycin-Resistenz flankiert von FRT-Sequenzen, Gen<sup>R</sup> – Geneticin-Resistenz, Gen<sup>FRT</sup> – Geneticin-Resistenz flankiert von FRT-Sequenzen, Nat<sup>R</sup> – Nourseothricin-Resistenz

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 (Southern-Blot; EMSA), Roti®-PVDF-Membran (Carl Roth) für den Transfer von Proteinen (Western Blot), 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 (Biorad) 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), 0,22 µm Sterilfilter (Carl Roth), 1 ml Einmalspritzen (Dispomed). Falls nicht gesondert erwähnt, wurden alle weiteren verwendeten Labormaterialien bei den Firmen Carl-Roth, Hartenstein, Thermo Fisher, Biozym und NeoLab bezogen.

## 4.2 Mikrobiologische und genetische Methoden

### 4.2.1 *Escherichia coli*

#### 4.2.1.1 Kultivierung von *E. coli*

*E. coli*-Stämme wurden entweder als Schüttelkulturen bei 150 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.

#### 4.2.1.2 Bestimmung der Zelldichte

Die Zelldichte von Flüssigkulturen wurde photometrisch in einem Jenway 7300 Spectro-Photometer bei einer Wellenlänge von 600 nm bestimmt. Um eine lineare Abhängigkeit sicherzustellen, wurden für die Messung der OD<sub>600</sub> die Kulturen durch entsprechende Verdünnung auf einen Wert unterhalb von 0,5 verdünnt. Als Nullwert wurde die OD<sub>600</sub> des jeweiligen Kulturmediums verwendet, eine OD<sub>600</sub> = 1,0 entspricht etwa 10<sup>9</sup> Zellen/ml.

#### 4.2.1.3 Transformation von *E. coli* modifiziert nach (Cohen *et al.*, 1972)

Um *E. coli*-Zellen kompetent für die Aufnahme von DNA zu machen, wurden diese mit CaCl<sub>2</sub> chemisch behandelt. Dazu wurden Zellen von einer frisch ausgestrichenen Platte in 4 ml SOB Medium ohne Magnesium überführt und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die Kultur wurde in 200 ml frisches Medium (SOB + f. c. 10 mM MgCl<sub>2</sub>) überführt und bei 30 °C und 180 rpm bis zum Erreichen einer OD<sub>550</sub> von 0,3 inkubiert, was einer Zelldichte von 5x10<sup>7</sup> Zellen/ml entspricht. Die Kultur wurde auf 50 ml Falcons aufgeteilt und die Zellen wurden nach einer zehnmütigen Inkubation auf Eis für 15 min bei 3.000 rpm und 4 °C abzentrifugiert. Das Pellet wurde durch Vortexen in 16,7 ml CCMB 80 aufgenommen. Nach einer Inkubation von 20 min auf Eis wurde der Überstand durch Zentrifugation (10 min, 3.000 rpm und 4 °C) abgetrennt und entfernt. Nach Resuspendierung des Pellets in 4,17 ml CCMB 80 wurden Aliquots von je 50 µl erzeugt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Anschließend kann eine Lagerung bei -80 °C erfolgen.

Um diese Zellen zu transformieren, wurden sie zunächst langsam auf Eis aufgetaut. Nach Zugabe der Plasmid-DNA mit einem DNA-Gehalt von maximal 1 ng erfolgte eine 15-minütige Inkubation auf Eis. Ein Hitzeschock für 45 s bei 42 °C sorgte für die Aufnahme der DNA. Nach Zugabe von 200 µl dYT-Medium wurden die Zellen bei 37 °C und 1400 rpm 30-60 Minuten geschüttelt. Dies sorgte für die Expression der auf dem Plasmid vorhandenen Gene, wozu auch die Resistenzgene gegen ein

nachfolgend verwendetes Antibiotikum gehören. Diese Resistenz wird als Selektionsmarker verwendet, indem der Ansatz auf YT-Platten mit dem entsprechenden Antibiotikum ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert wurde. Diese Methode erzielte eine Transformationseffizienz von etwa  $10^7$  Transformanden pro  $\mu\text{g}$  eingesetzter DNA.

#### CCMB 80

10 ml 1M KOAc, pH 7,0  
11,8 g  $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$   
4 g  $\text{MnCl}_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$   
2 g  $\text{MgCl}_2$   
100 ml Glycerin  
in 1 l  $\text{H}_2\text{O}$  pH 6,4, sterilfiltriert

#### 4.2.2 *Ustilago maydis*

##### 4.2.2.1 Kultivierung von *U. maydis*

*U. maydis*-Stämme wurden standardmäßig entweder als Schüttelkulturen bei 180 rpm oder auf Festmedien unter aeroben Bedingungen bei 28 °C kultiviert. Übernachtskulturen wurden entweder aus bei -80 °C gelagerten Glycerinkulturen oder von bewachsenen 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<sub>light</sub>-Übernachtskultur bei -80 °C gelagert.

##### 4.2.2.2 Bestimmung der Zelldichte von *U. maydis* Kulturen

Die Zelldichte von Flüssigkulturen wurde photometrisch in einem Jenway 7300 Spectro-Photometer bei einer Wellenlänge von 600 nm bestimmt. Um eine lineare Abhängigkeit sicherzustellen, wurden für die Messung der  $\text{OD}_{600}$  die Kulturen durch entsprechende Verdünnung auf einen Wert unterhalb von 0,5 verdünnt. Als Nullwert wurde die  $\text{OD}_{600}$  des jeweiligen Kulturmediums verwendet, eine  $\text{OD}_{600} = 1,0$  entspricht etwa  $1-5 \times 10^7$  Zellen/ml.

##### 4.2.2.3 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  $\text{OD}_{600}$  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 Flüssigmedium das induzierende Bedingung bot 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.

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

##### **Herstellung von Protoplasten von *U. maydis***

Von einer auf Platte wachsenden Kultur wurde eine 10 ml YEPS<sub>light</sub>-Flüssigkultur angesetzt und für 8 - 10 h bei 28 °C geschüttelt. Diese Vorkultur wurde anschließend in 50 ml frischem YEPS<sub>light</sub>-Medium verdünnt und bei 28 °C bis zu einer Zelldichte von  $1 - 2 \times 10^7$  Zellen/ml (bis  $OD_{600} = 0,6 - 1,0$ ) geschüttelt. Nach Erreichen des optimalen Zelltiters wurden die Zellen durch Zentrifugation (3.500 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 H<sub>2</sub>O<sub>bid.</sub>, sterilfiltrieren

##### **STC**

10 mM Tris-HCl, pH 7,5  
100 mM CaCl<sub>2</sub>  
1 M Sorbitol  
in H<sub>2</sub>O<sub>bid.</sub>, 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.

<b>Antibiotika Konz. in Bottom Agar Platten</b>	<b>STC/PEG (25 ml)</b>
Carboxin: 4 µg/ml	60 % STC-Puffer 15 ml
Hygromycin: 400 µg/ml	40 % PEG 4000
Nourseothricin: 100 µg/ml	10 g PEG
Geneticin: 1000 µg/ml	in STC-Puffer lösen, sterilfiltrieren

#### 4.2.2.5 Pflanzeninfektionen

Für Pathogenitätstests wurde eine Spritzinfektion durchgeführt, bei der 200 µl einer Pilzsuspension in das Innere des Blattwirtels sieben Tage alter Maispflanzen (Early Golden Bantam) injiziert wurden. Die entsprechenden Stämme wurden in YEPS<sub>light</sub>-Flüssigmedium bis zu einer OD<sub>600</sub> = 0,8 angezogen, durch Zentrifugation (3500 rpm, 5 min, RT) pelletiert und in H<sub>2</sub>O<sub>bid.</sub> aufgenommen (OD<sub>600</sub> = 3,0). Für Kreuzungen wurden die kompatiblen Stämme vor der Infektion 1:1 gemischt. Die Bonitur erfolgte 7 Tage nach Infektion.

#### 4.2.2.6 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<sub>600</sub> = 0,3 - 0,5) in CM-Glukose 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, Maßstabskalierung) erfolgte mit der AxioVision-Software Zen (Zeiss, Jena).

#### 4.2.2.7 Chlorazol Black E-Färbung

Sechszehn Stunden bis acht Tage nach der Pflanzeninfektion wurden die Blätter ca. 2 cm unter der Injektionsstelle abgetrennt. Es folgte eine Entfärbung der Blattsnitte für 3 bis 4 Tage in 100 % Ethanol. Nachdem die Schnitte in H<sub>2</sub>O<sub>bid.</sub> gewaschen wurden, erfolgte die Inkubation in 10 %-iger KOH

bei 90 °C (max. 6 Stunden). Danach wurde die KOH-Lösung vorsichtig entfernt und die Chlorazol Black E-Lösung dazu gegeben. Es folgte eine Inkubation ÜN bei 60 °C und danach die Entnahme der Färbelösung. Die Präparate können in 50 % Glycerin aufbewahrt werden.

### **Chlorazol Black E-Lösung**

0,03 % f. c. Chlorazol (Sigma) in H<sub>2</sub>O<sub>bid.</sub>

Glycerin und Milchsäure im Mischverhältnis 1:1:1

## **4.3 Molekularbiologische Standardmethoden**

### **4.3.1 Isolierung von Nukleinsäuren**

#### **4.3.1.1 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, HeraeusBiofuge 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
5 % (v/v)	Triton X-100
in H <sub>2</sub> O <sub>bid.</sub>	

#### **Minilysat(III)-Lösung**

3 M	NaAc, pH 4,8
in H <sub>2</sub> O <sub>bid.</sub>	

#### **Lysozym-Lösung**

10 mg/ml Lysozym in 1x TE-Puffer

#### 4.3.1.2 Isolierung genomischer DNA aus *U. maydis* mit Hilfe der „alternativen Präparation“ (M. Vraneš)

Für die Isolierung genomischer DNA aus *U. maydis* wurden 2,5 ml Kulturen über Nacht in Yeps<sub>light</sub> bei 28 °C im Schüttelinkubator kultiviert. Anschließend wurde die Kultur in 2 ml Reaktionsgefäße gegeben (Glaskugeln vorgelegt), abzentrifugiert (1 min, 13.000 rpm, Heraeus Biofuge pico) und der Überstand abgenommen. Zum Pellet wurden 500 µl Lysis-Puffer (50:50 mit 1x TE-Puffer gemischt) gegeben und die Zellen 10 - 15 Minuten auf einem Vibrax-Schüttler (1400 rpm) aufgeschlossen. Danach wurden die Zelltrümmer zuerst 15 Minuten bei 65 °C aufgekocht und danach für 5 Minuten auf Eis inkubiert. Zur Aussalzung der Proteine wurden 100 µl 8 M Kaliumacetat zugegeben, gut gevortext oder 8 - 10 x invertiert und anschließend die Zelltrümmer bei 14.000 rpm für 15 Minuten abzentrifugiert (RT, Heraeus Biofuge pico). 500 µl des Überstands wurden in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß gegeben, in dem bereits 400 µl Isopropanol vorgelegt worden waren. Nach sehr gutem Mischen (8-10x invertieren oder vortexen) wurde die DNA bei einem weiteren Zentrifugationsschritt (15 min, 13.000 rpm, RT, Heraeus Biofuge pico) ausgefällt. Anschließend wurde das Pellet einmal mit 500 - 1000 µl 70 % Ethanol gewaschen (5 min, 13.000 rpm) und danach erneut für ca. 5 sec anzentrifugiert, um restliche Flüssigkeiten zu entfernen. Das Pellet wurde 3 - 5 Minuten bei RT getrocknet und danach in 50 µl TE-Puffer mit 50 µg/ml RNaseA aufgenommen. Anschließend wurde die DNA bei 50 °C und 850 rpm für 20 Minuten in einem Eppendorf-Thermomixer gelöst. Zur Qualitätskontrolle wurde 1 µl der genomischen DNA auf ein 0,8 %-iges Agarosegel aufgetragen und analysiert.

##### Lysis-Puffer

1 % (w/v)	SDS
50 mM	Tris-HCl, pH 7,5
50 mM	Na <sub>2</sub> -EDTA, pH 8,0
in H <sub>2</sub> O <sub>bid.</sub>	

#### 4.3.1.3 RNA-Isolierung aus *U. maydis* (Trizol)

Diese Methode orientiert sich am Protokoll der Firma Invitrogen und wurde zur Präparation von Gesamt-RNA aus *U. maydis* Flüssigkulturen/Aktivkohlemedien/infiziertes Pflanzenmaterial verwendet. Es wurde ausschließlich nukleasefreies Verbrauchsmaterial verwendet.

**A)** 50 ml Zellkultur (auch induzierte Kulturen) wurden in CM-Medium bis zu einer OD<sub>600</sub> = 0,5 angezogen und pelletiert (3.500 rpm, 5 min, RT). Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in flüssigem Stickstoff schockgefroren (ggf. wurde das Pellet bei -80 °C gelagert).

**B)** Aus pheromonstimulierten *U. maydis* Zellen: 3 ml Zellkultur ( $OD_{600} = 0,3 - 0,5$ ) wurden pelletiert (3.500 rpm, 5 min, RT), der Überstand verworfen und das Pellet in flüssigem Stickstoff schockgefroren (ggf. Aufbewahrung bei  $-80^{\circ}\text{C}$ ).

**C)** Von aktivkohlehaltigen Festmedien: *U. maydis* Myzel wurde nach 2 - 3 Tage (bis filamentöses Wachstum sichtbar war) mit Hilfe einer Glaspipette abgeschabt und in ein Reaktionsgefäß überführt. Das Pellet wurde in flüssigem Stickstoff schockgefroren (ggf. Aufbewahrung bei  $-80^{\circ}\text{C}$ ). Die tiefgefrorenen Proben wurden in einem Mörser (bei ständiger Kühlung durch flüssigen Stickstoff) zu feinem Pulver verarbeitet.

**D)** Aus *U. maydis* infizierten Maispflanzen: 200-300 mg Tumormaterial mehrerer Pflanzen wurde in ein 2 ml Reaktionsgefäß vereinigt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren (ggf. Aufbewahrung bei  $-80^{\circ}\text{C}$ ). Die tiefgefrorenen Proben wurden in einem Mörser (bei ständiger Kühlung durch flüssigen Stickstoff) zu feinem Pulver verarbeitet.

