

Lichtregulation der Genexpression und Entwicklung in *Ustilago maydis*

Dissertation

zur

Erlangung des Grades eines
Doktor der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)
des Fachbereichs Biologie
der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Annika Brych

geboren in Hagen

Marburg, 2020

Light regulation of gene expression and development in *Ustilago maydis*

Doctoral thesis

for obtaining the degree
Doctor of Natural Science
(Dr. rer. nat.)
in the department of Biology
at the Philipps-Universität Marburg

presented by

Annika Brych

born in Hagen

Marburg, 2020

Die Untersuchungen zur vorliegenden Dissertation wurden in der Zeit von Januar 2015 bis Juni 2020 unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Alfred Batschauer am Fachbereich Biologie der Philipps-Universität Marburg durchgeführt.

Vom Fachbereich Biologie der Philipps-Universität Marburg (Hochschulkenziffer 1180) als Dissertation angenommen am

Erstgutachter: Prof. Dr. Alfred Batschauer

Zweitgutachter: Prof. Dr. Michael Bölker

Tag der Disputation: 29.10.2020

Die Publikation von Teilen dieser Arbeit ist in Vorbereitung:

Brych, A., Haas, F., Parzefall, K., Panzer, S., Bräuer, J., Engelsdorf, T., Terpitz U., Rensing, S.A., Kiontke, S., Batschauer, A. 2020. Coregulation of gene expression by White collar 1 and phytochrome in *Ustilago maydis*.

Sonstige Publikationen:

Panzer, S., **Brych, A.**, Batschauer, A., Terpitz, U. 2019. Opsin 1 and opsin 2 of the corn smut fungus *Ustilago maydis* are green light-driven proton pumps. *Front. Microbiol.* 10:735.

Brych, A., Mascarenhas J., Jaeger, E., Charkiewicz, E., Pokorny, R., Bölker, M., Doehlemann, G., Batschauer, A. 2016. White collar 1-induced photolyase expression contributes to UV-tolerance of *Ustilago maydis*. *MicrobiologyOpen* 5(2): 224-243

Summary

In this thesis the largely unknown photobiology of the basidiomycete *Ustilago maydis* was investigated. Transcriptomic analysis showed that dark-adapted *U. maydis* sporidia were able to perceive monochromatic blue, red and far-red light and in response regulated the expression of numerous genes. In FB1 wild-type, in total 404 genes were differentially expressed in one or more light conditions, which corresponds to around 5.9 % of the protein coding genes in *U. maydis*.

White-collar 1 (Wco1) was identified as the essential photoreceptor for blue light conditions and phytochrome (Phy1) as photoreceptor for red and far-red light conditions, respectively. But Wco1 also influenced the gene expression in red and far-red light and Phy1 had an effect on the number of differentially expressed genes in blue light. Additionally, both photoreceptors also showed a light-independent function.

Functional analysis revealed many blue light-regulated genes with a role in oxidation-reduction processes and also metabolism was affected by genes differentially expressed among all three light conditions. Furthermore, expression of genes for the synthesis of ferrichromes was regulated by Wco1 in the dark.

Localization studies showed Wco1 and Wco2 mainly in the nucleus and in less concentration in the cytoplasm. Phy1 on the other hand was found nearly exclusively in the cytoplasm. No evidence for a direct interaction of Wco1, Wco2 and Phy1 was found by yeast-two-hybrid analysis.

Next to the light effect on gene expression the importance of light, Wco1 and Phy1 for the development of *U. maydis* was investigated. Blue and red light showed a minor inhibitory effect on the formation of conjugation tubes and this light-dependency was abolished in $\Delta wco1$ and $\Delta phy1$ deletion mutants. Neither treatment with several light conditions nor the deletion of Wco1 or Phy1 had an impact on the ability of compatible *U. maydis* cells to form filaments. Lastly, pathogenicity was slightly reduced in $\Delta wco1$ compared to wild-type.

Thus, light and the photoreceptors Wco1 and Phy1 only had a low regulatory effect on development, at least in the experimental conditions used in the presented studies.

Inhaltsverzeichnis

Summary	i
Inhaltsverzeichnis	ii
Abkürzungsverzeichnis	vi
I. Einleitung	1
I.1 Lichtperzeption in Pilzen	1
I.2 Pilzliche Photorezeptoren	3
I.2.1 Blaulichtrezeptoren	4
I.2.1.1 Der White-collar Komplex	4
I.2.1.2 Photolyasen und Cryptochrome	8
I.2.1.3 BLUF-Domänen Proteine	9
I.2.2 Grünlichtrezeptoren	10
I.2.3 Rot- und Dunkelrotlichtrezeptoren	11
I.3 <i>Ustilago maydis</i> als Modellorganismus	14
I.3.1 Pheromonantwort	15
I.3.2 Filamentation	16
I.3.3 Infektion von Maispflanzen	16
I.4 Zielsetzung	17
II. Material und Methoden	19
II.1 Material	19
II.1.1 Besondere Chemikalien und Verbrauchsmaterialien	19
II.1.2 <i>Ustilago maydis</i> Zelllinien	20
II.1.3 Weitere Zelllinien	21
II.1.4 Plasmide	22
II.1.5 Oligonukleotide	22
II.1.6 Geräte	24
II.2 Methoden	26
II.2.1 Molekularbiologische Methoden	26
II.2.1.1 Klonierung über Restriktionsschnittstellen	26

II.2.1.2 Gibson-Klonierung.....	27
II.2.1.3 <i>In-vivo</i> Ligation in Hefe	27
II.2.1.4 Polymerase-Ketten-Reaktionen	28
II.2.1.5 Restriktionsverdau.....	29
II.2.1.6 Agarosegel-Elektrophorese	30
II.2.1.7 Herstellung chemisch kompetenter Hefe	30
II.2.1.8 Transformation von <i>S. cerevisiae</i>	31
II.2.1.9 Transformation von <i>E. coli</i>	32
II.2.1.10 Plasmidisolierung aus <i>E. coli</i> und <i>S. cerevisiae</i>	32
II.2.1.11 Protoplastierung von <i>U. maydis</i>	32
II.2.1.12 Transformation von <i>U. maydis</i>	33
II.2.1.13 DNA-Extraktion aus <i>U. maydis</i>	33
II.2.1.14 Southern Blot.....	34
II.2.1.15 RNA-Isolation aus <i>U. maydis</i>	36
II.2.1.16 DNase-Verdau und RNA-Aufreinigung	37
II.2.1.17 Bioanalyser.....	37
II.2.1.18 Reverse Transkription	38
II.2.1.19 Quantitative Realtime-PCR.....	38
II.2.2 Transkriptomanalyse.....	39
II.2.2.1 Belichtungsexperiment	39
II.2.2.2 RNA-Sequenzierung und Datenanalyse	40
II.2.2.3 Funktionelle Analyse	41
II.2.2.4 Expression Licht-abhängiger Gene während der biotrophen Entwicklung.....	41
II.2.3 Fluoreszenzmikroskopie	42
II.2.4 Interaktionsanalyse über Hefe-2-Hybrid-Konstrukte	43
II.2.4.1 Wachstum auf Auxotrophie-Platten	44
II.2.4.2 α -Galactosidase-Assay.....	45
II.2.5 Pheromon-Assay	46
II.2.6 Filamentation	46
II.2.7 Maisinfektion.....	47

III. Ergebnisse.....	49
III.1 Der Effekt von Licht auf die Genexpression von <i>Ustilago maydis</i>	49
III.1.1 Identifikation der Photorezeptoren für die Lichtantwort.....	51
III.1.2 Die Licht-unabhängige Funktion der Photorezeptoren	52
III.1.3 Funktionelle Analyse der differentiell exprimierten Gene.....	53
III.2 Ein möglicher Komplex aus White-collar-Proteinen und Phytochrom.....	57
III.2.1 Die Lokalisation der Blau- und Rotlichtrezeptoren.....	57
III.2.2 Interaktionsanalyse mittels Hefe-2-Hybrid	58
III.3 Einfluss von Licht auf Entwicklungsprozesse in <i>U. maydis</i>	62
III.3.1 Pheromonantwort und Ausbildung von Konjugationshyphen.....	62
III.3.2 Lichtregulation der Filamentation	65
III.3.3 Die Bedeutung von White-collar 1 für die Pathogenität von <i>U. maydis</i>	69
III.4 Charakterisierung der Opsine aus <i>U. maydis</i>	71
III.4.2 Expression der Opsine.....	71
III.4.1 Einfluss der Opsine auf die Pathogenität von <i>U. maydis</i>	72
III.4.2 Lokalisation der Opsine.....	74
IV. Diskussion.....	76
IV.1 Lichtantwort in <i>U. maydis</i>	76
IV.2 Das Zusammenspiel von Blaulicht- und Rotlicht-Photorezeptoren	77
IV.2.1 Interaktion zwischen White-collar Komplex und Phy1	79
IV.3 Funktion der Licht-regulierten Gene in <i>U. maydis</i>	81
IV.3.1 Energieerzeugung abhängig vom Nährstoffangebot	81
IV.3.2 Vorbereitung auf Stress	84
IV.4 Weitere Licht-abhängige Gene in <i>U. maydis</i>	84
IV.5 Lichteffekte auf die Entwicklung von <i>U. maydis</i>	86
IV.6 Einfluss von Licht auf die Symptomausprägung auf der Maispflanze	88
IV.7 Mögliche Lichteffekte auf die Sporenkeimung	90
V. Zusammenfassung	91
VI. Literaturverzeichnis	92

VII. Anhang.....	102
VII.1 Die Gene der Lichtantwort in <i>U. maydis</i>	102
VII.2 Prozentualer Anteil an Zellen mit Konjugationshyphen.....	111
VII.3 Koloniemorphologie verschiedener Photorezeptormutanten	112
VII.4 Symptome bei Infektionen im Gewächshaus bzw. in LED-Kammern	115
Danksagung	117
Lebenslauf	118
Erklärung	119

