

**Transkriptom-Analyse der frühen  
Infektionsphase von *Ustilago maydis*:  
Identifikation neuer pathogenitätsrelevanter Gene**

**Dissertation**

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



**dem Fachbereich Biologie  
der Philipps-Universität Marburg  
vorgelegt von**

**Miroslav Vraneš  
aus Krefeld**

**Marburg/Lahn 2006**

Vom Fachbereich Biologie  
der Philipps-Universität Marburg als Dissertation  
angenommen am: 20.06.2006

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

Tag der mündlichen Prüfung am: 26.06.2006

Die Untersuchungen zur vorliegenden Arbeit wurden von Dezember 2002 bis Februar 2006 in Marburg am Max-Planck-Institut für terrestrische Mikrobiologie in der Abteilung für Organismische Interaktionen unter der Leitung von Frau Prof. Dr. Regine Kahmann und der Betreuung von Herrn Prof. Dr. Jörg Kämpfer durchgeführt.

## Erklärung

Ich versichere, dass ich meine Dissertation mit dem Titel „Transkriptom-Analyse der frühen Infektionsphase von *Ustilago maydis*: Identifikation neuer pathogenitätsrelevanter Gene“ selbstständig, 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)

---

(Miroslav Vraneš)

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht in:

**VRANEŠ, M., FLOR-PARRA, I., KÄMPER, J., und PÉREZ-MARTÍN, 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.

*Gewidmet meinen Eltern*

*Što ne boli to nije život, što ne prolazi to nije sreća.*

(Ivo Andrić, posthum 1976)

## Zusammenfassung

Im phytopathogenen Pilz *Ustilago maydis* ist die Fusion kompatibler haploider Sporidien für die Initiation der pathogenen Entwicklung notwendig. Kontrolliert wird dieser Prozess durch zwei verschiedene Kreuzungstyploci, *a* und *b*. Der biallelische *a*-Locus kodiert dabei für ein Pheromonrezeptorsystem, welches für die Zell-Zellerkennung und die Fusion notwendig ist. Nach der Fusion ist der multiallelische *b*-Paarungstyplocus, der für zwei Homeodomänen-Transkriptionsfaktoren kodiert, für die Aufrechterhaltung des filamentösen Dikaryons und die nachfolgende pathogene Entwicklung essentiell. Nach der Bildung eines stabilen Dikaryons ist *U. maydis* zur Vollendung seiner sexuellen Entwicklung jedoch auf die Wirtspflanze angewiesen. Im Rahmen dieser Arbeit wurden durch DNA-Microarray-Analysen frühe *b*-vermittelte Prozesse auf der Pflanzenoberfläche untersucht. Hierfür wurde das Expressionsprofil von Zellen eines nicht-pathogenen Stammes mit dem eines pathogenen Stammes, der ein aktives *b*-Heterodimer exprimiert, verglichen. Es wurden insgesamt 327 Gene identifiziert, die u. a. für Proteine mit putativen Funktionen im Pflanzenzellwandabbau oder bei der Transkriptionsregulation kodieren.

Eines der auf der Pflanzenoberfläche *b*-induzierten Gene, *biz1*, kodiert für einen putativen C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>-Zinkfinger-Transkriptionsfaktor. Die Deletion von *biz1* führte zu einer drastischen Reduktion der Anzahl an gebildeten Appressorien; Hyphen konnten zwar noch die Pflanzenoberfläche penetrieren, jedoch war invasives Wachstum und *in planta* Proliferation in *Δbiz1*-Stämmen nicht zu beobachten. *Biz1* spielt demnach nicht nur eine wichtige Rolle in der Bildung von Appressorien, sondern vor allem in der Kolonisierung der Pflanze. Weitere DNA-Microarray-Analysen zeigten, dass *Biz1* für die Regulation von 19 Genen *on planta* hinreichend und notwendig ist. Systematische Deletionsanalysen führten zur Identifizierung von *pst1* und *pst2*, die für zwei putative sekretierte *U. maydis*-spezifische Proteine kodieren. Die gemeinsame Deletion beider Gene führte zu einem ähnlichen Phänotyp wie die Deletion von *biz1*. Der *pst*-Doppeldeletionsstamm war zwar noch in der Lage Appressorien zu bilden, arretierte sein Wachstum aber kurz nach der Penetration und zeigte ebenfalls keine Proliferation in der Pflanze. *Pst1* und *Pst2* scheinen damit ähnlich wie *Biz1* ihre Hauptfunktion in Postpenetrationsprozessen auszuüben.

## Abkürzungen und Fachbegriffe

Amp	Ampicillin	N-terminal	aminoterminal
Ara	Arabinose	NLS	"nuclear localization sequence"
AS	Aminosäure(n)	NM	Nitrat-Minimalmedium
bp	Basenpaar(e)	OD <sub>600</sub>	Optische Dichte bei 600 nm
CF	Calcofluor White	ORF	"open reading frame"
C-terminal	carboxyterminal	PC	Phenol/Chloroform
Cbx	Carboxin	PCR	"polymerase chain reaction"
CM	"complete medium"	PD	"potato dextrose"
cpm	"counts per minute"	PEG	Polyethylenglycol
Δ	Deletion	Phleo	Phleomycin
DAPI	4',6'-Diamidino-2-Phenylindol	d p i	Tage nach der Infektion (days post infection)
DIC	"differential interference contrast"	PIPES	Piperazine N-N'-bis (2-Ethansulphonat)
DMSO	Dimethylsulfoxid	PKA	"protein kinase A"
DNA	Desoxyribonukleinsäure	PRE	"pheromone response element"
DTT	Dithiothreitol	RNA	Ribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure	RT	"reverse transcription" oder Raumtemperatur
EGFP	"enhanced green fluorescent protein"		
EtOH	Ethanol	SDS	Natriumdodecylsulfat
GFP	"green fluorescent protein"	sGFP	"synthetic green fluorescent protein"
Glc	Glukose		
H <sub>2</sub> O <sub>bid</sub>	zweifach destilliertes Wasser	TE	Tris-Cl + Na <sub>2</sub> -EDTA
HMG	"high mobility group"	Tris	Trishydroxymethylamino-methan
Hyg	Hygromyzin		
kb	Kilobasenpaar	U	Unit (Enzymaktivitätseinheit)
MAPK	"mitogen-activated protein kinase"	UAS	"upstream activating sequence"
MAPKK	MAPK-Kinase	ÜN	über Nacht
MAPKKK	MAPKK-Kinase	Upm	Umdrehungen pro Minute
MOPS	3-(N-Morpholino)propan-sulphonat	UV	ultraviolettes Licht
mRNA	"messenger-RNA" (=Boten-RNA)	WGA	"wheat germ agglutinin"

## Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	<i>Ustilago maydis</i> .....	1
1.2	Der Lebenszyklus von <i>Ustilago maydis</i> .....	2
1.3	Die genetische Kontrolle der pathogenen Entwicklung in <i>U. maydis</i> .....	5
1.3.1	Der <i>a</i> -Locus und die Signaltransduktionskaskaden.....	5
1.3.2	Der <i>b</i> -Locus kodiert für den zentralen Regulator der pathogenen Entwicklung.....	7
1.3.3	Die <i>b</i> -Regulationskaskade .....	9
1.4	Fragestellung dieser Arbeit.....	11
2	Ergebnisse.....	12
2.1	Differentielle Genregulation im solopathogenen Stamm SG200 .....	12
2.2	Differentiell regulierte Transkriptionsfaktoren.....	20
2.3	Biz1 (um02549) ist ein C <sub>2</sub> H <sub>2</sub> -Zinkfingerprotein.....	21
2.4	Biz1 ist essentiell für die pathogene Entwicklung in <i>U. maydis</i> .....	22
2.5	Rolle von Biz1 in der Appressorienbildung und <i>in planta</i> Proliferation.....	24
2.6	<i>biz1</i> ist ein spät <i>b</i> -reguliertes Gen.....	27
2.7	Biz1 induziert einen Teil der <i>on planta</i> differentiell regulierten Gene.....	29
2.8	Systematische Analyse Biz1-regulierter Gene.....	33
2.9	<i>pst1</i> ist nur auf der Pflanze differentiell reguliert .....	35
2.10	<i>Pst1</i> ist essentiell für die pathogene Entwicklung von <i>U. maydis</i> .....	36
2.11	Transkriptom-Analyse von <i>U. maydis</i> während der pathogenen Entwicklung in der Pflanze .....	40
3	Diskussion.....	44
3.1	Auswahl der Stämme für die Transkriptom-Analyse auf der Pflanzenoberfläche.....	44
3.2	<i>b</i> -regulierte Gene auf der Pflanzenoberfläche .....	45
3.3	Regulation von <i>biz1</i> .....	49
3.4	<i>biz1</i> kodiert für einen potentiellen Transkriptionsfaktor .....	50
3.5	Biz1 und die Zellzykluskontrolle.....	52
3.6	Rolle von Biz1 während der pathogenen Entwicklung.....	58
4	Material und Methoden.....	60
4.1	Material und Bezugsquellen .....	60



4.1.1	Medien, Lösungen, Enzyme und Kits.....	60
4.1.2	Oligonukleotide.....	61
4.1.3	Stämme .....	64
4.1.4	Plasmide und Plasmidkonstruktionen .....	65
4.1.5	In dieser Arbeit hergestellte Plasmide .....	66
4.2	Mikrobiologische, zellbiologische und genetische Methoden.....	67
4.2.1	<i>Escherichia coli</i> .....	67
4.2.2	<i>Ustilago maydis</i> .....	67
4.3	Molekularbiologische Standard-Methoden.....	71
4.3.1	Isolierung von Nukleinsäuren .....	71
4.3.2	Auftrennung und Nachweis von Nukleinsäuren .....	73
4.3.3	Sequenz- und Strukturanalyse.....	73
4.3.4	PCR-Techniken.....	74
4.4	Transkriptom-Analyse .....	76
5	Literaturverzeichnis .....	80
Anhang.....		89
5.1	Daten CD .....	89
5.1.1	Microarray-Daten.....	89

# 1 Einleitung

## 1.1 *Ustilago maydis*

Der phytopathogene Pilz *Ustilago maydis* ist der Erreger des Maisbeulenbrandes, einer weltweit verbreiteten Pflanzenkrankheit. *U. maydis* gehört zur Klasse der Heterobasidiomyceten, Ordnung *Ustilaginales* und darin in die Familie der *Ustilaginaceae*. Die *Ustilaginales* umfassen ca. 1200 Spezies, unter anderem die Brandpilze, welche wichtige Pflanzenpathogene darstellen und ca. 4000 Pflanzenarten infizieren können. Brandpilze befallen wichtige Nutzpflanzen und verursachen dadurch lokal teilweise Einbussen von über 25 % des Ernteertrags (zusammengefasst in Martinez-Espinoza *et al.*, 2002; Weise, 1987).

*U. maydis* besitzt ein enges Wirtsspektrum, welches neben dem Mais (*Zea mays*) nur Teosinte (*Zea mays* ssp. *mexicana* und *Zea mays* ssp. *pavighuminis*) umfasst, die wahrscheinlich die Urform des Mais darstellt (Doebley, 1992). Eine Infektion durch *U. maydis* äußert sich zunächst durch Chlorosen- und Anthocyanbildung und letztlich in der Bildung von Tumoren, die an allen oberirdischen Teilen der Maispflanze entstehen können. Die reifen Tumore enthalten schwarze „rußig-aussehende“ Teliosporen, welche die Dauerform von *U. maydis* repräsentieren und der Krankheit „Maisbeulenbrand“ ihren Namen verleihen.

*U. maydis* hat sich in den letzten Jahren zu einem der Modellorganismen für phytopathogene Pilze entwickelt. Im Gegensatz zu vielen anderen pflanzenpathogenen Pilzen lässt sich *U. maydis* in seiner saprophytischen Form leicht in Flüssigkultur oder auf Festmedium kultivieren. Des Weiteren kann der sexuelle Lebenszyklus in ca. 3 Wochen durchlaufen werden, was ein relativ schnelles genetisches Arbeiten ermöglicht (Christensen, 1963; Holliday, 1961; Holliday, 1974). *U. maydis* ist ähnlich wie *Saccharomyces cerevisiae* für eine Reihe von molekularen Techniken zugänglich. Die Verfügbarkeit einer Vielzahl an dominanten Selektionsmarkern ermöglicht eine effiziente Geninaktivierung durch homologe Rekombination bzw. die ektopische Expression von Genen (Brachmann *et al.*, 2004; Gold *et al.*, 1994b; Kämper, 2004; Keon *et al.*, 1991; Kojić und Holloman, 2000; Kronstad *et al.*, 1989; Wang *et al.*, 1988). Des Weiteren ermöglichen Promotoren, die

über die Stickstoff- bzw. Kohlenstoffquelle regulierbar sind, das gezielte Ein- oder Ausschalten von Genen (Bottin *et al.*, 1996; Brachmann *et al.*, 2001), wodurch sich unter anderem die Effekte der Inaktivierung essentieller Gene studieren lassen (Straube *et al.*, 2001). Durch die Fusion von Proteinen an verschiedene GFP-Varianten (green fluorescent protein) ist die Kollokalisierung von Proteinen und Strukturen, wie beispielsweise von Mikrotubuli und Organellen in lebenden Zellen möglich (Spellig *et al.*, 1996; Steinberg *et al.*, 2001; Straube *et al.*, 2003; Wedlich-Söldner *et al.*, 2000; Wedlich-Söldner *et al.*, 2002a; Wedlich-Söldner *et al.*, 2002b).

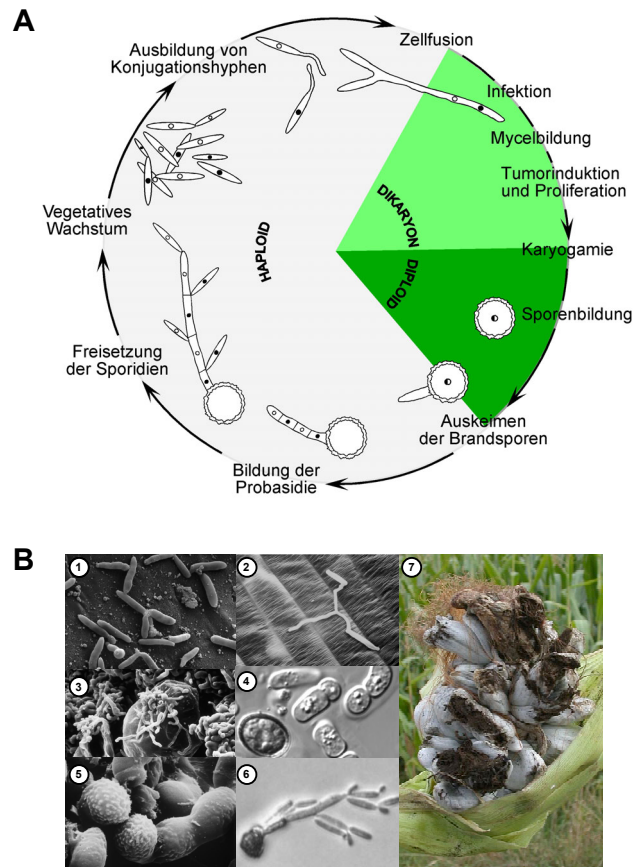
Neben den zahlreichen molekularbiologischen Methoden sind zudem seit 2003 die Genomsequenz von *U. maydis* und Affymetrix-DNA-Arrays, die eine parallele Analyse der Expression von ca. 6200 *U. maydis* Genen ermöglichen, verfügbar (zusammengefasst in Kahmann und Kämper, 2004; Kämper *et al.*, 2006).

Die annotierte *Ustilago maydis* Genomsequenz (MUMDB; <http://mips.gsf.de/genre/proj/ustilago>) und die Affymetrix-DNA-Arrays stellen weitere Meilensteine für *Ustilago maydis* als Modellorganismus dar und sollten einen umfassenderen und tieferen Einblick in die regulatorischen Netzwerke der Pathogenität ermöglichen.

## 1.2 Der Lebenszyklus von *Ustilago maydis*

Der Lebenszyklus von *U. maydis* lässt sich in drei verschiedene Kernphasen einteilen (Abb. 1). Die haploiden Zellen, sogenannte Sporidien, vermehren sich hefeartig durch Knospung an einer der Polseiten und wachsen ausschließlich saprophytisch, d.h. sie sind nicht in der Lage, die Wirtspflanze zu infizieren. Für die Initiation der pathogenen Entwicklung fusionieren zwei kompatible Sporidien miteinander. Durch die Fusion entsteht ein filamentöses Dikaryon, welches die pathogene Form von *U. maydis* darstellt (Christensen, 1963; Snetselaar und Mims, 1992; Snetselaar und Mims, 1993). Das infektiöse Dikaryon enthält dabei sowohl das Zytoplasma und die Organellen als auch die Zellkerne beider haploider Sporidien (Steinberg *et al.*, 1998). In dieser Phase ist nur die Spitzenzelle der Hyphe mit Zytoplasma gefüllt, die dahinter liegenden, leeren Abschnitte entstehen durch das regelmäßige Einziehen von Septen am distalen Ende der Spitzenzelle (Banuett und Herskowitz, 1994b). Im dikaryotischen Filament sind beide Zellkerne im Zellzyklus

arretiert, der erst nach der Penetration der Pflanze durch den Pilz wieder aktiviert wird (Snetselaar, 1993; Snetselaar und Mims, 1992). Unter Laborbedingungen kann die Ausbildung des Dikaryons auf aktivkohlehaltigem Festmedium nachvollzogen und als weißes „pelzartiges“ Luftmyzel sichtbar gemacht werden, jedoch ist *U. maydis* für



**Abbildung 1: Der Lebenszyklus von *U. maydis*.** A. Schematisch dargestellt ist der Lebenszyklus von *U. maydis*, nähere Einzelheiten siehe Text. Die Zahlen beziehen sich auf die entsprechenden Stadien in B. B. Gezeigt sind unterschiedliche Entwicklungsstadien von *U. maydis*. (1) Haploide Sporidien, die sich durch vegetative Sprossung vermehren (G. Wanner). (2) Fusion zweier haploider Zellen und Dikaryenbildung auf der Blattoberfläche (Snetselaar und Mims, 1993). (3) Proliferation des Pilzmyzels im Tumor (K. Snetselaar). (4) Präsporulationsstadien bestehend aus sich abrundenden Zellen fragmentierter Hyphensegmente (S. Huber). (5) Bildung der Brandsporen in den sporogenen Hyphen (Snetselaar und Mims, 1994). (6) Keimung der diploiden Brandspore und Abschnürung der haploiden Sporidien (S. Huber). (7) Tumorbildung auf einem Maiskolben (J. Kämper). Abbildung modifiziert nach (Brachmann, 2001)

alle weiteren Schritte der sexuellen Entwicklung strikt von der Wirtspflanze abhängig. Die Infektion der Maispflanze durch *U. maydis* erfolgt durch die Bildung von Appressorien, wobei eine Matrix zwischen Appressorium und der Pflanzenzellwand abgelagert wird. Diese Matrix könnte auf eine Produktion von Adhesinen hindeuten.

Adhesine sind Oberflächenproteine, die die Adhäsion zwischen Zellen untereinander bzw. mit der Oberfläche des Wirtes vermitteln. Da es unwahrscheinlich ist, dass die Penetration mechanisch über den Aufbau eines Turgordruckes geschieht, wird diskutiert, dass Pflanzenzellwand-abbauende Enzyme das Eindringen der Hyphne in die Pflanze unterstützen (zusammengefasst in Kahmann und Kämper, 2004; Snetselaar, 1993). Nach erfolgter Penetration wächst das filamentöse Dikaryon in der Pflanze zunächst intrazellulär, wobei die Plasmamembran der Wirtszellen intakt bleibt (Banuett und Herskowitz, 1996; Snetselaar und Mims, 1992), wohingegen in späteren Stadien das Wachstum des Pilzmyzels vorwiegend im Apoplasten beobachtet werden kann. Die Pflanzen reagieren mit Chlorosen- und Anthocyanbildung auf den Pilz, jedoch lassen sich keine weiteren Abwehrreaktionen erkennen. Die massive Proliferation der pilzlichen Hyphen findet nach ca. 5 Tagen statt und geht mit der Bildung von Tumoren einher. Nach etwa 10 Tagen runden sich die Filamente ab und bilden die sogenannten sporogenen Hyphen (Banuett und Herskowitz, 1996). Aus den fragmentierten sporogenen Hyphen differenzieren sich, nach vorangehender Karyogamie, anschließend die diploiden Teliosporen (Christensen, 1963). Diese können nach Aufplatzen der Tumore beispielsweise durch Wind, Regen und Insekten verbreitet werden (Christensen, 1963). Unter geeigneten Bedingungen keimen die Teliosporen aus, wobei in das auskeimende Promyzel nach erfolgter Meiose vier haploide Kerne einwandern. Anschließend werden die Sporidien sukzessiv abgeschnürt (Christensen, 1963).

### 1.3 Die genetische Kontrolle der pathogenen Entwicklung in *U. maydis*

Die Initiation der pathogenen Entwicklung ist in *U. maydis* durch die morphologische Transition von hefeartigem, saprophytischem zu filamentösem, biotrophem Wachstum gekennzeichnet. Die Fähigkeit, filamentös zu wachsen, ist eine Voraussetzung für die Pathogenität von *U. maydis*, jedoch ist sie alleine nicht ausreichend. So wurde bereits von Sleumer filamentöses Wachstum haploider Sporidien auf der Blattoberfläche beschrieben, die Penetration der Hyphen wurde jedoch niemals beobachtet (Sleumer, 1931). Mutationen in den Genen des G-Proteins Gpa3 oder der Adenylatzyklase Uac1, die jeweils ein Absenken des intrazellulären cAMP-Spiegels zur Folge haben, führen zu filamentösem Wachstum, jedoch nicht zur Pathogenität von haploiden Sporidien (zusammengefasst in Kahmann und Kämper, 2004). Auch bestimmte Umweltbedingungen, wie Stickstoffmangel oder niedriger pH-Wert, können filamentöses Wachstum in haploiden Sporidien induzieren (Kernkamp, 1939; Ruiz-Herrera *et al.*, 1995); diese Filamente sind nicht pathogen. Zusätzlich zum morphologischen Wechsel muss es also weitere Determinanten geben, die das Pathogenitätsprogramm regulieren.

Für die Initiation der pathogenen Entwicklung ist die Fusion kompatibler haploider Sporidien notwendig. Diese wird genetisch durch zwei verschiedene Kreuzungstyploci, *a* und *b*, kontrolliert. Der biallelische *a*-Locus kodiert dabei für ein Pheromonrezeptorsystem, welches für die Zell-Zellerkennung und die Fusion notwendig ist. Nach der Fusion ist der multiallelische *b*-Paarungstyplocus für die Aufrechterhaltung des filamentösen Dikaryons und die nachfolgende sexuelle Entwicklung essentiell (Banuett und Herskowitz, 1994b).

#### 1.3.1 Der *a*-Locus und die Signaltransduktionskaskaden

Die beiden Allele des *a*-Locus, *a1* und *a2*, kodieren für die Pheromonvorläufer Mfa1 bzw. Mfa2, sowie für die dazu komplementären Pheromonrezeptoren Pra1 bzw. Pra2. Die Pheromonvorläufer werden posttranslational am C-Terminus methyliert/farnesyliert. Mfa1 wird als 13 Aminosäuren langes Peptid und Mfa2 als 9 Aminosäuren langes Peptid sekretiert. Beide Proteine interagieren mit dem Pheromonrezeptor kodiert durch das jeweils andere Allel (Bölker *et al.*, 1992; Spellig

*et al.*, 1994). Die Bindung des Pheromons an den kompatiblen Rezeptor führt zu einem Zellzyklusarrest in der G2-Phase und zur Ausbildung von Konjugationshyphen, welche entlang des Pheromongradienten aufeinander zuwachsen und an den Spitzen miteinander fusionieren (Garcia-Muse *et al.*, 2003; Snetselaar *et al.*, 1996; Snetselaar und Mims, 1993). In der Pheromonantwort kommt dem Transkriptionsfaktor Prf1 eine zentrale Rolle zu. Prf1 gehört zur Klasse der HMG-Domänen-Transkriptionsfaktoren („high mobility group“) und bindet an ein neun Basenpaar langes Konsensusmotiv, das PRE-Element (pheromone response element), welches z.B. in mehreren Kopien in den Promotoren der *a*-Gene vorliegt (Urban *et al.*, 1996). Die Expression des *prf1*-Gens selbst wird über die im Promotor vorliegenden PRE-Elemente reguliert, die vermutlich der Autoregulation dienen. Über die UAS-Elemente (upstream activating sequences) wird zusätzlich noch eine von der Kohlenstoffquelle abhängige Regulation vermittelt (Hartmann *et al.*, 1996; Hartmann *et al.*, 1999; zusammengefasst in Kahmann und Kämper, 2004). Für die posttranskriptionelle Regulation von Prf1 sind zwei Signalkaskaden verantwortlich. Der MAPK-Weg („mitogen-activated protein kinase“) wird nach Bindung des Pheromons an den Rezeptor aktiviert, wobei das Signal auf bisher unbekannte Weise auf die MAPKKK Kpp4 (Müller *et al.*, 2003) übertragen wird. Anschließend wird das Signal über die MAPKK Fuz7 (Banuett und Herskowitz, 1994a) an die MAPK Kpp2 (Müller *et al.*, 1999) weitergeleitet, was wiederum zu einer Phosphorylierung von Prf1 durch Kpp2 und somit zu einer Aktivierung von Prf1 führt. Neben der MAPK-Signalkaskade ist der cAMP-Signalweg ebenfalls an der Pheromonsignalweiterleitung beteiligt. Der cAMP-Signalweg besteht aus dem G-Protein Gpa3 (Krüger *et al.*, 1998; Regenfelder *et al.*, 1997), der Adenylatzyklase Uac1 (Gold *et al.*, 1994a), sowie den katalytischen und regulatorischen Untereinheiten der Proteinkinase A (PKA), Adr1 und Ubc1 (Dürrenberger *et al.*, 1998; Gold *et al.*, 1997). Es konnte gezeigt werden, dass Prf1 nicht nur durch Kpp2, sondern auch durch Adr1 phosphoryliert wird. Während eine Phosphorylierung durch Adr1 eine wichtige Rolle für die Induktion sowohl der *a*- als auch der *b*-Gene spielt, wird eine Phosphorylierung durch Kpp2 nur für die Induktion der *b*-Gene benötigt (Kaffarnik *et al.*, 2003). Somit ist für die Induktion der *b*-Gene durch Prf1 eine Integration sowohl des cAMP-Signalwegs, als auch der MAPK-Kaskade notwendig, die eine Aktivierung von Prf1 durch Kpp2 und Adr1 erfordern (Kaffarnik *et al.*, 2003).

Kpp6 stellt eine weitere MAP-Kinase dar, die teilweise redundante Funktionen zu Kpp2 aufweist. *kpp2*- und *kpp6*-Deletionsmutanten weisen eine reduzierte Pathogenität auf (Brachmann *et al.*, 2003; Müller *et al.*, 1999), Doppel-Deletionsmutanten sind apathogen (Brachmann *et al.*, 2003). Stämme, die ein nicht-phosphorylierbares *kpp2AEF*-Allel tragen, bilden keine Appressorien mehr aus, wohingegen solche, die eine nicht-phosphorylierbare *kpp6AEF*-Variante tragen, zwar noch Appressorien bilden können, jedoch nicht mehr in der Lage sind, die Kutikula zu penetrieren. Beide MAPK haben somit während der pathogenen Entwicklung sowohl redundante als auch spezifische Funktionen (Brachmann *et al.*, 2003; Müller *et al.*, 2003).

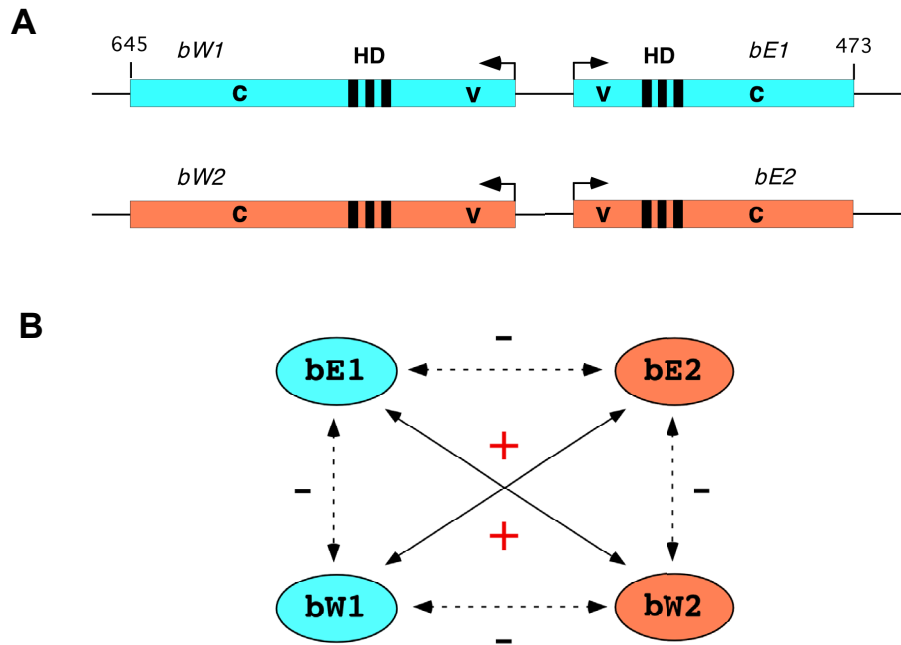
### 1.3.2 Der *b*-Locus kodiert für den zentralen Regulator der pathogenen Entwicklung

Nach erfolgter Zellfusion ist der *b*-Locus, der in mindestens 19 verschiedenen Allelen vorliegt (J. Kämper, pers. Mitteilung), für das Aufrechterhalten eines stabilen Dikaryons erforderlich. Nur Zellen, die verschiedene *b*-Allele tragen, können ein stabiles Dikaryon bilden (Banuett und Herskowitz, 1994b). Ein Allel besteht aus den zwei divergent transkribierten Genen *bEast* (*bE*) und *bWest* (*bW*), die durch einen ca. 200 bp großen intergenischen Promotorbereich getrennt sind (Abb. 2A). Beide Allele kodieren für zwei Homeodomänenproteine, wobei *bW* mit 645 Aminosäuren etwas größer ist als *bE* mit 473 Aminosäuren (Gillissen *et al.*, 1992). Obwohl beide Proteine zueinander keinerlei Homologie aufweisen, lassen sich im strukturellen Aufbau Gemeinsamkeiten erkennen. Beide enthalten einen variablen N-terminalen und einen konstanten C-terminalen Bereich, welcher auch die Homeodomäne enthält. Der variable N-terminale Bereich ist im Vergleich zwischen den einzelnen Allelen nur zu etwa 40-60 % konserviert, wohingegen der konstante C-terminale Bereich mit 90 % Identität stark konserviert ist (Gillissen *et al.*, 1992; Kronstad und Leong, 1990; Schulz *et al.*, 1990). Die *bE*- und *bW*-Homeodomänenproteine dimerisieren über den variablen N-terminalen Bereich und bilden ein funktionelles *bE/bW*-Heterodimer, allerdings nur, wenn sie von unterschiedlichen Allelen stammen (Kämper *et al.*, 1995; Abb. 2B). *bE*- und *bW*-Proteine, die von demselben Allel abstammen, können kein



funktionelles bE/bW-Heterodimer bilden, entsprechend kann der Pilz nicht in die pathogene Phase eintreten (Kämper *et al.*, 1995). Durch die Konstruktion des Stammes CL13 konnte gezeigt werden, dass ein funktionelles bE/bW-Heterodimer hinreichend ist, um die pathogene Entwicklung in *U. maydis* zu initiieren. Dieser haploide Stamm enthält ein chimäres *bE1/bW2*-Allel und ist in der Lage, ohne einen kompatiblen Kreuzungspartner Maispflanzen zu infizieren (Bölker *et al.*, 1995). Basierend auf diesen Experimenten konnte dem b-Heterodimer eine zentrale Rolle als Regulator der Pathogenität zugewiesen werden.

Das bE/bW-Heterodimer bindet an konservierte DNA-Motive, die sogenannten bbs (*b* binding site), in Promotoren direkt b-regulierter Gene, außerdem führen Mutationen in der Homeodomäne zum Verlust der Pathogenität (Brachmann *et al.*, 2001; Romeis *et al.*, 2000; Romeis *et al.*, 1997; Schlesinger *et al.*, 1997; Weinzierl, 2001). Daher wurde postuliert, dass ein aktives bE/bW-Heterodimer seine zentrale Rolle in der pathogenen Entwicklung von *U. maydis* als transkriptioneller Regulator erfüllt.



**Abbildung 2: Der *b*-Locus von *Ustilago maydis*.** A. Schematisch dargestellt ist der *b*-Locus von *U. maydis* und die von diesem kodierten Homeodomänen-Proteine bW und bE. Bei dieser Darstellung der b-Proteine bezeichnet HD die Homeodomänen, V die variablen und C die konstanten Regionen. B. Allelspezifische Dimerisierung der b-Proteine. bW- und bE-Proteine dimerisieren nur dann miteinander, wenn sie von unterschiedlichen Allelen stammen.

### 1.3.3 Die b-Regulationskaskade

Durch die zentrale regulatorische Funktion des bE/bW-Heterodimers im Morphologiewechsel und der pathogenen Entwicklung, wurde das b-Heterodimer an die Spitze einer b-vermittelten Regulationskaskade gestellt. Durch verschiedene differentielle Techniken wurden in den letzten Jahren mehrere direkt und indirekt b-regulierte Gene identifiziert. Direkt b-regulierten Gene werden vom b-Heterodimer durch Bindung an die konservierten b-Bindestellen im Promoter reguliert. Zu diesen Genen zählen *lga2* (Romeis *et al.*, 2000), *polX*, ein Gen, das für eine putative DNA-Polymerase X kodiert (Brachmann *et al.*, 2001), und die beiden Gene *dik6* und *dkh6*, die für zwei Membranproteine kodieren (Weinzierl, 2001). Indirekt durch das b-Heterodimer reguliert werden unter anderem Gene, die für zwei hydrophobe Zellwandproteine (Rep1, Hum2; Bohlmann *et al.*, 1994; Wösten *et al.*, 1996), und eine Endoglukanase (EG1; Schauwecker *et al.*, 1995) kodieren. Für keines der bisher als b-reguliert identifizierten Gene konnte jedoch eine zentrale Rolle für die Infektion, bzw. für die pathogene Entwicklung in *U. maydis* ermittelt werden.

Mit Hilfe von DNA-Microarrays war es möglich, ein umfassenderes Verständnis der durch das b-Heterodimer regulierten Prozesse zu bekommen. Für die Analyse wurden Stämme verwendet, in denen die Gene *bE* und *bW* unter der Kontrolle von Nitrat- bzw. Arabinose-regulierbaren Promotoren stehen. Die Expression von *bE* und *bW* kann somit gezielt induziert werden und ermöglicht so eine zeitlich aufgelöste Analyse der b-regulierten Prozesse (Brachmann *et al.*, 2001). Insgesamt konnten 347 Gene identifiziert werden, die durch das b-Heterodimer induziert bzw. reprimiert werden (J. Kämper und M. Scherer, pers. Mitteilung). Unter diesen befinden sich Gene, die Proteine mit einer putativen Funktion in der Regulation des Zellzyklus kodieren, beispielsweise Zykline, oder Proteinkinasen, die eine wichtige Funktion in der Etablierung des b-vermittelten G2-Zellzyklusarrests haben könnten (J. Kämper und M. Scherer, pers. Mitteilung). Gene, die für putative Chitinsynthasen, Chitindeacetylasen und Endoglukanasen kodieren, finden sich sowohl unter den hoch- als auch unter den runterregulierten Genen, was ein Indiz dafür sein könnte, dass Veränderungen der Zellwandstruktur auf der differentiellen Expression von Isoenzymen mit verschiedenen Eigenschaften beruhen (J. Kämper und M. Scherer, pers. Mitteilung). Ein Großteil der b-induzierten Gene kodiert für Proteine, die keine Ähnlichkeit zu bekannten Proteinen aufweisen. Es wird diskutiert,

dass ihre Funktion mit der biotrophen Phase von *U. maydis* korreliert (J. Kämper und M. Scherer, pers. Mitteilung).

Der Focus bei der systematischen Analyse b-regulierter Gene lag primär auf der Deletion potentieller Regulatoren. Dies führte zur Identifizierung dreier pathogenitätsrelevanter Gene - *rbf1*, *hdp2* und *clp1*. *rbf1* ist ein direkt b-reguliertes Gen und kodiert für einen C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>-Zinkfinger-Transkriptionsfaktor, der auf transkriptioneller Ebene ca. 90 % der b-abhängigen Gene reguliert, und somit eine zentrale Position in der b-abhängigen Regulationskaskade unterhalb von b einnimmt (J. Kämper und M. Scherer, pers. Mitteilung). Neben *rbf1* konnten noch *hdp2*, welches für einen Homeodomänen-Transkriptionsfaktor kodiert, und *clp1*, das für ein Protein mit Sequenzähnlichkeiten zu Clp1 aus *Coprinopsis cinerea* kodiert, als wichtige Regulatoren der pathogenen Entwicklung charakterisiert werden. *clp1*-Deletionsmutanten sind zwar noch in der Lage, die Pflanzenkutikula zu penetrieren, jedoch kann keine anschließende Proliferation in der Pflanze beobachtet werden. Vermutlich ist Clp1 an der Regulation der Zellteilung des Dikaryons nach erfolgter Penetration beteiligt (M. Scherer, pers. Mitteilung). Ein weiteres b-abhängig reguliertes Gen ist *hdp1*, dessen Expression ebenfalls Rbf1-abhängig ist. *hdp1* kodiert für ein Homeodomänenprotein. Die Deletion von *hdp1* hat keinen Einfluss auf die Pathogenität, jedoch sind die gebildeten Filamente stark verkürzt. Die Überexpression von *hdp1* führt zu einem Zellzyklusarrest in der G2-Phase (J. Kämper und C. Pothiratana, pers. Mitteilung). In der frühen Infektionsphase vor der Penetration ist es notwendig, den Zellzyklusarrest aufrecht zu erhalten, wobei Hdp1 eine Rolle spielen könnte. Da *hdp1*-Deletionsstämme weiterhin im Zellzyklus arretieren können, muss allerdings davon ausgegangen werden, dass noch weitere Faktoren diese Rolle übernehmen können (J. Kämper und C. Pothiratana, pers. Mitteilung).

