



Regulationsmechanismen der biotrophen Entwicklung von *Ustilago maydis*

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

dem Fachbereich Biologie
der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Kai Heimel

aus Homberg/Efze

Marburg/Lahn 2010

Vom Fachbereich Biologie
der Philipps-Universität Marburg als Dissertation
angenommen am: _____

Erstgutachter: Herr Prof. Dr. Jörg Kämper
Zweitgutachter: Herr Prof. Dr. Michael Bölker

Tag der mündlichen Prüfung am: _____

Erklärung

Ich versichere, dass ich meine Dissertation mit dem Titel "Regulationsmechanismen der biotrophen Entwicklung von *Ustilago maydis*" selbständig, ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfen bedient habe.

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

(Ort, Datum)

(Kai Heimes)

Die Untersuchungen zur vorliegenden Arbeit wurden von Oktober 2005 bis März 2008 in Marburg am Max-Planck-Institut für terrestrische Mikrobiologie in der Abteilung für Organismische Interaktionen und von April 2008 bis Februar 2010 am Karlsruher Institut für Technologie in der Abteilung für Genetik unter der Betreuung von Herrn Prof. Dr. Jörg Kämper durchgeführt.

Teile dieser Arbeit wurden zur Veröffentlichung eingereicht:

Heimel, K.*, Zahiri, A.*, Wahl, R. Rath, M. and 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. (*accepted, with revision*). *zu gleichen Teilen beitragen.

Heimel, K., Scherer, M., Schuler, D. and Kämper, J. (2010). The *Ustilago maydis* Clp1 protein orchestrates pheromone and *b*-dependent signalling pathways to coordinate cell cycle and pathogenic development. (*submitted*).

Weitere Veröffentlichungen:

Heimel, K.*, Scherer, M.*, Vranes, M., Wahl, R., Pothiratana, C., Schuler, D., Vicon, V., Finkernagel, F., Flor-Parra, I. and Kämper, J. (2010). The transcription factor Rbf1 is the master regulator for *b*-mating type controlled pathogenic development in *Ustilago maydis*. (*in revision*, PLOS Pathogens). *zu gleichen Teilen beitragen.

Scherer, M., Heimel, K., Starke, V. and Kämper, J. (2006). The Clp1 protein is required for clamp formation and pathogenic development of *Ustilago maydis*. *Plant Cell* 18, 2388-2401.

Abkürzungen und Fachbegriffe

Abb.	Abbildung	Leu	Leucin
<i>ad</i>	zum Endvolumen auffüllen	M	Molar oder auch Methionin
Ade	Adenin	mb	Megabasenpaar(e) = 1000000 bp
Amp	Ampicillin	min	Minute
AmpR	Ampicillinresistent	mM	Millimolar
bp	Basenpaar(e)	N-terminal	aminoterminal
BSA	Rinder Serumalbumin	nm	Nanometer
C-terminal	carboxyterminal	nt	Nukleotide (nucleotide)
ca.	Circa	OD	Optische Dichte
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat	OD600	Optische Dichte bei 600 nm
Cbx	Carboxin	ORF	Offener Leserahmen
CbxR	Carboxinresistent	PCR	Polymerase Kettenreaktion
dATP (A)	Desoxyadenosintriphosphat	PD	Potato-Dextrose Medium
dCTP (C)	Desoxycytidintriphosphat	PEG	Polyethylenglycol
dGTP (G)	Desoxyguanosintriphosphat	pers.	persönlich(e)
DMSO	Dimethylsulfoxid	Phleo	Phleomycin
DNA	Desoxyribonukleinsäure	RNA	Ribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease	RNase	Ribonuklease
			Raumtemperatur oder auch reverse
dNTP (N)	Desoxynukleosidtriphosphat	RT	Transkriptase
	Aminosäurenmischung für		
Drop-out	Hefemedien	SDS	Natriumdodecylsulfat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure	sec	Sekunde
g	Gramm	Tab.	Tabelle
GTP	Guanosintriphosphat	TE	Tris-HCl/EDTA
GTPase	Guanosintriphosphatase	Tris	Trishydroxymethylaminomethan
h	Stunde	Trp	Tryptophan
H ₂ O _{bid.}	zweifach destilliertes Wasser	U	Unit (Enzymaktivitätseinheit)
His	Histidin	üN	über Nacht
Hyg	Hygromycin	Upm	Umdrehungen pro Minute
KanR	Kanamycinresistent	UV	Ultraviolettes Licht
kb	Kilobasenpaar(e) = 1000 bp	V	Volt
L	Liter	wt	Wildtyp

Summary

The coordination of complex developmental processes in multicellular organisms requires the stringent regulation and interconnection of various signaling pathways. Sexual development in yeasts and filamentous fungi is often coupled to defined cell cycle stages, to account for the synchronized development of the different cells and to guarantee a controlled cellular differentiation.

In the dimorphic basidiomycete *U. maydis* sexual and pathogenic development are tightly connected and depend on the host plant maize. Prerequisite for the formation of the infectious dikaryon is the cell/cell recognition and fusion that is controlled via an *a*-locus encoded pheromone/receptor system. The activation of this system triggers a G2 cell cycle arrest and the formation of conjugation tubes. After fusion of the conjugation tubes, further development is controlled by the *b*-locus. The expression of the heterodimeric bE/bW transcription factor, which is encoded by the *b*-locus, is required for the maintenance of the cell cycle arrest and filamentous growth. In previous studies, 345 *b*-dependently regulated genes have been identified, out of which more than 90% are regulated via the C2H2 zinc finger transcription factor Rbf1. Besides this “master regulator“ of pathogenic development, *clp1* represents the sole directly *b*-regulated gene that is, in addition to *rbf1*, essential for pathogenic development and expressed independently from Rbf1. $\Delta clp1$ strains do not form clamps and are unable to proliferate *in planta*, suggesting that Clp1 might be involved in the regulation of these processes. The induced co-expression of *clp1* blocks the function of the b-heterodimer and prevents filamentous growth and the G2 cell cycle arrest (Scherer et al., 2006; Scherer, unpublished).

In previous studies I have demonstrated that Clp1 interacts, among others, with both the bW-protein and Rbf1, the central regulators of pathogenic development. In this study the functional impact of Clp1-protein interactions on the pathogenic development of *U. maydis* were analyzed. The interaction of Clp1 with bW results in the loss of b-function resulting in the global inhibition of *b*-dependent gene regulation. In contrast, the interaction of Clp1 with Rbf1 leads to the specific repression of the pheromone gene *mfa*, and thereby represses the pheromone response on both, the morphological, as well as on the regulatory level. The further characterization of Clp1-interacting proteins led to the identification of the transcription factor Cib1. Deletion of *cib1* results in a phenocopy of $\Delta clp1$ strains and, similar to Clp1, Cib1 protein expression is

posttranscriptionally regulated and restricted to postpenetrative stages of the pathogenic development. In contrast to Clp1, the mechanism of the posttranscriptional control of Cib1 expression has been elucidated and could be attributed to developmentally regulated alternative splicing of the *cib1* mRNA.

Clp1 acts as modulator of two transcription factors, of which both play a central role in the regulation of the pathogenic development and the cell cycle. Expression of either Rbf1 or the b-heterodimer trigger both a G2 cell cycle arrest that is only released after plant penetration. The function of the b-heterodimer, and most likely also of Rbf1, is required during the entire process of pathogenic development. The function of Clp1 is to allow the re-initiation of the cell cycle by the interaction with bW and Rbf1.

By use of an artificial promoter system that mediates *rbf1* expression prior and post penetration of the leaf surface, the formation of appressoria and the penetration of the leaf surface was demonstrated for the first time independent of an active b-heterodimer. Rbf1-regulated genes are therefore sufficient for the initial phase of pathogenic development, whereas the re-initiation of the cell cycle and the limited proliferation *in planta* requires the additional expression of Clp1. The further progression of the infectious development results in asynchronous nuclear divisions and elicits plant defense responses. Obviously, the b-heterodimer is required for the suppression of plant defense responses and the coordinated and careful control of the *in planta* development.

This approach provided new insights and a fundamental knowledge of the regulatory cross connections of the different signaling pathways and their contribution to the regulation of the biotrophic development of *U. maydis*.

Zusammenfassung

Die Koordination komplexer Entwicklungsvorgänge in multizellulären Organismen erfordert eine stringente Regulation und die Verknüpfung verschiedener Signalwege. Bei Hefen und filamentösen Pilzen ist die sexuelle Entwicklung oftmals an spezifische Stadien des Zellzyklus gekoppelt, wodurch die synchrone Entwicklung verschiedener Zellen gesichert und ein geordneter Ablauf der zellulären Differenzierung gewährleistet wird.

Bei dem dimorphen Basidiomyzeten *U. maydis* sind sexuelle und pathogene Entwicklung eng miteinander verknüpft und finden in Abhängigkeit der Wirtspflanze Mais statt. Voraussetzung für die Bildung des filamentösen Dikaryons, der infektiösen Wuchsform von *U. maydis*, ist die gegenseitige Erkennung und Verschmelzung kompatibler Sporidien, welche durch das Pheromon/Rezeptorsystem des *a*-Kreuzungstyp-Locus gesteuert wird. Die Aktivierung dieses Systems führt zu einem Zellzyklusarrest in der G2-Phase und der Ausbildung von Konjugationshyphen. Nach der Fusion der Konjugationshyphen unterliegt die weitere Entwicklung der Kontrolle des *b*-Locus. Die Expression des durch den *b*-Locus kodierten heterodimeren Transkriptionsfaktors *bE/bW* ist notwendig für die Aufrechterhaltung des Zellzyklusarrestes und des filamentösen Wachstums. In vorangegangenen Studien konnten 345 *b*-regulierte Gene identifiziert werden, von denen mehr als 90% in Abhängigkeit des C2H2-Zinkfinger Transkriptionsfaktors Rbf1 reguliert werden. Neben diesem „Master-Regulator“ der pathogenen Entwicklung ist *clp1* das einzige direkt *b*-regulierte Gen, das ebenfalls für die pathogene Entwicklung von *U. maydis* notwendig ist und unabhängig von Rbf1 exprimiert wird. $\Delta clp1$ Stämme sind nicht in der Lage Schnallenzellen zu bilden und innerhalb der Pflanze zu wachsen, was eine mögliche Funktion in der Regulation dieser Entwicklungsprozesse vermuten ließ. Die induzierte Co-Expression von *clp1* führt zur Inhibition der Funktion des *b*-Heterodimers, wodurch filamentöses Wachstum und der G2-Zellzyklusarrest verhindert werden (Scherer *et al.*, 2006; Scherer, unveröffentlicht).

In vorangegangenen Untersuchungen konnte ich zeigen, dass Clp1 unter anderem mit dem *bW*-Protein und Rbf1, den zentralen Regulatoren der pathogenen Entwicklung interagiert. In der vorliegenden Studie wurden die funktionellen Auswirkungen der Clp1-Protein-Interaktion auf die pathogene Entwicklung von *U. maydis* untersucht. Die Interaktion von Clp1 mit *bW* führt zu einem generellen Funktionsverlust des *b*-Heterodimeres und, daraus resultierend, zur globalen Repression der *b*-abhängigen Genregulation. Die Interaktion von Clp1 mit Rbf1 hingegen führt zu einer spezifischen

Repression des Pheromogens *mfa*, wodurch die Pheromonantwort sowohl auf morphologischer als auch auf regulatorischer Ebene unterdrückt wird. Die weitere Charakterisierung von Clp1-interagierenden Proteinen führte zur Identifizierung des Transkriptionsfaktors Cib1. Die Deletion von *cib1* führt zu einer Phänokopie der *clp1* Deletion. Ähnlich wie bei Clp1 ist die Proteinexpression von Cib1 posttranskriptionell reguliert und auf postpenetrative Entwicklungsstadien begrenzt. Im Gegensatz zu Clp1 konnte der Mechanismus der posttranskriptionellen Regulation von Cib1 aufgeklärt und auf entwicklungsspezifisch reguliertes alternatives Spleißen zurückgeführt werden.

Clp1 fungiert als Modulator von zwei Transkriptionsfaktoren, die beide eine zentrale Rolle bei der Steuerung des pathogenen Wachstums, aber auch bei der Zellzyklus-Kontrolle haben. Sowohl Rbf1 als auch das b-Heterodimer induzieren einen G2-Zellzyklusarrest, der erst nach der Penetration der Pflanzenoberfläche aufgehoben wird. Die Funktion des b-Heterodimeres, und vermutlich auch die von Rbf1, ist während der gesamten pathogenen Entwicklung notwendig. Die Funktion von Clp1 ist es, durch die Interaktion mit bW und Rbf1 die Re-Initiation des Zellzyklus zu ermöglichen. Durch die Verwendung eines artifiziellen Promotorsystems, das die Expression von *rbf1* während und nach der Penetration der Pflanzenoberfläche gewährleistet, wurde erstmalig die Bildung von Appressorien und die darauffolgende Penetration der Pflanzenoberfläche unabhängig von einem aktiven b-Heterodimer nachgewiesen. Die durch Rbf1 regulierten Gene sind damit für die initialen Infektionsprozesse ausreichend. Die Re-Initiation des Zellzyklus und eine begrenzte Proliferation *in planta* werden allerdings erst durch die zusätzliche Expression von Clp1 ermöglicht. Im weiteren Verlauf der Infektion kommt es dann zu asynchronen Kernteilungen und Pflanzenabwehrreaktionen. Für die Unterdrückung von Pflanzenabwehrreaktionen und eine koordinierte synchrone Entwicklung *in planta* ist offensichtlich die Funktion des b-Heterodimeres entscheidend.

Durch diesen Ansatz wurden neue Einblicke und ein grundlegendes Verständnis der regulatorischen Wechselwirkungen innerhalb der verschiedenen Signalwege und deren Auswirkung auf die biotrophe Entwicklung von *U. maydis* erlangt.

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	1
1.1 <i>Ustilago maydis</i>	1
1.2 Der Lebenszyklus von <i>U. maydis</i>	2
1.3 Kontrolle der pilzlichen Entwicklung durch Paarungstyp-Loci	4
1.3.1 Der <i>a</i> -Locus von <i>U. maydis</i> kontrolliert die interzelluläre Erkennung	5
1.3.2 Der <i>b</i> -Locus kodiert den zentralen Regulator der pathogenen Entwicklung... 7	
1.4 Die <i>b</i>-vermittelte Genregulationskaskade	8
1.5 Clp1 und die Schnallenbildung in <i>U. maydis</i>	10
1.6 Zielsetzung der Arbeit	12
2 Ergebnisse	14
2.1 Das Num1 Protein in <i>U. maydis</i>	14
2.1.1 Num1 ist essentiell für die pathogene Entwicklung von <i>U. maydis</i>	15
2.1.2 Num1 ist für die Schnallenbildung in <i>U. maydis</i> nicht notwendig	15
2.2 Das Fkh1-Protein aus <i>U. maydis</i>	18
2.2.1 Fkh1 ist notwendig für die Pathogenität und Sporenbildung von <i>U. maydis</i> . 19	
2.2.3 Fkh1 ist für die Schnallenbildung in <i>U. maydis</i> nicht notwendig	20
2.3 Untersuchung von Clp1-Protein-Interaktionen <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i>	21
2.3.1 Clp1 interagiert mit bW, Rbf1 und Cib1 <i>in vitro</i>	21
2.3.2 Clp1 interagiert mit bW, Rbf1 und Cib1 <i>in vivo</i>	22
2.3.3 Charakterisierung der Clp1-Interaktionsdomäne	24
2.4 Das Cib1-Protein in <i>U. maydis</i>	26
2.4.1 Cib1 ist posttranskriptionell reguliert und lokalisiert im Zellkern	26
2.4.2 Die posttranskriptionelle Regulation von <i>cib1</i> beruht auf alternativem	28
Spleißen.....	28
2.4.3 Cib1 ist für den Kernimport des Clp1-Proteins nicht notwendig	31
2.4.4 Cib1 ist nicht an der Genregulation auf der Pflanzenoberfläche beteiligt	31
2.5 Die Interaktion von Clp1 und bW	32
2.5.1 Die C-terminale Domäne des bW2-Proteins ist ausreichend für die	32
Interaktion mit Clp1 und führt zur Inhibition des Kon8-Proteins <i>in vivo</i>	32
2.6 Die Interaktion von Clp1 und Rbf1	35
2.6.3 Die Co-Expression von <i>rbf1</i> und <i>clp1</i> führt zur spezifischen Repression der 36	
Pheromonvorläufer- (<i>mfa1</i>) und Pheromonrezeptorgene (<i>pra1</i>)	36

2.6.4 Clp1 blockiert die Pheromon-induzierte Konjugationshyphenbildung und den Pheromon-induzierten G2-Zellzyklusarrest.	38
2.7 Clp1 ist notwendig für die <i>b</i>-abhängige Repression der Pheromonantwort.....	41
2.8 Die Regulation der pathogenen Entwicklung durch Rbf1 und Clp1.....	42
2.8.1 Die initiale Phase der pathogenen Entwicklung wird durch Rbf1 gesteuert .	44
2.8.2 Rbf1 und Clp1 steuern die Appressorienbildung, die Penetration der Pflanzenoberfläche und die Proliferation <i>in planta</i>	48
3 Diskussion.....	52
3.1 Num1 und Fkh1 sind essentiell für die pathogene Entwicklung, aber nicht für die Schnallenbildung	52
3.2 Clp1 interagiert mit essentiellen Regulatoren der pathogenen Entwicklung <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i>	54
3.3 Mechanismus der Clp1-vermittelten Inhibition der <i>b</i>-Funktion	56
3.4 Die Auswirkung der Clp1/Rbf1-Interaktion auf die Genregulation und das filamentöse Wachstum von <i>U. maydis</i>.....	58
3.5 Die Funktion und Regulation von Cib1	60
3.6 Regulationskaskaden während der pathogenen Entwicklung von <i>U. maydis</i> (ABC-Modell).....	64
3.7 Die Kontrolle der pathogenen Entwicklung durch Rbf1 und Clp1	66
4. Material und Methoden.....	68
4.1 Material und Bezugsquellen.....	68
4.1.1 Chemikalien, Enzyme, Kits, Medien und Lösungen	68
4.1.2 Oligonukleotide	72
4.1.3 Stämme	74
4.1.4 Plasmide	76
4.2 Mikrobiologische, genetische, zellbiologische Methoden	80
4.2.1 Kultivierung von <i>E. coli</i>	80
4.2.2 Kultivierung von <i>S. cerevisiae</i>	81
4.2.3 Kultivierung von <i>U. maydis</i>	82
4.3 Molekularbiologische Standard-Methoden.....	86
4.3.1 Die Bestimmung der Konzentration von Nukleinsäuren	86
4.3.2 Die Isolierung von Nukleinsäuren	86
4.3.3 Auftrennung und Nachweis von Nukleinsäuren.....	89
4.4 Biochemische Methoden	90

4.4.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese von Proteinen	90
4.4.2 Nachweis von immobilisierten Proteinen - Western Blot	90
4.4.3 <i>In vitro</i> Transkription und Translation von Proteinen	90
4.4.4 Co-Immunopräzipitation.....	91
4.5 PCR-Methoden.....	92
4.5.1 Standard-PCR-Ansätze	92
4.5.2 PCR-Generierung von Gen-Deletions- Konstrukten für <i>U. maydis</i>	92
4.5.3 DNase I-Behandlung und Reverse Transkription (für Real-Time-PCR)	93
4.5.4 Real-Time-PCR (qRT-PCR)	94
4.5.5 cDNA-Isolierung.....	94
4.6 Transkriptomanalyse	95
4.7 Sequenzanalyse	98
5 Literaturverzeichnis.....	100

1 Einleitung

1.1 *Ustilago maydis*

Ustilago maydis, der Erreger des Maisbeulenbrandes, gehört zur Klasse der Basidiomycota und wurde durch Bonnet 1754 erstmalig beschrieben. Die frühen Studien an *U. maydis* befassten sich vornehmlich mit der Morphologie, Zytologie und Sexualität und der damit verknüpften pathogenen Wuchsform von *U. maydis* (damals *Ustilago zaeae*) (Brefeld, 1883; Hanna, 1929; Holloman, *et al.*, 2008; Seyfert, 1927; Sleumer, 1931; Stakman and Christensen, 1927). In den letzten Jahrzehnten hat sich *U. maydis* immer stärker als Modellorganismus für die Untersuchung grundlegender zellulärer Mechanismen der Rekombination, der sexuellen Entwicklung, des polaren Wachstums und der Pilz-Pflanzen-Interaktion etabliert (Bakkeren, *et al.*, 2008; Brefort, *et al.*, 2009; Holloman *et al.*, 2008; Kämper, *et al.*, 2006; Steinberg and Perez-Martin, 2008). *U. maydis* gehört zu der ca. 1500 Mitglieder umfassenden Gruppe der phytopathogenen Brandpilze (Begerow, *et al.*, 2006). Trotz seiner relativ geringen wirtschaftlichen Bedeutung als Ernteschädling ermöglicht die Untersuchung von *U. maydis* Rückschlüsse auf pathogenitätsrelevante Entwicklungsprozesse in verwandten Arten, die als Parasiten landwirtschaftlich relevanter Kulturpflanzen jährlich Ernteschäden in Höhe von mehreren Milliarden Dollar verursachen (Martinez-Espinoza, *et al.*, 2002). Zu diesen gehören neben weiteren Brandpilzen wie *Ustilago hordei*, *U. nigra*, *U. nuda*, *U. scitaminea*, *U. tritici* und *Sporisorium reilianum* auch die Rostpilze, die auf Grund ihrer obligat biotrophen Lebensweise genetisch schwer zugänglich sind.

Die pathogene Entwicklung von *U. maydis* ist eng an die sexuelle Entwicklung gekoppelt und abhängig vom lebenden Gewebe der befallenen Pflanze (Brefeld, 1895; Christensen, 1963). Das enge Wirtsspektrum von *U. maydis* beschränkt sich auf Mais (*Zea mays*) und dessen Urform Teosinte (*Euchlena mexicana*) (Doebley, 1992). Die Infektion mit *U. maydis* führt zur Bildung von Gallen, die, häufig auch als Tumore bezeichnet, an allen oberirdischen Teilen der Pflanze auftreten können (siehe Abb. 1A) (Christensen, 1963). Innerhalb dieser Tumore finden eine massive Vermehrung der Pilzhyphen und die Differenzierung der diploiden Brandsporen statt. Am Ende der Vegetationsperiode werden die Sporen freigesetzt und verleihen der Maispflanze das für *U. maydis* namensgebende Aussehen (siehe Abb. 1B). Infizierte Maiskolben

werden in Mexiko als “mexikanische Trüffel” oder “Cuitlacoche” verkauft und sind eine landesübliche Delikatesse (Banuett, 1992; Valverde, *et al.*, 1995).

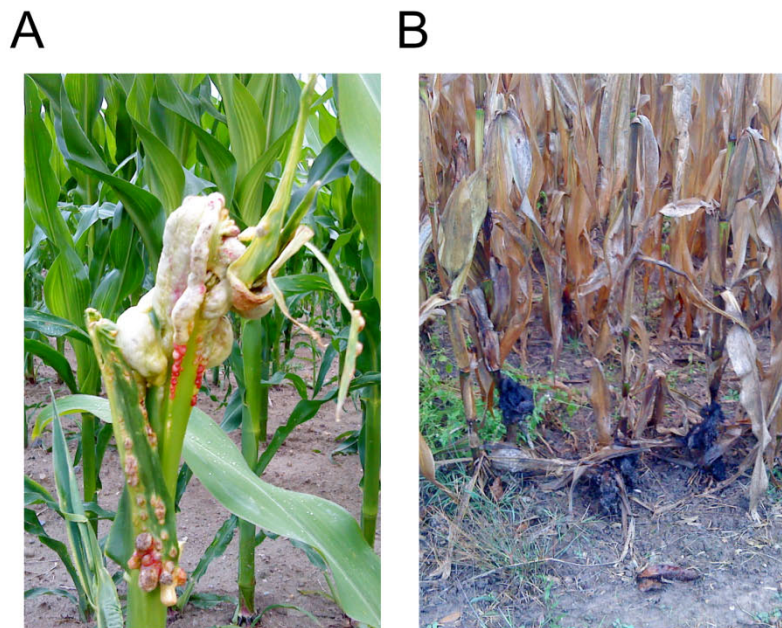


Abbildung 1: Infizierte Maispflanzen. (A) Stängeltumor einer infizierten Maispflanze zum Beginn der Vegetationsperiode. (B) Aufgebrochene Tumore zum Ende der Vegetationsperiode. Die freigesetzten melanierten Brandsporen führen zu einem verbrannten Aussehen der infizierten Pflanzenteile. (Photos aufgenommen im Juni (A) und Oktober (B) 2009 in Karlsruhe-Rüppurr)

1.2 Der Lebenszyklus von *U. maydis*

Der Lebenszyklus von *U. maydis* ist in drei verschiedene Kernphasen unterteilt. Die saprophytisch wachsenden Sporidien sind haploid, das pathogene Filament ist dikaryotisch, und die Teliosporen sind diploid. Während des saprophytischen Wachstums vermehren sich die haploiden Sporidien durch hefeartige Knospung. In dieser Form ist *U. maydis* unter Laborbedingungen auf Fest- oder in Flüssigmedien kultivierbar und zugänglich für genetische Manipulationen. Eine große Anzahl molekularbiologischer Techniken und ein hocheffizientes, homologes Rekombinationssystem vereinfachen dabei die Arbeit mit *U. maydis* und unterstreichen die hervorragende Eignung als pilzlicher Modellorganismus (Brachmann, *et al.*, 2004; Kämper, 2004; Steinberg and Perez-Martin, 2008). Die Sequenzierung des Genoms und dessen zweifache manuelle Annotierung ermöglichen gezielte revers-genetische Untersuchungen, die durch die Verfügbarkeit von Affymetrix Microarrays komplementiert werden (Kämper *et al.*, 2006).

Die verschiedenen Stadien der sexuellen Entwicklung von *U. maydis* stehen unter der Kontrolle der Paarungstyp-Loci (Bölker, 2001; Feldbrügge, *et al.*, 2004; Kahmann and Kämper, 2004; Kahmann, *et al.*, 1996). Der biallelische *a*-Locus kodiert für ein Pheromon/Rezeptorsystem über das die Zell/Zellerkennung und die anschließende Zellfusion gesteuert werden (Bölker, *et al.*, 1992; Schulz, *et al.*, 1990). Nach der Zellfusion steht die weitere sexuelle und pathogene Entwicklung unter der Kontrolle des multiallelischen *b*-Locus, der für die Homeodomänenproteine bEast (bE) und bWest (bW) kodiert (Gillissen, *et al.*, 1992). Die Expression kompatibler Allele dieser beiden Proteine ist sowohl notwendig als auch ausreichend für die Induktion und Vollendung der pathogenen Entwicklung von *U. maydis* (Bölker, *et al.*, 1995; Kämper *et al.*, 2006).

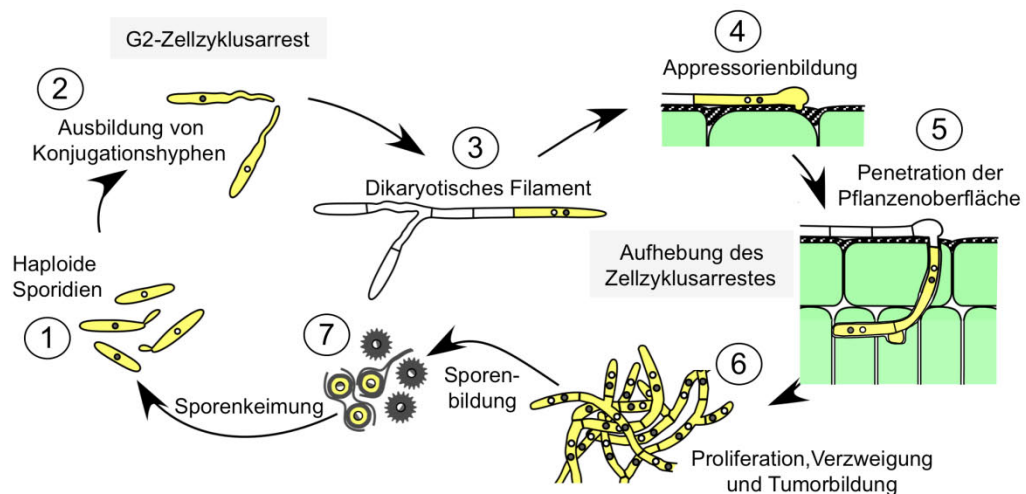


Abbildung 2: Lebenszyklus von *U. maydis*. Schematische Darstellung der unterschiedlichen Entwicklungsstufen während der sexuellen und pathogenen Entwicklung von *U. maydis*. (1) Vegetatives, hefeartiges Wachstum durch Knospung, (2) Konjugationshyphenbildung und Zellfusion, (3) filamentöses Wachstum des Heterodikaryons, (4) Penetration der Pflanzenoberfläche durch Appressorien, (5) Aufhebung des Zellzyklusarrestes und Proliferation, Schnallenbildung, (6) Verzweigung, Tumorbildung und daran anschließende Karyogamie, (7) Differenzierung der Teliosporen. (Lebenszyklus modifiziert nach Kämper *et al.*, 2006).

Der erste Schritt der sexuellen Entwicklung von *U. maydis* wird durch die Pheromonvermittelte Perzeption eines kompatiblen Kreuzungspartners initiiert (1) (siehe Abb. 2). Dabei kommt es zur Ausbildung schlauchartiger Konjugationshyphen und parallel zur Arretierung des Zellzyklus im G2-Stadium (2) (Garcia-Muse, *et al.*, 2003). Nach der Fusion kompatibler haploider Sporidien wächst das heterodikaryotische Filament (3) durch Spitzenwachstum. Es erfolgt keine Zellteilung, und am basalen Pol der Pilzhyphe werden Septen eingezogen, was zur Abschnürung leerer Kompartimente führt (Banuett and Herskowitz, 1994). Nur in dieser Wuchsform ist *U. maydis*

infektionskompetent. Erst nach der Ausbildung einer speziellen Infektionsstruktur, dem Appressorium (4) (Snetselaar and Mims, 1992; Snetselaar and Mims, 1993), und der daran anschließenden Penetration der Pflanzenoberfläche (5) erfolgt die Aufhebung des G2-Zellzyklusarrestes, wodurch die Proliferation des Heterodikaryons innerhalb der Wirtspflanze ermöglicht wird (Banuett and Herskowitz, 1996). Die Zellkernverteilung während des heterodikaryotischen Wachstums erfolgt unter Verwendung der für die Basidiomyceten spezifischen Schnallenzellen (Banuett and Herskowitz, 1996; Scherer, *et al.*, 2006; Seyfert, 1927; Sleumer, 1931). Das intra- und interzelluläre Wachstum innerhalb der Pflanze findet vornehmlich in nährstoffreichen Geweben der Maispflanze statt. Nach extensiver Proliferation und Verzweigung des Pilzmyzels (6) kommt es zu einer erhöhten Teilungsrates und Hypertrophie pflanzlicher Zellen, was zur Bildung von Tumoren führt, in denen nach der Karyogamie die Differenzierung der diploiden Brandsporen stattfindet (7) (Banuett and Herskowitz, 1996; Snetselaar and Mims, 1993). Diese stellen die Verbreitungs- und Überdauerungsform von *U. maydis* dar und werden durch Wind, Regen, Insekten oder andere Vektoren verbreitet. Unter geeigneten Bedingungen können die Teliosporen auskeimen und nach Abschluss der Meiose werden von dem ausgebildeten Promyzel die haploiden Sporidien abgeschnürt, welche den Lebenszyklus erneut durchlaufen können (Christensen, 1963).

1.3 Kontrolle der pilzlichen Entwicklung durch Paarungstyp-Loci

Die sexuelle Reproduktion in Pilzen wird durch Paarungstyp-Loci gesteuert. In den verschiedenen Modellsystemen existiert eine große Vielfalt unterschiedlicher Konfigurationen der Paarungstyp-Loci. Man unterscheidet zwischen homo- und heterothallischen Spezies, in Basidiomyceten wird bei den heterothallischen Spezies zusätzlich zwischen bi- und tetrapolaren Paarungssystemen unterschieden (Hsueh and Heitman, 2008; Kothe, 1996; Nielsen and Heitman, 2007; Raudaskoski and Kothe).

Bei bipolaren Paarungstyp-Systemen wird zwischen zwei verschiedenen Geschlechtern unterschieden, die über die verschiedenen Allele des Paarungstyp-Locus definiert werden. Typischerweise kodieren dessen Gene für Determinanten der Zellidentität oder Transkriptionsfaktoren, die deren Expression regulieren (Morrow and Fraser, 2009).

In tetrapolaren Systemen existieren zwei Paarungstyp-Loci, die zumeist als *A*- und *B*-Locus bezeichnet werden und typischerweise für ein Pheromon/Pheromonrezeptor-

System und Homeodomänen-Transkriptionsfaktoren kodieren (Morrow and Fraser, 2009). In *Coprinopsis cinerea* und *Schizophyllum commune* existieren die A- und B-Loci in einer großen Anzahl verschiedener Allele, was zu einer Bildung von geschätzten 20000 verschiedenen Kombinationen führt (Brown and Casselton, 2001; Casselton and Kües, 1994). Die genomische Ausdehnung der Paarungstyp-Loci ist selbst in verwandten Arten sehr unterschiedlich und schwankt zwischen wenigen kb (*U. maydis*) und 0,5 mb (*Ustilago hordei*) (Bakkeren *et al.*, 2008). In pathogenen Pilzen wie *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* und *U. maydis* ist die sexuelle Reproduktion mit der Virulenz dieser Pilze assoziiert. Diese Wechselbeziehung ist jedoch nur bei den Brandpilzen, zu denen *U. maydis* gehört, obligat (Hsueh and Heitman, 2008).

1.3.1 Der a-Locus von *U. maydis* kontrolliert die interzelluläre Erkennung

Der biallelische a-Locus kodiert für das Pheromon Mfa (mating factor a) und den Pheromonrezeptor Pra (pheromon receptor a) (siehe Abb. 3). Das a1-Vorläuferpheromon Mfa1 besteht aus 40, das a2-Vorläuferpheromon aus 38 Aminosäuren, welche nach einer posttranslationalen Prozessierung und Modifikation 13 und 9 Aminosäuren umfassen und am C-Terminus farnesyliert und methyliert werden (Spellig, *et al.*, 1994).



Abbildung 3: Schematische Darstellung der a-Loci. *mfa1* und *mfa2* kodieren für die Pheromonvorläufer, *pra1* und *pra2* für die Pheromonrezeptoren. (Abbildung aus Brachmann, 2001).

Die Pheromone werden jeweils von den Pheromonrezeptoren des komplementären a-Locus perzipiert. Über dieses Pheromon/Rezeptorsystem wird die Zell/Zellerkennung und die Zellfusion gesteuert (Bölker *et al.*, 1992). Die Pheromonrezeptoren von *U. maydis* gehören zu den STE3-ähnlichen Pheromonrezeptoren, die typischerweise sieben Transmembrandomänen besitzen und an heterotrimere G-Proteine gekoppelt sind (Bölker *et al.*, 1992). Zusätzlich zu den Pheromon- und Pheromonrezeptorgenen beinhaltet der a2-Locus die Gene *lga2* und *rga2* (siehe Abb. 3) (Mahlert, *et al.*, 2009; Urban, *et al.*, 1996b). Die Funktion von Lga2 und Rga2 liegt in der Regulation mitochondrialer Spaltungs- und Fusionsdynamiken, über die die uniparentale

Vererbung mitochondrieller DNA gesteuert wird (Fedler, *et al.*, 2009; Mahler *et al.*, 2009). Des Weiteren wurden im *a2*-Locus Überreste eines zusätzlichen Pheromogens identifiziert, was auf eine ursprünglich multiallelische Konfiguration des *a2*-Locus hindeutet (Urban *et al.*, 1996b). Die Perzeption des Lipopeptidpheromons durch den Pheromonrezeptor führt zur Ausbildung von Konjugationshyphen, die entlang des Pheromongradienten aufeinander zuwachsen und an ihren Spitzen

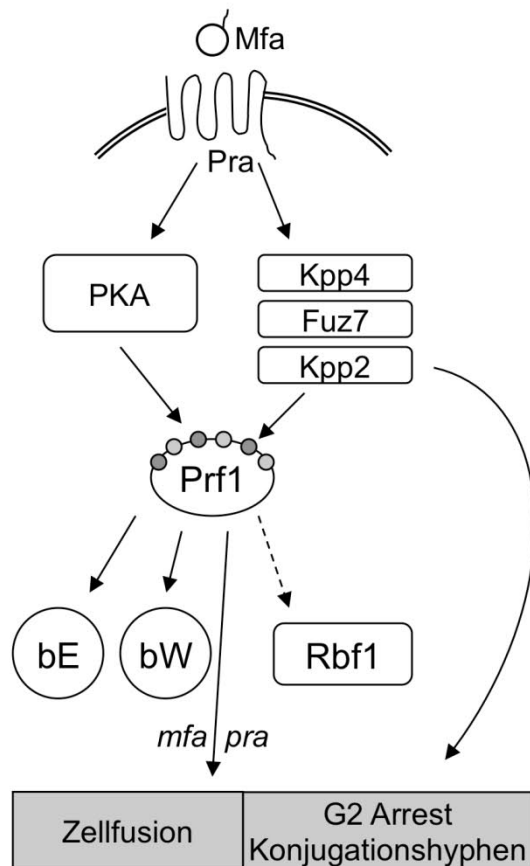


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Pheromonkaskade. Die Bindung des Pheromons Mfa an den Rezeptor löst die durch Phosphotransfer vermittelte Signaltransduktionskaskade aus. Kpp4, Fuz7 und Kpp2 repräsentieren die zentralen Bestandteile der MAPK-Kaskade. Der G2-Zellzyklusarrest und die Ausbildung von Konjugationshyphen werden, unabhängig von Prf1, durch Kpp2 reguliert.

fusionieren (Snetselaar, *et al.*, 1996; Spellig *et al.*, 1994). Gleichzeitig erfolgt die Arretierung des Zellzyklus in der G2-Phase (Garcia-Muse *et al.*, 2003), vermutlich um eine synchrone Entwicklung des Dikaryons zu gewährleisten. Auf molekularer Ebene wird durch die Bindung des Pheromons an den Rezeptor eine Proteinkinase A (PKA) und eine Mitogen-aktivierte Protein-Kinase (MAPK) -vermittelte Signaltransduktionskaskade ausgelöst, die in der differentiellen Phosphorylierung des High Mobility Group (HMG) Transkriptionsfaktors Prf1 (Pheromone response factor 1), dem zentralen Regulator der Pheromonantwort, kulminiert (Kaffarnik, *et al.*, 2003). Eine wechselnde Anzahl an Prf1-Zielgenen wird in Abhängigkeit des Phosphorylierungsstatus reguliert (Kaffarnik *et al.*, 2003; Zarnack, *et al.*, 2008). Zu diesen Zielgenen gehören, neben *prf1* selbst, die *a*-Locus-Gene *mfa* und *pra*, die *b*-Locus-Gene *bE* und *bW*

(Hartmann, *et al.*, 1996; Urban, *et al.*, 1996a) sowie der C2H2-Zinkfinger Transkriptionsfaktor Rbf1 (siehe Abb. 4) (M. Scherer, nicht publiziert; Zarnack *et al.*, 2008). Die verstärkte Expression der *a*-Locus-Gene führt zur Signalamplifikation innerhalb der autokrinen Antwort und vermittelt vermutlich das gerichtete, polare Wachstum der Konjugationshyphen entlang des Pheromongradienten (Hartmann, 1997; Snetselaar *et al.*, 1996). Nach der Fusion haploider Sporidien interagieren

kompatible bE- und bW-Proteine und bilden einen aktiven Transkriptionsfaktor, das b-Heterodimer, welches indirekt die Expression von *mfa* und *pra* reprimiert und die weitere Entwicklung des Heterodikaryons steuert (Urban *et al.*, 1996a). Die Expression von Prf1 ist abhängig von zwei weiteren Transkriptionsfaktoren, Rop1 und Hap2, deren Funktion im Gegensatz zu Prf1 nicht essentiell für die pathogene Entwicklung in haploiden, solopathogenen Stämmen ist (Brefort, *et al.*, 2005; Hartmann *et al.*, 1996; Mendoza-Mendoza, *et al.*, 2009). Durch die konstitutive Expression kompatibler *b*-Allele kann der Pathogenitätsdefekt in $\Delta prf1$ -Stämmen komplementiert werden (Hartmann *et al.*, 1996), was die zentrale Rolle des b-Heterodimers für die Regulation der pathogenen Entwicklung von *U. maydis* unterstreicht.

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

Der multiallelische *b*-Locus von *U. maydis* liegt in mindestens 19 unterschiedlichen verschiedenen Allelen vor (Kämper, *et al.*, 1995; J. Kämper, pers. Mitteilung). Die im *b*-Locus enthaltenen Gene *bEast* (*bE*) und *bWest* (*bW*) sind ca. 200 bp voneinander getrennt und werden von einer gemeinsamen Promotorregion divergent transkribiert. Die Proteine umfassen 473 (*bE*) und 645 (*bW*) Aminosäuren, die trotz geringer Sequenzhomologien einen ähnlichen Aufbau haben (siehe Abb 5A). Beide Proteine besitzen einen hochvariablen circa 120 Aminosäuren umfassenden N-terminalen Bereich, dem sich der hochkonservierte C-terminale Bereich anschließt. Die Selbst/Nichtselbst-Erkennung wird durch die N-terminalen variablen Bereiche gesteuert und vermittelt die Heterodimerisierung von *bE*- und *bW*-Proteinen (Gillissen *et al.*, 1992; Kronstad and Leong, 1990; Schulz *et al.*, 1990), die allerdings nur dann stattfinden kann, wenn diese von verschiedenen Allelen stammen (siehe Abb. 5B) (Kämper *et al.*, 1995). Nach der Komplexbildung ist das b-Heterodimer in der Lage, sequenzspezifisch an DNA zu binden und die Expression von Zielgenen zu induzieren (Brachmann, *et al.*, 2001; Romeis, *et al.*, 2000). Die DNA-Bindung an die *b*-Bindestellen (*bbs*) wird über die Homeodomänen, welche charakteristisch für eine Vielzahl zentraler Regulatoren der eukaryotischen Entwicklung sind, vermittelt (Banerjee-Basu, *et al.*, 1999; Gehring, *et al.*, 1994a; Gehring, *et al.*, 1994b; Liang and Biggin, 1998; Qian, *et al.*, 1994; Schier and Gehring, 1993; Valentine, *et al.*, 1998; Vazquez, *et al.*, 1999). Für die Bildung eines funktionellen Heterodimeres ist sowohl die Homeodomäne von *bE* als auch *bW* essentiell (Romeis, *et al.*, 1997; Schlesinger, *et al.*, 1997). Die Expression des b-Heterodimeres ist notwendig und ausreichend für die pathogene und sexuelle Entwicklung von *U. maydis*. Haploide Stämme, die

kompatible *b*-Gene besitzen, sind solopathogen und können ohne Paarung mit einem kompatiblen Kreuzungspartner den Lebenszyklus vollständig durchlaufen (Bölker *et al.*, 1995; Kämper *et al.*, 2006).

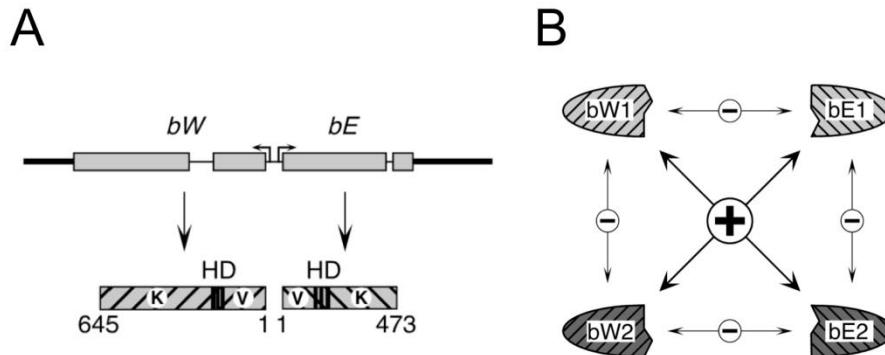


Abbildung 5 Der *b*-Locus in *U. maydis*. (A) Schematische Darstellung der genomischen Struktur des *b*-Locus und der *bW*- und *bE*-Proteine. K entspricht den konstanten, V den variablen Bereichen der Proteine. (B) Allelspezifische Dimerisierung der *b*-Proteine. Die Homeodomänen-Proteine können heterodimerisieren, wenn sie von verschiedenen Allelen stammen (Abbildung aus Brachmann, 2001).

Allerdings sind diese Stämme (CL13) im Vergleich zu isogenen Stämmen, die zusätzlich kompatible Pheromongene exprimieren (SG200), reduziert virulent, was auf vermutlich auf die schwache Expression der *b*-Gene zurückzuführen ist. Aufgrund der direkten Ausprägung von Mutationen in diesen haploiden Stämmen eignen sich diese hervorragend zur Untersuchung pathogenitätsrelevanter Entwicklungsprozesse. Die translationelle Fusion von *bE* und *bW* führt, unabhängig von der allelischen Kombination, zur Solopathogenität haploider Stämme (Romeis *et al.*, 1997). Die variable Domäne beider Proteine ist für die Funktion des Fusionsproteins nicht essentiell.

1.4 Die *b*-vermittelte Genregulationskaskade

Die Expression des *b*-Heterodimeres induziert den Wechsel vom saprophytischen Knospungswachstum zum filamentösen Wachstum (Brachmann *et al.*, 2001). Die Filamentbildung geht mit der Arretierung des Zellzyklus in der G2-Phase einher (Heimel, *et al.*, 2010; Mielnichuk, *et al.*, 2009; Scherer *et al.*, 2006). Ein ausgeprägtes Spitzenwachstum der Filamente und das Abschnüren leerer septierter Bereiche sind charakteristisch für das *b*-vermittelte filamentöse Wachstum. Diese Filamentstruktur spiegelt die infektiöse Form von *U. maydis* auf der Blattoberfläche wieder. Vor der Etablierung der Microarray-Technologie wurden in verschiedenen Studien insgesamt

22 *b*-regulierte Gene identifiziert (Brachmann *et al.*, 2001; Flor-Parra, *et al.*, 2007; Flor-Parra, *et al.*, 2006; Romeis *et al.*, 2000). Mit Ausnahme der MAP-Kinase Kpp6, die für eine effiziente Penetration der Pflanzenoberfläche notwendig ist (Brachmann, *et al.*,

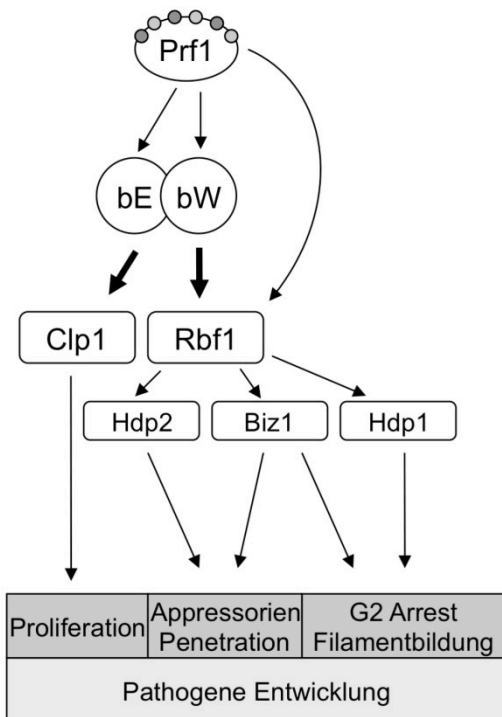


Abbildung 6: Die *b*-abhängige Genregulation. Schematische Darstellung der regulatorischen Schlüsselkomponenten innerhalb der *b*-vermittelten Regulationskaskade.