Auf das tiefgefrorene Pellet **(A)**, **(B)** bzw. Pulver **(C)**, **(D)** wurde 1 ml Trizol (Invitrogen) pipettiert, dieser Ansatz kurz gevortext und nach Zugabe von ca. 300 mg Glasperlen ( $150-200\ \mu\text{m}\ \varnothing$ ) wurden die Zellen in einer Kugelmühle (Retsch MM200) bei 25 Hz für 5 min aufgeschlossen. Der Zellaufschluss wurde in zwei frische 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt, um die Glasperlen aus dem Ansatz zu entfernen. Nach fünf-minütiger Inkubation bei RT wurden pro Ansatz (1 ml Trizol) 200  $\mu\text{l}$  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  $\mu\text{l}$  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 70 % 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  $\mu\text{l}$  Nuklease-freiem Wasser (Ambion) aufgenommen und für zehn Minuten bei  $50^{\circ}\text{C}$  in einem Eppendorf-Heizblock gelöst. Eine Qualitäts- und Quantitätskontrolle erfolgte durch photometrische Messung am NanoDrop ND-2000 Spektralphotometer.

#### 4.3.2 Handhabung von Nukleinsäuren

##### 4.3.2.1 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  $-20^{\circ}\text{C}$  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  $H_2O_{bid.}$  oder TE-Puffer gelöst.

Alternativ erfolgte eine Fällung durch Zugabe eines halben Volumens einer 30 % PEG 8000/30 mM  $MgCl_2$  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.

#### 4.3.2.2 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 Nucleinsäuren wurden anschließend mit Ethanol präzipitiert (s.o.).

#### 4.3.2.3 Konzentrationsbestimmung von DNA

Die Konzentration von Nucleinsäuren 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  $\mu g/ml$  doppelsträngiger DNA und 33  $\mu g/ml$  einzelsträngiger DNA. Als Maß für die Reinheit der Desoxyribonucleinsäuren 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 ND-2000 Spektralphotometer.

Zur Konzentrationsbestimmung von Nucleinsäuren in geringen Konzentrationen (10  $pg/\mu l$ –100  $ng/\mu l$ ) wurde das Qbit<sup>®</sup> dsDNA HS Assay Kit (Invitrogen) verwendet.

### 4.3.3 *in vitro* Modifikationen von DNA (Sambrook *et al.*, 1989)

#### 4.3.3.1 Restriktion von DNA

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

Ein analytischer Ansatz enthielt:

0,5 µg	DNA
0,5 U	Restriktionsenzym
2 µl	10x Reaktionspuffer
	in einem 20 µl Reaktionsansatz

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

#### 4.3.3.2 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
2 µl	10x Reaktionspuffer
	in einem 20 µl Reaktionsansatz

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 3 M Na-Acetat, pH 5,3 und 250 µl Ethanol gefällt, mit 70 % Ethanol gewaschen, getrocknet und in TE-Puffer aufgenommen.

#### 4.3.3.3 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 Mungbohnen Nukleasepuffer
1 U	Mungbohnen 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.

#### 4.3.3.4 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 drei- bis fünffachen molarem Überschuss gegenüber der dephosphorylierten, linearisierten Plasmid-DNA eingesetzt. Ein typischer Reaktionsansatz enthielt:

50 ng	linearisierter, dephosphorylierter Vektor
	fünffach molarer Überschuss an linearem Fragment
1 U	T4 DNA-Ligase
2 µl	10x T4-DNA-Ligase-Puffer
	in einem 20 µl Reaktionsansatz

Der Ansatz wurde entweder 2 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 16 °C inkubiert.

#### 4.3.4 Auftrennung und Nachweis von DNA-Fragmenten

##### 4.3.4.1 Nicht-denaturierende Agarose-Gelelektrophorese

In einem Agarosegel können Nukleinsäuren im elektrischen Feld entsprechend ihrer Größe aufgetrennt, identifiziert und isoliert werden (Sambrook *et al.*, 1989). In der Regel wurden Gele mit 0,8 % Agarose hergestellt. Hierfür wurde die entsprechende Menge an Agarose in 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.

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

Für die Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wurde das JETSORB®-Kit (Genomed) verwendet. Das Prinzip besteht darin, die DNA unter Hochsalzbedingungen an eine Silikatmatrix zu binden, von Verunreinigungen frei zu waschen und schließlich unter Niedrigsalzbedingungen die DNA

von dieser Matrix zu eluieren. Die Isolierung wurde nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Mit dieser Methode konnten DNA-Fragmente einer Länge von 200 bp bis 5 kb aus Agarosegelen zu etwa 80 - 90 % isoliert werden.

#### 4.3.4.3 Transfer von DNA (Southern-Blot) Modifiziert nach (Southern, 1975)

Der Transfer der aufgetrennten DNA-Fragmente aus einem Agarose-Gel auf eine Nylonmembran erfolgte mittels Kapillar-Blot. Hierbei wird die Transfer-Lösung (20x SSC) aus einem Pufferreservoir über Kapillarkräfte durch das Gel hindurch in einen auf dem Gel platzierten Stapel Papierhandtücher gesaugt. Die DNA-Fragmente werden durch den Pufferstrom aus dem Gel eluiert und binden an die darüber liegende Nylonmembran (Hybond-N+, Amersham Pharmacia Biotech). Vor dem Transfer wurde das Agarose-Gel für jeweils 15 min in 0,25 M HCl, DENAT- und RENAT-Lösung inkubiert, um u.a. einen Teil der Purine abzuspalten und damit den Transfer großer DNA-Fragmente zu erleichtern. Der Kapillar-Blot erfolgte in der Regel über Nacht, mindestens jedoch für 2 h. Anschließend wurde die Membran kurz getrocknet und die DNA durch UV-Bestrahlung (Stratalinker 1800, Stratagene) fixiert.

<b>DENAT-Lösung</b>	<b>RENAT-Lösung</b>	<b>SSC (20x)</b>
1,5 M NaCl	1,5 M NaCl	3,0 M NaCl
0,4 M NaOH	282 mM Tris-HCl	0,3 M Na-Citrat x 2H <sub>2</sub> O
in 1 l H <sub>2</sub> O <sub>bid.</sub>	218 mM Tris-Base	in 1 l H <sub>2</sub> O <sub>bid.</sub> , pH 7,0
	in 1 l H <sub>2</sub> O <sub>bid.</sub>	

#### 4.3.4.4 Herstellung von DNA-Hybridisierungssonden

Gen-spezifische Sonden wurden durch den Einbau von Digoxigenin-11-dUTP (DIG) in die Sonden-DNA hergestellt. Ein typischer Ansatz für die Markierungsreaktion enthielt:

- 6,6 µl DNA (0,5-1 µg in H<sub>2</sub>O<sub>bid.</sub>)
- 1 µl 10x DIG-Mix (Jena Bioscience, siehe Herstellerangaben)
- 1 µl 10x Octadeoxyribonukleotide in Markierungspuffer (New England Biolabs)
- 1 µl BSA (10 µg/µl)
- 0,4 µl DNA Polymerase I large (Klenow)-Fragment (New England Biolabs)

Vor der Markierungsreaktion wurde die Sonden-DNA zunächst für 10 Minuten bei 95 °C in einem Eppendorf-Heizblock denaturiert. Anschließend wurde das Gemisch über Nacht, mindestens jedoch eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Statt Hitzeinaktivierung und anschließender Fällung wurde das Gemisch mit 1 ml Southern-Hybridisierungspuffer gelöst und 10 Minuten bei 95 °C in einem Eppendorf-Heizblock oder einem Wasserbad denaturiert.

#### 4.3.4.5 Spezifischer Nachweis immobilisierter DNA

Zur Absättigung der unspezifischen Bindestellen der Nylon-Membran wurde diese mit Southern-Hybridisierungspuffer für 15-30 Minuten bei 65 °C in einer Hybridisierungs-Röhre prä-inkubiert. Der Puffer wurde anschließend verworfen, die denaturierte Sonde (in 15 ml Southern-Hybridisierungspuffer) hinzugegeben und über Nacht im Hybridisierungssofen bei 65 °C hybridisiert.

Anschließend wurde die Membran für je 15 Minuten bei 65 °C mit 2x SSPE + 0,1 % (v/v) SDS, 1x SSPE + 0,1 % (v/v) SDS und 0,1x SSPE + 0,1 % (v/v) SDS gewaschen. Für die Detektion wurde die Membran bei RT in der Hybridisierungs-Röhre in den folgenden Lösungen inkubiert:

5 Minuten DIG-Waschpuffer

30 Minuten DIG2-Lösung

30 Minuten Antikörper-Lösung (1:10.000 Anti-Digoxigenin-Fab-Fragmente (Roche) in DIG2-Lösung)

2x 15 Minuten in DIG-Waschpuffer

5 Minuten in DIG3-Lösung

5 Minuten in Chemilumineszenz-Lösung (1:500 CDP-Star Lösung (New England Biolabs) in DIG3)

Das Signal der Sonde wurde mit Hilfe eines Chemilumineszenzdetektors (LI-COR ODYSSEY FC Mod. 2800) detektiert.

#### DIG 1

0,1 M Maleinsäure  
0,15 M NaCl  
in H<sub>2</sub>O<sub>bid.</sub>, pH 7,5

#### Natriumphosphatpuffer

1 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 2H<sub>2</sub>O  
1 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> x 2H<sub>2</sub>O  
in H<sub>2</sub>O<sub>bid.</sub>, pH 7,0

#### DIG 2

5 % (w/v) Milchpulver in DIG 1

#### Southern Hybridisierungspuffer

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

#### DIG 3

0,1 M Maleinsäure  
0,1 M NaCl  
0,05 M MgCl<sub>2</sub>  
in H<sub>2</sub>O<sub>bid.</sub>, pH 9,5

#### SSPE

3 mM NaCl  
227 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x H<sub>2</sub>O  
20 mM Na<sub>2</sub>-EDTA 2 x H<sub>2</sub>O  
in H<sub>2</sub>O<sub>bid.</sub>, pH 7,4

#### DIG-Waschpuffer

0,03 % (v/v) Tween-20 in DIG 1

## 4.4 Biochemische Methoden

### 4.4.1 Isolierung von Gesamtprotein

#### 4.4.1.1 Analytischer Maßstab

Die Extraktion von Gesamtprotein aus *U. maydis* wurde aus etwa 25 - 50 ml Flüssigkultur nach deren Induktion durchgeführt. Die Zellen wurden pelletiert (3.500 rpm, 6 min, Heraeus Biofuge Stratos) und 1:20 in IP Puffer (nach Pierce) mit Proteaseinhibitoren aufgenommen. Den Zellen wurden Glasperlen zugesetzt, um sie für 15 min bei 4 °C auf dem Vibrax aufzuschließen. Anschließend wurde der Zellextrakt 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 Proteaseinhibitor wurde in der Regel 1x cComplete™ EDTA-free (Roche) verwendet.

#### IP-Puffer

25 mM	Tris-HCl
150 mM	NaCl
1 mM	EDTA
1 %	NP-40
5 %	Glycerol
Mit H <sub>2</sub> O <sub>bid.</sub> angesetzt und pH-Wert auf 7,4 eingestellt	

### 4.4.2 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 20 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	H <sub>2</sub> O <sub>bid.</sub>
20 µl	10 % SDS
10 µl	10 % APS (w/v in H <sub>2</sub> O <sub>bid.</sub> )
2 µl	TEMED

#### Sammelgel-Puffer (4x)

55 mM	Tris-Base
445 mM	Tris-HCl
In H <sub>2</sub> O <sub>bid.</sub> , pH 6,8	

**Trenngel (10 %)**

1,667 ml	Acrylamid/Bisacrylamid (30 %)
1,875 ml	Trenngel-Puffer, pH 8,8
1,364 ml	H <sub>2</sub> O <sub>bid.</sub>
50 µl	10 % SDS
40 µl	10 % APS (w/v in H <sub>2</sub> O <sub>bid.</sub> )
4 µl	TEMED

**Trenngel-Puffer (4x)**

1,27 M	Tris-Base
0,23 M	Tris-HCl
in H <sub>2</sub> O <sub>bid.</sub> , pH 8,8	

**Laufpuffer für Protein-Gele**

25 mM	Tris-HCl, pH 8,8
200 mM	Glycin
0,1 % (w/v)	SDS in H <sub>2</sub> O <sub>bid.</sub>

**Laemmli-Puffer**

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

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

#### 4.4.2.1 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 % EtOH entfärbt werden.

#### 4.4.3 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 18 min mit 2 mA pro cm<sup>2</sup> PVDF-Membran. Der Blot von der Kathode in Richtung Anode wurde für das Fastblot Puffersystem folgendermaßen aufgebaut:

- 1 Whatman 3MM (in Fastblotpuffer getränkt)
- SDS-Polyacrylamid-Gel
- PVDF-Membran (1 min in Methanol aktiviert)
- 1 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 in TBST-Puffer geblockt, um eine unspezifische Bindung der Antikörper an die Membran zu verhindern. Anschließend wurde die

Membran über Nacht mit 3 ml des primären Antikörpers (verdünnt in TBST mit 5 % Milchpulver) bei 4 °C auf einem Taumelrollenmischer inkubiert. Die Membran wurde danach für dreimal 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 Waschschrte für jeweils 10 Minuten in TBST-Puffer und ein Waschschrte in TBS-Puffer.

Tabelle 4.7: Bei Western-Analysen verwendete Antikörper

Antikörper	Wirt	Verdünnung	Bezugsquelle
<b>Primäre Antikörper</b>			
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 Actin-Antikörper	Kaninchen	1:3000	Cell Signaling
<b>Sekundäre Antikörper</b>			
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 zur Detektion des Signals mit Hilfe der Chemilumineszenz-Anlage LI-COR ODYSSEY FC Mod. 2800 aufgenommen.