#### 1.4 Fragestellung dieser Arbeit

*U. maydis* ist nach der Bildung eines stabilen Dikaryons und zur Vollendung seiner sexuellen Entwicklung auf die Wirtspflanze angewiesen. Alle bisherigen Analysen, die zur Identifizierung wichtiger b-abhängiger Regulatoren der pathogenen Entwicklung führten, wurden unter axenischen Bedingungen durchgeführt. Dabei wurde die Wirtspflanze und ihr Einfluss auf die Initiation der pathogenen Entwicklung weitgehend außer Acht gelassen. Die Aufgabenstellung dieser Arbeit war es, die Analyse der b-vermittelten pathogenen Entwicklung auf die Wirtspflanze auszudehnen. Der Focus lag dabei auf der Identifizierung potentieller Regulatoren, die eine Rolle in der frühen pathogenen Entwicklung von *U. maydis* innehaben.

## 2 Ergebnisse

### 2.1 Differentielle Genregulation im solopathogenen Stamm SG200

Zur Identifizierung von Genen, die auf der Pflanzenoberfläche vor bzw. während der Penetration differentiell reguliert werden, wurde das Expressionsprofil der Stämme FB1, SG200 und SG200 $\Delta b$  analysiert. Zellen des Stammes FB1 wachsen ohne einen kompatiblen Kreuzungspartner saprophytisch und sind nicht pathogen. SG200 hingegen, ein FB1-Derivat, trägt eine kompatible bE1/bW2-Kombination und zusätzlich hierzu das *mfa2*-Gen, welches für das a2-Pheromon kodiert. Aufgrund dieser genetischen Modifikation sind in SG200 sowohl der *a*- als auch der *b*-Paarungstyplocus aktiviert. Dies ermöglicht die Ausbildung eines pathogenen Filaments ohne einen entsprechenden Kreuzungspartner (Bölker *et al.*, 1995)<sup>1</sup> und sollte im Vergleich zu Kreuzungen eine synchronere Entwicklung und damit auch ein synchroneres Erfassen der Veränderungen in der Genexpression auf der Pflanzenoberfläche erlauben. Um mögliche Effekte eines aktiven *a*-Locus auf das Transkriptionsprofil in SG200 isoliert betrachten zu können, wurde zusätzlich der Stamm SG200 $\Delta b$ , ein SG200-Derivat, in dem der *b*-Paarungstyplocus durch homologe Rekombination durch eine Hygromyzin-Resistenzkassette ersetzt wurde, als Kontrolle verwendet.

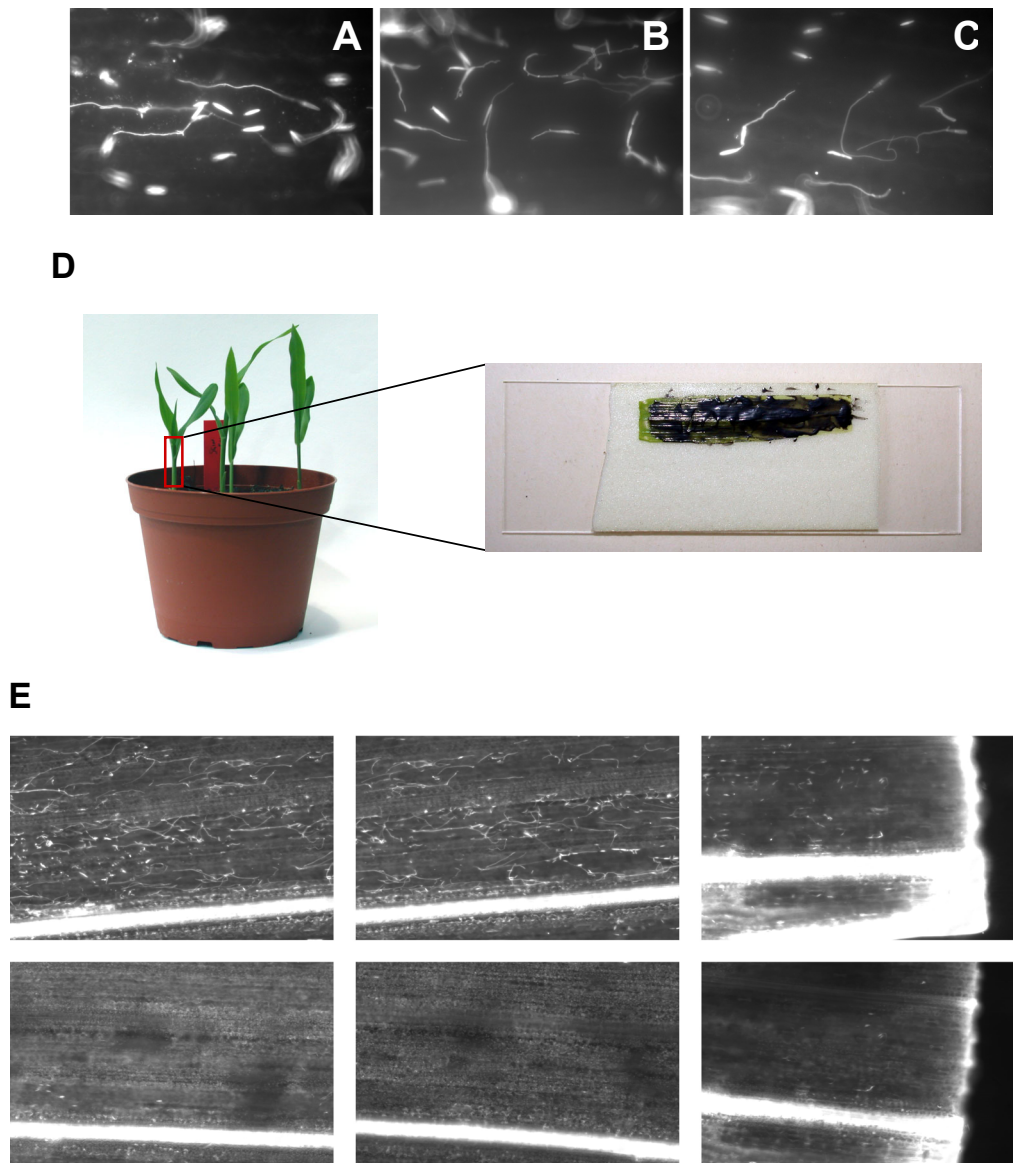
Für die Analyse der Genexpression in *U. maydis* auf der Pflanzenoberfläche wurden die Pflanzen mittels einer Standard-„Spritzinjektion“ infiziert. Hierbei wurden 200-250  $\mu$ L der entsprechenden Pilzsuspension (in Wasser, OD<sub>600</sub>~3,0) in das Innere des Blattwirtels von sieben Tage alten Maispflanzen gespritzt und anschließend für 16 h bzw. 24 h in einer Phytokammer inkubiert (Material und Methoden). Mikroskopische Analysen zeigten, dass die meisten SG200-Zellen auf der Pflanzenoberfläche filamentös wuchsen (Abb. 3C). Darüber hinaus konnte sowohl bei FB1 als auch SG200 $\Delta b$  filamentöses Wachstum auf der Blattoberfläche beobachtet werden (Abb. 3A, B).

Es wurden verschiedene Methoden getestet, um pilzliches Material von der Blattoberfläche zu isolieren (Daten nicht gezeigt). Als beste Methode erwies sich,

---

<sup>1</sup> Publiziert ist der Stamm SG100; SG200 unterscheidet sich von SG100 lediglich durch eine Phleomyzin-Resistenz.

pilzliches Material mit Hilfe von flüssigem Latex von der Blattoberfläche zu ernten (Abb. 3D; Material und Methoden). Calcofluor White-Färbungen von infizierten Blättern vor und nach Auftragen des Flüssiglatex ergaben, dass mit dieser Methode die meisten Filamente von der Blattoberfläche entfernt werden konnten (Abb. 3E).

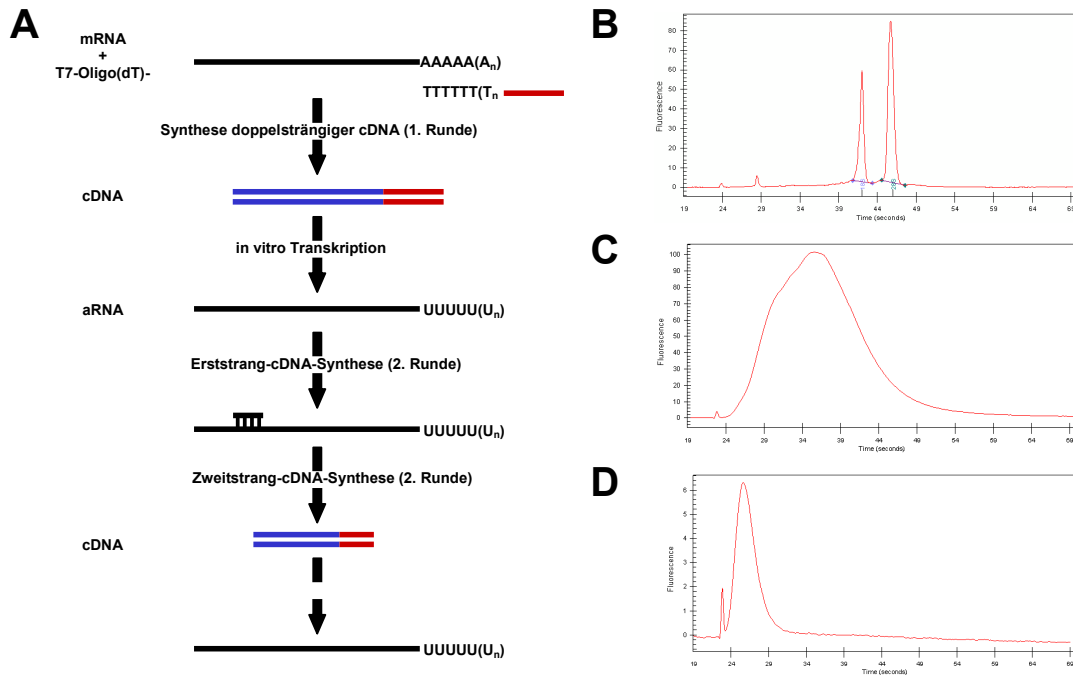


**Abbildung 3: Mikroskopische Analyse des filamentösen Wachstums auf der Blattoberfläche der Stämme FB1, SG200 und SG200 $\Delta$ b.** Die Abbildungen zeigen Calcofluor White-Färbungen von Zellen der Stämme FB1, SG200 und SG200 $\Delta$ b auf der Pflanzenoberfläche 16 h nach Infektion. Sowohl die beiden nicht pathogenen Stämme FB1 (A) und SG200 $\Delta$ b (B), als auch der pathogene Stamm SG200 (C) wachsen filamentös auf der Blattoberfläche. D. Die infizierten Maisblätter wurden nach 16 h bzw. 24 h geerntet und mit Hilfe von doppelseitigem Klebeband fixiert. Anschließend wurden die Blätter mit flüssigem Latex bestrichen. E. Gezeigt ist die Calcofluor White-Färbung eines mit SG200 infizierten Maisblattes. Pilzliches Material (E obere Reihe) wurde mit Hilfe von flüssigem Latex von der Blattoberfläche abgelöst. Nach dem Abziehen des Latexfilms sind keine Hyphen mehr auf der Blattoberfläche zu erkennen (E untere Reihe).

Für die Transkriptionsanalyse wurde Pilzmaterial von 6-8 infizierten Pflanzen vereinigt und anschließend die Gesamt-RNA extrahiert. Insgesamt wurden drei Ansätze pro Stamm und Zeitpunkt, d.h. drei unabhängige biologische Replikate an verschiedenen Tagen, für die weitere Analyse herangezogen. Die Qualität und Quantität der isolierten RNA wurde mittels Kapillargelelektrophorese auf einem Agilent Bioanalyzer 2100 bestimmt (Abb. 4B). Die Gesamtausbeute an RNA lag zwischen 100 ng bis 1 µg pro Ansatz. Da für Affymetrix-Array-Analysen nach dem Standard-Protokoll mindestens 5 µg Gesamt-RNA vorausgesetzt werden (Material und Methoden), wurde eine Zwei-Schritt-Amplifikation der isolierten Gesamt-RNA durchgeführt, um genügend cRNA für eine Hybridisierung des genomischen *U. maydis*- Microarrays zu erhalten. Die einzelnen Schritte sind in Abb. 4A schematisch dargestellt. Ausgehend von der isolierten Gesamt-RNA der zu vergleichenden Proben wurde zunächst eine reverse Transkription mit T7-Oligo(dT)-Oligonukleotiden durchgeführt, um doppelsträngige cDNA zu erzeugen. Anschließend erfolgte eine *in vitro*-Transkription als erster Amplifikationsschritt. Die durchschnittliche Transkriptlänge lag hierbei bei ca. 1400-1600 bp (Daten nicht gezeigt). Hieran schloss sich eine erneute Erststrang-cDNA-Synthese durch Verwendung von „Random“-Oligonukleotiden und eine Zweitstrang-cDNA-Synthese mit T7-Oligo(dT)-Oligonukleotiden an. Darauf folgte eine zweite *in vitro*-Transkription unter gleichzeitiger Markierung der Hybridisierungssonden mit biotinylierten Ribonukleotiden. Durch die Verwendung von „Random“-Oligonukleotiden entstanden in der zweiten Runde cRNA-Transkripte mit einer Durchschnittslänge von ca. 800-1000 bp (Abb. 4C). Die markierten Sonden wurden vor der Hybridisierung mit dem *U. maydis*-Microarray-Chip auf eine Größe von 30-200 bp fragmentiert (Abb. 4D; Material und Methoden).

Nach der Hybridisierung der entsprechenden Sonden wurden die Arrays mit Hilfe eines Scanners eingelesen. Anschließend wurden die Arrays mit der Affymetrix-Software MAS5.0 normalisiert und die entsprechenden Expressionswerte kalkuliert (Material und Methoden). Die hierauf folgende Analyse der Expressionsänderungen erfolgte mit dem Programm dChip (Li und Hung Wong, 2001). In einer Voranalyse wurde zunächst untersucht, wie stark sich das Expressionsprofil des solopathogenen Stammes SG200 in den beiden Zeitpunkten 16 h und 24 h vom Kontrollstamm FB1 zu denselben Zeitpunkten unterscheidet. Hierzu wurden alle Gene herausgefiltert, die im Experiment-Array (SG200 16 h; SG200 24 h) im Vergleich zum Kontroll-Array

(FB1 16h, FB1 24 h) eine um mindestens den Faktor 2 veränderte Expression aufwiesen.

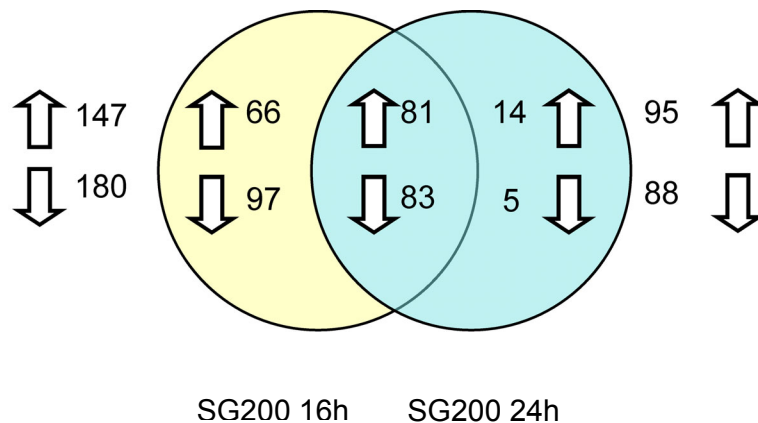


**Abbildung 4: Schematische Darstellung der Zwei-Schritt-Amplifikation.** **A.** Ausgehend von der isolierten Gesamt-RNA wurde zunächst eine reverse Transkription mit T7-Oligo(dT)-Oligonukleotiden durchgeführt, um doppelsträngige cDNA zu erzeugen. Anschließend erfolgte eine *in vitro*-Transkription als erster Amplifikationsschritt. Hieran schloss sich eine erneute Erststrang-cDNA-Synthese durch Verwendung von „Random“-Oligonukleotiden und eine Zweitstrang-cDNA-Synthese mit T7-Oligo(dT)-Oligonukleotiden an. Darauf folgte eine zweite *in vitro*-Transkription unter gleichzeitiger Markierung der Hybridisierungssonden mit biotinylierten Ribonukleotiden (Material und Methoden). Die Quantität und Qualität der isolierten Gesamt-RNA, sowie einzelne Schritte der Zwei-Schritt-Amplifikation wurden mittels Kapillargelelektrophorese auf einem Agilent Bioanalyzer 2100 bestimmt (**B-D**). **B.** Die Qualität der Gesamt-RNA wurde anhand der Integrität der ribosomalen Banden überprüft. **C.** Gezeigt ist die amplifizierte cRNA nach der zweiten *in vitro*-Transkription. Die Transkripte hatten eine durchschnittliche Länge von ca. 800-1000 bp. **D.** Vor der Hybridisierung des DNA-Microarrays wurden die biotinylierten cRNA-Transkripte auf eine durchschnittliche Größe von ca. 30-200 bp fragmentiert.



Bei der Berechnung der faktoriellen Veränderung der Genexpression wurde ein Vertrauensintervall („lower confidence bound of fold change“) vorgegeben, welches unter anderem den Standardfehler der Expressionswerte berücksichtigt und eine eher konservative Beurteilung der faktoriellen Veränderung darstellt (Li und Hung Wong, 2001).

Insgesamt konnten in SG200 im Vergleich zu FB1 nach 16 h 327<sup>2</sup> Gene identifiziert werden, die mehr als zweifach hoch- oder runterreguliert waren. Nach 24 h wurden 183 Gene differentiell regulierte gefunden. Es zeigte sich, dass bis auf 19 Gene (Tabelle 1; Abb. 5) alle Gene aus dem 24 h Zeitpunkt bereits nach 16 h differentiell reguliert waren. Deshalb wurden alle hierauf folgenden Experimente nur noch zum Zeitpunkt 16 h nach Infektion durchgeführt.



**Abbildung 5: Vergleichende Transkriptom-Analyse im Stamm SG200 zu den Zeitpunkten 16 h und 24 h nach Infektion.** Im Schnittmengendiagramm ist die Gesamtzahl aller differentiell regulierten Gene zu den beiden Zeitpunkten angegeben. Nach 16 h waren in SG200 insgesamt 327 Gene mehr als 2-fach hoch- oder runterreguliert, wohingegen nach 24 h 183 Gene differentiell exprimiert wurden.

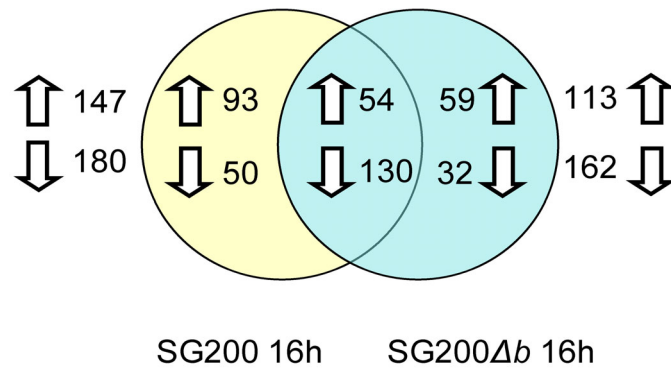
<sup>2</sup> Die *U. maydis* DNA-Mikroarray-Chips wurden von der Firma Affymetrix basierend auf der BayerCropScience Genomsequenz hergestellt. Jeder putative ORF ist durch einen Probeset repräsentiert. Probesets, die keine Übereinstimmung mit der MUMDB-Annotation aufweisen, wurden in dieser Studie nicht berücksichtigt. Daher unterscheiden sich die Anzahl der differentiell regulierten Probesets von der Anzahl der differentiell regulierten Gene (MUMDB: Stand 01.2006). Soweit nicht anders vermerkt, bezieht sich dieses auf alle folgenden Expressionsanalysen.

**Tabelle 1: Spät-regulierte Gene in SG200 (FB1 24 h vs. SG200 24 h)**

Probeset	MUMDB <sup>1</sup>	MUMDB Annotation	Veränderung der Expression (x-fach)
C35um250G_at	um10364	related to KRE6 - glucan synthase subunit	11,7
W70um170G_at	um11562	related to Hydrophobin	5,2
C155um157G_at	um02157	conserved hypothetical protein	4,4
W20um178G_at	um02026	related to 5-carboxyvanillate decarboxylase	2,6
C25um039G_at	um11651	related to S-adenosylmethionine:diacylglycerol 3-amino-3-carboxypropyl transferase btaA	2,5
UG23-1i5-133h4_RC_at	um05421	related to Multidrug resistance protein	2,3
C80um060G_at	um02115	conserved hypothetical protein	2,3
C85um012G_at	um11464	conserved hypothetical protein	2,2
C42um217G_at	um04499	conserved hypothetical protein	2,1
C50um075G_at	um11598	related to oxidoreductase, aldo/keto reductase family	2,1
W155um044G_at	um02331	Kpp6 MAP kinase	2,1
W80um225G_at	um02142	related to muconate cycloisomerase	2,1
W16um184G_at	um10350	putative protein	2,0
C120um192G_at	um00209	putative protein	2,0
C107um076G_at	um10657	conserved hypothetical protein	-2,1
W25um226G_at	um04322	hypothetical protein	-2,3
W95um192G_at	um00204	related to Ca <sup>2+</sup> -transporting ATPase	-2,7
W40um152G_at	um05276	conserved hypothetical protein	-2,9
C30um119G_at	um01744	related to Na <sup>+</sup> -transporting ATPase ENA-1 (sodium P-type ATPase ENA-1)	-3,8

<sup>1</sup>MUMDB (<http://mips.gsf.de/genre/proj/ustilago/>)

Ein Vergleich der Transkriptionsprofile von SG200 $\Delta$ *b* und FB1 ergab, dass in SG200 $\Delta$ *b* 275 Gene differentiell reguliert waren (Abb. 6). Vergleicht man jeweils SG200 und SG200 $\Delta$ *b* gegen FB1, so zeigt sich, dass 184 Gene sowohl in SG200 als auch in SG200 $\Delta$ *b* gleichermaßen differentiell reguliert sind. Somit sind 56% der in SG200 differentiell regulierten Gene auch in SG200 $\Delta$ *b* differentiell reguliert. Zusammengefasst ließen sich 418 Gene identifizieren, die in SG200 und/oder SG200 $\Delta$ *b* differentiell reguliert waren, und somit ihre Expression in Abhängigkeit des aktiven  $\alpha$ -Paarungstyplocus oder beider Paarungstyploci (*a* und *b*) auf der Pflanzenoberfläche um den Faktor  $\geq 2$  verändern (Abb. 6).



**Abbildung 6: Vergleichende Transkriptom-Analyse der Stämme SG200 und SG200Δb.** Im Schnittmengendiagramm ist die Gesamtzahl der in den beiden Stämmen als differentiell reguliert gefundenen Gene angegeben. In SG200 wurden insgesamt 327 Gene als differentiell reguliert gefunden; 275 Gene sind in SG200Δb hoch- bzw. runterreguliert (näheres siehe Text).

SG200 und SG200Δb sind genetisch so modifiziert, dass sie sowohl das Gen für das a2-Pheromon und den kompatiblen Rezeptor Pral tragen. In SG200Δb wird der *a*-Locus über ein autokrines System induziert. Somit ist dieser Stamm in der Lage, seine Pheromonantwort selbst zu stimulieren, was dem Zustand haploider, pheromon-stimulierter Sporidien entspricht. Andererseits führt die Aktivierung des *b*-Locus, die nur in SG200 möglich ist, durch ein aktives bW/bE-Heterodimer zu einer Repression der Pheromonantwort. Im Detail wird die Expression von *mfa* und *pra* runterreguliert und entspricht in etwa der von nicht pheromoninduzierten haploiden Sporidien (Hartmann *et al.*, 1996). Konsistent hiermit ist die Beobachtung, dass in SG200Δb im Vergleich zu FB1 *mfa1* und *pra1* eine 2,49- bzw. 9,05-fache Induktion zeigen, jedoch in SG200 keine differentielle Regulation festgestellt werden konnte (*pra1*=1,35x; *mfa1*=0,76x). Dieses Expressionsmuster kann durch die Induktion des zentralen Regulators der transkriptionellen Pheromonantwort, Prf1, in SG200Δb erklärt werden (Hartmann *et al.*, 1996). Neben *pra1*, *mfa1* und *prf1* konnten in SG200Δb weitere bekannte pheromoninduzierte Gene identifiziert werden, wie beispielsweise *rbf1*, *kpp6*, ein Gen für eine putative Endochitinase (*um06190*) und eine CAAX-Prenyl-Protease (*um11228*) (Brachmann *et al.*, 2003; Eichhorn, 2004).

Unter den Genen, die in SG200 induziert waren, wurden solche gefunden, die zuvor als b-reguliert beschrieben worden waren. Darunter waren *rbf1*, *dik6*, *clp1*, *egl1*, *hum2*, *polX* und *kpp6*.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die in SG200*Ab* beobachtete differentielle Genregulation (im Vergleich zu FB1) auf einen aktiven *a*-Locus zurückgeführt werden kann. Gene, die in SG200 differentiiell reguliert sind, stellen höchstwahrscheinlich b-regulierte Gene dar, da eine Induktion der Schlüsselkomponenten des *a*-Signalwegs (*pra*, *mfa* und *prf1*) nicht festgestellt wurde. Gene, die gleichermaßen in SG200*Ab* und SG200 differentiiell reguliert sind, zeigen entsprechend eine sowohl *a*- als auch b-abhängige Regulation.

1369 der putativen 6890 *U. maydis* Proteine (19,9%) haben keine Ähnlichkeit<sup>3</sup> zu Proteinen, die in Datenbanken hinterlegt sind. Bei gleichzeitiger Betrachtung der vorhergesagten Lokalisierung zeigt sich, dass 4,1 % aller putativen *U. maydis* Proteine keine Ähnlichkeit zu bekannten Proteinen haben und zugleich nach TargetP-Prognose<sup>4</sup> wahrscheinlich sekretiert sind. Interessanterweise kodieren 25,9 % der in SG200 induzierten Gene, für sekretierte Proteine ohne Ähnlichkeit zu bereits bekannten Proteinen. Von diesen zeigt etwa die Hälfte ebenfalls eine Induktion in SG200*Ab*. Eine Klassifizierung der in SG200 differentiiell regulierten Gene mit dem Programm FunCatDB (<http://mips.gsf.de/genre/proj/ustilago>) zeigte keine signifikante Anreicherung bestimmter funktioneller Kategorien. Unter den differentiiell exprimierten Genen lassen sich jedoch einige Gene, die beispielsweise für putative lytische Enzyme oder Transkriptionsfaktoren (siehe nächstes Kapitel) kodieren, identifizieren. 7 der in SG200 induzierten Gene kodieren für putativ zellwandabbauende Enzyme: drei Endoglukanasen, und zwar um02523, um04816 und *egl1*, eine Alpha-L-Arabinofuranosidase (um01829), eine Pectin-Methylesterase (um03516), eine Exo-1,3- $\beta$ -Glukanase (um00876) und eine Endo-1,4- $\beta$ -Xylanase (um04422). Interessanterweise sind die Pectin-Methylesterase und die Exo-1,3- $\beta$ -Glukanase (um00876) nur in SG200 induziert, wohingegen alle anderen zellwandabbauende Enzyme in beiden Stämmen induziert sind, dem apathogenen SG200*Ab* und dem pathogenen SG200.

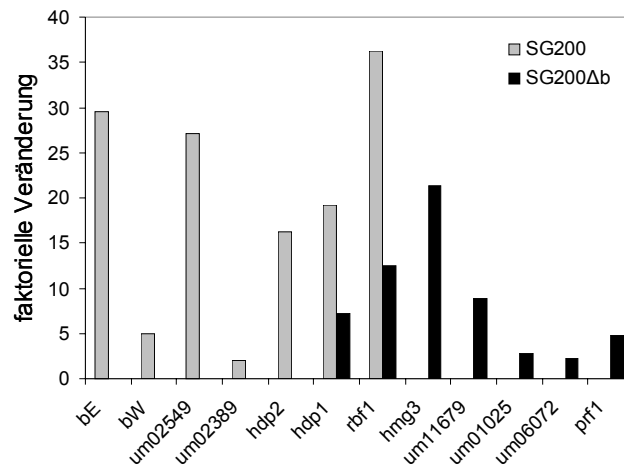
---

<sup>3</sup> In dieser Arbeit werden Proteine als *Ustilago maydis*-spezifisch bezeichnet, wenn sie < 20 % Ähnlichkeit (bezogen auf die Gesamtlänge des *U. maydis* Proteins) zu bekannten Proteinen in einer nicht-redundanten Protein-Datenbank zeigen (SIMAP, MUMDB, <http://mips.gsf.de/genre/proj/ustilago>) und gleichzeitig bei Verwendung von BLASTP gegen eine nicht redundante Protein-Datenbank einen E-Value > E-5 haben; zusätzlich wurden die Hits zu Proteinen manuell überprüft (G. Mannhaupt, MIPS)

<sup>4</sup> Für die in dieser Arbeit verwendeten TargetP-Voraussagen der *U. maydis* Genmodelle wurden die Berechnungen der MUMDB (<http://mips.gsf.de/genre/proj/ustilago>; Stand 04.2006) verwendet.

## 2.2 Differentiell regulierte Transkriptionsfaktoren

Zwölf der auf der Pflanzenoberfläche induzierten Gene (Abb. 7) kodieren für Transkriptionsfaktoren bzw. putative Transkriptionsfaktoren, und zwar für die vier Homeodomänen-Proteine *bE* und *bW*, *Hdp1* und *Hdp2*, für die drei C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>-Zinkfingerproteine, *Rbf1*, *um02549* und *um06072*, die beiden Hmg-Box-Proteine *Prf1* und *Hmg3* (Brefort *et al.*, 2005), sowie für drei Transkriptionsfaktoren, die zur Klasse der pilzspezifischen Zn(II)<sub>2</sub>Cys<sub>6</sub> binukleären Clusterproteine gehören (*um11679*, *um01025*, *um06072*). Die beiden Homeodomänen-Transkriptionsfaktoren *bE* und *bW* zeigten genauso wie *um02549*, *um02389* und *hdp2* eine Induktion ausschließlich in SG200. *hdp1* und *rbf1* waren in SG200Δ*b* induziert, die Expression stieg aber in SG200 noch einmal deutlich an. *prf1*, *hmg3*, *um11679*, *um01025* und *um06072* waren ausschließlich in SG200Δ*b* induziert, die Expression scheint also rein *a*-abhängig zu sein. Somit stellen *um02549*, *um02389* und *Hdp2* die einzigen Transkriptionsfaktoren dar, die auf der Pflanzenoberfläche ausschließlich eine *b*-abhängige Regulation zeigten. Aufgrund seiner strikt *b*-abhängigen Regulation und der zweithöchsten Induktion auf der Pflanzenoberfläche (27,2 x) wurde *um02549* für weitere Analysen ausgewählt.

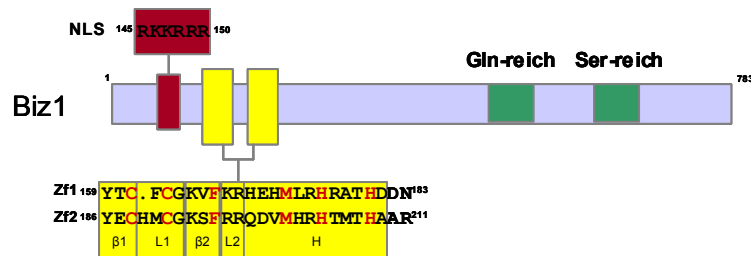


**Abbildung 7: Auf der Pflanzenoberfläche induzierte Transkriptionsfaktoren.**

Gezeigt ist die faktorische Veränderung der Expressionswerte der auf der Pflanzenoberfläche induzierten Transkriptionsfaktoren. *hdp2*, *um02549* und *um2389* sind ausschließlich in SG200 induziert. Für *hmg3*, *um11679*, *um01025*, *um06072* und *prf1* konnte nur in SG200Δ*b* eine differentielle Expression beobachtet werden. *hdp1* und *rbf1* zeigen eine Induktion sowohl in SG200 als auch in SG200Δ*b*.

### 2.3 Biz1 (um02549) ist ein C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>-Zinkfingerprotein

Bei *um02549*, im folgenden *biz1* (b-induziertes Zinkfingerprotein), handelt es sich um ein auf der Pflanzenoberfläche b-induziertes Gen. Für *biz1* wird ein offener Leserahmen von 2352 bp ohne Introns vorausgesagt (MUMDB). Das hiervon abgeleitete Protein hat 783 Aminosäuren und enthält zwei putative C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>-Zinkfinger-Domänen. Die beiden Zinkfingerdomänen Zf1 (AS 159 bis 183) und Zf2 (AS 186 bis 211) sind aus jeweils zwei kurzen  $\beta$ -Faltblättern ( $\beta$ 1 und  $\beta$ 2) aufgebaut, die wiederum durch zwei kurze Loops (L1) und (L2) separiert werden. An L2 schließt sich eine  $\alpha$ -Helix an (Abb. 8). Während die zweite Zinkfingerdomäne Zf2 der Konsensussequenz CX<sub>2</sub>-4CX<sub>12</sub>HX<sub>3</sub>-5H (Jacobs, 1992) entspricht, fehlt in der ersten Zinkfingerdomäne Zf1 eine Aminosäure zwischen den beiden Cysteinresten. Des Weiteren enthalten beide Domänen eine hydrophobe Aminosäure an Position 4 (Methionin) der putativen  $\alpha$ -Helix und ein Phenylalanin an Position 3 in  $\beta$ 2. BLAST-Analysen (Altschul *et al.*, 1997) ergaben, dass es neben den Zinkfingerdomänen keine signifikanten Sequenzähnlichkeiten zu anderen Einträgen gibt. Eine Analyse von Biz1 mit der PROSITE-Datenbank (Hulo *et al.*, 2006) zeigt eine glutaminreiche Sequenz zwischen den AS-Positionen 507-526 und eine serinreiche Region zwischen den Positionen 655-702 an (Abb. 8). Eine weitere Untersuchung der Aminosäuresequenz von Biz1 mit Hilfe des Programms PSORT (Nakai und Horton, 1999) zeigt eine Kernlokalisierungssequenz RKKRRR (AS-Position 145-150) und ergab eine sehr hohe Wahrscheinlichkeit von p=94 für eine Lokalisierung von Biz1 im Zellkern.



**Abbildung 8: Schematische Darstellung des Biz1-Proteins.** Gezeigt ist die Domänenstruktur des Biz1-Proteins. Biz1 enthält eine NLS (nuclear localization sequence), eine glutamin-, eine serinreiche Region und zwei C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>-Zinkfingerdomänen. Zusätzlich angegeben ist die Sequenz der beiden Zinkfingerdomänen; Die Aminosäuren, die wahrscheinlich in den  $\beta$ -Faltblattstrukturen ( $\beta$ 1 und  $\beta$ 2), dem Loop (L1) und der  $\alpha$ -Helix liegen, sind markiert (Modell nach Suzuki *et al.*, 1994). Konservierte Aminosäuren, die dem C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>-Konsensusmotiv entsprechen, sind in rot markiert.

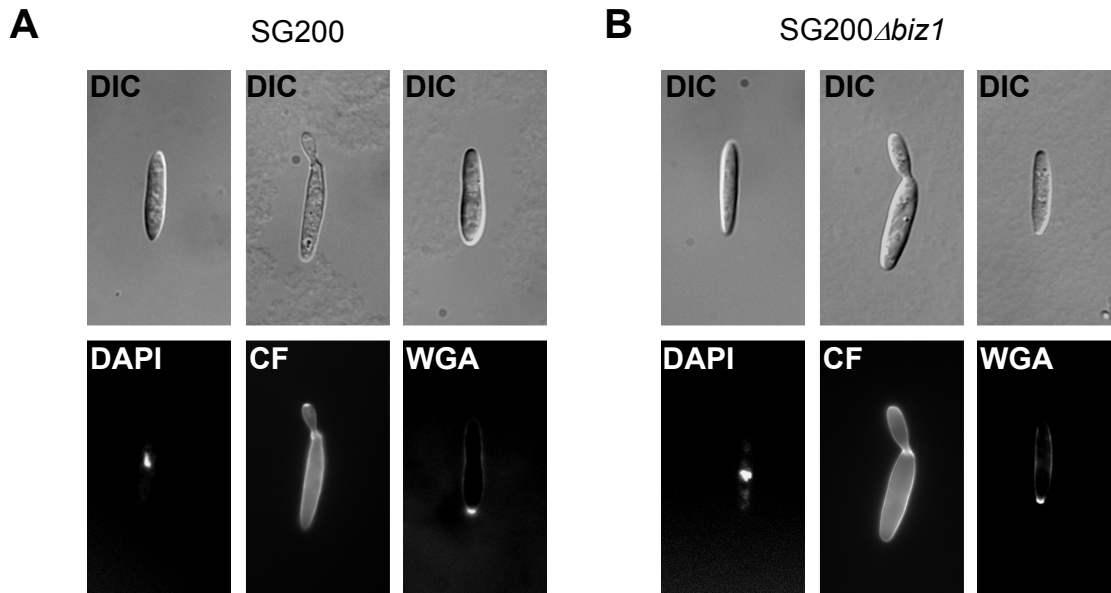
Sowohl die zwei C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>-Zinkfingerdomänen, die glutaminreiche Region, als auch die putative Zellkernlokalisierung von Biz1, lassen die Annahme zu, dass Biz1 ein Transkriptionsfaktor sein könnte.