2003), und des C2H2-Zinkfinger Transkriptionsfaktors Biz1 (siehe nächste Seite) ist allerdings keines der identifizierten Gene essentiell für die pathogene Entwicklung von *U. maydis*. Die Anwendung der Microarray-Technologie erlaubte die genomweite Untersuchung der *b*-vermittelten Genregulation und führte zur Identifizierung von insgesamt 345 *b*-regulierten Genen. Mit *rbf1* (Regulator of *b*-filament 1), welches direkt durch das *b*-Heterodimer reguliert wird und für einen C2H2-Zinkfinger Transkriptionsfaktor kodiert, konnte der zentrale Regulator innerhalb dieser Kaskade ermittelt werden (siehe Abb. 6). *Rbf1* ist notwendig und ausreichend für das *b*-vermittelte, filamentöse Wachstum und den *b*-induzierten G2-Zellzyklusarrest. *rbf1*-

Deletionsstämme bilden keine Appressorien und sind apathogen. Die Expression von mehr als 90% der *b*-regulierten Gene ist abhängig von *Rbf1*. Unter den *rbf1*-abhängig regulierten Genen befindet sich das für einen C2H2-Zinkfinger Transkriptionsfaktor kodierende *biz1* (*b-induced zinc finger 1*) -Gen und die für Homeodomänen-Transkriptionsfaktoren kodierenden *hdp1*- (*homeodomain protein 1*) und *hdp2*- (*homeodomain protein 2*) Gene (siehe Abb. 6) (Heimel *et al.*, 2010). *biz1*-Deletionsstämme sind apathogen und weisen im Vergleich zum Wildtypstamm SG200 eine stark verringerte Appressorienbildung auf. Die induzierte Expression von *biz1* führt zur Repression von *clb1*, einem mitotischen Zyklin, und induziert filamentöses Wachstum und einen Zellzyklusarrest im G2-Stadium (Flor-Parra *et al.*, 2006). Die induzierte Expression von *hdp1* führt ebenfalls zur Repression von *clb1* und filamentösem Wachstum. Gleichzeitig wird die Expression des PHO85-ähnlichen Zyklins Pcl12 induziert (Pothiratana, 2008). Die Deletion von *hpd1* oder *pcl12* führt zu reduziertem filamentösem Wachstum, jedoch nicht zu einem Verlust der Pathogenität (Flor-Parra *et al.*, 2007; Pothiratana, 2008). *Hpd2* ist essentiell für die pathogene

Entwicklung von *U. maydis*, da die Deletion von *hdp2* zum vollständigen Verlust der Appressorienbildung führt (siehe Abb. 6) (M. Scherer, pers. Mitteilung).

1.5 Clp1 und die Schnallenbildung in *U. maydis*

clp1 (clampless) wurde in einer genomweiten Expressionsanalyse als ein früh *b*-induziertes Gen identifiziert. Durch *in silico*-Analyse der Promotorsequenz konnten zwei putative *b*-Bindestellen (*bbs*) identifiziert werden (Scherer *et al.*, 2006). Die Bindung des *b*-Heterodimeres an die vorhergesagten Bindestellen konnte durch Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP) bestätigt werden (Schuler, 2010). Die Expression des *clp1*-Gens ist sowohl in frühen, als auch in späten Stadien der pathogenen Entwicklung detektierbar. Clp1-ähnliche Proteine konnten in allen bislang sequenzierten Basidiomyzeten-Genomen identifiziert werden.

Das Clp1 Protein aus *U. maydis* besitzt eine 40%ige Ähnlichkeit zu Clp1 aus *Coprinopsis cinerea*. In diesem Basidiomyzeten ist Clp1 notwendig und ausreichend für die Schnallenbildung (Inada, *et al.*, 2001). Der komplexe Ablauf dieses Entwicklungsprozesses erfordert eine ausgeklügelte Regulation und Koordination von polarem Wachstum, Kernwanderung, Zellzyklus und Septierung (siehe Abb.7) und wird durch die Paarungstyp-Loci gesteuert (Kamada, 2002; Kües, 2000). Die Zellfusion und der gegenseitige Austausch der Zellkerne stehen unter der Kontrolle des durch den *B*-Locus kodierten Pheromon-Rezeptorsystems (ähnlich zum *a*-Locus von *U. maydis*). Nach der Etablierung des Heterodikaryons sind die Kernwanderung, die synchrone Teilung beider Kerne und die Septierung abhängig von kompatiblen *A*-Genen, die analog zu den *b*-Genen von *U. maydis* für Homeodomänen-Transkriptionsfaktoren kodieren.

Während der Schnallenbildung erfolgt die mitotische Teilung der Zellkerne in einer koordinierten Art und Weise. Einer der beiden Zellkerne teilt sich parallel zur Wuchsrichtung der Hyphe, wohingegen sich der andere Zellkern in einem rückwärts gerichteten Primordium (der initialen Schnallenzelle) teilt. Durch die parallel ablaufende Septierung wird ein apikal gelegenes heterodikaryotisches Kompartiment gebildet. In der Schnallenzelle und dem subapikalen Kompartiment befindet sich jeweils ein Zellkern. Durch die Pheromon-vermittelte Verschmelzung der Schnallenzelle mit dem subapikalen Kompartiment erfolgt die Rekonstitution des heterodikaryotischen Zustandes (siehe Abb. 7).

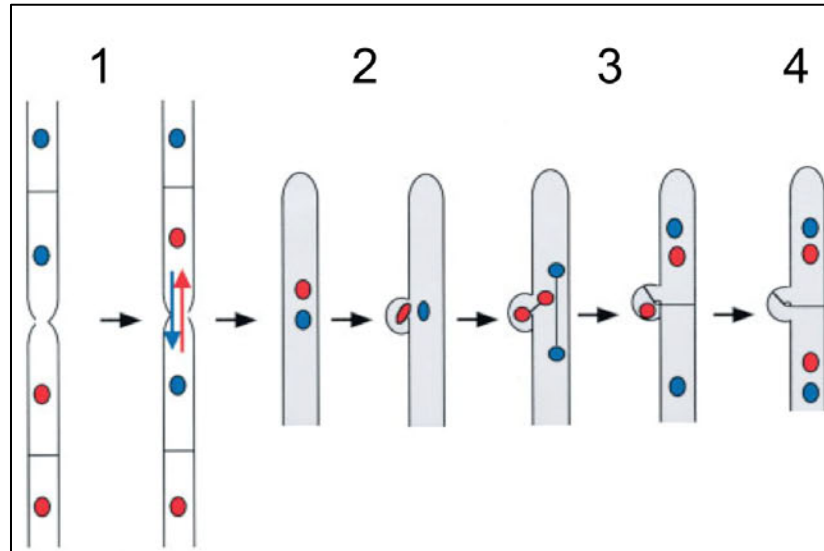


Abbildung 7: Schematische Darstellung der Schnallenbildung in *C. cinerea*. (1) Fusion der Hyphen und reziproker Austausch der Zellkerne, (2) Paarung der Zellkerne und Bildung der Schnallenzelle, (3) synchrone Teilung der Zellkerne und Septierung, (4) Fusion der Schnallenzelle mit dem subapikalen Kompartiment. (Abbildung modifiziert nach Kamada, 2002).

Die Schnallenbildung in *U. maydis* findet während der biotrophen Entwicklung statt und erfolgt analog zu der in *C. cinerea* beschriebenen Art und Weise, allerdings ist die Fusion der Schnallenzelle lichtmikroskopisch nicht detektierbar. Im Unterschied zu *C. cinerea*, bei dem für diesen Prozess die Aktivität beider Paarungstyp-Loci notwendig ist, kann die Schnallenbildung in *U. maydis* auch in dem haploiden, solopathogenen Stamm CL13 (*a1 bE1/bW2*) beobachtet werden und ist somit unabhängig von einem aktiven *a*-Locus (Scherer *et al.*, 2006). Ob sich die Bildung der Schnallenzellen in *U. maydis* mechanistisch von der der höheren Basidiomyceten unterscheidet, ist bislang ungeklärt.

Die Deletion von *clp1* in *U. maydis* führt zum Verlust der Pathogenität. Während das Wachstum unter axenischen Bedingungen, das Kreuzungsverhalten sowie das filamentöse Wachstum und die Appressorienbildung durch die Deletion von *clp1* nicht beeinträchtigt werden, erfolgt nach der Penetration der Pflanzenoberfläche keine Schnallenbildung und keine weitere Proliferation der Hyphen. Die Clp1-Expression unterliegt einer posttranskriptionellen Regulation. Auf transkriptioneller Ebene kann die Expression von *clp1* bereits zwei Stunden nach der induzierten Expression des *b*-Heterodimeres beobachtet werden. Die Expression eines Clp1-3eGFP Fusionsproteins ist während der pathogenen Entwicklung jedoch auf Hyphen beschränkt, die die Pflanzenoberfläche erfolgreich penetriert haben (Scherer *et al.*, 2006). Da die Expression eines aktiven *b*-Heterodimeres zu einem G2-Zellzyklusarrest führt, ein funktionelles *b*-Heterodimer jedoch Voraussetzung für die biotrophe Entwicklung ist

(Wahl, *et al.*, 2010), liegt der Schluss nahe, dass die Funktion des b-Heterodimeres modifiziert wird, um eine Proliferation des Heterodikaryons *in planta* zu ermöglichen. Der Zeitpunkt der Clp1-Proteinexpression überlappt mit der Re-Initiation des Zellzyklus, weshalb über eine mögliche Funktion von Clp1 für diesen Prozess spekuliert wurde (Scherer *et al.*, 2006). In *C. neoformans* ist Clp1 notwendig für die Bildung des dikaryotischen Filaments nach der Zellfusion. Ähnlich zur Situation in *U. maydis* ist zu diesem Zeitpunkt der Zellzyklus arretiert und *clp1*-Deletionsmutanten sind nicht in der Lage zu proliferieren (Ekena, *et al.*, 2008).

In einer Hefe-Zwei-Hybrid Untersuchung wurden bW, Rbf1, die zentralen Regulatoren der pathogenen Entwicklung von *U. maydis*, und der bZip-Transkriptionsfaktor Cib1 (Clp1 interacting bZIP) als Clp1-interagierende Transkriptionsfaktoren identifiziert (Heimel, 2005). Basierend auf diesen Interaktionsstudien konnte gezeigt werden, dass die induzierte Co-Expression von Clp1 und einem aktiven b-Heterodimer zu dem Verlust der *b*-abhängigen Filamentbildung und des *b*-induzierten G2 Zellzyklusarrestes führt. Die Expression *b*-abhängig regulierter Gene wird durch die Co-Expression von Clp1 unterdrückt (Scherer *et al.*, 2006). Die Deletion von *cib1* hat keinen Einfluss auf das Wachstum unter axenischen Bedingungen, das filamentöse Wachstum und die Appressorienbildung. Ähnlich wie im Fall von *clp1*-Deletionsstämmen kann keine Proliferation der Hyphen *in planta* und keine Schnallenbildung beobachtet werden. Während der Proteininteraktion von Clp1 und bW eine mögliche Funktion zugeordnet werden kann, ist unklar, welche Funktion die Interaktionen von Clp1 mit Rbf1 und Cib1 haben. Die molekulare Analyse der den Clp1 Protein-Protein-Interaktionen und den der Schnallenbildung in *U. maydis* zu Grunde liegenden molekularen Mechanismen sollte weitere Einblicke in die Regulation von sexueller und pathogener Entwicklung ermöglichen.

1.6 Zielsetzung der Arbeit

Die pathogene Entwicklung von *U. maydis* wird durch ein regulatorisches Netzwerk unter der Kontrolle des b-Heterodimeres gesteuert. Eine zentrale Rolle innerhalb dieses Netzwerkes erfüllt Rbf1, ein C2H2-Zinkfinger Transkriptionsfaktor der notwendig und ausreichend für die *b*-abhängige Filamentbildung und den G2-Zellzyklusarrest ist. Dieser Wechsel der Wuchsform ist Voraussetzung für die Initiation der pathogenen Entwicklung. Clp1 interagiert mit dem bW-Protein und Rbf1 und ist notwendig für das Wachstum innerhalb der Pflanze. Im Gegensatz zur detailliert beschriebenen

Regulation der initialen Phase der pathogenen Entwicklung ist über die Regulation der biotrophen Entwicklung von *U. maydis* wenig bekannt. Ziel dieser Arbeit ist es, die Auswirkungen der Clp1-Protein-Interaktionen auf die Funktion von bW und Rbf1 als Transkriptionsfaktor aufzuklären und deren Rolle in der Regulation des Zellzyklus und des biotrophen Wachstums von *U. maydis* zu untersuchen. Darüber hinaus sollte durch die Charakterisierung des Cib1-Proteins Hinweise auf mögliche Funktionen erlangt und Regulationsmechanismen der pathogenen Entwicklung identifiziert werden.

2 Ergebnisse

Der sexuelle Entwicklungszyklus vieler Basidiomyceten beinhaltet eine ausgedehnte dikaryotische Phase. Die korrekte Verteilung der genetisch verschiedenen Kerne während des Wachstums des dikaryotischen Filaments wird durch die Bildung sogenannter Schnallenzellen gewährleistet. Die Schnallenbildung erfordert eine präzise zeitliche und räumliche Regulation von Kernwanderung, Kernteilung, polarem Wachstum und Septierung der Hyphen. Die Koordination dieser Prozesse unterliegt der Kontrolle der Paarungstyp-Loci. In *Coprinopsis cinerea* und *Ustilago maydis* konnte gezeigt werden, dass Clp1 notwendig für die Schnallenbildung ist (Inada *et al.*, 2001; Scherer *et al.*, 2006). Im Gegensatz zu *U. maydis* ist die Expression von Clp1 in *C. cinerea* auch ausreichend für die Induktion dieses Prozesses. Neben Clp1 wurden in einem Kandidatengen-Ansatz Num1 und Fkh1 als weitere potentielle Regulatoren der Schnallenbildung identifiziert und eine mögliche Funktion beider Proteine für diesen Entwicklungsprozess untersucht.

2.1 Das Num1 Protein in *U. maydis*

In *C. cinerea* wurde in Mutagenesestudien das Num1-Protein identifiziert, das für die Kernwanderung nach Fusion kompatibler haploider Stämme und bei der Etablierung des Heterodikaryons (Paarung) notwendig ist (Makino and Kamada, 2004). Das *U. maydis* Gen *um01682* kodiert für ein potentielles Protein, das 41% Identität und 63% Ähnlichkeit (E:4,7e⁻⁴², MUMDB, (<http://mips.helmholtz-muenchen.de/genre/proj/ustilago/>) zu Num1 aus *C. cinerea* aufweist. Um01682 wird im weiteren Verlauf dieser Arbeit als Num1 bezeichnet. Das vorhergesagte offene Leseraster des *num1*-Gens enthält kein Intron und kodiert für ein Protein von 278 Aminosäuren (AS), welches die in vielen Eukaryoten konservierte BCAS2 (Breast-Cancer-Amplified-Sequence 2) Domäne enthält (AS 64 bis 278, E: 1e⁻¹¹⁶, PFAM), welche in humanen Zellen eine negative Regulation des Tumorsuppressors p53 vermittelt (Kuo, *et al.*, 2009).

2.1.1 Num1 ist essentiell für die pathogene Entwicklung von *U. maydis*

Für Num1 wurde eine mögliche Funktion in der Schnallenbildung in *U. maydis* vermutet. Zur Überprüfung dieser Annahme wurde *num1* in dem solopathogenen Stamm SG200 (*a1 mfa2 bE1/bW2*) (Kämper *et al.*, 2006) und in den kompatiblen Wildtypstämmen FB1 (*a1 b1*) und FB2 (*a2 b2*) (Banuett and Herskowitz, 1989) deletiert. $\Delta num1$ -Stämme zeigten im Vergleich zu den beschriebenen Ausgangsstämmen keine erkennbaren Unterschiede im Wachstum oder Zellmorphologie unter axenischen Bedingungen. Im Kreuzungsverhalten kompatibler $\Delta num1$ -Stämme und in der Filamentbildung auf aktivkohlehaltigem Festmedium konnte ebenfalls kein Unterschied zu den als Kontrolle verwendeten SG200, FB1 und FB2 Wildtypstämmen festgestellt werden (nicht gezeigt). In Infektionsstudien mit SG200 $\Delta num1$ und SG200 als entsprechender Kontrolle zeigten Pflanzen, die mit SG200 $\Delta num1$ infiziert wurden, außer der Bildung von Chlorosen keine weiteren sichtbaren Symptome einer Infektion (siehe Tabelle 1).

Tabelle 1: Pathogenität des *num1*-Deletionsstammes

Stamm	Infizierte Pflanzen	Chlorosebildung	Tumorbildung
SG200 $\Delta num1$	106	30 (28%)	0 (0%)
SG200	112	104 (93%)	100 (89%)

2.1.2 Num1 ist für die Schnallenbildung in *U. maydis* nicht notwendig

Durch die mikroskopische Untersuchung Chlorazole-Black-E gefärbter Hyphen wurde untersucht, in welchem Entwicklungsstadium die $\Delta num1$ -Mutante während der pathogenen Entwicklung gestört ist. Die mikroskopische Analyse des Blattmaterials, welches drei bis fünf Tage nach Inokulation entnommen wurde, zeigte, dass der Stamm SG200 $\Delta num1$ in der Lage ist Schnallenzellen zu bilden (siehe Abb. 8). Der Verlust der Pathogenität in $\Delta num1$ -Stämmen ist damit nicht auf die Abwesenheit von Schnallenzellen zurückzuführen, könnte jedoch mit einer fehlerhaften Kernverteilung während des Wachstums innerhalb der Pflanze verknüpft sein.

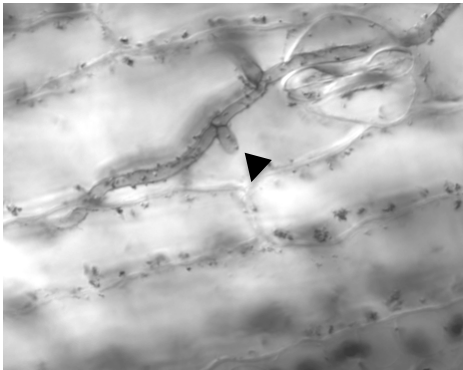


Abbildung 8: Untersuchung des Wachstumsverhaltens von *num1*-Deletionsstämmen innerhalb der Pflanze. Das Blattmaterial wurde fünf Tage nach der Inokulation entnommen, mit Chlorazole-Black-E gefärbt und anschließend mikroskopisch untersucht. Die Deletion von *num1* hat keine Auswirkung auf die Schnallenbildung. Pfeile markieren die Schnallenzellen der proliferierenden Hyphe.

Zur Überprüfung dieser Annahme wurde der Stamm UKH94 (*a1mfa2 bE1/bW2 Δnum1 P_{mig2_5}:NLS:eGFP P_{otef}:RFP₂*) verwendet. In diesem Stamm können die Zellkerne während der pathogenen Entwicklung durch Expression eines NLS-eGFP-Fusionsproteins unter der Kontrolle des *in planta* induzierten *mig2_5* Promotors visualisiert werden (Scherer *et al.*, 2006). Die Expression eines zytoplasmatisch lokalisierten RFPs unter der Kontrolle des konstitutiv aktiven *otef*-Promotors erlaubte die Visualisierung der Hyphen. Bei der fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung des Wachstums innerhalb der Pflanze wurden drei Tage nach der Inokulation mit UKH94 RFP-markierte Hyphenkompartimente ohne Zellkerne beobachtet. Mit zunehmender Infektionsdauer wurde dieser Phänotyp vermehrt beobachtet. Fünf Tage nach Inokulation wurde zusätzlich in einer Vielzahl von Hyphen eine starke Vakuolisierung beobachtet (siehe Abb. 9).

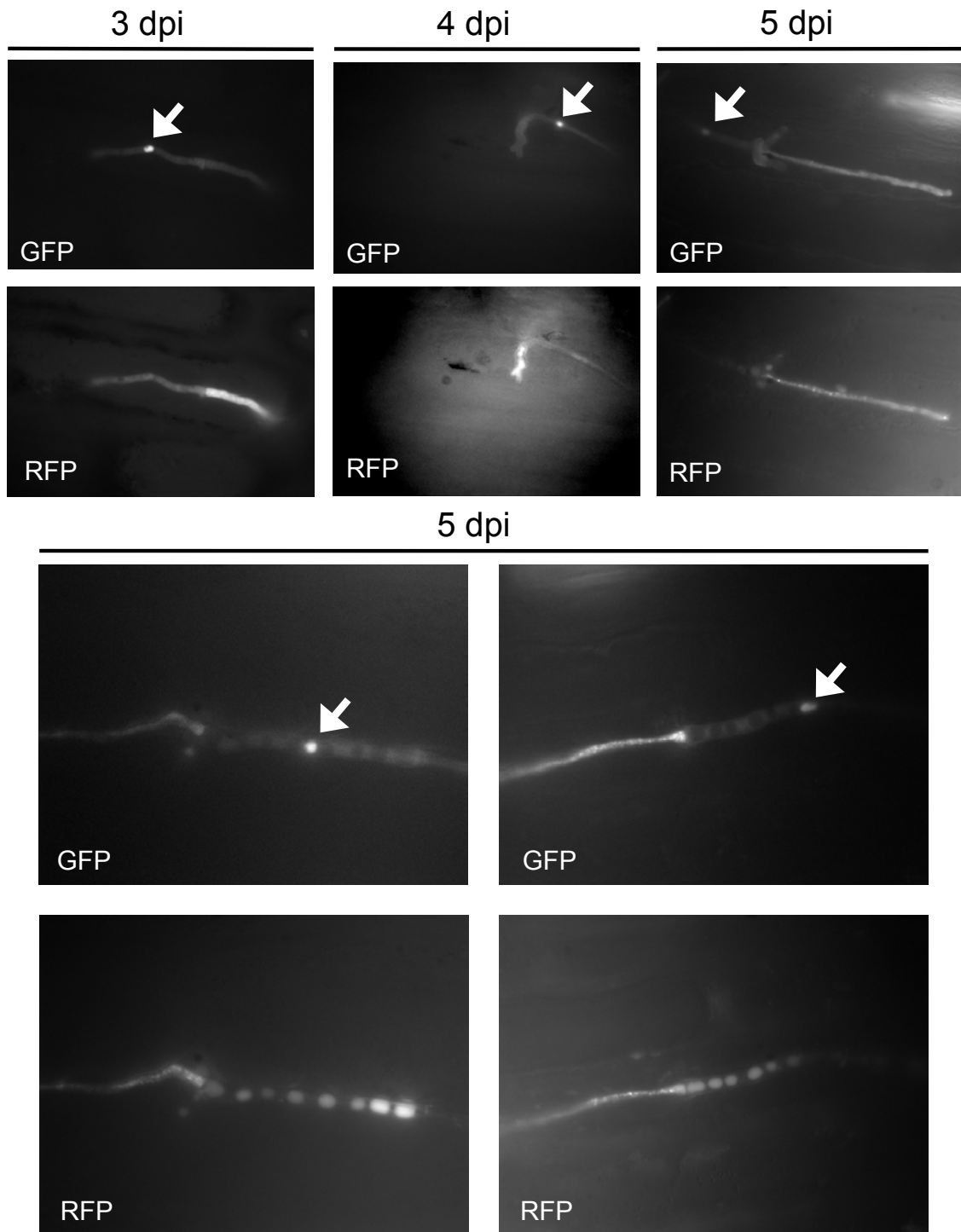


Abbildung 9: Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung von UKH94 während der pathogenen Entwicklung von *U. maydis*. Drei bis fünf Tage nach Inokulation wurden Blattproben infizierter Bereiche entnommen und fluoreszenzmikroskopisch untersucht. *num1*-Deletionsstämme zeigten bereits nach drei Tagen delokalisierte Kerne. Fünf Tage nach der Inokulation wurde neben delokalisierten Zellkernen eine starke Vakuolisierung der Hyphen beobachtet. Pfeile markieren die durch GFP markierten Zellkerne.

2.2 Das Fkh1¹-Protein aus *U. maydis*

Forkhead-Proteine stellen eine eigene Klasse von Transkriptionsfaktoren dar, die in vielen eukaryotischen Organismen wichtige Entwicklungsprozesse regulieren (Carlsson and Mahlapuu, 2002).

In *U. maydis* wurde in vergleichenden Transkriptomanalysen (M. Vranes, pers. Mitteilung) das Gen *um01523 (fkh1)* identifiziert, welches ausschließlich während des biotrophen Wachstums innerhalb der Pflanze exprimiert wird (siehe Abb. 10) und für ein putatives Protein mit Ähnlichkeit zu Forkhead-Proteinen kodiert. Der vorhergesagte offene Leserahmen umfasst 1410 bp und enthält ein Intron von 89 bp, welches durch eine 5'- und 3' RACE (**R**apid **A**mplification of **c**DNA **E**nds) -Analyse bestätigt werden konnte. Der 5'-untranslatierte Bereich (UTR) umfasst 74 bp, während der 3'-UTR 373 bp umfasst. Das aus der cDNA abgeleitete Protein besteht aus 439 Aminosäuren und enthält eine putative Forkhead Domäne (AS 64 bis 231, E: $9,5 \cdot 10^{-16}$, PFAM).

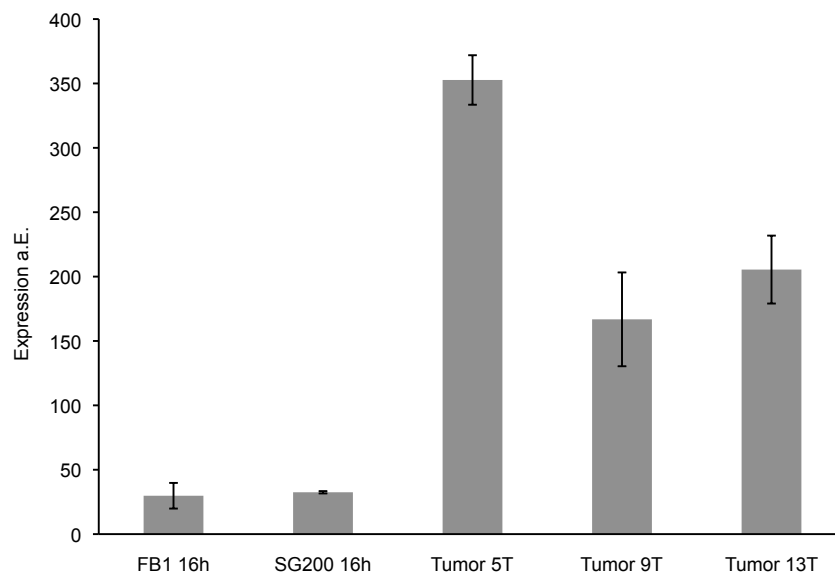


Abbildung 10: Genexpressionsanalyse von *fkh1* während der pathogenen Entwicklung von *U. maydis*. Gezeigt sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus zwei biologischen Replikaten in arbiträren Einheiten (a.E.) basierend auf Microarraydaten. Während des filamentösen Wachstums der Stämme auf der Blattoberfläche (FB1 16h und SG200 16h) kann nur eine schwache Expression von *fkh1* detektiert werden. Im Gegensatz dazu ist die *fkh1*-Expression fünf Tage nach Infektion deutlich induziert und kann bis in die späte Phase der pathogenen Entwicklung verfolgt werden (Expressionsanalyse basierend auf Daten von M. Vranes, nicht publiziert).

¹ In an diese Studie anschließenden Untersuchungen wurde der Name Fkh1 entsprechend der geltenden Nomenklatur in Fox1 (Forkhead-Box 1) geändert.

2.2.1 Fkh1 ist notwendig für die Pathogenität und Sporenbildung von *U. maydis*

Um die biologische Funktion näher zu untersuchen, wurde *fkh1* in den Stämmen SG200, FB1 und FB2 deletiert. *fkh1*-Deletionsstämme zeigten unter axenischen Bedingungen keine erkennbaren Unterschiede zu den Kontrollstämmen SG200, FB1 und FB2 bezüglich Wachstumsverhalten, Morphologie sowie Filamentbildung und Kreuzungsverhalten auf aktivkohlehaltigem Festmedium (nicht gezeigt). Im Gegensatz dazu zeigten $\Delta fkh1$ -Stämme in Infektionsexperimenten eine deutlich verringerte Pathogenität (siehe Abb. 11A). Die Anzahl und Ausprägung der durch $\Delta fkh1$ -Stämme induzierten Tumore war im Vergleich zu den durch die Kontrollstämme induzierten Tumoren drastisch reduziert. Zusätzlich wurde in Pflanzen, die mit $\Delta fkh1$ -Stämmen infiziert wurden, eine verstärkte Anthozyanbildung beobachtet. 67% (N=74) der mit SG200 $\Delta fkh1$ und 79% (N=82) der mit einer Mischung von FB1 $\Delta fkh1$ und FB2 $\Delta fkh1$ infizierten Pflanzen zeigten deutliche Anthozyanbildung, während Infektionen mit SG200 nur bei 40% (N=25) und mit einer Kreuzung von FB1 und FB2 lediglich bei 34% (N=32) der infizierten Pflanzen zu einer Anthozyanbildung führten. In Pflanzen, die mit einer Kreuzung aus FB1 und FB2 infiziert wurden, konnte bereits 14 Tage nach der Inokulation eine ausgeprägte Sporenbildung beobachtet werden. In Pflanzen die mit $\Delta fkh1$ -Stämmen infiziert wurden, konnte selbst 28 Tage nach Inokulation keine Bildung von Sporen beobachtet werden (siehe Abb. 11B). Die Infektionsstudien wurden mit jeweils drei unabhängigen *fkh1*-Deletionsstämmen wiederholt (N>80).

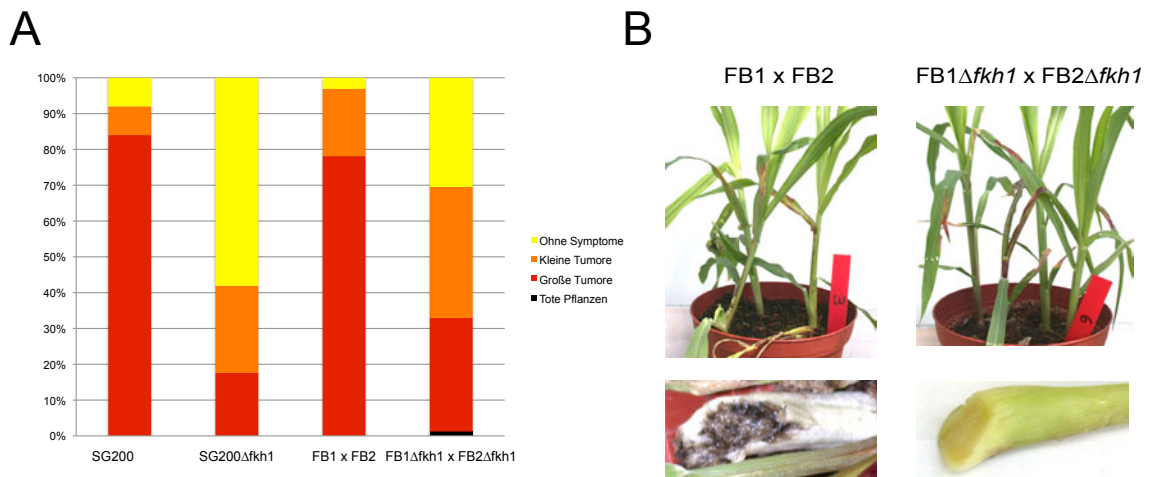


Abbildung 11: Pathogenität von $\Delta fkh1$ -Stämmen. (A) Die Bonitur der infizierten Pflanzen wurde sieben Tage nach der Inokulation durchgeführt. Die Deletion von *fkh1* führte zu verminderter Pathogenität. (B) In Pflanzen die mit *fkh1*-Deletionsstämmen infiziert wurden, konnte keine Sporenbildung, jedoch eine verstärkte Bildung von Anthozyan beobachtet werden. Die Sporenbildung wurde 14 bis 28 Tage nach der Inokulation untersucht.

2.2.3 Fkh1 ist für die Schnallenbildung in *U. maydis* nicht notwendig

Die morphologische Untersuchung der pathogenen Entwicklung von $\Delta fkh1$ -Mutanten erfolgte durch Färbung infizierter Pflanzenteile mit Chlorazole-Black-E (siehe Abb. 12). Im Vergleich zur Wildtypkontrolle wurde bei $\Delta fkh1$ -Hyphen vier Tage nach Inokulation kein Unterschied bezüglich Morphologie, Proliferation oder Schnallenbildung

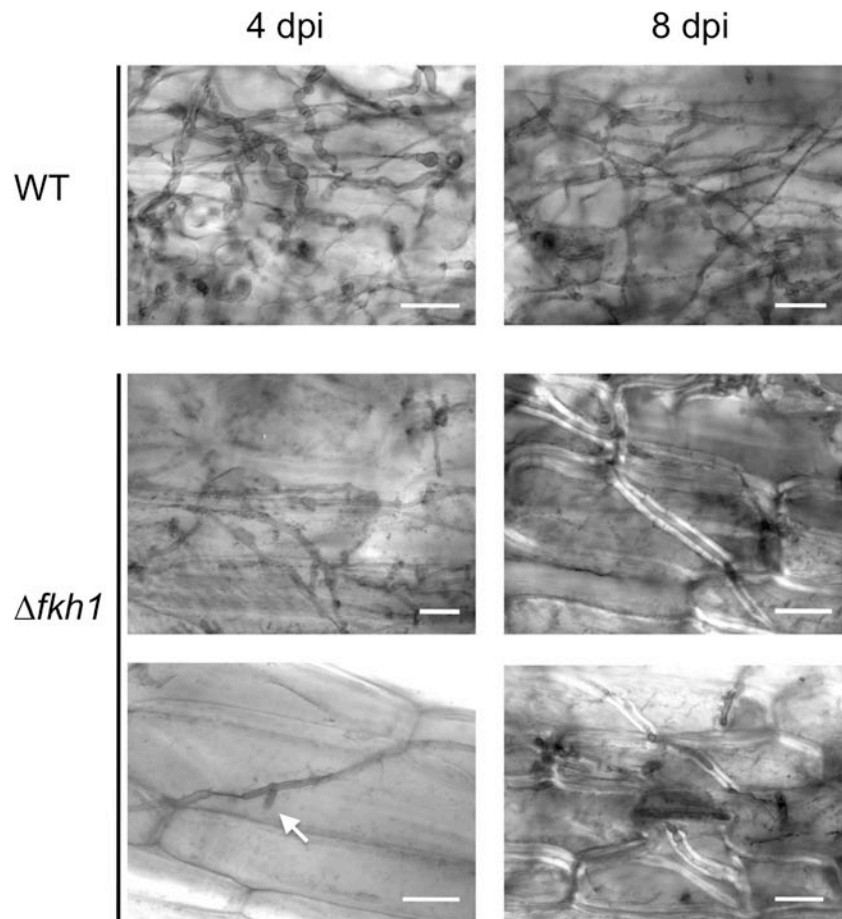


Abbildung 12: Auswirkung der *fkh1* Deletion auf das Wachstum innerhalb der Pflanze. Chlorazole-Black-E-Färbung von infiziertem Blattmaterial. Vier Tage nach der Inokulation ist kein Unterschied zwischen Kreuzungen von Wildtyp- (WT) und *fkh1*-Deletionsstämmen erkennbar. Der *fkh1* Deletionsstamm ist in der Lage Schnallenzellen zu bilden (Pfeil). Acht Tage nach Inokulation sind die Pilzhypen der $\Delta fkh1$ -Kreuzung im Gegensatz zur Wildtypkreuzung von einer filmartigen Matrix umhüllt. Der Größenstandard entspricht 50 μm .

festgestellt. Acht Tage nach der Inokulation waren die Pilzhypen von einer „filmartigen“, lichtbrechenden Substanz umhüllt und die Dicke der Pflanzenzellwände in infizierten Bereichen schien erhöht (siehe Abb. 12), was auf eine verstärkte Pflanzenabwehrreaktion hindeutet. Des Weiteren wurde eine Versteifung infizierter Pflanzenteile beobachtet. Makroskopisch wurde die verstärkte Pflanzenabwehrreaktion durch eine gesteigerte Anthozyanbildung (generelle Antwort auf biotischen und abiotischen Stress) (Duke, *et al.*, 1976; Kohler, *et al.*, 1995; Stapleton and Walbot,

1994; Taylor and Briggs, 1990) (siehe auch Abb. 10B) evident. Somit ist Fkh1, ähnlich wie Num1, essentiell für die pathogene Entwicklung, jedoch nicht für die Schnallenbildung von *U. maydis*.

2.3 Untersuchung von Clp1-Protein-Interaktionen *in vitro* und *in vivo*

In vorangegangenen Studien sind mit Hilfe des Hefe-Zwei-Hybrid Systems vier putative Transkriptionsfaktoren als mögliche Interaktionspartner von Clp1 identifiziert worden. Neben dem bW-Protein und Rbf1 wurden der bZip-Transkriptionsfaktor Cib1 (Clp1 interacting bZip 1) und Um02644, ein Protein mit Ähnlichkeit zum Wc2-Protein (White collar 2) aus *Neurospora crassa*, als mögliche Interaktionspartner identifiziert. Für Cib1 konnte eine essentielle Rolle für die pathogene Entwicklung von *U. maydis* gezeigt werden (Heimel, 2005). Die Deletion von *cib1* führt zu einem Phänotyp, der bereits bei der Deletion von *clp1* beobachtet werden konnte. *cib1* Deletionsstämme sind während des Wachstums unter axenischen Bedingungen nicht vom Wildtypstamm zu unterscheiden und in der Lage filamentös zu wachsen und Appressorien zu bilden. Die Proliferation der Pilzhyphen innerhalb der Pflanze und auch die Bildung von Schnallenzellen ist jedoch blockiert (Heimel, 2005). Diese Beobachtung legt eine funktionelle Beziehung von Clp1 und Cib1 nahe. Die Deletion des mit Clp1 interagierenden Transkriptionsfaktors Um02644 (mit Ähnlichkeit zu White collar 2) zeigte im Vergleich zu den als Kontrolle verwendeten SG200, FB1 und FB2 Wildtyp-Stämmen keine Unterschiede bezüglich des Wachstums und Kreuzungsverhaltens auf aktivkohlehaltigem Festmedium oder der Pathogenität in Pflanzeninfektionen (nicht gezeigt). Aus diesem Grund wurde Um02644 von der weiteren Charakterisierung ausgeschlossen.

2.3.1 Clp1 interagiert mit bW, Rbf1 und Cib1 *in vitro*

Die weitere Untersuchung der Clp1-Protein-Interaktionen erfolgte *in vitro* durch Co-Immunopräzipitationstudien von Clp1_{MYC} mit bW_{HA}, Rbf1_{HA} und Cib1_{HA}. Zu diesem Zweck wurden für die *in vitro* Expression von bW und Rbf1 die in der Hefe-Zwei-Hybrid Untersuchung isolierten Plasmide verwendet. Diese kodieren jeweils für die C-terminalen Bereiche der Proteine (bW: AS 309 bis 645, Rbf1: AS 109 bis 404). Clp1

und Cib1 wurden als Volllängenproteine exprimiert. Die Markierung der Proteine erfolgte durch biotinylierte Lysyl-tRNAs, über die während der Translation biotinyliertes Lysin in die Proteine inkorporiert und im Anschluss über Streptavidin-gekoppelte alkalische Phosphatase kolorimetrisch nachgewiesen wurde. Nach der Verifizierung der Proteinexpression wurden die *in vitro* exprimierten Proteine für die Co-Immunopräzipitation verwendet.

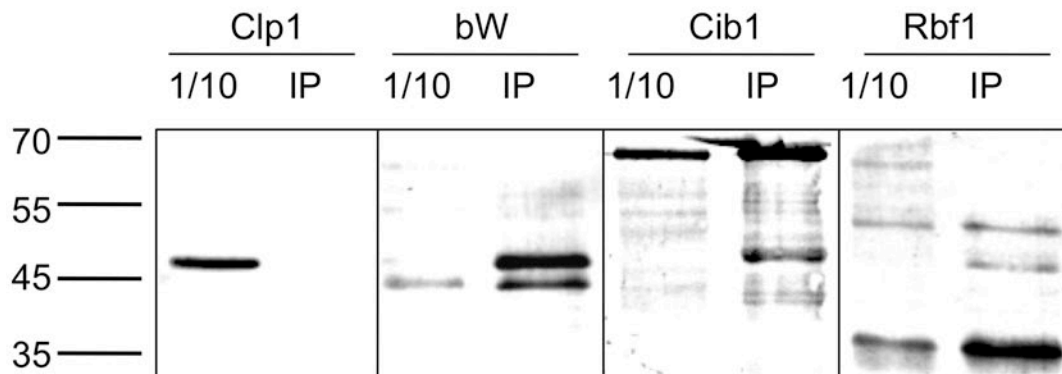


Abbildung 13: Co-Immunopräzipitation von Clp1 mit bW, Cib1 und Rbf1. Die Immunopräzipitation erfolgte mittels anti-HA gekoppelter Agarose (Sigma). Clp1 zeigt keine unspezifische Bindung an den anti-HA Antikörper oder die Agarose und kann mit bW, Cib1 und Rbf1 co-immunopräzipitiert werden. Proteinmassen: Clp1_{Myc} ~48 kDa (21 Lysine), bW_{HA} ~40 kDa (7 Lysine), Cib1_{HA} ~61 kDa (22 Lysine), Rbf1_{HA} ~35 kDa (4 Lysine). Unterschiedliche Intensitäten der Banden verschiedener Proteine sind abhängig von der Markierungs- und (Anzahl der Lysinreste im Protein) Translationseffizienz. Die linke Spur (1/10) zeigt jeweils 1/10 der für die Co-Immunopräzipitation eingesetzten Menge an Protein, die rechte Spur (IP) zeigt jeweils die Immunopräzipitation mit anti-HA-gekoppelter Agarose (Sigma).

In der Negativkontrolle (Clp1 IP) wurde keine unspezifische Bindung von Clp1 an die anti-HA-gekoppelte Agarose beobachtet. Im Gegensatz dazu wurde Clp1 mit bW, Rbf1 oder Cib1 co-immunopräzipitiert, was eine physikalische Interaktion von Clp1 mit bW, Rbf1 und Cib1 zeigt (siehe Abb. 13.). Dabei scheint die Co-Immunopräzipitation von Clp1 mit Rbf1 weniger effizient als mit bW oder Cib1 zu erfolgen. Diese Daten stehen im Einklang mit einer im Hefe-Zwei-Hybrid System beobachteten schwächeren Interaktion von Clp1 mit Rbf1 im Vergleich zu bW und Cib1 (Heimel, 2005).

2.3.2 Clp1 interagiert mit bW, Rbf1 und Cib1 *in vivo*

Die bereits im Hefe-Zwei-Hybrid System und *in vitro* gezeigten Protein-Protein-Interaktionen von Clp1 mit bW, Rbf1 und Cib1 wurden zur Verifikation mittels Bimolekularer Fluoreszenzkomplementations-Analyse (BiFC) in *U. maydis* untersucht.

Dieser Ansatz beruht auf der funktionellen Rekonstitution eines fluoreszierenden Proteins (GFP, CFP oder YFP), wenn zwei definierte Fragmente (NG und CG) dieses Proteins in räumliche Nähe zueinander gebracht werden (Hu, *et al.*, 2002; Hu, *et al.*, 2006; Hu and Kerppola, 2003; Kerppola, 2006b). Durch eine Fusion der Fragmente an putativ interagierende Proteine kann eine erfolgte Protein-Protein-Interaktion fluoreszenzmikroskopisch detektiert und zusätzlich auch lokalisiert werden. Ein Nachteil dieses Systems besteht darin, dass sich keine Dynamiken von Protein-Protein-Interaktionen untersuchen lassen, da die Komplexbildung der N- und C-terminalen GFP-Fragmente nahezu irreversibel ist (Hu *et al.*, 2002; Robida and Kerppola, 2009). Um eine kontrollierte Expression von Clp1, bW1, Rbf1 und Cib1 zu gewährleisten, wurde ein System etabliert, in dem die Expression der Gene unter der Kontrolle des Arabinose-induzierbaren und Glukose-reprimierbaren *crg1*-Promotors steht. Darüber hinaus wurden definierte Integrationsorte verwendet (*leu2*-Locus und *ip*-Locus), wodurch Positionseffekte vermieden werden sollten.

Für die BiFC-Analyse in *U. maydis* wurden die offenen Leserahmen von *clp1*, *bW1* und *rbf1* von genomischer DNA und der offene Leserahmen von *cib1* von cDNA mittels PCR amplifiziert. Das N-terminale GFP-Fragment NG (AS 1-154) wurde C-terminal an das Clp1-Protein fusioniert und in den *leu2*-Locus integriert. Das C-terminale GFP-Fragment CG (AS 155-238) wurde C-terminal an bW1, Rbf1, Cib1 und an die zur Negativkontrolle verwendeten SV40-Kernlokalisationssequenz (NLS) fusioniert. Ein zytoplasmatisch lokalisierendes C-terminales GFP-Fragment erschien für die Untersuchung ungeeignet, da für alle in der Analyse verwendeten Proteine bereits eine Kernlokalisierung gezeigt wurde (Heimel *et al.*, 2010; Scherer *et al.*, 2006; J. Kämper, pers. Mitteilung) und eine räumliche Trennung der GFP-Fragmente somit keine valide Interpretation der Hintergrundfluoreszenz erlauben würde.