**Fastblotpuffer**

45 mM	Tris
20 mM	HEPES
20 % (v/v)	Methanol
in H <sub>2</sub> O <sub>bid.</sub>	

**ECL 1-Lösung**

10 ml	100 mM Tris-HCl pH 8,5
44 µl	90 mM Coumarinsäure
100 µl	250 mM Luminol

**TBST-Puffer**

20 mM	Tris-HCl, pH 7,9
136 mM	NaCl
0,05 % (v/v)	Tween-20

**ECL 2-Lösung**

10 ml	100 mM Tris-HCl pH 8,5
6 µl	30 % H <sub>2</sub> O <sub>bid.</sub>



#### 4.4.4 Chromatinisolation und Chromatin-Immunoprecipitation

##### 4.4.4.1 Fixierung von *U. maydis* infiziertem Pflanzenmaterial und Isolation von Chromatin

Durch Injektion von 200 µl Pilzsuspension in das Innere des Blattwirtels wurden sieben Tage alte Maispflanzen (Early Golden Bantam) infiziert. Nach weiteren sieben Tagen wurde das infizierte Blattmaterial geerntet und in 1 cm kleine Stücke geschnitten. Die Blattstücke wurden anschließend in 300 ml Fixierlösung untergetaucht und es erfolgte eine Vakuuminfiltration (5 min, 250 mbar; 5 min Auflösen des Vakuums durch Belüften; 5 min 250 mbar, 5 min Auflösen des Vakuums durch Belüften). Die Fixierung wurde durch Zugabe und Vakuuminfiltration von 22,5 ml 2 M Glycin gestoppt. Das Blattmaterial wurde getrocknet, in Flüssigstickstoff schockgefroren und mit einem Mörser zu einem feinen Pulver gemahlen. Das Pulver wurde anschließend bei -80 °C gelagert oder weiterverarbeitet. Ein 15 ml Reaktionsgefäß (Greiner), das lediglich als Maß diente, wurde dazu bis zur 3 ml Markierung mit Pulver befüllt. In einer Zelmühle (Retsch MM200) wurden die Zellen bei einer Frequenz von 25 Hz für 5 min weiter aufgebrochen. Das Pulver wurde in 3 ml kalten FA-Lysepuffer + 2x Proteaseinhibitoren (cOmplete™, Roche) resuspendiert und 15 min auf Eis inkubiert. Die Suspension wurde durch ein 80 µm Netzfilter aus Nylon (Merck Millipore) filtriert bevor lösliche Proteine von fixiertem Chromatin durch Zentrifugation (22.000 rpm, 30 min, 4 °C, Heraeus Biofuge Stratos) getrennt wurden. Das Pellet wurde in 1 ml FA-Lysepuffer mit 2x Proteaseinhibitoren 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 (14.000 rpm, 15 min, 4 °C, Eppendorf Centrifuge 5417R) Zelltrümmer und nicht aufgeschlossenen Zellen vom nun gelösten Chromatin im Überstand getrennt.

##### 4.4.4.2 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 ÜN 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 abzdauen. Dann wurden 50 µl ProteinaseK (3,5 mg/ml) zugegeben und 2 h bei 37 °C inkubiert. Dadurch werden noch verbliebene Proteinkomplexe und Proteine gelöst. Die verbleibende DNA wurde dann mit dem CHIP DNA Clean & Concentrator Kit (Zymo Research) 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 Sonifizierintensität und -Dauer resultierenden Fragmentgrößen zuzuordnen.

#### 4.4.4.3 Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP-Seq)

Für die Chromatin-Immunopräzipitation wurden je 500 µl Chromatinlösung (20 min Sonifiziert) verwendet. Die Fragmentgröße betrug dabei 100 bis 300 bp. Dazu wurden 50 µl anti-HA magnetische *beads* Suspension (Pierce) gegeben, welche zuvor dreimal in FA-Lysepuffer mit Proteinaseinhibitoren gewaschen wurden. Hierfür wurde eine DyneMag™-2 Magnet (life technologies) verwendet. Der Ansatz wurde ÜN bei 4 °C unter langsamem Drehen inkubiert. Zur Anreicherung des gebundenen Chromatins wurden die *beads* 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 magnetischen *beads* in 500 µl TE in ein frisches 1,5 ml Eppendorfgefäß transferiert, um unspezifisches Chromatin an den Wänden des Gefäßes vom spezifisch gebundenen Chromatin zu trennen. Anschließend wurden die *beads* in 100 µl ChIP Elutionspuffer 15 min bei 65 °C inkubiert. Die Elutionslösung wurde in ein frisches Eppendorfgefäß transferiert und die *beads* in 150 µl TE/ 0,67 % SDS für weitere 10 min bei 65 °C inkubiert. Der resultierende Überstand wurde mit der Elutionslösung kombiniert und üN bei 65 °C inkubiert, um die Fixierung aufzuheben. Als Input-Kontrolle wurden 50 µl Chromatinlösung mit 200 µl TE/ 1 % SDS versetzt und ebenfalls zur Auflösung der Fixierung ÜN bei 65 °C inkubiert. Die Probe wurde dann mit 4 µl TE-RNase (50 mg/ml) für 30 min bei 37 °C inkubiert, um störende RNA abzdauen. Im Anschluss wurden 50 µl ProteinaseK (3,5 mg/ml) zugegeben und weitere 2 h bei 37 °C inkubiert. Dadurch werden noch verbliebene Proteinkomplexe und Proteine gelöst. Die verbleibende DNA wurde mit dem CHIP DNA Clean & Concentrator Kit (Zymo Research) aufgereinigt. Anschließend wurden die DNA-Proben in 30 µl EB-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

**FA-Lysepuffer high Salt**

50 mM	HEPES-KOH; pH 7,5
500 mM	NaCl
1 mM	EDTA
1 %	Triton-X-100
0,1 % (w/v)	Natriumdeoxycholat
0,1 %	SDS

**ChIP Waschpuffer**

10 mM	Tris-Cl, pH 7,5
250 mM	LiCl
1 mM	EDTA
0,5 %	Nonidet P-40
0,5 %	Natriumdeoxycholat

**ChIP Elutionspuffer**

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

**Fixierlösung**

50 mM	HEPES-KOH; pH 7,5
1 %	Formaldehyd

## 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) oder BIO-RAD T100™ durchgeführt.

Als Standard-Protokoll wurden folgende Ansätze verwendet:

30 ng	Matritzen-DNA
2 U	Phusion-DNA-Polymerase / Q5-DNA-Polymerase
1 µl	10 mM dNTPs
0,3 µl	je Primer (100 pmol/µl)
10 µl	5x Phusion-Puffer/ 5x Q5-Puffer

in einem 50 µl Ansatz

98 °C / 5 min - [98 °C / 1 min – X °C / 15 s – 72 °C / Y] x 30 – 72 °C / 10 min

Die Temperatur X für die Anlagerung der Primer richtet sich nach der Schmelztemperatur der verwendeten Primer. Die Elongationszeit Y beträgt 20-30 s/kb DNA-Amplifikat.

### 4.5.2 Real-Time-PCR (qRT-PCR)

#### 4.5.2.1 DNaseI-Behandlung und Reverse Transkription

Vor der reversen Transkription wurde die isolierte Gesamt-RNA zunächst mit Turbo DNase I (Ambion) behandelt, um DNA-Kontaminationen zu entfernen. Hierbei wurde nach Herstellerangaben vorgegangen (siehe Herstellerprotokoll Turbo DNA-free™ Kit). Die reverse Transkription wurde mit Hilfe des RevertAid™ First Strand cDNA Synthese Kit (Fermentas/Thermo) nach Herstellerprotokoll durchgeführt. Für die reverse Transkription von 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 42 °C für 60 Minuten inkubiert.

#### 4.5.2.2 Real-Time-PCR

Für Real-time PCR Analysen wurde das MESA GREEN qPCR Master Mix plus for SYBR Assay +Fluorescein Kit (Eurogentec) verwendet und nach Herstellerangaben durchgeführt. Für die PCR Reaktion wurden 1-2 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 Bio-Rad-Software Version 3.0a verwendet. Die Berechnung der relativen Expressionswerte erfolgte mit dem Programm Bio-Rad Gene Expression Macro der Firma Bio-Rad.

#### 4.5.3 PCR-Generierung von Gen-Deletionskonstrukten für *U. maydis*

Mit dieser Methode (Kämper, 2004) können gezielt offene Leserahmen 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 restringierten 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 Fusionskonstrukten für *U. maydis*

Die Herstellung von Fusionskonstrukten am C-Terminus erfolgte analog zur Herstellung von Deletionskonstrukten (Kämper, 2004). Die linke Flanke muss jedoch ausgehend vom Stopcodon des zu fusionierenden ORFs 1 kb in 5'-Richtung orientiert sein. Das Stopcodon 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 in einer einzigen Reaktion. 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, 50 ng Vektor und Insert-Fragmente in 3-5fachem molaren Überschuss)
15 µl	Master Mixtur

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 <sub>2</sub>
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 H <sub>2</sub> O <sub>bid.</sub> auf 2 ml auffüllen	

##### 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 H <sub>2</sub> O <sub>bid.</sub> auf 1,2 ml auffüllen	

## 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	Matrizen-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 5.3 (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 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 *U. 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 folgende Kriterien für den *pz*-score erfüllen für weitere Analysen verwendet:

*in vitro*

Rbf1:3xHA = *pz*-score  $\geq 80$  in beiden Duplikaten (Ulrich, 2020)

Hdp2:3xHA = *pz*-score  $\geq 150$  (Ulrich, 2020)

Biz1:3xHA = *pz*-score  $\geq 150$  (Ulrich, 2020)

*in planta*

Hdp2:3xHA = *pz*-score Duplikat I  $\geq 65$  UND Differenz Duplikat II - I  $\geq 20$

ODER

*pz*-score Duplikat II  $\geq 55$  UND Differenz Duplikat I – II  $\geq 30$

Biz1:3xHA = *pz*-score Duplikat I  $\geq 50$  UND Differenz Duplikat II - I  $\geq 30$

ODER

*pz*-score Duplikat II  $\geq 60$  UND Differenz Duplikat I – II  $\geq 20$

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 potenzieller Bindemotive wurden Sequenzen der gefilterten *peaks* extrahiert und mit der *MEME Suite* mit STREME (Sensitive, Thorough, Rapid, Enriched Motif Elicitation) (Bailey, 2021), FIMO (Find Individual Motif Occurrences) (Grant *et al.*, 2011) und CentriMo (Local Motif Enrichment Analysis) (Bailey und Machanick, 2012) analysiert.

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; Gish und States, 1993; Altschul *et al.*, 1997) zur Identifizierung ähnlicher Proteine oder DNA-Sequenzen in den öffentlichen Datenbanken.

**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.

**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.

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

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

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

## 5. Literaturverzeichnis

**Agrios, G.N.** (1997). *Plant Pathology*. (Academic Press).

**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.

**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.

**Andrews, J., Smith, M., Merakovsky, J., Coulson, M., Hannan, F. und Kelly, L.E.** (1996). The stoned locus of *Drosophila melanogaster* produces a dicistronic transcript and encodes two distinct polypeptides. *Genetics* **143**, 1699-1711.

**Armstrong-James, D., Meintjes, G. und Brown, G.D.** (2014). A neglected epidemic: fungal infections in HIV/AIDS. *Trends Microbiol* **22**, 120-127.

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

**Aymoz, D., Sole, C., Pierre, J.J., Schmitt, M., de Nadal, E., Posas, F. und Pelet, S.** (2018). Timing of gene expression in a cell-fate decision system. *Mol Syst Biol* **14**, e8024.

**Bailey, T.L.** (2021). STREME: Accurate and versatile sequence motif discovery. *Bioinformatics*.

**Bailey, T.L. und Machanick, P.** (2012). Inferring direct DNA binding from ChIP-seq. *Nucleic acids research* **40**, e128.

**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. 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.
- Barbosa, C., Peixeiro, I. und Romao, L.** (2013). Gene expression regulation by upstream open reading frames and human disease. *PLoS Genet* **9**, e1003529.
- 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.
- Basse, C.W., Kolb, S. und Kahmann, R.** (2002). A maize-specifically expressed gene cluster in *Ustilago maydis*. *Mol Microbiol* **43**, 75-93.
- 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*.
- Bechinger, C., Giebel, K.F., Schnell, M., Leiderer, P., Deising, H.B. und Bastmeyer, M.** (1999). Optical measurements of invasive forces exerted by appressoria of a plant pathogenic fungus. *Science* **285**, 1896-1899.
- Becht, P., Vollmeister, E. und Feldbrügge, M.** (2005). Role for RNA-binding proteins implicated in pathogenic development of *Ustilago maydis*. *Eukaryot Cell* **4**, 121-133.
- Becht, P., König, J. und Feldbrügge, M.** (2006). The RNA-binding protein Rrm4 is essential for polarity in *Ustilago maydis* and shuttles along microtubules. *J Cell Sci* **119**, 4964-4973.
- Becker, J., Tehrani, H.H., Ernst, P., Blank, L.M. und Wierckx, N.** (2020a). An Optimized *Ustilago maydis* for Itaconic Acid Production at Maximal Theoretical Yield. *J Fungi (Basel)* **7**.
- Becker, J., Hosseinpour Tehrani, H., Gauert, M., Mampel, J., Blank, L.M. und Wierckx, N.** (2020b). An *Ustilago maydis* chassis for itaconic acid production without by-products. *Microb Biotechnol* **13**, 350-362.
- 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.
- Bohlmann, R.** (1996). Isolierung und Charakterisierung von filamentspezifisch exprimierten Genen aus *Ustilago maydis*. In Fakultät für Biologie (München: Ludwig-Maximilian-Universität).
- Bölker, M.** (2001). *Ustilago maydis*--a valuable model system for the study of fungal dimorphism and virulence. *Microbiology* **147**, 1395-1401.
- Bölker, M., Urban, M. und Kahmann, R.** (1992). The *a* mating type locus of *U. maydis* specifies cell signaling components. *Cell* **68**, 441-450.
- 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.