#### 2.4 Biz1 ist essentiell für die pathogene Entwicklung in *U. maydis*

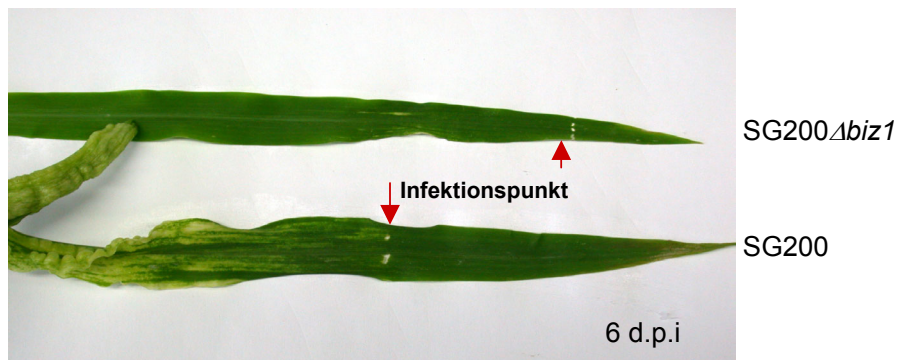
Um die biologische Funktion von Biz1 näher zu charakterisieren, wurde die Deletionsmutante SG200 $\Delta$ biz1 erstellt. Hierzu wurde der offene Leserahmen im Stamm SG200 durch eine Hygromyzin-Resistenzkassette ersetzt (Material und Methoden). Die homologe Integration des Deletionskonstruktes wurde mittels Southernblotanalyse bestätigt. SG200 $\Delta$ biz1 zeigte unter axenischen Bedingungen in Flüssigkultur keine erkennbaren Unterschiede zu SG200 im Wachstumsverhalten (nicht gezeigt) und in der Zellmorphologie (Abb. 9). Hinsichtlich der Fähigkeit von SG200 $\Delta$ biz1, filamentös auf aktivkohlehaltigen Platten zu wachsen, konnte ebenfalls keine Differenz zum SG200-Ausgangsstamm beobachtet werden (Abb. 11A). Um eine mögliche Rolle von Biz1 während der pathogenen Entwicklung von *U. maydis* zu untersuchen, wurden Maispflanzen mit SG200 $\Delta$ biz1 und SG200 als entsprechender Kontrolle infiziert. Pflanzen, die mit SG200 $\Delta$ biz1 infiziert wurden, zeigten keine Tumorbildung (siehe Tabelle 2; Abb. 10).

**Tabelle 2: Pathogenität des *biz1*-Deletionsstammes**

Stamm	Infizierte Pflanzen	Pflanzen mit Tumoren
SG200 $\Delta$ biz1	82	0 (0%)
SG200	70	59 (84%)



**Abbildung 9: Mikroskopische Analyse des Zellwachstums bei SG200*Abiz1*-Mutanten.** Die Abbildungen zeigen *in situ* DAPI-, Calcofluor White- und WGA- Färbungen von Zellen aus Flüssigkultur (CM-Glc). Bei *in situ*-Färbungen der Zellkerne mit DAPI (4',6'-Diamidino-Phenylindol) zeigen SG200*Abiz1*-Mutanten (B) keinen Unterschied zu SG200-Zellen (A) im Bezug auf die Anzahl der Zellkerne pro Zelle. In Färbungen der Zellwand mit Calcofluor White konnte ebenfalls kein Unterschied in der Morphologie der Zellwand im Vergleich zu SG200 festgestellt werden. WGA-Färbungen (wheat germ agglutinin), zeigen Zonen starken Wachstums der Zellwände an den Polen wie in SG200.



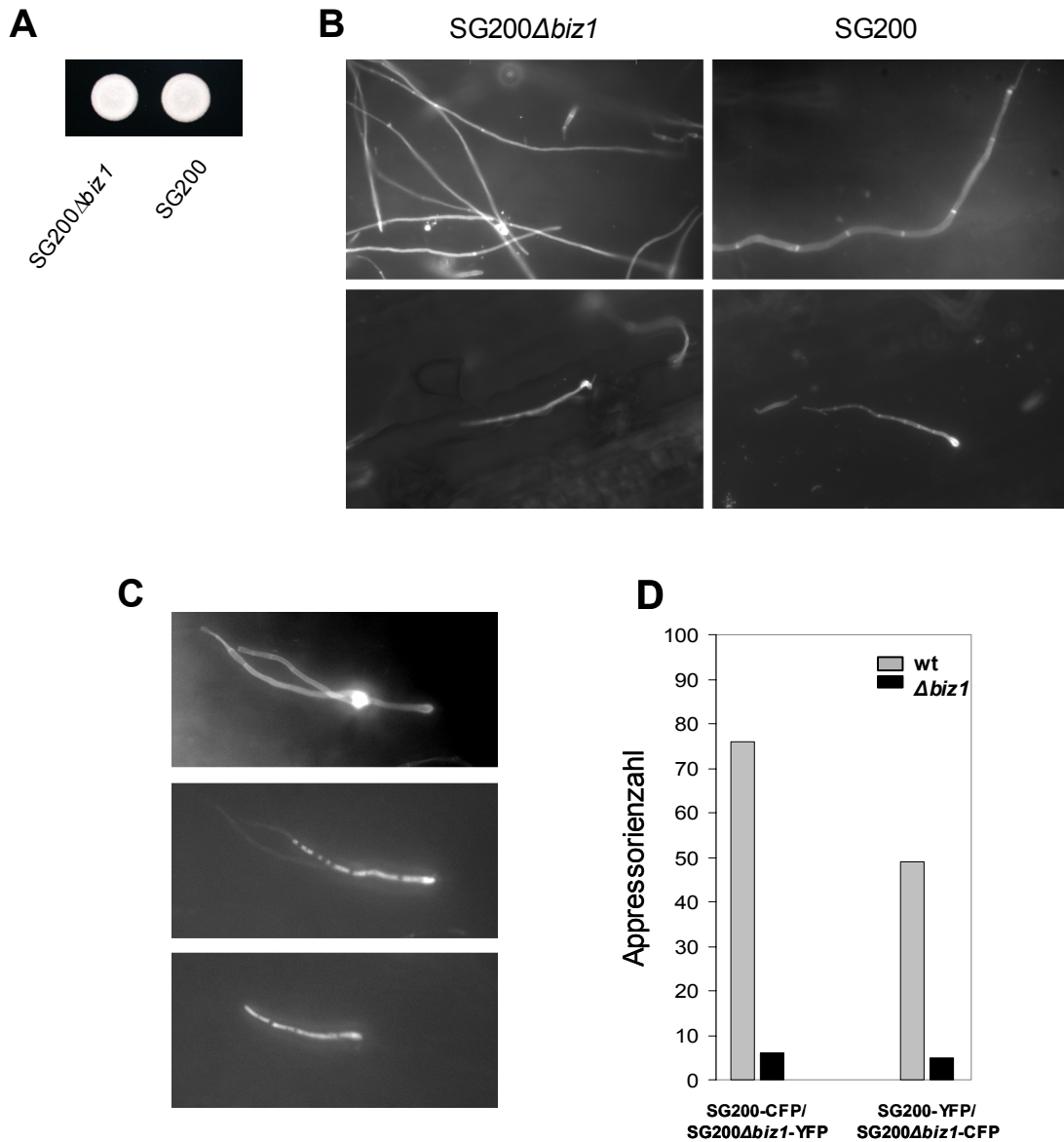
**Abbildung 10: Die Deletion von *biz1* hat einen Einfluss auf die Pathogenität.** Maispflanzen wurden mit SG200 bzw. SG200*Abiz1*-Stämmen infiziert. Sechs Tage nach der Infektion, können in Infektionen mit SG200-Stämmen bereits Tumore beobachtet werden, während Pflanzen, die mit SG200*Abiz1*-Stämmen infiziert wurden, keine Tumorbildung zeigten. Die roten Pfeile markieren die Injektionsstelle. Quantitative Analyse der Infektionsstudien: siehe Tabelle 2



## 2.5 Rolle von Biz1 in der Appressorienbildung und *in planta* Proliferation

Um zu untersuchen, in welchem Stadium die  $\Delta biz1$ -Mutante in ihrer pathogenen Entwicklung einen Defekt aufweist, wurde zunächst eine Calcofluor White-Färbung von Pilzzellen auf der Blattoberfläche durchgeführt. Hierbei konnte im Bezug auf die Morphologie der Filamente kein Unterschied zum entsprechenden Ausgangstamm SG200 beobachtet werden. SG200 $\Delta biz1$ -Zellen waren in der Lage, lange, von Septen durchzogene Filamente auf der Blattoberfläche zu bilden (Abb. 11B), woraus geschlossen werden kann, dass der Verlust der Pathogenität nicht durch einen Defekt im filamentösen Wachstum *on planta* verursacht wird. Interessanterweise kann die  $\Delta biz1$ -Mutante Appressorien ausbilden (Abb. 11B), die morphologisch den Appressorien von SG200-Zellen entsprechen, jedoch konnte eine drastische Reduktion der Anzahl von Appressorien in SG200 $\Delta biz1$  gegenüber SG200 beobachtet werden. Zur Quantifizierung der Appressorienbildung auf der Pflanzenoberfläche wurden SG200 $\Delta biz1$ - und SG200- Stämme konstruiert, die eine der beiden GFP-Derivate YFP und CFP (yellow- und cyan-shifted GFP) konstitutiv exprimieren (Abb. 11C). SG200 $\Delta biz1$ -YFP-Zellen wurden mit der gleichen Anzahl an SG200-CFP-Zellen für Pflanzenexperimente koinfiziert. In der anschließenden mikroskopischen Auswertung konnten für die Mutante 6 Appressorien und für den Wildtypstamm 76 Appressorien gezählt werden (Abb. 11D). Ähnliches zeigte sich in einem zweiten Experiment, bei dem die Stämme mit dem jeweils anderen GFP-Derivat markiert waren. Hier konnten für SG200-YFP 49 Appressorien und für SG200 $\Delta biz1$ -CFP 5 Appressorien gezählt werden (Abb. 11D).

In Chlorazol-Black-E-Färbungen (Brachmann *et al.*, 2003) von infizierten Maisblättern konnte beobachtet werden, dass Hyphen der  $\Delta biz1$ -Mutante zwar in der Lage sind, die Blattoberfläche zu penetrieren, die Hyphen aber kurz nach der Penetration stecken bleiben (Abb. 12A). Ein weiteres invasives Wachstum konnte nicht beobachtet werden. Ähnliches ließ sich auch in Infektionsexperimenten mit SG200 $\Delta biz1$ -YFP bzw. SG200 $\Delta biz1$ -CFP feststellen. Auch hier konnten penetrierende Hyphen beobachtet werden, die aber kein weiteres invasives Wachstum zeigten (Abb. 12C). Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass Biz1 während der Appressorienbildung zwar eine Rolle spielt, für die weitere Proliferation in der Pflanze allerdings von zentraler Bedeutung ist.



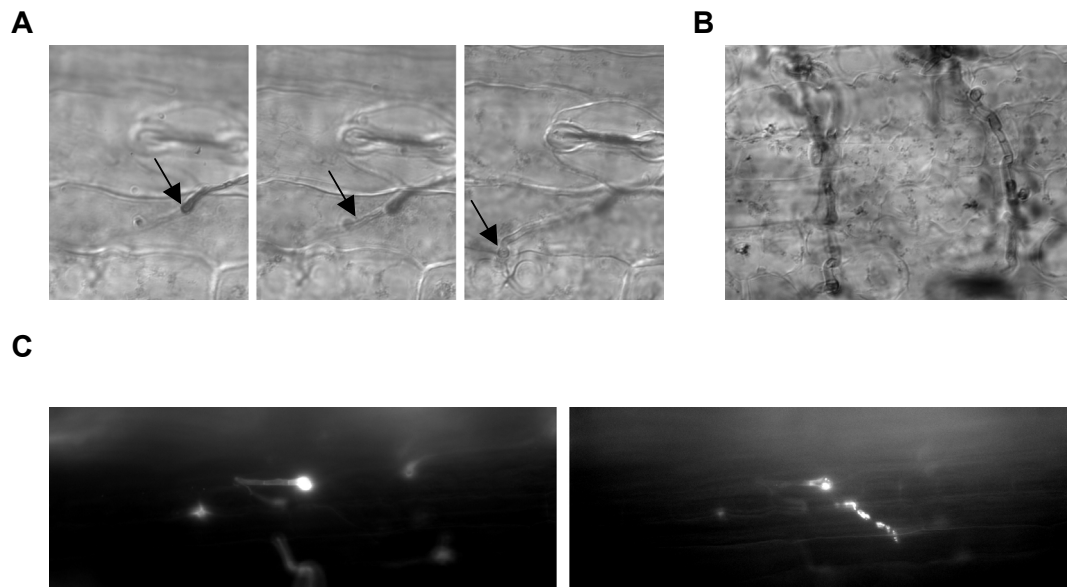
**Abbildung 11: Charakterisierung der *biz1*-Deletionsmutante während der pathogenen Entwicklung.**

**A.** zeigt die Filamentbildung des solopathogenen Stammes SG200 und des SG200Δ*biz1*-Stammes. Die Stämme wurden auf aktivkohlehaltige CM-Mediumplatten aufgetropft und bei 24°C für 24 h inkubiert. Die Kolonien erscheinen bei Ausbildung von Filamenten wegen der luftgefüllten leeren Abschnitte weiß.

**B.** 1 Tag nach Infektion von Maispflanzen mit SG200 und SG200Δ*biz1*-Stämmen können durch eine Calcofluor White-Färbung die pilzlichen Hyphen im UV-Licht visualisiert werden. In der oberen Reihe lassen sich Filamente in beiden Stämmen erkennen und in der unteren Reihe die Appressorienbildung.

**C.** Die konstitutive Expression der beiden GFP-Derivate YFP und CFP ermöglicht die Identifizierung von SG200 und SG200Δ*biz1* in einer Koinfektion. Das obere Bild zeigt zwei Hyphen, die Appressorien gebildet haben (Calcofluor White-Färbung). Eines der Appressorien wird von SG200-CFP (Fluoreszenzsignal im CFP-Filter, mittleres Bild) und das zweite von SG200-Δ*biz1*-YFP (Fluoreszenzsignal im YFP-Filter, unteres Bild) gebildet.

**D.** SG200Δ*biz1*-Stämme zeigen eine drastische Reduktion in der Appressorienbildung. SG200 und SG200Δ*biz1*-Zellen, die entweder mit YFP oder CFP markiert waren, wurden in gleichen Verhältnissen in Maispflanzen injiziert. Nach einem Tag wurden die Appressorien den Fluoreszenzsignalen entsprechend ausgezählt. Hierbei konnte eine Reduktion der Appressorienzahl in SG200Δ*biz1*-Stämmen beobachtet werden, ungeachtet des verwendeten Markers.



**Abbildung 12: SG200 $\Delta$ biz1-Stämme arretieren ihr Wachstum direkt nach der Penetration.**

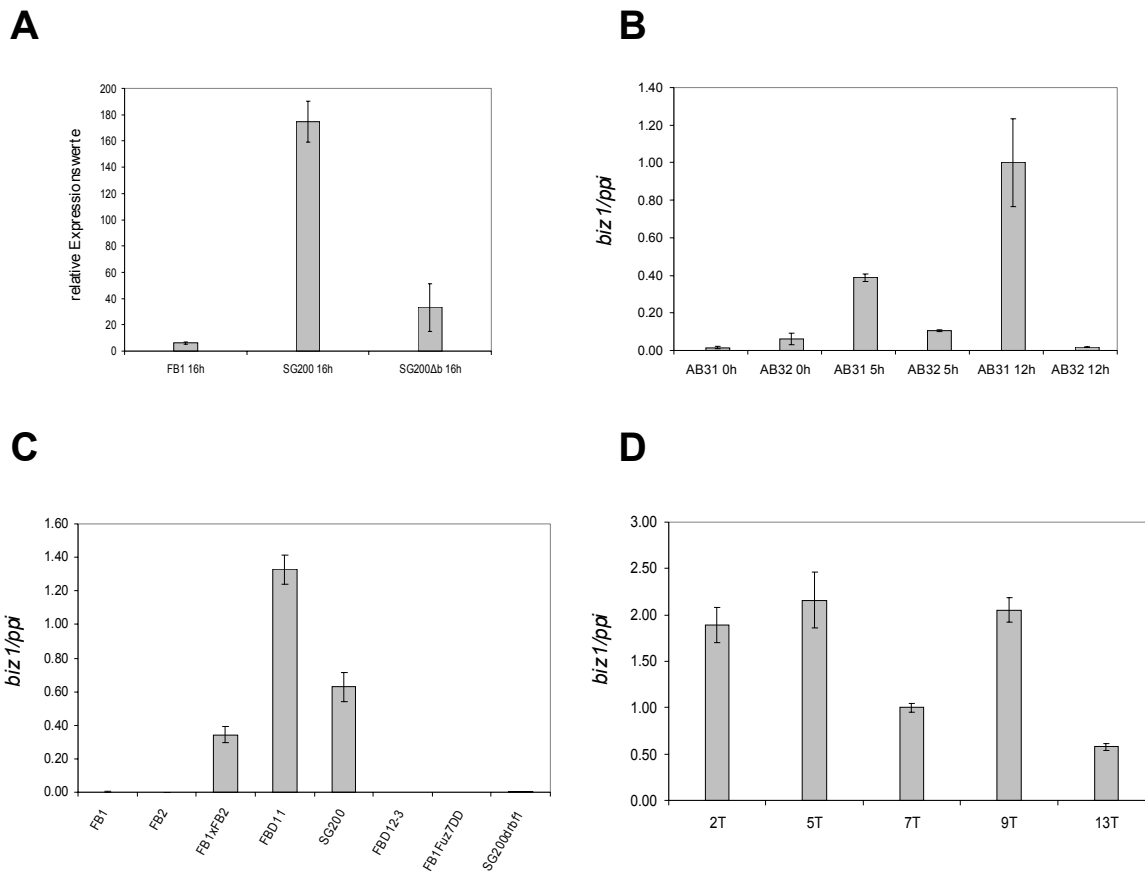
Gezeigt ist eine Serie von Z-Achsen-Aufnahmen der SG200 $\Delta$ biz1- und SG200-Filamente auf der Blattoberfläche. Pflanzen wurden mit SG200 und SG200 $\Delta$ biz1-Stämmen infiziert, und pilzliches Material wurde zwei Tage nach Infektion mit Hilfe von Chlorazol-Black-E-Färbungen sichtbar gemacht. **A.** In Infektionen mit SG200 $\Delta$ biz1 werden Appressorien gebildet, die Hyphen arretieren, aber direkt nach der Penetration. **B.** In Kontrollexperimenten mit SG200-Zellen kann zu diesem Zeitpunkt bereits massive Proliferation in der Pflanze beobachtet werden. **C.** Gezeigt ist die Penetration eines SG200 $\Delta$ biz1-Filaments. Pflanzen wurden mit SG200 $\Delta$ biz1-CFP infiziert und Appressorien wurden 1 Tag nach Infektion mit Calcofluor White visualisiert (linkes Bild). Mikroskopische Analysen zeigten penetrierende Hyphen (Fluoreszenzsignal im CFP-Filter, rechtes Bild).

## 2.6 *biz1* ist ein spät b-reguliertes Gen

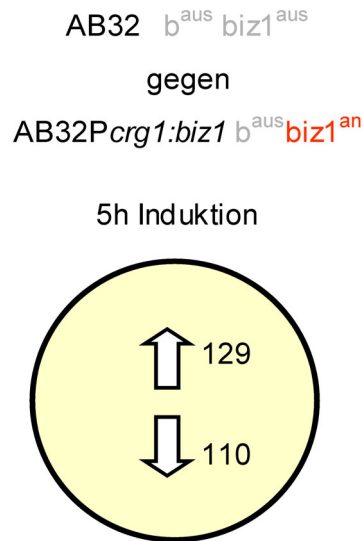
Für *biz1* konnte im vorhergehenden Microarray-Experiment (s. oben) bereits eine strikt b-abhängige Expression gezeigt werden (Abb. 13A). Im Folgenden wurde die *biz1*-Expression im Hinblick auf eine *a*- bzw. *b*-Locus-abhängige Regulation in axenischer Kultur näher charakterisiert. Zunächst wurde die b-abhängige *biz1*-Expression in Stämmen, die auf aktivkohlehaltigen CM-Medium inkubiert wurden, analysiert: den hefeartig wachsenden Wildtyp-Stämmen FB1 (*a1b1*) und FB2 (*a2b2*), einer Kreuzung von FB1 und FB2, dem solopathogenen Stamm SG200 (*a1mfa2 bE1/bW2*) und dem diploiden Stamm FBD11 (*a1a2b1b2*). Zusätzlich wurden die Stämme AB31 (*a2 PcrG:bW2,bE1*) und AB32 (*a2 PcrG:bW2,bE2*), in denen eine kontrollierte Expression der *b*-Gene möglich ist, in Array-Minimalmedium untersucht. Dabei lassen sich in AB31 kompatible bzw. in AB32 inkompatible *b*-Allele durch den Arabinose-induzierbaren *crG1*-Promotor regulieren (Brachmann *et al.*, 2001). Die *b*-Allele wurden in AB31 und AB32 für insgesamt 12 h in Arabinosehaltigem Array-Minimalmedium induziert und anschließend die Zeitpunkte 5 h und 12 h für eine Analyse verwendet. Eine Untersuchung mittels quantitativer Real-Time-PCR ergab, dass eine Induktion von *biz1* nur in Stämmen mit kompatiblen bE/bW-Kombinationen und somit aktiviertem pathogenen Programm (Kreuzung FB1xFB2, SG200, FDB11 und AB31 – jedoch nicht in AB32, FB1, FB2) zu beobachten ist (Abb. 13B, C). Des Weiteren konnte eine schwache Induktion von *biz1* in AB31 bereits nach 5 h detektiert werden, die nach 12 h deutlich zunahm (Abb. 13B). Rbf1 ist für die Regulation von ca. 90 % aller b-regulierten Gene notwendig und stellt somit unterhalb von b einen zentralen Faktor der pathogenen Entwicklung dar (J. Kämper und M. Scherer, pers. Mitteilung). Um zu testen, ob *biz1* Rbf1-abhängig exprimiert wird, wurde die *biz1*-Expression im Stamm SG200 $\Delta$ *rbf1* analysiert. Dieser Stamm besitzt ein aktives bE/bW-Heterodimer, trägt aber eine *rbf1*-Deletion. Unter gleichen Bedingungen wie in SG200 konnte in SG200 $\Delta$ *rbf1* keine Expression von *biz1* nachgewiesen werden, woraus gefolgert werden kann, dass die *biz1*-Induktion abhängig von Rbf1 ist (Abb. 13C).

Im diploiden Stamm FBD12-3 (*a1a2b1b1*), der zwar kompatible *a*-Allele, jedoch inkompatible *b*-Allele besitzt und somit eine aktivierte Pheromonsignalkaskade hat, konnte keine *biz1*-Expression detektiert werden. Des Weiteren war *biz1* in FB1Fuz7DD, der eine aktivierte Form der MAPK-Kinase Fuz7DD

(Müller *et al.*, 2003) exprimiert und somit ebenfalls einem Stamm mit einer aktivierten Pheromonsignalkaskade entspricht, nicht detektierbar (Abb. 13C). Für *biz1* konnte weiterhin eine Expression während der gesamten biotrophen Phase beobachtet werden (Abb. 13D). Zusammenfassend lässt sich sagen, dass *biz1* unabhängig vom *a*-Paarungstyplocus, jedoch strikt abhängig von einem aktiven bE/bW-Heterodimer und *Rbf1* exprimiert wird. Die *on planta* detektierte b-abhängige Expression von *biz1* konnte somit auch in axenischer Kultur verifiziert werden.



**Abbildung 13: *biz1* ist b-abhängig reguliert.** **A.** Gezeigt sind die relativen Expressionswerte aus der DNA-Microarray-Analyse von der Blattoberfläche (16 h nach Infektion). *biz1* zeigte eine Expression nur im pathogenen SG200 auf der Pflanzenoberfläche. In FB1 und SG200Δb hatte die Expression einen „Absent call“, d.h. es konnten keine statistisch signifikanten Expressionswerte detektiert werden. De facto muss das Gen daher als „nicht exprimiert“ gelten. **B.** Real-Time-PCR-Analyse der *biz1*-Expression. Der Stamm AB31 exprimiert nach einem Wechsel der Medium-Kohlenstoffquelle von Glucose zu Arabinose ein aktives b-Heterodimer, wohingegen AB32 als Kontrollstamm dient und inkompatible *b*-Allele trägt. AB31 und AB32 wurden in Array-Minimalmedium mit Arabinose als Kohlenstoffquelle 12 h inkubiert. **C.** *biz1* wird nur in Stämmen, die ein aktives b-Heterodimer exprimieren, induziert; In SG200Δ*rbf1* war keine *biz1*-Expression detektierbar. Die Stämme FB1, FB2, FB1xFB2, FBD11, SG200, SG200Δ*rbf1* und FBD12-3 wurden für 48 h auf aktivkohlehaltigem CM-Glucose-Festmedium inkubiert, FB1Fuz7DD für 48 h auf aktivkohlehaltigem CM-Arabinose-Festmedium. Die Expressionsanalyse erfolgte mit Hilfe von Real-Time-PCR. **D.** Real-Time-PCR-Analyse der *biz1*-Expression in der Pflanze. Gesamt-RNA wurde zu den angegebenen Zeitpunkten extrahiert (T=Tage nach Infektion). *biz1* ist während der gesamten biotrophen Phase exprimiert. Das konstitutiv exprimierte *ppi*-Gen diente in allen Real-Time-PCR-Analysen als Kontrolle.



**Abbildung 14: Identifikation Biz1-abhängig regulierter Gene.** Durch eine Biz1-Überexpression in axenischer Kultur konnten insgesamt 239 Biz1-regulierte Gene identifiziert werden. Der Stamm AB32Pcrg1:biz1 wurde für 5 h in Array-Minimalmedium mit Arabinose als Kohlenstoffquelle inkubiert.

## 2.7 Biz1 induziert einen Teil der *on planta* differentiell regulierten Gene

Zur Identifikation und Analyse Biz1-abhängig regulierter Gene wurden DNA-Microarrays mit dem Stamm AB32Pcrg1:biz1 durchgeführt. Dieser Stamm trägt ein *biz1*-Allel unter der Kontrolle des Arabinose-induzierbaren *crg1*-Promoters (Bottin *et al.*, 1996). Nach einem Wechsel der Medium-Kohlenstoffquelle von Glukose zu Arabinose wird der *crg1*-Promoter induziert und erreicht nach 3 h bis 5 h seine maximale Expressionsstärke (Brachmann, 2001; M. Scherer, pers. Mitteilung). Aus diesem Grund wurde der Stamm AB32Pcrg1:biz1 für 5 h in Arabinosehaltigem Array-Minimalmedium induziert.

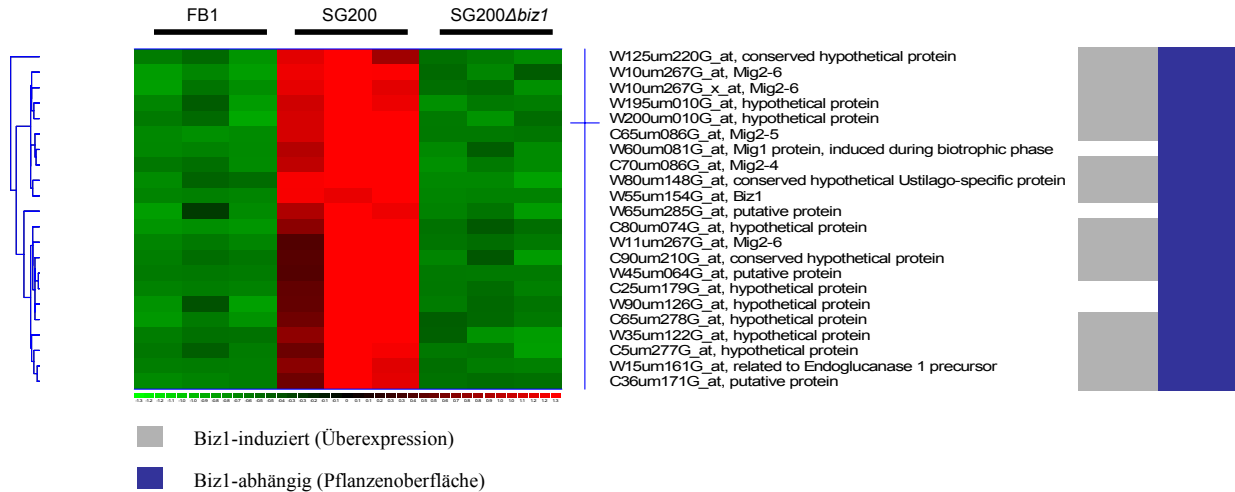
Zur Identifizierung Biz1-abhängig regulierter Gene, wurde das Expressionsprofil mit dem entsprechenden Kontrollstamm AB32 verglichen. Hierbei konnten insgesamt 239 differentiell regulierte Gene gefunden werden, die sich in ihrer Expression um den Faktor  $\geq 2$  verändern, wovon 129 hoch- und 110 runterreguliert wurden (Abb. 14). Erstaunlicherweise kodieren 53 % der stark induzierten Gene ( $>6$ -fach hochreguliert) für putativ sekretierte Proteine (TargetP-Prognose; Emanuelsson *et al.*, 2000; MUMDB), die keine Ähnlichkeit zu bekannten Proteinen aufweisen.

42 der Biz1-induzierten Gene sind ebenfalls auf der Pflanzenoberfläche in SG200 induziert. Dieses Ergebnis lässt vermuten, dass Biz1 die Expression dieser Gene auf der Pflanzenoberfläche reguliert. Um diese Vermutung experimentell zu bestätigen, wurden Maispflanzen mit dem Stamm SG200 $\Delta$ *biz1* infiziert und das Transkriptom mit dem von SG200 verglichen. Hierbei wurden solche Gene gefiltert, die über alle Bedingungen (SG200 16 h, SG200 $\Delta$ *biz1* 16 h) hinweg eine signifikante Variation in ihrer Expression aufwiesen. Dafür wurden die Parameter so gewählt, dass der Quotient aus Standardabweichung und Mittelwert der Expressionswerte eines Gens über alle Bedingungen hinweg größer war als 0,5 und kleiner als 10 (dChip; Li

und Hung Wong, 2001; Li und Wong, 2003). Die hieraus resultierende Liste wurde anschließend für eine hierarchische Clusterung verwendet. Hierbei wurde zusätzlich FB1 16 h in die Clusteranalyse miteinbezogen. Bei dieser Art der Expressionsanalyse werden die Gene mit dem ähnlichsten Expressionsmuster zunächst schrittweise zu Clustern zusammengefasst, und diese wiederum zu größeren Clustern zusammengefügt. Das Clustern folgt dabei den Methoden beschrieben in Golub *et al.* (1999) und Eisen *et al.* (1998). Hierbei konnte ein Genregulations-Cluster von 19 Genen identifiziert werden, die eine signifikante Reduktion ihrer Expression im SG200 $\Delta$ *biz1*-Stamm im Vergleich zu SG200 aufwiesen (Abb. 15). Im *biz1*-Deletionsstamm zeigten diese Gene ein Expressionsniveau, das vergleichbar war mit dem in FB1 (Tabelle 3). 15 dieser Gene kodieren für Proteine, die keine Ähnlichkeit zu bereits bekannten Proteinen aufweisen, und 11 hiervon werden nach TargetP-Prognose wahrscheinlich sekretiert (MUMDB). Interessanterweise zeigten 15 Gene dieses Regulationsclusters eine mehr als 2-fache Induktion nach Biz1-Überexpression in axenischer Kultur (Abb. 15). Diese Gruppe von 15 Genen, die nach Biz1-Überexpression induziert wurden und eine signifikante Reduktion ihrer Expression im SG200 $\Delta$ *biz1*-Stamm zeigten, werden im folgenden Text als strikt Biz1-abhängig bezeichnet.

Die Analyse des Expressionsprofils in SG200 $\Delta$ *biz1* ergab, dass Biz1 für die Regulation einiger der zuvor beschriebenen auf der Pflanzenoberfläche induzierten Gene verantwortlich ist. Des Weiteren scheint eine Überexpression von Biz1 ausreichend zu sein, um die Expression einiger dieser Gene ohne ein aktives bW/bE-Heterodimer und in Abwesenheit des Kontakts zur Pflanzenoberfläche zu aktivieren.

Die Gruppe der strikt Biz1-abhängigen Gene beinhaltet Kandidaten, deren Funktion Rückschlüsse auf die biologische Funktion bzw. Rolle von Biz1 während der pathogenen Entwicklung in *U. maydis* erlauben könnte.



**Abbildung 15: Hierarchische Clusterung Biz1-abhängiger Gene.** Gezeigt ist die hierarchische Cluster-Analyse der Biz1-abhängigen Gene auf der Pflanzenoberfläche. Maispflanzen wurden mit SG200Δbiz1 infiziert und das Transkriptom dieses Stammes mit dem von SG200 verglichen. Hierbei wurden durch Verwendung des Programms dChip die Gene herausgefiltert, die über alle Bedingungen (SG200 16 h, SG200Δbiz1 16 h) hinweg eine signifikante Variation in ihrer Expression aufwiesen (Li und Hung Wong, 2001; Li und Wong, 2003). Die resultierende Liste wurde anschließend für eine hierarchische Clusterung verwendet, wobei FB1 in die Analyse mit einbezogen wurde (Golub *et al.*, 1999; Eisen *et al.*, 1998). Es wurden 19 Gene identifiziert, die eine signifikante Reduktion ihrer Expression im SG200Δbiz1-Stamm im Vergleich zu SG200 aufwiesen. Die relative Expressionsstärke der Signale ist durch den im Bild dargestellten Farbcode gezeigt. Bei dieser Art der Darstellung (Eisen *et al.*, 1998) werden durch die rote Farbe Expressionswerte wiedergegeben, die über der durchschnittlichen Expression des Gens für alle Einzelexperimente liegen. Durch die grüne Farbe sind Expressionswerte wiedergegeben, die niedriger sind.



**Tabelle 3: Biz1-abhängige Gene auf der Pflanzenoberfläche**

Probeset	MUMDB <sup>1</sup>	Funktion/Annotation MUMDB	FBI		SG200/biz1		SG200	
			EW	SF	EW	SF	EW	SF
W125um220G_at	um06290	conserved hypothetical protein	42.2	5.1	42.5	2.9	193.2	24.3
W10um267G_at	um06126	Mig2-6	49.9	2.7	64.1	4.6	199.4	5.2
W10um267G_x_at	um06126	Mig2-6	70.3	5.4	78.6	5.2	243.9	12.9
W195um010G_at	um01241	hypothetical protein	11.7	5.0	10.7	1.8	113.6	9.7
W200um010G_at	um01240	hypothetical protein	21.4	4.3	22.8	2.7	112.5	6.0
C65um086G_at	um06181	Mig2-5	10.1	1.4	22.6	0.8	260.7	15.3
W60um081G_at	um03223	Mig1 protein, induced during biotrophic phase	5.6	0.8	9.0	4.7	125.7	12.0
C70um086G_at	um06180	Mig2-4	17.3	4.4	11.1	3.7	224.0	18.3
W80um148G_at	um00792	conserved hypothetical Ustilago-specific protein	28.3	3.2	20.6	2.3	127.1	1.7
W65um285G_at	um00501	putative protein	49.3	10.8	44.0	4.2	181.6	17.7
C80um074G_at	um01820	hypothetical protein	60.2	6.8	186.2	24.6	1252.4	170.4
W11um267G_at	um06126	Mig2-6	28.4	7.6	55.6	7.2	833.3	175.8
C90um210G_at	um02826	conserved hypothetical protein	45.7	1.6	43.3	6.6	161.6	25.7
W45um064G_at	um00628	putative protein	5.2	0.6	5.3	0.2	199.5	43.3
C25um179G_at	um01377	hypothetical protein	8.4	1.2	18.3	6.1	416.5	82.0
W90um126G_at	um02196	hypothetical protein	31.6	7.2	35.9	1.8	141.6	22.1
C65um278G_at	um04780	hypothetical protein	60.1	9.0	92.9	7.5	436.7	70.1
W35um122G_at	um01695	hypothetical protein	35.8	1.3	30.7	6.3	157.3	19.5
C5um277G_at	um05296	hypothetical protein	53.9	2.1	49.6	2.9	131.1	16.9
W15um161G_at	um02523	related to Endoglucanase I precursor	7.5	0.5	12.1	4.9	358.5	67.1
C36um171G_at	um00054	putative protein	85.4	5.4	117.8	3.0	714.3	137.0

**EW= Expressionswert; SF= Standardfehler; <sup>1</sup>MUMDB (<http://mips.gsf.de/genre/proj/ustilago/>)**

## 2.8 Systematische Analyse Biz1-regulierter Gene

Um die biologische Funktion der strikt Biz1-abhängig regulierten Gene während der pathogenen Entwicklung in *U. maydis* näher zu untersuchen, wurden zunächst für die in Tabelle 4 aufgelisteten Gene Deletionsmutanten erstellt, indem der offene Leserahmen vollständig durch homologe Integration einer Hygromyзин-Resistenzkassette ersetzt wurde (Material und Methoden). *mig2-4* und *mig2-5* sind Teil des *mig2*-Genclusters, welcher aus insgesamt 5 zueinander homologen Gene besteht, die spezifisch während der biotrophen Phase exprimiert werden (Basse *et al.*, 2002). Da weder die Deletion des *mig2*-Clusters noch die Doppeldeletion des *mig2*-Clusters und des *mig2-6*-Gens offensichtliche Phänotypen gegenüber dem Wildtyp hervorrufen (Basse *et al.*, 2002; Farfasing *et al.*, 2005), wurden die Gene von einer weiteren Analyse ausgeschlossen. Des Weiteren wurde *um00628* ausgeschlossen, da dieses Gen in einem unabhängigen Screen als putatives Kpp6-Zielgen identifiziert und bereits näher charakterisiert wurde (A. Mendoza, pers. Mitteilung). Alle Deletionsstämme wurden durch Southernblot-Analyse bestätigt. Angaben zu den einzelnen offenen Leserahmen, den hiervon abgeleiteten Proteinlängen und der putativen Lokalisierung der Proteine sind in Tabelle 4 zusammengefasst. Mit Ausnahme von *um04780* und *um05296* wird für alle abgeleiteten Proteine durch TargetP (MUMDB) vorhergesagt, dass sie sekretiert werden. Die erstellten Deletionsstämme wurden in Maisinfektionen auf Pathogenität getestet. Hierbei zeigte sich nur für SG200 $\Delta$ *um01695* (im folgenden SG200 $\Delta$ *pst1* genannt) ein Unterschied zum SG200-Ausgangsstamm. In diesem Fall konnte bei den infizierten Maispflanzen keine Tumorbildung beobachtet werden (Abb. 18C; Tabelle 4). Damit stellt SG200 $\Delta$ *pst1* einen interessanten Kandidaten für weitere Analysen dar.