Die induzierte Co-Expression von Clp1NG mit bW1CG, Rbf1CG oder Cib1CG führte 20 h nach Induktion in arabinosehaltigem Medium zu einem deutlichen und kernlokalisierten GFP-Signal, wohingegen bei der Negativkontrolle lediglich eine schwache, zytoplasmatische Hintergrundfluoreszenz beobachtet wurde (siehe Abb. 14). Die induzierte Expression des Rbf1CG-Fusionsproteins führte, ebenso wie die Expression des unmodifizierten Rbf1-Proteins, zu filamentösem Wachstum und Zellzyklusarrest (Heimel *et al.*, 2010), was darauf hindeutet, dass das Rbf1CG-Fusionsprotein funktionell ist (Daten nicht gezeigt). Im Gegensatz dazu wurde bei der Co-Expression von Clp1NG und Rbf1CG kein filamentöses Wachstum beobachtet, was auf eine Inhibition der Rbf1-Funktion durch die Bindung von Clp1 hindeutet. Über die biologische Signifikanz dieser Beobachtung kann jedoch kein Rückschluss

gezogen werden, da die Interaktion von Clp1NG mit Rbf1CG zu einer irreversiblen Komplexbildung der GFP-Fragmente führt und somit die Assoziations- und Dissoziationsdynamiken der Clp1/Rbf1-Interaktion stark beeinflusst.

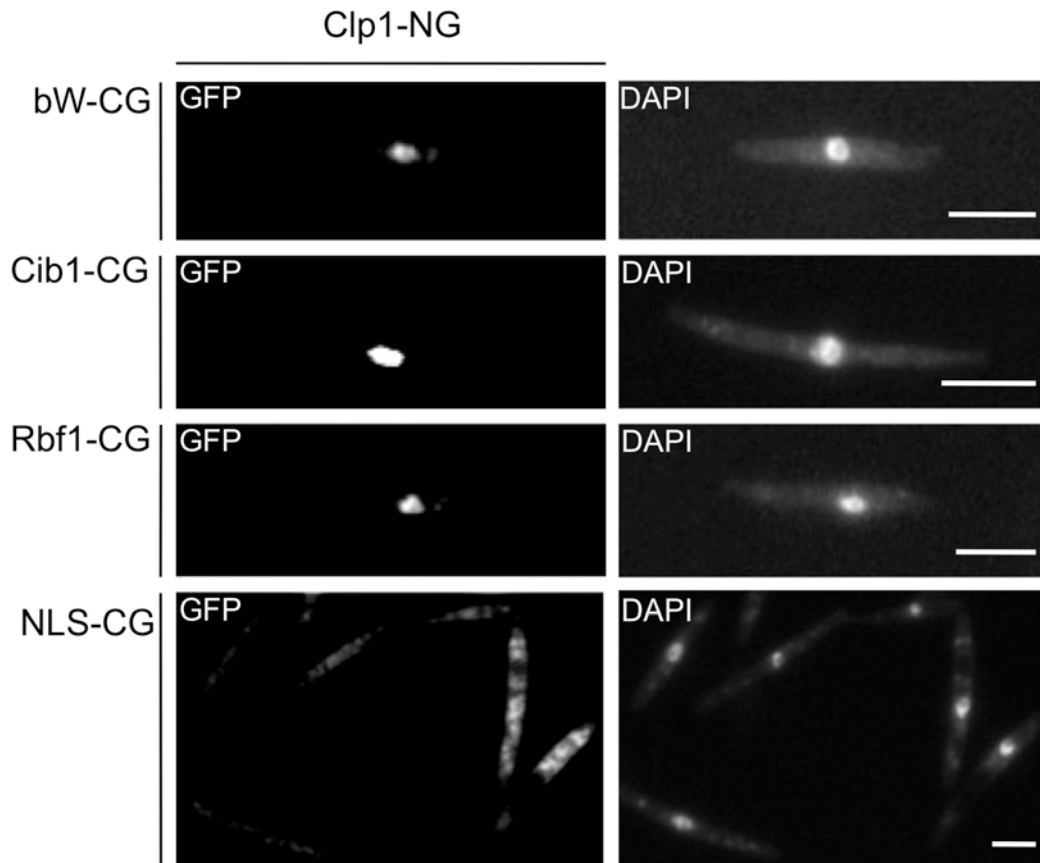


Abbildung 14: BiFC-Analyse der Clp1-Protein-Interaktionen. Bei der Co-Expression von Clp1-NG und bW1-CG, Cib1-CG oder Rbf1-CG, wurde ein kernlokalisiertes GFP-Signal beobachtet, wohingegen in der Negativkontrolle (Clp1-NG und NLS-CG) nur zytoplasmatische Hintergrundfluoreszenz beobachtet wurde. Die Expression der Fusionsproteine wurde für 20 h induziert. Zur Visualisierung der Zellkerne wurden die Zellen mit DAPI (Vectashield) gefärbt. Der Größenstandard entspricht 10 μm .

2.3.3 Charakterisierung der Clp1-Interaktionsdomäne

In vorangegangenen Experimenten konnte gezeigt werden, dass Clp1 mit drei Transkriptionsfaktoren interagiert, die jeweils essentiell für die pathogene Entwicklung von *U. maydis* sind. Um Rückschlüsse über die Rolle der einzelnen Protein-Protein-Interaktionen für die pathogene Entwicklung zu erlangen, wurden die Bereiche des Clp1-Proteins, die für eine Proteininteraktion mit bW, Rbf1 oder Cib1 notwendig sind, mit Hilfe des Hefe-Zwei-Hybrid Systems kartiert. Sollten individuell unterschiedliche Domänen von Clp1 für die Proteininteraktion mit den jeweiligen Transkriptionsfaktoren verantwortlich sein, könnte die Relevanz der einzelnen Clp1-Protein-Interaktion für die pathogene Entwicklung von *U. maydis* untersucht werden.

Es wurden insgesamt fünf N- und fünf C-terminal verkürzte Clp1-Versionen hergestellt und auf ihre Fähigkeit zur Interaktion mit bW, Rbf1 und Cib1 im Hefe-Zwei-Hybrid System getestet (siehe Abb. 15). Eine Selbstaktivierung der einzelnen Konstrukte konnte in vorangegangenen Studien ausgeschlossen werden (Heimel, 2005). Die Protein-Protein-Interaktion wurde durch Wachstumstests auf Selektionsmedium (SD - ade -his -leu -trp) untersucht. Schwache Protein-Protein-Interaktionen führen bei dem verwendeten System zur Rosafärbung der Zellen, da die schwache Expression des verwendeten Ade2-Reporters (Phosphoribosyl-Aminoimidazole-Carboxylase) zu einer Akkumulation von AIR (5-Aminoimidazol-Ribonukleotid), einem roten Zwischenprodukt des Adeninstoffwechsels führt. In den Wachstumstests zeigte sich, dass die N-terminalen 100 AS von Clp1 nicht für die Interaktion mit bW, Cib1 oder Rbf1 benötigt werden. Eine weitere Verkürzung des Clp1-Proteins um 50 AS führte zu einem Verlust der Interaktion mit bW, wohingegen die Interaktion mit Cib1 angesichts der leichten Rosafärbung der Zellen leicht verringert schien. Die Deletion der AS 418-445 hatte keinen Einfluss auf die Protein-Protein-Interaktionen, wohingegen eine weitere Verkürzung um 50 AS zum kompletten Verlust der Protein-Protein-Interaktion mit bW und Cib1 jedoch nicht mit Rbf1 führte. Ein Verlust der im Vergleich zu bW und Cib1 schwächeren Interaktion von Rbf1 mit Clp1 (Heimel, 2005) wurde bei keinem der verwendeten Konstrukte beobachtet (siehe Abb. 15). Diese Ergebnisse deuten an, dass die einzelnen Protein-Interaktionen von jeweils zwei Domänen innerhalb des Clp1-Proteins vermittelt werden. Die bislang verwendeten Clp1-Versionen erlauben jedoch keine eindeutigen Rückschlüsse auf die Relevanz der einzelnen Clp1-Protein-Interaktionen.

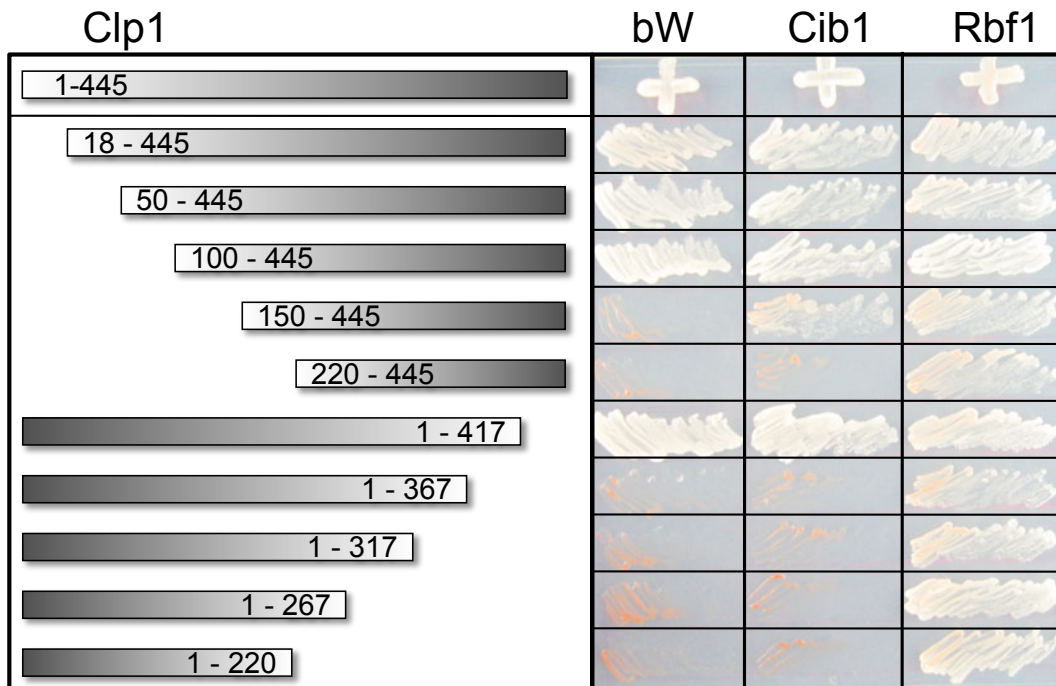


Abbildung 15: Bestimmung der Clp1-Interaktionsdomänen. N- oder C-terminal verkürzte Varianten des Clp1-Proteins wurden auf Interaktion mit bW, Cib1 und Rbf1 im Hefe-Zwei-Hybrid System getestet. Die Clp1-Varianten sind schematisch von N- nach C-terminal dargestellt, Nummern repräsentieren die Bereiche des Clp1-Proteins in Aminosäuren. Die Clp1-Konstrukte wurden nach Klonierung in pGBKT7 (Clontech) jeweils mit pGAD-bW, pGAD-Cib1 oder pGAD-Rbf1 co-transformiert. Transformanten wurden nach Selektion auf Anwesenheit der Plasmide (SD -leu -trp) auf Selektionsmedium (SD -ade his -leu -trp) überstrichen und für 3 Tage bei 28°C inkubiert. Als Positivkontrolle (+) wurde das vollständige Clp1-Protein (AS 1- 445) verwendet.

2.4 Das Cib1-Protein in *U. maydis*

2.4.1 Cib1 ist posttranskriptionell reguliert und lokalisiert im Zellkern

Die Untersuchung der *cib-1* Genexpression durch *Ustilago maydis* Microarrays ließ eine hohe und konstitutive Expression des *cib1* Gens in allen untersuchten Entwicklungsstadien von *U. maydis* vermuten (M. Scherer, M. Vranes, pers. Mitteilung). Übereinstimmend mit diesen Daten wurde in fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen des Reporterstammes UKH140 (FB1 P_{cib1} :eGFP) während des Wachstums in axenischer Kultur ein starkes GFP-Signal (siehe Abb. 16A) unabhängig vom Wachstumsstadium der Zellen beobachtet.

Im Gegensatz dazu wurde bei der fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung des Stammes USA1 (*a1mfa2 bE1/bW2 cib1:3eGFP*) trotz eines funktionellen

Fusionsproteins kein GFP-Signal während des Wachstums in axenischer Kultur beobachtet (Adler, 2007). Eine mögliche posttranskriptionelle Regulation des Cib1-Proteins im Rahmen der pathogenen Entwicklung wurde in Spritzinfektionen mit dem Stamm USA1 untersucht. 24 h nach Inokulation der Maispflanzen erfolgte die Entnahme der Blattproben, welche zur Visualisierung der Pilzhyphen auf der Pflanzenoberfläche mit Calcofluor gefärbt wurden. In Hyphen, die die Pflanzenoberfläche penetriert hatten, wurde in fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen ein kernlokalisierendes GFP-Signal beobachtet, das während des filamentösen Wachstums auf der Pflanzenoberfläche vor der Penetration der Pflanzenoberfläche nicht detektierbar war (siehe Abb. 16B). Die Expression von Cib1 scheint somit ähnlich wie im Fall von Clp1 posttranskriptionell reguliert und auf postpenetrative Entwicklungsstadien der Hyphen beschränkt zu sein.

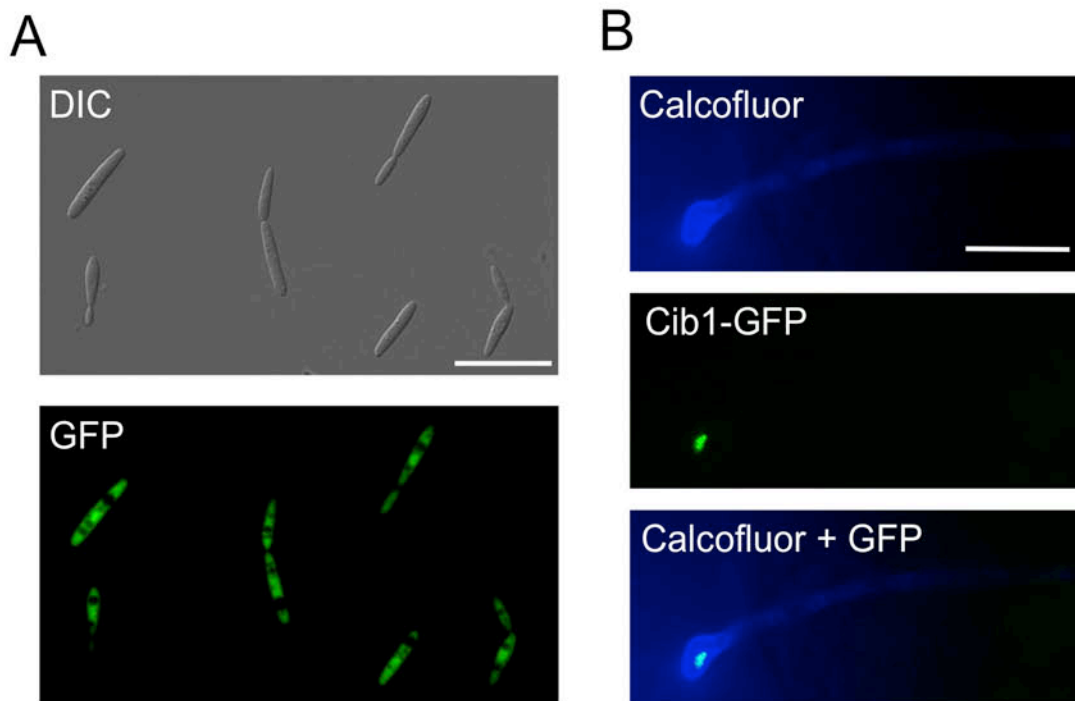


Abbildung 16: Untersuchung der *cib1*-Promotoraktivität und subzelluläre Lokalisation des Cib1-3eGFP Fusionsproteins. (A) Der *cib1*-Promotor ist während des Wachstums in axenischer Kultur aktiv. **(B)** Die Expression des Cib1-3eGFP Fusionsproteins konnte ausschließlich in Zellen beobachtet werden, die bereits die Pflanzenoberfläche penetriert hatten. Zur Visualisierung von Appressorien wurden die Pilzhyphen mit Calcofluor gefärbt. Der Größenstandard entspricht 20 μm .

2.4.2 Die posttranskriptionelle Regulation von *cib1* beruht auf alternativem

Spleißen

Der für das *cib1*-Gen vorhergesagte offene Leserahmen umfasst 1790 bp und besteht aus 2 Exons, die von einem 31bp umfassenden Intron getrennt sind (MUMDB). In einer 5'-3'-RACE-Analyse wurde ein offener Leserahmen von 1740 bp isoliert. Dieser wird von einem 45 bp 5'-UTR und einem 196 bp 3'-UTR flankiert. Als Ausgangsmaterial für die Analyse wurde RNA des haploiden FB1 Stammes, welcher in Minimalmedium kultiviert wurde, verwendet. Das durch die cDNA kodierte Protein umfasst 574 AS (vorhergesagt: 585 AS). Die vorhergesagte Exon-Intron-Struktur wurde falsifiziert. Die Vollängen-cDNA lässt auf ein 65 bp umfassendes Intron schließen (siehe Abb. 17A), welches nicht der bekannten GU/AG-Regel folgt. Die Erkennung derartiger, nicht konventioneller Intron-Grenzen wird oftmals durch alternative Spleißfaktoren verwirklicht und stellt einen bekannten Mechanismus der posttranskriptionellen Genregulation dar (Black, 2003; Hiller and Platzer, 2008). Da durch die vorangegangenen Lokalisations- und Promotor-GFP-Studien eine posttranskriptionelle Regulation der Cib1-Proteinexpression via 3'- oder 5'-UTR ausgeschlossen werden konnte, wurde eine mögliche Regulation der Cib1-Proteinexpression durch alternatives Spleißen untersucht. Zu diesem Zweck wurde das Expressionsniveau der gespleißten und der putativen ungespleißten und somit verkürzten *cib1*-Variante mittels quantitativer Realtime (qRT)-PCR untersucht. Dabei wurde RNA von *U. maydis*, die zu verschiedenen Entwicklungsstadien isoliert wurde, als Ausgangsmaterial für die cDNA Synthese verwendet. Die verwendeten Primerpaare ermöglichen die Diskriminierung von gespleißter und ungespleißter *cib1* mRNA (siehe Abb. 17B, 17C).

Die relative Expression der unterschiedlichen *cib1* mRNA-Varianten wurde im Verlauf der pathogenen Entwicklung untersucht. Die Expression des ungespleißten Transkriptes ist zu allen untersuchten Entwicklungsstadien von *U. maydis* detektierbar und ist nicht differenziell reguliert. Im Gegensatz dazu konnte eine deutliche Induktion des gespleißten *cib1*-Transkriptes während der pathogenen Entwicklung beobachtet werden (8,3-fach, 8 dpi) (siehe Abb. 18A). Die relative Abundanz der verschiedenen Transkripte zueinander wurde durch die absolute Quantifizierung der Transkriptmengen mittels definierter Eichproben untersucht (siehe Abb 18B) (Leong, *et al.*, 2007).

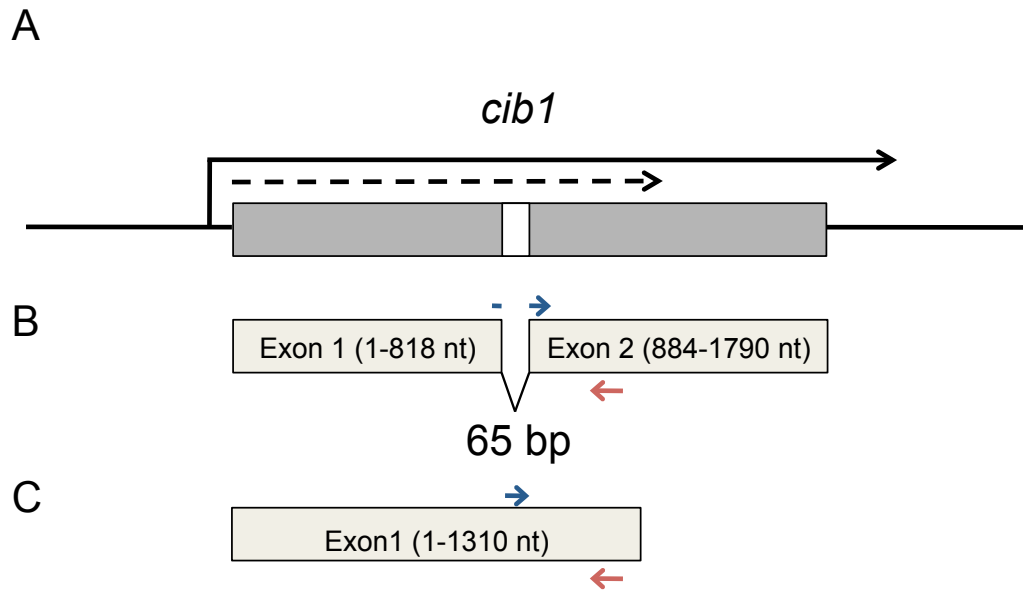


Abbildung 17: Struktur des *cib1* Gens. (A) Schematische Darstellung des *cib1* Locus. Als schwarzer Pfeil ist der transkribierte Bereich des *cib1* Gens dargestellt, als gestrichelter Pfeil der putative, offene Leserahmen ohne Spleißen. (B) Übersicht über die cDNA-Struktur nach 5'-3'RACE Analyse. Der blaue Pfeil markiert den für die quantitative qRT-PCR Analyse verwendeten Forward-Primer (bindet an den Intron/Exon Übergängen), der rote Pfeil den Reverse-Primer. (C) Übersicht über den putativen, offenen Leserahmen ohne Spleißen. Der blaue Pfeil markiert den für die quantitative qRT-PCR Analyse verwendeten Forward-Primer (bindet im Intron), der rote Pfeil den Reverse-Primer.

Dabei wurden verschiedene Variablen wie beispielsweise unterschiedliche Effizienzen der verwendeten Primerpaare berücksichtigt, um eine möglichst genaue Analyse zu ermöglichen. Während des vegetativen Wachstums in Flüssigmedium und während des filamentösen Wachstums auf aktivkohlehaltigem Festmedium beträgt das Verhältnis von ungespleißter zu gespleißter *cib1* mRNA 20:1, beziehungsweise 21:1 (siehe Abb. 18B). Im Gegensatz dazu wurde das Verhältnis von ungespleißter zu gespleißter *cib1*-mRNA während der pathogenen Entwicklung 2, 4 und 8 dpi mit 1:0,77; 1:0,43 und 1:0,58 bestimmt (siehe Abb. 18B). Es wurden keine Unterschiede in der *cib1*-Promotoraktivität zu verschiedenen Entwicklungsstadien beobachtet (Daten nicht gezeigt) und eine posttranskriptionelle Regulation der Cib1-Proteinexpression via 5'- oder 3'-UTR konnte durch die vorangegangenen Studien ausgeschlossen werden. Zusammen mit der deutlichen Induktion der gespleißten *cib1*-mRNA im Gegensatz zur ungespleißten *cib1*-Variante lassen diese Beobachtungen auf eine posttranskriptionelle Regulation der Cib1-Proteinexpression durch reguliertes Spleißen schließen.

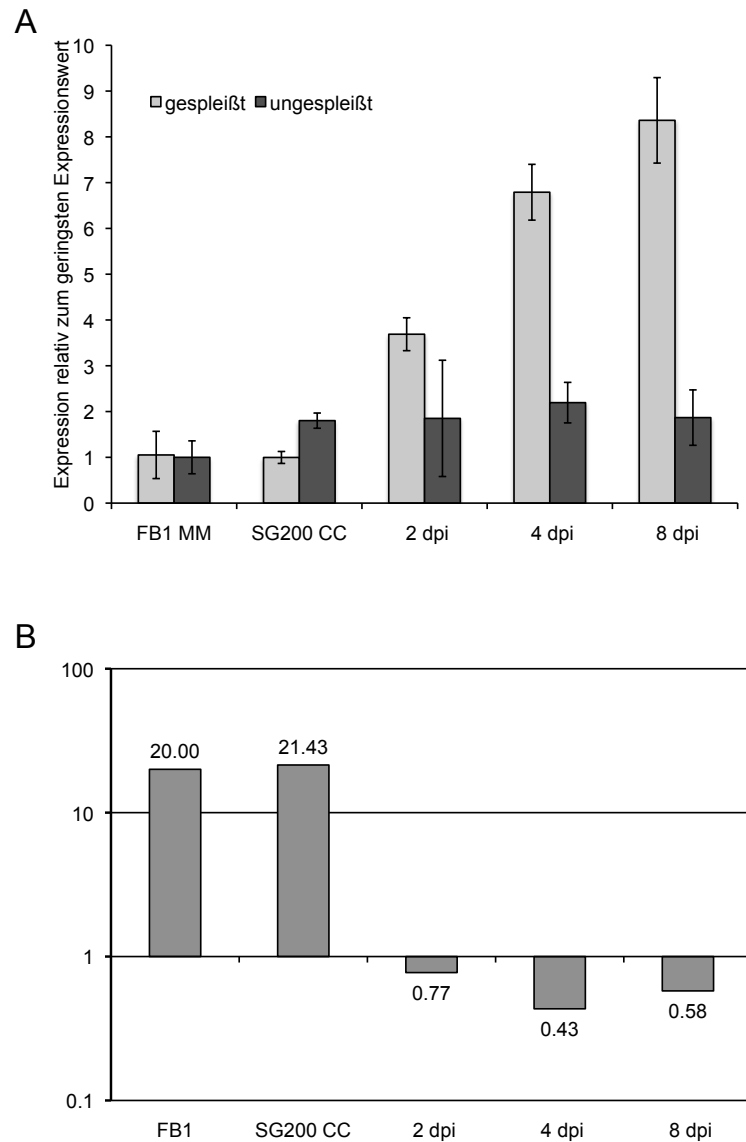


Abbildung 18: Untersuchung der *cib1*-Expression. (A) qRT-PCR-Analyse der Expression der alternativen *cib1*-Transkripte. Die gespleißte Form der *cib1*-mRNA ist im Gegensatz zur ungespleißten Form während der pathogenen Entwicklung verstärkt exprimiert. Dargestellt sind die Mittelwerte aus zwei technischen Replikaten. Fehlerbalken stellen die Standardabweichung (SD) dar. Die Berechnung der Genexpression erfolgte relativ zum geringsten Expressionswert. Die Normalisierung der relativen Genexpression erfolgte durch Verwendung von Aktin (*um11232*) und dem eukaryotischen Translationsinitiationsfaktor 2b (*eIF2b um04869*) als Referenzgene. **(B)** Absolute Quantifizierung der Genexpression. Dargestellt ist das Verhältnis von ungespleißter zu gespleißter *cib1*-mRNA. Während unter axenischen Wachstumsbedingungen bis zu 21-fach mehr Moleküle ungespleißter *cib1*-mRNA im Verhältnis zur gespleißten Variante in der Zelle vorhanden sind, kehrt sich das Verhältnis ungespleißt/gespleißt während der pathogenen Entwicklung um und es befinden sich doppelt so viel Moleküle gespleißter wie ungespleißter *cib1*-mRNA in der Zelle. (CC=Charcoal). Alle Experimente wurden mindestens dreifach wiederholt, mit ähnlichen Ergebnissen. Gezeigte Werte sind repräsentativ. (Eichgerade ungespleißte *cib1*-mRNA $r^2=0,969$; Eichgerade gespleißte *cib1*-mRNA $r^2=0,975$).

2.4.3 Cib1 ist für den Kernimport des Clp1-Proteins nicht notwendig

Da in der Aminosäuresequenz des Clp1-Proteins keine Kernlokalisationssequenz identifiziert werden konnte, es jedoch im Zellkern lokalisiert, wurde die Möglichkeit eines Cib1-vermittelten Kernimports von Clp1 untersucht.

Der sogenannte „Huckepack“- oder „Piggyback“-Mechanismus beruht auf einer durch Protein-Protein-Interaktion vermittelten Kernimport. Im Stamm UMS84 ($a2 P_{nar}:bE1/bW2 P_{crg}:clp1$) führt die induzierte Co-Expression von Clp1 und dem b-Heterodimer zu einer Repression der b-Funktion, die vermutlich durch eine direkte Interaktion von Clp1 und bW vermittelt wird. Eine mögliche Beteiligung von Cib1 an der Repression der b-Funktion wurde durch Deletion von *cib1* in diesem Stamm überprüft. Die gleichzeitige Induktion von *clp1* und dem b-Heterodimer bewirkte sowohl im Stamm UMS84 als auch im Stamm UMS84 Δ *cib1* die Repression des filamentösen Wachstums und des *b*-induzierten G2 Zellzyklusarrests (Daten nicht gezeigt). Somit ist Cib1 nicht notwendig für die Clp1-vermittelte Inhibition der b-Funktion.

In einem weiteren experimentellen Ansatz wurde untersucht, ob die Deletion von *cib1* Auswirkungen auf die Lokalisation des Clp1-Proteins hat. Auch hier zeigte sich kein Unterschied zwischen dem Ausgangsstamm UMS10 ($a2 P_{crg}:bE1/bW2 clp1:eGFP$) und UMS10 Δ *cib1* (Daten nicht gezeigt).

In einem komplementären Ansatz wurde im Stamm SG200 Δ *cib1* das Clp1-Protein mit einer Kernlokalisationssequenz (NLS) und eGFP fusioniert. Sollte die alleinige Funktion von Cib1 der Kernimport von Clp1 sein, wäre eine Komplementation des Δ *cib1*-Phänotyps zu erwarten. Es wurde jedoch in Infektionsexperimenten keine Komplementation des Δ *cib1*-Phänotyps beobachtet (Daten nicht gezeigt). Zusammenfassend zeigen die verschiedenen Ansätze übereinstimmend, dass Cib1 nicht für den Kernimport von Clp1 benötigt wird.

2.4.4 Cib1 ist nicht an der Genregulation auf der Pflanzenoberfläche beteiligt

Um mögliche Zielgene von Cib1 zu identifizieren, wurde eine vergleichende Transkriptomanalyse mittels DNA-Microarrays durchgeführt. Sieben Tage alte Maispflanzen wurden mit dem solopathogenen Stamm SG200 und dem Δ *cib1*-Derivat infiziert. Nach 16 h erfolgte die Isolierung der Pilzzellen von der Pflanzenoberfläche mit Hilfe von flüssigem Latex (Vranes, 2006). Bei dieser Methode wurde die Probenvorbereitung für die Microarray-Analyse in einem Zwei-Schritt-Verfahren

durchgeführt (siehe Material und Methoden 4.6). Im Vergleich von SG200 zu SG200 Δ *cib1* wurde mit Ausnahme von *cib1* kein Gen als differenziell reguliert identifiziert. Für Cib1 konnte somit keine Funktion in der differenziellen Genregulation während des filamentösen Wachstums auf der Pflanzenoberfläche gezeigt werden. Die Funktion des Cib1-Proteins scheint folglich auf postpenetrative Entwicklungsvorgänge beschränkt zu sein.

2.5 Die Interaktion von Clp1 und bW

Das b-Heterodimer ist der zentrale Regulator der pathogenen Entwicklung in *U. maydis*. Die induzierte Expression in axenischer Kultur führt zu filamentösem Wachstum und einem G2-Zellzyklusarrest (Heimel *et al.*, 2010; Mielnichuk *et al.*, 2009; Scherer *et al.*, 2006). In einer genomweiten Expressionsanalyse wurden 345 Gene als *b*-abhängig definiert. Innerhalb dieser Gruppe ist *clp1* eines von 12 Genen, die direkt durch das b-Heterodimer und unabhängig von Rbf1 reguliert werden (Heimel *et al.*, 2010; Scherer *et al.*, 2006). Eine entkoppelte und gleichzeitige Induktion von *clp1* und einem aktiven b-Heterodimer verhindert das filamentöse Wachstum und den G2-Zellzyklusarrest. Zusätzlich kann keine Regulation *b*-abhängig induzierter oder reprimierter Gene unter diesen Bedingungen beobachtet werden (Scherer *et al.*, 2006). Die induzierte Expression von *clp1* in Stämmen ohne aktives b-Heterodimer hat keine Auswirkung auf das Genexpressionsprofil (Scherer *et al.*, 2006). Basierend auf der im Hefe-Zwei-Hybrid System gezeigten Interaktion von Clp1 und bW wurde eine Inhibition der b-Funktion durch die Clp1-Interaktion vermutet. Die Repression der b-Funktion kann dabei auf verschiedene Arten erfolgen. Neben einer Veränderung der DNA-Affinität oder -Spezifität erscheint eine Maskierung der Transaktivierungsdomäne, eine Konkurrenz von Clp1 und bE um die Bindung von bW wie auch eine veränderte Stabilität des bE/bW-Komplexes nach der Bindung von Clp1 möglich.

2.5.1 Die C-terminale Domäne des bW2-Proteins ist ausreichend für die

Interaktion mit Clp1 und führt zur Inhibition des Kon8-Proteins *in vivo*.

Nach der Expression kompatibler *bEast* (bE) und *bWest* (bW) -Gene führt die Heterodimerisierung der Genprodukte zur Bildung eines aktiven Transkriptionsfaktors. Die Spezifität der bE- und bW-Proteine wird über die N-terminalen, variablen Bereiche der Proteine vermittelt (Gillissen *et al.*, 1992; Kronstad and Leong, 1990; Schulz *et al.*,

1990). Diese Bereiche enthalten große Mengen hydrophober Aminosäuren, so dass man von einer durch hydrophobe Wechselwirkungen vermittelten Interaktion von bE und bW ausgeht (Kämper *et al.*, 1995). Mit *in vitro* synthetisierten bE1- und bW2-Proteinen sollte der Einfluss von Clp1 auf die Heterodimerisierung der b-Proteine untersucht werden.

Da bei dem verwendeten System keine erfolgreiche Expression der Vollängenproteine erreicht werden konnte, wurde in den weiteren Studien das Kon8-Protein verwendet. Dabei handelt es sich um ein Fusionsprotein aus bE1 und bW2, bei dem alle Bereiche, die nicht für eine biologische Funktion notwendig sind, deletiert wurden (siehe Abb. 19) (Grandel, *et al.*, 2000; Romeis *et al.*, 1997; Schlesinger *et al.*, 1997). Für bE1 konnte gezeigt werden, dass die Homeodomäne und angrenzende Bereiche der konstanten Region (AS 110-332) für die biologische Funktion notwendig sind. Die bei bW2 notwendigen Bereiche beinhalten ebenfalls die Homeodomäne und einen angrenzenden Teil der konstanten Region (siehe Abb. 19). Der C-terminale Bereich des bW2 Proteins (AS 567-645) ist nicht notwendig für die Funktion als Transkriptionsfaktor, aber essentiell für die biologische Funktion des Fusionsproteins (Grandel *et al.*, 2000).

Da dieser Bereich mit dem Proteinfragment überlappt, für das eine Protein-Protein-Interaktion mit Clp1 im Hefe-Zwei-Hybrid System gezeigt werden konnte (AS 339-645), wurde untersucht, ob dieser C-terminale Bereich des bW2 Proteins (AS 567-645) für eine Interaktion mit Clp1 ausreichend ist und ob eine zeitgleiche Expression von Clp1 und Kon8 die Funktion des Kon8-Proteins stört. Würde eine Inhibition des Kon8-Proteins durch Clp1 beobachtet werden, könnte eine Inhibition der b-Funktion durch Beeinflussung der bE/bW-Heterodimerisierung ausgeschlossen werden.

Für die Untersuchung einer möglichen Protein-Protein-Interaktion zwischen Clp1 und Kon8 wurde das Hefe-Zwei-Hybrid System verwendet. Der für den C-terminalen Bereich (AS 567-645) des bW2-Proteins kodierende Genabschnitt wurde mittels PCR amplifiziert und in den Hefe-Zwei-Hybrid Beutevektor pGAD-DS (Dualsystems Biotech) integriert. Als zusätzliche Kontrolle wurde das in dem Hefe-Zwei-Hybrid Screen isolierte bW-Fragment (AS 339-645) verwendet. Nach der Co-Transformation von pGAD-bW2₅₆₇₋₆₄₅ und pGBKT7-Clp1, welches den gesamten offenen Leserahmen des *clp1*-Gens enthält, und dreitägiger Inkubation bei 30°C auf synthetischem Drop-Out (SD) Medium (-leu-trp) wurden jeweils drei Transformanten auf Selektivmedium (SD-leu-trp-his-ade) überstrichen und für weitere drei Tage bei 30°C inkubiert. Das Wachstum der Transformanten weist auf eine Interaktion zwischen Clp1 und bW2₅₆₇₋

⁶⁴⁵ hin. Im Vergleich zur verwendeten Kontrolle bW2₃₃₉₋₆₄₅ ist das Wachstum jedoch reduziert, was auf eine vergleichsweise schwache Interaktion des verkürzten bW2₅₆₇₋₆₄₅-Fragmentes hindeutet (siehe Abb. 20A).

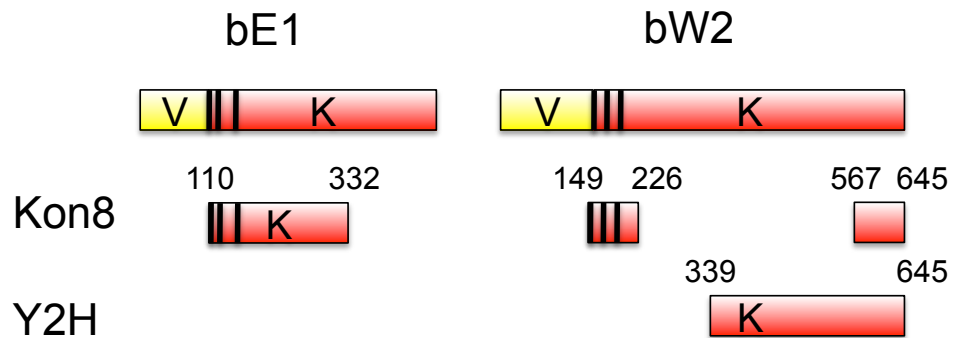


Abbildung 19: Schematische Darstellung der b-Proteine und Übersicht über die in Kon8-enthaltenen Proteindomänen. Variable Bereiche (gelb V) sind ausschließlich für die Heterodimerisierung von bE1 und bW2 notwendig. Im Kon8-Fusionsprotein werden ausschließlich Bereiche der konstanten Regionen (rot K) inklusive der Homeodomänen (schwarze Balken) für die biologische Funktion benötigt. Der im Hefe-Zwei-Hybrid Screen isolierte Teil des bW2-Proteins (AS 339-645) überlappt mit dem C-terminalen Bereich (AS 567-645), der für die biologische Aktivität von Kon8 benötigt wird.

Zur Untersuchung einer möglichen Clp1/Kon8-Interaktion *in vivo* wurden die Stämme UKH125 ($a2 b2 P_{nar}:kon8 P_{crg}:clp1$) und UKH 155 verwendet. Beide Stämme enthalten das Kon8 Gen unter der Kontrolle des Nitrat-induzierbaren *nar1*-Promotors, welches in den IP-Locus (Brachmann *et al.*, 2001) integriert wurde. Im Stamm UKH125 wurde zusätzlich das *clp1*-Gen unter der Kontrolle des Arabinose-induzierbaren *crg1*-Promotors in den *b*-Locus integriert. Für die Untersuchungen wurde aktivkohlehaltiges Nitrat-Minimalmedium (NM) verwendet, dem entweder Glukose (Glu) oder Arabinose (Ara) als Kohlenstoffquelle zugesetzt wurde. Dabei führt Glukose zur Repression und Arabinose zur Induktion der *clp1*-Expression. Das filamentöse Wachstum der Stämme auf aktivkohlehaltigem NM-Glu Medium weist auf ein funktionelles Kon8-Protein hin. Die induzierte Expression von Kon8 im Stamm UKH155 führte zu einer deutlichen Filamentbildung unabhängig von der verwendeten Kohlenstoffquelle (siehe Abb. 20B). Im Gegensatz dazu führte die gleichzeitige Induktion von *clp1* und *kon8* im Stamm UKH125 zu keiner sichtbaren Filamentbildung.

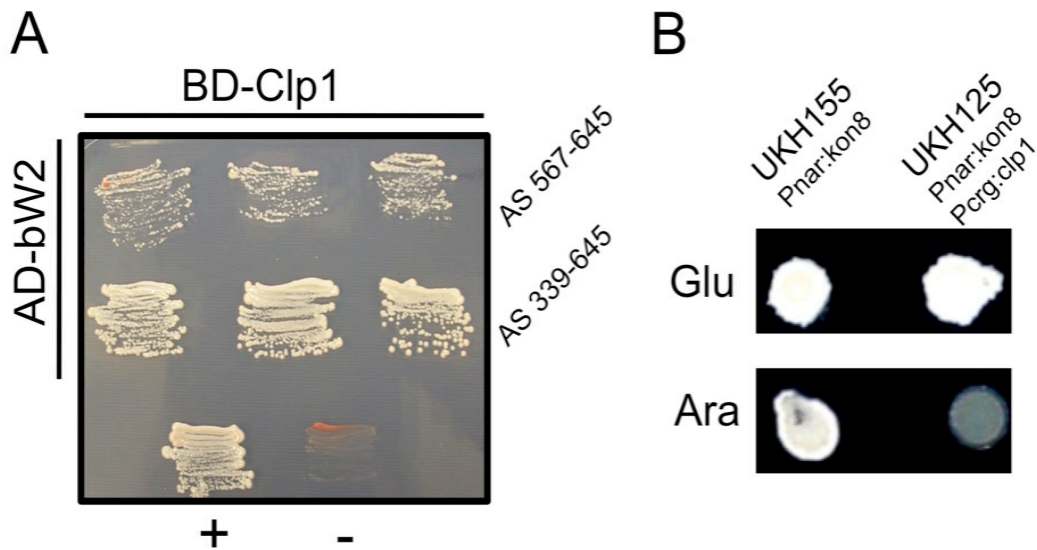


Abbildung 20. Hefe Zwei-Hybrid Untersuchung der Clp1/bW2-Interaktion und Untersuchung des Kon8-abhängigen filamentösen Wachstums. (A) Der C-terminale Bereich von $bW2_{567-645}$ ist ausreichend für eine Interaktion mit Clp1. Das im Vergleich zur Kontrolle $bW2_{339-645}$ verringerte Wachstum auf SD-Selektionsmedium (-leu-trp-his-ade) weist auf eine schwächere Interaktion des verkürzten $bW2$ -Fragmentes hin. Als Positivkontrolle (+) wurde pGBKT7-p53 + pGADT7-SV40, als Negativkontrolle (-) pGBKT7-Lam + pGADT7-SV40 (Clontech) verwendet. (B) Untersuchung auf filamentöses Wachstum. Die Stämme UKH125 (FB2 $\Delta b::PcrG:clp1$ Pnar:*kon8*) und UKH155 (FB2 Pnar:*kon8*) zeigen filamentöses Wachstum nach Induktion des *kon8*-Gens (Glu). Die Arabinose-induzierte Expression (Ara) von *clp1* im Stamm UKH125 führt zum Verlust des filamentösen Wachstums.

Die Inhibition der Kon8-Funktion durch Clp1 deutet auf eine Protein-Protein-Interaktion *in vivo* hin und zeigt darüber hinaus, dass die Inhibition der Funktion des b-Heterodimeres keine Clp1-vermittelte Trennung der beiden Untereinheiten benötigt.

2.6 Die Interaktion von Clp1 und Rbf1

Der C2H2-Zinkfinger Transkriptionsfaktor Rbf1 ist der zentrale Regulator innerhalb der b-induzierten Regulationskaskade. Die Deletion von *rbf1* führt in Infektionsexperimenten zum Verlust der Pathogenität und zum Verlust des b-abhängigen filamentösen Wachstums. Die induzierte Expression von *rbf1* ist ausreichend, um das filamentöse Wachstum und einen G2-Zellzyklusarrest zu induzieren. Für die Expression von mehr als 95 % (334 von 345) aller b-abhängig regulierten Gene ist *rbf1* notwendig oder ausreichend (Heimel *et al.*, 2010), was die zentrale Rolle von Rbf1 für die Regulation von Pathogenität, Zellzyklusarrest und Dimorphismus in *U. maydis* unterstreicht. Die Co-Expression von Clp1 und einem aktiven b-Heterodimer führt zum Verlust der b-Funktion (Scherer *et al.*, 2006). Hierbei

ist der Verlust der *rbf1*-Expression unter diesen Bedingungen vermutlich ausreichend, um einen Zellzyklusarrest und filamentöses Wachstum zu verhindern.

2.6.3 Die Co-Expression von *rbf1* und *clp1* führt zur spezifischen Repression der Pheromonvorläufer- (*mfa1*) und Pheromonrezeptorgene (*pra1*)

Da eine mögliche Funktion von Clp1 bei der Aufhebung des Zellzyklusarrestes nach erfolgter Penetration der Pflanzenoberfläche diskutiert wurde (Scherer *et al.*, 2006), stellt sich die Frage, welche biologische Funktion die Protein-Protein-Interaktion von Clp1 und Rbf1 besitzt, und ob beziehungsweise wie die Funktion von Rbf1 nach Bindung von Clp1 verändert wird.

Die Expression von *rbf1* wird durch filamentöses Wachstum evident und wurde lichtmikroskopisch quantifiziert. In den Stämmen UKH156 und UKH164 kann die Expression von *rbf1* durch Wechsel der Stickstoffquelle (von Glutamin zu Nitrat) induziert werden. Der Stamm UKH164 enthält zusätzlich ein Arabinose-induzierbares *clp1*-Gen. Die Co-Induktion von *clp1* und *rbf1* im Stamm UKH164 führte zu einer vierfach reduzierten Filamentbildung im Vergleich zum Stamm UKH156, der unter identischen Bedingungen inkubiert wurde (siehe Abb. 21). Diese Beobachtung lässt auf eine Repression der Rbf1-Funktion durch Bindung von Clp1 schließen.

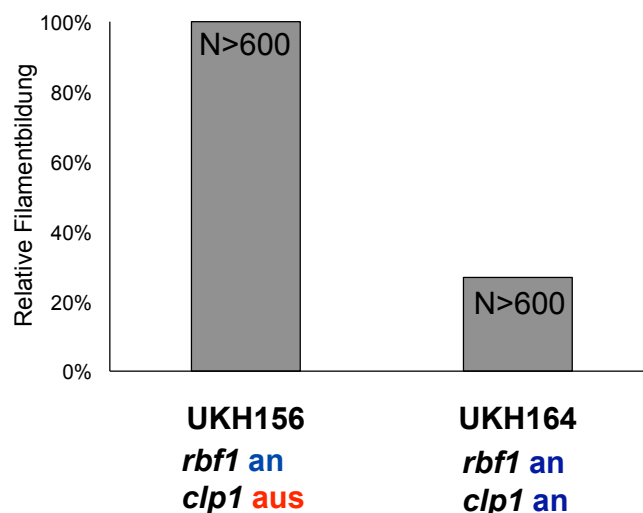


Abbildung 21: Quantifizierung der relativen Filamentbildung in Abhängigkeit von *rbf1*- und *clp1*-Induktion. Die Quantifizierung erfolgte 20 h nach Induktion von *rbf1* beziehungsweise *rbf1* und *clp1*. Für jeden Stamm wurden mindestens 600 Zellen ausgezählt.