Abkürzungsverzeichnis

<i>A. nidulans</i>	<i>Aspergillus nidulans</i>	Met	Methionin
AbA	Aureobasidin A	<i>mfa1</i>	<i>a1-specific mating factor</i> aus <i>U. maydis</i>
<i>blr-1</i> <i>blr-2</i>	White-collar Homologe aus <i>A. nidulans</i>	MTHF	Methylentetrahydrofolat
BLUF	<i>blue light sensing using FAD</i>	<i>N. crassa</i>	<i>Neurospora crassa</i>
<i>cry1</i> <i>cry2</i>	DASH-Cryptochrome aus <i>U. maydis</i>	<i>ops1</i> <i>ops2</i> <i>ops3</i>	Opsine aus <i>U. maydis</i>
<i>cyc1</i>	Cyclophilin aus <i>U. maydis</i>	PAS	Per, Arnt, Sim
DASH	<i>Drosophila, Arabidopsis, Synechocystis, Human</i>	PHR	Photolyase-homologe Region
DDO	<i>double dropout</i> Medium	<i>phr1</i> <i>phr2</i>	CPD- bzw. (6-4)-Photolyase aus <i>U. maydis</i>
DIG	Digoxigenin	PHY	Phytochrom-spezifische Domäne
DNA	Desoxyribonukleinsäure	<i>phy1</i>	Phytochrom aus <i>U. maydis</i>
FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid	RNA	Ribonukleinsäure
<i>fphA</i>	Phytochrom aus <i>A. nidulans</i>	RRD	<i>response regulator</i> Domäne
GAF	cGMP-spezifische Phosphodiesterase/ <i>Anabaena</i> Adenylatcyclase/ <i>E. coli</i> FhIA-Domäne	SDO	<i>Single dropout</i> Medium
Gal4 AD	Gal4 Aktivierungsdomäne	SIM	<i>structured illumination</i> Mikroskop
Gal4 BD	Gal4 DNA-Bindedomäne	TDO	<i>triple dropout</i> Medium
GFP	Grün fluoreszierendes Protein	Trp	Tryptophan
His	Histidin	<i>U. m.</i> <i>U. maydis</i>	<i>Ustilago maydis</i>
HKD	Histidinkinasedomäne	<i>wc-1</i> <i>wc-2</i>	White-collar Homologe aus <i>N. crassa</i>
Leu	Leucin	WCC	White-collar Komplex
LOV	<i>light, oxygen, voltage</i>	<i>wco1</i> <i>wco2</i>	White-collar Homologe aus <i>U. maydis</i>

I. Einleitung

I.1 Lichtperzeption in Pilzen

„*Nichts in der Biologie macht Sinn außer im Licht der Evolution*“ (Dobzhansky 1973). Dass der abiotische Faktor Licht bei der Evolution eine wichtige Rolle spielt, wird daran deutlich, dass Lichtsensoren in vielen verschiedenen Organismen zu finden sind. Dabei wird Licht in einigen Lebewesen für die Orientierung genutzt, in anderen auch als Energiequelle.

Tiere nutzen Licht hauptsächlich als Informationsquelle, um sich in ihrer direkten Umgebung zu orientieren und beispielsweise potentielle Partner oder Nahrungsquellen zu finden. Dabei dient die Lichtintensität vielen Tieren als Signal für ihre Aktivität, wobei zwischen tages-, dämmerungs- und nachtaktiven Tieren unterschieden wird. Die Tageslänge spielt zum Beispiel für Vögel bei der Entscheidung für den Vogelzug eine wichtige Rolle und Insekten nutzen die spektralen Eigenschaften von Licht, um Blütenfarben zu erkennen und Nahrung zu finden (Müller und Geinitz 1999).

Pflanzen, wie auch einige Algen und Bakterien, nutzen das Sonnenlicht dagegen hauptsächlich, um im Zuge der Photosynthese aus Wasser und Kohlenstoffdioxid energiereiche organische Moleküle zu generieren und sind dabei stets bemüht, eine optimale Lichtausbeute für die Photosynthese aufrecht zu erhalten (Fischer *et al.* 2016).

Obwohl Pflanzen als sessile Organismen nicht in der Lage sind, sich ihre Umgebung aktiv auszusuchen, nutzen sie das Sonnenlicht ebenfalls als Informationsquelle, um sich in ihrer Umwelt zu orientieren (Schäfer und Nagy 2006). Ein geringes Verhältnis von rotem zu dunkelrotem Licht beispielsweise bedeutet für sie, dass sie sich in der Nähe oder unter einem Blätterdach weiterer Pflanzen befinden, die um das Sonnenlicht konkurrieren. Es kommt zur Schattenvermeidungsreaktion, bei der Pflanzen mit einem verstärkten Sprosswachstum reagieren. Dagegen weisen hohe Anteile an UV- und Blaulicht auf ungefiltertes Licht hin und diese Reaktion wird gestoppt (Fraser *et al.* 2016). Auch die Länge der Lichtphase und ihre Intensität ist für Pflanzen von Bedeutung, sie bestimmen beispielsweise den optimalen Zeitpunkt für die Blüten- oder die Samenbildung (Schäfer und Nagy 2006; Spudich und Briggs 2005).

Pilze nutzen Sonnenlicht ausschließlich als Informationsquelle (Yu und Fischer 2019). Die meisten Pilze sind saprophytische Organismen, die überwiegend im Boden oder in organischem Material leben. Gelangen sie dann an die Oberfläche ändert sich ihre Umgebung teilweise dramatisch. So dient Licht vielen Pilzen als Hinweis auf Unterschiede in Feuchtigkeit, Temperatur oder Wasserverfügbarkeit und auch für das Vorhandensein von Stress,

beispielsweise hervorgerufen durch den UV-Anteil des Sonnenspektrums, der DNA-Schäden und andere reaktive Sauerstoffspezies erzeugen kann (Rodriguez-Romero *et al.* 2010).

Obwohl Pilze weder photosynthetisch aktiv sind, noch nebenstehende Objekte erkennen können (Fuller *et al.* 2015), wird vermutet, dass die Mehrzahl der pilzlichen Spezies Lichtantworten zeigen. Mittlerweile wurden eine ganze Reihe an biologischen Prozessen identifiziert (Abb. I.1), die in pilzlichen Organismen durch Licht reguliert werden, wobei das gesamte Sonnenspektrum, vom ultravioletten bis zum infraroten Bereich, abgedeckt ist.

In mehreren Pilzarten wurde eine Lichtregulation des Sekundärmetabolismus nachgewiesen. In den Hyphen von *Neurospora crassa* wird Blaulicht-abhängig die Biosynthese von Carotenoiden als photoprotektive Pigmente induziert (Abb. I.1), so dass diese eine orange Farbe aufweisen. In *Aspergillus nidulans* wird die Synthese des Mykotoxins Sterigmatocystin und des Antibiotikums Penicillin durch Weißlicht reguliert (Casas-Flores und Herrera-Estrella 2016; Fischer *et al.* 2016; Harding und Turner 1981).

In *Neurospora crassa* konnte gezeigt werden, dass die circadiane Uhr einer Feinregulation durch Licht unterliegt (Abb. I.1), so dass unter anderem Wachstumsrate und Konidienbildung an die vorherrschenden Bedingungen angepasst werden können (Sargent *et al.* 1966).

In einigen Pilzen wie *Aspergillus nidulans* ist die Reproduktionsweise durch Licht kontrolliert (Abb. I.1). Im Dunkeln werden vor allem sexuelle Fruchtkörper gebildet, sowohl blaues als auch rotes Licht bewirken dagegen eine vermehrte asexuelle Reproduktion über Konidiosporen (Bayram *et al.* 2010; Blumenstein *et al.* 2005). In *Botrytis cinerea* ist die Bildung von Konidien dagegen durch blaues Licht gehemmt. Diese Inhibierung wird durch rotes Licht aufgehoben und durch dunkelrotes Licht wiederum verstärkt (Fischer *et al.* 2016). Weitere photomorphogenetische Entwicklungen wurden für Basidiomyceten wie *Coprinopsis cinerea* oder *Cryptococcus neoformans* gefunden (Idnurm und Heitman 2005; Kües *et al.* 1998).

Die Fruchtkörper von *Phycomyces blakesleeana* zeigen eine phototropische Reaktion (Abb. I.1). Sie wachsen in Richtung von blauem und nahem UV-Licht und wenden sich von kurzwelligen UV-Quellen ab (Idnurm *et al.* 2006).

Auch die Bedeutung von Licht für die Pathogenität verschiedener Pilze wurde im Laufe der letzten Jahre immer deutlicher. Zum Beispiel sind die Läsionen infizierter Pflanzen durch *Colletotrichum acutatum* bei Inkubation im Licht größer im Vergleich zum Dunkeln (Yu *et al.* 2013). Beim Reispfadenpilz *M. oryzae* bewirkt eine Bestrahlung mit Licht dagegen eine geringere Virulenz (Kim *et al.* 2011).