**Tabelle 4: Systematische Deletionsanalyse strikt Biz1-abhängig regulierter Gene**

Probeset	MUMDB <sup>1</sup>	Funktion/Annotation MUMDB	ORE/Protein	Sekretiert (TargetP <sup>2</sup> )	<i>Ustilago maydis</i> -spezifisches Protein (MUMDB <sup>1</sup> )	Infizierte Pflanzen /Tumorbildung und bzw. oder verkümmerte Pflanzen in %
C36um171G_at	um00054	putative protein	1104 bp/368 AS	ja (RC=1)	ja	22/95
C65um278G_at	um04780	hypothetical protein	663 bp/221 AS	nein	ja	24/79
C80um074G_at	um01820	hypothetical protein	720 bp/240AS	ja (RC=2)	ja	22/95
C90um210G_at	um02826 <sup>3</sup>	conserved hypothetical protein	1197 bp/399AS	ja (RC=1)	nein <sup>4</sup>	20/90
W125um220G_at	um06290 <sup>5</sup>	conserved hypothetical protein	669 bp/223 AS	ja (RC=1)	nein	17/94
W15um161G_at	um02523 <sup>6</sup>	related to Endoglucanase I precursor	921 bp/307 AS	ja (RC=1)	nein <sup>7</sup>	17/94
W195um010G_at <sup>8</sup>	um01241	hypothetical protein	531 bp/177 AS	ja (RC=4)	ja	19/95
W200um010G_at <sup>8</sup>	um01240 <sup>9</sup>	hypothetical protein	837 bp/279 AS	ja (RC=1)	ja	19/95
W35um122G_at	um01695	hypothetical protein	2859 bp/953 AS	ja (RC=1)	ja	25/0
W80um148G_at	um00792 <sup>10</sup>	conserved hypothetical Ustilago-specific protein	522 bp/174 AS	ja (RC=1)	ja	23/100
C5um277	um05296 <sup>11</sup>	hypothetical protein	744 bp/248 AS	nein	ja	21/90

<sup>1</sup> MUMDB (<http://mips.gsf.de/genre/proj/ustilago/>)

<sup>2</sup> Angegeben ist die jeweilige von TargetP angegebene Verlässlichkeitsklasse RC (=Reliability Class; 1-5) für die Vorhersage, genaueres siehe (Emanuelsson *et al.*, 2000; MUMDB)

<sup>3</sup> Paralogs: um04682, 18.8%

<sup>4</sup> Das Protein um02826 zeigt eine Identität von 26,1 % zu dem hypothetischen Protein XP\_362921 aus *Magnaporthe grisea*

<sup>5</sup> Paralogs: um10816, 27.4%

<sup>6</sup> Paralogs: um06332, 30.3%; um04816, 20.8%

<sup>7</sup> um02523 kodiert für eine putative Endoglucanase

<sup>8</sup> um01240 und um01241 wurden durch ein Konstrukt deletiert, da beide Gene direkt nebeneinander liegen.

<sup>9</sup> Paralogs: um01239, 66.1%; um01238, 22.9%

<sup>10</sup> Paralogs: um00793, 25.8%

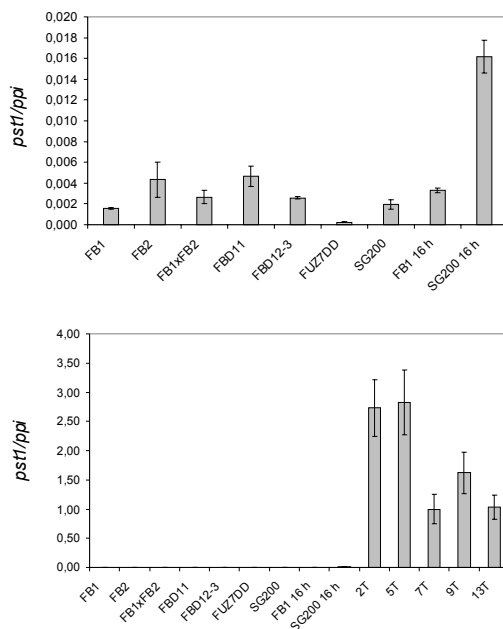
<sup>11</sup> Paralogs: um05295, 22.1%

## 2.9 *pst1* ist nur auf der Pflanze differentiell reguliert

Bei *pst1* (*um01695*) handelt es sich um ein Gen, das in axenischer Kultur durch Biz1-Überexpression induziert wird und auf der Pflanzenoberfläche strikt Biz1-abhängig exprimiert ist. *pst1* war in SG200 gegenüber FB1 nach 16 h auf der Blattoberfläche 4,4-fach in der Microarray-Analyse induziert. In einer quantitativen Real-Time-PCR-Analyse wurde eine 4,9-fache Induktion von *pst1* in SG200 gemessen (Abb. 16). Weitere Untersuchungen ergaben, dass *pst1* während der gesamten pathogenen Entwicklung (2-13 Tage nach Infektion) exprimiert wurde. Hier zeigte sich, dass *pst1* im Tumor 2 Tage nach Infektion (dpi) 169-fach im Vergleich zu SG200 auf der Pflanzenoberfläche induziert war (Tabelle 5). Interessanterweise konnte mittels quantitativer Real-Time-PCR-Analyse keine Induktion von *pst1* auf aktivkohlehaltigen CM-Medium in den Stämmen SG200, FDB11 und in einer Kreuzung von FB1xFB2 beobachtet werden (Abb. 16). An dieser Stelle kann darüber nur spekuliert werden, ob für die Induktion von *pst1* auf bzw. in der Pflanze z.B. ein zusätzliches Pflanzensignal oder ein weiterer erst auf der Pflanze induzierter Regulator notwendig ist.

Tabelle 5: Expressionsanalyse von *pst1* auf der Pflanzenoberfläche bzw. im Tumor

Stamm	x-fache Induktion
SG200 16 h vs FB1 16 h (Microarray)	4,4
SG200 16 h vs FB1 16 h (Real-Time-PCR)	4,9
SG200 16 h vs Tumor 2dpi (Real-Time-PCR)	169



**Abbildung 16: Real-Time-PCR-Analyse der *pst1*-Expression.** Eine Induktion von *pst1* konnte nur in SG200 auf der Pflanzenoberfläche detektiert werden (16 h). Eine differentielle Expression von *pst1* war unter axenischen Bedingungen weder in Stämmen mit aktivem *b*-Heterodimer, noch mit aktiviertem *a*-Locus zu verzeichnen (obere Abbildung). Die Stämme FB1, FB2, FB1xFB2, FBD11, SG200 und FBD12-3 wurden für 48 h auf aktivkohlehaltigen CM-Glucose-Festmedium inkubiert; FB1Fuz7DD für 48 h auf aktivkohlehaltigen CM-Arabinose-Festmedium. FB1 16 h und SG200 16 h wurden nach 16 Stunden von der Blattoberfläche geerntet. *pst1* zeigt eine starke Expression während der gesamten biotrophen Phase (untere Abbildung). Gesamt-RNA wurde zu den angegebenen Zeitpunkten extrahiert (T=Tage nach Infektion). Das konstitutiv exprimierte *ppi*-Gen diente in allen Real-Time-Analysen als Kontrolle.

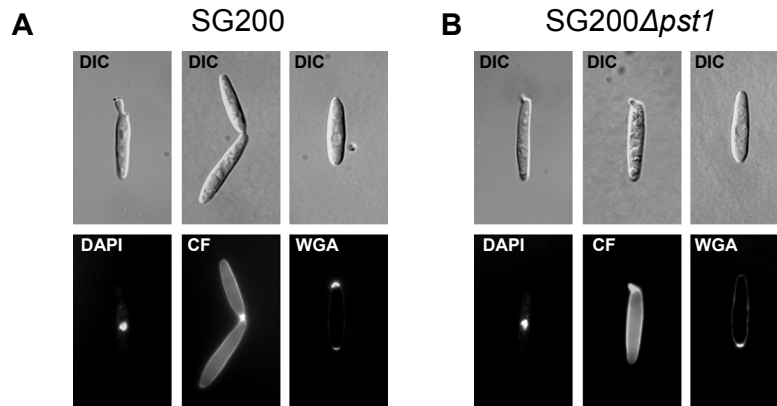
## 2.10 Pst1 ist essentiell für die pathogene Entwicklung von *U. maydis*

Für *pst1* wird ein offener Leserahmen von 2859 bp vorhergesagt und das hiervon abgeleitete Protein besitzt eine Länge von 953 AS (Tabelle 4). Mit Hilfe des Programms Blast2 (Altschul *et al.*, 1997) konnten keine Proteine mit signifikanter Ähnlichkeit zu Pst1 in den öffentlichen Datenbanken gefunden werden. Durch eine Analyse von Pst1 mit Prosite (Hulo *et al.*, 2006) konnte eine 263 AS-lange glycinreiche Region im Bereich 237-499 und eine glutaminreiche Sequenz von AS-Position 857 bis 933 identifiziert werden. Des Weiteren prognostizierte TargetP mit einer sehr hohen Verlässlichkeitsklasse RC=1 (Emanuelsson *et al.*, 2000), dass Pst1 sekretiert wird und eine Signalpeptid-Schnittstelle zwischen den Positionen 19 und 20 aufweist.

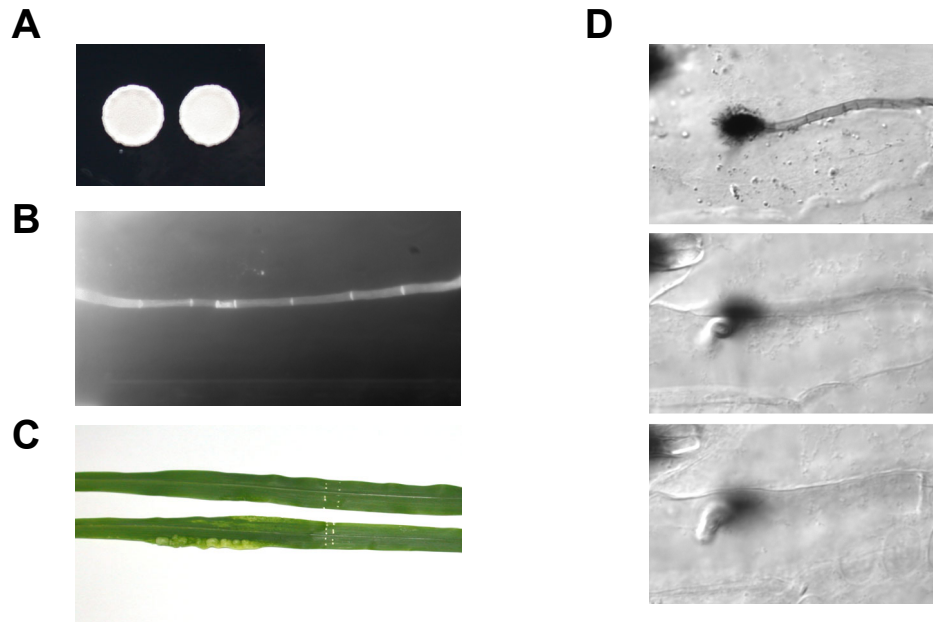
SG200 $\Delta$ *pst1* zeigte unter axenischen Bedingungen in Flüssigkultur keine erkennbaren Unterschiede zu SG200 im Wachstumsverhalten (nicht gezeigt) und in der Zellmorphologie (Abb. 17). Hinsichtlich der Fähigkeit von SG200 $\Delta$ *pst1* filamentös auf aktivkohlehaltigen Platten oder der Blattoberfläche zu wachsen, konnte ebenfalls keine Differenz zum SG200-Ausgangsstamm beobachtet werden (Abb. 18A, B). In Chlorazol-Black-E-Färbungen (Brachmann *et al.*, 2003) von infizierten Maisblättern zeigte sich jedoch, dass die vom SG200 $\Delta$ *pst1*-Stamm gebildeten Hyphen zwar in der Lage sind, Appressorien zu bilden und die Blattoberfläche zu penetrieren, aber offensichtlich kurz nach der Penetration das Wachstum arretieren (Abb. 18D). Invasives Wachstum und Proliferation der Deletionsmutante konnte selbst nach 9 Tagen nicht beobachtet werden.

An dieser Stelle muss angemerkt werden, dass am Ende dieser Doktorarbeit ein 3' cDNA Fragment von *pst1* sequenziert wurde. Basierend auf dieser Sequenz muss die Annotation von *pst1* in der MUMDB in Frage gestellt werden. Die ursprüngliche Annotation prognostizierte 3 Introns in der Sequenz von *pst1*. Tatsächlich scheint es sich aber um zwei offene Leserahmen zu handeln (Abb. 19). Nach der neuen Annotation kodiert *pst1* wahrscheinlich für ein Protein mit 511 AS und *pst2* für ein Protein mit 418 AS. Beide werden nach TargetP-Voraussage sekretiert (Emanuelsson *et al.*, 2000). Auf dem *U. maydis*-DNA-Microarray sind in dem Bereich zwei verschiedene Probesets vorhanden, und zwar w35um122G\_at (potenzieller 5'-ORF, *pst1*) und w37um122G\_at (potenzieller 3'-ORF, *pst2*). In der

Transkriptom-Analyse konnte eine Induktion in SG200 auf der Blattoberfläche nur mit dem Probeset w35um122G\_at detektiert werden. Jedoch wurde eine ähnlich hohe Induktion mittels Real-Time-PCR für *pst2* nachgewiesen, da die verwendeten RT-Primer am 3'-Ende des ursprünglichen *pst1*-ORFs liegen.



**Abbildung 17: Mikroskopische Analyse des Zellwachstums bei SG200 $\Delta$ *pst1*-Deletionsmutanten.** Die Abbildungen zeigen *in situ* DAPI-, Calcofluor White- und WGA-Färbungen von Zellen aus Flüssigkultur (CM-Glc). Bei *in situ*-Färbungen der Zellkerne mit DAPI zeigten SG200 $\Delta$ *pst1*-Mutanten (B) keinen Unterschied zu SG200-Zellen (A) im Bezug auf die Anzahl der Zellkerne pro Zelle. In Färbungen der Zellwand mit Calcofluor White konnte ebenfalls kein Unterschied in der Morphologie der Zellwand im Vergleich zu SG200 festgestellt werden. WGA-Färbungen zeigen Zonen starken Wachstums der Zellwand an den Polen wie in SG200.



**Abbildung 18: Charakterisierung der *pstI*-Deletionsmutante während der pathogenen Entwicklung.** **A.** zeigt die Filamentbildung des solopathogenen Stammes SG200 und des SG200*ΔpstI*-Stammes. Die Stämme wurden auf aktivkohlehaltigen CM-Mediumplatten aufgetropft und bei 24°C für 24 h inkubiert. Die Kolonien erscheinen bei Ausbildung von Filamenten wegen der luftgefüllten leeren Abschnitte weiß. **B.** Nach Infektion von Maispflanzen mit SG200*ΔpstI*-Stämmen, wurden 1 Tag nach Infektion durch eine Calcofluor White-Färbung die pilzlichen Hyphen im UV-Licht visualisiert. Es konnte filamentöses Wachstum auf der Blattoberfläche beobachtet werden. **C.** Maispflanzen wurden mit SG200 bzw. SG200*ΔpstI*-Stämmen infiziert. Sechs Tage nach der Infektion konnten in Infektionen mit SG200-Stämmen Tumore beobachtet werden, während Pflanzen, die mit SG200*ΔpstI*-Stämmen infiziert worden waren, keine Tumorbildung zeigten. Quantitative Analyse der Infektionsstudien: siehe Tabelle 4

**D.** Gezeigt ist eine Serie von Z-Achsen-Aufnahmen eines SG200*ΔpstI*-Filaments auf der Blattoberfläche. Pflanzen wurden mit SG200*ΔpstI*-Stämmen infiziert und pilzliches Material mit Hilfe von Chlorazol-Black-E-Färbungen sichtbar gemacht. SG200*ΔpstI*-Filamente waren in der Lage, Appressorien zu bilden und die Pflanzenkutikula zu penetrieren, jedoch ließ sich selbst nach 9 Tagen nur ein kurzes Filament innerhalb des Blattes erkennen.

```

1 ATG AAG GTT GCC CTG CTC TGT GCC ATC GTC TTC GGG GCC ATC TCT GTC GCT TCT TCC TCG CAT TAT GTG GCA 75
1 M K V A L L C A I V F G A I S V A A S S S S H Y V A 25
76 GAC GAG CAA TTC ATT CAA CGC GGT GTT CCC CAT GCT AGC GCC TCG AAA GCG AAG CGC GCC AAC GGC 150
26 D E Q F I Q R G V H R S S S A A G S K A K R D A N G 50
151 TCC AAA GTG GGA AAG AAG GAA CAT CTC TTG AAG CCT CGT GAC GAA ACT TCA GTA GTC AGG CTC GGC GTT GAT GCT 225
51 S K V G K K E H L L K P R D E T S V V R L G G V D A 75
226 CTC AAA GGA GCT CTT GGC GAT GGC GCC AAG GGT GGC GAG ACC ATA ATC AAC CAC TAT CAT GCG TCT CCG AAT GCA 300
76 L K G A L G D G A K G G E T I I N H Y H A S P N A 100
301 GCT GCA GCT CAT ATG CCT GGC GGC GCT CCT ATG AGC CAT CCC CCA GCT CCC TAC TAC CCG CCC CCG GCC TAC GGC 375
101 A A A H M P G G A P M S H P P A P Y Y F P P A A Y G 125
376 CAT GAT CCT GGC ATG GCT GCT AGA TTC GAC AAG CTC GAC CAG AAG CTT GGC AAG CTC AAA GGG CAC AAG GCC 450
126 H D P G M A A R F D K L D Q K L G K L K E G H K A 150
451 AAT GCA CAG CAG ATT CAG ATC ATG CAG GAG CTT CAG GCT AAA CAG ATG CAA ATT GCA CAT GCC GAG GCT TCT GGC 525
151 N A Q Q I Q I M Q E L Q A K Q M Q I A H A E A S G 175
526 GCC CAG GCT GCT GCT GCT GCT CCT GCT GCT AAG AAG CGC GGA ATG AGC AAG ACC AAA ATG GCC CTC CTG GGT 600
176 A Q A A A A V P A A A K K R R G M S K T K M A L L G 200
601 GGA GGT GGT CTT GCT GCT GGT TAT GGT CTC ACT AAA GTT TTT GAC ACC AAG CCT TCC GAC TCC ACT GCT GAC TAC 675
201 G G G L A A G Y T K V F D T K P S D S T A Y 225
676 AAC CAG CAG GAT ATG GCT GCG CTC CAG GCT GCA GGA GGC GCT GCT CCT GGC TCT ACC CCC GTC GAC GGC TAT CCT 750
226 N Q Q D M A A L Q A A G G A A P G S T F V D G Y F 250
751 CAA GGC GCA GAT CCA TCC CAG GGC GCC ATG CCG CAG GGC GCT GGT GGT CAA GAT CCT TCG GCA GGC GGA GCC GGT 825
251 Q G A D P S Q G A M P Q G A A Q G D P S A G G A G 275
826 GGC GGC TCT GCT CAG ATT GCA GGC GGA CCT TAC CGA ATT CCC GGC TCA GAC TTG GTC TGG GTC ACC GAT GCT CAA 900
276 G C S A Q I A D G F Y R I F G S D L V W V T D R Q 300
901 GGC CAA TAT CAC GTG CTG AAG TAC ACA CGC CAA GGT ATG GTA GAA GTA AAC CCA CCT GCT GGA TGG CAG CCG CCT 975
301 G Q Y H V L K Y T P Q G M V E V N P P A G W Q P P 325
976 TCC GCT GCT GGC AGC GGT GCT GCA CCT GGT ACC AGC GGT GGT GCT GGT CCT CTG GGC TCA GAC GGC AAG GCT 1050
326 S A A G S G A A P G T S G A G A P V A S D G S A 350
1051 GGA GCT TCT ACA GGG GCA GAT GGC GCA GCT GGC GGT GCA GGT TCA GCA GCC GGT GCT AAC CCT GTC CAA TCC GGT 1125
351 G A S T G A D G A A G G A G S A A G A N P V Q S G 375
1126 GAC AGC AGC TCT TCG GGT GCA GGC AAG GGT GCC GGT GGT CAG AAC CCA AAT GGT GCC AGC CAA GAT GCC CAG ACG 1200
376 D S S S S G A G K G A G G Q N P N G A S Q D A Q T 400
1201 GCT GGA GCA GCT GGA AAC CAG AGT GGC GGT AGT CCC AAG CCT GAA TAC GAT AGT CTT GCA GGC ATG TAC TAT GTT 1275
401 A C A A G N Q S G G S P F F E Y D S A A G H Y Y V 425
1276 GTT GGT CCC AAC AGC GTC AAG TAC TAC ATC GAT AGT CAG ACT GGC TAT TTG ATT AAC GCT AAC ACT GGC GAC GTC 1350
426 V G P N S V K Y Y I D S Q T G Y L I N A N T G D V 450
1351 AGC GAC CCC AAG ACT GGC AAG ATC GTG TAC AAG GCA GAA GAA TTG ATG AAT GGC GCC ACT GGA AAC GAC AAC GGT 1425
451 S D P K T G K I V Y S A E E L M N G A T G N D N G 475
1426 GCT GGT CAG GGC CAG AGC CAG GCC AAC GGC GGT GGG CAG TCG TCC GGT GCT GGA GCA GGA GCA GGA AAT GGG CGT 1500
476 A G Q G Q S Q A N G G G Q S S G A G A G A G A S N G R A 500
1501 ATG CAA AAG CGA TCC CTT CGC CAC CGC AAG gtatgacttttccctttgcccctttgccccttcaaacatgctgtaccagcgcctcaaaa 1590
501 M Q K R S L R H R K V 510
1591 ctgctgcaagctggctgttctcctgtttctcgaatgacaattctgagtgtgtccatctgctcttctgctgttaactcatctgtgctccacag CTC 1689
511 L 511
1690 GAC AAG CGT GAC TAC GCT AAT GCA GCC TTC CA gtgagtaccagccatcagccccagcttttatagatccatcaaacatgctccaccgt 1778
512 D K R D Y A N A A F Q 522
1779 aagccttgcttaataaacacag A C T TCA AGC CCC GCT TTG CTT GAA CAA GCA CAG CTT GCT CTT CTC CGA GGG CCA 1856
523 A S S P A L R E Q A Q L A L L R G P 540
1857 AAT CAG GCC AAC CCT GGG GCG CTC AGT GGT ACC GCT ACG AAA GCA GGC CCA GGT CTT GGC AAG ATG GCG GCC AAG 1931
541 N Q A N P G A L S G T A T K A G P G L G K M A A K 565
1932 GGA GCT CTA GGC GTG GGC GCC CTG GTA GCT CTT GTT CTC GGA CTC GGC GCG TAC GCT CAT CTT ACA CGA CCC AAT 2006
566 G A L G V G A L V A L V L G L G A Y A H P T R P N 590
2007 ACG ACA CCA GAC AAC GAG TAT GGT CTC ACA CCC ACA AGT GTC TGC GAC ATG TAT GGC GAG CCG ATC ATC CGA GAT 2081
591 T T P D N E Y G L T F T S V C D M Y G E F I I R D 615
2082 TTC CGT GGT GTG TTG TGG AAC AAG TCG ACA TAC ACG CCG GTC GAC CTG AAC CAT CCT CCG CCC CTT CAT CAA TGT 2156
616 F R G V L W N K S T Y T R V D L N H P F P L H Q C 640
2157 TCG GAG CAG GAG CTG GCT GAT GCT GGT GCT TCT GGT GGA GGT GCT GGT GGT GCT GCA CCG ATG CAG AAG CGT 2231
641 S E Q E L A D A G V S V G G G A G G A A P M Q K R 665
2232 GCT AGC AAA GAC AGA GAT GC ggtaagtacaggcctcggcttccgaagcaagtgtgctgagagctgactctttctgtacatgttgacctca 2324
666 A S K D R D A V S T G L G F R S K C V R E L T S L L Y M L T S 672
2325 atcca G CCT CAG GAC CGA CAG TTG CTT GCG GCC GTG AGG GAA AAC ATC AAT CAA GAG CAT CTC AGC AAA ACT TCG 2399
673 I Q P Q D R Q L L A A V R E N I N Q E H L S K T S 695
2400 AGT GTT GAG CTT TCA AAG CGA TCT GGA AGC AAC GAT CAG TCT CTG GAA AAG CGA GGT ATG GGA GTG ACT TCG 2474
696 S V E L S K R S G S N D Q S T L E A K R R G M S G V T S 720
2475 CTG CTA CCG TCG ATG ACA TCG GGT ACT ATG GCT GTT GGC GCC ACC CTC CTA CTC ATC ACG GGC ATC TAC CTC CAC 2549
721 L L P S M T T S S T M A V G A T L L I T A I Y L H 745
2550 AAT ATC CAT AAA GAA AAG CTC CAG GCG CTC AAG GAT CAA TGG AAT GGT CAA TAT CAC TCG GCC GGC GAC GCT GCT 2624
746 N I H K E K L Q A L K D Q W N G Q Y H S A G D A A 770
2625 TCT GCA GTG GGC AAC GCC ATC GAT ACT GGT GCC AAT GGA CAG CTT TTC AAC CCG ATT ACG GGC AAT CTT GCT CTT 2699
771 S A V G N A I D T G A N G Q L F N P I T G N L V L 795
2700 GTT GAC GCC ACC ACC AAC ATG TAC TAC GAC TCA GGG ACT GGT GAA CAG GTT AAC CCC AAG ACA GGA ATG CCC TTT 2774
796 V D A T T N M Y I D S G T G E Q V N P K T G M P F 820
2775 AAA TAT GGT GGA GGC GAC AAT AAT TCG TCG GAA TCG AGT GAT AAG CAG GCG GGT CAC CTT CCA CTC GAT CGC 2849
821 K Y G G G D N N S S S S D K Q A P V H L P L D R 845
2850 AAT GGC AAT ATG TCG GGC GAC TCG CCC GAG GTT CAG CAG GCC TTG GCA AAG TGG AAC ACA ATG TCG CCG CAG CAG 2924
846 N G N M S S D S P E V Q Q A L A K W N T M S F E Q Q 870
2925 CAG CAA CAG CTG TTG GCT CAA TAT GGT GAT GCC GCA AGC CAG ATC TTG AAC TCG CCC GAT CCA AAT GCT GCG CTG 2999
871 Q Q Q L L A Q Y G D A A S Q I L N S P D P N A A L 895
3000 CAA GCT TGG AGC GCA CAG GGT GCC GCA CAG CCG ATC GCC CCT CAA TTG ATA CCA CAA CAG CAG CAG TTG GCT 3074
896 Q A W S A Q Q G A A Q P I A P Q L I P Q Q Q L A 920
3075 CCT CAA CAA TAC CAG ACG CTA GTT CCT GGG CAG CAA CAG AGC CCA CCT GCT GGT GGT GCC TTC GGC TCT TCT 3149
921 F Q Q Y Q T L V F G Q Q Q S P F A S G G A F G S S 945
3150 GAC ACA GCA GCG ACA TCT GAC ATG TGA 3176
946 D T A A T S D M * 954

```

Abbildung 19: Annotation des *psl1*-Gens (*um0165*). Gezeigt ist die Annotation des *psl1* (*um0165*) Gens basierend auf der MUMDB-Annotation. Die Positionen der Nukleotide und Aminosäuren sind angegeben. Die Introns der MUMDB-Annotation sind durch Kleinschreibung gekennzeichnet. Die im Fettdruck dargestellten Nukleotide bezeichnen das isolierte 3' cDNA Fragment. Basierend auf dieser Sequenz wurde die Annotion geändert und der 5' Bereich als *psl1* (rot-gekennzeichnete Nukleotide) und der 3' Bereich als *psl2* (blau-gekennzeichnete Nukleotide) annotiert. Unterstrichen sind die potentiellen Signal-Peptide (TargetP-Prognose; Emanuelsson *et al.*, 2000). Nach der neuen Annotation kodiert *psl1* für ein Protein mit 511 AS und *psl2* für ein Protein mit 418 AS.

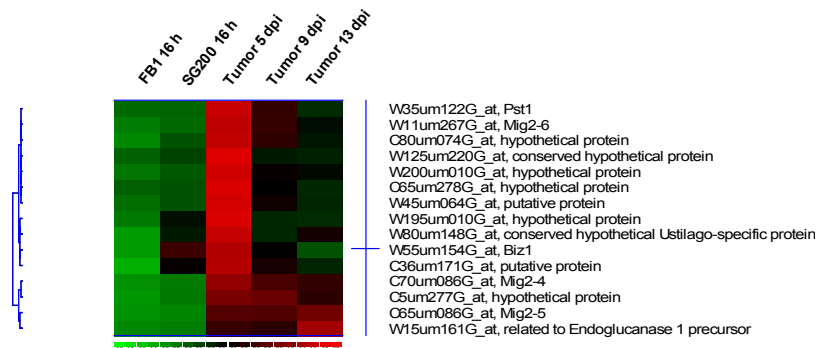


## 2.11 Transkriptom-Analyse von *U. maydis* während der pathogenen Entwicklung in der Pflanze

Durch eine Überexpression von Biz1 in axenischer Kultur konnten insgesamt 129 Biz1-abhängig induzierte Gene gefunden werden, von denen 42 ebenfalls eine Induktion auf der Pflanzenoberfläche zeigten. Um weitere putative Biz1-abhängig induzierte Gene, die in späteren Stadien exprimiert werden, zu identifizieren, wurde eine Transkriptom-Analyse von *U. maydis* zu den Zeitpunkten 5 Tage nach Infektion (dpi), 9 dpi und 13 dpi durchgeführt. Vorexperimente hatten ergeben, dass eine Hybridisierung von früheren Zeitpunkten, wie beispielsweise 2 dpi, aufgrund des relativ geringen pilzlichen Materials zu einer zu geringeren Sensitivität der Arrays führen könnte. Daher wurde die anschließende Analyse auf die oben angegebenen Zeitpunkte beschränkt. Zu diesem Zweck wurden Maispflanzen mit einer kompatiblen Mischung aus FB1 x FB2 infiziert und die Pflanzen bis zu den entsprechenden Zeitpunkten in einer Phytokammer inkubiert (Material und Methoden). Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden die an den Pflanzen induzierten Tumore geerntet und einer Microarray-Analyse unterzogen. Für die Zeitpunkte 5 dpi, 9 dpi und 13 dpi wurde jeweils Tumormaterial von mindestens drei verschiedenen Pflanzen zu einem biologischen Replikat zusammengegeben. Für 5 dpi und 9 dpi wurden drei biologische und für 13 dpi zwei biologische Replikate zur Analyse herangezogen. Die isolierte Gesamt-RNA wurde über das vorher schon beschriebene Zweischnitt-Amplifikations-Protokoll amplifiziert. Dadurch, dass dasselbe Protokoll verwendet wurde, war ein direkter Vergleich der *on planta* und *in planta* Arrays möglich.

Um Gene zu identifizieren, die zu mindestens einem Zeitpunkt während der pathogenen Entwicklung, also auf der Pflanzenoberfläche (FB1 und SG200) und zu den drei untersuchten Zeitpunkten 5 dpi, 9 dpi und 13 dpi in der Pflanze, differentiell reguliert waren, wurde eine Cluster-Analyse durchgeführt. Hierzu wurden zunächst mit Hilfe von dChip Gene herausgefiltert, die über alle Bedingungen hinweg eine signifikante Variation in ihrer Expression zeigten. Solche Gene, die innerhalb eines Zeitpunktes nicht in allen biologischen Replikaten einen „Present call“ aufwiesen, also statistisch signifikant nachweisbar waren, wurden manuell wieder entfernt

(Material und Methoden). Hierdurch wurden insgesamt 1288<sup>5</sup> differentiell regulierte Gene identifiziert. Bei einem Vergleich dieser Gene mit den strikt Biz1-abhängigen Genen stellte sich heraus, dass *um02826* unter diesen Bedingungen nicht mehr als differentiell reguliert herausgefiltert wurde. In der Cluster-Analyse ist zu erkennen, dass alle strikt Biz1-abhängigen Gene eine stärkere Expression im Tumor als auf der Pflanzenoberfläche zeigten (Abb. 20). 11 Gene zeigten ihre maximale Expression nach 5 Tagen, darunter auch *mig2-4*, und folgten somit dem Expressionsprofil von *biz1*. *mig2-5* zeigte hingegen eine relativ konstante Expression zu den Zeitpunkten 5, 9 und 13 dpi. Im Gegensatz hierzu wies die Endoglukanase *um02523* die höchste Expression 13 Tage nach Infektion auf.



**Abbildung 20: Hierarchische Clusterung der strikt Biz1-abhängigen Gene während der pathogenen Entwicklung.** Gezeigt ist die hierarchische Cluster-Analyse (Eisen *et al.*, 1998; Golub *et al.*, 1999) der strikt Biz1-abhängigen Gene während der pathogenen Entwicklung. Es wurden mit Hilfe von dChip die Gene herausgefiltert, die über alle Bedingungen (5 dpi, 9 dpi, 13 dpi) hinweg eine signifikante Änderung in ihrer Expression aufweisen (Li und Hung Wong, 2001; Li und Wong, 2003). Solche Gene, die innerhalb eines Zeitpunktes nicht in allen biologischen Replikaten einen „Present call“ aufwiesen, also statistisch signifikant nachweisbar waren, wurden manuell wieder entfernt. Bis auf *um02826* konnten alle strikt Biz1-abhängigen Gene wiedergefunden werden. Alle Gene zeigen in der biotrophen Phase eine stärkere Expression als auf der Pflanzenoberfläche. Die relative Expressionsstärke der Signale ist durch den im Bild dargestellten Farbcode gezeigt (Abb. 15)

Vergleicht man nun alle Gene, die nach einer Biz1-Überexpression in axenischer Kultur mehr als 2-fach induziert waren (129 Gene), mit den Genen, die eine differentielle Regulation während der gesamten pathogenen Entwicklung in *U. maydis* zeigten, konnten insgesamt 88 Gene identifiziert werden, die in beiden Datensätzen differentiell reguliert waren. Eine Clusterung dieser Gene ist in Abb. 21 dargestellt. Es lassen sich diverse Subcluster erkennen, die ihre maximale Expressionsstärke zu verschiedenen Stadien der pathogenen Entwicklung aufwiesen. Hier findet sich ein Subcluster von 4 Genen, die spezifisch im pathogenen SG200 auf der

<sup>5</sup> Hierbei handelt es sich um differentiell regulierte Probesets, da diese Analyse nur einen Zwischenschritt darstellt.

Pflanzenoberfläche eine maximale Expression zeigten, darunter auch *polX*. *polX* kodiert für eine putative DNA-Polymerase X, und es konnte gezeigt werden, dass *polX* ein frühes direkt b-reguliertes Gen ist, aber keine essentielle Rolle in der pathogenen Entwicklung von *U. maydis* spielt (Brachmann *et al.*, 2001). Interessanterweise zeigte ein Subcluster von 3 koregulierten Genen, die für eine putative Retikulin-Oxidase, einen putativen Glycerophosphoinositol-Transporter (Git1) und eine putative Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate-3-phosphatase (PTEN) kodieren, eine maximale Expression in FB1 auf der Pflanzenoberfläche. Dieser Subcluster war also während der pathogenen Entwicklung runterreguliert. Für Git1p in *S. cerevisiae* konnte gezeigt werden, dass das Protein Glycerophosphoinositol in die Zelle transportiert, und dass phosphat- oder inositol-limitierende Bedingungen die *GIT1*-Transkription induzieren und die Git1p-Aktivität erhöhen können (Almaguer *et al.*, 2004).

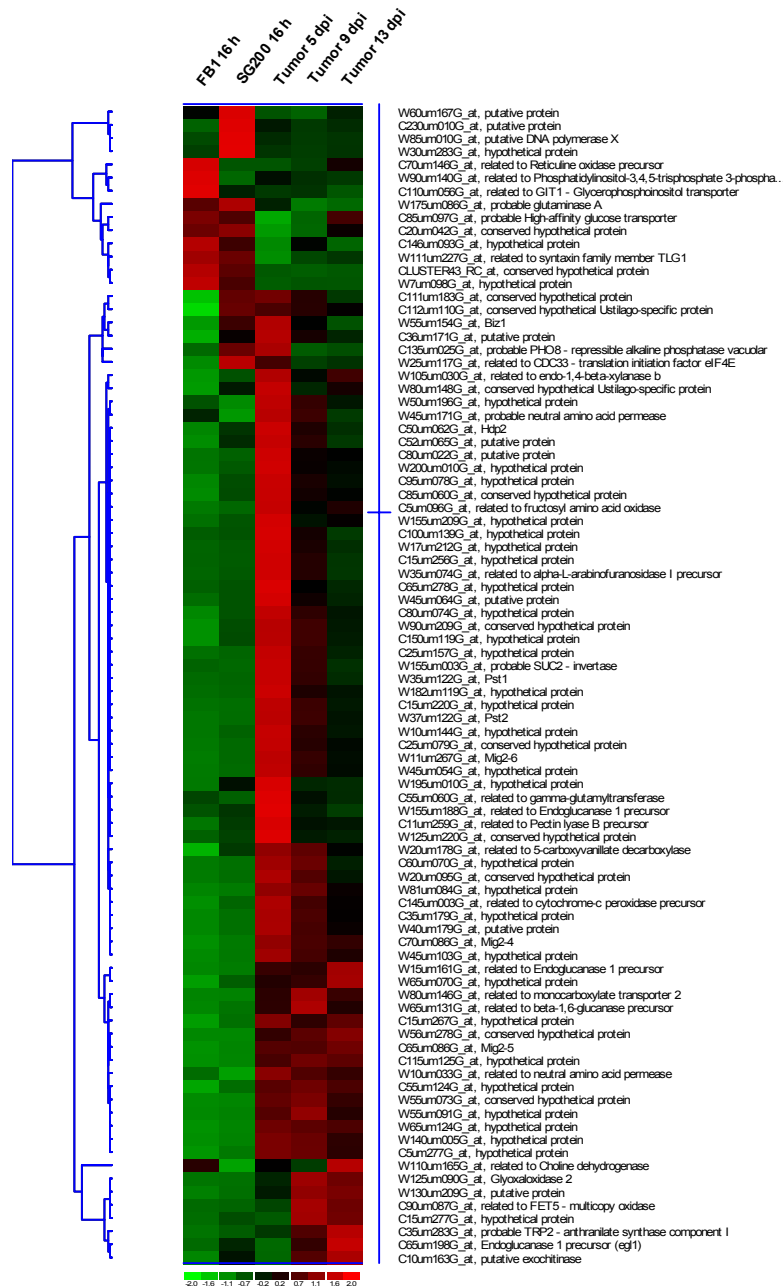
Den größten Subcluster bildete eine Gruppe von 45 Genen, die nach 5 Tagen ihre stärkste Expression aufwiesen. Darunter fanden sich neben *hdp2* verschiedene Gene, die für putative hydrolytische Enzyme kodieren, wie beispielsweise eine Endo-1,4- $\beta$ -Xylanase, eine Alpha-L-Arabinofuranosidase und eine Endoglukanase. Die größte Untergruppe in diesem Cluster bildeten jedoch 31 Gene, die für sekretierte Proteine kodieren. 19 dieser Proteine, darunter auch Pst1 und Pst2, zeigen keine Ähnlichkeit zu anderen Proteinen, die in Datenbanken hinterlegt sind (MUMDB).