In einer vergleichenden Transkriptomanalyse der Stämme UKH156 ($a1 \Delta b::P_{nar}:rbf1$), UKH164 ($a1 \Delta b::P_{nar}:rbf1, P_{crg}:clp1$) wurde der Einfluss von Clp1 auf die Rbf1-abhängige Genregulation mittels Microarrays untersucht. Die Stämme wurden in zwei biologischen Replikaten für 12 h in NM-Arraymedium mit Arabinose inkubiert. Nach der Isolation der Gesamt-RNA erfolgte deren weitere Prozessierung über cDNA zu cRNA, die für die Hybridisierung der Affymetrix-Microarrays verwendet wurde.

Im Vergleich der Stämme UKH156 und UKH164 war ausschließlich das für den Pheromonvorläufer Mfa1 kodierende Gen (*um2382*) signifikant reguliert. Die Co-Induktion von *rbf1* und *clp1* im Stamm UKH164 führt im Vergleich zur alleinigen Induktion von *rbf1* im Stamm UKH156 zu einer 48-fachen Repression der *mfa1*-Genexpression (adjusted P-value: 2.49E-04) und einer 3,7-fachen Repression des Pheromonrezeptorgens *pra1*. Auf Grund einer Irrtumswahrscheinlichkeit (adjusted P-value) von 2.86E-01 wurde diese Regulation jedoch als statistisch nicht signifikant eingestuft. Die in der Microarray-Analyse beobachtete Regulation von *mfa1* und *pra1* wurde mittels qRT-PCR in den Stämmen JB1 ($a1 \Delta b$), UKH156 und UKH164 verifiziert. Während die Expression beider Gene in den Kontrollstämmen JB1 und UKH156 auf konstantem Niveau war, wurde durch die Co-Induktion von *rbf1* und *clp1* im Stamm UKH164 die Expression von *mfa1* und *pra1* deutlich reprimiert (siehe Abb. 22).

Für die Expression von *mfa1* wurde im Vergleich von UKH156 zu UKH164 eine mehr als 2000-fache (siehe Abb. 22A) und für *pra1* eine mehr als 10-fache Verringerung der Genexpression beobachtet (siehe Abb. 22B). Durch Verwendung der im Vergleich zur Microarray-Analyse sensitiveren Nachweismethode der qRT-PCR wurde gezeigt, dass sowohl die *mfa1*-Genexpression als auch die *pra1*-Genexpression durch Co-Induktion von *rbf1* und *clp1* reprimiert wird.

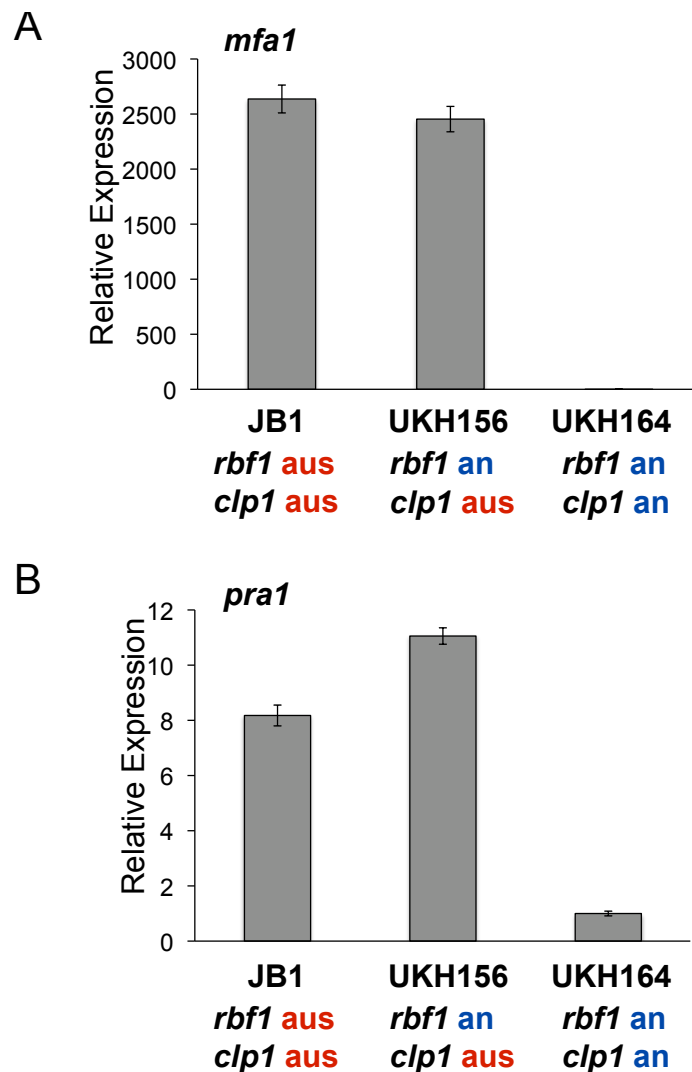


Abbildung 22: qRT-PCR Analyse der *mfa1* und *pra1* Genexpression. (A) Untersuchung der relativen *mfa1* (A) und *pra1*-Genexpression (B) in den Stämmen JB1, UKH156 und UKH164. Dargestellt sind die Mittelwerte aus zwei technischen Replikaten. Fehlerbalken stellen die Standardabweichung (SD) dar. Die Berechnung der Genexpression erfolgte relativ zum geringsten Expressionswert. Die Normalisierung der relativen Genexpression erfolgte durch Verwendung von Aktin (*act1*, *um11232*) und dem eukaryotischen Translationsinitiationsfaktor 2b (*eIF2b*, *um04869*) als Referenzgene.

2.6.4 Clp1 blockiert die Pheromon-induzierte Konjugationshyphenbildung und den Pheromon-induzierten G2-Zellzyklusarrest.

In der vorangegangenen Genexpressionsanalyse wurde die Repression der basalen Expression der *a*-Locus-Gene *mfa1* und *pra1* durch die gleichzeitig induzierte Expression von *rbf1* und *clp1* beobachtet.

Die Expression der Pheromon- und Pheromonrezeptorgene wird durch die Bindung von kompatibelem Pheromon an den Pheromonrezeptor stark induziert. Die Signaltransduktion erfolgt dabei zum einen über einen Proteinkinase A vermittelten und zum anderen über einen MAPK vermittelten Signalweg (zusammengefasst in Brefort *et al.*, 2009). Die Aktivierung beider Signalwege führt zur differenziellen Phosphorylierung des HMG Transkriptionsfaktors Prf1 (Kaffarnik *et al.*, 2003), welcher zur Signalverstärkung sowohl die Expression der Pheromon- und Pheromonrezeptorgene als auch die eigene Expression durch Bindung an PREs (Pheromone Response Element) induziert (Hartmann *et al.*, 1996; Urban *et al.*, 1996a). Prf1 ist der zentrale Regulator der Pheromon-induzierten Genexpression. Zu den weiteren Zielgenen gehören die Gene des *b*-Locus und *rbf1* (Hartmann *et al.*, 1996; Urban *et al.*, 1996a; Zarnack *et al.*, 2008). In diesem Zusammenhang stellte sich die Frage, ob die induzierte Expression von *clp1* nicht nur die basale, sondern auch die pheromoninduzierte Expression der *a*-Locus Gene reprimiert. Da die Expression von *rbf1* durch Pheromon induziert wird (Zarnack *et al.*, 2008), wurde auf eine Expression von *rbf1* unter der Kontrolle des *nar1*-Promotors verzichtet und der Stamm UVO151 (*a1 Δb P_{org}:clp1*) (Scherer *et al.*, 2006) verwendet. In diesem Stamm wurde der *b*-Locus deletiert und ein Arabinose-induzierbares *clp1*-Allel in den *ip*-Locus integriert. Als Kontrollstamm wurde JB1 (*a1 Δb*) (Scherer *et al.*, 2006) verwendet. Darüber hinaus wurde mit dem Stamm UVO151Δ*rbf1* (*a1 Δb P_{org}:clp1 Δrbf1*) eine mögliche Abhängigkeit von *rbf1* auf *clp1*-vermittelte Änderungen der Genexpression untersucht (siehe Abb. 23B). Da die Expression von *mfa1* und *pra1* auch in Abhängigkeit der Kohlenstoffquelle differenziell reguliert ist, wurden alle Experimente unter gleichen Bedingungen durchgeführt (Nitrat-Minimalmedium mit Arabinose als Kohlenstoffquelle). Die mikroskopische Untersuchung der pheromonstimulierten Zellen zeigte, dass in den Stämmen JB1 und UVO151Δ*rbf1* mehr als 80% der Zellen Konjugationshyphen ausbildeten, wohingegen im Stamm UVO151 die Ausbildung von Konjugationshyphen in weniger als 2% der Zellen beobachtet werden konnte (siehe Abb. 23A).

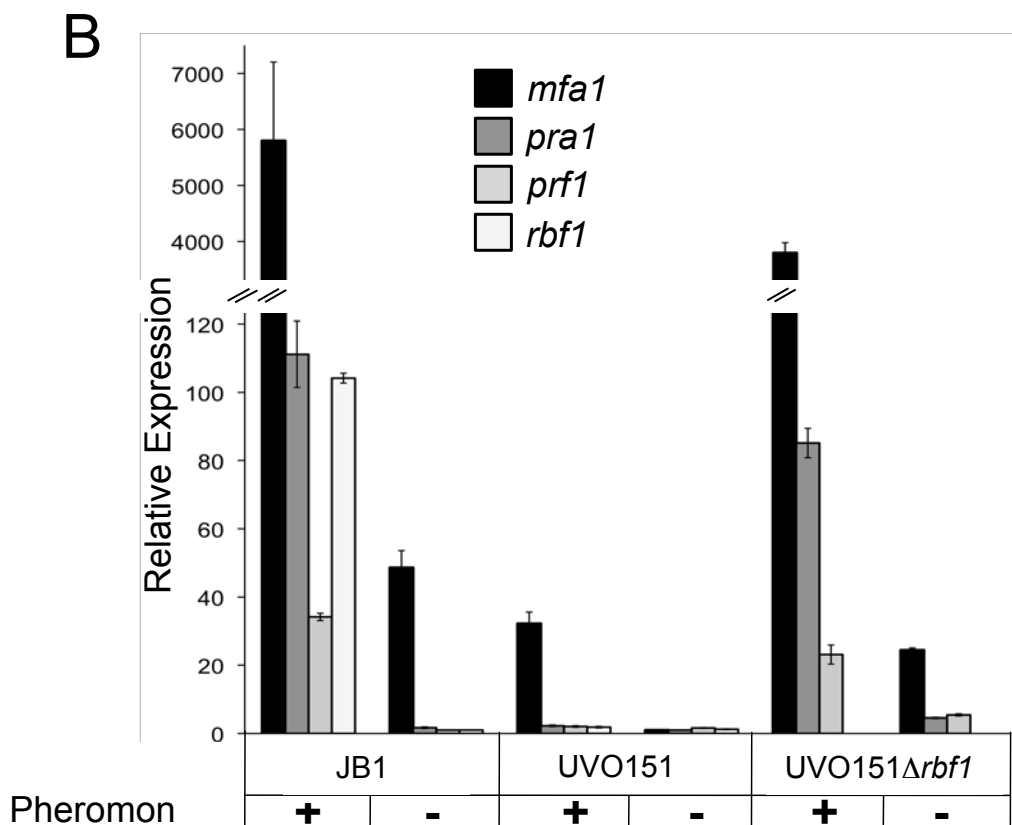
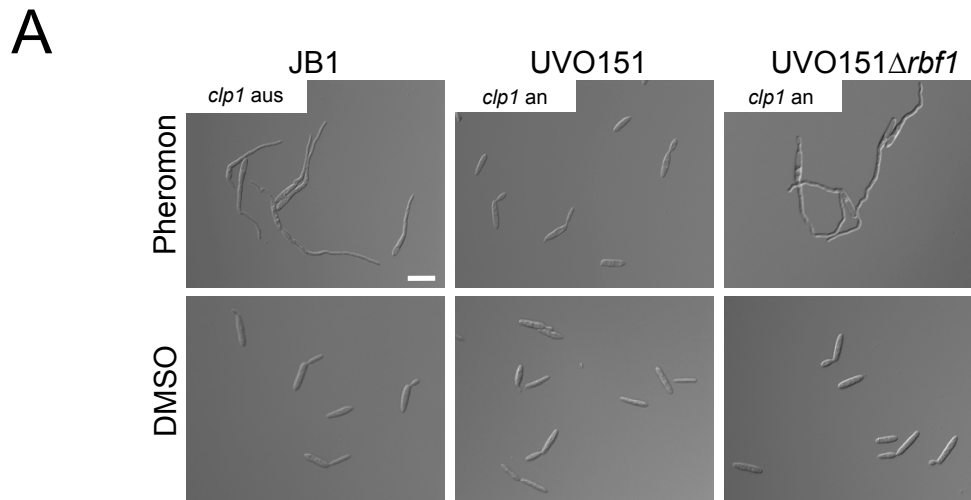


Abbildung 23: Die ektopische Expression von *clp1* blockiert die Pheromonantwort in Abhängigkeit von *rbf1*. (A) Zellen in der logarithmischen Wachstumsphase ($OD_{600}=0.25$) wurden mit $2,5 \mu\text{g/ml}$ (Endkonzentration) synthetischem $\alpha 2$ -Pheromon für 6 h stimuliert. Die Bildung der Konjugationshyphen wurde mikroskopisch untersucht. Als Kontrolle wurde DMSO verwendet (Lösungsmittel des Pheromons). In den Stämmen JB1 und UVOΔ*rbf1* wurde bei mehr als 80% der Zellen die Bildung von Konjugationshyphen beobachtet. Im Stamm UVO151 bildeten unter identischen Bedingungen weniger als 2% der Zellen Konjugationshyphen. Größenstandard = $15 \mu\text{M}$. (B) Analyse der *mfa1*-, *pra1*-, *prf1*-, und *rbf1*-Expression mittels qRT-PCR. Gezeigt sind die Mittelwerte von zwei technischen Replikaten sowie deren Standardabweichung (SD). Die Berechnung der Genexpression erfolgte relativ zum geringsten Expressionswert. Die Normalisierung der relativen Genexpression erfolgte durch Verwendung von Aktin (*act1*, *um11232*) und dem eukaryotischen Translationsinitiationsfaktor 2b (*eIF2b*, *um04869*) als Referenzgene.

Der Einfluss von Clp1 auf die durch Pheromon induzierte Expression von *mfa1*-, *pra1*-, *prf1*- und *rbf1*- wurde durch qRT-PCR analysiert. Mfa1 und Pra1 stellen den Ausgangspunkt, Prf1 den zentralen Regulator und *rbf1* ein Prf1-abhängig reguliertes Zielgen innerhalb der pheromoninduzierten Signalkaskade dar. Im Stamm JB1 wurde eine deutliche Induktion der *mfa1*-, *pra1*-, *prf1*- und *rbf1*-Genexpression in Folge der Pheromonstimulation beobachtet. Im Gegensatz dazu führte die Pheromonstimulation im Stamm UVO151 nicht zu einer erhöhten Expression der untersuchten Gene. Nach Deletion von *rbf1* im Stamm UVO151 wurde, ähnlich wie im Stamm JB1, eine deutlich induzierte Expression von *mfa1*, *pra1*, *prf1* und *rbf1* festgestellt (siehe Abb. 23B).

Somit kann gefolgert werden, dass die induzierte Expression von *clp1* die Aktivierung des Pheromonsignalwegs in Abhängigkeit von *rbf1* unterdrückt. Auf diese Weise wirkt Rbf1, vermutlich im Komplex mit Clp1 reprimierend auf die eigene Pheromon-induzierte Expression.

2.7 Clp1 ist notwendig für die *b*-abhängige Repression der

Pheromonantwort

Die sexuelle Entwicklung von *U. maydis* wird durch die *a*- und *b*-Paarungstyp-Loci kontrolliert, wobei der *a*-Locus die Zell/Zell-Erkennung und Fusion reguliert (Bölker *et al.*, 1992) und der *b*-Locus notwendig und ausreichend für die Regulation aller weiteren Schritte der sexuellen und pathogenen Entwicklung ist (Bölker *et al.*, 1995; Gillissen *et al.*, 1992). Die Aktivierung des *a*-Signalweges durch Pheromon führt zur Expression der *bE*- und *bW*-Gene. Nach der Heterodimerisierung kompatibler (allelisch unterschiedlicher) *bE*- und *bW*-Proteine wird die Expression der Gene des *a*-Locus reprimiert. Diese Repression wurde nach 48-stündiger Inkubation einer Kreuzung der Stämme FB1 und FB2 auf aktivkohlehaltigem Festmedium beobachtet. Die Abwesenheit von *b*-Bindestellen im *mfa*- und *pra*-Promotor ließ dabei auf eine indirekte Repression der *a*-Locus-Gene schließen (Hartmann *et al.*, 1996).

Um zu testen, ob die *b*-abhängige Repression der Pheromonantwort durch Clp1 vermittelt wird, wurde die Expression von *mfa1*, *pra1* und *prf1* in Kreuzungen der kompatiblen Stämme FB1 und FB2 und deren $\Delta clp1$ -Derivaten bestimmt. Die Deletion von *clp1* führt im Gegensatz zur Deletion von *rbf1* zu keiner Beeinträchtigung der *b*-abhängigen Filamentbildung (Kämper *et al.*, 2006), was einen direkten Vergleich der

Genexpression von Wildtypstämmen und $\Delta clp1$ -Derivaten erlaubt. Im Vergleich der Kreuzung $FB1\Delta clp1 \times FB2 \Delta clp1$ zur Kreuzung $FB1 \times FB2$ wurde eine vierfach erhöhte Expression der *a*-Locus-Gene *mfa1* und *pra1* beobachtet. Im Gegensatz dazu wurde keine Veränderung der *prf1* Expression beobachtet (siehe Abb. 24). Zusammenfassend zeigen die vorhandenen Daten, dass die *b*-abhängige Repression von *mfa1* und *pra1* durch Clp1 vermittelt wird.

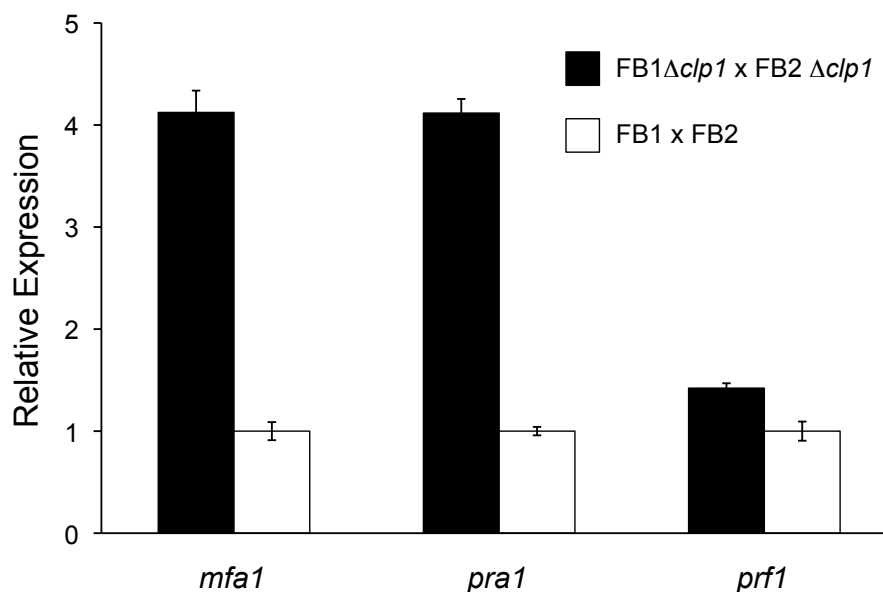


Abbildung 24: Die *b*-vermittelte Repression der Pheromonantwort durch *clp1*. Untersuchung der Genexpression von *mfa1*, *pra1* und *prf1* in der Kreuzung kompatibler FB1 und FB2-Stämme sowie deren $\Delta clp1$ Derivate mittels qRT-PCR. Gezeigt sind Mittelwerte von zwei technischen Replikaten sowie deren Standardabweichungen (SD). Die Berechnung der Genexpression erfolgte relativ zum geringsten Expressionswert. Die Normalisierung der relativen Genexpression erfolgte durch Verwendung von Aktin (*um11232*) und dem eukaryotischen Translationsinitiationsfaktor 2b (*eIF2b*, *um04869*) als Referenzgene.

2.8 Die Regulation der pathogenen Entwicklung durch Rbf1 und

Clp1

Die Paarungstyp-Loci als Kontrollinstanzen der sexuellen und pathogenen Entwicklung von *U. maydis* stehen in einem komplexen Geflecht regulatorischer Wechselwirkungen untereinander in Verbindung. Basierend auf den in vorangegangenen Experimenten gewonnenen Daten wurde eine zentrale Funktion von Rbf1 und Clp1 in der Regulation pathogenitätsrelevanter Entwicklungsprozesse vermutet. Beide Faktoren

repräsentieren unter den 12 Genen, die direkt von *b*- und unabhängig von *Rbf1*-reguliert sind, die einzigen mit einer essentiellen Funktion für die pathogene Entwicklung von *U. maydis*. Ein Verlust der Pathogenität nach Deletion des *b*-Locus könnte somit ausschließlich in dem Verlust der *rbf1*- und *clp1*-Expression begründet sein.

Um diese Annahmen zu überprüfen, wurden die Stämme UKH184 (*a1 Δb::P_{Iga2}:rbf1*) und UKH186 (*a2 Δb::P_{Iga2}:rbf1*) generiert, in denen der *b*-Locus deletiert und zusätzlich zum endogenen *rbf1*-Gen eine weitere *rbf1*-Kopie unter der Kontrolle des *Iga2*-Promotors in den *b*-Locus integriert wurde (*rbf1: b*-Locus) (siehe Abb. 25 A). Die Expression von *Iga2* wird zum einen direkt durch das *b*-Heterodimer induziert (Romeis *et al.*, 2000) und kann darüber hinaus, unabhängig von *b* durch eine induzierte Expression von *rbf1* oder durch Pheromonbehandlung ausgelöst werden (Heimel *et al.*, 2010; Urban *et al.*, 1996b; Zarnack *et al.*, 2008). Auf diese Weise steht die *rbf1*-Expression in den generierten Stämmen in einer positiven Rückkopplungsschleife (siehe Abb. 25A). Durch Zugabe von Pheromon sollte eine Aktivierung des Systems erfolgen und dadurch eine hohe Expression von *rbf1* in Abwesenheit eines aktiven *b*-Heterodimeres gewährleistet sein. In den Stämmen UKH178 (*a1 Δb::P_{Iga2}:rbf1 P_{Iga2}:clp1*) und UKH180 (*a2 Δb::P_{Iga2}:rbf1 P_{Iga2}:clp1*) steht zusätzlich die Expression von *clp1* unter der Kontrolle des *Iga2*-Promotors (siehe Abb. 25B) (Integration von *clp1: ip*-Locus). Die Interaktion von *Clp1* und *Rbf1* führt zur Repression der Pheromonantwort. Auf diese Weise wird die pheromonabhängige Expression des endogenen *rbf1*-Gens reprimiert und eine negative Rückkopplungsschleife etabliert (siehe Abb. 25B (4+5)). Ähnlich zu der in Wildtypstämmen beobachteten negativen Autoregulation von *Clp1* und dem *b*-Heterodimer (siehe Diskussion 3.3) sollte dadurch eine Hyperaktivierung des regulatorischen Netzwerkes vermieden und die Re-Initiation des Zellzyklus und das dikaryotische Wachstum innerhalb der Pflanze ermöglicht werden.

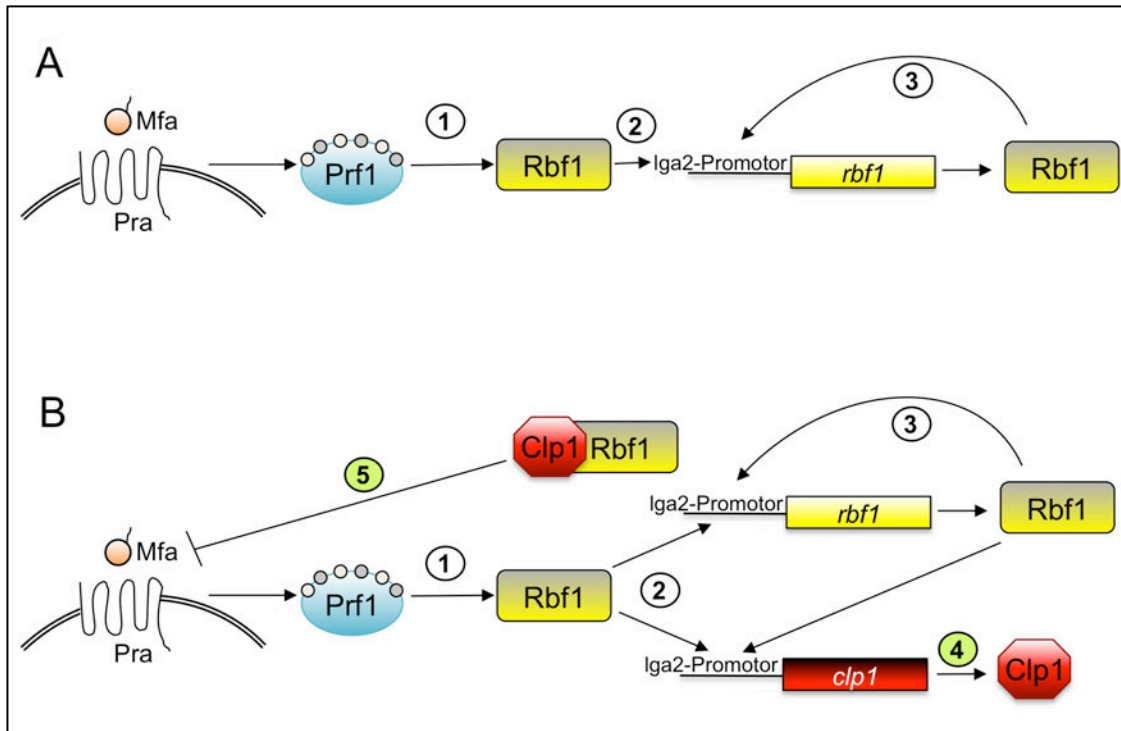


Abbildung 25: Übersicht der regulatorischen Verknüpfungen in den Stämmen (A) UKH184, UKH186 und (B) UKH178, UKH180. (1) Die Aktivierung des Pheromonsignalweges durch die Zugabe von kompatibelem Pheromon führt zur Expression von Rbf1. (2) Darauf folgend wird die Expression von *rbf1* (in A und B) und *clp1* (in B) unter der Kontrolle des *Iga2*-Promotors induziert. (3) Auf diese Weise wird eine positive Autoregulation der *rbf1*-Expression etabliert. (4) Die Expression des Clp1-Proteins ist posttranskriptionell reguliert und erfolgt erst nach der Penetration der Pflanzenoberfläche. (5) Die Interaktion von Clp1 und Rbf1 führt zur Repression der *mfa1*-Expression wodurch eine Hyperaktivierung des regulatorischen Netzwerkes verhindert und die Re-Initiation des Zellzyklus *in planta* vermittelt werden sollte. Weiße Markierungen (1 bis 3) stellen die Regulation auf der Pflanzenoberfläche, grüne Markierungen (4 und 5) die Regulation *in planta* dar.

2.8.1 Die initiale Phase der pathogenen Entwicklung wird durch Rbf1 gesteuert

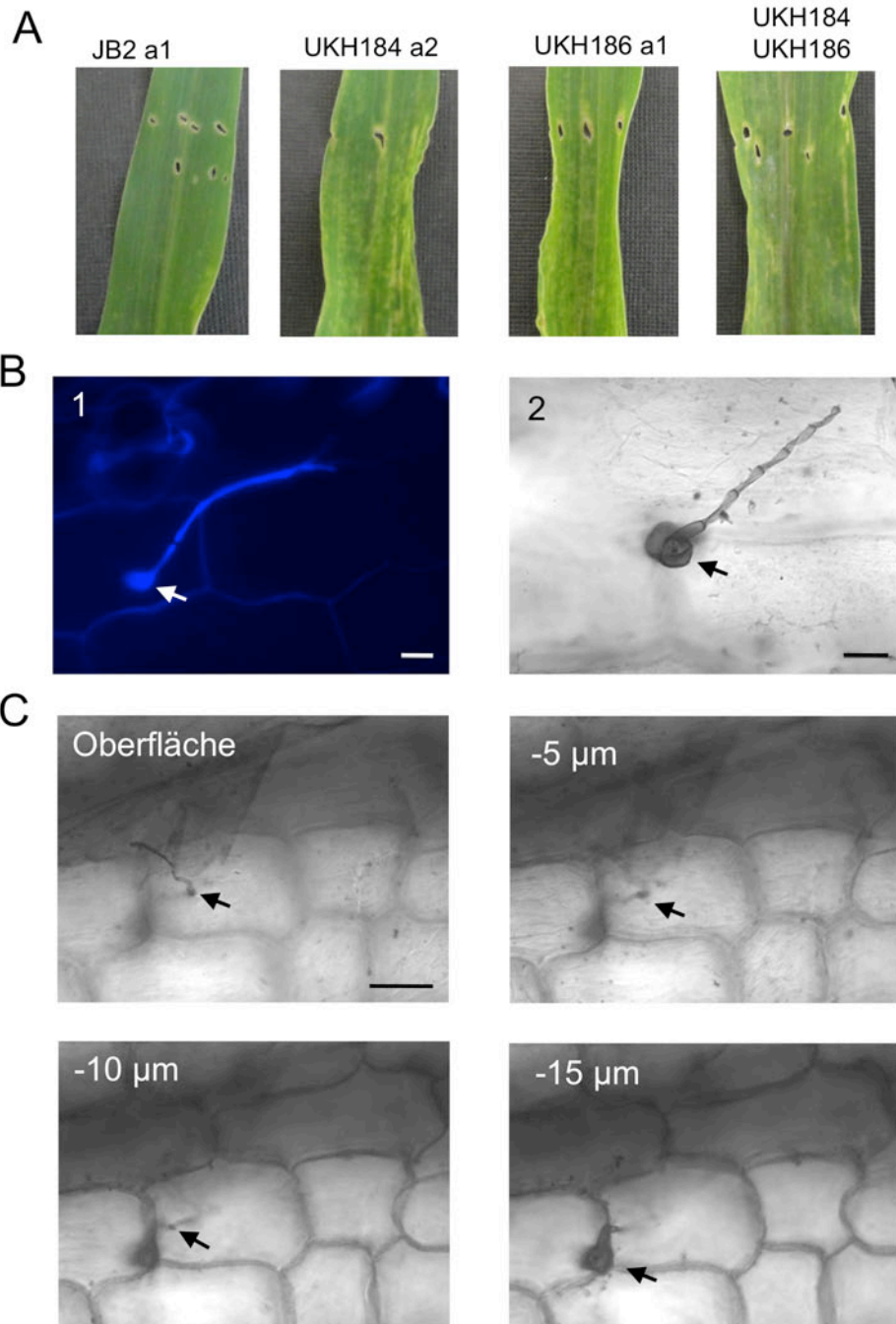
Die Fähigkeit der generierten Stämme zur Initiation der pathogenen Entwicklung wurde in Pflanzeninfektionen getestet. Alle Experimente wurden mit mindestens zwei unabhängigen Transformanten wiederholt, was zu identischen Ergebnissen führte. Die im Folgenden gezeigten Ergebnisse sind als repräsentativ zu betrachten. Maispflanzen wurden mit UKH184 ($a1 \Delta b::P_{Iga2}:rbf1$) und UKH186 ($a2 \Delta b::P_{Iga2}:rbf1$) jeweils einzeln, mit Addition kompatibelem Pheromon (2,5 $\mu\text{g/ml}$) und einer Mischung beider Stämme infiziert. Als Kontrollstamm wurde JB2 ($a2 \Delta b$) verwendet, der vor der Inokulation ebenfalls mit kompatibelem Pheromon behandelt wurde.

Sechs Tage nach Infektion wurden deutliche Infektionssymptome beobachtet. Die Infektion mit einer Mischung beider Stämme zeigte eine ähnlich hohe Infektionsrate wie die mit Pheromon behandelten Einzelstämme. Die Inokulation des Kontrollstammes JB2 mit kompatibelem Pheromon führte unter identischen

Bedingungen zur Ausbildung von leichten Infektionssymptomen (lokale Nekrosen an der Injektionsstelle) (siehe Abb. 26A).

Zur Visualisierung der initialen pathogenen Entwicklung auf der Pflanzenoberfläche wurden 2 dpi Blattproben entnommen und mit Calcofluor gefärbt. Bei der mikroskopischen Analyse zeigte sich, dass die Zellen der Stämme UKH184 und UKH186, sowie die Mischung beider Stämme in der Lage waren, filamentös zu wachsen und Appressorien zu bilden (siehe Abb. 26B). Im Gegensatz zu den Stämmen UKH184 und UKH186 wurde bei dem Stamm JB2 keine Appressorienbildung beobachtet. Diese Daten weisen darauf hin, dass die Aktivierung des regulatorischen Netzwerkes durch Pheromon zu einer erhöhten Infektionsrate führt. Die Virulenz der Stämme steigt offensichtlich proportional zur *rbf1*-Expression.

Im Gegensatz zu einer Infektion mit Stämmen mit kompatiblen *b*-Genen führte die Infektion mit UKH184 und UKH186 zu keiner Tumorbildung. Zur Untersuchung der pilzlichen Morphologie und der Proliferation *in planta* wurden 4 dpi Blattproben entnommen und mit Chlorazole-Black-E gefärbt (siehe Abb. 26C). Es wurden keine morphologischen Unterschiede zwischen den verschiedenen Ansätzen (Einzelstämme oder Mischung) beobachtet. Bei der mikroskopischen Untersuchung der Blattproben wurde in allen Ansätzen eine große Anzahl ballonartig vergrößerter Zellen beobachtet. Diese Aufwölbung erfolgte zumeist direkt nach der Appressorienbildung (siehe Abb. 26B2). Es wurde in den meisten Fällen keine weitere Proliferation *in planta* beobachtet. Im Falle einer Proliferation beschränkte sich diese auf nicht mehr als zwei Pflanzenzellen und führte in jedem Fall zur einer ballonartigen Aufwölbung der terminalen Pilzzelle (siehe Abb. 26C). Ähnliche Verdickungen der Zellen wurden nach der Inaktivierung eines temperatursensitiven *b*-Heterodimeres während des pathogenen Wachstums *in planta* beobachtet. Dieser Phänotyp trat bereits 9 h nach Inaktivierung des *b*-Heterodimeres auf. Es wurde vermutet, dass der Verlust der *clp1*-Expression ursächlich für diesen Phänotyp ist (Wahl *et al.*, 2010). Diese sind isogen zu UKH184 und UKH186, zusätzlich wurde das Plasmid pRWnlsGFP (Wahl *et al.*, 2010) ektopisch integriert, wodurch die Visualisierung der Zellkerne während des Wachstums innerhalb der Pflanze ermöglicht wurde. In Infektionsexperimenten mit einer Mischung beider Stämme wurde die pilzliche Entwicklung über einen Zeitraum von drei Tagen mikroskopisch untersucht. Dabei zeigte sich, dass die verwendeten Stämme in der Lage sind, Dikaryen auf der Pflanzenoberfläche zu bilden (siehe Abb.27.)



Zur Untersuchung der Kernteilung während der Entwicklung *in planta* wurden die Stämme UKH192 ($a1 \Delta b::P_{Iga2}:rbf1 P_{mig2_5}:NLS:3xeGFP$) und UKH194 ($a2 \Delta b::P_{Iga2}:rbf1 P_{mig2_5}:NLS:3xeGFP$) verwendet. Abbildung 26: Pathogenitätstest der Stämme UKH184 ($a1 \Delta b::P_{Iga2}:rbf1$) und UKH186 ($a2 \Delta b::P_{Iga2}:rbf1$). (A) Blattproben wurden 6 dpi entnommen. Leichte Infektionssymptome wie Chlorosen und lokale Nekrosen wurden bei allen Versuchsansätzen beobachtet. Die Pheromon-induzierte Aktivierung der *rbf1*-Expression in den Stämmen UKH184 und UKH 186 führte zu einer deutlichen Verstärkung der Infektionssymptome. (B) Untersuchung des filamentösen Wachstums und der Appressorienbildung (Pfeile markieren die Appressorien). Der Größenstandard entspricht 20 μm . (B1) Calcofluor-Färbung 2 dpi. UKH184 und UKH186 sind in der Lage Appressorien zu bilden. (B2) Chlorazole-Black-E-Färbung 4 dpi. Verdickung und Aufwölbung der Appressorien. (C) Chlorazole-Black-E-Färbung 4 dpi. Optische Schnitte beginnend von der Pflanzenoberfläche in 5 μm Abständen. Penetration der Pflanzenoberfläche und ballonartige Aufwölbung nach kurzer Proliferation der Pilzhyphe (Pfeile markieren den Penetrationspunkt und die weitere Proliferation der Pilzhyphe). Der Größenstandard entspricht 50 μm .

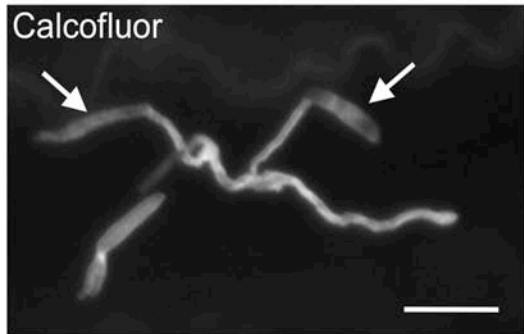


Abbildung 27: Bildung eines Dikaryons auf der Pflanzenoberfläche. Calcofluor-Färbung nach Inokulation mit einer Mischung aus UKH192 ($a1 \Delta b::P_{lga2}:rbf1 P_{mig2_5}:NLS:3xeGFP$) und UKH194 ($a2 \Delta b::P_{lga2}:rbf1 P_{mig2_5}:NLS:3xeGFP$) (1 dpi). Pfeile markieren die haploiden Sporidien. Ausgehend von diesen wurde durch Fusion der Konjugationshyphen die Bildung eines Dikaryons beobachtet. Der Größenstandard entspricht 20 μm .

Übereinstimmend mit den Ergebnissen der Chlorazole-Black-E Färbung wurde nach der Penetration der Pflanzenoberfläche keine weitere Proliferation der Hyphen, sondern die Bildung ballonartiger Zellen beobachtet. Innerhalb dieser Zellen wurden sowohl ein als auch zwei Zellkerne beobachtet (siehe Abb. 28), was auf die Infektion von Mono- oder Dikaryen zurückzuführen ist. Es wurde auch zu späteren Zeitpunkten (bis 3 dpi) keine weitere Proliferation der Pilzhypen beobachtet. Zusammenfassend zeigen diese Untersuchungen, dass die Expression von *rbf1* ausreichend für die Appressorienbildung und die Penetration der Pflanzenoberfläche ist.

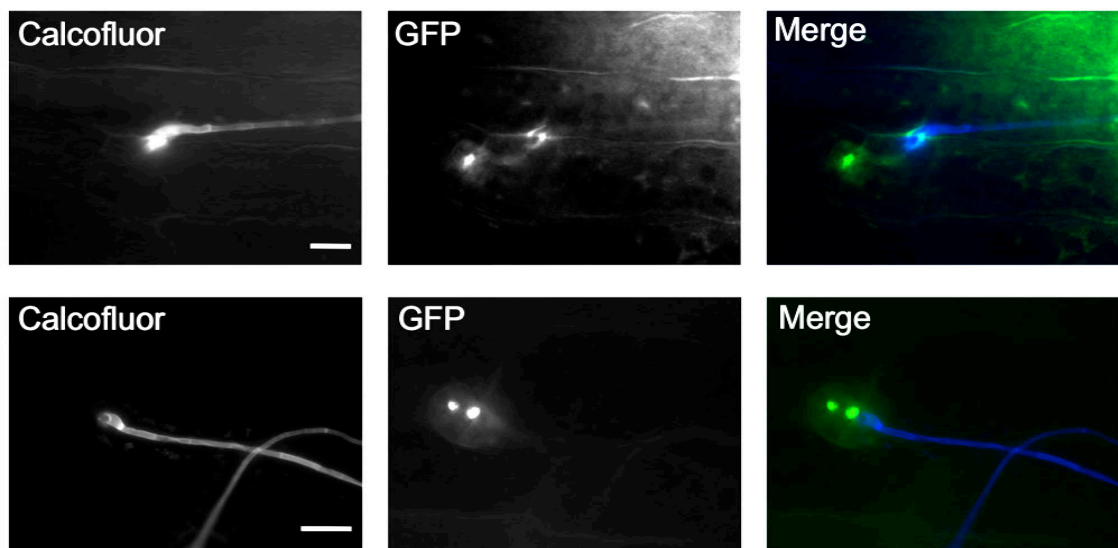


Abbildung 28: Rbf1-induzierte Pflanzeninfektion als Mono- oder Dikaryon. Die Stämme UKH192 ($a1 \Delta b::P_{lga2}:rbf1 P_{mig2_5}:NLS:3xeGFP$) und UKH194 ($a2 \Delta b::P_{lga2}:rbf1 P_{mig2_5}:NLS:3xeGFP$) sind als Monokaryon (oben) oder Dikaryon (unten) infektiös kompetent. In beiden Fällen erfolgte direkt nach der Penetration der Pflanzenoberfläche die Bildung ballonartig aufgeblähter Zellen, in denen sich ein (oben) oder zwei (unten) Zellkerne befanden. Die Probenahme erfolgte 2 dpi. Zur gleichzeitigen Visualisierung des Wachstums auf der Pflanzenoberfläche (Calcofluor) und *in planta* (GFP) sind die Aufnahmen als Maximalprojektion von Z-Stapeln dargestellt. Der Größenstandard entspricht 20 μm .

2.8.2 Rbf1 und Clp1 steuern die Appressorienbildung, die Penetration der

Pflanzenoberfläche und die Proliferation *in planta*

Die in dem vorangegangenen Versuchsansatz gewonnenen Ergebnisse zeigten, dass die Expression von *rbf1* ausreichend für die Appressorienbildung und Penetration der Pflanzenoberfläche ist, jedoch keine weitere Proliferation der Pilzhyphen erlaubt. Durch Pflanzeninfektionsexperimente mit den Stämmen UKH178 (*a1 Δb::P_{Iga2}:rbf1 P_{Iga2}:clp1*) und UKH180 (*a2 Δb::P_{Iga2}:rbf1 P_{Iga2}:clp1*) (siehe 2.8) wurde überprüft, ob die Co-Expression von *clp1* und *rbf1* unter der Kontrolle des *Iga2*-Promotors ausreichend ist, um eine mögliche Hyperaktivierung des regulatorischen Netzwerkes zu verhindern. Sollte dies der Fall sein, würde analog zur Clp1/bW-Regulation auch hier eine negativ autoregulatorische Feedbackschleife etabliert werden die eine Re-Initiation des Zellzyklus und die Proliferation innerhalb der Pflanze ermöglichen sollte. Die Infektionsexperimente wurden analog zum vorangegangenen Versuchsansatz durchgeführt und analysiert. Sechs Tage nach der Inokulation wurden in allen Ansätzen deutliche Infektionssymptome wie die Bildung ausgeprägter Chlorosen und lokaler Nekrosen beobachtet. Auch bei der Inokulation der Stämme UKH178 und UKH180 ohne Pheromon wurden Infektionssymptome in abgeschwächter Form beobachtet (siehe Abb. 29A). Bei der mikroskopischen Analyse Calcofluor-gefärbten Pflanzenmaterials 2 dpi zeigte sich, dass die mit Pheromon behandelten Stämme UKH178 (*a1 Δb::P_{Iga2}:rbf1 P_{Iga2}:clp1*) und UKH180 (*a2 Δb::P_{Iga2}:rbf1 P_{Iga2}:clp1*) in der Lage waren, filamentös zu wachsen und Appressorien zu bilden (siehe Abb. 29B1). Im Gegensatz zu den Stämmen UKH184 (*a1 Δb::P_{Iga2}:rbf1*) und UKH186 (*a1 Δb::P_{Iga2}:rbf1*) wurde zusätzlich ein deutliches Wachstum der Hyphen innerhalb der Pflanze beobachtet. Die erhöhte Autofluoreszenz infizierter Pflanzenzellen deutet dabei auf eine Pflanzenabwehrreaktion hin (siehe Abb. 29B2). Bezüglich der Morphologie waren keine Unterschiede zwischen den mit Pheromon behandelten haploiden Stämmen oder einer Mischung derer zu erkennen. Schnallenzellen wurden im Vergleich zu dem als Kontrolle verwendeten Stamm SG200 nicht beobachtet. Vielmehr zeigten sich bei einer großen Anzahl der Hyphen ballonartige Aufwölbungen der apikalen Zellkompartimente (siehe Abb. 29C). Im Gegensatz zu den Stämmen UKH184 (*a1 Δb::P_{Iga2}:rbf1*) und UKH186 (*a2 Δb::P_{Iga2}:rbf1*), bei denen jeweils eine große terminale Aufwölbung der Pilzhyphen während oder direkt im Anschluss an die Penetration der Pflanzenoberfläche beobachtet wurde, traten in den Stämmen UKH178 (*a1 Δb::P_{Iga2}:rbf1 P_{Iga2}:clp1*) und UKH180 (*a2 Δb::P_{Iga2}:rbf1 P_{Iga2}:clp1*) häufig mehrere dieser Aufwölbungen besonders in oder in der Nähe von Leitbündelscheiden auf (siehe Abb. 29C).