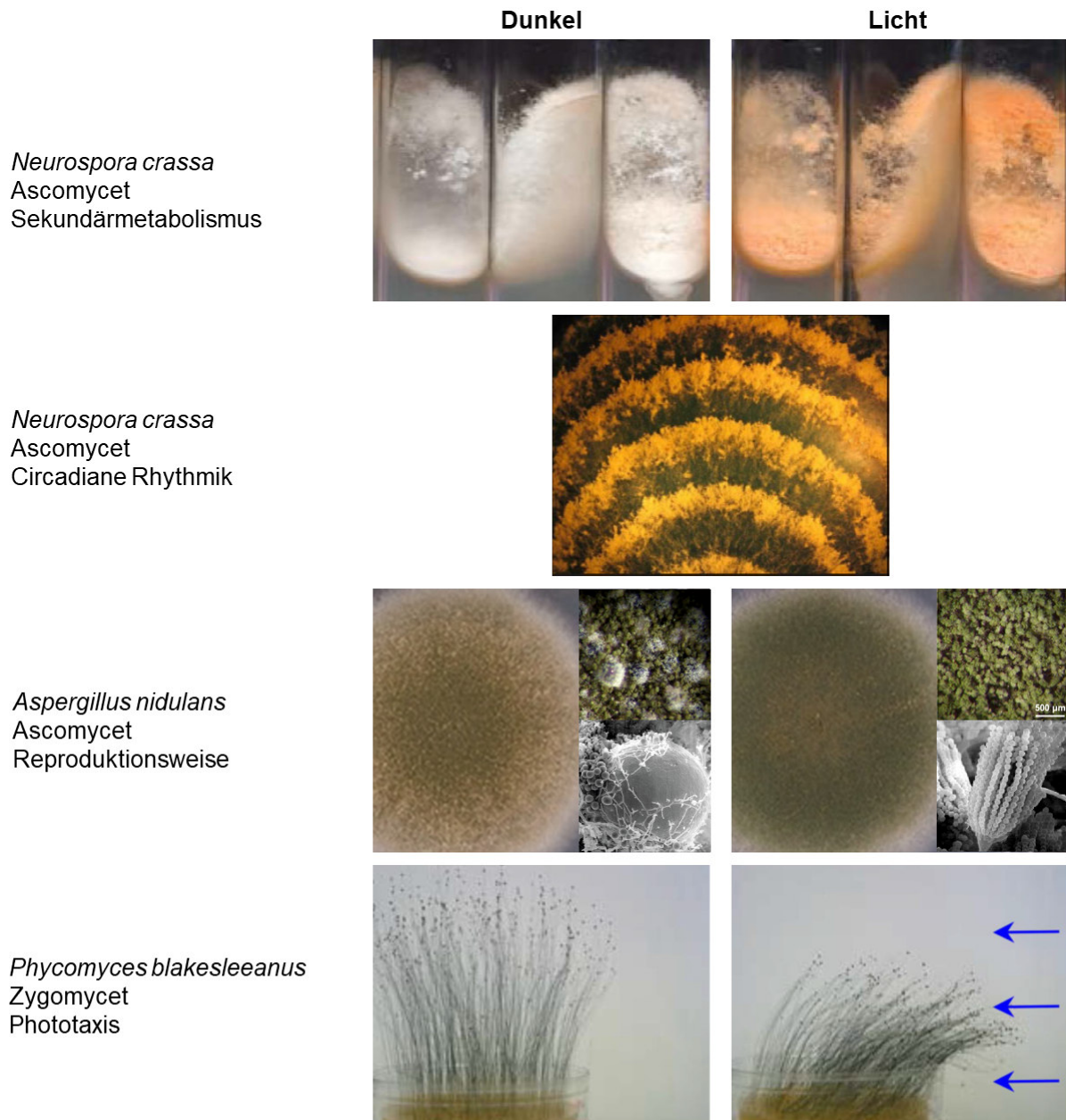


Abbildung I.1: Beispiele für Licht-regulierte Prozesse in Pilzen. Licht-abhängige Biosynthese von Carotenoiden färbt das Mycelium in *Neurospora crassa* orange. Auf Agar-Platten zeigt *N. crassa* eine rhythmische Sporenbildung, was auf Kontrolle durch eine circadiane Uhr hindeutet. In *Aspergillus nidulans* ist die Balance zwischen sexueller und asexueller Fortpflanzung Licht-abhängig. Im Dunkeln werden mehr sexuelle Fruchtkörper gebildet, im Licht dominiert die Anzahl asexueller Konidiosporen. In *Phycomyces blakesleeanus* zeigen Macrophoren phototropisches Wachstum in Richtung einer Lichtquelle (Fischer *et al.* 2016; Rodriguez-Romero *et al.* 2010; Yu und Fischer 2019).

I.2 Pilzliche Photorezeptoren

Im Laufe der Evolution haben sich in Pilzen unterschiedliche Photorezeptoren entwickelt, um Licht zu erkennen und darauf zu reagieren. Allgemein ist der Proteinanteil der Photorezeptoren fast immer mit einem weiteren Molekül assoziiert, dem Chromophor, der sichtbares Licht absorbiert und dadurch aktiviert wird. Er besteht entweder aus aromatischen

Aminosäureresten oder anderen Systemen konjugierter π -Elektronen. Licht führt zunächst zu Konformationsänderungen des Chromophors, welche im Anschluss den Proteinanteil des Photorezeptors beeinflusst, so dass dieser aktiviert wird (Yu und Fischer 2019). Pilze verfügen über Flavin-bindende Blaulichtrezeptoren, Retinal-bindende Grünlichtsensoren und Proteine mit einem linearen Tetrapyrrol als Chromophor, die im roten Spektralbereich aktiviert werden (Yu und Fischer 2019).

In dem phytopathogenen Pilz *Ustilago maydis* wurden über bioinformatische Sequenzvergleiche putative Photorezeptoren unterschiedlicher Arten gefunden, sie werden im Folgenden vorgestellt (Abb. I.2).

I.2.1 Blaulichtrezeptoren

Blaulichtrezeptoren werden im Allgemeinen in drei Hauptklassen unterteilt. In allen wird ein Flavinmolekül gebunden, das durch Absorption von Blaulichtphotonen aktiviert wird. Der Unterschied zwischen den Klassen liegt in der Struktur der Domäne, die den Chromophor bindet. Es gibt Proteine mit einer LOV-Domäne (*light, oxygen, voltage*), die Cryptochrom/Photolyase-Familie, die eine andere, für diese Rezeptoren spezielle Domäne für die Chromophorbindung aufweisen und Proteine mit einer BLUF-Domäne (*blue-light sensor using FAD*) (Yu und Fischer 2019).

I.2.1.1 Der White-collar Komplex

Ein wichtiger Blaulichtrezeptor, der mittlerweile in vielen Pilzen identifiziert und charakterisiert wurde, ist White-collar 1 (WC-1) aus *Neurospora crassa*, der zusammen mit WC-2 den sogenannten White-collar Komplex (WCC) bildet (Fischer *et al.* 2016; Talora *et al.* 1999). Die Proteine wurden nach dem Phänotyp von Kolonien benannt, die im Licht einen weißen Kranz unpigmentierter Hyphen um einen Kern oranger Konidien aufwiesen, denn Mutationen in den White-collar Proteinen führten in *N. crassa* zu einem Defekt in der Pigmentsynthese (Rodriguez-Romero *et al.* 2010; Harding und Shropshire 1980).

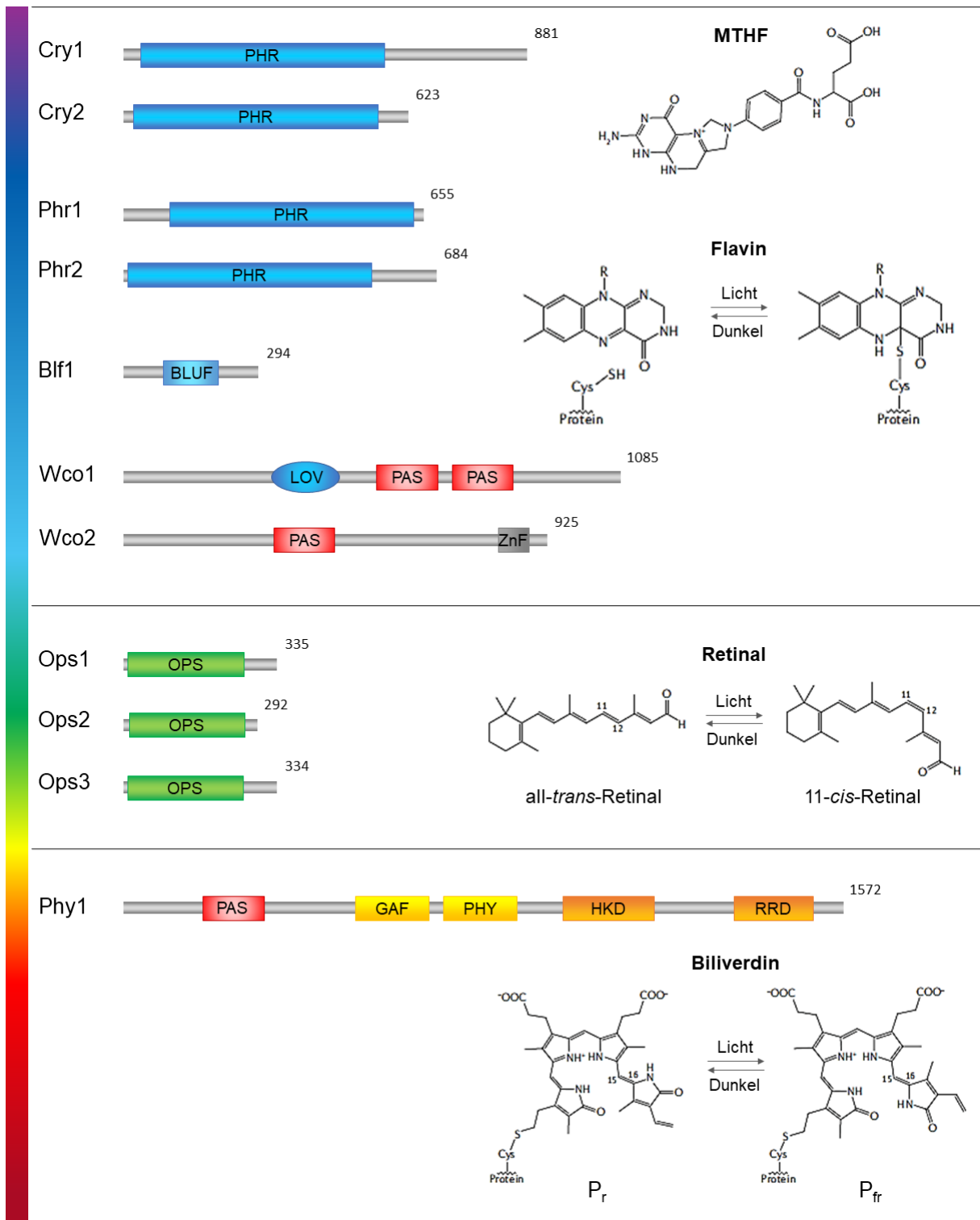


Abbildung I.2: Domänen- und Cofaktorstruktur der putativen Photorezeptoren in *U. maydis*. Cryptochrome (Cry1, Cry2) binden wie Photolyasen (Phr1, Phr2) ein Flavinmolekül an ihrer Photolyase-homologen Region (PHR) sowie teilweise ein Methylentetrahydrofolat (MTHF). In dem Protein Bif1 wird ein Flavin an der BLUF-Domäne (*blue light sensing using FAD*) gebunden, in White-collar 1 (Wco1) an der LOV-Domäne (*light-oxygen-voltage*). Für die Interaktion besitzen beide White-collar Proteine PAS-Domänen (Per, Arndt, Sim). Opsine (Ops1, Ops2, Ops3) binden den Chromophor Retinal. Phytochrom (Phy1) bindet kovalent Biliverdin an der PAS-Domäne im Licht-sensorischen Teil, zu dem außerdem eine GAF- (cGMP-spezifische Phosphodiesterase/*Anabaena* Adenylatcyclase/*E. coli* FhIA-Domäne) und eine PHY-Domäne (Phytochrom-spezifische Domäne) zählen. Eine HKD (Histidinkinasedomäne) und eine RRD (*response regulator* Domäne) fungieren in der Signalweiterleitung. Die Zahlen geben die Aminosäureanzahl der jeweiligen Proteine an.