In einem Subcluster, der zwischen 5 und 13 Tagen eine relativ gleichmäßige Expression verzeichnete, fanden sich neben dem *mig2-5* Gen (s.o.) noch weitere 3 koregulierte Gene die für sekretierte *Ustilago maydis*-spezifische Proteine kodieren.

Des Weiteren konnten Gene gefunden werden, die eine maximale Expression erst gegen Ende der pathogenen Entwicklung aufzeigten, dazu gehören beispielsweise *glo2*, welches für die Glyoxaloxidase 2 kodiert, *C90um087*, eine putative FET5-Oxidase, ein Gen für eine putative Exochitinase (*C10um163*) und die zwei Endoglukanasen *egl1* und *W15um161*. Sowohl für *glo2*, als auch für *egl1* ist bekannt, dass sie im Hinblick auf die Pathogenität in *U. maydis* keine Rolle spielen (Leuthner *et al.*, 2005; Schauwecker *et al.*, 1995).

Zusammengefasst lässt sich sagen, dass insgesamt 78 Gene identifiziert werden konnten, die sowohl in der Biz1-Überexpression induziert waren, als auch zu verschiedenen Zeitpunkten der pathogenen Entwicklung ein erhöhtes Transkriptionslevel zeigten, wohingegen 10 Gene während der pathogenen

Entwicklung niedriger oder ähnlich hoch exprimiert sind. An dieser Stelle lässt sich allerdings nur darüber spekulieren, ob Biz1 für die Regulation dieser Gene notwendig ist oder für einige nur eine „modulierende“ Rolle innehat.



**Abbildung 21: Hierarchische Clusterung der Biz1-induzierten Gene während der pathogenen Entwicklung.** Gezeigt ist die hierarchische Cluster-Analyse der Biz1-induzierten Gene während der gesamten pathogenen Entwicklung. Durch Verwendung von dChip wurden die Gene herausgefiltert, die über alle Bedingungen (5 dpi, 9 dpi, 13 dpi) hinweg eine signifikante Änderung in ihrer Expression aufweisen (Li und Hung Wong, 2001). Gene, die innerhalb eines Zeitpunktes nicht in allen biologischen Replikaten einen „Present call“ aufwiesen, also statistisch signifikant nachweisbar waren, wurden manuell wieder entfernt. Die hierbei identifizierten Gene wurden mit der Liste aller Biz1-induzierten Gene (axenische Kultur) abgeglichen und anschließend für eine hierarchische Clusterung verwendet (Golub *et al.*, 1999; Eisen *et al.*, 1998). Es lassen sich diverse Subcluster erkennen, die ihre maximale Expressionsstärke zu verschiedenen Stadien der pathogenen Entwicklung aufwiesen (Näheres siehe Text). Die relative Expressionsstärke ist durch den im Bild dargestellten Farbcode gezeigt (Abb. 15)

### 3 Diskussion

#### 3.1 Auswahl der Stämme für die Transkriptom-Analyse auf der Pflanzenoberfläche

Zur Analyse der Gene, die während der pathogenen Entwicklung auf der Pflanzenoberfläche induziert waren, wurden der nicht-pathogene, saprophytisch wachsende Stamm FB1 und der solopathogene Stamm SG200 verwendet. SG200 ist ein FB1-Derivat, enthält aber zusätzlich eine kompatible *bE1/bW2*-Kombination und das *mfa2*-Gen. Diese Modifikationen führen dazu, dass SG200 ein pathogenes Filament unabhängig von einem Kreuzungspartner bilden kann (Bölker *et al.*, 1995). Dadurch, dass SG200 sowohl über einen aktiven *a*-Locus, als auch einen aktiven *b*-Locus verfügt, spiegelt er die Situation nach der Kreuzung von kompatiblen Sporidien wider. Im Vergleich zur Kreuzung sollte jedoch bei Verwendung des solopathogenen Stammes ein synchroneres Erfassen der Veränderungen im Transkriptionsprofil auf der Blattoberfläche möglich sein. Um eine Differenzierung in (1) Gene, die nur durch einen aktiven *a*-Locus induziert werden, und (2) Gene, die sowohl durch den *a*-Locus als auch durch den *b*-Locus induziert werden, zu ermöglichen, wurde als weitere Kontrolle der Stamm SG200 $\Delta$ *b* generiert und in die Analyse mit einbezogen. Die Untersuchung strikt *b*-abhängiger Prozesse wäre prinzipiell auch durch Verwendung des Stammes CL13 möglich. CL13 ist ähnlich wie SG200 ebenfalls ein solopathogener Stamm, der allerdings ausschließlich eine kompatible *bE1/bW2*-Kombination trägt. Im Gegensatz zu SG200 wird der *a*-Locus also nicht über ein kompatibles Pheromon induziert. Da CL13 jedoch im Vergleich zu SG200 eine stark reduzierte Virulenz aufweist (R. Kahmann, pers. Mitteilung), wurde er nicht in die Untersuchungen mit einbezogen.

### 3.2 b-regulierte Gene auf der Pflanzenoberfläche

Insgesamt wurden beim Vergleich der Transkriptome von SG200 und SG200 $\Delta$ b im Vergleich zu FB1 418 Gene identifiziert, die ihre Expression in Abhängigkeit des aktiven *a*-Paarungstyplocus allein oder beider Paarungstyploci (*a* und *b*) auf der Blattoberfläche um den Faktor  $\geq 2$  verändern. Von diesen waren 206 hoch- und 212 Gene runterreguliert. 91 Gene zeigten eine differentielle Regulation nur in SG200 $\Delta$ b, sind demzufolge also wahrscheinlich spezifisch für pheromonstimulierte Zellen auf der Pflanzenoberfläche (Tabelle 6). Unter den Genen, die in SG200 $\Delta$ b induziert waren, befanden sich solche, für die zuvor schon eine *a*-abhängige Induktion beschrieben wurde. Hierzu zählen beispielsweise die Gene für den Pheromonrezeptor *Pra1* und das Pheromonvorläuferprotein *Mfa1* (Hartmann *et al.*, 1996; Urban *et al.*, 1996) oder den zentralen Transkriptionsfaktor der Pheromonantwort *Prf1* (Hartmann *et al.*, 1996). 184 Gene sind gleichermaßen in SG200 $\Delta$ b als auch in SG200 hoch- bzw. runterreguliert, wohingegen 143 Gene nur in SG200 differentiiell reguliert waren. Der Befund, dass eine differentielle Regulation von *mfa1*, *pra1* und *prf1* in SG200 nicht zu beobachten war, lässt die Schlussfolgerung zu, dass in diesem Stamm die *a*-abhängige Regulation reprimiert ist. Die in SG200 differentiiell regulierten Gene stellen somit höchstwahrscheinlich b-regulierte Gene dar. Für die Gene, die in SG200 $\Delta$ b und SG200 in ähnlicher Weise differentiiell reguliert waren, kann sowohl eine *a*-, als auch b-abhängige Regulation angenommen werden.

**Tabelle 6: Differentielle Genregulation in SG200 und SG200 $\Delta$**

Regulation	<i>a</i> -reguliert (nur in SG200 $\Delta$ b)	<i>a</i> - und b-reguliert (SG200 und SG200 $\Delta$ b)	b-reguliert (nur in SG200)
$\geq 2$ fach induziert	59 Gene	54 Gene	93 Gene
$\geq 2$ fach reprimiert	32 Gene	130 Gene	50 Gene

Während des filamentösen Wachstums auf der Pflanzenoberfläche kann eine Art „Matrix“ beobachtet werden, welche die Filamente umgibt und zwischen den Hyphen und der Pflanzenoberfläche abgelagert wird. Es wird vermutet, dass diese Matrix dem Pilz eine bessere Anheftung an die Oberfläche ermöglicht (Snetselaar und Mims, 1993; K. Snetselaar, pers. Mitteilung). Interessanterweise kodieren 20 Gene, die in SG200 $\Delta$ b induziert waren, für Proteine, die keine Ähnlichkeit zu bereits bekannten Proteinen in den Datenbanken aufweisen. Alle sind nach TargetP-Prognose (Emanuelsson *et al.*, 2000; MUMDB) sekretiert. Es ist vorstellbar, dass einige dieser Proteine Bestandteil der zuvor beschriebenen Matrix sind, oder an deren Bildung beteiligt sind und damit eine Rolle bei der Adhäsion der Konjugationshyphen spielen.

Des Weiteren fanden sich unter den in SG200 $\Delta$ b induzierten Genen 5, die für putativ zellwandabbauende Enzyme kodieren: drei Endoglukanasen (um02523, um04816 und *egl1*), eine Alpha-L-Arabinofuranosidase (um01829), und eine Endo-1,4- $\beta$ -Xylanase (um04422). Diese Enzyme könnten als Bestandteil der Matrix, welche die Filamente bzw. Konjugationshyphen umgibt, die Adhäsion unterstützen. Ähnliches wird in *Colletotrichum graminicola* diskutiert. Hier erfolgt zwar die Penetration über den Aufbau eines hohen Turgordruckes, es wird aber vermutet, dass lytische Enzyme die Anheftung der Sporen an die Blattoberfläche und anschließende Penetration unterstützen (Pascholati *et al.*, 1993). An dieser Stelle kann jedoch darüber nur spekuliert werden, ob die auf der Blattoberfläche beobachteten Filamente, die durch SG200 $\Delta$ b gebildet werden, Konjugationshyphen entsprechen, da für FB1 ebenfalls filamentöses Wachstum auf der Blattoberfläche beobachtet werden konnte. Es wäre durchaus vorstellbar, dass die Filamentbildung in SG200 $\Delta$ b, wie auch in FB1 durch Faktoren wie Stickstoffmangel oder niedrigen pH-Wert induziert wird (Kernkamp, 1939; Ruiz-Herrera *et al.*, 1995).

Von den 147 Genen, die in SG200 hochreguliert waren, kodieren 38 für putativ sekretierte Proteine ohne Ähnlichkeit zu bereits bekannten Proteinen, von denen 18 bereits *a*-abhängig induziert sind (s.o.). Auch für die 5 zellwandabbauenden Enzyme (s.o.) konnte eine Induktion im pathogenen *b*-abhängigen Filament beobachtet werden. Es ist nicht auszuschließen, dass auch solche Gene, die bereits *a*-induziert sind und im *b*-abhängigen Filament ebenfalls exprimiert werden, Pathogenitäts- bzw. Virulenzfaktoren darstellen. So ist durchaus vorstellbar, dass einige dieser beschriebenen Proteine der Filamentanheftung dienen, zum Anderen könnten sie aber auch wichtige Funktionen in der pathogenen Entwicklung von *U. maydis* erfüllen. Die

in SG200 induzierten sekretierten Proteine könnten eine Rolle in der Anheftung der Appressorien, bzw. während der Penetration spielen, oder aber auch an der Perzeption putativer Pflanzensignale beteiligt sein. Auch eine Rolle in der Suppression der Pflanzenabwehr ist denkbar.

Aus einigen pflanzenpathogenen Pilzen ist bekannt, dass für die Ausbildung von Appressorien die Perzeption eines spezifischen Signals der Wirtspflanze notwendig ist. Im Rostpilz *Uromyces appendiculatus* beispielsweise wird die Appressorienbildung durch die Oberflächenstruktur des Blattes induziert. Hier dient also die physikalische Beschaffenheit des Blattes als Signal zur Appressorienbildung (Hoch *et al.*, 1987). Ähnliches ist für *Magnaporthe grisea* beschrieben, wo die Festigkeit und die Hydrophobizität der Oberfläche eine wichtige Rolle in der Appressorienbildung spielen (Jelitto *et al.*, 1994; Lee und Dean, 1994). In *Colletotrichum gloeosporioides* wird die Appressorienbildung über die chemische Zusammensetzung des Oberflächenwachses induziert (Podila *et al.*, 1993). Es wird diskutiert, dass für die Ausbildung von Appressorien in *U. maydis* ebenfalls die Perzeption eines Pflanzensignals notwendig ist (zusammengefasst in Kahmann und Kämper, 2004). Es kann daher nicht ausgeschlossen werden, dass einige der Pathogen-spezifisch exprimierten Proteine an der Erkennung eines solchen Pflanzensignals beteiligt sind.

In *U. maydis* sind die Appressorien nur als Anschwellung der Hyphenspitze zu erkennen, und das Appressorium wird vor der Penetration nicht durch ein Septum von der Hyphe getrennt. Es gibt ebenfalls keinen Hinweis auf eine Melanisierung des Appressoriums. Damit unterscheiden sich die *U. maydis*-Appressorien von den Appressorien von *M. grisea* und *C. graminicola*, bei denen mittels eines hohen Turgordruckes die Pflanzenoberfläche penetriert wird (de Jonge *et al.*, 1997; Bechinger *et al.*, 1999). In *U. maydis* hingegen wird eine Penetration basierend auf der Sekretion von zellwandabbauenden Enzymen diskutiert. Unterstützt wird diese Vermutung einerseits durch die im Gegensatz zu den Penetrationshyphen von *M. grisea* und *C. graminicola* relativ breite penetrierende Hyphe, die von *U. maydis* gebildet wird (Snetselaar und Mims, 1992; Snetselaar und Mims, 1993), und andererseits durch die Beobachtung, dass nach erfolgter Penetration Zytoplasma sowohl in Hyphen auf der Pflanzeoberfläche als auch im bereits penetrierten Filament zu sehen ist (zusammengefasst in Kahmann und Kämper, 2004; Schirawski *et al.*, 2005). Bei den Appressorien im engeren Sinne wird zur Hyphe eine Zellwand ausgebildet. Es könnte daher sein, dass die in SG200 induzierten sekretierten Proteine



eine Rolle in der Perzeption eines putativen Pflanzensignals spielen, oder als Komponenten einer extrazellulären Matrix in der Anheftung der Hyphen bzw. Appressorien beteiligt sind. Auch eine Involvierung der induzierten lytischen Enzyme an der Adhäsion von Filamenten und Appressorien an der Blattoberfläche, sowie der anschließenden Penetration ist nicht auszuschließen.

In der Analyse der Transkriptomte von SG200 und SG200*Ab* hatte sich gezeigt, dass 54 Gene in beiden gleichermaßen induziert waren (Tabelle 6). Es ist möglich, dass diese Regulation über den Transkriptionsfaktor Rbfl1 abläuft. Rbfl1 nimmt in der b-vermittelten Regulationskaskade eine zentrale Rolle ein, da ca. 90 % der b-regulierten Gene in ihrer Expression abhängig von Rbfl1 sind. Dies manifestiert sich in *rbfl1*-Deletionsmutanten in einen kompletten Verlust der Pathogenität (J. Kämper und M. Scherer, pers. Mitteilung). *rbfl1* wird in axenischer Kultur sowohl durch *a* (Eichhorn, 2004; K. Zarnack, pers. Mitteilung) als auch durch b induziert, und diese Regulation konnte auch auf der Blattoberfläche beobachtet werden. Für eine Rbfl1-abhängige Regulation der Gene, die auf der Blattoberfläche sowohl in SG200 als auch in SG200*Ab* induziert sind, spricht der Befund aus DNA-Microarray-Analysen von SG200*Arbfl1*-Stämmen, dass ca. 60 % dieser 54 Gene (Tabelle 6) nicht mehr reguliert sind (M. Scherer, pers. Mitteilung).

Zellen, die mit kompatibelem Pheromon stimuliert werden, arretieren ihren Zellzyklus in Vorbereitung auf die bevorstehende Zellfusion in der G2-Phase (Garcia-Muse *et al.*, 2003). Da eine Induktion von *rbfl1* ebenfalls zu einem Zellzyklusarrest in der G2-Phase führt (M. Scherer, und J. Pérez-Martín, pers. Mitteilung), könnte Rbfl1 sowohl bei der Etablierung des *a*- als auch des b-abhängigen Zellzyklusarrests eine wichtige Rolle zukommen. Über die Funktion, die Rbfl1 während der Pheromonantwort innehat, kann allerdings bislang nur spekuliert werden, da *rbfl1*-Deletionsstämme keinen sichtbaren Defekt in der Ausbildung von Konjugationshyphen zeigen (J. Kämper und M. Scherer, pers. Mitteilung). Es ist bekannt, dass Rbfl1 die Expression von *hdp1* aktiviert, welches wiederum als Repressor für das Gen des B-Typ-Zyklins *Clb1* wirkt. Die Repression von *clb1* führt zu einem Zellzyklusarrest in der G2-Phase (J. Kämper und C. Pothiratana, pers. Mitteilung). *hdp1* zeigt wie *rbfl1* auf der Blattoberfläche eine Induktion in SG200*Ab* und SG200. Daher es ist durchaus vorstellbar, dass Rbfl1 und Hdp1 in der Aufrechterhaltung des Zellzyklusarrests in der G2-Phase während der Transition von

pheromon- zu b-induziertem G2-Zellzyklusarrest eine Rolle spielen könnte (I. Flor-Parra und J. Pérez-Martín, pers. Mitteilung).

### 3.3 Regulation von *biz1*

Auf der Pflanzenoberfläche konnten insgesamt fünf b-abhängig induzierte Transkriptionsfaktoren identifiziert werden. Hierbei zeigte sich, dass *hdp1* und *rbf1* sowohl a- als b-abhängig induziert waren, wohingegen *biz1*, *um02389* und *hdp2* eine strikt b-abhängige Regulation aufwiesen. *biz1* wurde auch in axenischer Kultur nur in Stämmen mit einem aktiven bE/bW-Heterodimer nachgewiesen. Da eine *biz1*-Expression weder in pheromonstimulierten Zellen (FBD12), noch in Zellen mit konstitutiv aktiver Pheromonsignalkaskade (FB1Fuz7DD) detektierbar war, kann eine a-abhängige Expression ausgeschlossen werden.

Die bekannten, direkt b-regulierten Gene *lga2*, *polX*, *dik6* werden bereits etwa 1-2 h nach b-Induktion exprimiert. Hieraus wurde geschlossen, dass die spät b-induzierten Gene, u.a. *egl1* und *rep1*, wahrscheinlich indirekt durch das bE/bW-Heterodimer reguliert werden (Brachmann *et al.*, 2001; Romeis *et al.*, 2000; Weinzierl, 2001). Sowohl die späte Expression von *biz1* in AB31, als auch der Befund, dass die Expression von *biz1* Rbf1-abhängig ist, spricht für eine solche indirekte Regulation durch b. Microarray-Analysen zeigten jedoch, dass die Expression von *rbf1* nicht hinreichend zu sein scheint, um eine *biz1*-Induktion in der Abwesenheit eines aktiven bE/bW-Heterodimers zu ermöglichen (M. Scherer, pers. Mitteilung). Für die Expression von *biz1* scheint sowohl ein aktives bE/bW-Heterodimer, als auch Rbf1 notwendig zu sein, da weder b noch Rbf1 alleine für eine *biz1*-Induktion ausreichend sind. Es wäre möglich, dass b und Rbf1 kooperativ an den *biz1*-Promoter binden und die Transkription initiieren. In *Saccharomyces cerevisiae* binden Ste12p und Tec1p kooperativ an sogenannte FREs (filamentation and invasion response element), um die Expression von Genen, die an haploidem invasivem Wachstum und an diploidem pseudohyphalem Wachstum beteiligt sind, synergistisch zu initiieren (Madhani und Fink, 1997). Zum anderen wäre aber auch denkbar, dass Rbf1 für die Induktion von *biz1* einen weiteren Koaktivator benötigt, der wiederum durch ein aktives bE/bW-Heterodimer reguliert wird. Bislang sind keine Rbf1-Bindestellen bekannt

(M. Scherer und J. Kämper, pers. Mitteilung), jedoch lassen sich im Promotor von *biz1* zwei putative b-Bindestellen identifizieren (Abb. 22), die allerdings im Vergleich zu den beiden b-Bindestellen von *frb52* und *lga2* mit -1651 und -1802 relativ weit stromaufwärts vom postulierten Translationsstartpunkt entfernt liegen. Allerdings ist das divergent zu *biz1* liegende Gen *um02550* mit 3386 bp im Vergleich zu anderen *U. maydis* Genen überdurchschnittlich weit entfernt; da dieses Gen auch nicht b-reguliert ist (M. Scherer, pers. Mitteilung), könnten die b-Bindestellen funktionelle *cis*-Elemente im *biz1*-Promotor darstellen. Weitere Analysen wie beispielsweise Promotor-Deletionen oder Gelretardationsexperimente mit dem *biz1*-Promoter und Rbf1 bzw. einem bE-bW-Fusionsprotein (Romeis *et al.*, 2000) sind allerdings notwendig, um einen näheren Einblick in die Regulation von *biz1* zu erhalten.

<i>frb52</i> <sub>-233</sub>	G	A	A	T	G	A	T	C	A	G	C	A	G	A	A	T	G	A	C	A	C	G	C	T	T	G
<i>lga2</i> <sub>-155</sub>	T	C	A	T	G	A	T	G	A	G	A	A	G	T	G	T	G	A	C	A	G	A	C	T	G	T
<i>biz1</i> <sub>-1651</sub>	T	A	G	T	G	A	T	G	A	A	A	T	T	G	A	T	G	A	A	A	G	C	C	C	G	A
<i>biz1</i> <sub>-1802</sub>	T	T	G	T	G	A	T	T	G	G	C	G	A	G	A	T	G	A	G	G	T	C	C	T	T	C

**Abbildung 22: Alignment putativer b-Bindestellen.** Gezeigt ist das Alignment putativer b-Bindestellen im *biz1*-Promoter mit den b-Bindestellen der Promotoren aus *lga2* und *frb52* (Romeis *et al.*, 2000; Brachmann *et al.* 2001). Die Zahlen geben die relative Position zum Translationsstartpunkt an. Grau hinterlegt sind identische Nukleotide.

### 3.4 *biz1* kodiert für einen potentiellen Transkriptionsfaktor

Biz1 enthält laut PSORT-Prognose eine NLS im N-terminalen Teil zwischen Aminosäure 145 und 150. Übereinstimmend mit dieser Voraussage konnte für Biz1 mit Hilfe eines funktionellen Biz1::eGFP-Fusionsproteins eine Lokalisierung im Zellkern gezeigt werden (Vraneš *et al.*, 2006). Des Weiteren enthält Biz1 zwei C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>-Zinkfingerdomänen, die zu den häufigsten DNA-Bindemotiven in Eukaryoten gehören (zusammengefasst in Papworth *et al.*, 2006). Während die zweite Zinkfingerdomäne Zf2 der Zinkfinger-Konsensussequenz CX<sub>2-4</sub>CX<sub>12</sub>HX<sub>3-5</sub>H entspricht (Jacobs, 1992), fehlt im Loop der ersten Domäne Zf1 zwischen den beiden Cysteinen eine Aminosäure. Die Zinkfingerdomäne, bestehend aus zwei β-

Faltblättern und einer  $\alpha$ -Helix, faltet sich in Gegenwart eines Zinkions zu einer kompakten Struktur. Dabei wird das Zinkion ( $Zn^{2+}$ ) zwischen den konservierten Cystein- und Histidinresten gebunden (Frankel *et al.*, 1987; Lee *et al.*, 1989; Pavletich und Pabo, 1991). Die  $C_2H_2$ -Zinkfingerdomäne wurde erstmalig in dem Transkriptionsfaktor TFIIIA aus *Xenopus laevis* beschrieben (Miller *et al.*, 1985), der für die Regulation der Transkription der 5S ribosomalen RNA Gene verantwortlich ist (zusammengefasst in Shastry, 1996). Es ist eine Vielzahl an  $C_2H_2$ -Transkriptionsfaktoren bekannt, die an der Regulation wichtiger Differenzierungs- und Wachstumsprozesse beteiligt sind. Hierzu zählen in erster Linie die  $C_2H_2$ -Zinkfinger der Sp1- und Krüppel-ähnlichen Transkriptionsfaktoren, die sich in verschiedenen Spezies wie beispielsweise *Caenorhabditis elegans*, *Xenopus laevis*, *Drosophila melanogaster*, der Maus, oder dem Menschen finden lassen. So wird beispielsweise Sp1 in murinen Zellen ubiquitär exprimiert, und die Deletion dieses Gens führt zu gravierenden morphologischen Defekten in der frühen Embryonalentwicklung (Marin *et al.*, 1997). Im Gegensatz hierzu zeigen KLF1 und KLF2 eine gewebe- bzw. zellspezifische Expression. KLF1 spielt eine Rolle während der Erythropoese (Nuez *et al.*, 1995; Perkins *et al.*, 1995), während KLF2 spezifisch an der T-Zellaktivierung beteiligt ist (Kuo *et al.*, 1997). Neben den  $C_2H_2$ -Zinkfingerdomänen enthält Biz1 auch eine glutaminreiche Domäne, die, wie von Sp1 oder Oct1 bekannt ist (Escher *et al.*, 2000), Transkriptionsaktivierung vermitteln könnte. Die glutaminreiche Sequenz aus Sp1 interagiert mit Komponenten des Transkriptionsfaktors TAFII130, um die Transkription zu initiieren (Gill *et al.*, 1994). In der Literatur lassen sich nur wenige Beispiele finden, in denen Transkriptionsfaktoren als Regulatoren der Pathogenität bzw. Virulenz in phytopathogenen Pilzen beschrieben wurden. In *Fusarium oxysporum* wird die Virulenz durch PacC, einem konservierten  $C_2H_2$ -Transkriptionsfaktor, der an der pH-abhängigen Gen-Regulation beteiligt ist, reguliert. Eine Deletion von *pacC* führte zu einer geringen, aber signifikanten Steigerung der Virulenz. Daher nimmt man an, dass PacC Gene reprimiert, die durch ein saures Milieu induziert werden und eine wichtige Rolle für die Pathogenität spielen (Caracuel *et al.*, 2003). In *Claviceps purpurea* ist der CREB-ähnliche bZIP-Transkriptionsfaktor CPTF1 an der Regulation der oxidativen Stressantwort beteiligt. Eine Deletion von CPTF1 führt zu reduzierter Virulenz (Nathues *et al.*, 2004). Interessanterweise ist in *M. grisea* Mst12, ein Ste12-homologer Transkriptionsfaktor, essentiell für die Penetration. *mst12*-

Deletionsmutanten sind zwar in der Lage, Appressorien zu bilden, jedoch können sie keine Penetrations- oder Infektionshyphen ausbilden (Park *et al.*, 2002).

Die Funktion von Biz1 kann mit keinem der erwähnten Transkriptionsfaktoren korreliert werden. So zeigen etwa *mst12*-Mutanten, ähnlich wie *biz1*-Deletionsmutanten, einen Defekt bei der Penetration, jedoch ist die Appressorienbildung im Gegensatz zu *biz1*-Deletionsmutanten nicht beeinträchtigt. Biz1 scheint also, anders als Mst12 sowohl in der Regulation der Appressorienbildung als auch in der Regulation der Penetration und dem anschließenden invasiven Wachstum eine entscheidende Rolle zu spielen.

### 3.5 Biz1 und die Zellzykluskontrolle

Die Deletion von *biz1* führt zu einer drastischen Reduktion der Appressorienbildung; die Hyphen können zwar die Pflanzenoberfläche noch penetrieren, jedoch ist invasives Wachstum und *in planta* Proliferation in *Δbiz1*-Stämmen nicht zu beobachten.

Die Differenzierung des Zellzyklus-arretierten Filaments auf der Blattoberfläche zu Appressorien stellt einen komplexen Prozess dar. Sie geht einher mit Änderung der Wachstumsrichtung um 90° und der anschließenden Aufhebung des Zellzyklusarrests nach erfolgter Penetration (Banuett und Herskowitz, 1996; Snetselaar und Mims, 1992). Neben der Perzeption eines putativen Pflanzensignals (zusammengefasst in Kahmann und Kämper, 2004) scheint eine fein abgestimmte Regulation des Zellzyklus während der morphologischen Veränderungen in der pathogenen Entwicklung eine wichtige Rolle zu spielen (J. Pérez-Martín, pers. Mitteilung). Es ist bekannt, dass in der Regulation des Zellzyklus in *U. maydis*, ähnlich wie in anderen Eukaryoten, Cyclin-abhängige Protein-Kinasen (Cdk, cyclin-dependent protein kinase) Schlüsselkomponenten darstellen. Während ein Komplex aus Cdk1 und dem B-Typ Zyklin Clb1 für die G1/S- und G2/M-Transition erforderlich ist, ist der Komplex Cdk1-Clb2 für die G2/M-Transition spezifisch (Garcia-Muse *et al.*, 2004). Aus neueren Studien ist bekannt, dass sowohl Veränderungen am Transkriptionslevel, als auch Veränderungen der Abbaurate mitotischer Zyklone dazu führen können, dass *U. maydis* nicht mehr in der Lage ist,

die Pflanze zu infizieren (Garcia-Muse *et al.*, 2004; Castillo-Lluva *et al.*, 2004; Castillo-Lluva und Pérez-Martín, 2005).

In Arbeiten von Ignacio Flor-Parra und José Pérez-Martín konnte gezeigt werden, dass eine Überexpression von Biz1 die Expression des B-Typ Zyklins Clb1 reprimiert, und somit zu einem Zellzyklusarrest in der G2-Phase führt. Somit wurde Biz1 als neuer Regulator des Zellzyklus in *U. maydis* beschrieben (Vraneš *et al.*, 2006). Es wurde zunächst postuliert, dass der Pathogenitätsverlust in *biz1*-Deletionsstämmen auf die Biz1-abhängige Regulation von Clb1 zurückgeführt werden könnte. Konsistent mit dieser Annahme war die Beobachtung, dass SG200 $\Delta$ *biz1*-Stämme während des filamentösen Wachstums mehr als einen Zellkern pro Hyphe aufwiesen, was für einen Defekt in der Fähigkeit den Zellzyklus zu arretieren sprach (Vraneš *et al.*, 2006). Jedoch konnte in weiterführenden Experimenten gezeigt werden, dass die Biz1-abhängige Regulation von Clb1 nicht für den Pathogenitätsverlust in *biz1*-Deletionsstämmen verantwortlich ist (Vraneš *et al.*, 2006). Dies legt die Vermutung nahe, dass andere durch Biz1-regulierte Gene eine essentielle Rolle in der pathogenen Entwicklung haben.

In dieser Arbeit wurden durch DNA-Microarray-Analysen 129 Gene identifiziert, die durch eine Biz1-Überexpression induziert waren. 42 von diesen Genen zeigten ebenfalls eine Induktion in SG200 auf der Pflanzenoberfläche. Dieses Ergebnis lässt vermuten, dass Biz1 für die Regulation dieser Gene verantwortlich ist. Um diese Hypothese experimentell zu verifizieren, wurde eine Transkriptom-Analyse eines SG200 $\Delta$ *biz1*-Stammes auf der Pflanzenoberfläche durchgeführt. Hierbei konnten 15 strikt Biz1-abhängige Gene identifiziert werden, deren Expression signifikant reduziert war und auf einem vergleichbaren Niveau wie im nicht pathogenen Stamm FB1 lag. Dieses Ergebnis lässt die Annahme zu, dass Biz1 sowohl notwendig, als auch hinreichend für die Expression dieser 15 Gene ist. Für die Gene, die zwar in der Biz1-Überexpression induziert waren, jedoch keine Reduktion in ihrer Expression in SG200 $\Delta$ *biz1* auf der Pflanzenoberfläche zeigten, könnte ein weiterer Regulator postuliert werden. Es darf aber auch nicht außer Acht gelassen werden, dass eine starke Biz1-Überexpression dazu führen kann, dass Gene induziert werden, die unter physiologischen Bedingungen nicht hochreguliert sind. Für 4 Gene, die in SG200 $\Delta$ *biz1* auf der Pflanzenoberfläche in ihrer Expression reduziert sind, aber keine Induktion in der Biz1-Überexpression zeigten, ist durchaus vorstellbar, dass

beispielsweise ein weiterer Koaktivator oder ein Pflanzensignal notwendig ist, um die Expression dieser Gene zu induzieren.

Nachdem die Zellzyklusregulation durch Biz1 nicht direkt mit dem Verlust der Pathogenität in  $\Delta biz1$ -Stämmen korreliert werden konnte (Vraneš *et al.*, 2006), lag die Vermutung nahe, dass die Apathogenität der *biz1*-Deletionsstämme auf dem Verlust der Regulation der in dieser Arbeit beschriebenen strikt Biz1-abhängigen Gene beruht. Von den 15 strikt Biz1-abhängigen Genen kodiert eines für eine putative Endoglukanase und 14 für Proteine ohne bekannte Funktion. Von diesen haben 12 keine Ähnlichkeit zu bekannten Proteinen, die in Datenbanken hinterlegt sind (Tabelle 4; siehe Ergebnisteil). Durch eine systematische Deletionsanalyse konnte *pst1* identifiziert werden, dessen Deletion zu einem ähnlichen Phänotyp wie die Deletion von *biz1* führt. *pst1*-Deletionsstämme sind zwar noch in der Lage, Appressorien zu bilden, bleiben aber ebenfalls kurz nach der Penetration stecken und zeigen keine Proliferation in der Pflanze. Im Rahmen dieser Arbeit konnte aus zeitlichen Gründen nicht geklärt werden, ob die Deletion von *pst1*, wie im Fall von *biz1*, zu einer Reduktion der Appressorienanzahl führt. An dieser Stelle muss angemerkt werden, dass basierend auf der Genomannotation der MUMDB *pst1* als ein ORF annotiert ist und als solcher deletiert wurde. Durch die Sequenzierung eines 3' cDNA-Fragments zeigte sich jedoch, dass es sich bei *pst1* höchstwahrscheinlich um zwei offene Leserahmen handelt (im folgenden Text als *pst1* und *pst2* bezeichnet; Abb. 19). Um herauszufinden, welches der beiden *pst*-Gene eine Rolle während der pathogenen Entwicklung hat, ist es zunächst erforderlich, beide putativen ORFs anhand von cDNA-Sequenzen zu verifizieren, und dann gegebenenfalls einzeln zu deletieren. Es ist vorstellbar, dass bereits die Deletion eines der beiden *pst*-Gene ausreichend ist, um einen Verlust der Pathogenität herbeizuführen, oder aber dass *pst1* und *pst2* redundante Funktionen besitzen. Diese Arbeiten wurden aus Zeitgründen jedoch noch nicht durchgeführt.

Über die Rolle der übrigen strikt Biz1-abhängigen Gene während der pathogenen Entwicklung kann momentan nur spekuliert werden. Es ist durchaus vorstellbar, dass sie Aufgaben, wie bereits diskutiert, bei der Anheftung der Filamente auf der Blattoberfläche oder Funktionen während der Penetration übernehmen, diese jedoch für *U. maydis* nicht essentiell sind oder unter den Gewächshaus- und Infektionsbedingungen nicht relevant sind. Einige der strikt Biz1-abhängig regulierten

Gene weisen Sequenzähnlichkeiten zu anderen *U. maydis* Proteinen auf (Tabelle 4), wodurch eine redundante Funktion nicht ausgeschlossen werden kann.