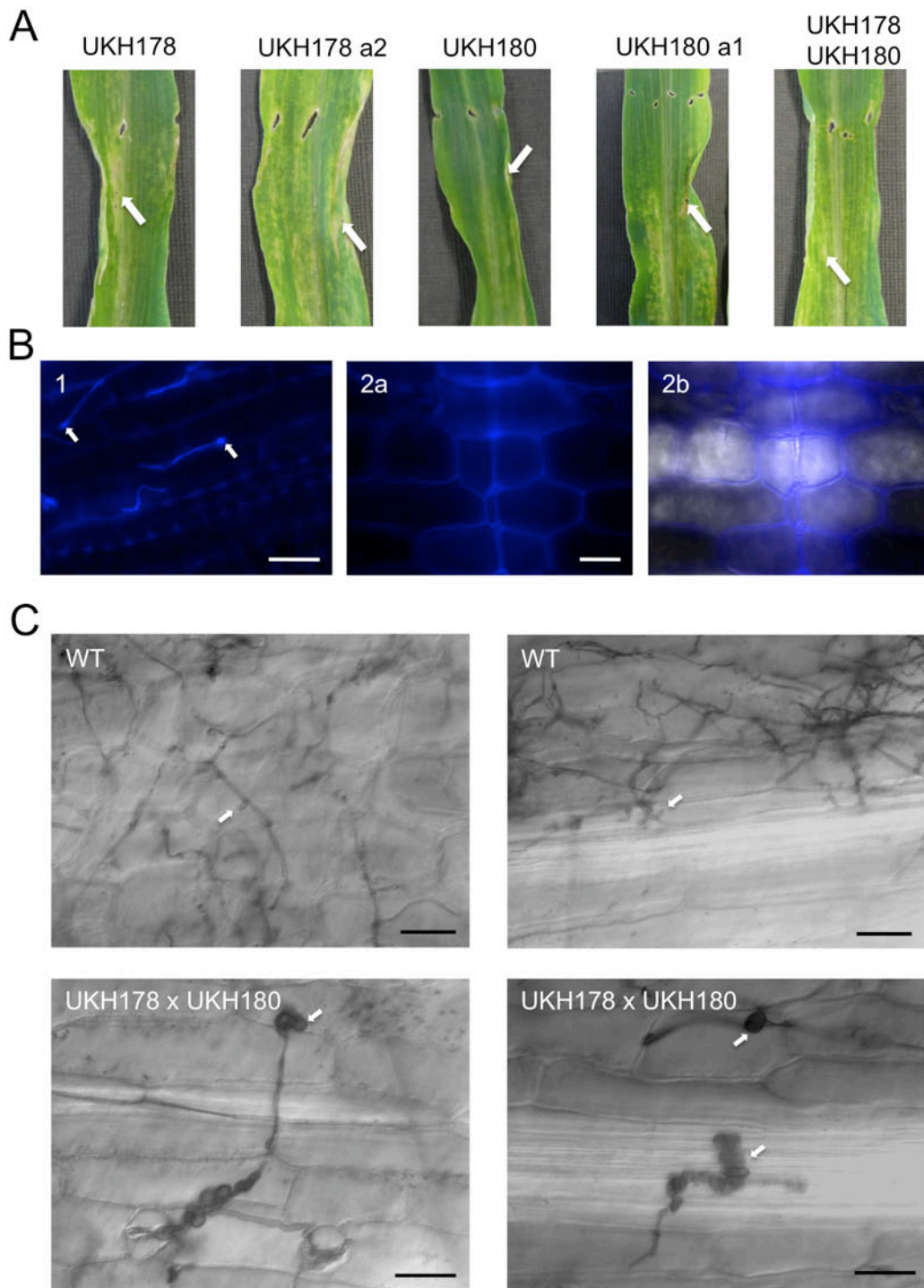


Abbildung 29: Pathogenitätstest der Stämme UKH178 (*a1* $\Delta b::P_{Iga2}:rbf1 P_{Iga2}:clp1$) und UKH180 (*a2* $\Delta b::P_{Iga2}:rbf1 P_{Iga2}:clp1$). (A) Die Entnahme der Blattproben erfolgte 6 dpi. Pfeile markieren nekrotische Bereiche unterhalb der Injektionsstellen. (B) Visualisierung des filamentösen Wachstums auf der Pflanzenoberfläche durch Calcofluor-Färbung. Die Blattentnahme erfolgte 2 dpi. (B1) UKH178 und UKH180 sind in der Lage Appressorien zu bilden. Pfeile markieren Appressorien. (B2a) Verstärkte Autofluoreszenz infizierter Pflanzenzellen. (B2b) Überlagerung von B2a und lichtmikroskopischer DIC-Aufnahme. (C) Chlorazole-Black-E-Färbung des infizierten Blattmaterials. Die Probenentnahme erfolgte 4 dpi. Der als Kontrolle verwendete Stamm SG200 (WT) zeigt eine ausgeprägte Proliferation. Pfeile markieren Schnallenzellen. Bei der Inokulation mit den Stämmen UKH178 und UKH180 oder einer Mischung aus beiden Stämmen wurde keine Bildung von Schnallenzellen beobachtet. Pfeile markieren ballonartige Aufwölbungen der Hyphen. Der Größenstandard entspricht 50 μ m.

Zur Visualisierung der Kernteilung *in planta* wurde das Plasmid pRWnlsGFP (Wahl *et al.*, 2010), analog zum vorherigen Versuchsteil, verwendet. Eine Mischung der generierten Stämme UKH188 ($a1 \Delta b::P_{lga2}:rbf1 P_{lga2}:clp1 P_{mig2_5}:NLS:3xeGFP$) und UKH190 ($a2 \Delta b::P_{lga2}:rbf1 P_{lga2}:clp1 P_{mig2_5}:NLS:3xeGFP$) wurde für die Infektionsexperimente verwendet. Übereinstimmend mit vorangegangenen Untersuchungen wurde die Bildung von Appressorien und die Penetration der Pflanzenoberfläche beobachtet. Im Gegensatz zu den Stämmen UKH192 ($a1 \Delta b::P_{lga2}:rbf1 P_{mig2_5}:NLS:3xeGFP$) und UKH194 ($a2 \Delta b::P_{lga2}:rbf1 P_{mig2_5}:NLS:3xeGFP$) führte dies nicht unmittelbar zur Ausbildung der ballonartigen Zellen (siehe Abb. 30, 1 dpi). 2 dpi wurde ausgeprägtes filamentöses Wachstum mit einer normalen Septierung (nicht gezeigt) der Zellen beobachtet. Auffällig war hierbei die oftmals ungerade Anzahl an Zellkernen, die zusätzlich in ungewöhnlich kurzen Abständen zueinander angeordnet waren (siehe Abb. 30, 2 dpi, 3 dpi). Diese Beobachtung deutet eine asynchrone Kernteilung an und steht im Kontrast zu Wildtypzellen bei denen eine synchrone Kernteilung (gerade Anzahl an Zellkernen) beobachtet wurde (Scherer *et al.*, 2006). Im weiteren Infektionsverlauf (2-3 dpi) wurde ein zunehmender Verlust des polaren Wachstums und die Bildung ballonartiger, größtenteils unseptierter Strukturen beobachtet, innerhalb derer sich zumeist mehrere Zellkerne befanden (siehe Abb. 30, 2 dpi, 3 dpi). Zusammenfassend zeigen die vorliegenden Daten, dass die Expression von *rbf1* und *clp1* ohne aktives b-Heterodimer ausreichend für die Appressorienbildung, die Penetration der Pflanzenoberfläche, die Re-Initiation des Zellzyklus und die Proliferation *in planta* ist. Diese Beobachtungen verifizieren das zuvor postulierte Modell der pathogenen Entwicklung und unterstreichen die zentrale Rolle von Rbf1 und Clp1 in der Regulation von polarem Wachstum, Zellzyklus und der biotrophen Entwicklung von *U. maydis*.

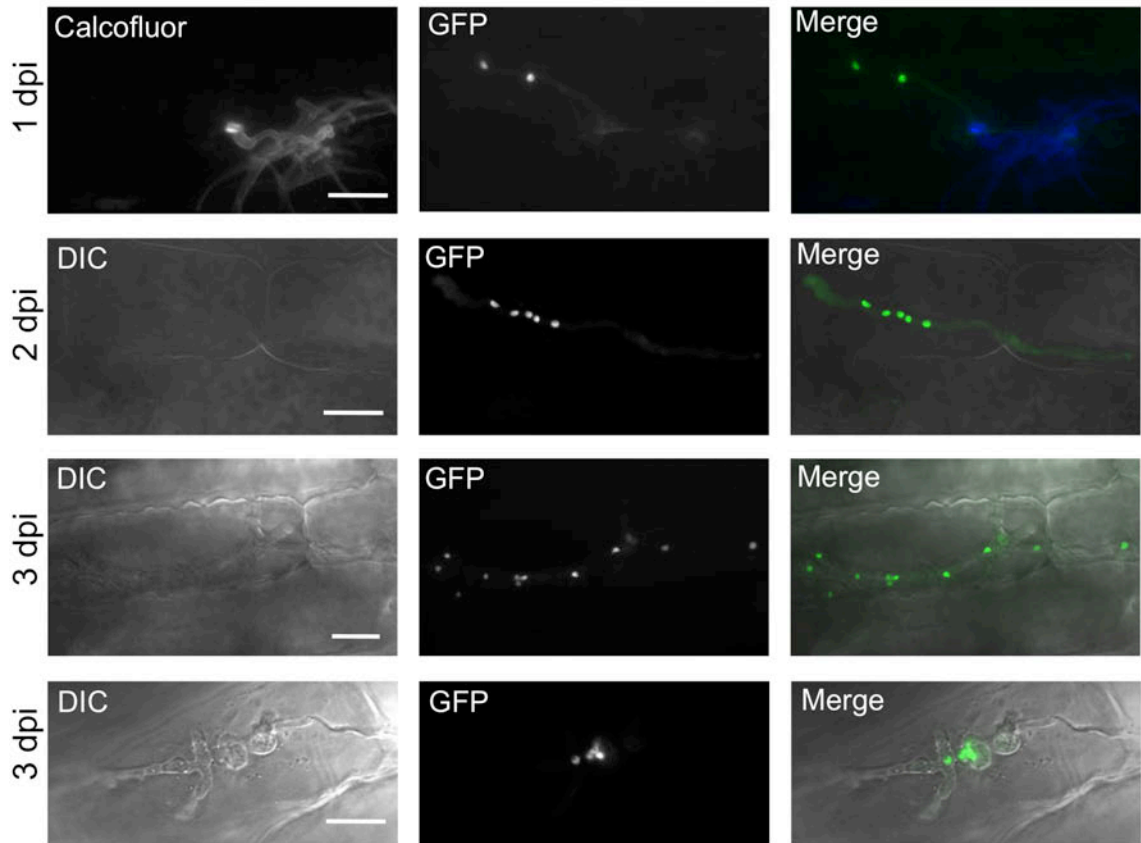


Abbildung 29: Die Expression von Rbf1 und Clp1 erlaubt die Proliferation von *U. maydis* in planta. Die Stämme UKH188 ($a1 \Delta b::P_{lga2}:rbf1 P_{lga2}:clp1 P_{mig2_5}:NLS:3xeGFP$) und UKH190 ($a2 \Delta b::P_{lga2}:rbf1 P_{lga2}:clp1 P_{mig2_5}:NLS:3xeGFP$) können Appressorien bilden, innerhalb der Pflanze filamentös wachsen und sind fähig zur Re-Initiation des Zellzyklus und damit zur Kernteilung. Zur Visualisierung des pilzlichen Wachstums auf der Pflanzenoberfläche wurden die Blattproben 1 dpi mit Calcofluor gefärbt. Postpenetrative Entwicklungsstadien sind durch GFP markiert. Im Verlauf der Infektion ist die zunehmende Anhäufung von Zellkernaggregaten deutlich erkennbar. Diese Anhäufung geht mit dem Verlust des polaren Wachstums einher und führt zur Bildung ballonartig aufgeblähter Zellstrukturen. Zur Verbesserung der Tiefenschärfe sind die Aufnahmen als Maximalprojektionen von Z-Stapeln dargestellt. Der Größenstandard entspricht 50 µm.

3 Diskussion

In der vorliegenden Studie wurden neue Einsichten in die komplexen Verknüpfungen regulatorischer Netzwerke während der sexuellen und pathogenen Entwicklung von *U. maydis* gewonnen. Die pathogene Entwicklung von *U. maydis* wird durch ein komplexes transkriptionelles Netzwerk unter der Kontrolle des b-Heterodimeres gesteuert. Ein zentraler Schalter innerhalb dieser Regulationskaskade ist der C2H2-Zinkfinger Transkriptionsfaktor Rbf1, der sowohl notwendig als auch ausreichend ist die initialen Schritte der pathogenen Entwicklung, wie filamentöses Wachstum, G2-Zellzyklusarrest, Appressorienbildung und die Penetration der Pflanzenoberfläche einzuleiten. Für die weitere Proliferation des Heterodikaryons während der biotrophen Entwicklung wird Clp1 benötigt. Clp1 interagiert mit dem bW-Protein und inhibiert b-induziertes filamentöses Wachstum, Zellzyklusarrest und die b-abhängige Genregulation vollständig. Im Gegensatz dazu führt die Interaktion mit Rbf1 zur spezifischen Repression von *mfa1*. Somit werden durch Clp1 sowohl die a- als auch die b-abhängigen Signalwege reprimiert und die Entwicklung *in planta* gesteuert. Interessanterweise wird für das biotrophe Wachstum von *U. maydis* mit Cib1 ein weiterer mit Clp1 interagierender Transkriptionsfaktor benötigt, dessen Proteinexpression durch alternatives Spleißen auf die biotrophe Entwicklung von *U. maydis* beschränkt ist.

3.1 Num1 und Fkh1 sind essentiell für die pathogene Entwicklung, aber nicht für die Schnallenbildung

Die Zellkernverteilung während des heterodikaryotischen Wachstums von *U. maydis* erfolgt mit Hilfe von Schnallenzellen (Scherer *et al.*, 2006). Voraussetzung für die Bildung dieser Strukturen ist die präzise Koordination komplexer zellulärer Prozesse wie polares Wachstum, Zellkernwanderung, -teilung und -sortierung, Zellzykluskontrolle und Septierung (Kamada, 2002; Kozubowski and Heitman, 2009; Kües, 2000). Mit Num1, dessen Homolog in *C. cinerea* notwendig für die Zellkernverteilung ist, und Fkh1, welches spezifisch zum Zeitpunkt der Schnallenbildung exprimiert wird, wurden zwei potenzielle Regulatoren der Schnallenbildung untersucht. Beide Faktoren sind in *U. maydis* notwendig für die Pathogenität, jedoch nicht für die Schnallenbildung.

Für Num1 wurde eine mögliche Funktion bei der Zellkernverteilung während des dikaryotischen Wachstums von *U. maydis* vermutet. Tatsächlich wurden bei der fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung von $\Delta num1$ -Stämmen während des Wachstums *in planta* Hyphenkompartimente ohne Zellkern beobachtet, was auf eine defekte Kernverteilung hindeutet. Die präzise Positionierung des Zellkernes wird durch das Motorprotein Dynein (Dyn1) vermittelt und ist Voraussetzung für ausgeprägtes polares Wachstum (Fuchs, *et al.*, 2005). Die Lokalisierung von Dynein am Zellapex ist dabei abhängig vom konventionellen Kinesin 1 (Kin1) (Lenz, *et al.*, 2006), für das in Hefe-Zwei-Hybrid Untersuchungen eine Interaktion mit Num1 gezeigt wurde (Kellner, 2009). Ähnlich wie die Deletion von *kin1* beeinflusst die Deletion von *num1* das *b*-abhängige filamentöse Wachstum und führt zur fehlerhaften Septierung der Pilzhyphen. Diese Beobachtungen sind ein starkes Indiz für eine funktionelle Kopplung von Kin1 und Num1. Der Verlust der Pathogenität in $\Delta num1$ -Stämmen könnte somit die Konsequenz eines defekten Zellkerntransportes oder einer fehlerhaften Septierung sein. Im Gegensatz zur Deletion von *num1* führt die Deletion von *kin1* jedoch nicht zum vollständigen Verlust der Pathogenität (Lehmler, *et al.*, 1997). Folglich scheinen weitere Kin1-unabhängige Funktionen von Num1 notwendig für die pathogene Entwicklung von *U. maydis* zu sein.

Auch für das pflanzenspezifisch exprimierte *fkh1*-Gen konnte keine Funktion bei der Schnallenbildung nachgewiesen werden. Die Deletion von *fkh1* führt zu einer drastisch reduzierten Virulenz, welche vermutlich in einer verstärkten Pflanzenabwehrreaktion begründet ist. Neben dem Einschluss der Pilzhyphen durch eine aus Callose und Zellulose bestehende Matrix wurde eine starke Akkumulation von H₂O₂ in infizierten Pflanzenzellen in und um die Pilzhyphen herum beobachtet (A. Zahiri, pers. Mitteilung). Der Einschluss von Pilzhyphen durch derartige pflanzliche Matrices ist eine in anderen Pathosystemen bekannte Pflanzenabwehrreaktion, wurde im *U. maydis*/Mais-Pathosystem jedoch bisher nicht beobachtet (Hückelhoven, 2007). Das biotrophe Wachstum phytopathogener Pilze erfordert die Unterdrückung derartiger Abwehrreaktionen. Die Etablierung einer kompatiblen Pilz-Pflanzen-Interaktion wird durch sekretierte Proteine, sogenannte Effektoren vermittelt (Doehlemann, *et al.*, 2009; Kämper *et al.*, 2006; O'connell and Panstruga, 2006; Schulze-Lefert and Panstruga, 2003) und ist Voraussetzung für biotrophes Wachstum phytopathogener Pilze. Die Funktion dieser Effektoren ist neben der aktiven oder passiven Unterdrückung von Pflanzenabwehrreaktionen die Umleitung von Nährstoffströmen um optimale Bedingungen für das Wachstum des Pathogens innerhalb der Pflanze zu schaffen (Doehlemann, *et al.*, 2008a). Der nach Deletion von *fkh1* beobachtete Phänotyp ließ

eine mögliche Funktion von Fkh1 in der Regulation von sekretierten Effektorproteinen vermuten. In einer vergleichenden Transkriptomanalyse wurde in Übereinstimmung mit dieser Annahme eine Vielzahl von Genen, die für potentielle Effektoren kodieren als dereguliert identifiziert. Darunter befinden sich einige in Clustern angeordnete Gene, die für potentiell sekretierte Effektoren kodieren und für die bereits eine Rolle in der pathogenen Entwicklung von *U. maydis* gezeigt wurde (A. Zahiri, pers. Mitteilung; Kämper *et al.*, 2006). Die durch $\Delta fkh1$ -Stämme ausgelöste Pflanzenabwehrreaktion ist daher vermutlich in der Deregulation dieser Effektorproteine begründet.

Unklar ist, ob der Verlust der Pathogenität von $\Delta fkh1$ -Stämmen ausschließlich in der Pflanzenabwehrreaktion begründet ist oder ob darüber hinaus weitere Faktoren zum vollständigen Stopp der pilzlichen Entwicklung führen.

3.2 Clp1 interagiert mit essentiellen Regulatoren der pathogenen Entwicklung *in vitro* und *in vivo*

Das Hefe-Zwei-Hybrid System ist die am häufigsten verwendete Methode zur Untersuchung von unbekanntem Protein-Protein-Interaktionen (Van Crieginge and Beyaert, 1999). Ein oftmals beschriebenes Problem bei der Verwendung des Hefe-Zwei-Hybrid Systems ist das Auftreten von „falsch positiven“ Resultaten (Serebriiskii, *et al.*, 2000). Zur Verifikation der im Hefe-Zwei-Hybrid System beobachteten Protein-Protein-Interaktionen von Clp1 mit bW, Rbf1 und Cib1 wurden zwei komplementäre Ansätze gewählt. Durch Co-Immunpräzipitation der zellfrei exprimierten Myc-, beziehungsweise HA-markierten Proteine konnte eine physikalische Interaktion von Clp1 mit bW, Rbf1 und Cib1 *in vitro* gezeigt werden. Für die Expression von bW und Rbf1 wurden die in vorangegangenen Studien im Hefe-Zwei-Hybrid isolierten Proteinfragmente verwendet, da die vollständigen bW und Rbf1 Proteine nicht erfolgreich *in vitro* exprimiert werden konnten. Ein möglicher Grund dafür könnte im Fall von bW in der Häufung hydrophober Aminosäuren im N-terminalen variablen Bereich liegen, die zu einer verminderten Löslichkeit des Proteins führen (Tönnis, 2002). Ähnliche Beobachtungen wurde beim Versuch der heterologen Expression der b-Proteine in *Escherichia coli* gemacht (Tönnis, 2002).

Zur Überprüfung der Protein-Protein-Interaktionen in *U. maydis* wurde die BiFC-Analyse angewandt. Diese Methode wurde in humanen Zelllinien etabliert (Hu *et al.*, 2002; Hu *et al.*, 2006; Kerppola, 2006b; Robida and Kerppola, 2009) und wird mittlerweile standardmäßig in einer großen Anzahl verschiedener Organismen zur

Untersuchung von Protein-Protein-Interaktionen eingesetzt (Atmakuri, *et al.*, 2003; Blondel, *et al.*, 2005; Blumenstein, *et al.*, 2005; Bracha-Drori, *et al.*, 2004; Hoff and Kück, 2005; Marrocco, *et al.*, 2006; Tsuchisaka and Theologis, 2004; Tzfira, *et al.*, 2004). Im Gegensatz zur Co-Immunopräzipitation bedarf es bei dieser Methode einer geringeren Proteinkonzentration um eine Interaktion zwischen zwei Proteinen detektieren zu können (Kerppola, 2006a; Kerppola, 2006b). Darüber hinaus erfolgt auch eine räumliche Auflösung der Protein-Protein-Interaktion. Ein Nachteil dieser Methode liegt zum einen in der langen Zeit die für eine korrekte Faltung und Assemblierung der Proteine benötigt wird (bis zu 8 h) und zum anderen, dass nach erfolgter Assemblierung eines fluoreszierenden Komplexes eine Dissoziation verhindert wird. Aus diesem Grund ist es mit der BiFC- im Gegensatz zur FRET-Analyse (Förster Resonance Energy Transfer) nicht möglich, zeitliche und räumliche Dynamiken von Protein-Protein-Interaktionen zu untersuchen (Hu *et al.*, 2002; Kerppola, 2008a; Kerppola, 2008b).

Die Abwesenheit des filamentösen Wachstums nach Co-Expression des Clp1-NG und des Rbf1-CG Fusionsproteins deutet auf eine Inhibition der Rbf1-Funktion durch Clp1 hin. Im Gegensatz dazu führte die Expression von Rbf1-CG zu ausgeprägtem filamentösen Wachstum, was zeigt, dass das Rbf1-CG Fusionsprotein an sich funktionell ist (Daten nicht gezeigt). Die Stärke der Protein-Protein-Interaktion zwischen Clp1 und Rbf1 wurde im Hefe-Zwei-Hybrid System als schwach kategorisiert, was auf eine transiente, dynamische Interaktion beider Proteine hindeutet (Heimel, 2005). Biologisch signifikante Funktionen von Proteinkomplexen werden oftmals über Assoziations- und Dissoziationsdynamiken von schwachen Protein-Wechselwirkungen gesteuert. Die im BiFC-System erfolgte Inhibition dieser Dynamiken könnte somit ursächlich für den Verlust der Rbf1-Funktion sein (Hu *et al.*, 2002; Kerppola, 2006c). Übereinstimmend mit dieser Annahme wurde nach der induzierten Co-Expression von nicht markiertem Clp1 und Rbf1 im Vergleich zur induzierten Expression von Rbf1 keine vollständige Inhibition der Filamentbildung beobachtet (siehe Abb. 21 und Diskussion 3.4).

3.3 Mechanismus der Clp1-vermittelten Inhibition der b-Funktion

Die Expression des b-Heterodimers führt zur Arretierung des Zellzyklus in der G2-Phase und induziert filamentöses Wachstum (Heimel *et al.*, 2010; Mielnichuk *et al.*, 2009; Scherer *et al.*, 2006). Dieser Wechsel der Wuchsform repräsentiert den Übergang vom saprophytischen Knospungswachstum zur pathogenen, filamentösen Wuchsform von *U. maydis*. Durch die induzierte Co-Expression von Clp1 werden filamentöses Wachstum und der G2-Arrest unterbunden (Scherer *et al.*, 2006). Die Untersuchung des Transkriptoms nach Co-Induktion von Clp1 und dem b-Heterodimer zeigt eine globale Repression der b-Funktion durch Clp1.

In *C. cinerea* führt der Funktionsverlust des HMG-Proteins Pcc1 zur Schnallenbildung unabhängig von aktiven A- oder B-Loci. Aus diesem Grund wurde für Pcc1 eine Funktion als Repressor der Schnallenbildung vermutet (Murata, *et al.*, 1998). Da Clp1 in *C. cinerea* notwendig und ausreichend für die Schnallenbildung ist, wurde für Clp1 eine Funktion als Repressor von Pcc1 diskutiert (Inada *et al.*, 2001; Kamada, 2002). Es scheint somit möglich, dass die Funktion von Clp1 als Repressor entwicklungspezifischer exprimierter Transkriptionsfaktoren in *U. maydis* und *C. cinerea* konserviert ist.

Die Clp1-abhängige Inhibition der b-Funktion wird durch eine direkte Protein-Protein-Interaktion mit bW vermittelt. Um weitere Einblicke in den Mechanismus der Clp1-vermittelten Inhibition der b-Funktion zu erlangen, wurde das Kon8-Protein verwendet, welches die minimalen für eine biologische Funktion notwendigen Bereiche von bE und bW als Fusionsprotein enthält und die Funktion des b-Heterodimeres während der pathogenen Entwicklung vollständig ersetzen kann (Grandel *et al.*, 2000; Romeis *et al.*, 1997; Schlesinger *et al.*, 1997). Die Bindung von Clp1 an bW könnte zu einer veränderten Sequenzspezifität, Stabilität, DNA-Affinität des bE/bW/Clp1 Komplexes oder zu einer Maskierung transaktivierender Domänen des b-Heterodimeres führen. Die Inhibition des Gal4p-Transkriptionsfaktors der Bäckerhefe *S. cerevisiae* durch Bindung von Gal80p ist ein gut dokumentiertes Beispiel für einen derartigen Regulationsmechanismus (Lohr, *et al.*, 1995). Darüber hinaus könnte die Bindung von Clp1 an bW die Fähigkeit der bE/bW-Heterodimerisierung beeinflussen und demnach einen kompetitiven Charakter besitzen. Da die Kon8-abhängige Filamentbildung auf aktivkohlehaltigem Medium durch Co-Expression von Clp1 unterdrückt wird, kann eine Inhibition der b-Funktion durch eine Clp1-vermittelte Trennung des b-Heterodimeres jedoch ausgeschlossen werden. Eine Veränderung der Sequenzspezifität durch Protein-Protein-Interaktionen ist für die Homeodomänenproteine $\alpha 2$ und $a 1$ in *S. cerevisiae* beschrieben. Die Heterodimerisierung beider Proteine führt zur Repression

haploid-spezifischer Gene. Die Bindung des MADS-Box-Proteins MCM1 an $\alpha 2$ führt zu einer Änderung der Sequenzspezifität und der damit verbundenen Repression Paarungstyp-a spezifischer Gene (Herskowitz, 1989). Der Mechanismus der Clp1-vermittelten Inhibition des b-Heterodimeres könnte durch eine gekoppelte auf Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP) (zur Untersuchung der DNA-Bindung) und Hefe-Ein-Hybrid (zur Untersuchung der Transaktivierungsfunktion) basierende Untersuchung aufgeklärt werden. Darüber hinaus könnte in „Pulse-Chase-Experimenten“ mit Epitop-markierten b-Proteinen der Einfluss der Clp1-Interaktion auf die Stabilität der b-Proteine untersucht werden.

Der C-terminale Bereich des bW-Proteins (AS 567-645) ist nicht notwendig für die Funktion des Kon8-Proteins als Transkriptionsfaktor, jedoch essentiell für die Regulation der pathogenen Entwicklung von *U. maydis* (Grandel *et al.*, 2000). Die Beobachtung, dass diese Domäne ausreichend für die Interaktion mit Clp1 ist, deutet eine essentielle Funktion der Clp1/bW-Interaktion für die pathogene Entwicklung an und steht im Einklang mit der Annahme, dass die Clp1 vermittelte Proliferation innerhalb der Pflanze durch eine Inhibition der b-Funktion realisiert wird.

Da die Expression von Clp1 direkt durch das b-Heterodimer reguliert ist, würde eine negative Rückkopplungsschleife etabliert werden (siehe Abb. 31). Die Steuerung von komplexen Entwicklungsvorgängen durch negativ autoregulatorische Schaltkreise ist ein häufig beschriebener Regulationsmechanismus. Die Etablierung dynamischer Schaltkreise, welche durch verschiedene Stimuli wie Licht, Wachstumsfaktoren oder Metabolitkonzentrationen reguliert werden, erlaubt eine effiziente Anpassung an wechselnde Umweltbedingungen (Aulehla and Pourquie, 2008; Dunlap and Loros, 2006; Goldbeter and Pourquie, 2008; Holtz and Keasling; Kageyama, *et al.*, 2007a; Kageyama, *et al.*, 2007b; Loros, *et al.*, 2007; Zordan, *et al.*, 2007). Die Expression von Clp1 ist auf Proteinebene vermutlich durch ein Pflanzensignal induziert/reguliert (Scherer *et al.*, 2006). Somit könnte in Abhängigkeit dieses Pflanzensignals eine Adaption der Genregulation von *U. maydis* an verschiedene pflanzliche Umgebungen und Gewebetypen vermittelt werden.

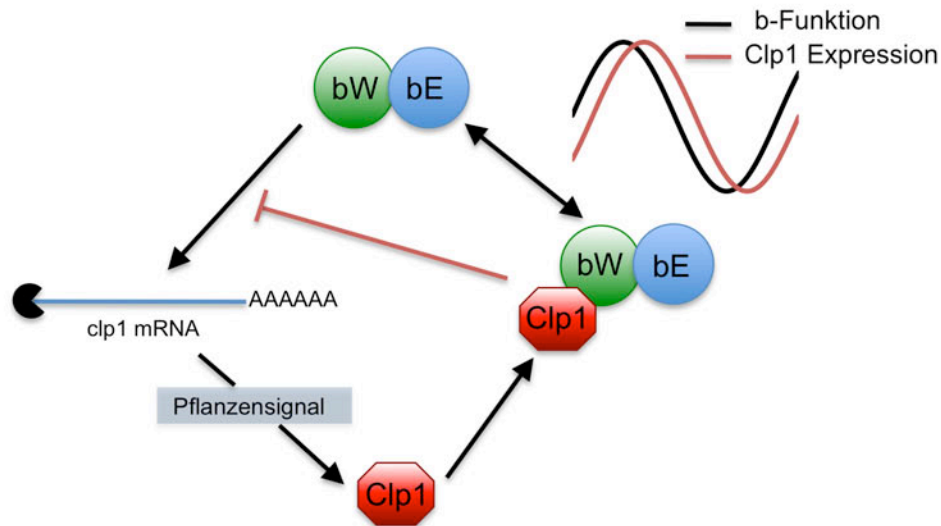


Abbildung 31: Modell der negativen Autoregulation der b-Funktion und Clp1-Expression. Die Funktion des b-Heterodimeres steht in einem negativ-autoregulatorischen Verhältnis zur Clp1-Expression. In Abhängigkeit des zur Expression von Clp1 notwendigen Pflanzensignals kann die Stärke der Clp1-abhängigen Repression der b-Funktion gesteuert werden und somit eine Anpassung an verschiedene pflanzliche Umgebungen und/oder Nährstoffverfügbarkeiten erfolgen. Eine starke Repression würde zu einer verstärkten Proliferation und Teilungsaktivität führen. Eine schwache Repression würde dagegen zu verstärktem filamentösem Wachstum führen und die Kolonisierung anderer Pflanzenbereiche ermöglichen.

3.4 Die Auswirkung der Clp1/Rbf1-Interaktion auf die Genregulation und das filamentöse Wachstum von *U. maydis*

Rbf1 stellt den zentralen transkriptionellen Regulator innerhalb der durch das b-Heterodimer induzierten Regulationskaskade dar. Phänotypisch führt die Deletion von *rbf1* zum Verlust der Appressorienbildung und damit der Pathogenität. Aufgrund der großen Anzahl *rbf1*-abhängig regulierter Gene ist davon auszugehen, dass Rbf1 auch in späteren Phasen der pathogenen Entwicklung eine wichtige Funktion ausübt. Rbf1 ist ausreichend und notwendig für b-abhängiges filamentöses Wachstum und den b-induzierten G2-Zellzyklusarrest (Heimel *et al.*, 2010). Die Expression von *rbf1* wird direkt durch Bindung des b-Heterodimeres an den Promotor von *rbf1* (Schuler, 2010) induziert. Darüber wurde eine pheromonabhängige Expression von *rbf1* beobachtet, die wahrscheinlich durch die Bindung von Prf1 an drei putative PREs (Pheromone Response Element) im Promotor von *rbf1* induziert wird (Zarnack *et al.*, 2008). Die Deletion von *rbf1* hat jedoch keinen Einfluss auf die Ausbildung von Konjugationshyphen, den a-induzierten G2-Zellzyklusarrest oder die pheromonabhängige Expression der b-Gene (Heimel *et al.*, 2010). Die biologische Funktion der durch Pheromon induzierten *rbf1*-Expression kann somit in der Sicherstellung des nahtlosen Überganges von der a- zur b-abhängigen Entwicklung,

der Aufrechterhaltung der filamentösen Wuchsform und des G2-Zellzyklusarrestes vermutet werden. Auf die Weise könnte die Zeitspanne zwischen der Perzeption eines kompatiblen Partners und der Infektion der Wirtspflanze minimiert und dieser Prozess somit äußerst effizient gestaltet werden.

Die Expression von *rbf1* induziert filamentöses Wachstum und den damit gekoppelten G2-Zellzyklusarrest. Nach Co-Induktion von *rbf1* und *clp1* wurde im Vergleich zur *rbf1*-Expression unter identischen Bedingungen eine reduzierte Filamentbildung beobachtet. Bei der vergleichenden Transkriptomanalyse (*rbf1* vs. *rbf1* + *clp1*) wurde jedoch ausschließlich *mfa1* als differenziell reguliert identifiziert, was eine Repression der Filamentbildung auf transkriptioneller Ebene unwahrscheinlich macht. Folglich scheint die durch Clp1 vermittelte Repression des filamentösen Wachstums auf posttranskriptioneller Ebene stattzufinden. Interessanterweise wurden bei der Hefe-Zwei-Hybrid Untersuchung mehrere mit Clp1-interagierende Proteine identifiziert, die eine mögliche Funktion im polaren Wachstum, der Septierung oder der Aktinregulation haben könnten. Neben Cdc15, welches in *U. maydis* notwendig für die Zytokinese und eine korrekte Zellkernverteilung ist (Böhmer, *et al.*, 2009), wurden Proteine mit Ähnlichkeit zu Bzz1p und Mob1p aus *Saccharomyces cerevisiae* als Clp1-interagierend identifiziert. Bzz1p ist Bestandteil des Myo5p-Las3p-Vrp1p-Komplexes, der für die Aktinpolymerisation *in vitro* ausreichend ist (Soulard, *et al.*, 2002), ein Prozess der in *U. maydis* notwendig für die Zell-Zellfusion und polares Wachstum ist (Weber, *et al.*, 2003). Des Weiteren wurden für Mob1p und homologe Proteine aus *Neurospora crassa* und *Candida albicans* wichtige Funktionen während der Zytokinese, des polaren Wachstums und innerhalb der Zellzykluskontrolle gezeigt (Luca, *et al.*, 2001; Luca and Winey, 1998; Maerz, *et al.*, 2009; Song, *et al.*, 2008; Weiss, *et al.*, 2002). Die Protein-Interaktionen von Clp1 mit Cdc15, Bzz1 oder Mob1 könnten somit eine Rolle in der Inhibition filamentösen Wachstums spielen und lassen darüber hinaus weitere Funktionen der Proteine während der biotrophen Entwicklung vermuten.

Nach Pheromonstimulation wurde bei gleichzeitiger Expression von *clp1* der Verlust der Konjugationshyphenbildung, des G2-Zellzyklusarrestes und der Pheromon-induzierten Expression von *mfa1*, *pra1*, *prf1* und *rbf1* beobachtet. Diese Faktoren repräsentieren drei regulatorische Ebenen innerhalb der Pheromon-Signalkaskade, was auf eine vollständige Repression der Pheromonantwort durch Clp1 schließen lässt. Da *rbf1* notwendig für die Clp1-vermittelte Repression der Pheromonantwort ist, ist es denkbar, dass der Rbf1-Clp1-Komplex diese Repression vermittelt.

Die Expression von *rbf1* kann sowohl *a*-abhängig, durch Stimulation der Zellen mit kompatibelem Pheromon, als auch durch die Expression eines aktiven *b*-Heterodimeres induziert werden. Die Clp1-vermittelte Repression der Pheromonantwort würde während der pathogenen Entwicklung jedoch ausschließlich zur Repression der *a*-abhängigen *rbf1*-Expression führen. Diese würde unter natürlichen Umständen nach der Penetration der Pflanzenoberfläche erfolgen, da dies der erste Zeitpunkt der Clp1 Expression ist. Es scheint darüber hinaus möglich, dass eine Clp1-vermittelte Inaktivierung der *a*- und *b*-abhängigen Signalwege Voraussetzung für dikaryotisches Wachstum und die Initiation der biotrophen Entwicklung ist.

Ein möglicher Mechanismus der *mfa1*-Repression könnte eine durch die Bindung von Clp1-vermittelte veränderte Sequenzspezifität von Rbf1 sein. Diese könnte zur Rekrutierung des Rbf1-Clp1-Komplexes an den *mfa1*-Promotor und dadurch zur Repression von *mfa1* führen. Diese Vermutung wird unterstützt durch die Beobachtung, dass die induzierte Expression von *clp1* und *rbf1* in Abwesenheit von Pheromon zur spezifischen Repression der (basalen) *mfa1*-Expression führt und ansonsten keine weiteren Auswirkungen auf die Rbf1-vermittelte Transkriptionsregulation oder die Expression anderer Faktoren des Pheromonsignalweges hat (siehe oben).

Die in der vorliegenden Studie gewonnenen Daten lassen vermuten, dass der Clp1/Rbf1-Komplex die *b*-abhängige Repression des Pheromonsignalweges vermittelt. Übereinstimmend mit diesem Modell wurde nach der Inaktivierung eines temperatursensitiven *b*-Heterodimeres während des biotrophen Wachstums *in planta* ein Verlust der *clp1*-Expression, nicht aber der *rbf1*-Expression beobachtet (Wahl *et al.*, 2010).

3.5 Die Funktion und Regulation von Cib1

Die Deletion von *cib1* in *U. maydis* hat keinen Einfluss auf das Wachstum unter axenischen Bedingungen, die Paarungskompetenz und die Filamentbildung. Ähnlich wie die Deletion von *clp1* führt die *cib1*-Deletion jedoch zum vollständigen Verlust der Pathogenität. Basierend auf der phänotypischen Ähnlichkeit zu $\Delta clp1$ Stämmen und der Protein-Protein-Interaktion von Cib1 mit Clp1 wurde eine funktionelle Beziehung beider Proteine vermutet. Ähnlich wie Clp1 wird die Expression des Cib1-Proteins posttranskriptionell reguliert und erfolgt in Analogie zu Clp1 nach der Penetration der

Pflanzenoberfläche. Aus diesem Grund wurde für Cib1 eine Funktion in der Genregulation während der biotrophen Entwicklungsphase von *U. maydis* vermutet. Die vergleichende Transkriptomanalyse der Stämme SG200 und SG200 Δ *cib1* wurde zu einem früheren Zeitpunkt während der pathogenen Entwicklung auf der Pflanzenoberfläche durchgeführt. Dieser Zeitpunkt wurde als ideal für die Untersuchung der Rbf1-, Biz1- und Hdp2-abhängigen Genregulation auf der Pflanzenoberfläche bestimmt (M. Vranes, M Scherer, pers. Mitteilung), führte jedoch im Fall von Cib1 nicht zur Identifizierung von differenziell regulierten Genen. Da Cib1 im Gegensatz zu diesen Transkriptionsfaktoren jedoch erst nach der Penetration der Pflanzenoberfläche exprimiert wird, erscheint eine Probenentnahme zu einem späteren Zeitpunkt (24-36 h nach Inokulation) sinnvoll. Durch die Anwendung von Laser-Mikrodissektion könnten Pilzhypen nach erfolgter Penetration angereichert werden und somit eine detaillierte Auflösung der Cib1-abhängigen Genregulation ermöglichen.

Eine weitere mögliche Funktion für Cib1 wurde in einem Cib1-vermittelten Kernimport von Clp1 vermutet, was jedoch in drei unabhängigen experimentellen Ansätzen (siehe Ergebnisse 2.4.3) ausgeschlossen werden konnte. Zusammenfassend weisen Proteinstruktur, Lokalisation und die Beschränkung der Proteinexpression auf postpenetrative Entwicklungsstadien auf eine für die pathogene Entwicklung essentielle Funktion von Cib1 als Transkriptionsfaktor hin und erklären den nach Deletion von *cib1* beobachteten Phänotyp.

Die Expression des Cib1-Proteins wird ähnlich wie die Expression des Clp1-Proteins vermutlich in Abhängigkeit eines Pflanzensignals induziert. Im Gegensatz zu Clp1 beinhaltet der offene Leserahmen von Cib1 ein Intron. Durch cDNA-Analyse konnte gezeigt werden, dass die Intron/Exon-Grenzen nicht der gängigen GU/AG-Regel folgen (vergleiche MUMDB um03509 und um11782), was eine Regulation der Cib1-Expression durch alternatives Spleißen nahelegt. In *U. maydis* konnte in extensiven EST-Analysen eine Vielzahl durch alternatives Spleißen entstandener mRNAs dokumentiert werden. Als häufigste Variante wurde dabei das sogenannte „intron retaining“ oder regulierte Spleißen beschrieben (Ho, *et al.*, 2007). Bisher konnte jedoch für keines der Gene in *U. maydis* eine durch alternatives Spleißen vermittelte biologische Funktion gezeigt werden (Feldbrügge, *et al.*, 2008). In qRT-PCR Analysen konnte gezeigt werden, dass neben der gespleißten *cib1*-Variante eine ungespleißte Variante transkribiert wird und deren relatives Verhältnis entwicklungspezifisch reguliert ist. Während des axenischen Wachstums in Flüssigkultur oder auf aktivkohlehaltigem Festmedium beträgt das molare Verhältnis von ungespleißter zu

gespleißter *cib1*-mRNA etwa 20:1. Während der biotrophen Entwicklung wird dagegen doppelt soviel gespleißte wie ungespleißte *cib1*-mRNA exprimiert. Im Gegensatz zur posttranskriptionellen Regulation der Clp1-Expression konnte der Mechanismus der posttranskriptionellen Regulation von Cib1 auf entwicklungspezifisch reguliertes alternatives Spleißen zurückgeführt werden.

Die Erkennung nicht kanonischer Spleißstellen, wie sie im Fall von *cib1* vorliegen, erfolgt häufig durch alternative Spleißfaktoren oder wird durch die Bindung regulatorischer Proteine gesteuert (Black, 2003; Hiller and Platzer, 2008). In *Drosophila melanogaster* wird in somatischen Zellen durch die Bindung des PSI-Proteins an regulatorische Bereiche der für die Transposase des P-Elementes kodierenden RNA das Spleißen des dritten Introns und damit die Expression einer funktionellen Transposase verhindert. In weiblichen Keimzellen wird PSI nicht exprimiert, was zur Expression der Transposase führt und eine zelltyp-spezifische Transposition des P-Elementes vermittelt (Adams, *et al.*, 1997; Siebel, *et al.*, 1995) (Labourier, *et al.*, 2002). Ein Beispiel für die differenzielle Expression von snRNPs (small nuclear Ribonucleoprotein) ist das 70K-U1 Protein aus *Arabidopsis thaliana*, welches durch alternatives Spleißen in zwei Isoformen vorkommt. Die relative Abundanz dieser Isoformen ist organspezifisch reguliert und zeigt große Varianzen innerhalb der verschiedenen Pflanzenorgane (Golovkin and Reddy, 1996).

Die durch das alternative Spleißen der *cib1*-mRNA entstehenden Proteine sind bis zur AS 273 identisch und beinhalten die potentiell für die DNA-Bindung und die Homo- oder Heterodimerisierung des Proteins notwendige bZIP-Domäne (AS 97-161). Interessanterweise ist der für eine Interaktion mit Clp1 notwendige Bereich (AS441-474) ausschließlich in dem durch die gespleißte *cib1*-Variante kodierten Protein enthalten (siehe Abb. 32). Eine Homodimerisierung konnte für die mit Clp1 interagierende Cib1-Variante bereits gezeigt werden (Adler, 2007). Die durch die ungespleißte *cib1*-mRNA kodierte Proteinvariante könnte somit auch eine kompetitive regulatorische Funktion erfüllen und so eine Feinabstimmung der Cib1-abhängigen Genregulation in der frühen biotrophen Phase vermitteln. Ausgehend von der Vermutung, dass die Bindung von Clp1 zu einer Veränderung Cib1-Aktivität führt, könnte durch die verstärkte Expression der ungespleißten Proteinvariante der Einfluss von Clp1 auf die Cib1-abhängige Genregulation verringert werden, da Clp1 nicht an die ungespleißte Cib1-Variante binden kann. Ein ähnlicher regulatorischer Mechanismus wurde für den bZIP-Transkriptionsfaktor CREM (cAMP Responsive Element Modulator) beschrieben, der in der cAMP-abhängigen Genregulation während der Spermatogenese in Säugetieren involviert ist und in verschiedenen durch alternatives

Spleißen generierten Isoformen existiert (Foulkes, *et al.*, 1992). Die gewebsspezifische Expression der einzelnen Isoformen führt zur Bildung verschiedener Homo- oder Heterodimere in unterschiedlichen Zelltypen. Diese Dimere können in Abhängigkeit der einzelnen Untereinheiten jeweils die Rolle eines Aktivators oder Repressors übernehmen. Dabei werden unabhängig von der aktivierenden oder reprimierenden Funktion dieselben Zielgene reguliert, da die Sequenzspezifität dieser Homo- oder Heterodimere nicht durch die Dimerisierungsdynamiken beeinflusst wird (Don and Stelzer, 2002; Foulkes *et al.*, 1992). Der für eine normale murine Embryonalentwicklung notwendige bZIP-Transkriptionsfaktor TCF11 ist ein weiteres Beispiel für die Steuerung von Proteinfunktionen durch Homo- und Heterodimerisierungsdynamiken. Die Homodimerisierung von TC11F vermittelt die Fähigkeit zur Transaktivierung, wohingegen eine Heterodimerisierung mit einer verkürzten Isoform des Proteins zu einem Verlust der Transaktivierung und somit zur Inhibition der TCF11-Funktion (Husberg, *et al.*, 2001) führt. Ein ähnlicher Mechanismus wäre auch im Fall von Cib1 denkbar und könnte darüber hinausgehend durch eine Bindung von Clp1 beeinflusst werden. Die Komplementation von $\Delta cib1$ -Stämmen durch die Expression von GFP-markierten, gespleißten oder ungespleißten *cib1*-Varianten könnte weiteren Aufschluss über die biologische Funktion der kodierten Proteine geben. Durch diesen Versuchsansatz könnte außerdem die Fragestellung untersucht werden, ob die ungespleißte Variante der *cib1*-mRNA translatiert oder abgebaut wird.