LOV-Domänen, wie die in White-collar 1 oder pflanzlichem Phototropin (Ballario *et al.* 1996; Briggs *et al.* 2001), sind spezialisierte PAS-Domänen (Per, Arnt, Sim), die in Proteinen gefunden wurden, die an der Wahrnehmung von Licht, Sauerstoff oder Spannung (*light, oxygen, voltage*) beteiligt sind (Christie *et al.* 2012).

Im Dunkeln ist der Flavin-Chromophor vollständig oxidiert in die Bindetasche der LOV-Domäne eingebettet, er ist aber nicht kovalent an das Protein gebunden. Erst bei Absorption von blauem Licht durch das Flavin kommt es zur reversiblen Ausbildung eines kovalenten Addukts zwischen der C4 α -Carbonylgruppe des Isoalloxazinrings im Cofaktor und der Thiolgruppe eines konservierten Cysteins im Protein (Crosson und Moffat 2002; He *et al.* 2002; Pfeifer *et al.* 2009; Yu und Fischer 2019).

Da WC-1 und WC-2 in *N. crassa* über die jeweiligen PAS-Domänen interagieren, werden beide durch eine Konformationsänderung von WC-1 aktiviert (Ballario *et al.* 1998; Linden und Macino 1997).

In *N. crassa* und weiteren Ascomyceten, sowie in den Zygomyceten *P. blakesleeanus* oder *Mucor circinelloides* besitzen sowohl WC-1 als auch WC-2 am N-terminalen Ende eine Zinkfingerdomäne, über die der White-collar Komplex an Promotoren lichtabhängiger Gene binden kann. Im Gegensatz dazu besitzen die White-collar 1 Homologe von Basidiomyceten keine Zinkfingerdomäne und die DNA-Bindung erfolgt ausschließlich über die WC-2 Homologe (Bahn *et al.* 2007; Idnurm und Heitman 2005).

Im Licht rekrutiert der White-collar Komplex die Histon-Acetyltransferase NGF-1, die für eine Lockerung der Chromatinstruktur an Promotoren Licht-regulierter Gene sorgt und somit deren Transkription ermöglicht (Grimaldi *et al.* 2006).

In Transkriptomanalysen von *N. crassa* Zellen, die mit weißem Licht bestrahlt wurden, zeigten 3-6 % der Gene eine lichtabhängige Induktion der Genexpression. Aufgrund von Unterschieden in der Expressionskinetik wurden diese Gene in zwei Gruppen eingeteilt (Lewis *et al.* 2002; Chen *et al.* 2009).

Für eine erste Gruppe an Genen ergab sich ein Maximum der Transkripte nach 5-45 Minuten nach Einschalten von Licht. Diese deshalb als *early light-responsive* (ELRGs) bezeichneten Gene besaßen in ihren Promotoren die spezifischen Konsensussequenzen für die Bindung des White-collar Komplexes und wurden somit direkt durch den Photorezeptor induziert. Zu den Prozessen, die durch diese ERLGs beeinflusst waren, gehörten unter anderem der Sekundärmetabolismus, die Synthese photoprotektiver Pigmente sowie diverser Cofaktoren. Außerdem wurden Gene für die Antwort auf externe Stimuli induziert (Lewis *et al.* 2002; Chen *et al.* 2009).

Zum Beispiel gehörte das Gen Vivid, ein weiteres LOV-Domänen-Protein, zu dieser Gruppe induzierter Gene (Lewis *et al.* 2002; Chen *et al.* 2009). Bei länger anhaltender Belichtung ist Vivid dafür zuständig, dass die Genexpression allmählich auf die Aktivität im Dunkelzustand

zurückfällt. Für diesen Prozess der Photoadaptation interagiert das Protein direkt mit dem White-collar Komplex, um diesen zu regulieren (Schwerdtfeger und Linden 2003). In dem Basidiomyceten *Ustilago maydis* wurde kein Homolog dieses Gens gefunden. Ob es eine Photoadaptation in *U. maydis* gibt und in welcher Form diese abläuft, ist demnach noch unklar.

Neben der Regulation der Lichtantwort ist der White-collar Komplex in *N. crassa* auch direkt an der Feinabstimmung der circadianen Uhr beteiligt (Cha *et al.* 2008). Der White-collar Komplex induziert die Transkription des *frequency*-Gens (*frq*) durch die Bindung an die *clock-box* in dessen Promotor sowohl im Dunkeln als auch lichtabhängig (Liu *et al.* 2003; Cheng *et al.* 2001). Das exprimierte FRQ-Protein bildet zusammen mit der RNA-Helikase FRH einen zweiten Komplex (Cheng *et al.* 2005; Denault *et al.* 2001; Schafmeier und Diernfellner 2011), der dann mit dem White-collar Komplex im Zellkern interagiert und diesen nachfolgend durch Rekrutierung mehrerer Kinasen inaktiviert (Cha *et al.* 2008). Auch in diesem Fall kommt es also zu einer Feedback-Regulation zwischen dem White-collar Komplex und einem durch ihn kontrollierten Gen. Eine circadiane Rhythmik wurde in *Ustilago maydis* jedoch ebenfalls noch nicht beschrieben.

Unter den früh exprimierten Genen fanden sich weitere Transkriptionsfaktoren, die dann für eine zweite Welle der Induktion sorgen. Diese später induzierten Gene (LLRGs; *late light-responsive genes*) zeigten die stärkste Induktion nach 45-60 Minuten. Gene, die in dieser Phase der Bestrahlung reguliert wurden, konnten dem Kohlenhydrat-Metabolismus oder der Oxidation von Fettsäuren zugeordnet werden. Weiterhin wurden auch Gene für Komponenten der Entgiftung reaktiver Sauerstoffspezies gefunden (Lewis *et al.* 2002; Chen *et al.* 2009).

White-collar Komplexe und deren Funktion sind nachfolgend auch in mehreren anderen Pilzen beschrieben worden. Zum Beispiel in den Ascomyceten *Trichoderma atroviride* und *Trichoderma reesei*, in den Basidiomyceten *Cryptococcus neoformans* und *Coprinus cinereus*, sowie in den Zygomyceten *Phycomyces blakesleeana* und *Mucor circinelloides* wurden White-collar Komplexe als Blaulicht-abhängige Transkriptionsfaktoren charakterisiert und deren regulatorische Funktion auf diverse Prozesse untersucht (Bahn *et al.* 2007).

In *T. atroviride* waren wie in *N. crassa* die Biosynthese von Carotenoiden und die Feinsteuerung des circadianen Rhythmus durch Blaulicht und dem White-collar 1 Homolog BLR-1 reguliert. Zusätzlich wurde eine Blaulicht-abhängige Induktion von Phototropismus und Ausbildung reproduktiver Strukturen gefunden. Die Lichtabhängigkeit dieser Prozesse war in Deletionsmutanten der White-collar Gene nicht mehr vorhanden (Casas-Flores *et al.* 2004). In *Alternaria alternata* ist der White-collar Komplex am Sekundärmetabolismus und der Sporenbildung beteiligt (Pruss *et al.* 2014).

In verschiedenen pathogenen Systemen konnte zudem eine wichtige Rolle des White-collar Komplexes für die Pathogenität von Pilzen nachgewiesen werden, teilweise auch im Kontext der Regulation circadianer Rhythmik (Fuller *et al.* 2015). In den Pflanzenpathogenen *Fusarium*

oxysporum, *Botrytis cinerea* und dem Säugerpathogen *Cryptococcus neoformans* war die Pathogenität reduziert, wenn das White-collar 1 Homolog deletiert wurde (Ruiz-Roldán *et al.* 2008; Hevia *et al.* 2015; Idnurm und Heitman 2005). Dagegen hatte White-collar 1, wie auch Licht an sich, einen negativen Einfluss auf die Virulenz von *Magnaporthe oryzae* (Kim *et al.* 2011).

I.2.1.2 Photolyasen und Cryptochrome

Neben dem White-collar Komplex gibt es in *U. maydis* und anderen Pilzen weitere Proteine, die Flavine binden und dadurch Licht im blauen Spektralbereich erkennen können. In der Familie der Photolyasen und Cryptochrome wird der Chromophor nicht-kovalent an die jeweilige Photolyase-Homologie-Region (PHR) des Proteins gebunden (Abb. I.2). Teilweise ist zusätzlich ein Folat als Antennenfaktor vorhanden, der absorbierte Photonenenergie auf das Flavin überträgt (Chaves *et al.* 2011; Cohrs und Schumacher 2017).

Photolyasen sind Proteine, die die Energie von Photonen im UV-A/Blaubereich nutzen, um Schäden in der DNA zu reparieren, die durch UV-B-Strahlung hervorgerufen wurden (Sancar 2003). 70-80 % dieser photochemischen Schäden machen dabei Cyclobutan-Pyrimidin-Dimere (CPDs) aus, wo zwischen zwei benachbarten Pyrimidinbasen eine zyklische Verbindung durch zwei Kohlenstoffbrückenbindungen gebildet wird. Zur Bildung von Pyrimidin-Pyrimidon-(6-4)-Photoprodukten, auch (6-4)-Photoprodukte genannt, kommt es seltener, da diese Schäden bei der Replikation aber regelmäßig zu T-nach-C-Mutationen führen, gelten sie als mutagener (LeClerc *et al.* 1991). Je nach Substrat werden CPD-Photolyasen und (6-4)-Photolyasen unterschieden (Sancar 2003).