- Bortfeld, M., Auffarth, K., Kahmann, R. und Basse, C.W.** (2004). The *Ustilago maydis* a2 mating-type locus genes lga2 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.
- Bouabe, H. und Okkenhaug, K.** (2013). Gene targeting in mice: a review. *Methods Mol Biol* **1064**, 315-336.
- Brachmann, A.** (2001). Die frühe Infektionsphase von *Ustilago maydis*: Genregulation durch das bW/bE-Heterodimer. München, Ludwig-Maximilians-Universität. (München: Ludwig-Maximilians-Universität).
- 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.
- 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., 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.
- 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., Tanaka, S., Neidig, N., Doehlemann, G., Vincon, V. und Kahmann, R.** (2014). Characterization of the largest effector gene cluster of *Ustilago maydis*. *PLoS Pathog* **10**, e1003866.
- Brenner, T.** (2017). Charakterisierung der Hdp2 abhängigen Promotoren der Gene umag\_00715 und umag\_06315 in *Ustilago maydis*. In IAB Genetik (Karlsruher Institut für Technologie).
- Brown, G.D., Denning, D.W., Gow, N.A., Levitz, S.M., Netea, M.G. und White, T.C.** (2012). Hidden killers: human fungal infections. *Sci Transl Med* **4**, 165rv113.
- Büttner, L.** (2020). Charakterisierung des trans-Aconitat-Metabolismus und dessen Regulierung in *Ustilago maydis*. In Fachbereich Biologie (Philipps-Universität Marburg).
- Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (BVL)** (2020), Absatz an Pflanzenschutzmitteln in der Bundesrepublik Deutschland, Ergebnisse der Meldungen gemäß § 64 Pflanzenschutzgesetz für das Jahr 2019, [https://www.bvl.bund.de/DE/Arbeitsbereiche/04\\_Pflanzenschutzmittel/01\\_Aufgaben/02\\_Zulassung\\_PSM/03\\_PSMInlandsabsatzAusfuhr/psm\\_PSMInlandsabsatzAusfuhr\\_node.html](https://www.bvl.bund.de/DE/Arbeitsbereiche/04_Pflanzenschutzmittel/01_Aufgaben/02_Zulassung_PSM/03_PSMInlandsabsatzAusfuhr/psm_PSMInlandsabsatzAusfuhr_node.html)
- Castanheira, S. und Perez-Martin, J.** (2015). Appressorium formation in the corn smut fungus *Ustilago maydis* requires a G2 cell cycle arrest. *Plant signaling & behavior* **10**, e1001227.
- Castanheira, S., Mielnichuk, N. und Perez-Martin, J.** (2014). Programmed cell cycle arrest is required for infection of corn plants by the fungus *Ustilago maydis*. *Development* **141**, 4817-4826.
- Castillo-Lluva, S. und Perez-Martin, J.** (2005). The induction of the mating program in the phytopathogen *Ustilago maydis* is controlled by a G1 cyclin. *Plant Cell* **17**, 3544-3560.

- Castillo-Lluva, S., Alvarez-Tabares, I., Weber, I., Steinberg, G. und Perez-Martin, J.** (2007). Sustained cell polarity and virulence in the phytopathogenic fungus *Ustilago maydis* depends on an essential cyclin-dependent kinase from the Cdk5/Pho85 family. *J Cell Sci* **120**, 1584-1595.
- Christensen, J.J.** (1963). Corn smut induced by *Ustilago maydis*. *Amer Phytopathol Soc Monogr* **2**.
- Chung, K.-T. und Liu, J.-K.** (2018). *Pioneers in microbiology : the human side of science.* (New Jersey: World Scientific).
- 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.
- Conway, M.K., Grunwald, D. und Heideman, W.** (2012). Glucose, nitrogen, and phosphate depletion in *Saccharomyces cerevisiae*: common transcriptional responses to different nutrient signals. *G3 (Bethesda)* **2**, 1003-1017.
- Courtois, V., Chatelain, G., Han, Z.Y., Le Novere, N., Brun, G. und Lamonerie, T.** (2003). New Otx2 mRNA isoforms expressed in the mouse brain. *J Neurochem* **84**, 840-853.
- Crews, S.T. und Pearson, J.C.** (2009). Transcriptional autoregulation in development. *Curr Biol* **19**, R241-246.
- de Klerk, E. und t Hoen, P.A.** (2015). Alternative mRNA transcription, processing, and translation: insights from RNA sequencing. *Trends Genet* **31**, 128-139.
- de la Torre, A., Castanheira, S. und Perez-Martin, J.** (2020). Incompatibility between proliferation and plant invasion is mediated by a regulator of appressorium formation in the corn smut fungus *Ustilago maydis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **117**, 30599-30609.
- de la Torre, A., Jurca, M., Hofmann, K., Schmitz, L., Heimel, K. und Kämper, J.** (2021). Robust Cre recombinase activity in the biotrophic smut fungus *Ustilago maydis* enables efficient conditional null mutants in planta. Manuskript zur Publikation eingereicht.
- De Val, S., Chi, N.C., Meadows, S.M., Minovitsky, S., Anderson, J.P., Harris, I.S., Ehlers, M.L., Agarwal, P., Visel, A., Xu, S.M., Pennacchio, L.A., Dubchak, I., Krieg, P.A., Stainier, D.Y. und Black, B.L.** (2008). Combinatorial regulation of endothelial gene expression by ets and forkhead transcription factors. *Cell* **135**, 1053-1064.
- Dean, R., Van Kan, J.A., Pretorius, Z.A., Hammond-Kosack, K.E., Di Pietro, A., Spanu, P.D., Rudd, J.J., Dickman, M., Kahmann, R., Ellis, J. und Foster, G.D.** (2012). The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Mol Plant Pathol* **13**, 414-430.
- 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.
- Demir, H.T., Bezirci, E., Becker, J., Tehrani, H.H., Nikerel, E., Wierck, N. und Turker, M.** (2021). High level production of itaconic acid at low pH by *Ustilago maydis* with fed-batch fermentation. *Bioprocess Biosyst Eng*.
- Dinkel, H., Van Roey, K., Michael, S., Davey, N.E., Weatheritt, R.J., Born, D., Speck, T., Kruger, D., Grebnev, G., Kuban, M., Strumillo, M., Uyar, B., Budd, A., Altenberg, B., Seiler, M., Chemes, L.B., Glavina, J., Sanchez, I.E., Diella, F. und Gibson, T.J.** (2014). The eukaryotic linear motif resource ELM: 10 years and counting. *Nucleic acids research* **42**, D259-266.

- Djamei, A., Schipper, K., Rabe, F., Ghosh, A., Vincon, V., Kahnt, J., Osorio, S., Tohge, T., Fernie, A.R., Feussner, I., Feussner, K., Meinicke, P., Stierhof, Y.D., Schwarz, H., Macek, B., Mann, M. und Kahmann, R. (2011). Metabolic priming by a secreted fungal effector. *Nature* **478**, 395-398.
- Doebley, J. (1992). Mapping the genes that made maize. *Trends in genetics : TIG* **8**, 302-307.
- Doehlemann, G., Reissmann, S., Assmann, D., Fleckenstein, M. und Kahmann, R. (2011). Two linked genes encoding a secreted effector and a membrane protein are essential for *Ustilago maydis*-induced tumour formation. *Mol Microbiol* **81**, 751-766.
- Doehlemann, G., van der Linde, K., Assmann, D., Schwammbach, D., Hof, A., Mohanty, A., Jackson, D. und Kahmann, R. (2009). Pep1, a secreted effector protein of *Ustilago maydis*, is required for successful invasion of plant cells. *PLoS Pathog* **5**, e1000290.
- Domcke, S., Bardet, A.F., Adrian Ginno, P., Hartl, D., Burger, L. und Schubeler, D. (2015). Competition between DNA methylation and transcription factors determines binding of NRF1. *Nature* **528**, 575-579.
- Donaldson, M.E. und Saville, B.J. (2012). Natural antisense transcripts in fungi. *Mol Microbiol* **85**, 405-417.
- Donaldson, M.E., Ostrowski, L.A., Goulet, K.M. und Saville, B.J. (2017). Transcriptome analysis of smut fungi reveals widespread intergenic transcription and conserved antisense transcript expression. *BMC Genomics* **18**, 340.
- Eichhorn, H., Lessing, F., Winterberg, B., Schirawski, J., Kämper, J., Müller, P. und Kahmann, R. (2006). A ferroxidation/permeation iron uptake system is required for virulence in *Ustilago maydis*. *Plant Cell* **18**, 3332-3345.
- Elias-Villalobos, A., Fernandez-Alvarez, A. und Ibeas, J.I. (2011). The general transcriptional repressor Tup1 is required for dimorphism and virulence in a fungal plant pathogen. *PLoS Pathog* **7**, e1002235.
- Fairlamb, A.H., Gow, N.A., Matthews, K.R. und Waters, A.P. (2016). Drug resistance in eukaryotic microorganisms. *Nat Microbiol* **1**, 16092.
- Faist, B. (2017). Mechanismus der Clp1-vermittelten Inhibition der bW- und Rbf1-Funktion in *Ustilago maydis*. In IAB Genetik (Karlsruher Institut für Technologie).
- Farfsing, J.W., Auffarth, K. und Basse, C.W. (2005). Identification of cis-active elements in *Ustilago maydis mig2* promoters conferring high-level activity during pathogenic growth in maize. *Molecular plant-microbe interactions : MPMI* **18**, 75-87.
- Fedler, M., Luh, K.S., Stelter, K., Nieto-Jacobo, F. und Basse, C.W. (2009). The  $\alpha 2$  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.
- Fiering, S., Northrop, J.P., Nolan, G.P., Mattila, P.S., Crabtree, G.R. und Herzenberg, L.A. (1990). Single cell assay of a transcription factor reveals a threshold in transcription activated by signals emanating from the T-cell antigen receptor. *Genes Dev* **4**, 1823-1834.

- Finkernagel, F.** (2006). *in silico*-DNA-Bindemotivsuche in *Ustilago maydis*: DNA-Bindemotiv des b-induzierten Transkriptionsfaktors Biz1 (Max Plank Institute for terrestrial Microbiology, Marburg).
- Fisher, M.C., Henk, D.A., Briggs, C.J., Brownstein, J.S., Madoff, L.C., McCraw, S.L. und Gurr, S.J.** (2012). Emerging fungal threats to animal, plant and ecosystem health. *Nature* **484**, 186-194.
- 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.
- Fortenbacher, J.** (2016). Charakterisierung der Rbf1-Bindestelle durch *sliding window* Promotor-Analysen. Karlsruher Institut für Technologie (KIT), Karlsruhe.
- Fortenbacher, J.** (2019). Charakterisierung des Proteinkomplexes Clp1 mit bE/bW und seine Auswirkung auf die pathogene Entwicklung in *Ustilago maydis*. In IAB Genetik (Karlsruher Institut für Technologie).
- Fukushige, T., Brodigan, T.M., Schriefer, L.A., Waterston, R.H. und Krause, M.** (2006). Defining the transcriptional redundancy of early bodywall muscle development in *C. elegans*: evidence for a unified theory of animal muscle development. *Genes Dev* **20**, 3395-3406.
- 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.
- Garcia-Muse, T., Steinberg, G. und Perez-Martin, J.** (2004). Characterization of B-type cyclins in the smut fungus *Ustilago maydis*: roles in morphogenesis and pathogenicity. *J Cell Sci* **117**, 487-506.
- Garcia-Pedrajas, M.D., Nadal, M., Bölker, M., Gold, S.E. und Perlin, M.H.** (2008). Sending mixed signals: redundancy vs. uniqueness of signaling components in the plant pathogen, *Ustilago maydis*. *Fungal Genet Biol* **45 Suppl 1**, S22-30.
- Garcia-Solache, M.A. und Casadevall, A.** (2010). Global warming will bring new fungal diseases for mammals. *mBio* **1**.
- 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.
- Gehrmann, T., Pelkmans, J.F., Lugones, L.G., Wosten, H.A., Abeel, T. und Reinders, M.J.** (2016). *Schizophyllum commune* has an extensive and functional alternative splicing repertoire. *Sci Rep* **6**, 33640.
- Geiser, E., Przybilla, S.K., Friedrich, A., Buckel, W., Wierckx, N., Blank, L.M. und Bölker, M.** (2016). *Ustilago maydis* produces itaconic acid via the unusual intermediate trans-aconitate. *Microb Biotechnol* **9**, 116-126.
- 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.
- Golovine, K., Schwerin, M. und Vanselow, J.** (2003). Three different promoters control expression of the aromatase cytochrome p450 gene (cyp19) in mouse gonads and brain. *Biol Reprod* **68**, 978-984.
- Goos, S.** (2007). Funktionelle Analyse von Hdp2, einem neuen Pathogenitätsfaktor in *Ustilago maydis* (Marburg: Philipps-Universität).
- Grant, C.E., Bailey, T.L. und Noble, W.S.** (2011). FIMO: scanning for occurrences of a given motif. *Bioinformatics* **27**, 1017-1018.
- Guo, N., Qian, Y., Zhang, Q., Chen, X., Zeng, G., Zhang, X., Mi, W., Xu, C., St Leger, R.J. und Fang, W.** (2017). Alternative transcription start site selection in Mr-OPY2 controls lifestyle transitions in the fungus *Metarhizium robertsii*. *Nat Commun* **8**, 1565.
- Haberle, V. und Stark, A.** (2018). Eukaryotic core promoters and the functional basis of transcription initiation. *Nat Rev Mol Cell Biol* **19**, 621-637.
- Hampel, M., Jakobi, M., Schmitz, L., Meyer, U., Finkernagel, F., Doehlemann, G. und Heimel, K.** (2016). Unfolded Protein Response (UPR) Regulator Cib1 Controls Expression of Genes Encoding Secreted Virulence Factors in *Ustilago maydis*. *PLoS One* **11**, e0153861.
- Han, X., Altegoer, F., Steinchen, W., Binnebesel, L., Schuhmacher, J., Glatter, T., Giammarinaro, P.I., Djamei, A., Rensing, S.A., Reissmann, S., Kahmann, R. und Bange, G.** (2019). A kiwellin disarms the metabolic activity of a secreted fungal virulence factor. *Nature* **565**, 650-653.
- Hartmann, H.A.** (1997). Die Pheromonantwort in *Ustilago maydis*: Kontrolle von Zellfusion und Pathogenität. In Fakultät für Biologie (München: Ludwig-Maximilians-Universität).
- 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.
- 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., Freitag, J., Hampel, M., Ast, J., Bölker, M. und Kämper, J.** (2013). Crosstalk between the unfolded protein response and pathways that regulate pathogenic development in *Ustilago maydis*. *Plant Cell* **25**, 4262-4277.
- Heimel, K., Scherer, M., 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.