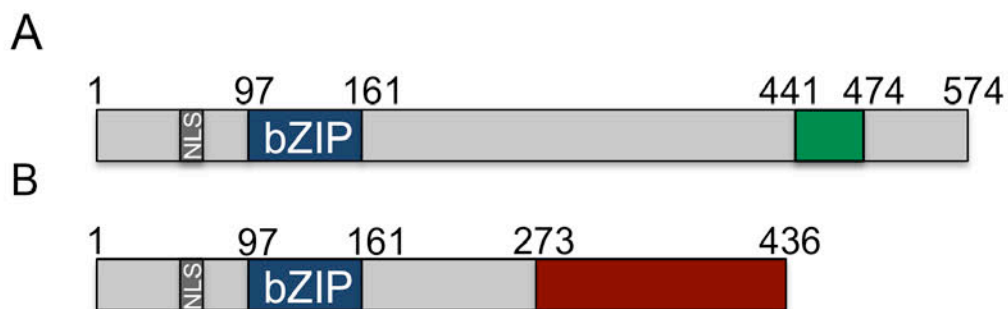


Abbildung 32: Struktur potentieller Cib1-Isoformen. (A) Schematische Darstellung des durch das gespleißte Transkript kodierten Cib1-Proteins. (B) Schematische Darstellung der potentiellen durch das ungespleißte *cib1*-Transkript kodierten Cib1-Isoform. Die verschiedenen Domänen sind durch Farben kodiert: dunkelgrau (AS 55-58) NLS; blau (AS 97-161) bZIP-Domäne; rot (AS 273-436) zu (A) unterschiedlicher Bereich; grün (AS 441-474) Clp1-Interaktionsdomäne. Die Angaben der AS sind ausgehend vom N-Terminus (1) zum C-Terminus des Cib1-Transkriptionsfaktors (574 oder 436).

Lange untranslatierte 3'-Bereiche alternativ gespleißter mRNAs, wie sie im Fall der ungespleißten *cib1*-Variante zu erwarten sind, können zum Abbau dieser mRNA durch

NMD (nonsense mediated decay) führen. Diese Möglichkeit erscheint allerdings eher unwahrscheinlich, da der Abbau von mRNAs, die durch alternatives Spleißen generiert wurden, entgegen initialer Vermutungen nicht weit verbreitet, sondern eher eine Ausnahme ist (Green, *et al.*, 2003; Lewis, *et al.*, 2003) (Pan, *et al.*, 2006) und NMD in *U. maydis* erst ab einer 3'-UTR-Länge von 1000 bp induziert wird (J. Freitag, pers. Mitteilung). Gegen den durch NMD-vermittelten Abbau der ungespleißten *cib1*-mRNA spricht ferner, dass sich das Intron der gespleißten *cib1*-mRNA nicht im 3'-UTR, sondern im kodierenden Bereich der ungespleißten *cib1*-mRNA befindet. Die erste Runde der Translation (Pionerrunde) würde zur Ablösung des EJC (Exon-Junction-Complex) führen, wodurch NMD verhindert würde.

3.6 Regulationskaskaden während der pathogenen Entwicklung von *U. maydis* (ABC-Modell)

Die Initiation der pathogenen Entwicklung von *U. maydis* erfolgt durch eine sequenzielle Aktivierung verschiedener Entwicklungsprogramme, die durch die *a*- und *b*-Paarungstyploci gesteuert werden. Die *a*- und *b*-abhängigen Signalwege sind durch positive und negative Rückkopplungsschleifen miteinander verknüpft (siehe Abb. 33). Innerhalb der *a*-vermittelten Regulationskaskade erfolgt, wie vormals beschrieben, eine Signalamplifikation durch eine gegenseitige Stimulation der *mfa*, *pra* und *prf1*-Genexpression (siehe Abb. 33A) (Hartmann *et al.*, 1996). Darüber hinaus führt die phosphorylierungsabhängige Aktivierung von Prf1 zu einer verstärkten Expression des *prf1*-Gens und der MAP-Kinase Kpp2, welche wiederum Prf1 phosphoryliert und dadurch aktiviert (Kaffarnik *et al.*, 2003). Die induzierte Expression von *rbf1* führt zu einer verstärkten Expression der *b*-Gene (M. Scherer, pers. Mitteilung). Somit steht die *rbf1*- und die *b*-Genexpression ebenfalls in einer positiven Rückkopplungsschleife. Des Weiteren wird über den Rbf1-abhängig exprimierten Homeodomänen-Transkriptionsfaktor Hdp1 die basale Expression von *rop1* (Regulator of Prf1 1) (Pothiratana, 2008) und dadurch wiederum die Expression von *prf1* reguliert (Brefort *et al.*, 2005).

Clp1 ist ein negativer Regulator dieser Schaltkreise, der basierend auf Proteinwechselwirkungen mit Rbf1 und bW antagonistisch zur Aktivität der *a*- und *b*-abhängigen Signalkaskaden wirkt (siehe Abb. 33C). Durch die *b*-abhängige Expression von *clp1* wird eine negative Rückkopplungsschleife etabliert, die eine vollständige Repression der *b*-Funktion verhindert und somit die pathogene Entwicklung sichert.

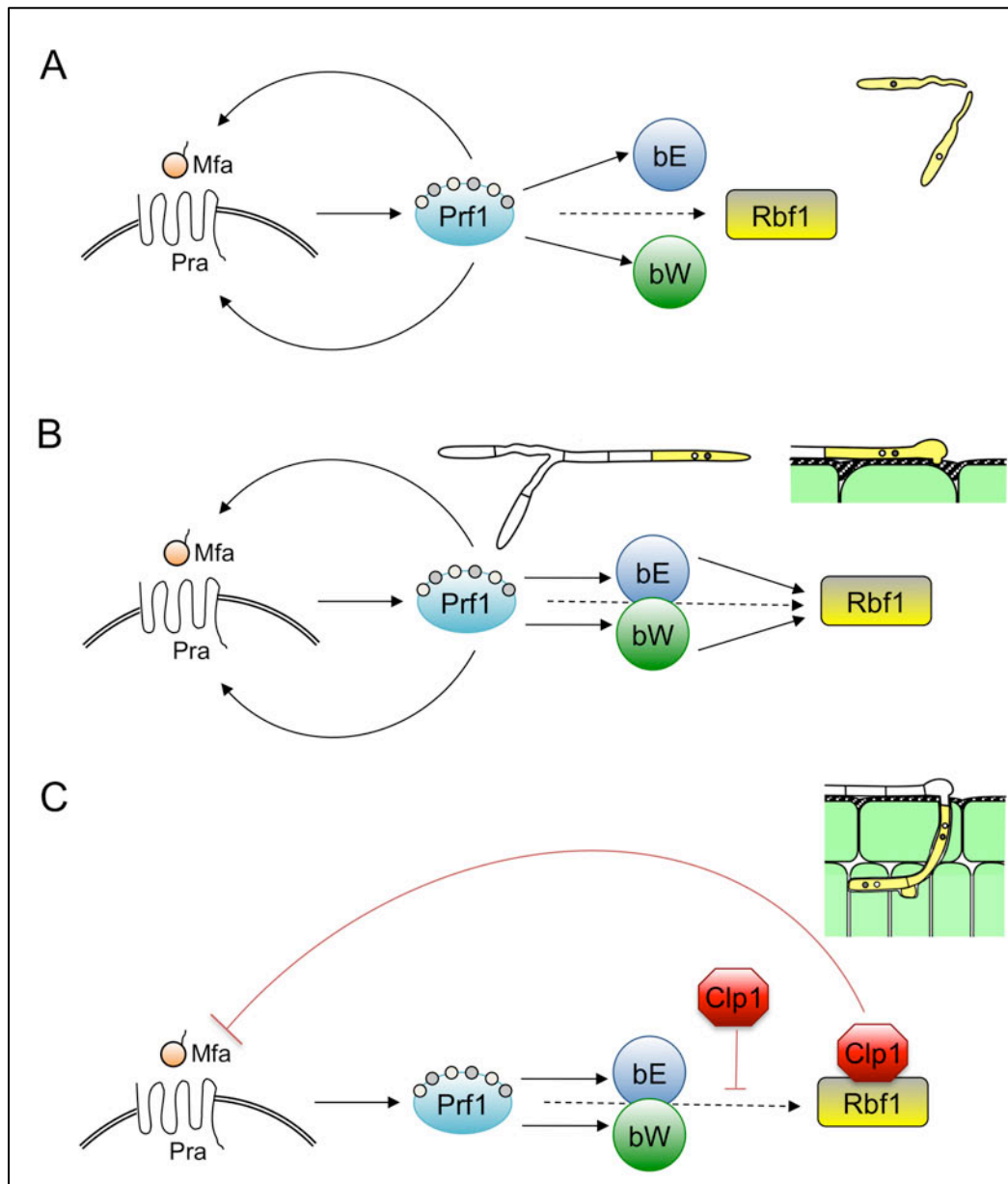


Abbildung 30: Genregulation während der pathogenen Entwicklung von *U. maydis* (ABC-Modell). (A) Die Konjugationshyphenbildung und die Zellfusion werden durch den a-Locus gesteuert. Die posttranslationelle Aktivierung des Prf1-Transkriptionsfaktors durch Phosphorylierung konservierter Serin- und Threoninreste führt zu einer erhöhten Expression von *mfa* und *pra* und damit zur autokrinen Stimulation. Die Expression von *bE*, *bW* und *rbf1* erlaubt nach der Zellfusion ein schnelles Umschalten der Entwicklungsprogramme. (B) Das filamentöse Wachstum, die Aufrechterhaltung des G2-Zellzyklusarrestes und die Appressorienbildung wird durch den b-Locus in Abhängigkeit von Rbf1 gesteuert. (C) Nach der Penetration der Pflanzenoberfläche erfolgt die Clp1-vermittelte Repression der a- und b-abhängigen Signalwege, was zu einer verminderten Expression von *rbf1* führt und die Aufhebung des Zellzyklusarrestes ermöglicht. Die weitere Proliferation innerhalb der Pflanze wird vermutlich über eine Balance der Rbf1 und Clp1-Aktivität vermittelt. Ein direkter Einfluss auf dieses Gleichgewicht könnte durch die posttranskriptionelle Regulation von Clp1 erfolgen und eine Anpassung an verschiedene Pflanzengewebe ermöglichen.

Durch die Clp1/Rbf1-Interaktion wird Signalspezifität vermittelt, das heißt, dass durch diese Interaktion die a-abhängige, nicht aber die b-abhängige Expression von *rbf1*

unterdrückt wird. Es scheint möglich, dass die biotrophe Entwicklung von *U. maydis* die vollständige Repression *rbf1*-Expression erfordert. Zu diesem Zweck müssten sowohl die *a*- als auch die *b*-abhängigen Signalwege nach der Penetration der Pflanzenoberfläche reprimiert werden, was durch Clp1 vermittelt werden könnte.

3.7 Die Kontrolle der pathogenen Entwicklung durch Rbf1 und Clp1

Durch die Verwendung von Stämmen, in denen eine dauerhafte und hohe Expression von *rbf1* ohne aktives b-Heterodimer erfolgt, wurde erstmalig die Bildung von Appressorien und die Penetration der Pflanzenoberfläche unabhängig von einem aktiven b-Heterodimer gezeigt. Innerhalb der Gruppe der *rbf1*-abhängig regulierten Gene befinden sich viele, die für die Appressorienbildung notwendig sind und deren Regulation durch Rbf1 im Einklang mit dem beobachteten Phänotyp der Stämme UKH184 und UKH186 steht. Neben *biz1* ist *kpp6* notwendig für eine effiziente Appressorienbildung und Penetration der Pflanzenoberfläche (Brachmann *et al.*, 2003; Flor-Parra *et al.*, 2006). Darüber hinaus ist *hdp2* essentiell für die Appressorienbildung (M. Scherer, pers. Mitteilung).

Die Expression von *rbf1* ist ausreichend für die Bildung von Appressorien und die Penetration der Pflanzenoberfläche, führt jedoch auch zur Arretierung des Zellzyklus wodurch eine Proliferation *in planta* verhindert wird. Für das weitere Wachstum innerhalb der Pflanze wird zusätzlich die Expression von *clp1* benötigt. Die durch Clp1-Protein-Interaktionen vermittelte negative Regulation der Paarungstyp-Loci ist sowohl notwendig als auch ausreichend für die Re-Initiation des Zellzyklus nach der Penetration der Pflanzenoberfläche. Folglich vermittelt Rbf1 die Initiation der pathogenen Entwicklung und Clp1 koordiniert die pathogenitätsrelevanten Signalwege, um die Kernteilung und Proliferation innerhalb der Pflanze zu vermitteln.

Während die beobachtete starke Autofluoreszenz infizierter Zellen auf ein verstärktes Zellwandwachstum hindeutet und auch bei Infektionen mit Wildtypstämmen beobachtet wurde (Doehlemann, *et al.*, 2008b), zeigt die Bildung von Nekrosen, dass keine kompatible biotrophe Interaktion etabliert wurde. Die Inaktivierung des b-Heterodimeres während des Wachstums *in planta* führt zum Expressionsverlust verschiedener direkt b-regulierter Gene, deren individuelle Deletion keinen Einfluss auf die Pathogenität von *U. maydis* hat (Heimel *et al.*, 2010; Wahl *et al.*, 2010). Der gleichzeitige Expressionsverlust dieser Gene könnte jedoch einen kumulativen Effekt haben und zum Verlust der Pathogenität führen. Eine kompatible Pilz/Pflanzen-

Interaktion wird unter anderem durch die Funktion sekretierter Effektorproteine vermittelt (Doehlemann *et al.*, 2009; Doehlemann *et al.*, 2008b; Kämper *et al.*, 2006). Das b-Heterodimer ist darüber hinaus während der biotrophen Entwicklung notwendig für die Expression verschiedener potenziell sekretierter Effektorproteine (Wahl *et al.*, 2010). Folglich könnte der gemeinsame Expressionsverlust dieser Gene die verstärkte Pflanzenabwehrreaktion nach Infektion mit UKH178 und UKH180 erklären.

clp1-Deletionsstämme sind nicht in der Lage, die dikaryotische Proliferation innerhalb der Pflanze zu induzieren. Die Expression verschiedener Effektoren ist an definierte Entwicklungsstufen von *U. maydis* gekoppelt (M. Vranes, pers. Mitteilung). Interessanterweise wurden bei einer vergleichenden Transkriptomanalyse der Stämme SG200 und SG200 Δ *clp1* während der pathogenen Entwicklung auf der Pflanzenoberfläche (16 hpi) eine Vielzahl für putativ sekretierte Effektoren kodierende Gene als differenziell reguliert identifiziert (M. Scherer, pers. Mitteilung). Folglich könnte die Pflanzenabwehrreaktion nach Infektion der Stämme UKH178 und UKH180 auch in der Unfähigkeit dieser Stämme zur Ausführung eines bestimmten Entwicklungsprogrammes begründet sein.

Da die Stämme UKH178 und UKH180 nicht die vollständige pathogene Entwicklung durchlaufen, keine Schnallenzellen bilden und eine aberante Septierung zeigten, scheint die *b*-abhängige Genregulation neben der Unterdrückung von Pflanzenabwehrreaktion notwendig für diese Entwicklungsprozesse zu sein. Zusätzlich könnte auch die synchrone Teilung der Zellkerne abhängig von der Anwesenheit eines b-Heterodimeres sein. Da die Bildung eines aktiven b-Heterodimeres die Genprodukte beider Zellkerne benötigt, würde auf diesem Weg automatisch eine synchrone Entwicklung und Teilung der Zellkerne gesichert werden.

In der vorliegenden Studie konnte erstmalig die Bildung von Appressorien, die Penetration der Pflanzenoberfläche und die Proliferation von *U. maydis* innerhalb der Pflanze ohne b-Heterodimer gezeigt werden. Durch die Etablierung eines artifiziellen regulatorischen Netzwerkes unter der Kontrolle von Rbf1 und Clp1 wurden die biologischen Funktionen der Proteine untersucht, das zuvor postulierte Modell verifiziert und neue Einblicke in die dynamischen Wechselwirkungen regulatorischer Schaltkreise während der pathogenen Entwicklung von *U. maydis* erlangt.

4. Material und Methoden

4.1 Material und Bezugsquellen

4.1.1 Chemikalien, Enzyme, Kits, Medien und Lösungen

Chemikalien

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

Puffer und Lösungen

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

Enzyme

Tabelle 2: In dieser Arbeit verwendete Enzyme

Name	Hersteller
Albumin (aus Rinderserum)	Sigma
Antarktische Phosphatase	New England Biolabs
E.coli DNA-Polymerase I (Klenow-Fragment)	New England Biolabs
Lysozym (aus Hühnerei)	Boehringer
Novozym 234	Novo Nordisc
Phusion DNA-Polymerase	New England Biolabs
Restriktionsenzyme	New England Biolabs
Ribonuklease A (aus Rinderpankreas)	Boehringer
T4 DNA-Ligase	New England Biolabs
T4 DNA-Polymerase	New England Biolabs
Taq-Polymerase	eigene Herstellung

Verwendete Kits

RNeasy Kit (Qiagen) zur Präparation hochreiner Gesamt-RNA, QiaQuick PCR Purification Kit (Qiagen) zur Aufreinigung von PCR-Produkten, Qiaprep Spin Miniprep Kit (Qiagen) zur Präparation hochreiner Plasmid-DNA, JETsorb Gel Extraction Kit

(Genomed) zur Aufreinigung von DNA aus Gelfragmenten, TOPO TA Cloning Kit (Invitrogen) zur Klonierung von PCR-Produkten, GeneRacer Kit (Invitrogen) für die cDNA Isolierung, BioArray-HighYield-RNA Transcript Labelling Kit (Enzo) und MEGAscript T7-HighYield Transcription Kit (Ambion) für die Markierung und Expression von cRNA für Microarrays, GeneChip Expression 3'-Amplification Two-Cycle cDNA Synthesis Kit (Affymetrix), SuperScript® III First-Strand Synthesis SuperMix (Invitrogen) für die Erststrang cDNA-Synthese, TurboDNase Kit (Ambion) für die Aufreinigung von RNA für qRT-PCR, MesaGreen qPCR MasterMix for SYBR Assay Kit (Eurogentech) für qRT-PCR, NEBlot Kit (NEB Biolabs) zur radioaktiven Markierung von DNA-Fragmenten, DIG-High Prime (Roche) zur Digoxigeninmarkierung von DNA-Fragmenten, BigDye Kit (ABI) zur fluoreszenzmarkierten Sequenzierung, Microspin S-300 Säulen (Amersham Pharmacia Biotech) zur Aufreinigung von radioaktiv markierten DNA-Sonden. TNT Quick Coupled Kit (Promega) zur Proteinexpression *in vitro*, Transcend™ Non-Radioactive Translation Detection Kit (Promega), zur Markierung und zum Nachweis *in vitro* exprimierter Proteine. DIG High-Prime Kit (Roche) zur Herstellung DIG-markierter Sonden für Southern Blots.

Medien und Lösungen

Medien für die Kultivierung von *E. coli*

LB-Medium

(Sambrook *et al.*, 1989)

10 g Bacto Trypton

5 g Hefeextrakt

10 g NaCl

mit H₂O_{bid.} auf 1L auffüllen und autoklavieren; für Festmedium 15 g Bacto Agar zufügen.

YT-Festmedium

(Sambrook *et al.*, 1989)

8 g Bacto Trypton

5 g Hefeextrakt

5 g NaCl

15 g Bacto Agar

mit H₂O_{bid.} auf 1L auffüllen und autoklavieren.

dYT-Flüssigmedium

(Sambrook *et al.*, 1989)

16 g Bacto Trypton

10 g Hefeextrakt

5 g NaCl

mit H₂O_{bid.} auf 1L auffüllen und autoklavieren.

Medien für die Kultivierung von***S. cerevisiae*****YEPDA**

10 g Hefeextrakt
 20 g Bacto Pepton
 0,003% (w/v) Adeninhemisulfat
 für Festmedium 15 g Bacto Agar
 zufügen, mit H₂O_{bid} auf 980 ml auffüllen
 und autoklavieren. Nach dem
 Autoklavieren 2% (v/v) 50% Glukose
 (1% f.c.) zufügen.

5x SC-LTHA

6,7 g Yeast Nitrogen Base
 1,7 g „Drop out additive“ –Leu/-Trp/-
 His/-Ade
 in 200 ml H₂O_{bid} lösen
 mit 760 ml sterilem H₂O_{bid}
 (Flüssigmedium) oder
 760 ml autoklaviertem 2% Bacto Agar
 (Festmedium) und 40 ml 50% (w/v)
 Glukose auffüllen.

5x SC-LT

6,7 g Yeast Nitrogen Base
 1,7 g „Drop out additive“ -Leu/-Trp/-
 His/-Ade
 76 mg Histidin,
 76 mg Adeninhemisulfat zufügen, in
 200 ml H₂O_{bid} lösen mit 760 ml sterilem
 H₂O_{bid} (Flüssigmedium) oder 760 ml
 autoklaviertem 2% Bacto Agar
 (Festmedium) und 40 ml 50% (w/v)
 Glukose auffüllen.

5x SC-T

6,7 g Yeast Nitrogen Base
 1,7 g „Drop out additive“ –Leu/-Trp/-
 His/-Ade
 76 mg Histidin,
 76 mg Adeninhemisulfat
 in 200 ml H₂O_{bid} lösen mit 760 ml
 sterilem H₂O_{bid} (Flüssigmedium) oder
 760 ml autoklaviertem 2% Bacto Agar
 (Festmedium) und 40 ml 50% (w/v)
 Glukose auffüllen.

Medien für die Kultivierung von***U. maydis***

CM-Flüssigmedium (Banuett and
 Herskowitz, 1989; Holliday, 1974)

1,5 g NH₄NO₃
 2,5 g Casaminosäuren
 0,5 g Heringssperma DNA
 1 g Hefeextrakt
 10 ml Vitamin-Lösung (s.u.)
 62,5 ml Salz-Lösung (s.u.)
 mit H₂O_{bid} auf 980 ml auffüllen
 Mit NaOH auf pH 7,0 einstellen, mit
 H₂O_{bid} auf 1L auffüllen und
 autoklavieren. Nach dem Autoklavieren
 20 ml (v/v) 50% Glukose (1% f.c.)
 zufügen.

Für CM-Festmedium 20 g Bactor Agar
 vor dem Autoklavieren hinzufügen.

Array-Minimalmedium (Scherer *et al.*,
 2006):

62,5 ml Salz-Lösung (s. unten)

30 mM L-Glutamin oder 3,8 g KNO_3 mit H_2O auf 980 ml aufgefüllt pH-Wert auf 7,0 mit NaOH eingestellt und sterilfiltriert. Nach dem Sterilfiltrieren: 20 ml 50% (w/v) Glukose-Lösung (f.c. 1%) bzw. 40 ml 25% Arabinose-Lösung (f.c. 1%) hinzufügen.

Salz-Lösung (Holliday, 1974)

16 g KH_2PO_4
 4 g Na_2SO_4
 8 g KCl
 4 g $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$
 1.32 g $\text{CaCl}_2 \times \text{H}_2\text{O}$
 8 ml Spurenelement Lösung
 mit in $\text{H}_2\text{O}_{\text{bid.}}$ auf 1L auffüllen und sterilfiltrieren.

Spurenelement-Lösung (Holliday, 1974)

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 in $\text{H}_2\text{O}_{\text{bid.}}$ auf 1L auffüllen und sterilfiltrieren.

Vitamin-Lösung (Holliday, 1974)

100 mg Thiamin
 20 mg Calciumpanthothenat
 50 mg p-Aminobenzoensäure
 20 mg Nikotinsäure
 20 mg Cholinchlorid
 40 mg myo-Inositol
 50 mg Folsäure
 mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{bid.}}$ auf 1L auffüllen und sterilfiltrieren.

NSY-Glyzerin (Einfriermedium)

8 g Nutrient Broth
 1 g Hefeextrakt
 5 g Sukrose
 800 ml 87% Glyzerin
 mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{bid.}}$ auf 1L auffüllen und autoklavieren.

PD-Festmedium

24 g Potato Dextrose Broth
 20 g Bacto Agar
 mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{bid.}}$ auf 1L auffüllen und autoklavieren.

Regenerationsagar_{light} (Schulz *et al.*, 1990)

a) Top-Agar:

15 g Bacto-Agar
 182,2 g Sorbitol
 10 g Hefeextrakt
 4 g Bacto Pepton
 4 g Saccharose
 mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{bid.}}$ auf 1L auffüllen und autoklavieren

b) Bottom-Agar

wie a), zusätzlich Antibiotikum zugeben (s.u.)

YEPS_{light}-Flüssigmedium (Tsukuda, *et al.*, 1988)

10 g Hefeextrakt
 4 g Bacto Pepton
 4 g Saccharose
 mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{bid.}}$ auf 1L auffüllen und autoklavieren

Die verschiedenen Antibiotika wurden nach dem Abkühlen der Medien auf 60°C in folgenden Endkonzentrationen zugegeben:

Carboxin 2 µg/ml (f.c.),
Nourseothricin (ClonNat) 75 µg/ml (f.c.),
Hygromycin 200 µg/ml (f.c.).

4.1.2 Oligonukleotide

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

Primer/Funktion	Sequenz 5'- 3'-Richtung
num1 Deletion	
01682_Lb_se	GACGCCGTACATGTCCCAGATTTTC
01682_Lb_as	GTTGGCCATCTAGGCCTGGATGGAGTAGCAGCGGCTTTC
01682_Rb_se	GTTGGCCTGAGTGGCCGCAGTGATGCGGTTTCATGTGTGCG
01682_RB_as	TCCCACAGGGGACTCGAAGAATC
01682_nested_se	GTACCAGTCTGCGGATCGGAAGAC
01682_nested_as	TTGCGGCAGATTCTTCCAACCTCC
01682_PCR_se	AACACCTTGGCTGCCACATCGAC
01682_PCR_as	CTGTTGGAAATTGGACAGCCTCC
fk1 Deletion	
01523LB_a	CTCTAACCCCTATCTCGAGGCGTTAG
01523LB_j	GTTGGCCATCTAGGCCGATGTTTGGGTCTGGCAGTGTGAC
01523RB_j	GTTGGCCTGAGTGGCCGCCTGGGTTTCAGTTTGCTTGCGA
01523RB_a	CTCCACTCGATTGGTTCCGGACAGG
01523ORFPCr_s	AAGTCCCACGACTTGGTTTCCTCC
01523ORFPCr_as	CCGACGAAGATGGATTGCTGTGAG
01523nested_LB	GCGGTCGAGCACAACCTCGAGA ATC
01523nested_RB	CACCTTCTTTCGAGGCTTGAGC
fk1 RACE	
01523_5'RACE	GAGCTCTGAGCCAGCGAAGTGGGT
01523_3'RACE	GCATTTTGAAGCGACCCGAGGGAA
Hefe Zwei-Hybrid Analyse	
Clp1_Nde	CATATGTCACCCCGTCACCAG
Clp1_Bam	GGATCCTCACTCGAGTTTGGTGGATTG
pGAD-DS for	TACGACTCACTATAGGGCCGAGCGCC
pGAD-DS rev	TGGTGCACGATGCACAGTTGAAGTG
Y2G_bW567_Sfi_f	GTGGGCCATTACGGCCAACATGCAAAGCTTTGAGGAGATCGA
Y2G_bW645_Sfi_r	GTGGGCCGAGGCGGCCTCAGGCAAGCGAGAAAGAGTTCGA
cib1 Deletion	
cib1_lba	AGCTTGGACTAGTAAATGGGACCG
cib1_lbi	GTTGGCCATCTAGGCCGAGGAGAAGGGATGCCAAGTG
cib1_rbi	GTTGGCCTGAGTGGCCATGTTGAACACGTGCGTCAGTCC
cib1_rba	ATTATCCCTTCGCCTTCCCCTTC

cib1_orf_f	TGTCAGAGACTCCTGTCAAGCAAG
cib1_orf_r	GGGATTAGAGGAAGATGGGAGGG
cib1_nested_f	ACGCCTGAATCGATGCAAAACTG
cib1_nested_r	CAATCTCATTTTCGTGTTCCGCC
um02664 Deletion	
um02644_lba	ATCCGCTACTCGCCACTGCTCATC
um02644_lbi	GTTGGCCATCTAGGCCTCTCGAGTTGAAGTGCAGTGCAAG
um02644_rbi	GTTGGCCTGAGTGGCCTCGACCTCATCATCTGGCGTATC
um02644_rba	GAAGAAGGCAACAATGGGAATGC
um02644_orf_f	AAAGCATGTTGCAAGGCAATGTG
um02644_orf_r	ATCTGCATAGGATTGATGGGCGC
um02644_nested_f	ATCCAAACGCCGAATCACGAATAC
um02644_nested_r	TTCTGGTCATACTCTGCGAGGTGG
cib1 RACE	
cib1_cDNA_3'	CCCTCCCATCTTCTCTAATCCC
cib1_cDNA_5'	ATAGCCCTCGCCACAGATACAG
cib1 GFP Fusion	
CibGFP_Lb_f	CAATCCTCAAATGAAGGCGTTTCGC
CibGFP_Lb_r	GTGGGCCGCGTTGGCCGCGAGCGACGATTGAGGCCATCAGAC
CibGFP_Rb_f	CACGGCCTGAGTGGCCTGTTGAACACGTGCGTCAGTCCC
CibGFP_Rb_r	CTCGCCACCTGTAGACAAACAAG
NLS in pMS72	
NLS_SFI_FOR	GTCGAGCCTCCAAAAAGAAGAGAAAGGTGCAATTCGGGCGGCCAACG
NLS_SFI_REV	TGGCCGCCGAATTCGACCTTTCTTCTTTTTTGGAGGCTCGACCGT
Pcib1 GFP Fusion	
LB_as_Pcib1GFP	GGTGGCCGCGTTGGCCGTCATGATGAGAGACGAACGTGAA
cib1_lba	AGCTTGGACTAGTAAATGGGACCG
CibGFP_Rb_f	CACGGCCTGAGTGGCCTGTTGAACACGTGCGTCAGTCCC
CibGFP_Rb_r	CTCGCCACCTGTAGACAAACAAG
In vitro Expression	
Y2H_cib1_f	GGCCATTACGGCCATGACTAGCACCACCAGTCAACG
Y2H_cib1_r	GGCCGAGGCGGCCAGCGACGATTGAGGCCATCAGA
BiFC Analyse	
SplitGFPN5_Nde	GTGCATATGGGGACGTCGGCGGCCAACGCGGCCATG
SplitGFPN3	GCCGGCGCGCCGGCCGCTTTAGGCCATGATATAGAC
SplitGFPC5_Nde	GTGCATATGGGGACGTCGGCGGCCAACGCGGCCGAC
SplitGFPC3	GCCGGCGCGCCGGCCGCTTTAC
Leu2_lb_a	CCAACCATTGATGTAACCTCTC
Leu2_lb_i	GCTGGCGATTGACGAGGC
Leu2_rb_a	GCATCGGATCCGAATGGTACG
Leu2_rb_l	TAGCTTGTTACTTGCTCACTTTATCAC
Clp1_Nde	CATATGTCACCCCGTCACCAG
Clp1_Sfi	GTGGGCCGCGTTGGCCGCGCTCGAGTTTGGTGGATTGGAGC
Cib1_Nde	GGGCATATGACTAGCACCACCACGTCAAC
Cib1_Sfi	GTGGGCCGCGTTGGCCGAGCGACGATTGAGGCCATCAGAC
bW1_Nde	GGGCATATGACGCTACCACCACTACCAAG
bW1_Sfi	GTGGGCCGCGTTGGCCGGCAAGCGAGAAAGAATTTGAGTAG
rbf1_Nde	GGGCATATGGACATCTTGGGTAAGTCCAAG
rbf1_Sfi	GTGGGCCGCGTTGGCCGGCGCTCTGCAGTTGAGAGGAC
NLS_f	TATGGTCGAGCCTCCAAAAAGAAGAGAAAGGTGCAATTCGGCGGCCAAC
NLS_r	TGGCCGCCGAATTCGACCTTTCTTCTTTTTTGGAGGCTCGACCA
link1f	CGGCCCGCCCGCCTGCAAGATCCCCAACGACCTCAAGCAGAAGGTGATG AACCACAACG
link1r	TGTGGTTCATCACCTTCTGCTTGAGGTCGTTGGGGATCTTGCAGGCGGGGC GGGCCGCGT
link2f	CGGCCCGCAGCATCGCCACCAACG
link2r	TGGTGGCGATGCTCGGGCCGCGT
qRT PCR	
RT_cib1_spliced_f	GCCTCCCTGCAGCGGATGC
RT_cib1_unspliced_f	GGCGACCTGCTCTGATGCACC
RT_cib1_r	CATCGACGTTGTTCCGGCCCT

RT_mfa1_f	ATGCTTTCGATCTTCGCTCAGAC
RT_mfa1_r	TAGCCGATGGGAGAACCGTTG
RT_pra1_f	AACCGAAGGCATCTGCACTGC
RT_pra1_r	CCC GCATGTCGATGTCAGACT
RT_prf1_f	TCGGTAGAACGAGCTGTGATG
RT_prf1_r	CTGTTGGACGATGTTGGAGTTG
RT_rbf1_f	AGTACGAGCTACGACGGATTC
RT_rbf1_r	GGGTAGGTGTTGGACACATTC
RT_eIF2b_f	ATCCCGAACAGCCCAAAC
RT_eIF2b_r	ATCGTCAACCGCAACCAC
RT_actin_f	CATGTACGCCGGTATCTCG
RT_actin_r	CTCGGGAGGAGCAACAATC
rbf1 Deletion	
lb5'	CGACTTGTACCACAATGAGGC
lb3'	CACGGCCTGAGTGGCCTCACGATTCGTGATTCGGTG
rb5'	GTGGGCCATCTAGGCCTCGACACCGCATCTCGCC
rb3'	TCCGAGTCCGACGACAGC
Clp1-Interaktionsdomäne	
Clp1_1100_rev	GGCCGAGGCGGCCTGACATGGATTCTACAATGTCCTG
Clp1_1252_rev	GGCCGAGGCGGCCTGAGCGAGCGACCATGGCACCG
Clp1_151_for	GGCCATTACGGCCAAGCAGCTCATCTCTGAAGAAAAG
Clp1_301_for	GGCCATTACGGCCTGGCACAGAAAAGTGCCTCGTCT
Clp1_451_for	GGCCATTACGGCCCTATCCTCGCCTCAGACCCAAC
CLp1_55_for	GGCCATTACGGCCATGACTGTGCTGGATCTTCGAGG
Clp1_661_for	GGCCATTACGGCCTTGCTCTCGCAAGTGATCCCAGGT
Clp1_661_rev	GGCCGAGGCGGCCAGTAGTCTTTGTTCCGCCGAGAGAA
Clp1_802_rev	GGCCGAGGCGGCCGGCATAACAGCGTTGCAGTTCTCG
Clp1_952_rev	GGCCGAGGCGGCCGCGCACGATCGTGTAAAGTGCGA
Clp1atg_sfi	GGCCATTACGGCCATGTCACCCCGTCACCAGCCAGAT
Clp1stop_sfi	GGCCGAGGCGGCCTCACTCGAGTTTGGTGGATTGGAG
Plga2-abhängige Expression	
Plga2_EcoRV_5'	GGGTGATATCCGAAGGACTTACTCATCAAAGCGA
Plga2_NdeI_3'	GGGGTCATATGGTTTCAGAGGAAAGGGAGGGAT

4.1.3 Stämme

***Escherichia coli*-Stämme**

Für sämtliche Klonierungen wurde der Stamm TOP10 (Invitrogen) verwendet, bei dem es sich um ein Derivat des *E. coli*-Stammes DH10B mit folgenden genetischen Markern handelt: F- mcrA Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC) ϕ 80lacZ Δ M15 Δ lacX74 nupG recA1 araD139 Δ (ara-leu)7697 galE15 galK16 rpsL(Str^R) endA1 λ ⁻. Die Nomenklatur von *E. coli*-Stämmen richtet sich nach (Demerec, *et al.*, 1966).

***Saccharomyces cerevisiae*-Stämme**

Für das Hefe-Zwei-Hybrid-System wurde der Stamm AH109 verwendet. Der Stamm hat den Genotyp MATa, trp1-901, leu2-3, 112, ura3-52, his3-200 gal4 Δ , gal80 Δ , LYS2::GAL1_{UAS}-GAL1_{TATA}-HIS3, GAL2_{UAS}-GAL2_{TATA}-ADE2, URA3::MEL1_{UAS}-MEL1_{TATA}-lacZ (James, *et al.*, 1996; Holtz, A., nicht veröffentlicht).

Ustilago maydis*-Stämme*Tabelle 3: Ausgangsstämme**

Stamm	Genotyp	Resistenz	Referenz
FB1	<i>a1 b1</i>	-	Banuett and Herskowitz, 1989
FB2	<i>a2 b2</i>	-	Banuett and Herskowitz, 1989
SG200	<i>a1 mfa2 bE1bW2</i>	Phleo ^R	Kämper <i>et al.</i> , 2006
JB1	<i>a1 Δb</i>	Hyg ^R	Scherer <i>et al.</i> , 2006
UMS10	<i>a2 Pcr1:bE1/bW2 clp1:eGFP</i>	Phleo ^R , Hyg ^R	M. Scherer, unveröffentlicht
UVO161	<i>a1 b1 Δclp1</i>	Hyg ^R	Scherer <i>et al.</i> , 2006
UVO162	<i>a2 b2 Δclp1</i>	Hyg ^R	Scherer <i>et al.</i> , 2006
USA1	<i>a1 mfa2 bE1bW2 cib1:3eGFP</i>	Phleo ^R , Hyg ^R	S. Adler, unveröffentlicht
USA2	<i>a1 mfa2 bE1bW2 cib1:3eGFP</i>	Phleo ^R , Hyg ^R	S. Adler, unveröffentlicht
UMS84	<i>a2 Pnar1:bE1/bW2 ip^r Pcr1:clp1 ip^s</i>	Hyg ^R , Cbx ^R	Scherer <i>et al.</i> , 2006
UVO151	<i>a1 Δb ip^r Pcr1:clp1 ip^s</i>	Hyg ^R , Cbx ^R	Scherer <i>et al.</i> , 2006

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

Tabelle 4: In dieser Arbeit hergestellte Stämme

Stamm	Genotyp	Resistenz	Ausgangsstamm
UKH11	<i>a1mfa2 bE1 bW2 Δnum1</i>	Hyg ^R	SG200
UKH12	<i>a1mfa2 bE1 bW2 Δnum1</i>	Hyg ^R	SG200
UKH17	<i>a2 Pnar1:bE1/bW2 ip^r Pcr1:clp1 ip^s Δcib1 #5</i>	Hyg ^R	UMS84
UKH50	<i>a2 b2 leu2::Pcr1:clp1:NG</i>	Hyg ^R	FB2
UKH71	<i>a2 b2 leu2::Pcr1:clp1:NG ip^r Pcr1:bW1:CG ip^s</i>	Hyg ^R , Cbx ^R	UKH50
UKH73	<i>a2 b2 leu2::Pcr1:clp1:NG ip^r Pcr1:cib1:CG ip^s</i>	Hyg ^R , Cbx ^R	UKH50
UKH74	<i>a2 b2 leu2::Pcr1:clp1:NG ip^r Pcr1:rbf1:CG ip^s</i>	Hyg ^R , Cbx ^R	UKH50
UKH75	<i>a2 b2 leu2::Pcr1:clp1:NG ip^r Pcr1:NLS:CG ip^s</i>	Hyg ^R , Cbx ^R	UKH50
UKH85	<i>a1mfa2 bE1 bW2 Δfkh1 #1</i>	Phleo ^R , Hyg ^R	SG200
UKH86	<i>a1mfa2 bE1 bW2 Δfkh1 #2</i>	Phleo ^R , Hyg ^R	SG200
UKH87	<i>a1mfa2 bE1 bW2 Δfkh1 #7</i>	Phleo ^R , Hyg ^R	SG200
UKH88	<i>a1 b1 Δfkh1 #10</i>	Hyg ^R	FB1
UKH89	<i>a1 b1 Δfkh1 #14</i>	Hyg ^R	FB1
UKH90	<i>a1 b1 Δfkh1 #15</i>	Hyg ^R	FB1
UKH91	<i>a2 b2 Δfkh1 #19</i>	Hyg ^R	FB2
UKH92	<i>a2 b2 Δfkh1 #12</i>	Hyg ^R	FB2
UKH93	<i>a2 b2 Δfkh1 #13</i>	Hyg ^R	FB2
UKH94	<i>a1mfa2 bE1 bW2 Δnum1 ip^r Pmig2_5:NLS:eGFP ip^s GFP Potef:2Rfp*</i>	Hyg ^R , Cbx ^R , Nat ^R	UKH12
UKH100	<i>a2 Pcr1:bE1/bW2 clp1 eGFP Δcib1 #5</i>	Hyg ^R , Nat ^R	UMS10
UKH125	<i>a2 Δb::Pcr1:clp1 ip^r Pnar1:kon8_1ip^s</i>	Hyg ^R , Cbx ^R	UKH155
UKH140	<i>a1 b1 Pcib1::3eGFP</i>	Hyg ^R	FB1
UKH155	<i>a2 b2 ip^r Pnar1:kon8_1ip^s</i>	Cbx ^R	FB2
UKH156	<i>a1 Δb::Pnar:rbf1</i>	Hyg ^R	FB1
UKH164	<i>a1 Δb::Pnar:rbf1 ip^r Pcr1:clp1 ip^s</i>	Hyg ^R , Cbx ^R	UKH156
UKH172 (UVO151Δrbf1)	<i>a1 Δb ip^r Pcr1:clp1 ip^s Δrbf1</i>	Hyg ^R , Cbx ^R , Nat ^R	UVO151
UKH176	<i>a1 b1 ip^r Plga2:clp1ip^s</i>	Cbx ^R	FB1
UKH177	<i>a2 b2 ip^r Plga2:clp1ip^s</i>	Cbx ^R	FB2

UKH178	<i>a1 ip^r Plga2:clp1ip^s Δb::Plga2:rbf1</i>	CbxR, HygR	UKH176
UKH179	<i>a1 ip^r Plga2:clp1ip^s Δb::Plga2:rbf1</i>	CbxR, HygR	UKH176
UKH180	<i>a2 ip^r Plga2:clp1ip^s Δb::Plga2:rbf1</i>	CbxR, HygR	UKH177
UKH181	<i>a2 ip^r Plga2:clp1ip^s Δb::Plga2:rbf1</i>	CbxR, HygR	UKH177
UKH184	<i>a1 Δb::plga2:rbf1</i>	HygR	FB1
UKH185	<i>a1 Δb::plga2:rbf1</i>	HygR	FB1
UKH186	<i>a2 Δb::plga2:rbf1</i>	HygR	FB2
UKH187	<i>a2 Δb::plga2:rbf1</i>	HygR	FB2
UKH188	<i>a1 ip^r Plga2:clp1ip^s Δb::Plga2:rbf1 Pmig2_5:Nls:3xeGFP*</i>	HygR, CbxR, PhleoR	UKH179
UKH189	<i>a1 ip^r Plga2:clp1ip^s Δb::Plga2:rbf1 Pmig2_5:Nls:3xeGFP*</i>	HygR, CbxR, PhleoR	UKH179
UKH190	<i>a2 ip^r Plga2:clp1ip^s Δb::Plga2:rbf1 Pmig2_5:Nls:3xeGFP*</i>	HygR, CbxR, PhleoR	UKH180
UKH191	<i>a2 ip^r Plga2:clp1ip^s Δb::Plga2:rbf1 Pmig2_5:Nls:3xeGFP*</i>	HygR, CbxR, PhleoR	UKH180
UKH192	<i>a1 Δb::plga2:rbf1 Pmig2_5:Nls:3xeGFP*</i>	HygR, PhleoR	UKH185
UKH193	<i>a1 Δb::plga2:rbf1 Pmig2_5:Nls:3xeGFP*</i>	HygR, PhleoR	UKH185
UKH194	<i>a2 Δb::plga2:rbf1 Pmig2_5:Nls:3xeGFP*</i>	HygR, PhleoR	UKH186
UKH195	<i>a2 Δb::plga2:rbf1 Pmig2_5:Nls:3xeGFP*</i>	HygR, PhleoR	UKH186

*Ektopische Integration wurde durch PCR überprüft.