Für die lichtabhängige Reparatur, dem Prozess der Photoreaktivierung, wird der DNA-Schaden lichtunabhängig von den Photolyasen erkannt und gebunden (Sancar 2003). Nach Absorption von Photonen kommt es zur Anregung des Flavinmoleküls, welches vollständig reduziert sein muss, und in Folge dessen zu einer Elektronenübertragung auf das Thymin-Dimer, wodurch letztlich der Schaden repariert, das Elektron zurück auf das semireduzierte FAD übertragen und somit das angeregte Flavin regeneriert wird (Sancar 2003).

Aus den Photolyasen entwickelten sich nach bisherigen Vorstellungen die Cryptochrome. Cryptochrome sind Proteine, die keine DNA-Schäden mehr reparieren können, dafür aber in Abhängigkeit von Blaulicht als Signalmoleküle wirken und verschiedene biologische Prozesse regulieren. Strukturell unterscheiden sich Cryptochrome von den Photolyasen unter anderem durch eine C-terminale Extension. Auch sie binden in der PHR-Domäne FAD, welches jedoch im aktivierten Zustand als FADH-Radikal, und nicht wie in Photolyasen vollständig reduziert, vorliegt (Sancar 2003).

Vertreter der Photolyase-Cryptochrom-Familie konnten bereits in verschiedenen Pilzen charakterisiert werden, wobei sie teilweise eine duale Funktion als Reparaturenzyme und Signalmoleküle aufwiesen. In *Aspergillus nidulans* wurde beispielsweise die CPD-Photolyase CryA phylogenetisch eher bei den Cryptochromen eingeordnet. Sie besitzt sowohl eine Reparatur- als auch eine Photorezeptorfunktion als Inhibitor sexueller Entwicklung (Bayram *et al.* 2008). Die Photolyase aus *Trichoderma atroviride*, PHR1, ist in der Lage, DNA zu reparieren, sie reguliert aber unter anderem auch ihre eigene Expression (Berrocal-Tito *et al.* 2007; García-Esquivel *et al.* 2016). Mit den Genen UMAG_06079 (*phr1*) und UMAG_01131 (*phr2*) konnte auch jeweils ein Vertreter von CPD- bzw. (6-4)-Photolyasen in *Ustilago maydis* gefunden und charakterisiert werden (Abb. I.2) (Brych *et al.* 2016).

Als mögliche Zwischenstufe zwischen Photolyasen und Cryptochromen gelten die so genannten DASH-Cryptochrome (*Drosophila*, *Arabidopsis*, *Synechocystis*, *Homo*) (Brudler *et al.* 2003). Strukturell sind sie eher den Photolyasen zuzuordnen, und bilden wie diese bei Lichtenregung ein vollständig reduziertes FADH[•]. Funktionell sind sie noch in der Lage, Schäden in einzelsträngiger DNA zu reparieren, jedoch, in aller Regel, nicht mehr in doppelsträngiger DNA (Selby und Sancar 2006). Eine Ausnahme hiervon bilden DASH-Cryptochrome aus Mucoromycotina wie *Phycomyces* (Tagua *et al.* 2015).

Für mehrere DASH-Cryptochrome wurde eine regulatorische Funktion gefunden, wie zum Beispiel für CRY-1 aus *Neurospora crassa*, das in der Lage ist, die Aktivität des White-collar Komplexes zu beeinflussen (Froehlich *et al.* 2010; Olmedo *et al.* 2010). CRY-1 wurde eine Bindung an einzel- und doppelsträngige DNA nachgewiesen, jedoch konnte keine Photolyase-Aktivität beobachtet werden. In *U. maydis* zeigten zwei Proteine (*cry1*, UMAG_01131 und *cry2*, UMAG_05917) typische Charakteristika für DASH-Cryptochrome (Brych *et al.* 2016). Während Cry1 nur Flavin als Cofaktor gebunden hat, wurde in Cry2 zusätzlich MTHF als Antennenfaktor gefunden und eine Reparaturfähigkeit konnte für beide Proteine in einzelsträngiger DNA beobachtet werden. Bei der *in-vivo* Photoreaktivierung von *U. maydis* cry-DASH Deletionsmutanten wurde jedoch kein Unterschied zum Wildtyp gefunden (Brych *et al.* 2016).

I.2.1.3 BLUF-Domänen Proteine

Mit dem Gen UMAG_00188 wurde in *U. maydis* ein Protein gefunden, das einzig aus einer BLUF-Domäne besteht (*blue light using flavin*) (Abb. I.2). Diese Blaulichtrezeptoren sind für Pilze eher untypisch und sind außer in *U. maydis* nur in nah verwandten Arten der Ustilaginales vorhanden.

In Bakterien und Algen sind BLUF-Domänen Proteine wichtig für die Regulation verschiedener Prozesse (Masuda 2013). Zuerst beschrieben wurden BLUF-Photorezeptoren in dem Purpurbakterium *Rhodobacter sphaeroides*, wo sie die Expression von

Photosyntheseorganismen kontrollieren (Braatsch *et al.* 2002; Masuda und Bauer 2002) und in der Alge *Euglena gracilis*, in der die Lichtvermeidungsreaktion durch BLUF-Proteine gesteuert wird (Iseki *et al.* 2002). In *R. palustris* ist das BLUF-Protein PapB an der Blaulicht-abhängigen Inhibition der Biofilmbildung beteiligt, außerdem reguliert es die Pathogenität und die Motilität (Schirmer und Jenal 2009). Auch für die Vertreter aus *E. coli* und *A. baumannii* wurden analoge Funktionen beschrieben (Mussi *et al.* 2010; Tschowri *et al.* 2012).

BLUF-Proteine können aus einer einzelstehenden BLUF-Domäne bestehen, zum Teil sind jedoch auch weitere Domänen für Adenylzyklasen oder Enzyme für die Hydrolyse von c-di-GMP assoziiert (Iseki *et al.* 2002; Wu und Gardner 2009).

Im Gegensatz zu LOV-Domänen wird der Flavincofaktor im Laufe des Photozyklus nicht kovalent gebunden. Die Anregung von Flavin durch Licht führt zu einer relativ geringen Änderung der Chromophorstruktur, die jedoch durch benachbarte Aminosäurereste der BLUF-Domäne wahrgenommen wird. Dadurch kommt es zu einer Neuordnung bzw. Stärkung der Wasserstoffbrückenbindungen in der Nähe des Chromophors (Anderson *et al.* 2005; Stelling *et al.* 2007) und später zu einer Konformationsänderung des restlichen Proteinanteils, was eine Interaktion mit anderen Domänen oder Proteinen zur Signalweiterleitung ermöglicht.

1.2.2 Grünlichtrezeptoren

Für die Wahrnehmung des grünen Spektralbereichs sind die Rhodopsine bekannt. Der Proteinteil wird als Opsin bezeichnet. Er hat sieben Transmembran-Helices und bindet ein Retinalmolekül als Chromophor kovalent an ein konserviertes Lysin in der letzten Helix (Spudich 2006). Unter Lichteinfluss kommt es zur Isomerisierung des Chromophors vom *all-trans*- zum *13-cis*-Retinal (Abb. 1.2), was im Folgenden zu einer Strukturänderung des Proteinanteils führt (Ernst *et al.* 2014).

Gene mit homologen Sequenzen zu Opsinen wurden in mehreren Asco- und Basidiomyceten gefunden, interessanterweise gehäuft in pflanzenpathogenen Pilzen (García-Martínez *et al.* 2015). Da die Deletion der Opsingene oftmals keine offensichtlichen phänotypischen Auswirkungen hatte (Rodríguez-Romero *et al.* 2010), konnten in Pilzen nur einzelne Grünlicht-abhängige Reaktionen oder spezielle Funktionen der Rhodopsine beschrieben werden. Abhängig von ihrer Struktur und ihrem Wirkmechanismus werden pilzliche Rhodopsine in drei Klassen eingeteilt (Brown und Jung 2006).

In höheren Eukaryoten wie Tieren weisen Rhodopsine eine sensorische Funktion als G-Protein gekoppelte Rezeptoren und keine Pumpaktivität auf (Palczewski 2006). Als erstes pilzliches Rhodopsin mit einer Signalfunktion wurde NOP-1 aus *Neurospora crassa* näher charakterisiert (Bieszke *et al.* 1999). NOP-1 hat einen langsamen Photozyklus, was für eine

Funktion als Photorezeptor spricht. Bezüglich der Funktion von NOP-1 konnte eine Beteiligung am Übergang zwischen sexuellem und asexuellem Wachstum nachgewiesen werden (Wang *et al.* 2018). Ein weiteres Opsin aus *F. fujikuroi*, OpsA, wird ebenfalls dieser Rhodopsingruppe zugeordnet. Eine Pumpaktivität konnte hier ebenfalls nicht festgestellt werden. Da aber kein Phänotyp bei Deletion des Gens gefunden wurde, ist eine Photorezeptorfunktion fraglich (Adam *et al.* 2018).

Eine zweite Gruppe ist strukturell den mikrobiellen Rhodopsinen ähnlich. Sie sind als lichtgetriebene Ionenpumpen daran beteiligt, Protonengradienten über Membranen zu generieren (Brown und Jung 2006). Zu dieser Gruppe gehört zum Beispiel das Opsin aus *Leptosphaeria maculans*, das alle für die Protonenübertragung wichtigen Aminosäuren und einen schnellen Photozyklus aufweist (Waschuk *et al.* 2005). Das Gen UMAG_00371 (*ops2*) aus *U. maydis* wird aufgrund seiner Struktur ebenfalls dieser Gruppe zugeordnet.

Ebenfalls als Protonenpumpe wurde CarO aus *Fusarium fujikuroi* beschrieben, wobei die Pumpaktivität Grünlicht-abhängig und zum Extrazellulärraum ausgerichtet war. Die Lokalisation des Opsins wurde hauptsächlich an der Plasmamembran von Konidien nachgewiesen und es konnte ein inhibierender Einfluss von CarO auf die Keimung beobachtet werden (García-Martínez *et al.* 2015). Strukturell sind Rhodopsine wie CarO eher den Opsin-verwandten Proteinen (*opsin related proteins*; ORPs) ähnlich, aufgrund ihrer Funktion werden sie jedoch als Untergruppe der Pumprhodopsine gesehen (Panzer *et al.* 2019). Hierzu zählen auch die beiden anderen Rhodopsine aus *U. maydis* (UMAG_02629, *ops1* und UMAG_04125, *ops3*), wobei *ops3* in einer anderen Arbeit als Hitzeschockprotein annotiert wurde, das die Virulenz beeinflusst (Ghosh 2014).