- Hemetsberger, C., Herrberger, C., Zechmann, B., Hillmer, M. und Doehlemann, G.** (2012). The *Ustilago maydis* effector Pep1 suppresses plant immunity by inhibition of host peroxidase activity. *PLoS Pathog* **8**, e1002684.
- Hofmann, K.P.** (2012). Die Rolle sekretierter Proteine zu Beginn der pathogenen Entwicklung von *Ustilago maydis*. In Fakultät für Chemie- und Biowissenschaften (Karlsruhe: Karlsruher Institut für Technologie (KIT)).
- Hoi, J.W., Herbert, C., Bacha, N., O'Connell, R., Lafitte, C., Borderies, G., Rossignol, M., Rouge, P. und Dumas, B.** (2007). Regulation and role of a STE12-like transcription factor from the plant pathogen *Colletotrichum lindemuthianum*. *Mol Microbiol* **64**, 68-82.
- Holliday, R.** (1974). *Ustilago maydis*. In Handbook of Genetics, R.C. King, ed (New York, USA: Plenum Press), pp. 575-595.
- Horst, R.J., Zeh, C., Saur, A., Sonnewald, S., Sonnewald, U. und Voll, L.M.** (2012). The *Ustilago maydis* Nit2 homolog regulates nitrogen utilization and is required for efficient induction of filamentous growth. *Eukaryot Cell* **11**, 368-380.
- 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.
- Hu, S., Wan, J., Su, Y., Song, Q., Zeng, Y., Nguyen, H.N., Shin, J., Cox, E., Rho, H.S., Woodard, C., Xia, S., Liu, S., Lyu, H., Ming, G.L., Wade, H., Song, H., Qian, J. und Zhu, H.** (2013). DNA methylation presents distinct binding sites for human transcription factors. *Elife* **2**, e00726.
- Inada, K., Morimoto, Y., Arima, T., Murata, Y. und Kamada, T.** (2001). The *clp1* gene of the mushroom *Coprinus cinereus* is essential for A-regulated sexual development. *Genetics* **157**, 133-140.
- Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J. und White, T.J.** (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.
- Ivanov, I.P., Wei, J., Caster, S.Z., Smith, K.M., Michel, A.M., Zhang, Y., Firth, A.E., Freitag, M., Dunlap, J.C., Bell-Pedersen, D., Atkins, J.F. und Sachs, M.S.** (2017). Translation Initiation from Conserved Non-AUG Codons Provides Additional Layers of Regulation and Coding Capacity. *mBio* **8**.
- 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**.
- Jia, L., Mao, Y., Ji, Q., Dersh, D., Yewdell, J.W. und Qian, S.B.** (2020). Decoding mRNA translatability and stability from the 5' UTR. *Nat Struct Mol Biol* **27**, 814-821.
- Jolma, A., Yin, Y., Nitta, K.R., Dave, K., Popov, A., Taipale, M., Enge, M., Kivioja, T., Morgunova, E. und Taipale, J.** (2015). DNA-dependent formation of transcription factor pairs alters their binding specificity. *Nature* **527**, 384-388.
- Jupe, J., Stam, R., Howden, A.J., Morris, J.A., Zhang, R., Hedley, P.E. und Huitema, E.** (2013). Phytophthora capsici-tomato interaction features dramatic shifts in gene expression associated with a hemi-biotrophic lifestyle. *Genome Biol* **14**, R63.

- Jurca, M.** (2017). Die Rolle von Rbf1 während der pathogenen Entwicklung von *Ustilago maydis*. In IAB Genetik (Karlsruher Institut für Technologie (KIT)).
- 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., Friedrich, M.W. und Kahmann, R.** (2020). Creating novel specificities in a fungal nonself recognition system by single step homologous recombination events. *New Phytol* **228**, 1001-1010.
- 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.
- Kämper, J., Kahmann, R., Bölker, M., Ma, L.J., Brefort, T., Saville, B.J., Banuett, F., Kronstad, J.W., Gold, S.E., Müller, O., Perlin, M.H., Wösten, H.A., de Vries, R., Ruiz-Herrera, J., Reynaga-Pena, C.G., Snetselaar, K., McCann, M., Perez-Martin, J., Feldbrügge, M., Basse, C.W., Steinberg, G., Ibeas, J.I., Holloman, W., Guzman, P., Farman, M., Stajich, J.E., Sentandreu, R., Gonzalez-Prieto, J.M., Kennell, J.C., Molina, L., Schirawski, J., Mendoza-Mendoza, A., Greilinger, D., Münch, K., Rössel, N., Scherer, M., Vranes, M., Ladendorf, O., Vincon, V., Fuchs, U., Sandroock, B., Meng, S., Ho, E.C., Cahill, M.J., Boyce, K.J., Klose, J., Klosterman, S.J., Deelstra, H.J., Ortiz-Castellanos, L., Li, W., Sanchez-Alonso, P., Schreier, P.H., Häuser-Hahn, I., Vaupel, M., Koopmann, E., Friedrich, G., Voss, H., Schlüter, T., Margolis, J., Platt, D., Swimmer, C., Gnirke, A., Chen, F., Vysotskaia, V., Mannhaupt, G., Güldener, U., Münsterkötter, M., Haase, D., Oesterheld, M., Mewes, H.W., Mauceli, E.W., DeCaprio, D., Wade, C.M., Butler, J., Young, S., Jaffe, D.B., Calvo, S., Nusbaum, C., Galagan, J. und Birren, B.W.** (2006). Insights from the genome of the biotrophic fungal plant pathogen *Ustilago maydis*. *Nature* **444**, 97-101.
- Kellner, N., Heimel, K., Obhof, T., Finkernagel, F. und Kämper, J.** (2014). The SPF27 homologue Num1 connects splicing and kinesin 1-dependent cytoplasmic trafficking in *Ustilago maydis*. *PLoS Genet* **10**, e1004046.
- 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., Kumar, N., Liu, Z., Maurel, T., Moore, B., McDowall, M.D., Maheswari, U., Naamati, G., Newman, V., Ong, C.K., Paulini, M., Pedro, H., Perry, E., Russell, M., Sparrow, H., Tapanari, E., Taylor, K., Vullo, A., Williams, G., Zadissia, A., Olson, A., Stein, J., Wei, S., Tello-Ruiz, M., Ware, D., Luciani, A., Potter, S., Finn, R.D., Urban, M., Hammond-Kosack, K.E., Bolser, D.M., De Silva, N., Howe, K.L., Langridge, N., Maslen, G., Staines, D.M. und Yates, A.** (2018). Ensembl Genomes 2018: an integrated omics infrastructure for non-vertebrate species. *Nucleic acids research* **46**, D802-D808.

- Khrunyk, Y., Munch, K., Schipper, K., Lupas, A.N. und Kahmann, R.** (2010). The use of FLP-mediated recombination for the functional analysis of an effector gene family in the biotrophic smut fungus *Ustilago maydis*. *New Phytol* **187**, 957-968.
- 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.
- Kribelbauer, J.F., Rastogi, C., Bussemaker, H.J. und Mann, R.S.** (2019). Low-Affinity Binding Sites and the Transcription Factor Specificity Paradox in Eukaryotes. *Annu Rev Cell Dev Biol* **35**, 357-379.
- 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.
- Kulaeva, O.I., Hsieh, F.K. und Studitsky, V.M.** (2010). RNA polymerase complexes cooperate to relieve the nucleosomal barrier and evict histones. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 11325-11330.
- Kumar, D.** (2014). Salicylic acid signaling in disease resistance. *Plant Sci* **228**, 127-134.
- Kuntz, S.G., Williams, B.A., Sternberg, P.W. und Wold, B.J.** (2012). Transcription factor redundancy and tissue-specific regulation: evidence from functional and physical network connectivity. *Genome Res* **22**, 1907-1919.
- Kwon-Chung, K.J., Fraser, J.A., Doering, T.L., Wang, Z., Janbon, G., Idnurm, A. und Bahn, Y.S.** (2014). *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*, the etiologic agents of cryptococcosis. *Cold Spring Harb Perspect Med* **4**, a019760.
- Laemmli, U.K.** (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Landry, J.R., Mager, D.L. und Wilhelm, B.T.** (2003). Complex controls: the role of alternative promoters in mammalian genomes. *Trends Genet* **19**, 640-648.
- Langmead, B. und Salzberg, S.L.** (2012). Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nat Methods* **9**, 357-359.
- Lanver, D., Mendoza-Mendoza, A., Brachmann, A. und Kahmann, R.** (2010). Sho1 and Msb2-related proteins regulate appressorium development in the smut fungus *Ustilago maydis*. *Plant Cell* **22**, 2085-2101.
- 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., Altmuller, J., Rensing, S.A. und Kahmann, R.** (2018). The Biotrophic Development of *Ustilago maydis* Studied by RNA-Seq Analysis. *Plant Cell* **30**, 300-323.
- Latge, J.P. und Chamilos, G.** (2019). *Aspergillus fumigatus* and Aspergillosis in 2019. *Clin Microbiol Rev* **33**.

- Lee, T.I. und Young, R.A.** (2013). Transcriptional regulation and its misregulation in disease. *Cell* **152**, 1237-1251.
- Lengeler, K.B., Davidson, R.C., D'Souza, C., Harashima, T., Shen, W.C., Wang, P., Pan, X., Waugh, M. und Heitman, J.** (2000). Signal transduction cascades regulating fungal development and virulence. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR* **64**, 746-785.
- Leyva-Diaz, E. und Hobert, O.** (2019). Transcription factor autoregulation is required for acquisition and maintenance of neuronal identity. *Development* **146**.
- Liang, L.** (2012). The role of Stp1, a secreted effector, in the biotrophic interaction of *Ustilago maydis* and its host plant maize In Fachbereich Biologie (Philipps-Universität Marburg).
- Lin, J.S., Happel, P. und Kahmann, R.** (2021). Nuclear status and leaf tumor formation in the *Ustilago maydis*-maize pathosystem. *New Phytol.*
- Liu, H., Hu, M., Wang, Q., Cheng, L. und Zhang, Z.** (2018). Role of Papain-Like Cysteine Proteases in Plant Development. *Front Plant Sci* **9**, 1717.
- Low, C.Y. und Rotstein, C.** (2011). Emerging fungal infections in immunocompromised patients. *F1000 Med Rep* **3**, 14.
- Lucas, J.A., Hawkins, N.J. und Fraaije, B.A.** (2015). The evolution of fungicide resistance. *Adv Appl Microbiol* **90**, 29-92.
- Ludwig, N., Reissmann, S., Schipper, K., Gonzalez, C., Assmann, D., Glatter, T., Moretti, M., Ma, L.S., Rexer, K.H., Snetselaar, K. und Kahmann, R.** (2021). A cell surface-exposed protein complex with an essential virulence function in *Ustilago maydis*. *Nat Microbiol.*
- 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 *lga2* of *Ustilago maydis* interferes with mitochondrial dynamics and fusion, partially in dependence on a Dnm1-like fission component. *J Cell Sci* **122**, 2402-2412.
- Marin-Menguiano, M., Moreno-Sanchez, I., Barrales, R.R., Fernandez-Alvarez, A. und Ibeas, J.I.** (2019). N-glycosylation of the protein disulfide isomerase Pdi1 ensures full *Ustilago maydis* virulence. *PLoS Pathog* **15**, e1007687.
- Meile, L., Peter, J., Puccetti, G., Alassimone, J., McDonald, B.A. und Sanchez-Vallet, A.** (2020). Chromatin Dynamics Contribute to the Spatiotemporal Expression Pattern of Virulence Genes in a Fungal Plant Pathogen. *mBio* **11**.
- 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.
- Misas Villamil, J.C., Mueller, A.N., Demir, F., Meyer, U., Okmen, B., Schulze Huynck, J., Breuer, M., Dauben, H., Win, J., Huesgen, P.F. und Doehlemann, G.** (2019). A fungal substrate mimicking molecule suppresses plant immunity via an inter-kingdom conserved motif. *Nat Commun* **10**, 1576.