Nach der neuen Annotation kodiert *pst1* wahrscheinlich für ein Protein mit 511 AS und *pst2* für ein Protein mit 418 AS. Für beide wird durch TargetP (Emanuelsson *et al.*, 2000; MUMDB) vorausgesagt, dass sie sekretiert werden. Durch die neue Annotation war die Verwendung eines bereits bestehenden *pst1::egfp*-Konstruktes zur Lokalisierung des Pst1-Proteins hinfällig geworden, so dass die Sekretion der Pst-Proteine bislang leider nicht experimentell verifiziert werden konnte. Beide *pst*-Gene sind sowohl auf der Pflanzenoberfläche als auch während der gesamten biotrophen Phase exprimiert. Basierend auf diesem Befund erscheint es wahrscheinlich, dass Pst1 und Pst2 nicht nur während der Penetration und des initialen invasiven Wachstums eine essentielle Rolle spielen, sondern dass sie auch in späteren Entwicklungsprozessen in der Pflanze eine wichtige Funktion haben könnten. So könnten sie beispielsweise an Prozessen wie der Pilz-Pflanze-Interaktion bzw. Kommunikation, oder aber auch an der Unterdrückung der Pflanzenabwehr beteiligt sein. Es wird diskutiert, dass einige sekretierte Proteine aus Rostpilzen oder Oomyceten in Pflanzenzellen transportiert werden (Armstrong *et al.*, 2005; Dodds *et al.*, 2004; Rehmany *et al.*, 2005). Im Gegensatz zu diesen Organismen, die spezialisierte Infektionsstrukturen, sogenannte Haustorien, besitzen, um den Austausch von Nährstoffen und Proteinen zu gewährleisten (Birch *et al.*, 2006; Mendgen und Hahn, 2002), hat *U. maydis* eine stark ausgeprägte Wirt-Parasit-Grenzfläche während des intrazellulären Wachstums. Es wird angenommen, dass der enge Kontakt zwischen Pathogen und Wirts-Plasmamembran eine Grundvoraussetzung für den Austausch von Proteinen darstellt (Kämper *et al.*, 2006; Snetselaar und Mims, 1994). Interessanterweise wurde kürzlich mit *gas1* ein weiteres Gen beschrieben, das eine Funktion bei der Proteinsekretion hat und eine wichtige Rolle in der sexuellen Entwicklung von *U. maydis* spielt (Schirawski *et al.*, 2005). *gas1* kodiert für die katalytische  $\alpha$ -Untereinheit der Glucosidase II und lokalisiert im endoplasmatischen Retikulum, wo sie an der Prozessierung von N-glykosylierten Proteinen beteiligt ist. Es wird angenommen, dass Glucosidasen eine zentrale Rolle in der Kontrolle der Proteinfaltung von Glykoproteinen spielen (Helenius und Aebi, 2001). Ähnlich wie *biz1*- und *pst1/pst2*-Deletionsstämme zeigen auch *gas1*-Deletionsmutanten keinen offensichtlichen Phänotyp im Bezug auf das Wachstum



unter axenischen Bedingungen, arretieren jedoch ihr Wachstum in der pathogenen Entwicklung kurz nach der Penetration der Blattoberfläche (Schirawski *et al.*, 2005). Es wird spekuliert, dass Gas1 spezifisch für die Etablierung dieser Wirt-Parasit-Grenzfläche benötigt wird, und dass eine fehlerhafte Glykosylierung von Proteinen die Ausbildung dieser Grenzfläche verhindern könnte (Schirawski *et al.*, 2005). Es ist durchaus vorstellbar, dass *pst1* und *pst2* eine essentielle Funktion in der Etablierung der Wirt-Parasit-Grenzfläche haben, bzw. Bestandteil dieser sind und hier Aufgaben in der Pilz-Pflanze-Interaktion übernehmen.

Bislang ist unbekannt, wie *U. maydis* während seines biotrophen Wachstums in der Pflanze die pflanzlichen Abwehrmechanismen umgeht bzw. unterdrückt. Es ist vorstellbar, dass *pst1* und *pst2* hierbei eine Rolle spielen könnten. Pflanzen besitzen sowohl konstitutive als auch induzierbare Mechanismen, um Pathogene abzuwehren. Um die Pflanze erfolgreich zu kolonisieren, müssen vom Pathogen morphologische Barrieren wie Zellwände und Wachsschichten, aber auch Sekundärmetabolite und antimikrobielle Proteine überwunden werden. Zu den konstitutiven Mechanismen gehören beispielsweise chemische antimikrobielle Substanzen wie Saponine, die in aktiver Form und teilweise in hohen Konzentrationen in unbeschädigten Pflanzenzellen vorkommen. Hingegen liegen zyanogene Glykoside oder Glukosinolate in nicht-aktivierter Form in der Zelle vor und werden nach Pathogeninvasion aktiviert (zusammengefasst in Osbourn, 1996).

Bei der induzierten Abwehr wird das Pathogen anhand von Elizitoren, auch PAMPs (pathogen-associated molecular pattern) genannt, erkannt. Hierzu zählen beispielsweise bakterielle Lipopolysaccharide (Newman *et al.*, 2002), pilzliche Xylanasen und Invertasen (Basse *et al.*, 1993; Enkerli *et al.*, 1999), oder Abbauprodukte der pilzlichen Zellwand, wie Chitin (Ito *et al.*, 1997; Peck *et al.*, 2001). Die induzierte Abwehrreaktion kann in der Induktion von PR-Proteinen (pathogenesis-related; wie Chitinasen, Glukanasen, oder Proteinasen), in der Akkumulation von antimikrobiellen Proteinen (Defensinen) bzw. Sekundärmetaboliten (Phytoalexinen), oder in der Anhäufung reaktiver Sauerstoffspezies bestehen (zusammengefaßt in Nürnberger *et al.*, 2004). Für *Fusarium oxysporum* konnte gezeigt werden, dass das Chitin der Zellwand durch eine Glykoproteinschicht maskiert wird (Schoffemeer *et al.*, 1999), wodurch die pilzliche Zellwand vor einem Angriff pflanzlicher Chitinasen geschützt werden könnte. Durchaus vorstellbar ist, dass sekretierte Proteine in *U. maydis* eine ähnliche Funktion übernehmen und so den

Pilz vor der Pflanzenabwehr schützen. Hierbei könnten *pst1* und *pst2* wichtige Komponenten, beispielsweise als Strukturproteine in der Vernetzung dieser Schutzschicht, darstellen. Eine Proteinschutzschicht könnte aber auch dazu genutzt werden, um dem Pilz als eine Art „Tarnkappe“ zu dienen. Dies könnte eine Erkennung des Pilzes durch die Pflanze gänzlich unterbinden und so eine Pflanzenabwehrreaktion vermeiden.

Aus *Cladosporium fulvum* ist bekannt, dass während der Infektion verschiedene Proteine in den Apoplasten der Pflanzen sekretiert werden und diese als Elizitoren in kompatiblen Reaktionen die Pflanzenabwehr induzieren können. Für den Avirulenzfaktor Avr4, der eine Chitinbindedomäne besitzt, konnten „virulente“ Allele identifiziert und charakterisiert werden. Diese modifizierten Avr4-Varianten besitzen noch ihre Chitinbindefähigkeit, induzieren aber keine Pflanzenabwehrreaktion mehr. Daher wird diskutiert, dass ihre Funktion in der Pathogenität darin besteht, die Pilzzellwand vor pflanzlichen Chitinasen zu schützen (van den Burg *et al.*, 2004; van den Burg *et al.*, 2003).

Eine weitere Möglichkeit für sekretierte Proteine, den Pilz vor einer Abwehrreaktion der Pflanze zu schützen, bestünde in der aktiven Suppression der Pflanzenabwehr. In der Aktivierung der adaptiven Pflanzenabwehr spielen Signaltransduktionskaskaden eine wichtige Rolle (zusammengefasst in Innes, 2001; Tena *et al.*, 2001). So werden beispielsweise in *Nicotiana tabacum* zwei MAPK (SIPK und WIPK) über eine MAPK-Kaskade durch verschiedene Elizitoren aktiviert (Zhang *et al.*, 1998). In *Oryza sativa* ist für die MAPK BWMK1 bekannt, dass sie ebenfalls durch pilzliche Elizitoren aktiviert wird und die Transkription verschiedener PR-Gene durch die Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors OsEREBP1 vermittelt (Cheong *et al.*, 2003). Pst1 und Pst2 könnten Rezeptoren solcher Kaskaden blockieren oder aktiv in der Pflanzenzelle Schlüsselkomponenten solcher Signaltransduktionskaskaden hemmen.

### 3.6 Rolle von Biz1 während der pathogenen Entwicklung

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Biz1 in der frühen pathogenen Entwicklung von *U. maydis* eine essentielle Rolle spielt. Hier kontrolliert Biz1 Prozesse wie die Regulation des Zellzyklus (Vraneš *et al.*, 2006) und die Appressorienausbildung. Der Verlust der *pst1*- und *pst2*- Regulation scheint für den in *biz1*-Deletionsstämmen beobachteten Defekt in der Pathogenität verantwortlich zu sein. Da *biz1* während der gesamten biotrophen Phase exprimiert wird, ist es jedoch wahrscheinlich, dass dies nicht die einzige Funktion von Biz1 ist. Während der gesamten pathogenen Entwicklung konnten 78 Biz1-abhängige Gene identifiziert werden, die in verschiedenen Gruppen geclustert waren, und die ihre maximale Expressionsstärke zu verschiedenen Stadien der pathogenen Entwicklung aufwiesen. Dieser Befund spricht dafür, dass Biz1 zu verschiedenen Zeitpunkten der pathogenen Entwicklung distinkte Aufgaben übernehmen könnte. Die Annotation dieser Gene lässt jedoch keine eindeutige Aussage über ihre Funktion und deren Bedeutung für das biotrophe Wachstum von *U. maydis* zu, da viele für potentiell sekretierte Proteine kodieren, die keine Ähnlichkeit zu bekannten Proteinen aus Datenbanken aufweisen (s. Ergebnisteil). Es könnte sein, dass einige dieser Proteine nicht nur in bereits vorher diskutierten Prozessen wie Perzeption eines Pflanzensignals, Anheftung von Filamenten oder Suppression der Pflanzenabwehr eine Rolle spielen, sondern auch in späteren Entwicklungsstadien, beispielsweise an der Tumorinduktion, beteiligt sind. Im Genom von *U. maydis* lassen sich durch eine Kombination von SignalP- und ProtComp-Vorhersagen 416 Gene identifizieren, die für sekretierte Proteine kodieren. 301 von diesen kann keine Funktion zugewiesen werden, und von diesen zeigt rund die Hälfte (179) keine Ähnlichkeit zu bekannten Proteinen. Interessanterweise sind 14,4 % aller sekretierten Proteine in Clustern von 3 bis 26 Genen organisiert (R. Kahmann und T. Brefort, pers. Mitteilung; Kämper *et al.*, 2006). Der größte Teil dieser Gene zeigt eine spezifische Induktion während der pathogenen Entwicklung (5, 9, 13 dpi; Daten nicht gezeigt). Eine systematische Deletionsanalyse hat ergeben, dass 6 der Cluster relevant für die pathogene Entwicklung sind. Eine Deletionsmutante ist hypervirulent, wohingegen fünf Deletionsmutanten zu verschiedenen Stadien blockiert sind; eine Mutante davon, ähnlich wie die *biz1*-Mutante, bereits kurz nach der Penetration (R. Kahmann und T. Brefort, pers. Mitteilung; Kämper *et al.*, 2006).

Die in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse haben gezeigt, dass Biz1 ein neuer essentieller Regulator der pathogenen Entwicklung in *U. maydis* ist. Biz1 scheint nicht nur an Prozessen in der frühen Infektionsphase, wie Appressorienbildung, Penetration und *in planta* Proliferation beteiligt zu sein, sondern könnte auch in späteren Entwicklungsstadien wichtige Aufgaben innehaben. Konsistent mit dieser Vermutung ist der Befund, dass Biz1-regulierte Gene nicht nur auf der Pflanzenoberfläche induziert sind, sondern ihre Expressionsmaxima zu verschiedenen Zeitpunkten der pathogenen Entwicklung aufweisen. Dies lässt es wahrscheinlich erscheinen, dass Biz1 in verschiedenen Stadien an spezifischen Prozessen, wie beispielsweise Suppression der Pflanzenabwehr oder Tumorinduktion, beteiligt sein könnte.

Mit *pst1* und *pst2* sind Biz1-Zielgene identifiziert worden, deren Deletion zu einem ähnlichen Phänotyp wie die *biz1*-Deletion führt. Es erscheint wahrscheinlich, dass der Verlust der *pst1*- und *pst2*- Regulation für den in *biz1*-Deletionsstämmen beobachteten Defekt in der Pathogenität verantwortlich ist. Durch eine Überexpression der *pst1*- und *pst2*-Gene könnte untersucht werden, ob die Überexpression ausreichend wäre, um den Defekt in der Pathogenität von *biz1*-Deletionsstämmen zu beheben. Die Funktion der *pst1* und *pst2*-Gene konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter charakterisiert werden. So müssen im Rahmen zukünftiger Studien Pst1/Pst2::GFP-Fusionsproteine verwendet werden, um die subzelluläre Lokalisation oder eine mögliche Sekretion in den Apoplasten der Pflanze näher zu untersuchen.

Während der pathogenen bzw. biotrophen Entwicklungsphase von *U. maydis* scheinen sekretierte Proteine wichtige Aufgaben zu übernehmen. Die weitere Charakterisierung dieser sekretierten Proteine könnte einen entscheidenden Beitrag zum Verständnis der biotrophen Lebensweise von *U. maydis* leisten.

## 4 Material und Methoden

### 4.1 Material und Bezugsquellen

#### 4.1.1 Medien, Lösungen, Enzyme und Kits

##### Chemikalien

Alle in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien waren p. a. Qualität und wurden von den Firmen Ambion, Sigma-Aldrich, Merck, Fluka, Riedel-de-Haën, 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 sein.

##### Medien

Für die Kultivierung von *E. coli* wurden dYT-Flüssigmedium und YT-Festmedium verwendet (Ausubel *et al.*, 1987; Sambrook *et al.*, 1989). Ampicillin wurde in einer Konzentration von 100 µg/ml eingesetzt.

Für die Kultivierung von *U. maydis* wurden folgende Medien verwendet, die wenn nicht anders angegeben, 5 min bei 121 °C autoklaviert wurden.

##### CM-Medium

(Banuett und Herskowitz, 1989; Holliday, 1974):

1,5 g NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>  
 2,5 g Casamino Acids  
 0,5 g DNA  
 1 g Yeast Extract  
 10 ml Vitamin-Lösung (s.unten)  
 62,5 ml Salz-Lösung (s.unten)  
 1 ml Spurenelement-Lösung (s.unten)  
 20 g Bacto Agar (für Platten)  
 mit H<sub>2</sub>O auf 980 ml aufgefüllt, pH-Wert auf 7,0  
 mit NaOH eingestellt und autoklaviert.  
 nach dem Autoklavieren:

20 ml 50% (w/v) Glukose-Lösung (f.c. 1% CM-Glc) bzw. 40 ml 25% Arabinose-Lösung (f.c. 1% CM-Ara).

**YEPS<sub>1</sub>-Medium**, modifiziert nach (Tsukuda *et al.*, 1988):

10 g Yeast Extract  
 10 g Pepton  
 10 g Saccharose  
 mit H<sub>2</sub>O auf 1 l aufgefüllt

**NM-Medium** (Holliday, 1974):

62,5 ml Salz-Lösung (s. unten)  
 3 g KNO<sub>3</sub>  
 mit H<sub>2</sub>O auf 980 ml aufgefüllt pH-Wert auf 7,0  
 mit NaOH eingestellt und autoklaviert.  
 nach dem Autoklavieren:  
 20 ml 50% (w/v) Glukose-Lösung (f.c. 1%)

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

62,5 ml Salz-Lösung (s. unten)  
 30 mM L-Glutamin  
 mit H<sub>2</sub>O 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%)

**Salz-Lösung** (Holliday, 1974):

16 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
 4 g Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>  
 8 g KCl  
 4 g MgSO<sub>4</sub> x 7 H<sub>2</sub>O  
 1,32 g CaCl<sub>2</sub> x 2 H<sub>2</sub>O  
 8 ml Spurenelement-Lösung  
 mit H<sub>2</sub>O auf 1 l aufgefüllt und sterilfiltriert

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

60 mg H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>  
 140 mg MnCl<sub>2</sub> x 4 H<sub>2</sub>O  
 400 mg ZnCl<sub>2</sub>  
 40 mg NaMoO<sub>4</sub> x 2 H<sub>2</sub>O  
 100 mg FeCl<sub>3</sub> x 6 H<sub>2</sub>O  
 40 mg CuSO<sub>4</sub> x 5 H<sub>2</sub>O

Mit H<sub>2</sub>O auf 1 l aufgefüllt und sterilfiltriert

**Vitamin-Lösung** (Holliday, 1974):

100 mg Thiamin

50 mg Riboflavin

50 mg Pyridoxin

200 mg Calciumpantothenat

500 mg p-Aminobenzoensäure

200 mg Nikotinsäure

200 mg Cholinchlorid

1000 mg myo-Inositol

Mit H<sub>2</sub>O auf 1 l aufgefüllt und sterilfiltriert

**Regenerationsagar** (Schulz *et al.*, 1990):

a) Top-Agar:

1,5% (w/v) Bacto-Agar

1 M Sorbitol

in YEPS-Medium (s. oben)

b) Bottom-Agar:

wie a), zusätzlich 400 µg/ml Hygromycin

oder 4 µg/ml Carboxin

**NSY-Glycerin** (Einfriermedium):

8 g Nutrient Broth

1 g Yeast Extract

5 g Saccharose

800 ml 87% (v/v) Glycerin

mit H<sub>2</sub>O auf 1 l aufgefüllt

**Enzyme**

Restriktionsenzyme wurden von NEB Biolabs bezogen, alle übrigen Enzyme von Roche mit Ausnahme der reversen Transkriptasen von (Invitrogen), der Phusion™ High-Fidelity DNA Polymerase (NEB) und Taq DNA-Polymerase (Laborpräparation).

**Verwendete Kits und sonstiges Material**

RNeasy Kit (Qiagen) zur Präparation hochreiner Gesamt-RNA, QiaQuick PCR Purification Kit (Qiagen) zur Aufreinigung von PCR-Produkten, JETquick Plasmid Miniprep Kit (Genomed) zur Präparation hochreiner Plasmid-DNA, JETquick General DNA Clean-Up Kit (Genomed) zur Aufreinigung von Plasmiden vor der Sequenzierung, TOPO TA Cloning Kit (Invitrogen) zur Klonierung von PCR-Produkten, GeneRacer Kit (Invitrogen), BioArray-HighYield-RNA Transcript Labelling Kit (Enzo), MEGAscript T7-HighYield Transcription Kit (Ambion), GeneChip Expression

3'-Amplification Two-Cycle cDNA Synthesis Kit (Affymetrix), SuperScript® III First-Strand Synthesis SuperMix (Invitrogen), Platinum® SYBR® Green qPCR SuperMix-UDG (Invitrogen), NEBlot Kit (NEB Biolabs) zur radioaktiven Markierung von DNA-Fragmenten, BigDye Kit (ABI) zur fluoreszenzmarkierten Sequenzierung, Microspin S-200 und S-300 Säulen (Amersham Pharmacia Biotech) zur Aufreinigung von radioaktiv markierten DNA-Sonden. Weiteres verwendetes Material ist unter den jeweiligen Methoden beschrieben.

**4.1.2 Oligonukleotide**

Die Oligonukleotide wurden von der Firma MWG-Biotech AG synthetisiert. Die Nukleotidsequenz ist jeweils vom 5'-Ende in Richtung 3'-Ende angegeben.

Folgende Oligonukleotide dienten zur Amplifikation der linken (lb) und der rechten (rb) Flanken zur Konstruktion von Deletionskonstrukten nach Kämper (2004); Details siehe Abschnitt

Deletion des *b*-Paarungstyplocus:

Lb1

GAAGCTAGCGG AAAAGTGGGTGAG

Rb2

CCGTAGTTGTGCGAGAGCAGAGG

Deletion von *biz1*:

piz2\_lb1

CTGCATGTTTCGGACGCCAAC

piz2\_lb2

GTTGGCCTGAGTGGCCCAAGCACACTGGCC

CTCG

piz2\_lbn

CAATGGGCATGTGCTCTTG

piz2\_rb1

GAGGCTGACTGAGCTGGAC

piz2\_rb2

GTTGGCCATCTAGGCCGCTGACTCGACTGC

CTGC

piz2\_rbn

GAAGGGCGTTGAAGGATG

Deletion von *c36um171*:

C36um171\_lb1

GCTCTTCATGCTCGTATTC

C36um171\_lb2  
 GTTGGCCATCTAGGCCCTGACTGAGCTTTC  
 TAG  
 C36um171\_lbn  
 GCACGGTACTTGCCATGC  
 C36um171\_rb1  
 TTCGTTTCGGCAGAACTGAC  
 C36um171\_rb2  
 GTTGGCCTGAGTGGCCATCACAACTGCGC  
 ATGTATC  
 C36um171\_rbn  
 TTGGGAGGTTGCGACTTAC

Deletion von *C80um074*:

C80um074\_lb1  
 GATCGCCACTGATTACATCC  
 C80um074\_lb2  
 GTTGGCCATCTAGGCCCTGACTAGGATCG  
 AGAGC  
 C80um074\_lbn  
 TCGCGGATCTGATTGAGTG  
 C80um074\_rb1  
 GCGGATACAACATGGTATGTGG  
 C80um074\_rb2  
 GTTGGCCTGAGTGGCCTTGGATTTCTCCCTA  
 TTCAGCTTC  
 C80um074\_rbn  
 GGTCTCCGTCTCATTCTCAG

Deletion von *C90um210*:

C90um210\_lb1  
 TCGTCTTCCTCGCCTTTATG  
 C90um210\_lb2  
 GTTGGCCATCTAGGCCCTGTGCTTGATTTTGC  
 CTCG  
 C90um210\_lbn  
 GTGAGATGCAAGCGTCAAAG  
 C90um210\_rb1  
 TGTGAGATGGTGGTAGACAG  
 C90um210\_rb2  
 GTTGGCCTGAGTGGCCTCTTCAACTCGTTC  
 TTGAC  
 C90um210\_rbn  
 GGGATGACTGGGAAAGAAAC

Deletion von *W125um220*:

W125um220\_lb1  
 GACCGACAGGTTCTTCAC

W125um220\_lb2  
 GTTGGCCATCTAGGCCGAGATGGAAGGATC  
 AGAG  
 W125um220\_lbn  
 ACCTCGGTCTGACACTATAC  
 W125um220\_rb1  
 GCATCACGGAATGACTTAGG  
 W125um220\_rb2  
 GTTGGCCTGAGTGGCCGAGACGCGAGGCTC  
 ATGC  
 W125um220\_rbn  
 GCTCCATCTGTGGTTCAGTTC

Deletion von *W15um161*:

W15um161\_lb1  
 GGAAGTCTACAGGATTG  
 W15um161\_lb2  
 GTTGGCCATCTAGGCCCTGAAGTAAGAAG  
 AAGAAG  
 W15um161\_lbn  
 ACGGGTGTGATACACGAG  
 W15um161\_rb1  
 ATGCGCTTACCTTTGTGC  
 W15um161\_rb2  
 GTTGGCCTGAGTGGCCGACGCTTGCAGCTT  
 TTTAAC  
 W15um161\_rbn  
 TGTATTCCGCTTGCTTGC

Deletion von *W195um010* und *W200um010*:

W195um010\_lb1  
 CGTCGGCAAGTCTACAAAC  
 W195um010\_lb2  
 GTTGGCCATCTAGGCCGTCGATTGCTGATCT  
 GAATTG  
 W195um010\_lbn  
 CAGCTTCGCGTTCATGTC  
 W195um010\_rb1  
 TCGACGAGCTGCTGGTAAG  
 W195um010\_rb2  
 GTTGGCCTGAGTGGCCTCAGTCTCCTATTCT  
 CGAC  
 W195um010\_rbn  
 TCGGAGTAGTCAGAAGTC

Deletion von *psl1*:

W35um122\_lb1  
 GCTCGTAGAGGCCATACAC

W35um122\_lb2  
 GTTGGCCATCTAGGCCGACTGCAGCTGGAG  
 AATC  
 W35um122\_lbn  
 CGTCCCTCCTCACACTTG  
 W35um122\_rb1  
 TCATTAGGTCGGCTGATGTC  
 W35um122\_rb2  
 GTTGGCCTGAGTGGCCTGGTATCGTAATTG  
 GCAAC  
 W35um122\_rbn  
 GTTCGACCTGAGTCAATCC

Deletion von *W80um148*:

W80um148\_lb1  
 GTAAGTGAGCCGAACAAC  
 W80um148\_lb2  
 GTTGGCCATCTAGGCCGGTGAAAAAAGGGA  
 GTTG  
 W80um148\_lbn  
 CGTCTCTCAGCGAGTACC  
 W80um148\_rb1  
 TACATTGCGACTGGAGAC  
 W80um148\_rb2  
 GTTGGCCTGAGTGGCCACGCTCCATTCTGTG  
 ATTG  
 W80um148\_rbn  
 ATTCGGTGCTTGCCATCTAC

Deletion von *C5um277*:

C5um277\_lb1  
 CCAGTGAATGGTGACCCTTATG  
 C5um277\_lb2  
 GTTGGCCATCTAGGCCTCTTCACGATTCTAG  
 GGC  
 C5um277\_lbn  
 ATGTCTGGCAAGTCCCTAAC  
 C5um277\_rb1  
 TAGAGCGGCAAGCTAGTG  
 C5um277\_rb2  
 GTTGGCCTGAGTGGCCTTACCCAAAAATGC  
 CGCTTC  
 C5um277\_rbn  
 CCCGAGAGCTGAAATAAGTC

Deletion von *C65um278*:

C65um278\_lb1  
 CTCACTTGTGCTGCTACTTG

C65um278\_lb2  
 GTTGGCCATCTAGGCCCGGTGTGCGTATGT  
 GTCG  
 C65um278\_lbn  
 CTTGCTACCCGAGTTGAC  
 C65um278\_rb1  
 GAAGTGCCTCTCTTCTGG  
 C65um278\_rb2  
 GTTGGCCTGAGTGGCCGCTAAGTGCTCTTGT  
 ACTAAC  
 C65um278\_rbn  
 CATCGTATCTGTCGCTCAAC

Diese Oligonukleotide führen die angegebenen Restriktionsstellen ein. Sie wurden zur Klonierung des *biz1*-ORFs in pRU11 verwendet:

*piz2*-NdeI  
 GTTGATCATATGTCGATGCTTAGCACACG  
*piz2*-NotI  
 GTTAGCGGCCGCTTACCAACGACGGCTGGT  
 G

Folgende Oligonukleotide liegen im *biz1*-Locus und wurden zur Sequenzierung des *biz1*-ORFs verwendet:

Seq-riz1-1  
 GGCATACGCAGACACAACAC  
 Seq-riz1-2  
 GATCCACACTGCCAAGACTC  
 Seq-riz1-3  
 TTACCGCCAACGCTCAATAC  
 Seq-riz1-4  
 ACATTGTGGGCGTAGATCGG

Diese Oligonukleotide wurden in Kombination mit dem GeneRACER-Kit (Invitrogen) zur Herstellung der *pst1*-3'-cDNA verwendet:

W35um122-gsp-3  
 TCGACGGCTATCCTCAAGGCGCAGATCC  
 W35um122-gsp-3n  
 GCAGGGCGCTGCTGGTCAAGATCCTTC



Diese Oligonukleotide wurden für die Real-Time-PCR verwendet:

für *biz1*:

Rt-riz1-F3  
GGATCAGCCAAATGATGGACAG  
Rt-riz1-R3  
TACTCTCGCATCTCTTCCACTC

für *pst1*:

pst1-rt-F  
ACTCATCACGGCCATCTACC  
pst1-rt-R  
GTCCATTGGCACCAGTATCG

für *ppi*:

Rt-ppi-F2  
ACATCGTCAAGGCTATCG  
Rt-ppiR2  
AAAGAACACCGGACTTGG

Weitere Oligonukleotide

REV24  
TTCACACAGGAAACAGCTATGACC  
Zur Sequenzierung verwendetes Oligonukleotid;  
liegt neben dem Polylinker von pCR2.1-Topo

UNI24

ACGACGTTGTAAAACGACGGCCAG  
Zur Sequenzierung verwendetes Oligonukleotid;  
liegt neben dem Polylinker von pCR2.1-Topo

### 4.1.3 Stämme

#### *E. coli*-Stämme

Für sämtliche Klonierungen wurde der Stamm DH5 $\alpha$  (Hanahan, 1985) verwendet, bei dem es sich um ein Derivat des *E. coli*-Stammes K12 mit folgenden genetischen Markern handelt: F', *endA1*, *hsdR*, *hsdM*, *sup44*, *thi-1*, *gyrA1*, *gyrA96*, *relA1*, *recA1*, *lacZ*  $\Delta$ M15. Für die Klonierung von PCR-Amplifikaten in pCR-TOPO mit dem TOPO-TA Klonierungs-Kit (Invitrogen) wurde teilweise der Stamm TOP10 (Invitrogen) benutzt, ebenfalls ein *E. coli* K12 Derivat mit dem Genotyp: F', *mcrA*,  $\Delta$ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*),  $\Phi$ 80*lacZ* $\Delta$ M15,  $\Delta$ *lacX74*, *deoR*, *recA1*, *araD139*,  $\Delta$ (*ara-leu*)7697, *galU*, *galK*, *rpsL*(Str<sup>R</sup>), *endA1*, *nupG*.

#### Maisvarietäten (*Zea mays spec.*)

Für alle Pflanzeninfektionen wurde die Maisvarietät Early Golden Bantam (Olds Seed Company, Madison, Wisconsin, USA) verwendet.

### *U. maydis* Stämme

Die Stämme in Tabelle 7 dienten in dieser Arbeit als Ausgangs- und/oder Teststämme, die in Tabelle 8 aufgeführten Stämme wurden in dieser Arbeit hergestellt. Wenn nicht anders vermerkt, wurden in allen Stämmen homologe Rekombinationsereignisse durch Southern-Analyse bestätigt.

**Tabelle 7: Ausgangstämme**

Stamm	Genotyp	Resistenz	Referenz
FB1	<i>a1 b1</i>	-	(Banuett und Herskowitz, 1989)
FB2	<i>a2 b2</i>	-	(Banuett und Herskowitz, 1989)
FBD11	<i>a1a2 b1b2</i>	-	(Banuett und Herskowitz, 1989)
FBD12-3	<i>a1 a2 b1 b1</i>	-	(Banuett und Herskowitz, 1989)
AB31	<i>a2 P<sub>crg1</sub>:bW2 P<sub>crg1</sub>:bE1</i>	Phleo <sup>R</sup>	(Brachmann <i>et al.</i> , 2001)
AB32	<i>a2 P<sub>crg1</sub>:bW2 P<sub>crg1</sub>:bE2</i>	Phleo <sup>R</sup>	(Brachmann <i>et al.</i> , 2001)
SG200	<i>a1 mfa2 bW2 bE1</i>	Phleo <sup>R</sup>	(Bölker <i>et al.</i> , 1995)
SG200 $\Delta$ <i>Arbfl</i>	<i>a1 mfa2 bW2 bE1 <math>\Delta</math>Arbfl</i>	Phleo <sup>R</sup> , Hyg <sup>R</sup>	(M. Scherer, pers. Mitteilung)
FB1P <sub>crg</sub> :fuz7DD	<i>a1 b1 ip<sup>R</sup>[P<sub>crg1</sub>:fuz7DD]ip<sup>S</sup></i>	Cbx <sup>R</sup>	(Müller <i>et al.</i> , 2003)

Tabelle 8: In dieser Arbeit hergestellt Stämme

Stamm	Genotyp	Resistenz	Ausgangstamm
SG200 <i>Ab</i>	<i>a1 mfa2 ΔbW2 ΔbE1</i>	Phleo <sup>R</sup> , Hyg <sup>R</sup>	SG200
SG200 <i>Abiz1</i>	<i>a1 mfa2 bW2 bE1 Δbiz1</i>	Phleo <sup>R</sup> , Hyg <sup>R</sup>	SG200
SG200-CFP <sup>1</sup>	<i>a1 mfa2 bW2 bE1 P<sub>oma</sub>:cfp</i>	Phleo <sup>R</sup> Cbx <sup>R</sup>	SG200
SG200-YFP <sup>2</sup>	<i>a1 mfa2 bW2 bE1 P<sub>oma</sub>:yfp</i>	Phleo <sup>R</sup> Cbx <sup>R</sup>	SG200
SG200 <i>Abiz1</i> -CFP <sup>3</sup>	<i>a1 mfa2 bW2 bE1 Δbiz1 P<sub>oma</sub>:cfp</i>	Phleo <sup>R</sup> , Hyg <sup>R</sup> , Cbx <sup>R</sup>	SG200 <i>Abiz1</i>
SG200 <i>Abiz1</i> -YFP <sup>4</sup>	<i>a1 mfa2 bW2 bE1 Δbiz1 P<sub>oma</sub>:yfp</i>	Phleo <sup>R</sup> , Hyg <sup>R</sup> , Cbx <sup>R</sup>	SG200 <i>Abiz1</i>
AB32Pcrg1:biz1	<i>a2 P<sub>crg1</sub>:bW2 P<sub>crg1</sub>:bE2 P<sub>crg1</sub>:biz1</i>	Phleo <sup>R</sup> Cbx <sup>R</sup>	AB32
SG200 <i>Apst1</i> <sup>5</sup>	<i>a1 mfa2 bW2 bE1 Δpst1</i>	Phleo <sup>R</sup> , Hyg <sup>R</sup>	SG200
SG200 <i>AC36um171</i>	<i>a1 mfa2 bW2 bE1 ΔC36um171</i>	Phleo <sup>R</sup> , Hyg <sup>R</sup>	SG200
SG200 <i>AC65um278</i>	<i>a1 mfa2 bW2 bE1 ΔC65um278</i>	Phleo <sup>R</sup> , Hyg <sup>R</sup>	SG200
SG200 <i>AC80um074</i>	<i>a1 mfa2 bW2 bE1 ΔC80um074</i>	Phleo <sup>R</sup> , Hyg <sup>R</sup>	SG200
SG200 <i>AC90um210</i>	<i>a1 mfa2 bW2 bE1 ΔC90um210</i>	Phleo <sup>R</sup> , Hyg <sup>R</sup>	SG200
SG200 <i>AW125um220</i>	<i>a1 mfa2 bW2 bE1 ΔW125um220</i>	Phleo <sup>R</sup> , Hyg <sup>R</sup>	SG200
SG200 <i>AW15um161</i>	<i>a1 mfa2 bW2 bE1 ΔW15um161</i>	Phleo <sup>R</sup> , Hyg <sup>R</sup>	SG200
SG200 <i>AW195/W200um010</i> <sup>6</sup>	<i>a1 mfa2 bW2 bE1 ΔW195/W200um010</i>	Phleo <sup>R</sup> , Hyg <sup>R</sup>	SG200
SG200 <i>AW80um148</i>	<i>a1 mfa2 bW2 bE1 ΔW80um148</i>	Phleo <sup>R</sup> , Hyg <sup>R</sup>	SG200
SG200 <i>AC5um277</i>	<i>a1 mfa2 bW2 bE1 ΔC5um277</i>	Phleo <sup>R</sup> , Hyg <sup>R</sup>	SG200

<sup>1-4</sup> Für die Erstellung dieser Stämme wurden die Plasmide pOMA-CFP bzw. pOMA-YFP verwendet. Die Integration der mit *SspI* linearisierten Plasmide in den *ip*-Locus wurde nicht durch Southern-Blot-Analyse bestätigt.

<sup>5</sup> Doppeldeletion von *pst1* und *pst2*

<sup>6</sup> Doppeldeletionsstamm (*W195um010* und *W200um010*)

#### 4.1.4 Plasmide und Plasmidkonstruktionen

Sämtliche Plasmide tragen eine Ampicillin-Resistenzkassette zur Selektion in *E. coli*. Alle Klonierungsschritte wurden durch Restriktionsanalyse überprüft, alle eingebrachten PCR-Amplifikate wurden sequenziert.

##### Ausgangsplasmide

##### Klonierungsvektoren

##### pCR2.1-TOPO (Invitrogen)

##### Spezielle Vektoren für das Arbeiten in/mit *U. maydis*

##### pBS-hhn (Kämper, 2004)

Enthält eine 1.884 bp Hygromyzin-Resistenzkassette als *SfiI*-Fragment. Das *hph*-Gen wird dabei von dem *hsp70*-Promotor und dem *nos*-Terminator flankiert.

##### pCR-Δb (Kämper, 2004)

Enthält das Deletionskonstrukt für den *b*-Paarungstyplocus

##### pOY (Weber *et al.*, 2003)

Enthält das *yfp*-Gen unter der Kontrolle des *otef*-Promotors.

##### pOC (Weber *et al.*, 2003)

Enthält das *cfp*-Gen unter der Kontrolle des *otef*-Promotors.

##### pOMA-sgfp-KP (K. Papenfort, pers. Mitteilung)

Basiert auf dem Vektor pCU4 (Loubradou *et al.*, 2001). Ist ein Derivat des Vektors pOMA-sgfp (Ladendorf, 2003). Enthält das *sgfp*-Gen unter der Kontrolle des *oma*-Promotors und des *nos*-Terminators, sowie eine Carboxin-Resistenzkassette. Die *NotI*-Restriktionsschnittstelle im Rückgrat von pOMA-sgfp-KP wurde deletiert.

**pRU11-KP (K. Papenfort, pers. Mitteilung)**

Dieses Derivat von pRU11 enthält das *gfp*-Gen unter der Kontrolle des *crg1*-Promoters und des *nos*-Terminators, sowie eine Carboxin-Resistenz. Die *NotI*-Restriktionsschnittstelle im Rückgrat wurde deletiert.

#### 4.1.5 In dieser Arbeit hergestellte Plasmide

**pCR2.1-Topo-biz1**

Dieses pCR2.1-Topo-Derivat dient der Erzeugung von pRU11Pcrg1:biz1. Es enthält den *biz1*-ORF der mit den Oligonukleotiden piz2-Not und piz2-Nde amplifiziert wurde.

**pRU11Pcrg1:biz1**

Enthält den *biz1*-ORF unter der Kontrolle des *crg1*-Promoters und des *nos*-Terminators, sowie eine Carboxin-Resistenzkassette. Zur Konstruktion von pRU11Pcrg1:biz1 wurde pCR2.1-Topo-biz1 in einem Ansatz mit *NdeI* und *BssSI* geschnitten und ein 511 bp Fragment durch Gelelektrophorese

isoliert. In einem anderen Ansatz wurde der gleiche Vektor mit *NotI* und *BssSI* restringiert und ein 1846 bp Fragment durch Gelelektrophorese isoliert. Beide Fragmente wurden in den mit *NdeI* und *NotI* geöffneten Vektor pRU11-KP ligiert.

**pOMA-CFP**

Dieser Vektor enthält das *cfp*-Gen unter der Kontrolle des *oma*-Promoters. Zur Konstruktion von pOMA-CFP wurde pOC mit *XmaI* und *NotI* geschnitten und ein 742 bp Fragment durch Gelelektrophorese isoliert. Dieses Fragment wurde in den *XmaI* und *NotI* geöffneten Vektor pOMA-sgfp-KP ligiert.

**pOMA-YFP**

Dieser Vektor enthält das *yfp*-Gen unter der Kontrolle des *oma*-Promoters. Zur Konstruktion von pOMA-YFP wurde pOY mit *XmaI* und *NotI* geschnitten und ein 742 bp Fragment durch Gelelektrophorese isoliert. Dieses Fragment wurde in den *XmaI* und *NotI* geöffneten Vektor pOMA-sgfp-KP ligiert.