Den Vertretern der letzten Klasse der pilzlichen Rhodopsine, den Opsin-verwandten Proteinen, fehlt das konservierte Lysin für die Chromophorbindung. Auch die Funktion dieser Proteine blieb aufgrund fehlender Phänotypen bisher weitestgehend unbekannt. Einige wurden als Hitzeschockproteine oder Proteine gegen chemischen Stress annotiert, darunter zum Beispiel HSP30 aus der Hefe (Brown 2004).

I.2.3 Rot- und Dunkelrotlichtrezeptoren

Die Photorezeptoren für den längerwelligen Bereich des Lichts sind die Phytochrome. Auch sie wurden zuerst in Pflanzen identifiziert und charakterisiert (Butler *et al.* 1959), wo sie viele Entwicklungsprozesse wie die Samenkeimung oder die Deetiolerung steuern. Auch die Schattenvermeidungsreaktion, also das Erkennen von Nachbarpflanzen und das Wachstum aus deren Schatten wird in Pflanzen durch Phytochrome reguliert (Casal 2012). Ebenfalls in Bakterien und Pilzen wurden diese Rot- und Dunkelrotlichtrezeptoren gefunden (Fuller *et al.* 2015).

Das pilzliche Phytochrom, das am besten charakterisiert wurde, ist FphA aus *Aspergillus nidulans* (Brandt *et al.* 2008). In diesem Ascomyceten ist die Entscheidung zwischen sexueller und asexueller Lebensweise lichtabhängig. Im Dunkeln und im Dunkelrotlicht dominiert die sexuelle Fortpflanzung, diese wird jedoch im Rotlicht (abhängig von FphA) und im Blaulicht unterdrückt. Auch die Keimung von Konidiosporen ist in *A. nidulans* durch Phytochrom reguliert (Röhrig *et al.* 2013).

Strukturell bestehen die Proteinteile der Phytochrome aus zwei Teilen (Abb. I.2). Der photosensorische Teil setzt sich aus einer PAS (Per-Arnt-Sim), einer GAF (cGMP-spezifische Phosphodiesterase/ *Anabaena* Adenylatcyclase/ *E. coli* FhlA-Domäne) und einer Phytochrom-spezifischen Domäne (PHY) zusammen. Pilze besitzen zusätzlich eine sehr variable, N-terminale Extension vor der PAS-Domäne. Diese ist aber nicht homolog zu der Serinreichen P1-Domäne von Pflanzenphytochromen (Rodriguez-Romero *et al.* 2010).

Der zweite Teil, die regulatorische Domäne, unterscheidet sich in pilzlichen und bakteriellen Phytochromen von denen in Pflanzen. In Pilzen und Bakterien ist der regulatorische Teil aus einem zwei-Komponenten-System aufgebaut, wobei in Pilzen eine Histidin-Kinase-Domäne (HKD) und eine *response-regulator*-Domäne (RRD) im gleichen Protein verknüpft sind. In Bakterien sind beide Domänen in unterschiedlichen Proteinen kodiert (Rodriguez-Romero *et al.* 2010; Zschiedrich *et al.* 2016). In Pflanzen besteht der regulatorische Teil von Phytochromen dagegen nur aus einer Histidin-Kinase-ähnlichen Domäne (HKRD), die keine Enzymaktivität mehr aufweist, und aus zwei weiteren PAS-Domänen (Rodriguez-Romero *et al.* 2010).

Die Ähnlichkeit zwischen pilzlichen und bakteriellen Phytochromen wird auch an der Bindestelle des Chromophors deutlich. Ein lineares Tetrapyrrol wird in allen Fällen in der photosensorischen Domäne autokatalytisch an einen konservierten Cysteinrest gebunden, in Bakterien und Pilzen liegt diese Aminosäure gleichermaßen in der PAS-Domäne, in Pflanzen und Cph1 von *Synechocystis* wird der Chromophor an die GAF-Domäne gebunden (Rodriguez-Romero *et al.* 2010). Auch die Natur des Chromophors unterscheidet sich zwischen den Organismen (Brandt *et al.* 2008). Pflanzen und Cyanobakterien binden die strukturell ähnlichen Tetrapyrrole Phytochromobilin (PΦB) bzw. Phycocyanobilin (PCB), in den bisher charakterisierten anderen bakteriellen und pilzlichen Phytochromen wie FphA wurde das stärker oxidierte Biliverdin IX α gebunden (Rockwell und Lagarias 2006; Rodriguez-Romero *et al.* 2010).

Im Allgemeinen liegen Phytochrome lichtabhängig in zwei verschiedenen Konformationen vor, der Rotlicht-absorbierenden Pr- oder der Dunkelrotlicht-absorbierenden Pfr-Form, die reversibel ineinander umgewandelt werden können. Die Grundlage für die Photokonversion bildet der Tetrapyrrol-Chromophor, der unter Lichteinfluss eine Z-E-Isomerisierung um die

C15-C16 Doppelbindung erfährt. Dadurch dreht sich der D-Ring des Bilins, was letztlich eine Konformationsänderung des Proteins zur Folge hat (Burgie *et al.* 2016; Purschwitz *et al.* 2006).

Für FphA konnte gezeigt werden, dass nach Bestrahlung mit rotem Licht die Histidin-Kinase-Domäne aktiviert wird, was zu einer Autophosphorylierung des Histidins an Position 770 führt. Der nächste Schritt der Signalkaskade besteht aus der Phosphorylierung des Aspartatrestes D1181 in der RR-Domäne des Phytochroms. Die anschließende Signalweiterleitung erfolgt über direkte Interaktion mit anderen Proteinen oder durch Weitergabe der Phosphorylgruppe auf andere Protein (Brandt *et al.* 2008).

Zum Beispiel zeigten Interaktionsstudien in *A. nidulans*, dass im Zellkern ein lichtsensoryischer Komplex aus FphA und den White-collar Proteinen LreA und LreB vorliegt, wobei das Phytochrom eventuell die Aktivität des White-collar Komplexes beeinflusst (Purschwitz *et al.* 2008). Es wurden dabei direkte Interaktionen zwischen FphA und dem White-collar 2 Homolog LreB gefunden, sowie zwischen FphA und dem Velvet-Protein VeA. Dieses ist ein NF- κ B-ähnlicher Hauptregulator von Entwicklung und Sekundärmetabolismus in diesem Organismus (Purschwitz *et al.* 2008).

Phytochrom aus *A. nidulans* fungiert somit als Regulator und nicht direkt als Transkriptionsfaktor. Diese Regulation erfolgt entweder indirekt über die Modulation der Aktivität des White-collar Komplexes oder über Interaktion mit Histon-Acetyltransferasen und -Deacetylasen und damit über den Einfluss auf die Chromatin-Struktur (Hedtke *et al.* 2015).

Die meisten Erkenntnisse über pilzliche Phytochrome beruhen auf Versuchen an dem Ascomyceten *A. nidulans*. Daneben zeigte beispielweise auch *Botrytis cinerea* eine Rotlicht-abhängige Reaktion mit Hemmung der Sporenproduktion im Licht (Schumacher 2017). Für *N. crassa* wurde vermutet, dass die Photorezeptoren PHY-2, CRY-1 und NOP-1 die Aktivität des White-collar Komplexes beeinflussen (Olmedo *et al.* 2010).

I.3 *Ustilago maydis* als Modellorganismus

Pilzliche Pflanzenpathogene sind von großer ökonomischer Bedeutung, da sie sowohl die Entwicklung der Pflanzen auf dem Feld gefährden als auch Schäden am Erntegut auslösen können (Lo Presti *et al.* 2015). Global verzeichnet die landwirtschaftliche Produktion jährlich einen Ernteverlust von bis zu zehn Prozent, der alleine durch Pilzinfektionen hervorgerufen wird (Oerke 2006). Landwirte benötigen deshalb resistente Sorten der Kulturpflanzen oder effiziente Fungizide, was eine kontinuierliche Forschung und Entwicklung an Resistenzmechanismen voraussetzt (Lo Presti *et al.* 2015).

Ein Phytopathogen, an dem an mehreren Aspekten geforscht wird, ist der Erreger des Maisbeulenbrands *Ustilago maydis*. Dieser Pilz weist mehrere genetische Vorteile auf wie die haploide Lebensphase, die Möglichkeit, das Genom mittels homologer Rekombination und CRISPR/Cas zu verändern, sowie der insgesamt kurze Lebenszyklus, der mit der Entwicklung in der Maispflanze nur ca. drei Wochen beträgt (Banuett 1995; Schuster *et al.* 2016). Diese Faktoren machten ihn zu einem Modellorganismen für unterschiedlichste Fragestellungen wie DNA-Reparatur (Holliday 2011), die Regulation der Siderophor- und Sekundärmetabolit-Biosynthese (Bölker *et al.* 2008; Haas 2003) sowie der Interaktion zwischen Pflanze und Pilz (Doehlemann *et al.* 2008; Lanver *et al.* 2017; Lanver *et al.* 2018). Die Photobiologie von *U. maydis* wurde aber bislang nur wenig beachtet (Cabrera-Ponce *et al.* 2012; Estrada *et al.* 2009).

Ustilago maydis gehört zur Abteilung der Basidiomycota und der Familie der Brandpilze (Ustilaginales), die eine Vielzahl an Pflanzenarten infizieren und dort Tumore bilden, die mit schwarzen Sporen gefüllt sind (Abb. I.3 Mitte) (Banuett 1995).

Im Laufe seines Lebenszyklus tritt *U. maydis* in verschiedenen Formen auf (Abb. I.3). Zum einen gibt es eine einzellige, haploide Form, die sich hefeähnlich durch Knospung teilt. Diese Zellen leben saprophytisch im Boden und sind nicht pathogen. Durch Kreuzung zweier kompatibler Zellen entsteht eine zweite Form, ein dikaryotisches Filament, das Maispflanzen infizieren kann und somit pathogen ist. In der Pflanze kommt es zur Tumor- und letztlich zur Sporenbildung. Die Basidiosporen werden in die Umwelt abgegeben und keimen erneut zu Sporidien aus (Banuett 1995).