- Molina, L. und Kahmann, R.** (2007). An *Ustilago maydis* gene involved in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> detoxification is required for virulence. *Plant Cell* **19**, 2293-2309.
- Morgunova, E. und Taipale, J.** (2017). Structural perspective of cooperative transcription factor binding. *Curr Opin Struct Biol* **47**, 1-8.
- Morrow, C.A. und Fraser, J.A.** (2009). Sexual reproduction and dimorphism in the pathogenic basidiomycetes. *FEMS Yeast Res* **9**, 161-177.
- Mueller, A.N., Ziemann, S., Treitschke, S., Assmann, D. und Doehlemann, G.** (2013). Compatibility in the *Ustilago maydis*-maize interaction requires inhibition of host cysteine proteases by the fungal effector Pit2. *PLoS Pathog* **9**, e1003177.
- Müller, P., Weinzierl, G., Brachmann, A., Feldbrügge, M. und Kahmann, R.** (2003). Mating and pathogenic development of the Smut fungus *Ustilago maydis* are regulated by one mitogen-activated protein kinase cascade. *Eukaryot Cell* **2**, 1187-1199.
- Müntjes, K., Philipp, M., Hüsemann, L., Heucken, N., Weidtkamp-Peters, S., Schipper, K., Zurbriggen, M.D. und Feldbrügge, M.** (2020). Establishing Polycistronic Expression in the Model Microorganism *Ustilago maydis*. *Front Microbiol* **11**, 1384.
- Nakagawa, S., Gisselbrecht, S.S., Rogers, J.M., Hartl, D.L. und Bulyk, M.L.** (2013). DNA-binding specificity changes in the evolution of forkhead transcription factors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**, 12349-12354.
- Nishad, R., Ahmed, T., Rahman, V.J. und Kareem, A.** (2020). Modulation of Plant Defense System in Response to Microbial Interactions. *Front Microbiol* **11**, 1298.
- Nishimoto, R.** (2019). Global trends in the crop protection industry. *J Pestic Sci* **44**, 141-147.
- Nucci, M. und Marr, K.A.** (2005). Emerging fungal diseases. *Clin Infect Dis* **41**, 521-526.
- O'Connell, R.J., Thon, M.R., Hacquard, S., Amyotte, S.G., Kleemann, J., Torres, M.F., Damm, U., Buiate, E.A., Epstein, L., Alkan, N., Altmüller, J., Alvarado-Balderrama, L., Bauser, C.A., Becker, C., Birren, B.W., Chen, Z., Choi, J., Crouch, J.A., Duvick, J.P., Farman, M.A., Gan, P., Heiman, D., Henrissat, B., Howard, R.J., Kabbage, M., Koch, C., Kracher, B., Kubo, Y., Law, A.D., Lebrun, M.H., Lee, Y.H., Miyara, I., Moore, N., Neumann, U., Nordstrom, K., Panaccione, D.G., Panstruga, R., Place, M., Proctor, R.H., Prusky, D., Rech, G., Reinhardt, R., Rollins, J.A., Rounsley, S., Schardl, C.L., Schwartz, D.C., Shenoy, N., Shirasu, K., Sikhakolli, U.R., Stuber, K., Sukno, S.A., Sweigard, J.A., Takano, Y., Takahara, H., Trail, F., van der Does, H.C., Voll, L.M., Will, I., Young, S., Zeng, Q., Zhang, J., Zhou, S., Dickman, M.B., Schulze-Lefert, P., Ver Loren van Themaat, E., Ma, L.J. und Vaillancourt, L.J.** (2012). Lifestyle transitions in plant pathogenic *Colletotrichum* fungi deciphered by genome and transcriptome analyses. *Nat Genet* **44**, 1060-1065.
- Oerke, E.C.** (2006). Crop losses to pests. *J Agric Sci* **144**, 31-43.
- Pardo, L.M., Rizzu, P., Francescato, M., Vitezic, M., Leday, G.G., Sanchez, J.S., Khamis, A., Takahashi, H., van de Berg, W.D., Medvedeva, Y.A., van de Wiel, M.A., Daub, C.O., Carninci, P. und Heutink, P.** (2013). Regional differences in gene expression and promoter usage in aged human brains. *Neurobiol Aging* **34**, 1825-1836.

- Perales, M., Rodriguez, K., Snipes, S., Yadav, R.K., Diaz-Mendoza, M. und Reddy, G.V.** (2016). Threshold-dependent transcriptional discrimination underlies stem cell homeostasis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **113**, E6298-E6306.
- Perlin, D.S., Rautemaa-Richardson, R. und Alastruey-Izquierdo, A.** (2017). The global problem of antifungal resistance: prevalence, mechanisms, and management. *Lancet Infect Dis* **17**, e383-e392.
- 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).
- Poulain, D.** (2015). *Candida albicans*, plasticity and pathogenesis. *Crit Rev Microbiol* **41**, 208-217.
- Prade, R.A. und Timberlake, W.E.** (1993). The *Aspergillus nidulans* *brlA* regulatory locus consists of overlapping transcription units that are individually required for conidiophore development. *EMBO J* **12**, 2439-2447.
- Rabe, F., Seitner, D., Bauer, L., Navarrete, F., Czedik-Eysenberg, A., Rabanal, F.A. und Djamei, A.** (2016). Phytohormone sensing in the biotrophic fungus *Ustilago maydis* - the dual role of the transcription factor Rss1. *Mol Microbiol* **102**, 290-305.
- Raudvere, U., Kolberg, L., Kuzmin, I., Arak, T., Adler, P., Peterson, H. und Vilo, J.** (2019). g:Profiler: a web server for functional enrichment analysis and conversions of gene lists (2019 update). *Nucleic acids research* **47**, W191-W198.
- Rodriguez, D.L., Quail, M.M., Hernday, A.D. und Nobile, C.J.** (2020). Transcriptional Circuits Regulating Developmental Processes in *Candida albicans*. *Front Cell Infect Microbiol* **10**, 605711.
- 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.
- 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.
- 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.
- Saeki, H. und Svejstrup, J.Q.** (2009). Stability, flexibility, and dynamic interactions of colliding RNA polymerase II elongation complexes. *Mol Cell* **35**, 191-205.
- Sambrook, J. und Russell, D.W.** (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. (Cold Spring Harbour, New York: Cold Spring Harbour Laboratory Press).
- Sambrook, J., Frisch, E.F. und Maniatis, T.** (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. (Cold Spring Harbour, New York: Cold Spring Harbour Laboratory Press).
- Schauwecker, F., Wanner, G. und Kahmann, R.** (1995). Filament-specific expression of a cellulase gene in the dimorphic fungus *Ustilago maydis*. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* **376**, 617-625.
- 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.

- Schilling, L., Matei, A., Redkar, A., Walbot, V. und Doehlemann, G.** (2014). Virulence of the maize smut *Ustilago maydis* is shaped by organ-specific effectors. *Mol Plant Pathol* **15**, 780-789.
- Schipper, K.** (2009). Charakterisierung eines *Ustilago maydis* Genclusters, das für drei neuartige sekretierte Effektoren kodiert. In Fachbereich Biologie (Philipps-Universität Marburg).
- 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.
- Schlesinger, R., Kahmann, R. und Kämper, J.** (1997). The homeodomains of the heterodimeric bE and bW proteins of *Ustilago maydis* are both critical for function. *Mol Gen Genet* **254**, 514-519.
- Schmitz, L., Kronstad, J.W. und Heimel, K.** (2020). Conditional gene expression reveals stage-specific functions of the unfolded protein response in the *Ustilago maydis*-maize pathosystem. *Mol Plant Pathol* **21**, 258-271.
- Schmucker, D., Clemens, J.C., Shu, H., Worby, C.A., Xiao, J., Muda, M., Dixon, J.E. und Zipursky, S.L.** (2000). Drosophila Dscam is an axon guidance receptor exhibiting extraordinary molecular diversity. *Cell* **101**, 671-684.
- Schuler, D.** (2010). *in vivo*-Charakterisierung von Transkriptionsfaktoren in *Ustilago maydis*. In Institut für angewandte Biowissenschaften (Karlsruhe: Karlsruhe Institute of Technology).
- Schuler, D., Wahl, R., Wippel, K., Vranes, M., Munsterkotter, M., Sauer, N. und Kamper, J.** (2015). Hxt1, a monosaccharide transporter and sensor required for virulence of the maize pathogen *Ustilago maydis*. *New Phytol* **206**, 1086-1100.
- 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.
- Schurack, S., Depotter, J.R.L., Gupta, D., Thines, M. und Doehlemann, G.** (2021). Comparative transcriptome profiling identifies maize line specificity of fungal effectors in the maize-*Ustilago maydis* interaction. *Plant J.*
- Schuster, M., Schweizer, G. und Kahmann, R.** (2018a). Comparative analyses of secreted proteins in plant pathogenic smut fungi and related basidiomycetes. *Fungal Genet Biol* **112**, 21-30.
- 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.** (2018b). Single and Multiplexed Gene Editing in *Ustilago maydis* Using CRISPR-Cas9. *Bio-Protocol* **8**.
- Seitner, D., Uhse, S., Gallei, M. und Djamei, A.** (2018). The core effector Cce1 is required for early infection of maize by *Ustilago maydis*. *Mol Plant Pathol* **19**, 2277-2287.
- Shuping, D.S.S. und Eloff, J.N.** (2017). The Use of Plants to Protect Plants and Food against Fungal Pathogens: A Review. *Afr J Tradit Complement Altern Med* **14**, 120-127.
- 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.
- Snetselaar, K.M. und Mims, C.W.** (1994). Light and electron microscopy of *Ustilago maydis* hyphae in maize. *Mycol Res* **98**, 347-355.
- 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.
- 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.
- Southern, E.M.** (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* **98**, 503-517.
- Spellig, T., Bottin, A. und Kahmann, R.** (1996). Green fluorescent protein (GFP) as a new vital marker in the phytopathogenic fungus *Ustilago maydis*. *Mol Gen Genet* **252**, 503-509.
- 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.
- Srivastava, D. und Mahony, S.** (2020). Sequence and chromatin determinants of transcription factor binding and the establishment of cell type-specific binding patterns. *Biochim Biophys Acta Gene Regul Mech* **1863**, 194443.
- Steinberg, G. und Perez-Martin, J.** (2008). *Ustilago maydis*, a new fungal model system for cell biology. *Trends Cell Biol* **18**, 61-67.
- Talbot, N.J.** (2003). On the trail of a cereal killer: Exploring the biology of *Magnaporthe grisea*. *Annu Rev Microbiol* **57**, 177-202.
- Tasic, B., Nabholz, C.E., Baldwin, K.K., Kim, Y., Rueckert, E.H., Ribich, S.A., Cramer, P., Wu, Q., Axel, R. und Maniatis, T.** (2002). Promoter choice determines splice site selection in protocadherin alpha and gamma pre-mRNA splicing. *Mol Cell* **10**, 21-33.
- Teertstra, W.R., Deelstra, H.J., Vranes, M., Bohlmann, R., Kahmann, R., Kämper, J. und Wösten, H.A.** (2006). Repellents have functionally replaced hydrophobins in mediating attachment to a hydrophobic surface and in formation of hydrophobic aerial hyphae in *Ustilago maydis*. *Microbiology* **152**, 3607-3612.
- Tollot, M., Assmann, D., Becker, C., Altmüller, J., Dutheil, J.Y., Wegner, C.E. und Kahmann, R.** (2016). The WOPR Protein Ros1 Is a Master Regulator of Sporogenesis and Late Effector Gene Expression in the Maize Pathogen *Ustilago maydis*. *PLoS Pathog* **12**, e1005697.
- Touriol, C., Bornes, S., Bonnal, S., Audigier, S., Prats, H., Prats, A.C. und Vagner, S.** (2003). Generation of protein isoform diversity by alternative initiation of translation at non-AUG codons. *Biol Cell* **95**, 169-178.

- 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.
- Ulrich, J.** (2015). Identifizierung von Rbf1-Bindestellen in *Ustilago maydis*. *Karlsruher Institut für Technologie (KIT)*.
- Ulrich, J.** (2020). Die kombinatorische Regulation eines Transkriptions-Netzwerks reguliert die Pflanzeninfektion von *Ustilago maydis*. In IAB Genetik (Karlsruher Institut für Technologie).
- Urban, M., Kahmann, R. und Bölker, M.** (1996a). Identification of the pheromone response element in *Ustilago maydis*. *Mol Gen Genet* **251**, 31-37.
- Urban, M., Kahmann, R. und Bölker, M.** (1996b). The biallelic *a* mating type locus of *Ustilago maydis*: remnants of an additional pheromone gene indicate evolution from a multiallelic ancestor. *Mol Gen Genet* **250**, 414-420.
- Vranes, M.** (2006). Transkriptom-Analyse der frühen Infektionsphase von *Ustilago maydis*: Identifikation neuer pathogenitätsrelevanter Gene (Marburg: Philipps-Universität).
- Wahl, R., Zahiri, A. und Kämper, J.** (2010a). The *Ustilago maydis* *b* mating type locus controls hyphal proliferation and expression of secreted virulence factors *in planta*. *Mol Microbiol* **75**, 208-220.
- Wahl, R., Wippel, K., Goos, S., Kämper, J. und Sauer, N.** (2010b). A novel high-affinity sucrose transporter is required for virulence of the plant pathogen *Ustilago maydis*. *PLoS Biol* **8**, e1000303.
- Wall, A.A., Phillips, A.M. und Kelly, L.E.** (2005). Effective translation of the second cistron in two *Drosophila* dicistronic transcripts is determined by the absence of *in-frame* AUG codons in the first cistron. *J Biol Chem* **280**, 27670-27678.
- Walter, P. und Ron, D.** (2011). The unfolded protein response: from stress pathway to homeostatic regulation. *Science* **334**, 1081-1086.
- Weinzierl, G.** (2001). Isolierung und Charakterisierung von Komponenten der *b*-vermittelten Regulationskaskade in *Ustilago maydis*. In Fachbereich Biologie (Marburg: Philipps-Universität marburg).
- Wilson, M.D., Harreman, M. und Svejstrup, J.Q.** (2013). Ubiquitylation and degradation of elongating RNA polymerase II: the last resort. *Biochim Biophys Acta* **1829**, 151-157.
- Wösten, H.A., Bohlmann, R., Eckerskorn, C., Lottspeich, F., Bölker, M. und Kahmann, R.** (1996). A novel class of small amphipathic peptides affect aerial hyphal growth and surface hydrophobicity in *Ustilago maydis*. *EMBO J* **15**, 4274-4281.
- Zahiri, A., Heimel, K., Wahl, R., Rath, M. und Kämper, J.** (2010). The *Ustilago maydis* forkhead transcription factor Fox1 is involved in the regulation of genes required for the attenuation of plant defenses during pathogenic development. *Molecular plant-microbe interactions : MPMI* **23**, 1118-1129.