4.1.4 Plasmide

Tabelle 5: Ausgangsplasmide

Name	Kurzbeschreibung	Resistenz	Referenz
pGBKT7	Y2H-Ködervektor	Kan ^R /Trp+	Clontech
pGAD-DS	Y2H-Beutevektor	Amp ^R /Leu+	Dualsystems Biotech
pCR2.1 TOPO	Klonierung von PCR-Produkten	Amp ^R	Invitrogen
pRU11 –Not6474	crg1-kontrollierte Expression	Amp ^R /Cbx ^R	K. Papenfort, unveröffentlicht
pCR-b-KO	Deletion des b-Locus	Amp ^R /Hyg ^R	Kämper, 2004
pGAD-Cib1	Y2H-Cib1 Vollängenkonstrukt	Amp ^R /Leu+	S. Adler, unveröffentlicht
pRU-ATG1	Pcrg1:clp1 Konstrukt	Amp ^R /Cbx ^R	Scherer <i>et al.</i> , 2006
pRU4-kon8	Pnar1:kon8 Konstrukt	Amp ^R /Cbx ^R	A. Brachmann, 2001
pPmig2_5:NLS_GFP	Kernmarkierung <i>in planta</i>	Amp ^R /Cbx ^R	Scherer <i>et al.</i> , 2006
pRFP2-NatR	Zytoplasmatisches RFP unter Otef	Amp ^R /Nat ^R	M. Scherer, unveröffentlicht
pMS72	clp1:eGFP	Amp ^R /Nat ^R	M. Scherer, unveröffentlicht
pMS83	Pcrg1:rbf1 Konstrukt	Amp ^R /Cbx ^R	M. Scherer, unveröffentlicht
pMS81	Deletion von rbf1	Amp ^R /Hyg ^R	M. Scherer, unveröffentlicht
pRWnlsGFP	Visualisierung der Zellkerne <i>in planta</i>	Amp ^R /Phleo ^R	Wahl <i>et al.</i> , 2010

In dieser Arbeit hergestellte Plasmide:

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

pGBKT7-Clp1-TNT

Hefe-Zwei-Hybrid (Y2H) Ködervektor mit 1,4 kb (*NdeI-BamHI*) Clp1 offenem Leserahmen. Für eine verbesserte Translationseffizienz während der *in vitro*-Expression wurde ein PolyA₂₀-Trakt in die singuläre *BamHI*-Schnittstelle durch Oligoinserterion eingefügt.

pNG-Leu-Clp1

pRU12-Derivat (Brachmann, 2001). Enthält das N-terminale 0,5 kb eGFP Fragment (AS 1-154) als C-terminale Fusion mit dem *clp1*-Gen (1,4 kb *NdeI-SfiI*-Fragment) unter der Kontrolle des *crg1*-Promotors. Für eine gerichtete Integration in den Leu2-Locus wurde die PCR-amplifizierte 1 kb linke Flanke nach partiellem *NotI*-Verdau und Auffüllen der Überhänge, blunt End integriert. Die PCR-amplifizierte 1 kb rechte Flanke des Leu2-Locus wurde in die singuläre *HindIII*-Schnittstelle integriert. Die Hygromyzin-Resistenzkassette wurde in die

singuläre *NotI*-Schnittstelle als 1,9 kb *NotI*-Fragment integriert.

pCG-Cbx-bW1

pRU11-Derivat (Brachmann, 2001). Enthält das C-terminale 0,3 kb eGFP Fragment (AS 155-238) als C-terminale Fusion mit dem *bW1*-Gen (2,2 kb *NdeI-SfiI*-Fragment) unter der Kontrolle des *crg1*-Promotors.

pCG-Cbx-rbf1

pRU11-Derivat (Brachmann, 2001). Enthält das C-terminale 0,3 kb eGFP Fragment (AS 155-238) als C-terminale Fusion mit dem *rbf1*-Gen (2,0 kb *NdeI-SfiI*-Fragment) unter der Kontrolle des *crg1*-Promotors.

pCG-Cbx-cib1

pRU11-Derivat (Brachmann, 2001). Enthält das C-terminale 0,3 kb eGFP Fragment (AS 155-238) als C-terminale Fusion mit dem *cib1*-Gen (1,8 kb *NdeI-SfiI*-Fragment) unter der Kontrolle des *crg1*-Promotors.

pCG-Cbx-NLS

pRU11-Derivat (Brachmann, 2001). Enthält das C-terminale 0,3 kb eGFP Fragment (AS 155-238) als C-terminale Fusion mit der SV40-NLS unter der Kontrolle des *crg1*-Promotors.

pPcib1:GFP

Plasmid zur Integration in den *cib1*-Locus. Die Integration führt zur Deletion von *cib1* und gleichzeitiger Fusion des *cib1*-Promotors an 3eGFP. Enthält 1 kb des *cib1*-Promotors, ein 5,5 kb 3xeGFP-HygR (aus pUMa647, M.Feldbrügge unveröffentlicht) *Sfil*-Fragment und einen 1 kb umfassenden Bereich stromabwärts des *cib1*-Gens im pCR2.1 TOPO Rückgrat.

pPCR-b-KO:Pnar:rbf1

Vektor zur Integration in den *b*-Locus und der gleichzeitigen Deletion dessen. Derivat von pPCR-b-KO (Kämper, 2004). In die singuläre *Stul*-Restriktionsschnittstelle wurde in einer Drei-Fragment Ligation ein 1 kb *HpaI*(blunt)-*NdeI* Pnar1-Promotor-Fragment aus pRU4 (Brachmann, 2001) und ein 2,3 kb *NdeI*-*EcoRI*(blunt) *rbf1*-nosT-Fragment aus pMS83 (M. Scherer, unveröffentlicht), integriert.

pPCR-b-KO:Pcrg:clp1

Vektor zur Integration in den und gleichzeitigen Deletion des *b*-Locus. Derivat von pPCR-b-KO (Kämper 2004). In die singuläre *Stul*-Restriktionsschnittstelle wurde in einer Drei-Fragment Ligation ein 2,7 kb *BstXI*(blunt)-*NotI* Pcrg1-Promotor-*clp1* Fragment und ein 0,3 kb *NdeI*-*EcoRI*(blunt) nosT-Fragment aus pRU-ATG1, integriert.

pGAD-bW2₅₆₇₋₆₄₅

Hefe-Zwei-Hybrid Beutevektor. Derivat von pGAD-DS (Dualsystems Biotech). Enthält den C-terminalen Bereich des *bW2*-Gens (AS567-645) als 0,3 kb *Sfil*-Fragment.

pMS72NLS

Derivat von pMS72 (M. Scherer, unveröffentlicht). Enthält ein *clp1-eGFP* Fusionskonstrukt zur Integration in den *clp1*-Locus. In die singuläre *Sfil*-Restriktionsschnittstelle wurde durch Oligoinserion eine SV40-Kernlokalisationssequenz zwischen dem offenen Leserahmen von *clp1* und eGFP inseriert.

pGBKT7-Clp1₁₈₋₄₄₅

Hefe-Zwei-Hybrid Ködervektor. Derivat von pGBKT7-Clp1. Enthält ein N-terminal verkürztes 1285 bp *Sfil*-Fragment des offenen Leserahmens von *clp1*.

pGBKT7-Clp1₅₀₋₄₄₅

Hefe-Zwei-Hybrid Ködervektor. Derivat von pGBKT7-Clp1. Enthält ein N-terminal verkürztes 1185 *Sfil*-Fragment des offenen Leserahmens von *clp1*.

pGBKT7-Clp1₁₀₀₋₄₄₅

Hefe-Zwei-Hybrid Ködervektor. Derivat von pGBKT7-Clp1. Enthält ein N-terminal verkürztes 1035 bp *Sfil*-Fragment des offenen Leserahmens von *clp1*.

pGBKT7-Clp1₁₅₀₋₄₄₅

Hefe-Zwei-Hybrid Ködervektor. Derivat von pGBKT7-Clp1. Enthält ein N-terminal verkürztes 885 bp *SfiI*-Fragment des offenen Leserahmens von *clp1*.

pGBKT7-Clp1₂₂₂₋₄₄₅

Hefe-Zwei-Hybrid Ködervektor. Derivat von pGBKT7-Clp1. Enthält ein N-terminal verkürztes 669 bp *SfiI*-Fragment des offenen Leserahmens von *clp1*.

pGBKT7-Clp1₁₋₄₁₇

Hefe-Zwei-Hybrid Ködervektor. Derivat von pGBKT7-Clp1. Enthält ein C-terminal verkürztes 1251 bp *SfiI*-Fragment des offenen Leserahmens von *clp1*.

pGBKT7-Clp1₁₋₃₆₇

Hefe-Zwei-Hybrid Ködervektor. Derivat von pGBKT7-Clp1. Enthält ein C-terminal verkürztes 1101 bp *SfiI*-Fragment des offenen Leserahmens von *clp1*.

pGBKT7-Clp1₁₋₃₁₇

Hefe-Zwei-Hybrid Ködervektor. Derivat von pGBKT7-Clp1. Enthält ein C-terminal verkürztes 951 bp *SfiI*-Fragment des offenen Leserahmens von *clp1*.

pGBKT7-Clp1₁₋₂₆₇

Hefe-Zwei-Hybrid Ködervektor. Derivat von pGBKT7-Clp1. Enthält ein C-terminal verkürztes 801 bp *SfiI*-Fragment des offenen Leserahmens von *clp1*.

pGBKT7-Clp1₁₋₂₂₀

Hefe-Zwei-Hybrid Ködervektor. Derivat von pGBKT7-Clp1. Enthält ein C-terminal verkürztes 660 bp *SfiI*-Fragment des offenen Leserahmens von *clp1*.

pPIga2-clp1

pRU-ATG1-Derivat (Scherer *et al.*, 2006). Zur Expression von *clp1* unter der Kontrolle des Iga2-Promotors. Ein 1kb Iga2-Promotorfragment (*EcoRV/NdeI*) wurde in den *PvuII/NdeI* geöffneten Vektor integriert wodurch der *crg1*-Promotor gegen den Iga2-Promotor ausgetauscht wurde.

pPIga2:rbf1

pMS83-Derivat (M. Scherer, unveröffentlicht). Zur Expression von *rbf1* unter der Kontrolle des Iga2-Promotors. Ein 1kb Iga2-Promotorfragment (*EcoRV/NdeI*) wurde in den *PvuII/NdeI* geöffneten Vektor integriert wodurch der *crg1*-Promotor gegen den Iga2-Promotor ausgetauscht wurde.

pb-KO:PIga2-rbf1

Vektor zur Integration in den und gleichzeitigen Deletion des *b*-Locus. Derivat von pPCR-b-KO (Kämper 2004). In die singuläre *Stul*-

Restriktionsschnittstelle wurde in ein 3 kb PIga2:rbf1nosT-Fragment (*BglII/EcoRI*-blunt) aus pPIga2:rbf1 integriert.

4.2 Mikrobiologische, genetische, zellbiologische Methoden

4.2.1 Kultivierung von *E. coli*

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

Bestimmung der Zelldichte bei *E. coli*

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

RbCl-Transformation von *E. coli*

Dieses Protokoll ist modifiziert nach (Cohen, *et al.*, 1972). Zur Herstellung transformationskompetenter Bakterienzellen wurden 100 ml LB-Medium, dem je 10 mM MgCl₂ und MgSO₄ zugesetzt war, mit 1 ml einer frischen TOP10-Übernachtskultur angeimpft und bis zu einer OD₆₀₀ ≈ 0,5 bei 37°C und 200 Upm inkubiert. Die Zellen wurden für 15 min bei 3.000 Upm und 4°C pelletiert und in 33 ml eiskalter RF1-Lösung resuspendiert. Nach 30 bis 60 min Inkubation auf Eis wurden die Zellen erneut abzentrifugiert (15 min, 3.000 Upm, 4°C), der Überstand abgenommen, die Zellen in 5 ml eiskalter RF2-Lösung resuspendiert und 15 min inkubiert. Die Zellsuspension wurde zu je 100 µl aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert. Zur Transformation wurden die Zellen auf Eis aufgetaut, jeweils 50 µl mit 10 µl Plasmidlösung (1-5 ng Plasmid) bzw. Ligationsansatz versetzt und 5-30 min auf Eis

inkubiert. Nach einem Hitzeschock von 30s bei 42°C wurde der Transformationsansatz zur phänotypischen Expression der durch das eingebrachte Plasmid vermittelten Antibiotika-Resistenz mit 500 µl dYT-Medium versetzt und 30 min bei 500 Upm und 37°C in einem Eppendorf-Wärmeblock inkubiert. 200 µl des Transformationsansatzes wurde auf YT-Platten mit 100 µg/ml Ampicillin ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Auf diese Weise konnte eine Transformationsrate von 10^6 Transformanden pro 1 µg eingesetzter Plasmid-DNA erreicht werden.

RF1-Lösung:

100 mM RbCl
 50 mM MnCl₂ x 4 H₂O
 30 mM K-Acetat
 10 mM CaCl₂ x 2 H₂O
 15% (v/v) Glycerin in H₂O_{bid.}
 mit Essigsäure auf pH 5,8 einstellen und sterilfiltrieren.

RF2-Lösung:

10 mM MOPS
 10 mM RbCl
 75mM CaCl₂x2H₂O
 15% (v/v) Glycerin
 in H₂O_{bid.} mit NaOH
 auf pH 5,8 einstellen und sterilfiltrieren

4.2.2 Kultivierung von *S. cerevisiae*

S. cerevisiae-Stämme wurden standardmäßig als Schüttelkulturen bei 200 Upm oder auf Festmedien unter aeroben Bedingungen bei 28°C oder 30°C kultiviert. Übernachtskulturen wurden entweder aus Glycerinkulturen (bei -80°C eingelagert) oder von bewachsenen YEPD-Platten bzw. entsprechenden Selektionsplatten, die weniger als zwei Monate bei 4°C gelagert waren, angeimpft.

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

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

Anschließend wurde das 6-fache Volumen steriler LIT-PEG-Lösung zugefügt, gemischt und der Ansatz für 30 min bei 30°C inkubiert. Nach einem Hitzeschock für 15 min bei 42°C wurden die Zellen 3 min bei 2.000 Upm in einer Heraeus Biofuge pico abzentrifugiert, einmal mit YEPDA-Medium gewaschen und in 100 µl TE-Puffer resuspendiert, bevor der Ansatz auf einer entsprechenden Selektionsplatte ausgestrichen wurde.

SORB:

100 mM LiAc
10 mM Tris-Cl, pH 8,0
1 mM Na₂-EDTA, pH 8,0
1 M Sorbitol
in H₂O_{bid.}

Lit/PEG:

50 g PEG-3500
10 ml Lithium-Acetat-Lösung (100 mM)
in 100 ml H₂O_{bid.}, sterilfiltriert

4.2.3 Kultivierung von *U. maydis*

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

Bestimmung der Zelldichte bei *U. maydis*

Die Zelldichte von Flüssigkulturen wurde photometrisch in einem Novospec II Photometer (Pharmacia Biotech) bei 600 nm bestimmt. Um eine lineare Abhängigkeit sicherzustellen, wurden für die Messung der OD₆₀₀ die Kulturen durch entsprechende Verdünnung auf einen Wert unterhalb von 0,8 verdünnt. Als Nullwert wurde die OD₆₀₀ des jeweiligen Kulturmediums verwendet. Eine OD₆₀₀ von 1,0 entspricht etwa $1-5 \times 10^7$ Zellen/ml.

Induktion von *U. maydis*-Stämmen

Die Stämme wurden aus Vorkultur in Flüssigmedium angeimpft, das reprimierende Bedingungen bot (im Fall des *crg1*-Promotors mit Glukose als einziger Kohlenstoffquelle, im Fall des *nar1*-Promotors mit Glutamin als einziger Stickstoffquelle) und bis zu einer OD₆₀₀ ≈ 0,5 bei 28°C und 200 Upm inkubiert. Die Zellen wurden daraufhin abzentrifugiert (3.000 Upm, 5 min, 28°C, Heraeus Multifuge 4 KR), der Überstand abgenommen und die Zellen im gleichen Volumen H₂O_{bid.}

resuspendiert. Nach nochmaliger Pelletierung (3.000 Upm, 5 min, 28°C, Heraeus Multifuge 4 KR) wurden die Zellen in Flüssigmedium resuspendiert, das induzierende Bedingungen bot (im Fall des *crg1*-Promotors Arabinose als einziger Kohlenstoffquelle, im Fall des *nar1*-Promotors mit Nitrat als einziger Stickstoffquelle). Die Kulturen wurden bei 28°C und 200 Upm für die erforderliche Zeit inkubiert. Für die Probenentnahme wurden jeweils 50 ml Kultur in 50 ml-Röhrchen (Greiner) abzentrifugiert (3.000 Upm, 5 min, 28°C, Heraeus Multifuge 4 KR), der Überstand dekantiert und die Zellpellets in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

Transformation von *U. maydis*

Dieses Protokoll ist modifiziert nach (Schulz *et al.*, 1990) und (Gillissen *et al.*, 1992).

Von einer auf Platte wachsenden Kultur wurde eine 4 ml YEPS-Flüssigkultur angesetzt und für 8-10 h bei 28°C geschüttelt. Diese Vorkultur wurde anschliessend 1/300 in 50 ml frischem YEPSL- Medium verdünnt und bei 28°C bis zu einer Zelldichte von $1-2 \times 10^7$ Zellen/ml (bis maximal $OD_{600} = 1,0$) geschüttelt. Nach Erreichen des optimalen Zelltiters wurden die Zellen zentrifugiert (3.200 Upm, 10 min, 4°C), mit 25 ml SCS gewaschen und in 5 ml SCS resuspendiert. Nach Zugabe von 4 ml SCS mit 2,5 mg/ml Novozym erfolgte der Zellwandverdau. Die in diesem Puffer bei Raumtemperatur ablaufende Protoplastierung kann mikroskopisch verfolgt werden, da die zigarrenförmigen Zellen nach Lyse der Zellwand eine kugelige Form einnehmen. Waren etwa 1/3 der Zellen abgerundet (nach 3-8 min), wurden 10 ml eiskaltes SCS zugegeben und die Protoplasten durch zehninütige Zentrifugation bei 2.300 Upm (4°C) pelletiert. Um das Novozym vollständig zu entfernen, wurde dieser Waschgang zweimal wiederholt. Anschliessend wurde mit eiskaltem 10 ml STC gewaschen und das Pellet danach in einem Volumen von 0,5 ml eiskaltem STC aufgenommen. Die so behandelten Protoplasten können 3-4 h auf Eis oder aliquotiert bei -80°C mehrere Monate aufbewahrt werden.

Zur integrativen Transformation wurden 100 µl Protoplasten mit 1-5 µl linearisierter Plasmid-DNA (3-5 µg) und 1 µl Heparin-Lösung für 10 min auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 0,5 ml STC/PEG folgte eine weitere Inkubation von 15 min auf Eis. Anschliessend wurde der gesamte Transformationsansatz auf einer kurz zuvor mit Top-Agar überschichteten Regenerationsagarplatte ausgestrichen. Nach 2 bis 5 Tagen Inkubation bei 28°C wurden die gewachsenen Kolonien mit Zahnstochern auf antibiotikahaltigen PD- oder CM-Platten vereinzelt.

SCS:
20 mM Na-Citrat, pH 5,8
1 M Sorbitol
in H₂O_{bid.}, sterilfiltriert.

STC:
10 mM Tris-Cl, pH 7,5
100 mM CaCl₂
1 M Sorbitol in H₂O_{bid.}
sterilfiltriert.

STC/PEG:
15 ml STC
10 g PEG4000

Test auf filamentöses Wachstum

U. maydis-Stämme wurden in CM-Flüssigmedium bei 28°C bis zu einer OD₆₀₀ ≈ 0,5 angezogen. Die Zellen wurden pelletiert (13.000 Upm, 1 min, RT) und in H₂O_{bid.} aufgenommen, und die Zelldichte auf eine OD₆₀₀ ≈ 1,0 eingestellt. Bei Ko-Inokulationen wurden gleiche Volumina beider Kreuzungspartner in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß gemischt. Von jedem Ansatz wurden 3-5 µl auf eine CM-CC-Platte getropft. Die Platte wurde mit Parafilm versiegelt und für 24-48 h bei 22°C inkubiert.

Pheromonstimulation in Flüssigkultur

Für die Behandlung mit synthetischem Pheromon wurden die Zellen in MM-Nitrat/Arabinose Flüssigmedium bis zu einer OD₆₀₀ ≈ 0,3 angezogen. Jeweils 3 ml Kultur wurden in einem 15 ml-Röhrchen (Greiner) pelletiert (8.500 Upm, 5 min, RT) und in 3 ml frischem MM-Nitrat/Arabinose Medium mit 2,5 µg/ml synthetischem Pheromon (in DMSO) bzw. 0,1 % (v/v) DMSO resuspendiert. Die Inkubation erfolgte für 6 h bei 28°C und 20 Upm auf einem Drehrad (Eppendorf).

Pflanzeninfektionen

Für Pathogenitätstests wurde eine Spritzinfektion verwendet, bei der 300 µl einer Pilzsuspension in das Innere des Blattwirtels sieben Tage alter Maispflanzen (Early Golden Bantam) injiziert wurden. Die entsprechenden Stämme wurden in YEPSL-Flüssigmedium bis zu einer OD₆₀₀ ≈ 0,8 angezogen, durch Zentrifugation (3000 Upm, 5 min, RT) pelletiert und in H₂O_{bid.} aufgenommen (OD₆₀₀ ≈ 3,0). Die kompatiblen Stämme wurden vor der Infektion 1:1 gemischt. Die Bonitur erfolgte 7 Tage nach Infektion.

Calcofluor-Färbung

20-50 µl Zellen (auch *on planta*) wurden mit einer 1:100-Verdünnung einer Calcofluorfärbelösung (Stocklösung: 10 mg/ml in DMSO) überschichtet. Die Präparate wurden zwei Minuten bei RT inkubiert und anschließend einmal mit PBS (pH 7,2) gewaschen.

Chlorazol Black E-Färbung

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

Chlorazol Black E-Lösung:

0,03% f. c. Chlorazol (Sigma) in H_2O_{bid} ,
Glycerin und Milchsäure im Mischverhältnis 1:1:1.

DAPI-Färbung

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

Mikroskopie und Bildverarbeitung

Die zellmorphologische Betrachtung von *U. maydis* erfolgte an einem Lichtmikroskop (Axiophot oder AxioImager Z1, ZEISS) mittels Nomarski-Optik. 3,5 µl einer exponentiell wachsenden Kultur ($OD_{600} \approx 0,3-0,5$) wurden zur Analyse auf Agarose-beschichtete Objektträger getropft. Für die Fluoreszenz-Mikroskopie wurden Filter mit folgendem Anregungs- und Emissionsspektrum eingesetzt: GFP, 450-490 nm und 515-565 nm. Digitale Aufnahmen wurden mit einer hochauflösenden CCD-Kamera (CoolSNAP-HQ, Photometrics), bzw. einer AxioCam MRm (Zeiss) aufgenommen, welche durch das Programm MetaMorph (Universal Imaging) oder durch die Axiovision-Software (Zeiss) gesteuert wurde. Die Nachbearbeitung der Bilder (Bildausschnitt, Kontrastverstärkung, Maßstabsskalierung) erfolgte mit der Axiovision-Software (Zeiss).

Bimolekulare Fluoreszenzkomplementationsanalyse (BiFC) (Hu et al., 2002)

Zur Untersuchung von Protein-Protein-Interaktionen in *U. maydis* wurde die BiFC-Analyse verwendet. Auf eine Interaktion zu testende Proteine wurden an die N- oder C-terminalen Fragmente des eGFP-Proteins fusioniert. Das N-terminale Fragment (NG) besteht aus den AS 1-154, das C-terminale Fragment (CG) aus den AS 155-238. Alle

verwendeten Protein-N(C)G-Fusionen waren C-terminal. Die Expression der Fusionsproteine stand unter der Kontrolle des *crg1*-Promotors und wurde nach Präinkubation der Kulturen in CM-Glukose bis zu einer $OD_{600} = 0.2-0.4$, 20 h mit Arabinose induziert.

4.3 Molekularbiologische Standard-Methoden

Standardtechniken, wie z.B. Aufreinigung, Fällung und elektrophoretische Auftrennung von DNA, oder Klonierungstechniken sind bei (Ausubel *et al.*, 1987) und (Sambrook *et al.*, 1989) beschrieben.

4.3.1 Die Bestimmung der Konzentration von Nukleinsäuren

Die Konzentration von Nukleinsäuren wurde photometrisch bestimmt. Bei einer Schichtdicke von 1 cm entspricht $OD_{260} = 1$ einer Konzentration von 50 $\mu\text{g/ml}$ doppelsträngiger DNA, 33 $\mu\text{g/ml}$ einzelsträngiger DNA, bzw. 40 $\mu\text{g/ml}$ RNA. Als Maß für die Reinheit der Desoxyribonukleinsäuren diente der Quotient aus A260 zu A280. Für reine DNA und RNA sollte er bei etwa 1,8 liegen. Niedrigere Werte weisen auf Verunreinigungen mit Proteinen hin, höhere Werte auf Verunreinigungen mit Salzen oder Zuckern. Die Messungen erfolgten in einem BioSpec UV-Spektralphotometer (Amersham) bzw. NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer (NanoDrop-Technologies).

4.3.2 Die Isolierung von Nukleinsäuren

Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Die Isolierung erfolgte mittels "Lyse durch Kochen" nach (Sambrook *et al.*, 1989). 1,5 ml einer *E. coli*-Übernachtskultur wurden pelletiert (13.000 Upm, 1 min, RT). Das Zellpellet wurde in 300 μl STET resuspendiert, nach Zugabe von 20 μl Lysozym-Lösung kräftig geschüttelt und anschließend 90 sec bei 95°C in einem Eppendorf-Heizblock inkubiert. Die lysierten Zellenreste und die denaturierte genomische DNA wurden 10 min bei 9.000 Upm abzentrifugiert und danach mit einem sterilen Zahnstocher aus der wässrigen Lösung entfernt. Die Reinigung der Plasmid-DNA erfolgte durch Fällung mit 30 μl 3 M Na-Acetat, pH 5,3 und 500 μl Isopropanol bei RT für 5 min und anschließender Zentrifugation für 5 min bei 13.000 Upm. Das Pellet wurde mit 70% Ethanol gewaschen und nach Trocknen in 100 μl TE-Puffer mit 20

µg/ml RNase A aufgenommen. Mit dieser Methode gelang es routinemäßig, aus 1,5 ml Übernachtskultur etwa 15 µg Plasmid-DNA zu isolieren.

STET:

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

Lysozym-Lösung:

10 mg/ml Lysozym
10 mM Tris-Cl, pH 8,0
in H₂O_{bid.}

DNA-Isolierung aus *U. maydis*

Diese Methode ist modifiziert nach (Hoffman and Winston, 1987).

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

Ustilago-Lysispuffer:

50 mM Tris-Cl, pH 7,5
50 mM Na₂-EDTA
1% (w/v) SDS in H₂O_{bid.}

TE-Phenol/Chloroform:

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

RNA-Isolierung nach der Trizol -Methode

Diese Methode orientiert sich am Protokoll der Firma Invitrogen und wurde zur Präparation von Gesamt-RNA aus *U. maydis*-Flüssigkulturen verwendet.

A) Aus pheromonstimulierten *U. maydis* Zellen: 2 ml Zellkultur (OD₆₀₀ ≈ 0,3-0,5) wurden pelletiert (13.000 Upm, 5 min, RT), der Überstand verworfen und das Pellet in flüssigem Stickstoff schockgefroren (ggf. Aufbewahrung bei -80°C).

B) Aus *U. maydis* Flüssigkultur: 50 ml Zellkultur (OD₆₀₀ ≈ 0,5) wurden pelletiert (3.500 Upm, 5 min, RT), der Überstand verworfen und das Pellet in flüssigem Stickstoff schockgefroren (ggf. Aufbewahrung bei -80°C).

C) Aus *U. maydis* Kulturen, die auf aktivkohlehaltigen Festmedien gewachsen sind: Auf das in flüssigem Stickstoff tiefgefrorene und zu feinem Pulver gemörserte Pilzmaterial wurden pro 1 gr 10 ml Trizol gegeben, gut gemischt und für 10 min bei RT inkubiert.

Auf das tiefgefrorene Zellpellet wurde **A)** 1 ml **B)** 2 ml Trizol pipettiert, dieser Ansatz kurz gevortext und nach Zugabe von ca. 0,3 g Glasperlen für 5 min auf einer Retsch-Kugelmühle bei 30 Hz aufgeschlossen. Nach Inkubation bei RT für 5 min wurden pro

ml Trizol 200 µl Chloroform zugegeben. Alle weiteren Angaben sind pro ml eingesetztem Trizol.

Die Ansätze wurden anschließend kurz gevortext und 2-3 min bei RT inkubiert. Nach Zentrifugation (13.000 Upm, 4°C, 15 min) wurde die wässrige Phase abgenommen, in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und nach Zugabe von 500 µl Isopropanol 10 min bei RT gefällt. Nach erneuter Zentrifugation (13.000 Upm, 4°C, 10 min) wurde die pelletierte RNA mit 75% Ethanol gewaschen und erneut zentrifugiert (13.000 Upm, 4°C, 5 min). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet für 5 min bei RT getrocknet, anschliessend in 50 µl Nuclease-freiem H₂O (Ambion) aufgenommen und für 10 min bei 55°C resuspendiert. Eine Quantitäts- und Qualitätskontrolle erfolgte durch photometrische Messung am NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer sowie durch Analyse auf einem Agilent 2100-Bioanalyser (siehe Angaben des Herstellers).

RNA-Isolierung aus pilzlichem Material von der Blattoberfläche (Latex-Methode) nach (Vranes, 2006)

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

4.3.3 Auftrennung und Nachweis von Nukleinsäuren

Transfer von DNA (Southern-Blot)

Diese Methode ist modifiziert nach (Southern, 1975). Der Transfer der aufgetrennten DNA-Fragmente aus einem Agarosegel 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 darüberliegende Nylonmembran (Hybond-N+, Amersham Pharmacia Biotech). Vor dem Transfer wurde das Agarosegel für jeweils 15 min in 0,25 M HCl, DENAT- und RENAT-Lösung inkubiert, um u.a. einen Teil der Purine abzuspalten und damit den Transfer großer DNA-Fragmente zu erleichtern. Der Kapillar-Blot erfolgte in der Regel über Nacht, mindestens jedoch für 4 h. Anschließend wurde die Membran 15 min getrocknet und die DNA durch UV-Bestrahlung fixiert.

Der spezifische Nachweis immobilisierter Nukleinsäuren (DIG-Protokoll):

Genspezifische Sonden wurden durch den Einbau von Digoxigenin-11-dUTP (DIG) in 0,5 – 1 µg Sonden-DNA (in 16 µl DNA + 4 µl DIG High Prime) mit dem DIG High-Prime Kit (Roche) hergestellt. Die Inkubation des Reaktionsansatzes erfolgte bei 37°C über Nacht. Nach Fällung der Sonden-DNA mit 2,5 µl 4M LiCl und 75 µl EtOH wurde das Pellet im 1 ml Hybridisierungspuffer gelöst und anschließend für 5 min bei 95°C denaturiert. Die Hybond-N+-Membranen (Amersham Pharmacia Biotech) wurden zur Absättigung der unspezifischen Bindungsstellen mit Southern-Hybridisierungspuffer für 20 min bei 62°C präinkubiert. Nach Wechsel der Hybridisierungslösung wurde die denaturierte Sonde zugegeben und über Nacht bei 65°C hybridisiert. Im Anschluß wurden die Filter für je 15 min bei 62°C mit 2xSSPE+0,1%SDS, 1xSSPE+0,1%SDS und 0,1xSSPE+0,1%SDS gewaschen.

Für die Detektion wurde die Membran bei Raumtemperatur unter langsamem Schwenken in folgenden Lösungen inkubiert: 5 min DIG-Waschpuffer, 30 min DIG2-Lösung, 30 min DIG2-Antikörper-Lösung (1:15.000 Anti-Digoxigenin-Fab-Fragmente (Roche) in DIG2-Lösung) und zweimal 20 min in DIG-Waschpuffer. Danach wurde die Membran für 5 min in DIG3-Lösung äquilibriert und anschließend für 5 min in Chemilumineszenz-Lösung (1:100 CDP-Star (Roche) in DIG3-Lösung) inkubiert. Die Membran wurde luftblasenfrei in einen Plastikbeutel eingeschweißt und gemeinsam mit einem Film in einer lichtdichten Kassette verschlossen. Nach einer Expositionszeit von durchschnittlich 1-30 min wurde der Film entwickelt.

4.4 Biochemische Methoden

4.4.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese von Proteinen

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

Als Größenstandard für Proteingele wurde der peqGOLD Protein Marker IV (Peqlab) verwendet.

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

Der Transfer der Proteine aus SDS-Polyacrylamid-Gelen auf eine Nitrozellulose Membran (Hybond-P, Amersham) erfolgte mittels Elektro-Blot in einer Semi-Dry-Blotter-Apparatur für 1 h mit 1 mA pro cm² Nitrozellulose-Membran. Der Aufbau des Blots von der Kathode in Richtung Anode geschah folgendermaßen:

- drei Lagen Whatman 3MM (in Kathodenpuffer getränkt)
- SDS-Polyacrylamid-Gel (für 10 min in Kathodenpuffer äquilibriert)
- Nitrozellulose-Membran (10 sec in Methanol gewaschen, mit H₂O gespült und für 10 min in Anodenpuffer 2 äquilibriert)
- eine Lage Whatman 3MM (in Anodenpuffer 2 getränkt)
- zwei Lagen Whatman 3MM (in Anodenpuffer 1 getränkt)

4.4.3 *In vitro* Transkription und Translation von Proteinen

Für die *in vitro* Transkription und Translation von Proteinen wurde das TNT®Quick Coupled Transcription / Translation System (Promega) verwendet. Für die Reaktion wurden 40 µl des TNT®T7 Master Mix (enthält ein Hasen-Retikulozyten-Lysat), 1 µl 1 mM Methionin, 2,5 µl Transcend™ Biotin-Lysyl tRNA und insgesamt 2 µg der Plasmid-

DNA in 6,5 µl Nuklease-freiem H₂O gemischt und für 90 min bei 30°C in einem Wärmeblock inkubiert.

Um zu überprüfen, ob die Proteine erfolgreich exprimiert wurden, wurden 1,5 µl des Reaktionsgemischs mit 20 µl 1x SDS-Probenpuffer versetzt, 5 min bei 95°C inkubiert und anschließend auf einem 10%-igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Nach dem Transfer der Proteine auf eine Nitrozellulose-Membran (s.o.) wurden die Proteine mit dem Transcend™ Colorimetric Detection System (Promega) detektiert. Dazu wurde die Membran zunächst für eine Stunde mit TBST-Puffer geblockt. Nach dem Blockieren wurde die Membran eine Stunde in 10 ml TBST-Puffer + 4 µl der Streptavidin-gekoppelten alkalischen Phosphatase rotierend inkubiert. Nach zweimaligem Waschen in TBST-Puffer für je 1 min und zwei weiteren Waschschritten in H₂O wurde die Membran in 3 ml Western Blue® Stabilized Substrate für AP inkubiert. Nach etwa 2 min wurden die ersten Banden sichtbar. Die Reaktion wurde abschließend durch Waschen mit H₂O gestoppt.

4.4.4 Co-Immunopräzipitation

Je 15 µl der *in vitro* exprimierten Proteine wurden gemischt und mit Co-IP-Puffer bis zu einem Gesamtvolumen von 150 µl aufgefüllt. Dieses Gemisch wurde für 30 min bei RT inkubiert, um die Komplexbildung zwischen den beiden Interaktionspartnern zu gewährleisten. Nach Zugabe von 10 µl Anti-HA-gekoppelter Agarose erfolgte die Immunopräzipitation (IP) über Nacht bei 4°C auf einem Drehrad. Nachdem viermaligem Waschen mit je 1 ml Co-IP-Puffer, wurde das Pellet mit 20 µl 2x SDS-Probenpuffer versetzt und für 3-5 min bei 95°C in einem Wärmeblock inkubiert. Nach Zentrifugation (1 min 13.00 Upm) wurde der Überstand auf ein 10 %-iges Polyacrylamidgel aufgetragen. Als Negativkontrolle wurde eine IP-Reaktion mit dem Clp1-Protein und plasmidfreiem Retikulozytenlysate durchgeführt. Als Inputkontrolle wurde jeweils 1/10 der für die IP eingesetzten Proteinmenge aufgetragen.

Co-IP-Puffer:

25 mM HEPES
100 mM NaCl
12.5 mM MgCl₂
0.1 mM Na₂-EDTA
10 % (v/v) Glycerin
0.1 % (v/v) NP-40
1 mM DTT in H₂O_{bid.},
pH-Wert auf 7,5 einstellen

4.5 PCR-Methoden

4.5.1 Standard-PCR-Ansätze

Die Methode ist modifiziert nach (Innis, *et al.*, 1990). Ein typischer PCR-Ansatz enthielt etwa 10 ng Template-DNA, die beiden Oligonukleotide in einer Endkonzentration von 1 μ M, dNTPs in einer Endkonzentration von 200 μ M (d. h. je 200 μ M dATP, dCTP, dGTP und dTTP) in PCR- Puffer. Standardmäßig wurden die Reaktionen in einem Volumen von 50 μ l mit Hot-Start durchgeführt, zur Vermeidung von Kontaminationen wurden Pipettenspitzen mit Filtereinsatz benutzt. Bei Verwendung der aufgeführten Oligonukleotide und einer Amplifikatlänge von unter 1 kb sah ein typisches Protokoll folgendermaßen aus:

Denaturierung bei 94°C für 2 min, Zugabe von 1-2 U Taq DNA-Polymerase (Hot-Start),
Denaturierung bei 94°C für 1 min,
30 Zyklen mit jeweils
30 s Denaturierung bei 94°C,
1 min Annealing bei 65°C und
1,5 min Elongation bei 72°C,
mit einer abschließenden Elongationsphase von 5 min bei 72°C.

Die Hybridisierungstemperatur bzw. Elongationszeit wurde entsprechend der verwendeten Oligonukleotide und AMplifikatlängen entsprechend angepasst. Die Reaktionen erfolgten im Thermocycler (PTC 100 oder PTC 200, MJ Research).

PCR-Ansätze mit der PhusionTM High-Fidelity DNA Polymerase erfolgten nach Angaben des Herstellerprotokolls.

4.5.2 PCR-Generierung von Gen-Deletions- Konstrukten 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 PCR-Primer wurden an den dem offenen Leseraster zugewandten Enden der Amplifikate *Sfi*I-Restriktionsschnittstellen eingebracht. Nach Restriktion der PCR-Produkte wird über

die *Sfi*I-Restriktionsschnittstellen eine *Sfi*I-geschnittene Hygromycin-Resistenzkassette aus pBS-hhn direkt zwischen die amplifizierten Flanken ligiert. Mit einer weiteren PCR mit den jeweiligen Außenprimern für die Flanken wird das komplette Deletionskonstrukt amplifiziert, aufgereinigt und für die Transformation in *U. maydis* verwendet. Für alle PCR-Amplifikationen wurde Phusion™ High-Fidelity DNA Polymerase 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 *Sfi*I-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 *Sfi*I-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 *Sfi*I 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 *Sfi*I-restringierten Resistenzkassette. Nach zweistündiger Ligation bei RT wurde der Ligationsansatz über ein 0,8%iges TBE-Agarosegel aufgetrennt, die 4 kB-Banke aufgereinigt und als Matrize in die abschließende PCR eingesetzt. Hierbei wurden Nested-Primer verwendet um eine effiziente Amplifikation des Deletionskonstruktes zu gewährleisten. Nach der Fällung des PCR-Reaktionsgemisches wurde die DNA in 10 µl TE resuspendiert und anschließend für die Transformation eingesetzt.

4.5.3 DNase I-Behandlung und Reverse Transkription (für Real-Time-PCR)

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

Kit). Für die Reverse Transkription wurde das SuperScript® III First-Strand Synthesis SuperMix-Kit von der Firma Invitrogen nach Herstellerprotokoll verwendet. Für die reverse Transkription von Gesamt-RNA, die aus Pilzkulturen und Tumormaterial extrahiert wurde, wurden 0,5-1 µg DNase-behandelter RNA eingesetzt und zusammen mit Oligo(dT)₂₀-Primern, den entsprechenden Puffern und Enzymgemischen (Details, siehe Herstellerprotokoll) für die Erststrang-cDNA-Synthese bei 50°C für 50 min inkubiert.

4.5.4 Real-Time-PCR (qRT-PCR)

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

95°C für 7 min, 45 Zyklen für 30 s bei 95°C, 20 s bei 60°C und 40 s bei 72°C. Im Anschluß hieran wurde die Spezifität der Amplifikation anhand einer Schmelzkurve am BioRad-iCycler-System überprüft. Zur Kalkulation des CT-Wertes (Threshold Cycle), der den Wert bzw. Zyklus beschreibt, bei dem die Fluoreszenz zum ersten Mal signifikant über die Hintergrundfluoreszenz steigt, wurde die BioRad-Software Version 3.0a verwendet. Die Berechnung der relativen Expressionswerte erfolgte mit dem Program Bio-Rad Gene Expression Macro der Firma Biorad.

Absolute Quantifizierung der Genexpression nach (Leong *et al.*, 2007)

Zur absoluten Quantifizierung der *cib1*-Genexpression wurden Eichlösungen erstellt, die aus einem 1:1 molaren Gemisch PCR-amplifizierter *cib1* cDNA und aus PCR-amplifizierter genomischer *cib1*-DNA bestand. Dieses Gemisch wurde in 10-fachen Reihenverdünnungen für die Erstellung der Eichkurven eingesetzt. Die Eichkurven für die spezifischen Primerpaare basieren auf der Verwendung des Mittelwertes technischer Triplikate. Die Genexpression in den verwendeten Proben mit unbekannter Menge Ziel-DNA befand sich in dem, durch die Eichkurven ermittelten, linearen Amplifikationsbereich und wurde in Duplikaten ermittelt.

4.5.5 cDNA-Isolierung

Die Isolierung der cDNAs erfolgte mit dem GeneRacer Kit (Invitrogen) nach Herstellerangaben. Als Matrize wurde für die Untersuchung der *cib1*-cDNA RNA aus

dem Stamm FB1 verwendet. Für die Isolierung der *fkh1*-cDNA wurde RNA aus Tumorgewebe 5 dpi (freundlicherweise von M. Vranes zur Verfügung gestellt), verwendet. Nach der Amplifikation der cDNA wurde diese auf einem Agarosegel aufgetrennt, distinkte Banden im Bereich der erwarteten Größe wurden aufgereinigt, in pCR2.1 TOPO (Invitrogen) kloniert und sequenziert.

4.6 Transkriptomanalyse

RNA-Aufreinigung nach RNeasy-Protokoll

100 µl gelöste RNA wurde mit 350 µl Puffer RLT und 250 µl 100% EtOH gemischt. Dieser Ansatz wurde auf eine RNeasy-Säule pipettiert und für 15 sec bei 10.000 Upm und RT zentrifugiert. Nach Zugabe von 500 µl Puffer RPE wurde die Säule erneut für 15 sec bei 10.000 Upm, RT zentrifugiert. Dieser Schritt wurde einmal wiederholt. Anschließend wurde die Säule zur Trocknung der Matrix erneut bei 2 min, 10.000 Upm zentrifugiert. Zur Elution der RNA wurden 30 µl RNase-freies Wasser (Ambion) auf die Matrix pipettiert und die Säule für 1 min bei 10.000 Upm zentrifugiert. Das Eluat wurde für eine Wiederholung dieses Schrittes eingesetzt. Diese Methode orientiert sich am Protokoll der Firma Qiagen; die genaue Zusammensetzung der verwendeten Puffer geht aus dem Protokoll hervor.

cDNA-Synthese nach dem Affymetrix-Protokoll

Alle nachfolgenden Schritte der Ein-Schritt-Amplifikation und Zwei-Schritt-Amplifikation sind im „GeneChip® Expression Analysis Technical Manual“ der Firma Affymetrix näher beschrieben. Soweit nicht anders angegeben, wurde nach Herstellerprotokoll vorgegangen.

Ein-Schritt-Amplifikation

Zur Synthese eines cDNA-Erststranges wurden 5 µg gereinigte RNA (nach photometrischer Konzentrationsbestimmung) und 100 pmol T7(dT)-Primer in einem Volumen von 20 µl für 10 min bei 70°C inkubiert. Nach kurzem Abzentrifugieren wurde der Ansatz auf Eis gestellt, mit 4 µl 5x Erststrangpuffer, 2 µl 0,1 M DTT und 1 µl 10 mM dNTP-Mix versetzt und für 2 min bei 42°C inkubiert. Nach Zugabe von 2 µl SuperScript II RT (Invitrogen) wurde die Mischung für 1 h bei 50°C inkubiert.

Zur Zweitstrangsynthese wurde der oben beschriebene Ansatz mit 91 µl H₂O, 30 µl 5x Zweitstrangpuffer, 3 µl 10 mM dNTP-Mix, 1 µl *E. coli* DNA-Ligase (10 U/ml), 4 µl *E. coli*-

DNA-Polymerase I und 1 µl *E. coli* RNaseH versetzt und für 2 h bei 16°C inkubiert. Anschliessend wurden 2 µl T4-DNA-Polymerase zugegeben, der Ansatz für weitere 5 min bei 16°C inkubiert und die Reaktion mit 10 µl 0,5 M EDTA gestoppt. Diese Methode orientiert sich an den Protokollen der Firmen Affymetrix und Invitrogen; die genaue Zusammensetzung der verwendeten Puffer geht aus dem jeweiligen Protokoll hervor.

cDNA-Aufreinigung

600 µl cDNA-Bindepuffer wurden zu 162 µl cDNA gegeben, der Ansatz kurz gevortext und auf eine cDNA-Reinigungssäule aufgetragen. Nach Zentrifugation für 1 min bei 10.000 Upm, RT wurde die Säule mit 750 µl cDNA-Waschpuffer gewaschen und erneut für 1 min bei 10.000 Upm, RT zentrifugiert. Nach Verwerfen des Eluates wurde die Säule für 5 min bei 13.000 Upm, RT zentrifugiert. Die Elution der cDNA erfolgte mit 14 µl cDNA-Elutionspuffer und einminütige Zentrifugation bei 13.000 Upm, RT. Eine Qualitätskontrolle der cDNA erfolgte auf einem Agilent 2100-Bioanalyser®. Diese Methode orientiert sich am Protokoll der Firma Qiagen; die genaue Zusammensetzung der verwendeten Puffer geht aus dem Protokoll hervor.

cRNA-Synthese – *in vitro*-Transkription

Die *in vitro*-Transkription erfolgte mit dem BioArray-HighYield-RNA Transcript Labelling Kit (Enzo). Dabei wurde die Gesamtmenge der verfügbaren cDNA (12 µl) mit 4 µl 10x HY-Puffer, 4 µl 10x Biotin-markierter Ribonukleotide, 4 µl 10x DTT, 4 µl 10x RNase-Inhibitoren und 2 µl 20x T7- RNA-Polymerase in einem Gesamtvolumen von 40 µl versetzt. Die Komponenten wurden kurz gevortext, abzentrifugiert und anschließend bei 37°C für 16 h inkubiert. Nach jeweils 30 min wurde der Ansatz bei 750 Upm für 30 sec geschüttelt. Diese Methode orientiert sich am Protokoll der Firma Enzo; die genaue Zusammensetzung der verwendeten Puffer geht aus dem Herstellerprotokoll hervor.

cRNA-Aufreinigung

60 µl H₂O wurden zum Gesamtvolumen der *in vitro*-Transkriptions-Reaktion pipettiert und für 3 sec gevortext. Der Ansatz wurde mit 350 µl IVT-cRNA Bindepuffer versetzt und erneut für 3 sec gevortext. Anschliessend wurden 250 µl 100% EtOH zugegeben und die Lösung durch Pipettieren gemischt. Dieser Ansatz wurde auf IVT-cRNA-Säulen aufgetragen und für 15 sec bei 10.000 Upm, RT zentrifugiert. Nach Zugabe von 500 µl IVT-cRNA Waschpuffer wurden die Säulen erneut für 15 sec bei 10.000 Upm, RT zentrifugiert. Es wurden dann 500 µl 80% EtOH zugegeben und die Säule erneut für 15 sec bei 10.000 Upm, RT zentrifugiert. Nach Verwerfen des Eluates wurde die Säule für 5 min bei 13.000 Upm, RT zentrifugiert. Zur Elution der cRNA wurden 11 µl

H₂O auf die Matrix pipettiert, die Säule für 1 min bei RT inkubiert, für 1 min bei 13.000 Upm, RT zentrifugiert, erneut mit 10 µl H₂O versetzt, erneut für 1 min bei RT inkubiert und für 1 min bei 13.000 Upm, RT zentrifugiert. Eine Qualitätskontrolle der cRNA erfolgte auf einem Agilent 2100- Bioanalyser® und durch photometrische Messung. Diese Methode orientiert sich am Protokoll der Firma Qiagen; die genaue Zusammensetzung der verwendeten Puffer geht aus dem Protokoll hervor.

cRNA-Fragmentierung

20 µg cRNA wurden für eine cRNA-Fragmentierungsreaktion eingesetzt, die sich am Protokoll der Firma Affymetrix orientiert. 20 µg cRNA wurden dafür mit 8 µl Mg₂⁺-haltigem 5x Fragmentations-Puffer und H₂O in einem Gesamtvolumen von 40 µl gemischt. Dieser Ansatz wurde 35 min bei 94°C inkubiert und anschließend auf Eis gehalten. Eine Qualitätskontrolle der fragmentierten cRNA erfolgte auf einem Agilent 2100-Bioanalyser®. Diese Methode orientiert sich am Protokoll der Firma Affymetrix; die genaue Zusammensetzung der verwendeten Puffer geht aus dem Protokoll hervor.