Die Voraussetzung für die sexuelle Reproduktion von *U. maydis* ist die Paarung von zwei kompatiblen, haploiden Zellen. Ob zwei Zellen kompatibel sind, wird durch zwei geschlechtsspezifische Loci und die Unterschiede in den Allelen dieser Gene bestimmt. Der erste Locus ist an einer möglichen Fusion zweier Zellen beteiligt, wohingegen der zweite Genlocus entscheidend für die weitere Entwicklung des Pilzes ist, beginnend von der Filamentation bis hin zur Ausbildung der Pathogenität (Feldbrügge *et al.* 2004).

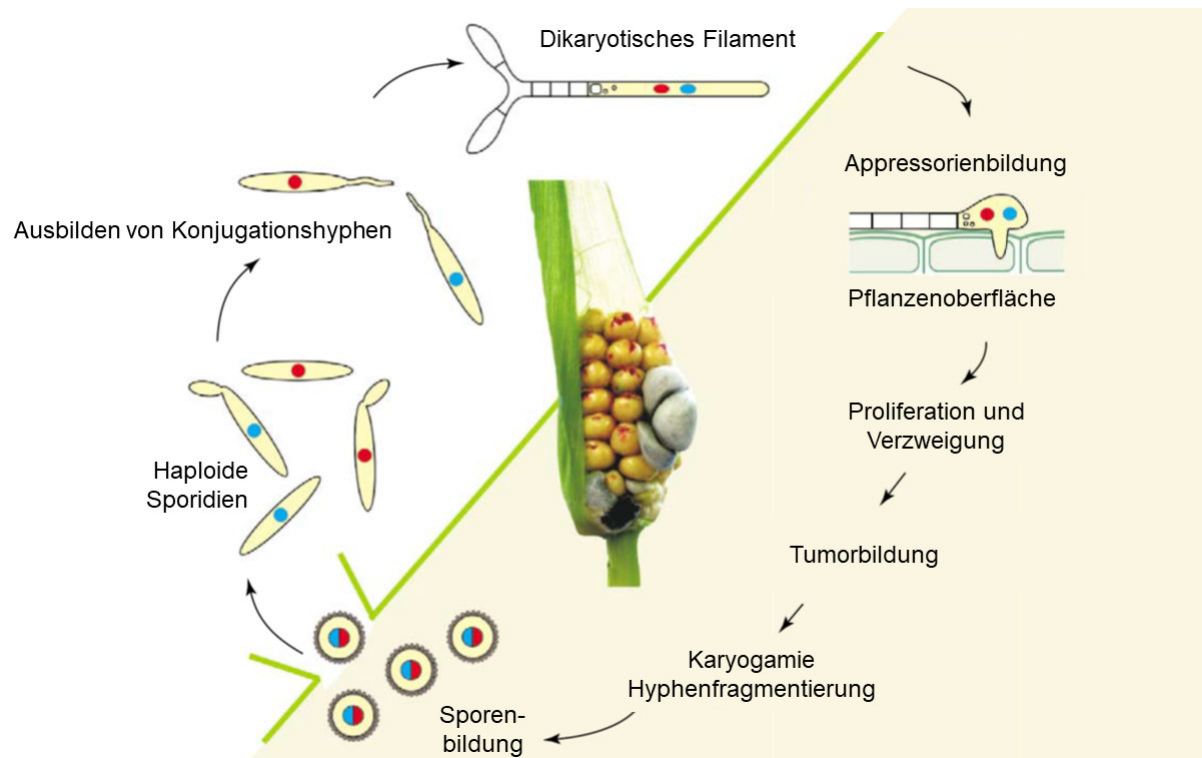


Abbildung I.3: Lebenszyklus von *Ustilago maydis*. Die blauen und roten Zellkerne weisen auf unterschiedliche Allele im *a* und *b* Locus hin. Der hellgrüne Bereich auf der rechten Seite der Abbildung geben die Prozesse an, die von der Maispflanze abhängig sind. In der Mitte ist ein infizierter Maiskolben mit den typischen Infektionssymptomen gezeigt (Feldbrügge *et al.* 2004).

I.3.1 Pheromonantwort

Die Gene des biallelischen *a mating type* Locus (*a1* bzw. *a2*) sind für das Erkennen und die Fusion kompatibler Zellen verantwortlich (Bölker *et al.* 1992; Urban *et al.* 1996). Das Gen *mfa1* kodiert ein kleines, nur aus 13 Aminosäuren bestehendes Lipopeptid, das als Pheromon fungiert und dabei etwas größer ist als das Nonapeptid *mfa2* des zweiten Allels (Szabó *et al.* 2002). Zu den *a* Genen gehört auch *pra1*, ein Sieben-Transmembrandomänen-Rezeptor, der spezifisch die Pheromonform des anderen Allels erkennt (Bölker *et al.* 1992). Somit müssen die Zellen unterschiedliche Allele im *a* Locus aufweisen, um eine Pheromonantwort hervorzurufen.

Als Antwort auf externes Pheromon werden unter anderem die Gene des eigenen Pheromons und Rezeptors verstärkt exprimiert, wodurch die Pheromonantwort nochmals gesteigert wird (Feldbrügge *et al.* 2004). Phänotypisch kommt es zur Bildung sogenannter Konjugationshyphen. Diese entstehen an den Polen der Zellen und richten sich am Pheromongradienten des Partners aus. Die beiden Zellen nähern sich dadurch an und fusionieren an den Hyphenspitzen, wobei es in diesem Entwicklungsschritt zur Verschmelzung des Cytoplasmas jedoch noch nicht zur Karyogamie kommt (Snetselaar *et al.* 1996). Weiterhin kommt es zu einem Pheromon-induzierten Stopp des Zellzyklus in der G2 Phase, um zu

gewährleisten, dass die Teilung beider Zellkerne innerhalb der fusionierten Zellen synchronisiert wird (García-Muse *et al.* 2003).

I.3.2 Filamentation

Ab der Fusion zweier Zellen ist der multiallelische *b mating type* Locus für die weitere Entwicklung verantwortlich. Dieser kodiert für die zwei Homeodomänen-Proteine bE und bW, die zusammen ein Heterodimer bilden und als Transkriptionsfaktor wirken. Diese Heterodimere sind jedoch nur dann aktiv, wenn die beiden Proteine von verschiedenen Allelen stammen, sodass auch bei diesem Regulationsschritt eine Eigenaktivierung ausgeschlossen wird (Feldbrügge *et al.* 2004; Kämper *et al.* 1995).

Durch einen aktiven Homeodomänen-Transkriptionsfaktor bW/bE wird zunächst die Pheromonantwort gestoppt. Unter den bW/bE-abhängigen Genen finden sich mehrere Regulatoren für den Zellzyklus, wodurch die Zellteilung so lange weiter inhibiert wird, bis *U. maydis* die Maispflanze penetriert hat (Heimel *et al.* 2010; García-Muse *et al.* 2003; Pérez-Martín *et al.* 2006). Obwohl die Expression von mehr als 300 Genen von bW/bE abhängig ist, werden die meisten nicht durch das Heterodimer selbst reguliert, sondern durch Rbf1, einem weiteren Transkriptionsfaktor, der zu den früh induzierten Zielgenen von bW/bE zählt. Er reguliert eine Vielzahl von Prozessen, die das filamentöse Wachstum von *U. maydis* sowie die Pathogenität des Pilzes auf der Maispflanze bestimmen (Heimel *et al.* 2010).

Das entstehende dikaryotische Filament besteht aus einer einzelnen Zelle an der Spitze, die die beiden Zellkerne beinhaltet und ein polares Wachstum aufweist. Diese Zelle bildet am basalen Ende mehrere Vakuolen, die zunächst wachsen und anschließend miteinander fusionieren. In regelmäßigen Abständen werden Septen gebildet, um die Wachstumszone der Filamentspitze mit dem Cytoplasma von den vakuolierten Teilen der Zelle zu trennen. Auf Platten mit Nährstoff-reichem Medium und Aktivkohle sind diese weiß aussehenden Hyphen gut von Kolonien einzelliger Zellen mit einem glänzenden Aussehen zu unterscheiden, es wird von einem *fuzzy*-Phänotyp gesprochen (Banuett 1995; Kronstad und Leong 1990).

I.3.3 Infektion von Maispflanzen

Die Filamentbildung findet in der Natur optimalerweise auf der Oberfläche von Maispflanzen statt. Dementsprechend ist es auch nicht verwunderlich, dass gewisse Pflanzensignale den nächsten Entwicklungsschritt begünstigen, nämlich die Ausbildung spezieller Infektionsstrukturen, den Appressorien (Mendoza-Mendoza *et al.* 2009). In *Ustilago maydis* enthalten diese Strukturen kein Melanin und sind nicht besonders auffällig. Im Gegensatz zu anderen pathogenen Pilzen wie *M. grisea*, die über einen hohen Turgordruck in die

Pflanzenzelle eindringen, bildet *U. maydis* vermehrt Enzyme für den Abbau der pflanzlichen Zellwand (Schirawski *et al.* 2005; Tucker und Talbot 2001).

U. maydis bricht zwar die Zellwand der pflanzlichen Zellen auf, die Plasmamembran bleibt jedoch intakt und umhüllt die eindringende Hyphe. Dadurch entsteht eine Kontaktfläche, über die verschiedene Signale ausgetauscht werden können (Banuett 1995). In dieser Phase der Infektion muss der Pilz sowohl die Immunantwort der Pflanze kontern als auch die Genexpression der Wirtszelle so umprogrammieren, dass diese eine ausreichende Menge an organischen Nährstoffen produziert, die auch der Pilz nutzen kann (Brefort *et al.* 2009; Doehlemann *et al.* 2008; Vollmeister *et al.* 2012).

Zusätzlich dazu beeinflusst *U. maydis* den Zellzyklus bestimmter Pflanzenzellen, so dass es einerseits zu einer Zunahme der Zellzahl kommt und andererseits Zellen an Größe gewinnen (Matei *et al.* 2018). In diesem pflanzlichen Tumorgewebe kommt es zur massiven Ausbreitung von Pilzhyphen, die sich zu runden Zellen entwickeln, in denen es zur Karyogamie kommt. Es entstehen schwarz aussehende Teliosporen mit einer melaninreichen Zellwand, die unter günstigen Bedingungen keimen und haploide Spordien hervorbringen (Banuett 1995).