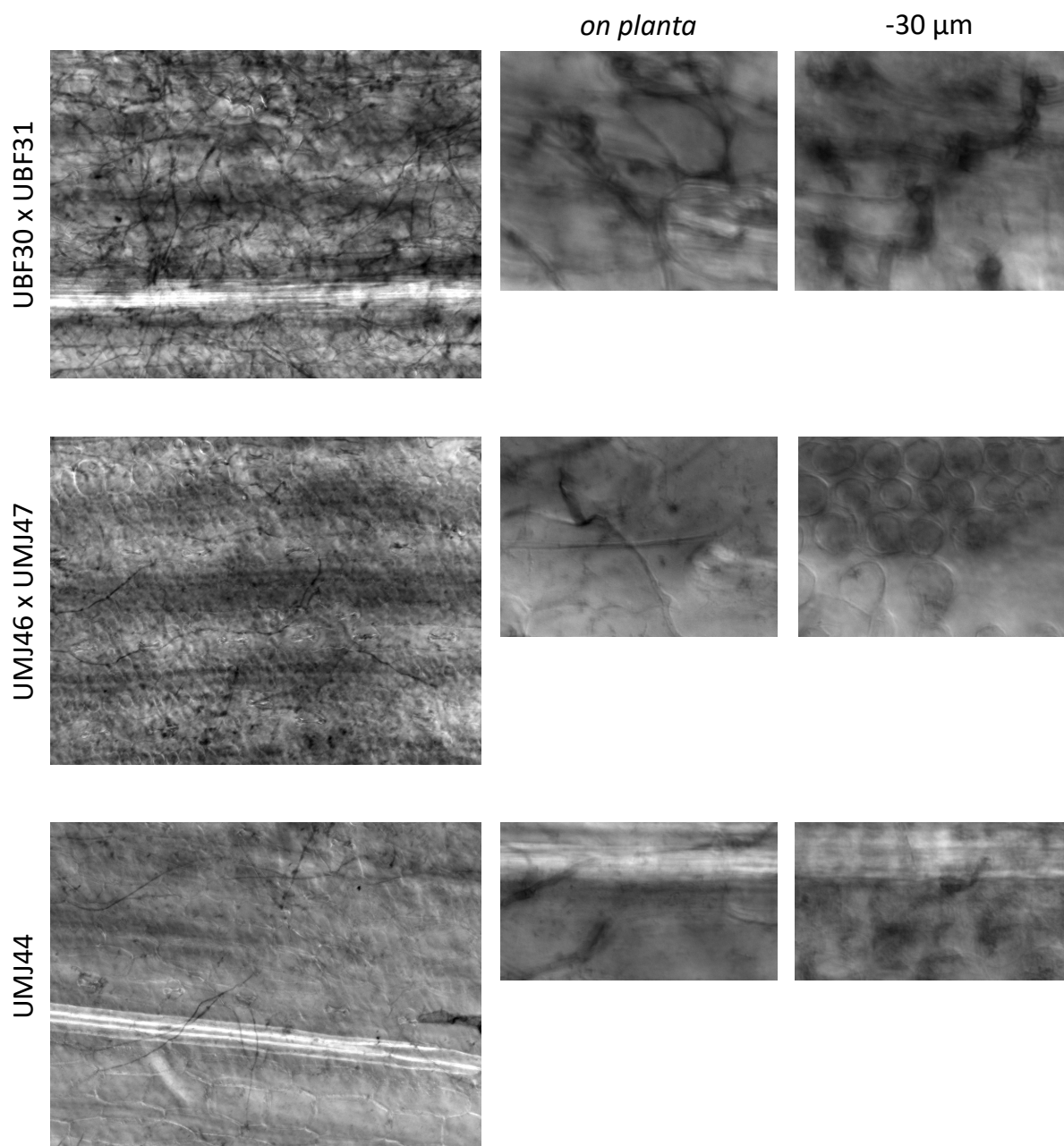
**Zarnack, K., Eichhorn, H., Kahmann, R. und Feldbrügge, M.** (2008). Pheromone-regulated target genes respond differentially to MAPK phosphorylation of transcription factor Prf1. *Mol Microbiol* **69**, 1041-1053.

**Zheng, Y., Kief, J., Auffarth, K., Farfsing, J.W., Mahler, M., Nieto, F. und Basse, C.W.** (2008). The *Ustilago maydis* Cys2His2-type zinc finger transcription factor Mzr1 regulates fungal gene expression during the biotrophic growth stage. *Mol Microbiol* **68**, 1450-1470.

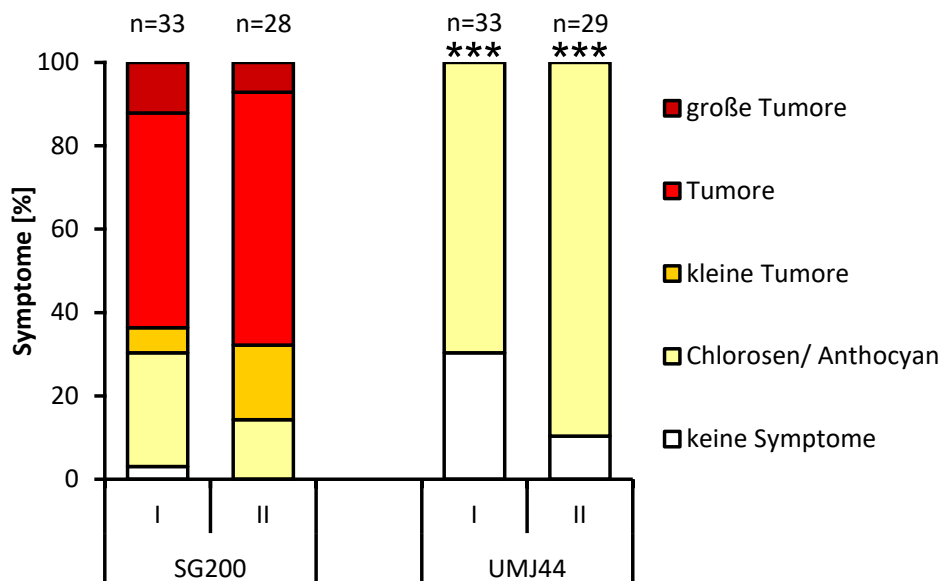
**Zuker, M.** (2003). Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic acids research* **31**, 3406-3415.

**Zuo, W., Depotter, J.R. und Doehlemann, G.** (2020). Cas9HF1 enhanced specificity in *Ustilago maydis*. *Fungal Biol* **124**, 228-234.

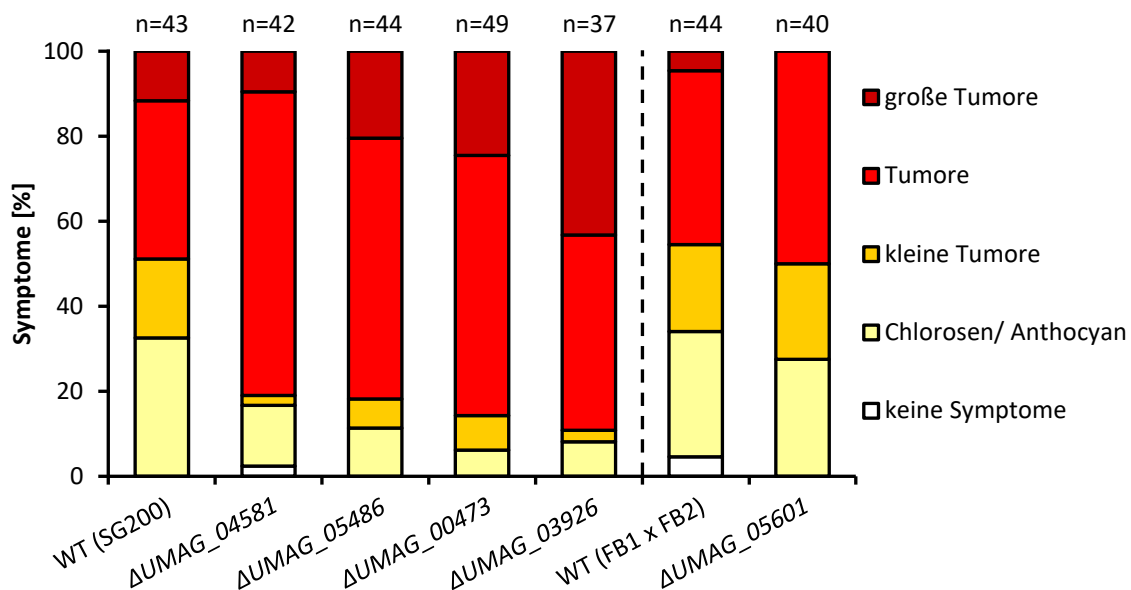
## 6. Anhang



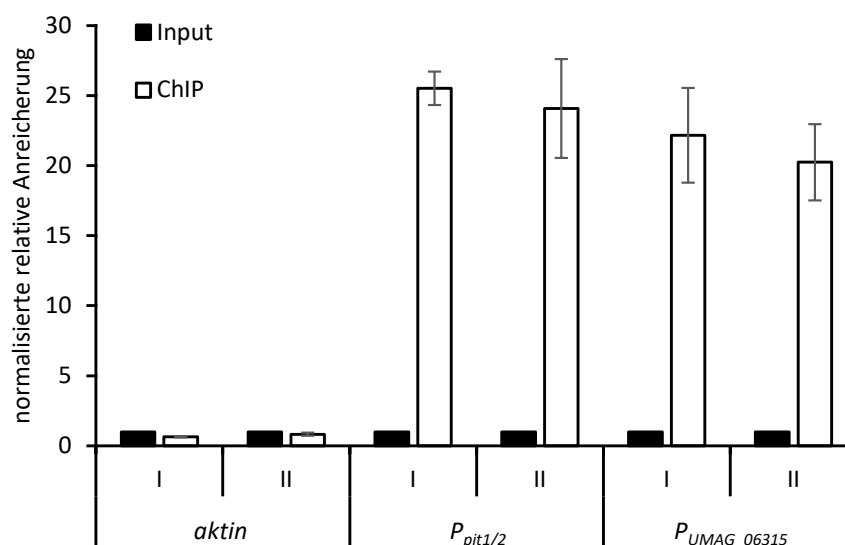
**Abbildung 6.1: Die prolongierte Expression von *rbf1* beeinträchtigt die Kolonisation *in planta*.** Für die Inokulation wurde eine Kreuzung der Stämme UBF30 x UBF31 (*a1 b1 H1:3xmCherry ip<sup>r</sup>[P<sub>hxt1</sub>:NLS:GFP]ip<sup>s</sup> x a2 b2 H1:3xmCherry ip<sup>r</sup>[P<sub>hxt1</sub>:NLS:GFP]ip<sup>s</sup>*), UMJ46 x UMJ47 (*a1 b1 H1:3xmCherry ip<sup>r</sup>[P<sub>mig2-5</sub>:rbf1]ip<sup>s</sup> x a2 b2 H1:3xmCherry ip<sup>r</sup>[P<sub>mig2-5</sub>:rbf1]ip<sup>s</sup>*), sowie der solopathogene Stamm UMJ44 (*a1:mfa2 bE1 bW2 ip<sup>r</sup>[P<sub>mig2-5</sub>:rbf1:3xHA]ip<sup>s</sup>*) verwendet. Blattsschnitte wurden sieben Tage nach der Infektion entnommen und mit Chlorazol Black gefärbt. Der Wildtyp (UBF30 x UBF31) hat nach sieben Tagen den Großteil der Blattoberfläche kolonisiert und proliferiert *in planta*. Wohingegen die Stämme mit prolongierter *rbf1* Expression, die Pflanze zwar penetrieren; weiteres invasives Wachstum bleibt jedoch aus. Der Maßstabsbalken entspricht 10 µm.



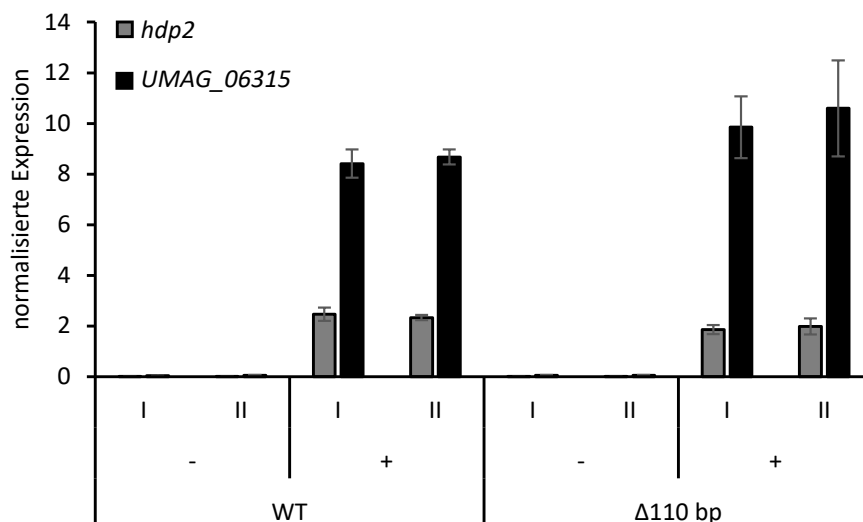
**Abbildung 6.2: Der solopathogene Stamm UMJ44 ist durch die prolongierte *rbf1* Expression in seiner Pathogenität reduziert.** Pflanzen die mit UMJ44 (*a1:mfa2 bE1 bW2 ip'[P<sub>mig2-5</sub>:rbf1:3xHA]ip<sup>s</sup>*) infiziert wurden, weisen im Vergleich zum Wildtyp (SG200; *a1:mfa2 bE1 bW2*) keinerlei Tumorbildung auf, lediglich Chlorosen und Anthocyan. Die Bonitur der infizierten Pflanzen erfolgte sieben Tage nach Inokulation. Das Experiment wurde zwei Mal unabhängig durchgeführt und jede Wiederholung ist im Diagramm dargestellt (I, II). Die Anzahl der Pflanzen ist mit n über den jeweiligen Replikaten angegeben. Statistische Signifikanz wurde mit dem zweiseitigen Mann-Whitney-U Rangsummentest mit Kontinuitätskorrektur ermittelt und bezieht sich auf den Wildtyp. \*\*\*  $p$ -Wert  $\leq 0,001$ .



**Abbildung 6.3: Die Deletion von putativen Transkriptionsfaktoren innerhalb der *b*-Kaskade zeigen keine verringerte Virulenz.** WT (SG200): *a1:mfa2 bE1 bW2*; ΔUMAG\_04581: SG200 ΔUMAG\_04581; ΔUMAG\_05486: SG200 ΔUMAG\_05486; ΔUMAG\_00473: SG200 ΔUMAG\_00473; ΔUMAG\_03926: SG200 ΔUMAG\_03926; WT(FB1 x FB2): *a1 b1 x a2 b2*; ΔUMAG\_05601: *a1 b1 ΔUMAG\_05601 x a2 b2 ΔUMAG\_05601*. Die putativen Transkriptionsfaktoren *UMAG\_04581*, *UMAG\_05486*, *UMAG\_00473* und *UMAG\_03926* werden von Rbf1 reguliert, während *UMAG\_05601* mit dem Rbf1-bW/bE-Komplex interagiert (Ulrich, 2020). Stämme, bei denen der jeweilige Transkriptionsfaktor deletiert wurde, weisen im Vergleich zum Wildtyp (SG200 bzw. FB1 x FB2) keine reduzierte Virulenz auf. Für eine quantitative Aussage zur Virulenz reicht der Stichprobenumfang allerdings nicht aus. Die Bonitur der infizierten Pflanzen erfolgte sieben Tage nach Inokulation. Die Anzahl der infizierten Pflanzen ist mit n über den jeweiligen Säulen angegeben.