## 4.2 Mikrobiologische, zellbiologische und genetische Methoden

### 4.2.1 *Escherichia coli*

#### 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 immer zuerst 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 OD<sub>600</sub> die Kulturen durch entsprechende Verdünnung auf einen Wert unterhalb von 0,8 verdünnt. Als Nullwert wurde die OD<sub>600</sub> des jeweiligen Kulturmediums verwendet. OD<sub>600</sub> = 1,0 entspricht etwa 10<sup>9</sup> 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 MgCl<sub>2</sub> und MgSO<sub>4</sub> zugesetzt war, mit 1 ml einer frischen DH5α-Übernachtskultur angeimpft und bis zu einer OD<sub>600</sub> ≈ 0,5 bei 37°C und 200 Upm inkubiert. Die Zellen wurden durch Zentrifugieren für 15 min bei 3.000 Upm und 4°C (Heraeus Varifuge 3.0R) 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, Heraeus Varifuge 3.0R), 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

15 min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock von 2 min bei 42°C wurde der Transformations-Ansatz zur phänotypischen Expression der durch das eingebrachte Plasmid vermittelten Antibiotikaresistenz mit 800 µl dYT-Medium versetzt und 30 min bei 500 Upm und 37°C in einem Eppendorf-Wärmeblock inkubiert. 200 µl des Transformations-Ansatzes 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<sup>6</sup> Transformanten pro 1 µg eingesetzter Plasmid-DNA erreicht werden

#### RF1-Lösung:

100 mM RbCl  
50 mM MnCl<sub>2</sub> x 4 H<sub>2</sub>O  
30 mM K-Acetat  
10 mM CaCl<sub>2</sub> x 2 H<sub>2</sub>O  
15% (v/v) Glycerin  
in H<sub>2</sub>O<sub>bid.</sub>

mit Essigsäure auf pH 5,8 einstellen und sterilfiltrieren

#### RF2-Lösung:

10 mM MOPS  
10 mM RbCl  
75 mM CaCl<sub>2</sub> x 2 H<sub>2</sub>O  
15% (v/v) Glycerin  
in H<sub>2</sub>O<sub>bid.</sub>

mit NaOH auf pH 5,8 einstellen und sterilfiltrieren

### 4.2.2 *Ustilago maydis*

#### 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 OD<sub>600</sub> die Kulturen durch entsprechende Verdünnung auf einen Wert unterhalb von 0,8 verdünnt. Als Nullwert wurde die OD<sub>600</sub> des jeweiligen Kulturmediums verwendet. OD<sub>600</sub> = 1,0 entspricht etwa 1-5 x 10<sup>7</sup> Zellen/ml.

### Induktion von Stämmen

Die Stämme wurden aus Vorkultur in Flüssigmedium angeimpft, das reprimierende Bedingungen bot (im Fall des *crg1*-Promotors Glukose als einzige Kohlenstoffquelle) und bis zu OD<sub>600</sub> ≈ 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 H<sub>2</sub>O<sub>bid.</sub> 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 einzige Kohlenstoffquelle). Die Kulturen wurden bei 28°C und 200 Upm für die erforderliche Zeit inkubiert. Für die Pobenentnahme 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 YEPS<sub>L</sub>-Medium verdünnt und bei 28°C bis zu einer Zelldichte von 1-2 × 10<sup>7</sup> Zellen/ml (bis maximal OD<sub>600</sub> = 1,0) geschüttelt. Nach Erreichen des optimalen Zelltiters wurden die Zellen durch Zentrifugieren (3.200 Upm, 10 min, 4°C, Heraeus Varifuge 3.0R) geerntet, einmal mit 25 ml SCS gewaschen und in 2 ml SCS mit 2,5 bis 5 mg/ml Novozym resuspendiert. Die in diesem Puffer bei Raumtemperatur ablaufende Protoplastierung kann mikroskopisch verfolgt werden, da die zigarrenförmigen Zellen nach Lyse der Zellwand eine kugelige Form einnehmen. Nach vollständiger Protoplastierung (5-15 min) wurden

10 ml SCS zugegeben und die Protoplasten durch 10minütige Zentrifugation bei 2.300 Upm (4°C, Heraeus Varifuge 3.0R) pelletiert. Um das Novozym vollständig zu entfernen, wurde dieser Waschgang dreimal wiederholt. Anschliessend wurde mit 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 50 µl Protoplasten mit 1-5 µl linearisierter Plasmid-DNA (ca. 5 µg) und 1 µl Heparin-Lösung für 10 min auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 0,5 ml STC/PEG folgte eine weitere Inkubation von 15 min auf Eis. Anschliessend wurde der gesamte Transformationsansatz auf einer kurz zuvor mit Top-Agar überschichteten Regenerationsagarplatte ausgestrichen. Nach 2 bis 5 Tagen Inkubation bei 28°C wurden die gewachsenen Kolonien mit Zahnstochern auf Antibiotikum-haltigen PD-Platten, vereinzelt.

### SCS:

20 mM Na-Citrat, pH 5,8  
1 M Sorbitol  
in H<sub>2</sub>O<sub>bid.</sub>, sterilfiltriert

### STC:

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

### STC/PEG:

15 ml STC  
10 g PEG4000

### Test auf filamentöses Wachstum

*U. maydis*-Stämme wurden von Platte in YEPS-Flüssigmedium inokuliert. Bei 28°C wurden die Zellen bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,5-1,0 inkubiert. Die Zellen wurden geerntet (Zentrifugieren bei 3.500 Upm für 7 min bei RT in der Heraeus Varifuge 3.0R) und das Pellet anschliessend in H<sub>2</sub>O<sub>bid.</sub> so aufgenommen, dass die Zelldichte bei etwa OD<sub>600</sub> = 5,0 lag. Von jedem Ansatz wurden 6 µl auf eine CM-CC-Platte getropft. Die Platte wurde für 24 h bei 21°C unter Luftabschluss inkubiert.

### Test auf filamentöses Wachstum auf der Maispflanze

Zur Untersuchung des filamentösen Wachstums auf der Maispflanze und der Ausbildung von Appressorien-ähnlichen Infektionsstrukturen wurden Maispflanzen mittels Spritzinfektion infiziert. Nach 16 h, 24 h und 48 h wurde dann ein Stück von der Blattspreite des dritten Blatts, das unterhalb der Durchstichstelle lag, ausgeschnitten und mit einer Rasierklinge in kleine Stücke geschnitten. Die Blattstücke wurden 1 min in einer 1:100-Verdünnung einer Calcofluorfarblösung (Stammlösung: 10 mg/ml in DMSO; Fluorescent Brightener 28; Sigma) gelegt und danach zweimal mit Wasser gewaschen. Die Präparate wurden anschließend in einem Tropfen Wasser unter UV-Licht im Fluoreszenz-Mikroskop (Axiophot, ZEISS) untersucht.

### Mikroskopie und Bildverarbeitung

Die zellmorphologische Betrachtung von *U. maydis* erfolgte an einem Lichtmikroskop (Axiophot, ZEISS) mittels Nomarski-Optik. Für DIC-Mikroskopie und Fluoreszenz-Mikroskopie wurde ein 100faches Plan-Apochromat Objektiv (ZEISS) mit 1,4 numerischer Apertur verwendet. 8 µl der entsprechenden Kultur, bzw. des fixierten Präparats wurden zur Analyse auf Objektträger getropft. Für die Betrachtung und photographische Dokumentation sind Zelldichten von etwa  $2,5 \times 10^6$  Zellen/ml ideal, die Kulturen sollten entsprechend verdünnt werden. Für die Fluoreszenz-Mikroskopie wurden Filter mit folgendem Anregungs- und Emissionsspektrum eingesetzt: DAPI-Färbung, 365 nm und >397 nm; CFP 436 nm und 460-500 nm, YFP 500 nm und 535 nm, Rhodamin 546 nm und >590 nm. Digitale Aufnahmen mit einer hochauflösenden CCD-Kamera (C4742-25, Hamamatsu) wurden mit dem Programm IMAGE PRO PLUS (Media Cybernetics) nachbearbeitet (Bildausschnitt, Kontrastverstärkung) und als TIFF-Dateien für die weitere Bearbeitung in den Programmen PHOTOSHOP 6.0 (Adobe) und CANVAS 7.0 (Deneba) abgespeichert.

### Test auf Pathogenität

Bei dem hier verwendeten Test handelt es sich um eine Spritzinfektion, bei der 200-250 µl der entsprechenden Pilzsuspension in das Innere des Blattwirtels von 7 Tage alten Maispflanzen der

Maisvarietät Early Golden Bantam injiziert wurden. Die Stämme wurden in YEPS-Flüssigmedium bis zu einer  $OD_{600}=0,8$  angezogen und durch Zentrifugation (3000 Upm, 5 min, RT Heraeus Multifuge 4KR) geerntet. Das Zell-Pellet wurde anschließend im ursprünglichen Volumen in  $H_2O$  aufgenommen und erneut zentrifugiert (Zentrifugation (3000 Upm, 5 min, RT Heraeus Multifuge 4KR). Anschließend wurden die Zellen in Wasser aufgenommen ( $OD_{600}=3,0$ ).

### Koinfektionsstudien

Für Koinfektionsstudien wurde zunächst so verfahren wie in Kapitel „Test auf Pathogenität“ beschrieben. Jedoch wurden die Zellpellets für Koinfektionsstudien in Wasser ( $OD_{600}=1,0$ ) aufgenommen und anschließend wurde die Zellzahl mittels einer Neubauer Zählkammer überprüft und ggf. auf eine gleiche Zellzahl eingestellt. Zusätzlich wurde das Verhältnis der gemischten Stämme am Fluoreszenzmikroskop anhand des spezifischen Fluoreszenzsignals (CFP- bzw. YFP-Fluoreszenzsignal) überprüft.

### Fixierung von Zellen

Zellen wurden durch Zugabe von 10%iger Formaldehyd-Lösung bis zu einer Endkonzentration von 1% direkt zum Medium fixiert. Nach 30 min Inkubation auf einem Drehrad (Eppendorf) wurden die Zellen pelletiert (3.000 Upm, 5 min, RT, Heraeus Biofuge 15), zweimal mit PBS gewaschen, in PBS aufgenommen und bis zur weiteren Bearbeitung bei 4°C gelagert.

### DAPI-Färbung

Etwa 500 µl fixierte Zellen in PBS wurden pelletiert (3.000 Upm, 5 min, RT, Heraeus Biofuge 15) und in 200 µl  $H_2O_{bid}$  aufgenommen. Diese Zellsuspension wurde auf ein mit Polylysin beschichtetes Deckglas gegeben und 10 min bei RT inkubiert. Anschliessend wurde das Deckglas mit den Zellen nach unten für kurze Zeit in eine Petrischale mit PBS gelegt (Waschschritt). Das Deckglas wurde abgetropft, so dass ca. 10 µl am Deckglas verblieben. 10 µl einer DAPI-Lösung (Sigma D-9542) wurden in eine Petrischale mit 10 ml PBS gegeben, das Deckglas mit den Zellen nach unten auf die Flüssigkeit gelegt und so für 10 min bei 60°C inkubiert. Nach einem weiteren

Waschschritt (10 min in PBS) wurde das Deckglas abgetropft und auf einen Objektträger gelegt.

#### **WGA-Färbung**

Etwa 500 µl fixierte Zellen in PBS (pH 7,2) wurden mit 5 µl einer WGA-TRITC Stammlösung (Sigma, 2 mg/ml) versetzt und 15 Minuten bei RT auf einem Drehrad inkubiert. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen (Pelletierung bei 3.000 Upm, 5 min, RT, Heraeus Biofuge 15) und in PBS aufgenommen und eingebettet in 2% Low-melting Agarose mikroskopiert.

#### **Chlorazol Black E-Färbung**

Ein, zwei und drei Tage nach der Pflanzeninfektion wurden die Blätter ca. 1 cm unter der Injektionsstelle abgeschnitten. Es folgte eine Entfärbung der Blattschnitte ÜN in 100% Ethanol. Sie wurden einmal in H<sub>2</sub>O<sub>bid.</sub> gewaschen und anschließend mindestens eine Stunde bei 90°C in 10%-iger KOH inkubiert (max. 6 Stunden). Ab hier

ist Vorsicht geboten, da die Präparate instabil werden. 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. Danach in Glycerin mikroskopieren.

Chlorazol Black E-Lösung:

0,03% f. c. Chlorazol (Sigma) in H<sub>2</sub>O<sub>bid.</sub>, Glycerin und Milchsäure im Mischverhältnis 1:1:1

#### **Calcofluor White-Färbung**

20-50 µl Zellen (auch *on planta*) wurden mit einer 1:100-Verdünnung einer Calcofluorfärbelösung (Sammlösung: 10 mg/ml in DMSO) überschichtet. Die Präparate wurden zwei Minuten bei RT inkubiert und anschließend einmal mit H<sub>2</sub>O gewaschen. Danach mikroskopieren.

### 4.3 Molekularbiologische Standard-Methoden

Standardtechniken, wie beispielsweise Aufreinigung, Fällung und elektrophoretische Auftrennung von DNA, oder Klonierungstechniken sind bei Ausubel *et al.* (1987) Sambrook *et al.* (1989) ausführlicher beschrieben. 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  $A_{260}$  zu  $A_{280}$ . 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).

#### 4.3.1 Isolierung von Nukleinsäuren

##### Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Die Isolierung erfolgte durch "Lyse durch Kochen" nach Sambrook *et al.* (1989). 1,5 ml einer *E. coli*-Übernightkultur wurden pelletiert (13.000 Upm, 30 sec, RT, Heraeus Biofuge 15). Das Zellpellet wurde in 300  $\mu\text{l}$  STET resuspendiert, nach Zugabe von 20  $\mu\text{l}$  Lysozym-Lösung kräftig geschüttelt und anschliessend 40 sec bei 95°C in einem Eppendorf-Heizblock inkubiert. Die lysierten Zellen und die denaturierte genomische DNA wurden 15 min bei 13.000 Upm abzentrifugiert (Heraeus Biofuge 15) und danach mit einem sterilen Zahnstocher aus der wässrigen Lösung entfernt. Die Reinigung der Plasmid-DNA erfolgte durch Fällung mit 40  $\mu\text{l}$  3 M Na-Acetat, pH 5,3 und 400  $\mu\text{l}$  Isopropanol bei RT für 5 min und anschliessender Zentrifugation für 5 min bei 13.000 Upm (Heraeus Biofuge 15). Das Pellet wurde mit 70% Ethanol gewaschen und nach Trocknen in 200  $\mu\text{l}$  TE-Puffer mit 20  $\mu\text{g/ml}$  RNase A aufgenommen. Mit dieser Methode gelang es routinemässig, aus 1,5 ml Übernightkultur etwa 50  $\mu\text{g}$  Plasmid-DNA zu isolieren.

##### STET:

50 mM Tris-Cl, pH 8,0  
50 mM  $\text{Na}_2$ -EDTA  
8% (w/v) Saccharose  
5% (v/v) Triton X-100  
in  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bid}}$ .

##### Lysozym-Lösung:

10 mg/ml Lysozym  
10 mM Tris-Cl, pH 8,0  
in  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bid}}$ .

##### DNA-Isolierung aus *U. maydis*

Diese Methode ist modifiziert nach Hoffman und Winston, (1987). Dabei wurden 1,5 ml einer Übernightkultur in YEPS<sub>L</sub>-Flüssigmedium wurden zusammen mit 0,3 g Glasperlen in einem 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäss pelletiert (13.000 Upm, 30 sec, RT, Heraeus Biofuge 15), der Überstand abgegossen und das Pellet in 400  $\mu\text{l}$  *Ustilago*-Lysispuffer und 400  $\mu\text{l}$  TE-Phenol/Chloroform aufgenommen. Die Proben wurden für 10 min auf einem Vibrax-VXR Schüttler (IKA) geschüttelt. Nach Phasentrennung (13.000 Upm, 5 min, RT, Heraeus Biofuge 15) wurden 400  $\mu\text{l}$  des Überstands in ein neues Eppendorf-Gefäss überführt und mit 1 ml Ethanol gefällt. Nach Zentrifugation (13.000 Upm, 30 sec, RT, Heraeus Biofuge 15) wurde das Pellet in 50  $\mu\text{l}$  TE mit 20  $\mu\text{g/ml}$  RNase A aufgenommen, bei 50°C resuspendiert und bei -20°C aufbewahrt.

##### *Ustilago*-Lysispuffer:

50 mM Tris-Cl, pH 7,5  
50 mM  $\text{Na}_2$ -EDTA  
1% (w/v) SDS  
in  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bid}}$ .

##### TE-Phenol/Chloroform:

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

##### RNA-Isolierung nach Trizol-Methode

Diese Methode orientiert sich am Protokoll der Firma Invitrogen und wurde zur Präparation von Gesamt-RNA aus Pilzkulturen, die in Flüssigmedium (A) oder auf aktivkohlehaltigen



Festmedien (B) gewachsen waren, sowie zur Isolierung von Gesamt-RNA aus infiziertem Pflanzenmaterial (C), verwendet:

(A; C) Isolierung von Gesamt-RNA aus Pilzkulturen die in Flüssigmedium gewachsen waren, sowie aus infiziertem Pflanzenmaterial: Auf das tiefgefrorenes Zellpellet, bzw. das mit Hilfe von flüssigem Stickstoff zu einem feinen Pulver gemörserte Tumormaterial (~250 mg), wurde 1 ml Trizol pipettiert, dieser Ansatz kurz gevortext und nach Zugabe von ca. 0,3 g Glasperlen (150212 microns; Sigma) anschliessend für 5 min auf einer Retsch-Kugelmühle bei 30 Hz aufgeschlossen, bzw. homogenisiert. Nach Inkubation bei RT für 15 min wurden 200 µl Chloroform zugegeben. Die Ansätze wurden anschliessend kurz gevortext und 2 min bei RT inkubiert. Nach Zentrifugation (13.000 Upm, 4°C, 15 min, Beckmann Avanti30 Zentrifuge) wurde die wässrige Phase abgenommen, in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und nach Zugabe von 500 µl Isopropanol 10 min bei RT gefällt. Nach einer erneuten Zentrifugation (13.000 Upm, 4°C, 10 min, Beckmann Avanti30 Zentrifuge) wurde die pelletierte RNA mit 70% Ethanol gewaschen und erneut zentrifugiert (7.500 g, 4°C, 5 min, Beckmann Avanti30 Zentrifuge). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet für 5 min bei RT getrocknet, anschliessend in 100 µl Rnase-freiem-H<sub>2</sub>O aufgenommen und bei 55°C resuspendiert. Eine Quantitäts- und Qualitätskontrolle erfolgte durch photometerische Messung am NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer, sowie eine Analyse auf einem Agilent 2100-Bioanalyser<sup>R</sup>. Details zum Agilent 2100-Bioanalyser<sup>R</sup> siehe Herstellerangaben bzw. Herstellerprotokoll.

(B) Isolierung von Gesamt-RNA aus Pilzkulturen, die auf aktivkohlehaltigen Festmedien gewachsen waren. Die folgenden Angaben beziehen sich auf 1 g Pilzmaterial. Auf das in flüssigem Stickstoff tiefgefrorene und zu feinem Pulver gemörserte Pilzmaterial wurde 10 ml Trizol gegeben, gut gemischt und für 10 min bei RT inkubiert. Anschliessend wurden 2 ml Chloroform zugesetzt und der Ansatz gut gemischt und 2 min bei RT inkubiert. Hiernach wurden die Proben bei 8.500 Upm in einer Biofuge-stratos (Heraeus) bei 4 °C für 15 min zentrifugiert. Die oberen wässrige Phase wurde abgenommen und mit 5 ml

Isopropanol versetzt, gut gemischt und bei RT für 10 min inkubiert. Das Pelletieren der RNA erfolgte durch Zentrifugation in einer Biofuge-stratos (Heraeus) bei 8.500 Upm. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 70% Ethanol gewaschen und erneut zentrifugiert (Biofuge-Stratos Heraeus, 10 min, 4 °C bei 8.500 Upm). Nach Trocknung der RNA wurde das RNA-Pellet in 100 µl Rnase-freiem-H<sub>2</sub>O aufgenommen. Eine Quantitäts- und Qualitätskontrolle erfolgte durch photometerische Messung am NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer, sowie eine Analyse auf einem Agilent 2100-Bioanalyser<sup>R</sup>. Details zum Agilent 2100-Bioanalyser<sup>R</sup> siehe Herstellerangaben bzw. Herstellerprotokoll.

#### **RNA-Isolierung aus pilzlichem Material von der Blattoberfläche (Latex-Methode)**

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 + βMercaptoethanol (RNeasy Mini-Kit, Qiagen) in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt. Nach Zugabe von ca. 0,3 g Glasperlen (0,35-0,45 µm) wurden die Proben mit Hilfe einer Schwingmühle (MM200; Retsch) homogenisiert (5 min, 30 Hz). Der Überstand wurde nach 5minütiger Zentrifugation bei RT und 13.000 Upm (Biofuge; Heraeus) in ein neues Reaktionsgefäß überführt und das 0,5 fache Volumen an 100% Ethanol zugesetzt. Die weitere Aufreinigung der RNA folgt ab hier dem RNeasy Mini Kit-Protokoll (Qiagen) zur Isolierung von Gesamt-RNA aus Pflanzenzellen

und filamentösen Pilzen. Alle weiteren Einzelheiten gehen aus dem Herstellerprotokoll hervor.

### 4.3.2 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 durch Kapillar-Blot. Hierbei wird die Transfer-Lösung (0,4 M NaOH) 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<sup>+</sup>, Amersham Pharmacia Biotech). Vor dem Transfer wurde das Agarosegel für 15 min in 0,25 M HCl inkubiert, um einen Teil der Purine abzuspalten, damit ein Transfer grosser DNA-Fragmente erleichtert wird. Anschliessend wurde das Gel für 15 min in 0,4 M NaOH inkubiert. Der Kapillar-Blot erfolgte in der Regel über Nacht, mindestens aber für 4 h.

#### Spezifischer Nachweis immobilisierter Nukleinsäuren

Die Hybond-N<sup>+</sup>-Membranen (Amersham Pharmacia Biotech) wurden zur Absättigung der unspezifischen Bindungsstellen mit Hybridisierungspuffer für 20 min bei 60°C präinkubiert. Nach Wechsel der Hybridisierungslösung wurde die bei 95°C für 5 min denaturierte radioaktive Hybridisierungsprobe zugegeben (Endkonzentration etwa 10<sup>6</sup> cpm/ml). Spezifische Hybridisierung erfolgte bei 60°C über Nacht. Die Filter wurden zweimal je 15 min bei 60°C mit Waschpuffer gewaschen. Schliesslich wurden die Filter in Plastikfolie eingeschweisst und in Kassetten für den Phosphorimager STORM840 (Molecular Dynamics) exponiert. Nach 12 bis 24 Stunden wurden die strahlungssensitiven "Screens" der Kassetten im Phosphorimager eingelesen und mit dem Computerprogramm IMAGEQUANT (Molecular Dynamics) bearbeitet.

#### Hybridisierungspuffer:

50 mM Na-Phosphat-Puffer, pH 7,0

50 mM PIPES  
100 mM NaCl  
1 mM Na<sub>2</sub>-EDTA  
5% (w/v) SDS  
in H<sub>2</sub>O<sub>bid.</sub>

#### Waschpuffer:

1x SSC  
0,1% (w/v) SDS  
in H<sub>2</sub>O<sub>bid.</sub>

### 4.3.3 Sequenz- und Strukturanalyse

#### Sequenzierung von DNA

DNA wurde mit einem ABI 377 Sequenzierautomat von Perkin Elmer sequenziert. Vor der automatischen Sequenzierung wurde die DNA mit dem JETquick-Kit (Genomed) aufgereinigt. Die Sequenzreaktion wurde mit 35 Zyklen und unter Verwendung des BigDye-Kits nach Angabe des Herstellers (ABI) durchgeführt. Das Prinzip entspricht der Didesoxy-Methode nach (Sanger *et al.*, 1992). In den Reaktionsansatz werden ddNTPs gegeben, durch deren Einbau ein Kettenabbruch erfolgt. Die verschiedenen Basen sind mit unterschiedlichen Fluoreszenz-Farbstoffen markiert. Nach der Sequenzreaktion wurde die DNA gefällt. Das getrocknete Pellet wurde in 4 µl Formamid mit 25 mM Na<sub>2</sub>-EDTA, pH 8,0 aufgenommen und 5 min bei 95°C aufgeköcht. Ein 1,5 µl Aliquot wurde anschliessend auf das Gel aufgetragen. Die Banden wurden nach der Auftrennung in einem Sequenzgel und Anregung durch einen Laser von einer Photozelle detektiert. Die erhaltenen Daten wurden mit den Programmen SEQUENCENAVIGATOR<sup>R</sup> oder SEQUENCHER<sup>R</sup> ausgewertet.

#### Sequenz- und Strukturanalyse

**SEQUENCENAVIGATOR 1.0.1** (ABI) zur Bearbeitung von Sequenz-Rohdaten und zum Vergleich von DNA-Sequenzen.

**SEQUENCHER 4.1** (Genecodes) zur Bearbeitung von Sequenz-Rohdaten und zum Vergleich von DNA-Sequenzen.

**DNA-STRIDER 1.3** (Douglas, 1995) zur Erstellung und zur Bearbeitung von Plasmid- und

genomischen Sequenzen; wichtig vor allem zur Vorbereitung von Klonierungsschritten.

**BLAST2** (Altschul *et al.*, 1990; Altschul *et al.*, 1997; Gish und 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 und Horton, 1999) 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, 1995) und **CLUSTALX** (Heringa, 1999) zum Vergleich mehrerer Protein- oder DNA-Sequenzen.

**SEQVU 1.0.1** (The Garvan Institute of Medical Research, Sidney) zur Nachbearbeitung von Sequenz-Alignments

**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.

### 4.3.4 PCR-Techniken

#### 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  $\mu$ M, dNTPs in einer Endkonzentration von 200  $\mu$ M (d. h. je 200  $\mu$ M dATP, dCTP, dGTP und dTTP) in PCR-Puffer. Standardmäßig wurden die Reaktionen in einem Volumen von 50  $\mu$ l mit Hot-Start durchgeführt, zur Vermeidung von Kontaminationen wurden Pipettenspitzen mit Filtereinsatz benutzt. Bei Verwendung der aufgeführten Oligonukleotide und einer Amplifikationslänge 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 sec

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. Bei Benutzung anderer Oligonukleotide oder der Herstellung längerer Amplifikate musste die Hybridisierungstemperatur bzw. Elongationszeit entsprechend angepasst werden. Die Reaktionen erfolgten im Thermocycler (PTC 100 oder PTC 200, MJ Research).

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

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

Mit dieser Methode (Kämper, 2004) können gezielt offene Leseraster von Genen bekannter Sequenz in *U. maydis* deletiert werden. Man bedient sich hierbei des Mechanismus der homologen Rekombination über die angrenzenden genomischen Flanken. Eine Klonierung der Fragmente ist dabei nicht notwendig. Prinzipiell erfolgt eine PCR-Amplifikation des 5'- und 3'-gelegenen Bereichs des zu deletierenden Gens. Die Fragmente haben dabei etwa eine Länge von 1 kb. Über geeignete PCR-Primer werden an den dem offenen Leseraster zugewandten Enden der Amplifikate *Sfi*I-Restriktionsschnittstellen eingebracht. Nach Restriktion der PCR-Produkte wird über die asymmetrischen *Sfi*I-Restriktionsschnittstellen eine *Sfi*I-geschnittene Hygromyzin-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-Amplifikation wurde Phusion™ High-Fidelity DNA Polymerase nach 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 (also

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 PCR-Reaktion eingesetzt. Die Produkte werden auf einem Agarosegel überprüft und das gewünschte DNA-Fragment, d. h. die rechte (also 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 restingierten Flanken über QiaQuick PCR Purification MinElute-Säulen (Qiagen).

Ligation des Gendeletionskonstruktes:

0,2 µg jeder Flanke, 0,2 µg Hyg-Kassette (mit *Sfi*I aus pBS-hhn isoliert; Länge: 1884 bp) wurden in 20 µl Endvolumen bei RT in 5 min mit der Quick-Ligase (NEB) ligiert. Im Anschluß hieran wurde das Ligationsprodukt (insgesamt ca. 4 kb) über ein Agarosegel aufgetrennt, ausgeschnitten und mittels MinElute Gel Extraction Kit (Qiagen) eluiert.

PCR mit Nested-Primern (lbn und rbn) zur Amplifikation des Deletionskonstruktes:

Für die Standard-Amplifikation des Deletionskonstruktes wurden 1-2 µl der aufgereinigten Ligationsbande und die Nested-Primer lbn und rbn verwendet. Die Amplifikation wurde in einem Agarosegel überprüft und die PCR-Reaktion über QiaQuick PCR Purification Säulen (Qiagen) aufgereinigt.

Von dem aufgereinigten PCR-Produkt wurden je 10 µl (etwa 1-3 µg) für die Transformationen von *U. maydis* verwendet.

### DNaseI-Behandlung und Reverse Transkription (für Real-Time-PCR)

Für die reverse Transkription wurde zunächst die isolierte Gesamt-RNA mit der Turbo DNase I (Ambion) behandelt, um eventuell noch vorhandene DNA-Kontaminationen zu entfernen. Hierbei wurde nach Herstellerprotokoll vorgegangen (Einzelheiten 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. Die synthetisierte cDNA wurde mit RNase-freiem H<sub>2</sub>O 1:5 verdünnt und bei -20°C gelagert. Für Gesamt-RNA, die aus Pflanzmaterial von der Pflanzenoberfläche isoliert wurde, wurden 10-50 ng Gesamt-RNA eingesetzt und bei 50°C für 50 min inkubiert. Die synthetisierte cDNA wurde unverdünnt eingesetzt.

### Real-Time-PCR

Real-time PCR wurden mit Hilfe des Platinum SYBR Green qPCR SuperMix-UDG-Kit der Firma Invitrogen nach Herstellerangaben durchgeführt. Für die PCR Reaktion wurden 5 µl der synthetisierten cDNA eingesetzt (s.o.). Als Referenzfarbstoff wurde Fluorescein (1 µl einer 1 µM-Stammlösung/50 µl-Reaktionsansatz) der Firma Biorad eingesetzt. Die Reaktionen erfolgten auf einem Bio-Rad-iCycler-System unter der Verwendung des folgenden Programms:

95°C für 2 min, 45 Zyklen für 30 s bei 95°C, 30 s bei 62°C und 30 s bei 72°C.

Im Anschluß hieran wurde die Spezifität der Amplifikation anhand einer Schmelzkurve am Bio-Rad-iCycler-System überprüft. Zur Kalkulation des des CT-Wert (Threshold Cycle), der den Wert bzw. Zyklus beschreibt, an 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. Hierbei diente das konstitutiv exprimierte Gen *ppi* (*peptidylprolyl isomerase*) als Kontrolle.

#### Techniken zur Bestimmung von mRNA-Enden

Für die Bestimmung des 3'-Endes von *pstI* wurde das GeneRACER Kit (Invitrogen) verwendet. Als „Matritze“ diente hierbei Gesamt-RNA, die aus dem Stamm-AB32*Pcrg1:biz1* nach *crg1*-Induktion (5 h) isoliert wurde. Die Gesamt-RNA wurde zunächst über RNeasy-Säulen (Qiagen) aufgereinigt und die cDNA und anschließende Amplifikation nach Herstellerprotokoll durchgeführt. Die PCR-Produkte wurden über QiaQuick PCR Purification Säulen (Qiagen) aufgereinigt, in pCR2.1-TOPO kloniert und sequenziert.

## 4.4 Transkriptom-Analyse

### Wachstumsbedingungen

Alle Stämme, von denen Expressionsanalysen durchgeführt wurden, wurden dafür ausschließlich in Arrayminimalmedium angezogen (s. 4.1.1). Die Stämme wurden wie in Kapitel 4.2.2 beschrieben kultiviert und induziert.

Für die Expressionsanalysen von der Pflanzenoberfläche und den Tumorstadien wurden Maispflanzen mit den entsprechenden Stämme wie in Kapitel 4.2.2 beschrieben infiziert und in einer Phytokammer (Convicon; Model E15) unter Verwendung des folgenden Programms inkubiert:

Uhrzeit	T [°C]	MHAC	HPSOD
0:00	20	0	0
6:00	20	0	0
6:30	28	2	2
21:30	28	1	1
21:31	24	0	0
22:00	20	0	0
23:59	20	0	0

Pflanzeninfektionen wurden stets gegen 18 Uhr durchgeführt. Die Proben wurden nach 16 h, 24 h, 5 dpi, 9 dpi, 13 dpi entnommen.

### RNA-Isolierung:

Siehe Kapitel 4.3.1

### 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, 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 bei 2 min, 10.000 Upm. Anschließend wurde die Säule erneut 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 (Alternatives Protokoll zur Ein-Schritt-Amplifikation)

Dieses Protokoll wurde zur Transkriptom-Analyse der Stämme AB32*Pcrg1:biz1* und AB32 verwendet. Da aus Pilzkulturen, die in Arrayminimalmedium kultiviert wurden, genügend Gesamt-RNA isoliert werden kann, ist eine Zwei-Schritt-Amplifikation nicht notwendig.

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 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 (Gibco) wurde die Mischung für 1 h bei 50°C inkubiert.

Zur Zweitstrangsynthese wurde der oben beschriebene Ansatz mit 91 µl H<sub>2</sub>O, 30 µl 5 x Zweit-

strangpuffer, 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-Bioanalyzer®. 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 Protokoll hervor.

#### **cRNA-Aufreinigung**

60 µl H<sub>2</sub>O 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 H<sub>2</sub>O 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 H<sub>2</sub>O 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-Bioanalyzer® 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 Mg<sup>2+</sup>-haltigem 5x Fragmentations-Puffer und H<sub>2</sub>O 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-Bioanalyzer®. 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 FB1, SG200, SG200*Δb*, SG200*Δbiz1*, die auf der Pflanzenoberfläche inkubiert wurden, verwendet. Des Weiteren wurde dieses Protokoll für die Expressionsstudien der Tumorstadien 5 dpi, 9 dpi und 13 dpi verwendet. Hierbei wurde folgende Modifizierung des Protokolls vorgenommen: Im Anschluß an die Zweit-Strang cDNA-Synthese der zweiten Runde wurde die *in vitro*-Transkription mit dem BioArray-HighYield-RNA

Transcript Labelling Kit (Enzo) vorgenommen (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 worden war. 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 Protokoll hervor.

#### Array-Detektionsreaktionen

Nach der Hybridisierung wurde der Chip entleert und mit 300 µl 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 biotinylierter 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 jeweiligen Protokoll 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 (Affymetrix) ausgewertet, normalisiert und die Expressionswerte kalkuliert.

Eine Auswertung der Transkriptom-Vergleiche wurde mit Hilfe des Programm dChip 2004 (Li und Hung Wong, 2001) durchgeführt.

Bei der vergleichenden Analyse der experimentellen Arrays mit den Kontrollarrays wurden Gene herausgefiltert, die mindestens zweifach hoch- oder runterreguliert waren. Bei der Berechnung der faktoriellen Veränderung der Genexpression wurde ein Vertrauensintervall von 90 % („lower confidence bound of fold change“) vorgegeben, welches unter anderem den Standardfehler der Expressionswerte berücksichtigt und eine eher konservative Beurteilung der faktoriellen Veränderung darstellt (Li und Hung Wong, 2001).

Diese Kriterien wurden angewandt auf die vergleichende Analyse von FB1/SG200 (16 h und 24 h), FB1/SG200*Ab* und AB32/AB32*Pergl:biz1*. Für die Cluster-Analyse der Biz1-abhängigen Gene auf der Pflanzenoberfläche wurden solche Gene gefiltert, die über alle Bedingungen (SG200 16 h, SG200*Abiz1* 16 h) hinweg eine signifikante Variation in ihrer Expression aufwiesen. Hierbei wurden die Parameter so gewählt, dass der Quotient aus Standardabweichung und Mittelwert der Expressionswerte eines Gens über alle Bedingungen hinweg größer als 0,5 und kleiner als 10 war. Dabei mußten die Gene zusätzlich in  $\geq 49$  % der verwendeten Arrays einen „Present Call“ aufweisen (Li und Hung Wong, 2001; Li und Wong, 2003). Die hieraus resultierende Liste wurde anschließend für eine hierarchische Clustering verwendet. Hierbei wurde zusätzlich FB1 16 h in die Clusteranalyse miteinbezogen (Li und Hung Wong, 2001; Li und Wong, 2003)

Für die Analyse der Gene, die während der pathogenen Entwicklung, also auf der Pflanzenoberfläche (FB1 und SG200) und zu den drei untersuchten Zeitpunkten 5 dpi, 9 dpi und 13 dpi in der Pflanze differentiell reguliert waren, wurden Gene herausgefiltert, die über alle Bedingungen hinweg eine signifikante Variation in ihrer Expression zeigten. Hierbei wurden die Parameter so gewählt, dass der Quotient aus Standardabweichung und Mittelwert des Expressionswertes eines Gens über alle Bedingungen hinweg größer war als 0,5 und kleiner als 10 (Li und Hung Wong, 2001; Li und Wong, 2003). Solche Gene, die innerhalb eines Zeitpunktes nicht in allen biologischen Replikaten einen „Present Call“ aufwiesen, also statistisch

signifikant nachweisbar waren, wurden manuell  
wieder entfernt.



## 5 Literaturverzeichnis

ALMAGUER, C., CHENG, W., NOLDER, C., und PATTON-VOGT, J. (2004). Glycerophosphoinositol, a novel phosphate source whose transport is regulated by multiple factors in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **279**, 31937-31942.

ALTSCHUL, S. F., GISH, W., MILLER, W., MYERS, E. W., und LIPMAN, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* **215**, 403-410.

ALTSCHUL, S. F., MADDEN, T. L., SCHAFER, A. A., ZHANG, J., ZHANG, Z., MILLER, W., und LIPMAN, D. J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* **25**, 3389-3402.