Zwei-Schritt-Amplifikation

Dieses Protokoll wurde zur Transkriptom-Analyse der Stämme SG200 und SG200Δ*cib1*, die auf der Pflanzenoberfläche inkubiert wurden, verwendet. Hierbei wurde folgende Modifizierung des Protokolls vorgenommen: Im Anschluß an die Zweit-Strang cDNA-Synthese der zweiten Runde erfolgte die *in vitro*-Transkription mit dem BioArray-HighYield-RNATranscript Labelling Kit (Enzo) (s. Abschnitt cRNA-Synthese *in vitro*-Transkription). Alle weiteren Einzelheiten gehen aus dem Protokoll hervor.

Array-Hybridisierung

15 µg fragmentierte cRNA wurden mit 5 µl Kontrolloligo B2, 15 µl 20x Hybridisierungskontrollen, 3 µl Heringssperma-DNA (10 mg/ml), 3 µl BSA und 150 µl 2x Hybridisierungspuffer in einem Gesamtvolumen von 300 µl gemischt. Dieser Cocktail wurde für 5 min bei 99°C erhitzt, dann für 5 min bei 45°C inkubiert und 5 min bei 13.000 Upm, RT abzentrifugiert. 200 µl davon wurden in den Microchip pipettiert, der zuvor mit 200 µl 1x Hybridisierungspuffer bei 45°C für 10 min äquilibriert wurde. Nach Verschließen der Chip-Septen mit Klebeband wurde der Chip bei 45°C und 60 Upm für 16-18 h hybridisiert. Diese Methode orientiert sich am Protokoll der Firma Affymetrix; die genaue Zusammensetzung der verwendeten Puffer geht aus dem Herstellerprotokoll hervor.

Array-Detektionsreaktionen

Nach der Hybridisierung wurde der Chip entleert und mit 300µl Waschpuffer A befüllt. Die Nachweisreaktionen wurden mit einem SAPE-Mix, bestehend aus 300 µl 2x MES-Puffer, 24 µl BSA (50 mg/ml) und 6 µl Streptavidin-Phycoerythrin (1 mg/ml) in einem Gesamtvolumen von 600 µl, sowie einer Antikörper-Mischung, bestehend aus 300 µl 2x MES-Puffer, 24 µl BSA (50 mg/ml) und 6 µl Ziegen-IgG (10 mg/ml) und 3,6 µl biotinyliertem Antikörper (0,5 mg/ml) in einem Gesamtvolumen von 600 µl durchgeführt. Es wurde das EuGE-WS2v4-Programm für sämtliche Wasch- und Detektionsschritte verwendet. Diese Methode orientiert sich am Protokoll der Firma Affymetrix; die genaue Zusammensetzung der verwendeten Puffer geht aus dem Herstellerprotokoll hervor.

Datenanalyse

Nach Abschluß der Wasch- und Markierungsschritte wurden die Arrays mit Hilfe eines GeneArray Scanners (Agilent/Affymetrix) bzw. eines Affymetrix GeneChip Scanners (Affymetrix) eingelesen. Das resultierende Bild wurde zunächst durch Verwendung des Programms AFFYMETRIX MICROARRAY SUITE 5.0, bzw. 5.1 (Affymetrix) ausgewertet, normalisiert und die Expressionswerte kalkuliert. Die anschließende Datenanalyse wurde mit dem Programm R (Bioconductor) zur Berechnung der Irrtumswahrscheinlichkeit (adjusted P-value) und dem Programm dChip durchgeführt. Dabei wurde ein Expressionsunterschied >100 eine mehr als zweifache Änderung der Genexpression und ein adjusted P-value <0.01 als signifikant eingestuft.

4.7 Sequenzanalyse

Sequenzierung von DNA

Die Sequenzierung von DNA erfolgte durch einen kommerziellen Anbieter (MWG Eurofins).

Sequenz- und Strukturanalyse

Folgende Programme wurden für die Sequenz- und Strukturanalyse verwendet:

VectorNTI 10.0 (Invitrogen) Zur Sequenzanalyse, virtuellen Klonierung und

Bearbeitung von Plasmid- und genomischen Sequenzen, Primerdesign, Alignments von DNA und Proteinen

BLAST2 (Altschul, *et al.*, 1990; Altschul, *et al.*, 1997; Gish and States, 1993) zur Identifikation ähnlicher Proteine oder DNA-Sequenzen in den öffentlichen Datenbanken.

SMART (Schultz, *et al.*, 1998) zur Identifikation konservierter Domänen in Proteinen, bzw. zur Identifikation von Proteinen mit ähnlichen Domänen oder ähnlicher Domänenstruktur.

PSORT2 (Nakai and Kanehisha, 1992) zur Vorhersage der subzellulären Lokalisierung von Proteinen.

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

CLUSTALW (Eddy, 1997) und **CLUSTALX** (Heringa, 1999) zum Vergleich mehrerer Protein- oder DNA-Sequenzen.

CLONEMANAGER (Version 7 und Version 8; Sci Ed Central) zur Erstellung und Bearbeitung von Plasmid- und genomischen Sequenzen, zum Erstellen von Primern und zeichnen von genetischen Karten.

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

5 Literaturverzeichnis

- Adams, M. D., Tarrn, R. S. and Rio, D. C.** (1997). The alternative splicing factor PSI regulates P-element third intron splicing in vivo. *Genes Dev* **11**, 129-138.
- Adler, S.** (2007) Funktionelle Charakterisierung des Cib1-Proteins aus *Ustilago maydis*, Philipps-Universität, Marburg.
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W. and 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. and Lipman, D. J.** (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* **25**, 3389-3402.
- Atmakuri, K., Ding, Z. and Christie, P. J.** (2003). VirE2, a type IV secretion substrate, interacts with the VirD4 transfer protein at cell poles of *Agrobacterium tumefaciens*. *Mol Microbiol* **49**, 1699-1713.
- Aulehla, A. and Pourquie, O.** (2008). Oscillating signaling pathways during embryonic development. *Curr Opin Cell Biol* **20**, 632-637.
- Ausubel, M. A., Ausubel, M. A., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidmann, J. G. and Smith, J. A., eds.** (1987). *Current protocols in molecular biology* (John Wiley & Sons, Inc.).
- Bakkeren, G., Kamper, J. and Schirawski, J.** (2008). Sex in smut fungi: Structure, function and evolution of mating-type complexes. *Fungal Genet Biol* **45 Suppl 1**, S15-21.
- Banerjee-Basu, S., Ferlanti, E. S., Ryan, J. F. and Baxevanis, A. D.** (1999). The Homeodomain Resource: sequences, structures and genomic information. *Nucleic Acids Res* **27**, 336-337.
- Banuett, F.** (1992). *Ustilago maydis*, the delightful blight. *Trends Genet* **8**, 174-180.
- Banuett, F. and 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. and 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. and Herskowitz, I.** (1996). Discrete developmental stages during teliospore formation in the corn smut fungus, *Ustilago maydis*. *Development* **122**, 2965-2976.
- Begerow, D., Stoll, M. and Bauer, R.** (2006). A phylogenetic hypothesis of Ustilaginomycotina based on multiple gene analyses and morphological data. *Mycologia* **98**, 906-916.

- Black, D. L.** (2003). Mechanisms of alternative pre-messenger RNA splicing. *Annu Rev Biochem* **72**, 291-336.
- Blondel, M., Bach, S., Bamps, S., Dobbelaere, J., Wiget, P., Longaretti, C., Barral, Y., Meijer, L. and Peter, M.** (2005). Degradation of Hof1 by SCF(Grr1) is important for actomyosin contraction during cytokinesis in yeast. *EMBO J* **24**, 1440-1452.
- Blumenstein, A., Vienken, K., Tasler, R., Purschwitz, J., Veith, D., Frankenberg-Dinkel, N. and Fischer, R.** (2005). The *Aspergillus nidulans* phytochrome FphA represses sexual development in red light. *Curr Biol* **15**, 1833-1838.
- Böhmer, C., Ripp, C. and Bölker, M.** (2009). The germinal centre kinase Don3 triggers the dynamic rearrangement of higher-order septin structures during cytokinesis in *Ustilago maydis*. *Mol Microbiol* **74**, 1484-1496.
- Bölker, M.** (2001). *Ustilago maydis*--a valuable model system for the study of fungal dimorphism and virulence. *Microbiology* **147**, 1395-1401.
- Bölker, M., Genin, S., Lehmler, C. and Kahmann, R.** (1995). Genetic regulation of mating, and dimorphism in *Ustilago maydis*. *Can J Bot* **73**, 320-325.
- Bölker, M., Urban, M. and Kahmann, R.** (1992). The *a* mating type locus of *U. maydis* specifies cell signaling components. *Cell* **68**, 441-450.
- Bracha-Drori, K., Shichrur, K., Katz, A., Oliva, M., Angelovici, R., Yalovsky, S. and Ohad, N.** (2004). Detection of protein-protein interactions in plants using bimolecular fluorescence complementation. *Plant J* **40**, 419-427.
- Brachmann, A.** (2001) Die frühe Infektionsphase von *Ustilago maydis*, Ludwig-Maximilians-Universität, München.
- Brachmann, A., König, J., Julius, C. and Feldbrügge, M.** (2004). A reverse genetic approach for generating gene replacement mutants in *Ustilago maydis*. *Mol Genet Genomics* **272**, 216-226.
- Brachmann, A., Schirawski, J., Müller, P. and Kahmann, R.** (2003). An unusual MAP kinase is required for efficient penetration of the plant surface by *Ustilago maydis*. *EMBO J* **22**, 2199-2210.
- Brachmann, A., Weinzierl, G., Kämper, J. and Kahmann, R.** (2001). Identification of genes in the bW/bE regulatory cascade in *Ustilago maydis*. *Mol Microbiol* **42**, 1047-1063.
- Brefeld, O.** (1883) Botanische Untersuchungen über Hefenpilze. Untersuchungen aus dem Gesamtgebiete der Mykologie. , Leipzig.
- Brefeld, O.** (1895) Untersuchungen aus dem Gesamtgebiete der Mykologie: Die Brandpilze II. 98., Leipzig.
- Brefort, T., Doehlemann, G., Mendoza-Mendoza, A., Reissmann, S., Djamei, A. and Kahmann, R.** (2009). *Ustilago maydis* as a Pathogen. *Annu Rev Phytopathol* **47**, 423-445.

- Brefort, T., Muller, P. and Kahmann, R.** (2005). The high-mobility-group domain transcription factor Rop1 is a direct regulator of prf1 in *Ustilago maydis*. *Eukaryot Cell* **4**, 379-391.
- Brown, A. J. and Casselton, L. A.** (2001). Mating in mushrooms: increasing the chances but prolonging the affair. *Trends Genet* **17**, 393-400.
- Carlsson, P. and Mahlapuu, M.** (2002). Forkhead transcription factors: key players in development and metabolism. *Dev Biol* **250**, 1-23.
- Casselton, L. A. and Kües, U.** (1994). Mating type genes in homobasidiomycetes. In *The Mycota I: Growth, Differentiation and Sexuality*, J. G. H. Wessels and F. Meinhardt, eds. (Heidelberg, Springer-Verlag), pp. 307-321.
- Christensen, J. J.** (1963). Corn smut induced by *Ustilago maydis*. *Amer Phytopathol Soc Monogr* **2**.
- Cohen, S. N., Chang, A. C. and Hsu, L.** (1972). Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **69**, 2110-2114.
- Demerec, M., Adelberg, E. A., Clark, A. J. and Hartman, P. E.** (1966). A proposal for a uniform nomenclature in bacterial genetics. *Genetics* **54**, 61-76.
- Doebley, J.** (1992). Mapping the genes that made maize. *Trends Genet* **8**, 302-307.
- Doehlemann, G., van der Linde, K., Assmann, D., Schwammbach, D., Hof, A., Mohanty, A., Jackson, D. and Kahmann, R.** (2009). Pep1, a secreted effector protein of *Ustilago maydis*, is required for successful invasion of plant cells. *PLoS Pathog* **5**, e1000290.
- Doehlemann, G., Wahl, R., Horst, R. J., Voll, L. M., Usadel, B., Poree, F., Stitt, M., Pons-Kuhnemann, J., Sonnewald, U., Kahmann, R. and Kamper, J.** (2008a). Reprogramming a maize plant: transcriptional and metabolic changes induced by the fungal biotroph *Ustilago maydis*. *Plant J* **56**, 181-195.
- Doehlemann, G., Wahl, R., Vranes, M., de Vries, R. P., Kämper, J. and Kahmann, R.** (2008b). Establishment of compatibility in the *Ustilago maydis*/maize pathosystem. *J Plant Physiol* **165**, 29-40.
- Don, J. and Stelzer, G.** (2002). The expanding family of CREB/CREM transcription factors that are involved with spermatogenesis. *Mol Cell Endocrinol* **187**, 115-124.
- Duke, S. O., Fox, S. B. and Naylor, A. W.** (1976). Photosynthetic Independence of Light-induced Anthocyanin Formation in *Zea* Seedlings. *Plant Physiol* **57**, 192-196.
- Dunlap, J. C. and Loros, J. J.** (2006). How fungi keep time: circadian system in *Neurospora* and other fungi. *Curr Opin Microbiol* **9**, 579-587.
- Eddy, R.** (1997). Multiple alignment using hidden Markov models. *Proc Int Conf Intell Syst Mol Biol* **3**, 114-120.
- Ekena, J. L., Stanton, B. C., Schiebe-Owens, J. A. and Hull, C. M.** (2008). Sexual development in *Cryptococcus neoformans* requires CLP1, a target of the homeodomain transcription factors Sxi1alpha and Sxi2a. *Eukaryot Cell* **7**, 49-57.

- Fedler, M., Luh, K. S., Stelter, K., Nieto-Jacobo, F. and Basse, C. W.** (2009). The $\alpha 2$ mating-type locus genes *lga2* and *rga2* direct uniparental mitochondrial DNA (mtDNA) inheritance and constrain mtDNA recombination during sexual development of *Ustilago maydis*. *Genetics* **181**, 847-860.
- Feldbrügge, M., Kämper, J., Steinberg, G. and Kahmann, R.** (2004). Regulation of mating and pathogenic development in *Ustilago maydis*. *Curr Opin Microbiol* **7**, 666-672.
- Feldbrugge, M., Zarnack, K., Vollmeister, E., Baumann, S., Koepke, J., König, J., Munsterkötter, M. and Mannhaupt, G.** (2008). The posttranscriptional machinery of *Ustilago maydis*. *Fungal Genet Biol* **45 Suppl 1**, S40-46.
- Flor-Parra, I., Castillo-Lluva, S. and 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. and 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.
- Foulkes, N. S., Mellstrom, B., Benusiglio, E. and Sassone-Corsi, P.** (1992). Developmental switch of CREM function during spermatogenesis: from antagonist to activator. *Nature* **355**, 80-84.
- Fuchs, U., Manns, I. and Steinberg, G.** (2005). Microtubules are dispensable for the initial pathogenic development but required for long-distance hyphal growth in the corn smut fungus *Ustilago maydis*. *Mol Biol Cell* **16**, 2746-2758.
- Garcia-Muse, T., Steinberg, G. and Perez-Martin, J.** (2003). Pheromone-induced G2 arrest in the phytopathogenic fungus *Ustilago maydis*. *Eukaryot Cell* **2**, 494-500.
- Gehring, W. J., Affolter, M. and Bürglin, T.** (1994a). Homeodomain proteins. *Annu Rev Biochem* **63**, 487-526.
- Gehring, W. J., Qian, Y. Q., Billeter, M., Furukubo-Tokunaga, K., Schier, A. F., Resendez-Perez, D., Affolter, M., Otting, G. and Wuthrich, K.** (1994b). Homeodomain-DNA recognition. *Cell* **78**, 211-223.
- Gillissen, B., Bergemann, J., Sandmann, C., Schröer, B., Bölker, M. and Kahmann, R.** (1992). A two-component regulatory system for self/non-self recognition in *Ustilago maydis*. *Cell* **68**, 647-657.
- Gish, W. and States, D. J.** (1993). Identification of protein coding regions by database similarity search. *Nat Genet* **3**, 266-272.
- Goldbeter, A. and Pourquie, O.** (2008). Modeling the segmentation clock as a network of coupled oscillations in the Notch, Wnt and FGF signaling pathways. *J Theor Biol* **252**, 574-585.
- Golovkin, M. and Reddy, A. S.** (1996). Structure and expression of a plant U1 snRNP 70K gene: alternative splicing of U1 snRNP 70K pre-mRNAs produces two different transcripts. *Plant Cell* **8**, 1421-1435.

- Grandel, A., Romeis, T. and Kämper, J.** (2000). Regulation of pathogenic development in the corn smut fungus *Ustilago maydis*. *Mol Plant Path* **1**, 61-66.
- Green, R. E., Lewis, B. P., Hillman, R. T., Blanchette, M., Lareau, L. F., Garnett, A. T., Rio, D. C. and Brenner, S. E.** (2003). Widespread predicted nonsense-mediated mRNA decay of alternatively-spliced transcripts of human normal and disease genes. *Bioinformatics* **19 Suppl 1**, i118-121.
- Hanna, W. F.** (1929). Studies in the physiology and cytology of *Ustilago Zeae* and *Sporisorium Reilianum*. *Phytopathology* **19**, 415 - 442.
- Hartmann, H. A.** (1997) Die Pheromonantwort in *Ustilago maydis*: Kontrolle von Zellfusion und Pathogenität, phd-thesis, Ludwig-Maximilians-Universität, München.
- Hartmann, H. A., Kahmann, R. and Bölker, M.** (1996). The pheromone response factor coordinates filamentous growth and pathogenicity in *Ustilago maydis*. *EMBO J* **15**, 1632-1641.
- Heimel, K.** (2005) Funktionelle Charakterisierung des Clp1-Proteins aus *Ustilago maydis*, Philipps-Universität, Marburg.
- Heimel, K., Scherer, M., Vranes, M., Wahl, R., Pothiratana, C., Schuler, D., Vincon, V., Finkernagel, F., Flor-Parra, I. and Kämper, J.** (2010). The transcription factor Rbf1 is the master regulator for *b*-mating type controlled pathogenic development in *Ustilago maydis*. *in revision*.
- Heringa, J.** (1999). Two strategies for sequence comparison: profile-preprocessed and secondary structure-induced multiple alignment. *Comput Chem* **23**, 341-364.
- Herskowitz, I.** (1989). A regulatory hierarchy for cell specialization in yeast. *Nature* **342**, 749-757.
- Hiller, M. and Platzer, M.** (2008). Widespread and subtle: alternative splicing at short-distance tandem sites. *Trends Genet* **24**, 246-255.
- Ho, E. C., Cahill, M. J. and Saville, B. J.** (2007). Gene discovery and transcript analyses in the corn smut pathogen *Ustilago maydis*: expressed sequence tag and genome sequence comparison. *BMC Genomics* **8**, 334.
- Hoff, B. and Kück, U.** (2005). Use of bimolecular fluorescence complementation to demonstrate transcription factor interaction in nuclei of living cells from the filamentous fungus *Acremonium chrysogenum*. *Curr Genet* **47**, 132-138.
- Hoffman, C. S. and Winston, F.** (1987). A ten-minute DNA preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformation of *E. coli*. *Gene* **57**, 267-272.
- Holliday, R.** (1974). *Ustilago maydis*. In Handbook of Genetics, R. C. King, ed. (New York, USA, Plenum Press), pp. 575-595.
- Holloman, W. K., Schirawski, J. and Holliday, R.** (2008). The homologous recombination system of *Ustilago maydis*. *Fungal Genet Biol* **45 Suppl 1**, S31-39.
- Holtz, W. J. and Keasling, J. D.** Engineering static and dynamic control of synthetic pathways. *Cell* **140**, 19-23.

- Hsueh, Y. P. and Heitman, J.** (2008). Orchestration of sexual reproduction and virulence by the fungal mating-type locus. *Curr Opin Microbiol* **11**, 517-524.
- Hu, C. D., Chinenov, Y. and Kerppola, T. K.** (2002). Visualization of interactions among bZIP and Rel family proteins in living cells using bimolecular fluorescence complementation. *Mol Cell* **9**, 789-798.
- Hu, C. D., Grinberg, A. V. and Kerppola, T. K.** (2006). Visualization of protein interactions in living cells using bimolecular fluorescence complementation (BiFC) analysis. *Curr Protoc Cell Biol* **Chapter 21**, Unit 21 23.
- Hu, C. D. and Kerppola, T. K.** (2003). Simultaneous visualization of multiple protein interactions in living cells using multicolor fluorescence complementation analysis. *Nat Biotechnol* **21**, 539-545.
- Hückelhoven, R.** (2007). Cell wall-associated mechanisms of disease resistance and susceptibility. *Annu Rev Phytopathol* **45**, 101-127.
- Husberg, C., Murphy, P., Martin, E. and Kolsto, A. B.** (2001). Two domains of the human bZIP transcription factor TCF11 are necessary for transactivation. *J Biol Chem* **276**, 17641-17652.
- Inada, K., Morimoto, Y., Arima, T., Murata, Y. and 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. and White, T. J., eds.** (1990). *PCR Protocols: a guide to methods and applications*. (San Diego, USA, Academic Press).
- Ito, H., Fukuda, Y., Murata, K. and Kimura, A.** (1983). Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. *J Bacteriol* **153**, 163-168.
- James, P., Halladay, J. and Craig, E. A.** (1996). Genomic libraries and a host strain designed for highly efficient two-hybrid selection in yeast. *Genetics* **144**, 1425-1436.
- Kaffarnik, F., Müller, P., Leibundgut, M., Kahmann, R. and Feldbrügge, M.** (2003). PKA and MAPK phosphorylation of Prf1 allows promoter discrimination in *Ustilago maydis*. *Embo J* **22**, 5817-5826.
- Kageyama, R., Masamizu, Y. and Niwa, Y.** (2007a). Oscillator mechanism of Notch pathway in the segmentation clock. *Dev Dyn* **236**, 1403-1409.
- Kageyama, R., Yoshiura, S., Masamizu, Y. and Niwa, Y.** (2007b). Ultradian oscillators in somite segmentation and other biological events. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **72**, 451-457.
- Kahmann, R. and Kämper, J.** (2004). *Ustilago maydis*: how its biology relates to pathogenic development. *New Phytologist* **164**, 31-42.
- Kahmann, R., Romeis, T., Hartmann, H. A., Bohnert, H. U., Bolker, M. and Kamper, J.** (1996). Control of mating, filamentous growth and pathogenicity in *Ustilago maydis*. *Biology Of Plant Microbe Interactions*, 239-241.

- 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 Genet Genomics* **271**, 103-110.
- Kämper, J., Kahmann, R., Bölker, M., Ma, L. J., Brefort, T., Saville, B. J., Banuett, F., Kronstad, J. W., Gold, S. E., Müller, O., Perlin, M. H., Wösten, H. A., de Vries, R., Ruiz-Herrera, J., Reynaga-Pena, C. G., Snetselaar, K., McCann, M., Perez-Martin, J., Feldbrugge, 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., Sandrock, B., Meng, S., Ho, E. C., Cahill, M. J., Boyce, K. J., Klose, J., Klosterman, S. J., Deelstra, H. J., Ortiz-Castellanos, L., Li, W., Sanchez-Alonso, P., Schreier, P. H., Häuser-Hahn, I., Vaupel, M., Koopmann, E., Friedrich, G., Voss, H., Schlüter, T., Margolis, J., Platt, D., Swimmer, C., Gnirke, A., Chen, F., Vysotskaia, V., Mannhaupt, G., Güldener, U., Münsterkotter, 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. and Birren, B. W.** (2006). Insights from the genome of the biotrophic fungal plant pathogen *Ustilago maydis*. *Nature* **444**, 97-101.
- Kämper, J., Reichmann, M., Romeis, T., Bölker, M. and Kahmann, R.** (1995). Multiallelic recognition: nonself-dependent dimerization of the bE and bW homeodomain proteins in *Ustilago maydis*. *Cell* **81**, 73-83.
- Kellner, N.** (2009) Funktionelle Charakterisierung des Num1-Proteins aus *Ustilago maydis*, Philipps-Universität, Marburg.
- Kerppola, T. K.** (2006a). Complementary methods for studies of protein interactions in living cells. *Nat Methods* **3**, 969-971.
- Kerppola, T. K.** (2006b). Design and implementation of bimolecular fluorescence complementation (BiFC) assays for the visualization of protein interactions in living cells. *Nat Protoc* **1**, 1278-1286.
- Kerppola, T. K.** (2006c). Visualization of molecular interactions by fluorescence complementation. *Nat Rev Mol Cell Biol* **7**, 449-456.
- Kerppola, T. K.** (2008a). Bimolecular fluorescence complementation (BiFC) analysis as a probe of protein interactions in living cells. *Annu Rev Biophys* **37**, 465-487.
- Kerppola, T. K.** (2008b). Bimolecular fluorescence complementation: visualization of molecular interactions in living cells. *Methods Cell Biol* **85**, 431-470.
- Kohler, U., Liaud, M. F., Mendel, R. R., Cerff, R. and Hehl, R.** (1995). The maize GapC4 promoter confers anaerobic reporter gene expression and shows homology to the maize anthocyanin regulatory locus C1. *Plant Mol Biol* **29**, 1293-1298.
- Kothe, E.** (1996). Tetrapolar fungal mating types: sexes by the thousands. *FEMS Microbiol Rev* **18**, 65-87.

- Kozubowski, L. and Heitman, J.** (2009). Septins enforce morphogenetic events during sexual reproduction and contribute to virulence of *Cryptococcus neoformans*. *Mol Microbiol*.
- Kronstad, J. W. and Leong, S. A.** (1990). The *b* mating-type locus of *Ustilago maydis* contains variable and constant regions. *Genes Dev* **4**, 1384-1395.
- Kües, U.** (2000). Life history and developmental processes in the basidiomycete *Coprinus cinereus*. *Microbiol Mol Biol Rev* **64**, 316-353.
- Kuo, P. C., Tsao, Y. P., Chang, H. W., Chen, P. H., Huang, C. W., Lin, S. T., Weng, Y. T., Tsai, T. C., Shieh, S. Y. and Chen, S. L.** (2009). Breast cancer amplified sequence 2, a novel negative regulator of the p53 tumor suppressor. *Cancer Res* **69**, 8877-8885.
- Labourier, E., Blanchette, M., Feiger, J. W., Adams, M. D. and Rio, D. C.** (2002). The KH-type RNA-binding protein PSI is required for *Drosophila* viability, male fertility, and cellular mRNA processing. *Genes Dev* **16**, 72-84.
- Laemmli, U. K.** (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Lehmler, C., Steinberg, G., Snetselaar, K., Schliwa, M., Kahmann, R. and Bolker, M.** (1997). Identification of a motor protein required for filamentous growth in *Ustilago maydis*. *Embo Journal Jun* **16**, 3464-3473.
- Lenz, J. H., Schuchardt, I., Straube, A. and Steinberg, G.** (2006). A dynein loading zone for retrograde endosome motility at microtubule plus-ends. *EMBO J* **25**, 2275-2286.
- Leong, D. T., Gupta, A., Bai, H. F., Wan, G., Yoong, L. F., Too, H. P., Chew, F. T. and Hutmacher, D. W.** (2007). Absolute quantification of gene expression in biomaterials research using real-time PCR. *Biomaterials* **28**, 203-210.
- Lewis, B. P., Green, R. E. and Brenner, S. E.** (2003). Evidence for the widespread coupling of alternative splicing and nonsense-mediated mRNA decay in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 189-192.
- Liang, Z. and Biggin, M. D.** (1998). Eve and ftz regulate a wide array of genes in blastoderm embryos: the selector homeoproteins directly or indirectly regulate most genes in *Drosophila*. *Development* **125**, 4471-4482.
- Lohr, D., Venkov, P. and Zlatanova, J.** (1995). Transcriptional regulation in the yeast GAL gene family: a complex genetic network. *Faseb J* **9**, 777-787.
- Loros, J. J., Dunlap, J. C., Larrondo, L. F., Shi, M., Belden, W. J., Gooch, V. D., Chen, C. H., Baker, C. L., Mehra, A., Colot, H. V., Schwerdtfeger, C., Lambregts, R., Collopy, P. D., Gamsby, J. J. and Hong, C. I.** (2007). Circadian output, input, and intracellular oscillators: insights into the circadian systems of single cells. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **72**, 201-214.
- Luca, F. C., Mody, M., Kurischko, C., Roof, D. M., Giddings, T. H. and Winey, M.** (2001). *Saccharomyces cerevisiae* Mob1p is required for cytokinesis and mitotic exit. *Mol Cell Biol* **21**, 6972-6983.

- Luca, F. C. and Winey, M.** (1998). MOB1, an essential yeast gene required for completion of mitosis and maintenance of ploidy. *Mol Biol Cell* **9**, 29-46.
- Maerz, S., Dettmann, A., Ziv, C., Liu, Y., Valerius, O., Yarden, O. and Seiler, S.** (2009). Two NDR kinase-MOB complexes function as distinct modules during septum formation and tip extension in *Neurospora crassa*. *Mol Microbiol* **74**, 707-723.
- Mahlert, M., Vogler, C., Stelter, K., Hause, G. and Basse, C. W.** (2009). The $\alpha 2$ mating-type-locus gene *Iga2* of *Ustilago maydis* interferes with mitochondrial dynamics and fusion, partially in dependence on a Dnm1-like fission component. *J Cell Sci* **122**, 2402-2412.
- Makino, R. and Kamada, T.** (2004). Isolation and characterization of mutations that affect nuclear migration for dikaryosis in *Coprinus cinereus*. *Curr Genet* **45**, 149-156.
- Marrocco, K., Zhou, Y., Bury, E., Dieterle, M., Funk, M., Genschik, P., Krenz, M., Stolpe, T. and Kretsch, T.** (2006). Functional analysis of EID1, an F-box protein involved in phytochrome A-dependent light signal transduction. *Plant J* **45**, 423-438.
- Martinez-Espinoza, A. D., Garcia-Pedrajas, M. D. and Gold, S. E.** (2002). The Ustilaginales as plant pests and model systems. *Fungal Genet Biol* **35**, 1-20.
- Mendoza-Mendoza, A., Eskova, A., Weise, C., Czajkowski, R. and Kahmann, R.** (2009). Hap2 regulates the pheromone response transcription factor *prf1* in *Ustilago maydis*. *Mol Microbiol*.
- Mielnichuk, N., Sgarlata, C. and Perez-Martin, J.** (2009). A role for the DNA-damage checkpoint kinase Chk1 in the virulence program of the fungus *Ustilago maydis*. *J Cell Sci* **122**, 4130-4140.
- Morrow, C. A. and Fraser, J. A.** (2009). Sexual reproduction and dimorphism in the pathogenic basidiomycetes. *FEMS Yeast Res* **9**, 161-177.
- Murata, Y., Fujii, M., Zolan, M. E. and Kamada, T.** (1998). Molecular analysis of *pcc1*, a gene that leads to A-regulated sexual morphogenesis in *Coprinus cinereus*. *Genetics* **149**, 1753-1761.
- Nakai, K. and Kanehisa, M.** (1992). A knowledge base for predicting protein localization sites in eukaryotic cells. *Genomics* **14**, 897-911.
- Nielsen, K. and Heitman, J.** (2007). Sex and virulence of human pathogenic fungi. *Adv Genet* **57**, 143-173.
- O'Connell, R. J. and Panstruga, R.** (2006). Tete a tete inside a plant cell: establishing compatibility between plants and biotrophic fungi and oomycetes. *New Phytol* **171**, 699-718.
- Pan, Q., Saltzman, A. L., Kim, Y. K., Misquitta, C., Shai, O., Maquat, L. E., Frey, B. J. and Blencowe, B. J.** (2006). Quantitative microarray profiling provides evidence against widespread coupling of alternative splicing with nonsense-mediated mRNA decay to control gene expression. *Genes Dev* **20**, 153-158.
- Pothiratana, C.** (2008) Functional characterization of the homeodomain transcription factor Hdp1 in *Ustilago maydis*, Philipps-University Marburg, Marburg.

- Qian, Y. Q., Resendez-Perez, D., Gehring, W. J. and Wüthrich, K.** (1994). The des(1-6)antennapedia homeodomain: comparison of the NMR solution structure and the DNA-binding affinity with the intact Antennapedia homeodomain. *Proc Natl Acad Sci USA* **91**, 4091-4095.
- Raudaskoski, M. and Kothe, E.** Basidiomycete mating type genes and pheromone signaling. *Eukaryot Cell*.
- Robida, A. M. and Kerppola, T. K.** (2009). Bimolecular fluorescence complementation analysis of inducible protein interactions: effects of factors affecting protein folding on fluorescent protein fragment association. *J Mol Biol* **394**, 391-409.
- Romeis, T., Brachmann, A., Kahmann, R. and Kämper, J.** (2000). Identification of a target gene for the bE/bW homeodomain protein complex in *Ustilago maydis*. *Mol Microbiol* **37**, 54-66.
- Romeis, T., Kämper, J. and Kahmann, R.** (1997). Single-chain fusions of two unrelated homeodomain proteins trigger pathogenicity in *Ustilago maydis*. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**, 1230-1234.
- Sambrook, J., Frisch, E. F. and Maniatis, T.** (1989). Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbour, New York, Cold Spring Harbour Laboratory Press).
- Scherer, M., Heimel, K., Starke, V. and Kämper, J.** (2006). The Clp1 protein is required for clamp formation and pathogenic development of *Ustilago maydis*. *Plant Cell* **18**, 2388-2401.
- Schier, A. F. and Gehring, W. J.** (1993). Analysis of a *fushi tarazu* autoregulatory element: multiple sequence elements contribute to enhancer activity. *EMBO J* **12**, 1111-1119.
- Schlesinger, R., Kahmann, R. and 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.
- Schuler, D.** (2010) in vivo-Charakterisierung von Transkriptionsfaktoren in *Ustilago maydis*, Karlsruhe Institute of Technology, Karlsruhe.
- Schultz, J., Milpetz, F., Bork, P. and Ponting, C. P.** (1998). SMART, a simple modular architecture research tool: identification of signaling domains. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 5857-5864.
- Schulz, B., Banuett, F., Dahl, M., Schlesinger, R., Schäfer, W., Martin, T., Herskowitz, I. and 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.
- Schulze-Lefert, P. and Panstruga, R.** (2003). Establishment of biotrophy by parasitic fungi and reprogramming of host cells for disease resistance. *Annu Rev Phytopathol* **41**, 641-667.
- Serebriiskii, I., Estojak, J., Berman, M. and Golemis, E. A.** (2000). Approaches to detecting false positives in yeast two-hybrid systems. *Biotechniques* **28**, 328-330, 332-326.

- Seyfert, R.** (1927). Über Schnallenbildung im Paarkernmycel der Brandpilze. *Zeitschrift für Botanik* **19**, 577 - 601.
- Siebel, C. W., Admon, A. and Rio, D. C.** (1995). Soma-specific expression and cloning of PSI, a negative regulator of P element pre-mRNA splicing. *Genes Dev* **9**, 269-283.
- Sleumer, O.** (1931). Über Sexualität und Zytologie von *Ustilago Zeae* (Beckm.) Unger. *Zeitschrift für Botanik* **25**, 209 - 262.
- Snetselaar, K. M., Bölker, M. and Kahmann, R.** (1996). *Ustilago maydis* mating hyphae orient their growth toward pheromone sources. *Fungal Genetics and Biology* **20**, 299-312.
- Snetselaar, K. M. and Mims, C. W.** (1992). Sporidial fusion and infection of maize seedlings by the smut fungus *Ustilago maydis*. *Mycologia* **84**, 193-203.
- Snetselaar, K. M. and Mims, C. W.** (1993). Infection of maize stigmas by *Ustilago maydis*: Light and electron microscopy. *Phytopathology* **83**, 843.
- Song, Y., Cheon, S. A., Lee, K. E., Lee, S. Y., Lee, B. K., Oh, D. B., Kang, H. A. and Kim, J. Y.** (2008). Role of the RAM network in cell polarity and hyphal morphogenesis in *Candida albicans*. *Mol Biol Cell* **19**, 5456-5477.
- Sonnhammer, E. L., Eddy, S. R. and Durbin, R.** (1997). Pfam: a comprehensive database of protein domain families based on seed alignments. *Proteins* **28**, 405-420.
- Soulard, A., Lechler, T., Spiridonov, V., Shevchenko, A., Li, R. and Winsor, B.** (2002). *Saccharomyces cerevisiae* Bzz1p is implicated with type I myosins in actin patch polarization and is able to recruit actin-polymerizing machinery in vitro. *Mol Cell Biol* **22**, 7889-7906.
- Southern, E. M.** (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* **98**, 503-517.
- Spellig, T., Bölker, M., Lottspeich, F., Frank, R. W. and Kahmann, R.** (1994). Pheromones trigger filamentous growth in *Ustilago maydis*. *EMBO J* **13**, 1620-1627.
- Stakman, E. C. and Christensen, I. I.** (1927). Heterotallism in *Ustilago Zeae*. *Phytopathology* **17**, 827 - 834.
- Stapleton, A. E. and Walbot, V.** (1994). Flavonoids can protect maize DNA from the induction of ultraviolet radiation damage. *Plant Physiol* **105**, 881-889.
- Steinberg, G. and Perez-Martin, J.** (2008). *Ustilago maydis*, a new fungal model system for cell biology. *Trends Cell Biol* **18**, 61-67.
- Taylor, L. P. and Briggs, W. R.** (1990). Genetic regulation and photocontrol of anthocyanin accumulation in maize seedlings. *Plant Cell* **2**, 115-127.
- Tönnis, M.** (2002) Untersuchungen zur molekularen Interaktion und Zellkommunikation am Beispiel der Inkompatibilitätsloki von *Ustilago maydis*, Technische Universität München.

- Towbin, H., Staehelin, T. and Gordon, J.** (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**, 4350-4354.
- Tsuchisaka, A. and Theologis, A.** (2004). Heterodimeric interactions among the 1-amino-cyclopropane-1-carboxylate synthase polypeptides encoded by the Arabidopsis gene family. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 2275-2280.
- Tsukuda, T., Carleton, S., Fotheringham, S. and Holloman, W. K.** (1988). Isolation and characterization of an autonomously replicating sequence from *Ustilago maydis*. *Mol Cell Biol* **8**, 3703-3709.
- Tzfira, T., Vaidya, M. and Citovsky, V.** (2004). Involvement of targeted proteolysis in plant genetic transformation by Agrobacterium. *Nature* **431**, 87-92.
- Urban, M., Kahmann, R. and Bölker, M.** (1996a). Identification of the pheromone response element in *Ustilago maydis*. *Mol Gen Genet* **251**, 31-37.
- Urban, M., Kahmann, R. and 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.
- Valentine, S. A., Chen, G., Shandala, T., Fernandez, J., Mische, S., Saint, R. and Courey, A. J.** (1998). Dorsal-mediated repression requires the formation of a multiprotein repression complex at the ventral silencer. *Mol Cell Biol* **18**, 6584-6594.
- Valverde, M. E., Paredes Lopez, O., Pataky, J. K. and Guevara Lara, F.** (1995). Huitlacoche (*Ustilago maydis*) as a food source--biology, composition, and production. *Crit-Rev-Food-Sci-Nutr* **35**, 191-229.
- Van Criekinge, W. and Beyaert, R.** (1999). Yeast Two-Hybrid: State of the Art. *Biol Proced Online* **2**, 1-38.
- Vazquez, M., Moore, L. and Kennison, J. A.** (1999). The trithorax group gene *osa* encodes an ARID-domain protein that genetically interacts with the brahma chromatin-remodeling factor to regulate transcription. *Development* **126**, 733-742.
- Vranes, M.** (2006) Transkriptom-Analyse der frühen Infektionsphase von *Ustilago maydis*: Identifikation neuer pathogenitätsrelevanter Gene, Philipps-Universität, Marburg.
- Wahl, R., Zahiri, A. and Kamper, J.** (2010). The *Ustilago maydis b* mating type locus controls hyphal proliferation and expression of secreted virulence factors in planta. *Mol Microbiol* **75**, 208-220.
- Weber, I., Gruber, C. and Steinberg, G.** (2003). A class-V myosin required for mating, hyphal growth, and pathogenicity in the dimorphic plant pathogen *Ustilago maydis*. *Plant Cell* **15**, 2826-2842.
- Weiss, E. L., Kurischko, C., Zhang, C., Shokat, K., Drubin, D. G. and Luca, F. C.** (2002). The *Saccharomyces cerevisiae* Mob2p-Cbk1p kinase complex promotes polarized growth and acts with the mitotic exit network to facilitate daughter cell-specific localization of Ace2p transcription factor. *J Cell Biol* **158**, 885-900.

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

Zordan, R. E., Miller, M. G., Galgoczy, D. J., Tuch, B. B. and Johnson, A. D. (2007). Interlocking transcriptional feedback loops control white-opaque switching in *Candida albicans*. *PLoS Biol* **5**, e256.

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

Lebenslauf

Name Kai Heimel
Geboren 29.10.1979 in Homberg/Efze
Familienstand ledig
Staatsangehörigkeit deutsch

Schulbildung

08/86 - 06/90 Mittelpunktschule Heiligenberg
08/90 - 06/96 Gesamtschule Felsberg
08/96 - 06/99 Geschwister-Scholl-Schule Melsungen
Abschluss: Abitur

Zivildienst

08/99 - 06/00 Rotes-Kreuz Schwalm-Eder Kreis (Schwalmstadt)

Studium

10/2000 - 09/2005 Studium der Biologie
an der Philipps-Universität in Marburg
Hauptfächer: Genetik, Mikrobiologie, Biochemie

12/2004 - 09/2005 Anfertigung der Diplomarbeit am Max-Planck Institut für
terrestrische Mikrobiologie in Marburg
Thema: "Funktionelle Charakterisierung des Clp1-
Proteins aus *Ustilago maydis*"

Gesamtnote: sehr gut (1,0)

Promotion

10/2005 – 03/2008 Anfertigung der Doktorarbeit am Max-Planck-Institut für
terrestrische Mikrobiologie in Marburg, Abt.
Organismische Interaktionen unter der Betreuung von
Prof. Dr. Jörg Kämper

Mitglied der *International Max-Planck Research School*
des Max-Planck Instituts, Marburg

04/2008 – 02/2010 Weiterführung der Doktorarbeit am Karlsruher Institut für
Technologie, Institut für angewandte Biowissenschaften,
Abteilung Genetik unter der Betreuung von Prof. Dr. Jörg
Kämper
Titel der Arbeit: "Regulationsmechanismen der
biotrophen Entwicklung von *Ustilago maydis*"

Danksagung

Ich möchte mich zunächst bei Herrn Prof. Dr. Bölker, Frau Prof. Dr. Renkawitz-Pohl und Herrn Prof. Dr. Maier für die freundliche Übernahme der Gutachten bedanken.

Mein besonderer Dank gilt Jörg Kämper für die Freiheiten, die Möglichkeit dieses spannende Thema zu bearbeiten und nicht zuletzt die vielen guten wissenschaftlichen und nicht-wissenschaftlichen Gespräche und Diskussionen.

Ich möchte mich bei Frau Prof. Dr. Regine Kahmann für die Möglichkeit meine Arbeit in der Abteilung der Organismischen Interaktionen durchführen zu können, bedanken. Darüber hinaus danke ich der International Max-Planck Research School und dem GRK767 für die finanzielle Unterstützung dieser Arbeit. Insbesondere seien da die Mitglieder des „Thesis Advisory Committee“, Herr Prof. Dr. Bölker, Frau Prof. Dr. Renkawitz-Pohl und Herr Prof. Dr. Feldbrügge genannt. Vielen Dank für die Mühen, Zeit, Vorschläge und Diskussionen.

Mein herzlichster Dank geht auch an meine Mitsreiter im b-Labor. Insbesondere an die „alten Hasen“ Miro und Ramon. Ihr wisst selbst am besten wofür ich euch alles danken muss. Diese Seite hier wäre nicht lang genug! Vielen Dank auch an Mario, ich habe viel von dir gelernt. Ich danke Nikola und Kai für die Geduld und Beharrlichkeit während unserer Zusammenarbeit und der Fürsorge für meine ungespülten Kulturkolben und für die vielen schönen Abende im Stövchen. David und Thorsten möchte für die gute Zeit in Karlsruhe, tiefe Einblicke in die Pfälzer/Badenser Gedanken- und Sprachwelt und für die praktische Hilfe im letzten Teil der Arbeit danken. Ein großer Dank gilt auch meinen Mitstreitern außerhalb des b-Labs, vielen Dank Evelyn, Janine, Magnus und Mauri für viele gute gemeinsame Stunden, aufmunternde Worte, Diskussionen, Kaffee kochen, Müll wegräumen, lachen und ärgern. Vielen Dank auch an die guten Seelen im b-Labor Volker und Caro. Ihr seid immer da gewesen wenn ich Hilfe brauchte.

Mein größter Dank geht an meine Eltern und meine Familie für die Unterstützung, die aufbauenden Worte, die allzeitige und tatkräftige Hilfsbereitschaft vor, während und nach dem Umzug nach Karlsruhe, und dafür, dass ich mich immer auf euch verlassen kann.

Abschließend möchte ich Dir liebe Sandy danken, für dein Verständnis, deine Geduld, dein allzeitiges Vertrauen und die lange und wundervolle Zeit die wir zusammen verbracht haben und noch verbringen werden.