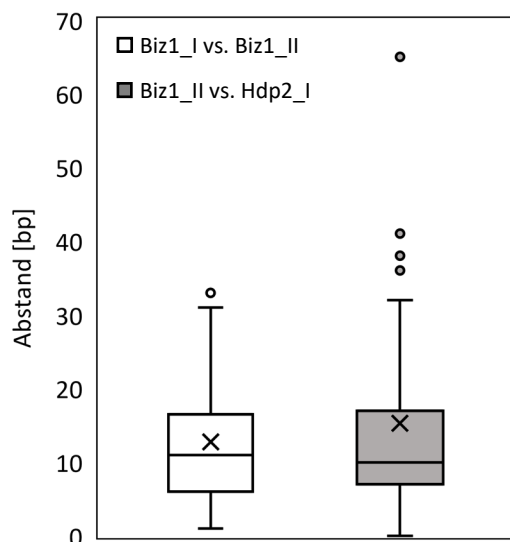


**Abbildung 6.4: Hdp2:3xHA bindet an die Promotoren von *pit1/2* und *UMAG\_06315* in *planta*.** Gezeigt ist die normalisierte relative Anreicherung von Hdp2:3xHA an den ORF von *aktin* (Negativkontrolle) und an den Promotoren von *pit1/2* und *UMAG\_06315*. Zur Normalisierung diente das Gen *eIF2B*. Die Berechnung erfolgte relativ zum jeweiligen Input (Probenentnahme vor der ChIP). Für die qChIP wurden Pflanzen zweimal unabhängig mit UMJ14 x UMJ15 (*a1 b1 hdp2:3xHA* x *a2 b2 hdp2:3xHA*) inokuliert und Proben sieben Tage nach der Infektion entnommen. Die anschließende RT-PCR wurde mit den biologischen Duplikate mit jeweils technischen Duplikaten durchgeführt. Dargestellt sind die Mittelwerte der technischen Duplikate der biologischen Replikate (I, II). Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung der Mittelwerte der technischen Duplikate. Im Vergleich zum Input ist eine deutliche Anreicherung von Hdp2:3xHA in den Promotorregionen von *pit1/2* und *UMAG\_06315* zu erkennen.



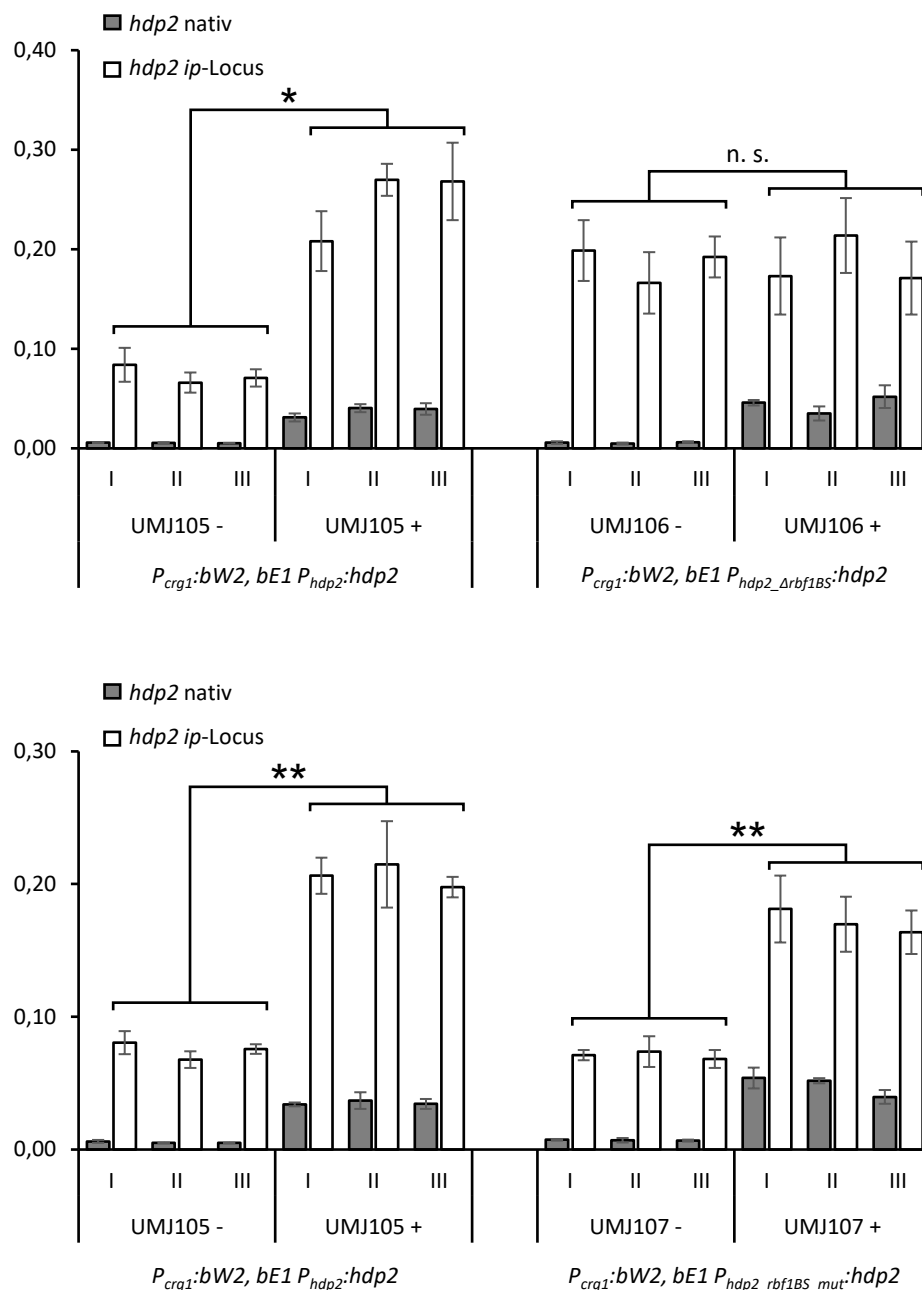
**Abbildung 6.5: qRT-PCR der Induktionskontrollen des *UMAG\_06315* Promotor Assays.** Zu sehen ist die normalisierte Expression ( $\Delta Ct$ ) von *hdp2* und (endogenen) *UMAG\_06315* in UTaB4 ( $\alpha 2 b 2 P_{crg1}:hdp2 ip^+[P_{UMAG_06315}:GFP]ip^5$ ) (WT) und UTaB5 ( $\alpha 2 b 2 P_{crg1}:hdp2 ip^+[P_{UMAG_06315\Delta 110bp}:GFP]ip^5$ ) ( $\Delta 110$  bp) unter nicht induzierten (-) und induzierten (+) Konditionen. Zur Normalisierung diente das Gen *eIF2B*. Das Experiment wurde in biologischen Duplikaten (I, II) mit jeweils technischen Duplikaten durchgeführt. Dargestellt sind die Mittelwerte der technischen Replikate. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung der Mittelwerte der technischen Duplikate. Die Stämme UTaB4 (WT) und UTaB5 ( $\Delta 110$  bp) weisen keinen Unterschied bezüglich der Induktion von *hdp2* und *UMAG\_06315* auf.





**Abbildung 6.6: Biz1 und Hdp2 binden *in planta* an gemeinsame Promotoren in unmittelbarer Nähe.**

Zur Berechnung wurden 35 Gene ausgewählt, deren Promotoren mit Biz1:3xHA *in planta*, sowie mit Hdp2:3xHA *in planta* angereichert werden konnten. Dabei hatte jeder Promotor einen einzigen *peak* je Kondition und entsprach den Kriterien in Kapitel 4.6. Anschließend wurde der Abstand zwischen den Gipfeln der *peaks* ermittelt. Für den Vergleich Biz1\_I vs. Biz1\_II (weiß) wurden die beiden biologischen Duplikate der ChIP-Seq *in planta* miteinander verrechnet. Für den Vergleich Biz1\_II vs. Hdp2\_I (grau) wurde eines der Duplikate der Biz1:3xHA ChIP-Seq *in planta* mit der Hdp2:3xHA ChIP-Seq *in planta* verrechnet. Die Streuung der Bindeposition zwischen Biz1:3xHA und Hdp2:3xHA ist vergleichbar mit der Varianz unter den Biz1:3xHA Duplikaten.



**Abbildung 6.7: Die Deletion der *Rbs* im *hdp2* Promotor führt zum Ausbleiben der *hdp2* Induktion und einer erhöhten Basalexpression.** Zu sehen ist die normalisierte Expression ( $\Delta Ct$ ) von endogenem *hdp2* (*hdp2* nativ) und ektoischem *hdp2* (*hdp2 ip*-Locus) in UMJ105 ( $a2 P_{crg1}:bW2, bE1 ip^+[P_{hdp2}:hdp2]ip^s$ ), UMJ106 ( $a2 P_{crg1}:bW2, bE1 ip^+[P_{hdp2\Delta rbf1BS}:hdp2]ip^s$ ) und UMJ107 ( $a2 P_{crg1}:bW2, bE1 ip^+[P_{hdp2\_rbf1BS\_mut}:hdp2]ip^s$ ) nach fünfstündiger b-Induktion. Während die Mutation der am stärksten konservierten *Rbs* im *hdp2* Promotor (UMJ107) keine Auswirkungen auf die Expression von ektoischem *hdp2* zeigt, führt die Deletion der drei *Rbs* (UMJ106) zum Ausbleiben der Induktion. Zudem erhöht sich durch die Deletion die Basalexpression von ektoischem *hdp2*. Zur Normalisierung diente das Gen *eIF2B*. Das Experiment wurde in biologischen Triplikaten mit jeweils technischen Duplikaten durchgeführt. Dargestellt sind die Mittelwerte der technischen Duplikate der induzierten (+) und nicht induzierten (-) biologischen Replikate (I, II, III). Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung der Mittelwerte der technischen Duplikate. Statistische Signifikanz wurde mit dem studentische *t*-Test ermittelt und bezieht sich nur auf ektoisches *hdp2* (*ip*-Locus). \*\* *p*-Wert  $\leq 0,01$ ; \* *p*-Wert  $\leq 0,05$ ; n.s.: nicht signifikant

## 6.1 Digitale Daten

### ➤ Tabellen:

- Tabelle 6.1.1: Gene deren Promotor mit Hdp2 *in planta* angereichert werden konnten
- Tabelle 6.1.2: Gene deren Promotor mit Biz1 *in planta* angereichert werden konnten
- Tabelle 6.1.3: Gene Ontology Analyse von Hdp2 Zielgenen

### ➤ Ordner:

- ChIP-Seq
  - Biz1\_I\_Rohdaten
  - Biz1\_II\_Rohdaten
  - Hdp2\_I\_Rohdaten
  - Hdp2\_II\_Rohdaten
  - Biz1\_I\_Genzuweisung
  - Biz1\_II\_Genzuweisung
  - Hdp2\_I\_Genzuweisung
  - Hdp2\_II\_Genzuweisung
- Meme Suite Analyse
  - Input\_STREME\_Biz1
  - Input\_STREME\_Hdp2
  - Input\_STREME\_Kontrolle
  - Output\_FIMO\_Biz1\_Motiv
  - Output\_FIMO\_Hdp2\_Motiv

### ➤ Digitale Version dieser Arbeit

## Danksagung

Lieber Jörg, vielen Dank für dein Vertrauen und für die Gelegenheit, meine Doktorarbeit bei dir anfertigen zu dürfen. Die großartige Atmosphäre deiner Arbeitsgruppe sowie dein Rat, Engagement, Wertschätzung und natürlich deine kulinarischen Experimente ließen mich keinen Tag zweifeln eine falsche Entscheidung getroffen zu haben. Vielen Dank dafür!

Vielen Dank an Prof. Dr. Holger Puchta für die Bewertung meiner Arbeit als Zweitgutachter.

Vielen Dank an Prof. Dr. Kai Heimel für den regen Input sowie die Unterstützung der CHIP-Seq Experimente und der Vermittlung der Sequenzierung an der Universität Göttingen. Vor allem bedanke ich mich auch bei Florian Finkernagel für die Unterstützung bei der Auswertung der CHIP-Seq Daten.

Ein Dank geht auch an die Kollegen der AG Fischer und AG Requena mit denen man sich immer austauschen konnte.

Ein großer Dank geht natürlich auch an die gesamte AG Kämper. Danke an Thes, Jonas und Julia, die einem gezeigt haben, wie der Usti im Labor läuft. Vor allem Jonas, der mich bereits in der Masterarbeit betreut hatte und mir im Anschluss weiterhin zahlreiche Kniffe und Methoden beigebracht hat. Danke an meine Laborbank-Nachbarin Julia, die meine Musik ertragen musste und trotzdem immer mit einem offenen Ohr, Bier oder Kuchen zur Seite stand. Danke an Karina für die gemeinsame Laborzeit seit der Bachelorarbeit. Von Pferde-Ranches in Kalifornien, Metro Ausflügen mit anschließenden Ben & Jerry's Ekstasen über den Entwurf bizarrer Klonierungsstrategien und manchmal stundenlanger Mittagspausen war so einiges dabei. Danke auch an die Newcomer Lukas und Julia D. für die Unterstützung im Labor sowie bei der Korrektur dieser Arbeit.

Nicht zu vergessen meine Familie, auf deren Hilfe ich mich jederzeit verlassen konnte und die immer an mich geglaubt hat. Der Dank gilt vor allem meinen Eltern, ohne die das Ganze nicht möglich gewesen wäre.

Zuletzt geht ein großes Danke an Lucie – für dein Verständnis, deine Geduld und verrückte Art und Weise. Vor allem in den letzten Zügen dieser Arbeit konnte ich auf deinen Rückhalt und Motivation bauen, denn du hast mich nicht nur ausgehalten wenn es schlecht lief, sondern mich direkt wieder aufgebaut, sei es mit Essen, Memes oder einfach nur mit deinen Worten.