ARMSTRONG, M. R., WHISSON, S. C., PRITCHARD, L., BOS, J. I., VENTER, E., AVROVA, A. O., REHMANY, A. P., BOHME, U., BROOKS, K., CHEREVACH, I., HAMLIN, N., WHITE, B., FRASER, A., LORD, A., QUAIL, M. A., CHURCHER, C., HALL, N., BERRIMAN, M., HUANG, S., KAMOUN, S., BEYNON, J. L., und BIRCH, P. R. (2005). An ancestral oomycete locus contains late blight avirulence gene *Avr3a*, encoding a protein that is recognized in the host cytoplasm. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 7766-7771.

AUSUBEL, F. M., BRENNER, R., KINGSTON, R. E., MOORE, D. D., SEIDMAN, J. G., SMITH, J. A., und STRUKL, K. (1987). *Current Protocols in Molecular Biology*. John Wiley & Sons, Inc., USA.

BANUETT, F., und HERSKOWITZ, I. (1989). Different *a* alleles of *Ustilago maydis* are necessary for maintenance of filamentous growth but not for meiosis. *Proc Natl Acad Sci USA* **86**, 5878-5882.

BANUETT, F., und HERSKOWITZ, I. (1994a). Identification of *fuz7*, a *Ustilago maydis* MEK/MAPKK homolog required for *a*-locus-dependent and -independent steps in the fungal life cycle. *Genes Dev* **8**, 1367-1378.

BANUETT, F., und HERSKOWITZ, I. (1994b). Morphological transitions in the life cycle of *Ustilago maydis* and their genetic control by the *a* and *b* loci. *Exp Mycol* **18**, 247-266.

BANUETT, F., und HERSKOWITZ, I. (1996). Discrete developmental stages during teliospore formation in the corn smut fungus, *Ustilago maydis*. *Development* **122**, 2965-2976.

BASSE, C. W., FATH, A., und BOLLER, T. (1993). High affinity binding of a glycopeptide elicitor to tomato cells and microsomal membranes and displacement by specific glycan suppressors. *J Biol Chem* **268**, 14724-14731.

BASSE, C. W., KOLB, S., und KAHMANN, R. (2002). A maize-specifically expressed gene cluster in *Ustilago maydis*. *Mol Microbiol* **43**, 75-93.

BECHINGER, C., GIEBEL, K. F., SCHNELL, M., LEIDERER, P., DEISING, H. B., und BASTMEYER, M. (1999). Optical measurements of invasive forces exerted by appressoria of a plant pathogenic fungus. *Science* **285**, 1896-1899.

BIRCH, P. R., REHMANY, A. P., PRITCHARD, L., KAMOUN, S., und BEYNON, J. L. (2006). Trafficking arms: oomycete effectors enter host plant cells. *Trends Microbiol* **14**, 8-11.

BOHLMANN, R., SCHAUWECKER, F., BASSE, C., und KAHMANN, R. (1994). Genetic regulation of mating and dimorphism in *Ustilago maydis*. In *Advances in Molecular Genetics of Plant-Microbe Interactions*, M. J. Daniels, ed. (Dordrecht, Kluwer Acad. Publ.), pp. 239-245.

BÖLKER, M., GENIN, S., LEHMLER, C., und KAHMANN, R. (1995). Genetic regulation of mating and dimorphism in *Ustilago maydis*. *Can J Botany* **73**, 320-325.

- BÖLKER, M., URBAN, M., und KAHMANN, R.** (1992). The *a* mating type locus of *Ustilago maydis* specifies cell signaling components. *Cell* **68**, 441-450.
- BOTTIN, A., KÄMPER, J., und KAHMANN, R.** (1996). Isolation of a carbon source-regulated gene from *Ustilago maydis*. *Mol Gen Genet* **253**, 342-352.
- BRACHMANN, A.** (2001) Die frühe Infektionsphase von *Ustilago maydis*: Genregulation durch das bE/bW-Heterodimer, Ludwig-Maximilian-University, Munich.
- BRACHMANN, A., KÖNIG, J., JULIUS, C., und 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., und KAHMANN, R.** (2003). An unusual MAP kinase is required for efficient penetration of the plant surface by *Ustilago maydis*. *EMBO J* **22**, 2199-2210.
- BRACHMANN, A., WEINZIERL, G., KÄMPER, J., und KAHMANN, R.** (2001). Identification of genes in the bW/bE regulatory cascade in *Ustilago maydis*. *Mol Microbiol* **42**, 1047-1063.
- BREFORT, T., MÜLLER, P., und KAHMANN, R.** (2005). The high-mobility-group domain transcription factor Rop1 is a direct regulator of *prf1* in *Ustilago maydis*. *Eukaryot Cell* **4**, 379-391.
- CARACUEL, Z., RONCERO, M. I., ESPESO, E. A., GONZALEZ-VERDEJO, C. I., GARCIA-MACEIRA, F. I., und DI PIETRO, A.** (2003). The pH signalling transcription factor PacC controls virulence in the plant pathogen *Fusarium oxysporum*. *Mol Microbiol* **48**, 765-779.
- CASTILLO-LLUVA, S., GARCIA-MUSE, T., und PÉREZ-MARTÍN, J.** (2004). A member of the Fizzy-related family of APC activators is regulated by cAMP and is required at different stages of plant infection by *Ustilago maydis*. *J Cell Sci* **117**, 4143-4156.
- CASTILLO-LLUVA, S., und PÉREZ-MARTÍN, J.** (2005). The induction of the mating program in the phytopathogen *Ustilago maydis* is controlled by a G1 cyclin. *Plant Cell* **17**, 3544-3560.
- CHEONG, Y. H., MOON, B. C., KIM, J. K., KIM, C. Y., KIM, M. C., KIM, I. H., PARK, C. Y., KIM, J. C., PARK, B. O., KOO, S. C., YOON, H. W., CHUNG, W. S., LIM, C. O., LEE, S. Y., und CHO, M. J.** (2003). BWMK1, a rice mitogen-activated protein kinase, locates in the nucleus and mediates pathogenesis-related gene expression by activation of a transcription factor. *Plant Physiol* **132**, 1961-1972.
- CHRISTENSEN, J. J.** (1963). Corn smut induced by *Ustilago maydis*. *Amer Phytopathol Soc Monogr* **2**.
- COHEN, S. N., CHANG, A. C., und HSU, L.** (1972). Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **69**, 2110-2114.
- DE JONGE, J., MCCORMACK, B., SMIRNOFF, N., und TALBOT, N. J.** (1997). Glycerol generates turgor in rice blast. *Nature* **389**, 244-245.
- DODDS, P. N., LAWRENCE, G. J., CATANZARITI, A. M., AYLIFFE, M. A., und ELLIS, J. G.** (2004). The *Melampsora lini* AvrL567 avirulence genes are expressed in haustoria and their products are recognized inside plant cells. *Plant Cell* **16**, 755-768.
- DOEBLEY, J.** (1992). Mapping the genes that made maize. *Trends Genet* **8**, 302-307.
- DOUGLAS, S. E.** (1995). DNA Strider. An inexpensive sequence analysis package for the Macintosh. *Mol Biotechnol* **3**, 37-45.
- DÜRRENBARGER, F., WONG, K., und KRONSTAD, J. W.** (1998). Identification of a cAMP-dependent protein kinase catalytic subunit required for virulence and morphogenesis in *Ustilago maydis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 5684-5689.

- EDDY, S. R.** (1995). Multiple alignment using hidden Markov models. *Proc Int Conf Intell Syst Mol Biol* **3**, 114-120.
- EICHHORN, H.** (2004) Pathogenitätsrelevante Signalkaskaden in *Ustilago maydis*: Identifikation von Zielgenen, Dissertation, Philipps-Universität Marburg, Marburg/Lahn.
- EISEN, M. B., SPELLMAN, P. T., BROWN, P. O., und BOTSTEIN, D.** (1998). Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 14863-14868.
- EMANUELSSON, O., NIELSEN, H., BRUNAK, S., und VON HEIJNE, G.** (2000). Predicting subcellular localization of proteins based on their N-terminal amino acid sequence. *J Mol Biol* **300**, 1005-1016.
- ENKERLI, J., FELIX, G., und BOLLER, T.** (1999). The enzymatic activity of fungal xylanase is not necessary for its elicitor activity. *Plant Physiol* **121**, 391-397.
- ESCHER, D., BODMER-GLAVAS, M., BARBERIS, A., und SCHAFFNER, W.** (2000). Conservation of glutamine-rich transactivation function between yeast and humans. *Mol Cell Biol* **20**, 2774-2782.
- FARFANG, J. W., AUFFARTH, K., und BASSE, C. W.** (2005). Identification of cis-active elements in *Ustilago maydis mig2* promoters conferring high-level activity during pathogenic growth in maize. *Mol Plant Microbe Interact* **18**, 75-87.
- FRANKEL, A. D., BERG, J. M., und PABO, C. O.** (1987). Metal-dependent folding of a single zinc finger from transcription factor IIIA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**, 4841-4845.
- GARCIA-MUSE, T., STEINBERG, G., und PÉREZ-MARTÍN, J.** (2003). Pheromone-induced G2 arrest in the phytopathogenic fungus *Ustilago maydis*. *Eukaryot Cell* **2**, 494-500.
- GARCIA-MUSE, T., STEINBERG, G., und PÉREZ-MARTÍN, J.** (2004). Characterization of B-type cyclins in the smut fungus *Ustilago maydis*: roles in morphogenesis and pathogenicity. *J Cell Sci* **117**, 487-506.
- GILL, G., PASCAL, E., TSENG, Z. H., und TJIAN, R.** (1994). A glutamine-rich hydrophobic patch in transcription factor Sp1 contacts the dTAFII110 component of the Drosophila TFIID complex and mediates transcriptional activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 192-196.
- GILLISSEN, B., BERGEMANN, J., SANDMANN, C., SCHROEER, B., BÖLKER, M., und KAHMANN, R.** (1992). A two-component regulatory system for self/non-self recognition in *Ustilago maydis*. *Cell* **68**, 647-657.
- GISH, W., und STATES, D. J.** (1993). Identification of protein coding regions by database similarity search. *Nat Genet* **3**, 266-272.
- GOLD, S., DUNCAN, G., BARRETT, K., und KRONSTAD, J.** (1994a). cAMP regulates morphogenesis in the fungal pathogen *Ustilago maydis*. *Genes Dev* **8**, 2805-2816.
- GOLD, S. E., BAKKEREN, G., DAVIES, J. E., und KRONSTAD, J. W.** (1994b). Three selectable markers for transformation of *Ustilago maydis*. *Gene* **142**, 225-230.
- GOLD, S. E., BROGDON, S. M., MAYORGA, M. E., und KRONSTAD, J. W.** (1997). The *Ustilago maydis* regulatory subunit of a cAMP-dependent protein kinase is required for gall formation in maize. *Plant Cell* **9**, 1585-1594.
- GOLUB, T. R., SLONIM, D. K., TAMAYO, P., HUARD, C., GAASENBEEK, M., MESIROV, J. P., COLLIER, H., LOH, M. L., DOWNING, J. R., CALIGIURI, M. A., BLOOMFIELD, C. D., und LANDER, E. S.** (1999). Molecular classification of cancer: class discovery and class prediction by gene expression monitoring. *Science* **286**, 531-537.
- HANAHAH, D.** (1985). *Techniques for transformation of E. coli*, IRL Press).

- HARTMANN, H. A., KAHMANN, R., und BÖLKER, M.** (1996). The pheromone response factor coordinates filamentous growth and pathogenicity in *Ustilago maydis*. *EMBO J* **15**, 1632-1641.
- HARTMANN, H. A., KRÜGER, J., LOTTSPEICH, F., und KAHMANN, R.** (1999). Environmental signals controlling sexual development of the corn Smut fungus *Ustilago maydis* through the transcriptional regulator Prf1. *Plant Cell* **11**, 1293-1306.
- HELENIUS, A., und AEBI, M.** (2001). Intracellular functions of N-linked glycans. *Science* **291**, 2364-2369.
- HERINGA, J.** (1999). Two strategies for sequence comparison: profile-preprocessed and secondary structure-induced multiple alignment. *Comput Chem* **23**, 341-364.
- HOCH, H., STAPLES, R., WHITEHEAD, B., COMEAU, J., und ED, W.** (1987). Signalling for growth orientation and cell differentiation by surface topography in *Uromyces*. *Science* **235**, 1696-1662.
- HOFFMAN, C. S., und 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.** (1961). The genetics of *Ustilago maydis*. *Genet Res Camb* **2**, 204-230.
- HOLLIDAY, R.** (1974). *Ustilago maydis*. In Handbook of Genetics, R. C. King, ed. (New York, USA, Plenum Press), pp. 575-595.
- HULO, N., BAIROCH, A., BULLIARD, V., CERUTTI, L., DE CASTRO, E., LANGENDIJK-GENEVAUX, P. S., PAGNI, M., und SIGRIST, C. J.** (2006). The PROSITE database. *Nucleic Acids Res* **34**, D227-230.
- INNES, R. W.** (2001). Mapping out the roles of MAP kinases in plant defense. *Trends Plant Sci* **6**, 392-394.
- INNIS, M. A., GELFAND, D. H., SNINSKY, J. J., und WHITE, T. J., eds.** (1990). *PCR Protocols: a guide to methods and applications*. (San Diego, USA, Academic Press).
- ITO, Y., KAKU, H., und SHIBUYA, N.** (1997). Identification of a high-affinity binding protein for N-acetylchitooligosaccharide elicitor in the plasma membrane of suspension-cultured rice cells by affinity labeling. *Plant J* **12**, 347-356.
- JACOBS, G. H.** (1992). Determination of the base recognition positions of zinc fingers from sequence analysis. *EMBO J* **11**, 4507-4517.
- JELITTO, T., PAGE, H., und READ, N.** (1994). Role of external signals in regulating the pre-penetration phase of infection by the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. *Planta* **194**, 471-477.
- KAFFARNIK, F., MÜLLER, P., LEIBUNDGUT, M., KAHMANN, R., und FELDBRÜGGE, M.** (2003). PKA and MAPK phosphorylation of Prf1 allows promoter discrimination in *Ustilago maydis*. *EMBO J* **22**, 5817-5826.
- KAHMANN, R., und KÄMPER, J.** (2004). *Ustilago maydis*: how its biology relates to pathogenic development. *New Phytologist* **164**, 31-42.
- 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., SAVILLE, B. J., BANUETT, F., KRONSTAD, J. W., GOLD, S. E., BREFORT, T., MÜLLER, O., PERLIN, M. H., WÖSTEN, H. A. B., DEVRIES, R., RUIZ-HERRERA, J., REYNAGA-PEÑA, C. G., SNETSELAAR, K., MCCANN, M., PÉREZ-MARTÍN, J., FELDBRÜGGE, M., BASSE, C. W., STEINBERG, G., IBEAS, J. I., HOLLOMAN, W., GUZMAN, P., FARMAN, M., STAJICH, J. E., SENTANDREU, R., GONZÁLEZ-PRIETRO, J. M., KENNEL, J., MOLINA, L., SCHIRAWSKI, J., MENDOZA-MENDOZA, A., GREILINGER, D., SCHERER, M., VRANEŠ,**

- M., LADENDORF, O., SANDROCK, B., FUCHS, U., DEELSTRA, H. J., MENG, S., HO, E. C. H., CAHILL, M. J., BOYCE, K. J., KLOSE, J., KLOSTERMAN, S. 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., PLATT, D., SWIMMER, C., GNIRKE, A., CHEN, F., VYSOTSKAIA, V. S., MANNHAUPT, G., GÜLDENER, U., MÜNSTERKÖTTER, M., HAASE, D., MEWES, H.-W., MAUCELL, E. W., DECAPRIO, D., WADE, C. M., BUTLER, J., YOUNG, S., JAFFE, D. D., CALVO, S., NUSBAUM, C., GALAGAN, J., und BIRREN, B. (2006). Living in pretend harmony: the genome of the biotrophic fungus *Ustilago maydis*. *Nature*, under revision.
- KÄMPER, J., REICHMANN, M., ROMEIS, T., BÖLKER, M., und KAHMANN, R. (1995). Multiallelic recognition: nonself-dependent dimerization of the bE and bW homeodomain proteins in *Ustilago maydis*. *Cell* **81**, 73-83.
- KEON, J. P., WHITE, G. A., und HARGREAVES, J. A. (1991). Isolation, characterization and sequence of a gene conferring resistance to the systemic fungicide carboxin from the maize smut pathogen, *Ustilago maydis*. *Curr Genet* **19**, 475-481.
- KERNKAMP, M. F. (1939). Genetic and environmental factors affecting growth types of *Ustilago zeae*. *Phytopathology* **29**, 473-484.
- KOJIC, M., und HOLLOMAN, W. K. (2000). Shuttle vectors for genetic manipulations in *Ustilago maydis*. *Can J Microbiol* **46**, 333-338.
- KRONSTAD, J. W., und LEONG, S. A. (1990). The *b* mating-type locus of *Ustilago maydis* contains variable and constant regions. *Genes Dev* **4**, 1384-1395.
- KRONSTAD, J. W., WANG, J., COVERT, S. F., HOLDEN, D. W., MCKNIGHT, G. L., und LEONG, S. A. (1989). Isolation of metabolic genes and demonstration of gene disruption in the phytopathogenic fungus *Ustilago maydis*. *Gene* **79**, 97-106.
- KRÜGER, J., LOUBRADOU, G., REGENFELDER, E., HARTMANN, A., und KAHMANN, R. (1998). Crosstalk between cAMP and pheromone signalling pathways in *Ustilago maydis*. *Mol Gen Genet* **260**, 193-198.
- KUO, C. T., VESELITS, M. L., und LEIDEN, J. M. (1997). LKLF: A transcriptional regulator of single-positive T cell quiescence and survival. *Science* **277**, 1986-1990.
- LADENDORF, O. (2003) Transposition und heterologe Genexpression in *Ustilago maydis*, Dissertation, Philipps-Universität-Marburg, Marburg.
- LEE, M. S., GIPPERT, G. P., SOMAN, K. V., CASE, D. A., und WRIGHT, P. E. (1989). Three-dimensional solution structure of a single zinc finger DNA-binding domain. *Science* **245**, 635-637.
- LEE, Y., und DEAN, R. (1994). Hydrophobicity of contact surface induces appressorium formation of *Magnaporthe grisea*. *FEMS Microbiol Lett* **115**, 71-76.
- LEUTHNER, B., AICHINGER, C., OEHMEN, E., KOOPMANN, E., MÜLLER, O., MÜLLER, P., KAHMANN, R., BÖLKER, M., und SCHREIER, P. H. (2005). A H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-producing glyoxal oxidase is required for filamentous growth and pathogenicity in *Ustilago maydis*. *Mol Genet Genomics* **272**, 639-650.
- LI, C., und HUNG WONG, W. (2001). Model-based analysis of oligonucleotide arrays: model validation, design issues and standard error application. *Genome Biol* **2**, RESEARCH0032.
- LI, C., und WONG, W. H. (2003). DNA-Chip Analyzer (dChip). In The analysis of gene expression data: methods and software, E. S. G. by Giovanni Parmigiani, Rafael A. Irizarry, Scott L. Zeger, ed. (Springer).

- LOUBRADOU, G., BRACHMANN, A., FELDBRÜGGE, M., und KAHMANN, R.** (2001). A homologue of the transcriptional repressor Ssn6p antagonizes cAMP signalling in *Ustilago maydis*. *Mol Microbiol* **40**, 719-730.
- MADHANI, H. D., und FINK, G. R.** (1997). Combinatorial control required for the specificity of yeast MAPK signaling. *Science* **275**, 1314-1317.
- MARIN, M., KARIS, A., VISSER, P., GROSVELD, F., und PHILIPSEN, S.** (1997). Transcription factor Sp1 is essential for early embryonic development but dispensable for cell growth and differentiation. *Cell* **89**, 619-628.
- MARTINEZ-ESPINOZA, A. D., GARCIA-PEDRAJAS, M. D., und GOLD, S. E.** (2002). The Ustilaginales as plant pests and model systems. *Fungal Genet Biol* **35**, 1-20.
- MENDGEN, K., und HAHN, M.** (2002). Plant infection and the establishment of fungal biotrophy. *Trends Plant Sci* **7**, 352-356.
- MILLER, J., MCLACHLAN, A. D., und KLUG, A.** (1985). Repetitive zinc-binding domains in the protein transcription factor IIIA from *Xenopus* oocytes. *EMBO J* **4**, 1609-1614.
- MÜLLER, P., AICHINGER, C., FELDBRÜGGE, M., und KAHMANN, R.** (1999). The MAP kinase kpp2 regulates mating and pathogenic development in *Ustilago maydis*. *Mol Microbiol* **34**, 1007-1017.
- MÜLLER, P., WEINZIERL, G., BRACHMANN, A., FELDBRÜGGE, M., und KAHMANN, R.** (2003). Mating and pathogenic development of the Smut fungus *Ustilago maydis* are regulated by one mitogen-activated protein kinase cascade. *Eukaryot Cell* **2**, 1187-1199.
- NAKAI, K., und HORTON, P.** (1999). PSORT: a program for detecting sorting signals in proteins and predicting their subcellular localization. *Trends Biochem Sci* **24**, 34-36.
- NATHUES, E., JOSHI, S., TENBERGE, K. B., VON DEN DRIESCH, M., OESER, B., BAUMER, N., MIHLAN, M., und TUDZYNSKI, P.** (2004). CPTF1, a CREB-like transcription factor, is involved in the oxidative stress response in the phytopathogen *Claviceps purpurea* and modulates ROS level in its host *Secale cereale*. *Mol Plant Microbe Interact* **17**, 383-393.
- NEWMAN, M. A., VON ROEPENACK-LAHAYE, E., PARR, A., DANIELS, M. J., und DOW, J. M.** (2002). Prior exposure to lipopolysaccharide potentiates expression of plant defenses in response to bacteria. *Plant J* **29**, 487-495.
- NEUZ, B., MICHALOVICH, D., BYGRAVE, A., PLOEMACHER, R., und GROSVELD, F.** (1995). Defective haematopoiesis in fetal liver resulting from inactivation of the EKLF gene. *Nature* **375**, 316-318.
- NÜRNBERGER, T., BRUNNER, F., KEMMERLING, B., und PIATER, L.** (2004). Innate immunity in plants and animals: striking similarities and obvious differences. *Immunol Rev* **198**, 249-266.
- OSBOURN, A. E.** (1996). Preformed Antimicrobial Compounds and Plant Defense against Fungal Attack. *Plant Cell* **8**, 1821-1831.
- PAPWORTH, M., KOLASINSKA, P., und MINCZUK, M.** (2006). Designer zinc-finger proteins and their applications. *Gene* **366**, 27-38.
- PARK, G., XUE, C., ZHENG, L., LAM, S., und XU, J. R.** (2002). *MST12* regulates infectious growth but not appressorium formation in the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. *Mol Plant Microbe Interact* **15**, 183-192.
- PASCHOLATI, S., DEISING, H., LEITI, B., ANDERSON, D., und NICHOLSON, R. L.** (1993). Cutinase and non-specific esterase activities in the conidial mucilage of *Colletotrichum graminicola*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **42**, 37-51.

- PAVLETICH, N. P., und PABO, C. O. (1991). Zinc finger-DNA recognition: crystal structure of a Zif268-DNA complex at 2.1 Å. *Science* **252**, 809-817.
- PECK, S. C., NUHSE, T. S., HESS, D., IGLESIAS, A., MEINS, F., und BOLLER, T. (2001). Directed proteomics identifies a plant-specific protein rapidly phosphorylated in response to bacterial and fungal elicitors. *Plant Cell* **13**, 1467-1475.
- PERKINS, A. C., SHARPE, A. H., und ORKIN, S. H. (1995). Lethal beta-thalassaemia in mice lacking the erythroid CACCC-transcription factor EKLF. *Nature* **375**, 318-322.
- PODILA, G. K., ROGERS, L. M., und KOLATTUKUDY, P. E. (1993). Chemical Signals from Avocado Surface Wax Trigger Germination and Appressorium Formation in *Colletotrichum gloeosporioides*. *Plant Physiol* **103**, 267-272.
- REGENFELDER, E., SPELLIG, T., HARTMANN, A., LAUENSTEIN, S., BÖLKER, M., und KAHMANN, R. (1997). G proteins in *Ustilago maydis*: Transmission of multiple signals? *EMBO J* **16**, 1934-1942.
- REHMANY, A. P., GORDON, A., ROSE, L. E., ALLEN, R. L., ARMSTRONG, M. R., WHISSON, S. C., KAMOUN, S., TYLER, B. M., BIRCH, P. R., und BEYNON, J. L. (2005). Differential recognition of highly divergent downy mildew avirulence gene alleles by RPP1 resistance genes from two *Arabidopsis* lines. *Plant Cell* **17**, 1839-1850.
- ROMEIS, T., BRACHMANN, A., KAHMANN, R., und KÄMPER, J. (2000). Identification of a target gene for the bE/bW homeodomain protein complex in *Ustilago maydis*. *Mol Microbiol* **37**, 54-66.
- ROMEIS, T., KÄMPER, J., und KAHMANN, R. (1997). Single-chain fusions of two unrelated homeodomain proteins trigger pathogenicity in *Ustilago maydis*. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**, 1230-1234.
- RUIZ-HERRERA, J., LEON, C. G., GUEVARA, O. L., und CARABEZ, T. A. (1995). Yeast-mycelial dimorphism of haploid and diploid strains of *Ustilago maydis*. *Microbiology* **141**, 695-703.
- SAMBROOK, J., FRISCH, E. F., und MANIATIS, T. (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbour, New York, Cold Spring Harbour Laboratory Press).
- SANGER, F., NICKLEN, S., und COULSON, A. R. (1992). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. 1977. *Biotechnology* **24**, 104-108.
- SCHAUWECKER, F., WANNER, G., und KAHMANN, R. (1995). Filament-specific expression of a cellulase gene in the dimorphic fungus *Ustilago maydis*. *Biol Chem Hoppe-Seyler* **376**, 617-625.
- SCHERER, S., HEIMEL, K., STARKE, V., und KÄMPER, J. (2006). The Clp1 protein is required for clamp formation and pathogenic development of *Ustilago maydis*. *Plant Cell* **submitted**.
- SCHIRAWSKI, J., BÖHNERT, H. U., STEINBERG, G., SNETSELAAR, K., ADAMIKOWA, L., und KAHMANN, R. (2005). Endoplasmic reticulum glucosidase II is required for pathogenicity of *Ustilago maydis*. *Plant Cell* **17**, 3532-3543.
- SCHLESINGER, R., KAHMANN, R., und KÄMPER, J. (1997). The homeodomains of the heterodimeric bE and bW proteins of *Ustilago maydis* are both critical for function. *Mol Gen Genet* **254**, 514-519.
- SCHOFFELMEER, E. A., KLIS, F. M., SIETSMAN, J. H., und CORNELISSEN, B. J. (1999). The cell wall of *Fusarium oxysporum*. *Fungal Genet Biol* **27**, 275-282.
- SCHULTZ, J., MILPETZ, F., BORK, P., und PONTING, C. P. (1998). SMART, a simple modular architecture research tool: identification of signaling domains. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 5857-5864.

- SCHULZ, B., BANUETT, F., DAHL, M., SCHLESINGER, R., SCHÄFER, W., MARTIN, T., HERSKOWITZ, I., und KAHMANN, R. (1990). The *b* alleles of *U. maydis*, whose combinations program pathogenic development, code for polypeptides containing a homeodomain-related motif. *Cell* **60**, 295-306.
- SHASTRY, B. S. (1996). Transcription factor IIIA (TFIIIA) in the second decade. *J Cell Sci* **109** ( Pt 3), 535-539.
- SLEUMER, O. (1931). Über Sexualität und Zytologie von *Ustilago Zeae* (Beckm.) Unger. *Zeitschrift für Botanik; Verlag von Gustav Fischer; Jena* **25**, 209-262.
- SNETSELAAR, K. M. (1993). Microscopic observation of *Ustilago maydis* mating interactions. *Exp Mycol* **17**, 345-355.
- SNETSELAAR, K. M., BÖLKER, M., und KAHMANN, R. (1996). *Ustilago maydis* mating hyphae orient their growth toward pheromone sources. *Fungal Genetics and Biology* **20**, 299-312.
- SNETSELAAR, K. M., und MIMS, C. W. (1992). Sporidial fusion and infection of maize seedlings by the smut fungus *Ustilago maydis*. *Mycologia* **84**, 193-203.
- SNETSELAAR, K. M., und MIMS, C. W. (1993). Infection of maize stigmas by *Ustilago maydis*: Light and electron microscopy. *Phytopathology* **83**, 843.
- SNETSELAAR, K. M., und MIMS, C. W. (1994). Light and electron microscopy of *Ustilago maydis* hyphae in maize. *Mycol Res* **98**, 347-355.
- SONNHAMMER, E. L., EDDY, S. R., und DURBIN, R. (1997). Pfam: a comprehensive database of protein domain families based on seed alignments. *Proteins* **28**, 405-420.
- SOUTHERN, E. M. (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* **98**, 503-517.
- SPELLIG, T., BÖLKER, M., LOTTSPEICH, F., FRANK, R. W., und KAHMANN, R. (1994). Pheromones trigger filamentous growth in *Ustilago maydis*. *EMBO J* **13**, 1620-1627.
- SPELLIG, T., BOTTIN, A., und KAHMANN, R. (1996). Green fluorescent protein (GFP) as a new vital marker in the phytopathogenic fungus *Ustilago maydis*. *Mol Gen Genet* **252**, 503-509.
- STEINBERG, G., SCHLIWA, M., LEHMLER, C., BÖLKER, M., KAHMANN, R., und MCINTOSH, J. R. (1998). Kinesin from the plant pathogenic fungus *Ustilago maydis* is involved in vacuole formation and cytoplasmic migration. *J Cell Sci* **111**, 2235-2246.
- STEINBERG, G., WEDLICH-SÖLDNER, R., BRILL, M., und SCHULZ, I. (2001). Microtubules in the fungal pathogen *Ustilago maydis* are highly dynamic and determine cell polarity. *J Cell Sci* **114**, 609-622.
- STRAUBE, A., BRILL, M., OAKLEY, B. R., HORIO, T., und STEINBERG, G. (2003). Microtubule organization requires cell cycle-dependent nucleation at dispersed cytoplasmic sites: polar and perinuclear microtubule organizing centers in the plant pathogen *Ustilago maydis*. *Mol Biol Cell* **14**, 642-657.
- STRAUBE, A., ENARD, W., BERNER, A., WEDLICH-SÖLDNER, R., KAHMANN, R., und STEINBERG, G. (2001). A split motor domain in a cytoplasmic dynein. *Embo J* **20**, 5091-5100.
- SUZUKI, M., GERSTEIN, M., und YAGI, N. (1994). Stereochemical basis of DNA recognition by Zn fingers. *Nucleic Acids Res* **22**, 3397-3405.
- TENA, G., ASAI, T., CHIU, W. L., und SHEEN, J. (2001). Plant mitogen-activated protein kinase signaling cascades. *Curr Opin Plant Biol* **4**, 392-400.



- TSUKUDA, T., CARLETON, S., FOTHERINGHAM, S., und HOLLOMAN, W. K.** (1988). Isolation and characterization of an autonomously replicating sequence from *Ustilago maydis*. *Mol Cell Biol* **8**, 3703-3709.
- URBAN, M., KAHMANN, R., und BÖLKER, M.** (1996). Identification of the pheromone response element in *Ustilago maydis*. *Mol Gen Genet* **251**, 31-37.
- VAN DEN BURG, H. A., SPRONK, C. A., BOEREN, S., KENNEDY, M. A., VISSERS, J. P., VUISTER, G. W., DE WIT, P. J., und VERVOORT, J.** (2004). Binding of the AVR4 elicitor of *Cladosporium fulvum* to chitotriose units is facilitated by positive allosteric protein-protein interactions: the chitin-binding site of AVR4 represents a novel binding site on the folding scaffold shared between the invertebrate and the plant chitin-binding domain. *J Biol Chem* **279**, 16786-16796.
- VAN DEN BURG, H. A., WESTERINK, N., FRANCOIJS, K. J., ROTH, R., WOESTENENK, E., BOEREN, S., DE WIT, P. J., JOOSTEN, M. H., und VERVOORT, J.** (2003). Natural disulfide bond-disrupted mutants of AVR4 of the tomato pathogen *Cladosporium fulvum* are sensitive to proteolysis, circumvent Cf-4-mediated resistance, but retain their chitin binding ability. *J Biol Chem* **278**, 27340-27346.
- VRANEŠ, M., FLOR-PARRA, I., KÄMPER, J., und PÉREZ-MARTÍN, 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.
- WANG, J., HOLDEN, D. W., und LEONG, S. A.** (1988). Gene transfer system for the phytopathogenic fungus *Ustilago maydis*. *Proc Natl Acad Sci USA* **85**, 865-869.
- WEBER, I., GRUBER, C., und 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.
- WEDLICH-SÖLDNER, R., BÖLKER, M., KAHMANN, R., und STEINBERG, G.** (2000). A putative endosomal t-SNARE links exo- and endocytosis in the phytopathogenic fungus *Ustilago maydis*. *EMBO J* **19**, 1974-1986.
- WEDLICH-SÖLDNER, R., SCHULZ, I., STRAUBE, A., und STEINBERG, G.** (2002a). Dynein supports motility of endoplasmic reticulum in the fungus *Ustilago maydis*. *Mol Biol Cell* **13**, 965-977.
- WEDLICH-SÖLDNER, R., STRAUBE, A., FRIEDRICH, M. W., und STEINBERG, G.** (2002b). A balance of KIF1A-like kinesin and dynein organizes early endosomes in the fungus *Ustilago maydis*. *EMBO J* **21**, 2946-2957.
- WEINZIERL, G.** (2001) Isolierung und Charakterisierung von Komponenten der b-vermittelten Regulationskaskade in *Ustilago maydis*, Dissertation, Philipps-Universität Marburg, Marburg.
- WEISE, M. V.** (1987). *Compendium of Wheat Diseases, 2nd ed.*, APS Press, St. Paul).
- WÖSTEN, H. A., BOHLMANN, R., ECKERSKORN, C., LOTTSPREICH, F., BÖLKER, M., und KAHMANN, R.** (1996). A novel class of small amphipathic peptides affect aerial hyphal growth and surface hydrophobicity in *Ustilago maydis*. *EMBO J* **15**, 4274-4281.
- ZHANG, S., DU, H., und KLESSIG, D. F.** (1998). Activation of the tobacco SIP kinase by both a cell wall-derived carbohydrate elicitor and purified proteinaceous elicitors from *Phytophthora* spp. *Plant Cell* **10**, 435-450.

## **Anhang**

### **5.1 Daten CD**

#### **5.1.1 Microarray-Daten**

## **Danksagung**

Als erstes möchte ich mich an dieser Stelle bei meine Eltern bedanken, die mich nicht nur während meiner Doktorarbeit mit allen Kräften unterstützt haben. Ohne Eure Unterstützung und Euer Verständnis wäre ich sicherlich nicht da, wo ich heute bin.

Mein Dank gilt auch Jörg Kämper nicht nur für das Überlassen dieses spannenden Themas, sondern auch für die vielen Freiheiten und seine Unterstützung während der Doktorarbeit und vor allem während des Zusammenschreibens. In diesem Rahmen möchte ich mich auch ganz herzlich bei Regine Kahmann für ihre Unterstützung und ihr Vertrauen während meiner Doktorarbeit und des Zusammenschreibens bedanken. Den Mitgliedern der Promotionskommission danke ich für die freundliche Übernahme der Gutachten und ihre Mühen.

Mein ganz besonderer Dank gilt natürlich meinen Mitstreitern im b-Labor. Als erstes möchte ich mich bei Mario bedanken, unserem Dienstältesten... na, ich glaub ich war vor dir da ☺, zumindestens die Praktikantenzeit mitgezählt. Ich muss sagen Mario, es war ein langer, aber dennoch recht angenehmer Weg. Ich werde so manchen Abend im Sudhaus vermissen; oder die ein oder andere Zugfahrt mit dem ein oder anderen Weizen in der Hand. Chet möchte ich dafür danken, dass er es mit seiner Begeisterungsfähigkeit für alltägliche Dinge schafft, mich immer wieder ins Staunen zu versetzen. Bei Volker möchte ich mich für seine gute Laune bedanken; ich kenne keinen Menschen, der ein breiteres Grinsen hat ☺. Bei Kai möchte ich mich ebenfalls für seine gute Laune und vor allem für das ein oder andere aufmunternde Wort bedanken. Tja Ramon, dir gilt mein Dank nicht nur als einem Laborkollegen und Benchnachbarn, sondern auch als einem guten Freund.

Bei Kathi möchte ich mich nicht nur fürs Korrekturlesen, sondern auch für die ganzen Jahre in Marburg bedanken und fürs Mitorganisieren des jährlichen „Grill die Sau“-Events. Da sind noch Evelyn und Janine denen ich ebenfalls für die lustige Zeit in Marburg danken möchte.

Zuguterletzt möchte ich mich bei allen „ehemaligen“ Marburgern bzw. Quasi-Marburgern Christiane, Inga, Ute, Sabine, Philip, Nico und Rocco bedanken..., die nächste Sau kommt bestimmt.

# Lebenslauf

## Persönliche Angaben

---

	Miroslav Vraneš
Geburtsdatum	13.12.1976
Geburtsort	Krefeld

## Werdegang

---

1983-1987	Grundschule Krefeld
1987-1996	Besuch des Gymnasiums Fabritianum Uerdingen, Krefeld
Mai. 1996	Abschluss: Abitur
1997-2002	Studium der Biologie an der Philipps-Universität Marburg Hauptfächer: Genetik, Mikrobiologie und Virologie kombiniert mit Biochemie
Nov. 2001-Aug. 2002	Diplomarbeit am Max-Planck-Institut für terrestrische Mikrobiologie, Marburg; Thema „Untersuchungen zur Lokalisierung und Interaktion der Transmembranproteine Dik6 und Dkh6 in <i>Ustilago maydis</i> “.
Okt. 2002	Abschluss: Diplom in Biologie
Dez. 2002-Feb. 2006	Dissertation am Max-Planck-Institut für terrestrische Mikrobiologie, Marburg; Betreuer: Prof. Dr. Jörg Kämper Thema: „Transkriptom-Analyse der frühen Infektionsphase von <i>Ustilago maydis</i> : Identifikation neuer pathogenitätsrelevanter Gene“