I.4 Zielsetzung

Bislang war weitgehend unbekannt, wie *Ustilago maydis* auf Licht reagiert. In den wenigen vorhandene Quellen hierzu wurde weder auf die Frage eingegangen, welcher Anteil des Lichtspektrums bestimmte Effekte hervorruft noch welcher Photorezeptor diese Effekte vermittelt.

Deshalb sollte in der vorliegenden Arbeit zunächst herausgefunden werden, welche Wellenlängen des Lichtspektrums *U. maydis* wahrnehmen kann und welche Photorezeptoren für die Lichtantwort verantwortlich sind. Dafür wurden saprophytische Zellen mit monochromatischem Licht bestrahlt und auf Transkriptomebene untersucht, ob und wie die Expression verschiedener Gene durch Licht beeinflusst wird. Nach der Identifikation lichtabhängiger Gene sollte auch deren Funktion näher betrachtet werden.

Anschließend sollten die zuständigen Photorezeptoren identifiziert und weiter charakterisiert werden. Als putativer Blaulichtrezeptor wurde White-collar 1 gewählt, als Photorezeptor mit Wirksamkeit im roten und dunkelroten Licht das Phytochrom. Für diese Analyse wurden Deletionsmutanten dieser Photorezeptoren hergestellt, analog zum Wildtyp bestrahlt und die Reaktion der Mutanten mit der des Wildtyps verglichen. Weiterhin sollte über Lokalisationsstudien und Interaktionsanalysen herausgefunden werden, ob die White-collar Proteine und Phytochrom einen Komplex bilden können.

Ausgehend von den Erkenntnissen der Transkriptomanalyse sollte letztlich die Bedeutung von Licht auf verschiedene Entwicklungsstufen im Lebenszyklus von *Ustilago maydis* analysiert werden. Für die saprophytische Phase wurden mögliche Wirkungen von Licht auf die Pheromonantwort und die Filamentation getestet. Dafür wurden Zellen des Wildtyps und von Photorezeptor-Deletionsmutanten in verschiedenen monochromatischen Lichtbedingungen gehalten und deren Reaktionen verglichen. Die Bedeutung verschiedener Photorezeptoren für die pathogene Phase von *U. maydis* wurde ebenfalls untersucht, indem Symptomausprägungen an Maispflanzen nach Infektionen mit Deletionsmutanten und Wildtypzellen miteinander verglichen wurden.

Zusätzlich zu White-collar 1 und Phytochrom sollten auch Analysen an den Opsinen aus *U. maydis* durchgeführt werden. Hier wurden sowohl deren Expression in verschiedenen Lichtbedingungen, ihre Bedeutung für die Pathogenität als auch ihre Lokalisation betrachtet.

II. Material und Methoden

II.1 Material

II.1.1 Besondere Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Spezielle Stoffe sind in folgender Tabelle wiedergegeben, weitere gängige Chemikalien wurden von Roth, Sigma-Aldrich oder BD bezogen.

Material	Firma
4-Nitrophenyl α -D-galactopyranosid	Sigma-Aldrich
Aminosäuremischungen (verschiedene Dropout-Mischungen)	Sigma-Aldrich bzw. Takara Bio
Ampicillin	Roth
Anti-Digoxigenin-AP Fab Fragments	Roche
Aureobasidin A	Takara-Bio
Blocking Reagent for Southern Blot	Roche
Carrier-DNA	Clontech
CDP-Star	Roche
Geneticindisulfat	Roth
Hygromycin B	Duchefa
Lysing Enzymes from <i>Trichoderma harzianum</i>	Sigma-Aldrich
Midori Green Advance	Biozym Scientific
PCR DIG Labeling Mix	Roche
pHrodo™ Red AM: intrazellulärer pH-Indikator	ThermoFisher Scientific
RNaseZAP® RNase Decontamination Solution	ThermoFisher Scientific
SYTO™ 59 Red: Fluorescent Nucleic Acid Stain	ThermoFisher Scientific
TRIzol® Reagent	Life Technologies
Yeast Nitrogen Base ohne Aminosäuren und Ammoniumsulfat	BD
Falconröhrchen (15 ml; 50 ml)	Greiner Bio-One
Küvetten (Polystyrol)	Sarstedt
Pipettenspitzen (1 ml; 200 μ l; 20 μ l; 10 μ l)	Sarstedt
Reaktionsgefäße (2 ml; 1,5 ml; 0,2 ml)	Sarstedt
Reaktionsgefäße (0,1 ml)	Qiagen
Serologische Pipetten (10 ml; 25 ml)	Sarstedt
Zellkulturflaschen (10 ml; 50 ml)	Sarstedt
Kanülen: Microlance™ 3	BD
1 ml Spritzen: Injekt-F	Braun

II.1.2 *Ustilago maydis* Zelllinien

Einige der in dieser Arbeit verwendeten Mutanten von *Ustilago maydis* wurden von Elaine Jaeger während ihrer Masterarbeit (Jaeger 2013) oder von Katharina Parzefall während ihrer Bachelorarbeit (Parzefall 2015) hergestellt und als Dauerkulturen zur Verfügung gestellt. Andere wurden während dieser Zeit neu kloniert.

Stammbezeichnung	Beschreibung	Quelle
FB1 Wildtyp	<i>a1 b1</i>	
FB1 $\Delta wco1$	genomische Deletion des Gens UMAG_03180 (HygR)	Elaine Jaeger
FB1 $\Delta wco2$	Genomische Deletion des Gens UMAG_02664 (GenR)	diese Arbeit
FB1 $\Delta phy1$	genomische Deletion des Gens UMAG_05732 (HygR)	Elaine Jaeger
FB1 $\Delta wco1$ $p_{otef}:GFP-Wco1$	Genomische Deletions des Gens UMAG_03180 und genomische Insertion des Konstrukts $p_{otef}:GFP-UMAG_03180$ in den ip-Lokus (CbxR)	diese Arbeit
FB1 $p_{crg}:GFP-Wco2$	Genomische Insertion des Konstrukts $p_{crg}:GFP-UMAG_02664$ in den ip-Lokus (CbxR)	diese Arbeit
FB1 $p_{crg}:GFP-Phy1$	Genomische Insertion des Konstrukts $p_{crg}:GFP-UMAG_05732$ in den ip-Lokus (CbxR)	diese Arbeit
FB1 $\Delta ops1$ $p_{crg}:Ops1-GFP$	Genomische Deletion des Gens UMAG_02629 und genomische Insertion des Konstrukts $p_{crg}:UMAG_02629-GFP$ in den ip-Lokus (CbxR)	diese Arbeit
FB1 $p_{otef}:Ops2-GFP$	Genomische Insertion des Konstrukts $p_{otef}:UMAG_00371-GFP$ in den ip-Lokus (CbxR)	diese Arbeit
FB1 $\Delta ops2$ $p_{crg}:Ops2-GFP$	Genomische Deletion des Gens UMAG_00371 und genomische Insertion des Konstrukts $p_{crg}:UMAG_00371-GFP$ in den ip-Lokus (CbxR)	diese Arbeit
SG200 Wildtyp	<i>a1 mfa2 bE2 bW1</i>	
SG200 $\Delta wco1$	Genomische Deletion des Gens UMAG_03180 (HygR)	Elaine Jaeger
SG200 $\Delta wco1+c$	Genomische Deletion des Gens UMAG_03180 und genomische Insertion des Konstrukts $p(wco1):UMAG_03180$ in den ip-Lokus (CbxR, HygR)	Elaine Jaeger
SG200 $\Delta ops1$	Genomische Deletion des Gens UMAG_02629 (CbxR)	Katharina Parzefall
SG200 $\Delta ops2$	Genomische Deletion des Gens UMAG_00371 (HygR)	Katharina Parzefall
SG200 $\Delta ops1\Delta ops2$	Genomische Deletionen der Gene UMAG_02629 und UMAG_00371 (CbxR, HygR)	Katharina Parzefall
SG200 $\Delta ops3$	Genomische Deletion des Gens UMAG_04125 (GenR)	Katharina Parzefall

Für die Herstellung von Deletionsmutanten wurden ca. 1000 bp der flankierenden Bereiche der Gene mittels PCR hergestellt und mit einer aus anderen Plasmiden ausgeschnittenen Resistenzkassette mit Hygromycin (HygR), Geneticin (GenR) oder Carboxin (CbxR) ligiert. Über homologe Rekombination konnte das Gen in *Ustilago maydis* durch die entsprechende Resistenzkassette ausgetauscht werden.

Für GFP-fusionierte Konstrukte wurden die Gene in einen der Vektoren p1742 oder p1747 kloniert. Der erste ist für die Klonierung von GFP-Konstrukten unter dem konstitutiven *otef*-Promotor, der zweite beinhaltet den Glucose-inhibierten und Arabinose-induzierbaren *crg*-Promotor. Das in beiden Vektoren enthaltene Carboxin-Resistenzgen unterscheidet sich vom Gen UMAG_00188, annotiert als eine Eisen-Schwefel-Cluster enthaltende Untereinheit der Succinat-Dehydrogenase, in nur einer Aminosäure (Keon *et al.* 1991). Für die Komplementation von $\Delta wco1$ wurden Promotor und GFP aus dem Plasmid p1742 durch 1000 bp der linken Flanke und des Protein-kodierenden Bereiches von UMAG_03180 ersetzt. Die Plasmide wurden mit SspI, das innerhalb der Resistenzkassette schneidet, linearisiert und über homologe Rekombination am Ort der oben genannten Succinat-Dehydrogenase (*ip*-Lokus) integriert. Dabei konnte es zu einer oder mehreren Integrationen kommen.

Der Austausch des Protein-kodierenden Bereiches durch die Resistenzkassette und die Integrationen der GFP-Konstrukte wurden durch Kolonie-PCR und Southern-Blot überprüft.

II.1.3 Weitere Zelllinien

Stammbezeichnung	Verwendung
<i>E. coli</i> TOP10	Klonierung der <i>U. maydis</i> -Konstrukte
<i>S. cerevisiae</i> DF5 his1-1	Klonierung der <i>U. maydis</i> Deletionskonstrukte
<i>S. cerevisiae</i> ESM356	Klonierung der Hefe-2-Hybrid-Konstrukte
<i>S. cerevisiae</i> Matchmaker Y2HGold	Hefe-2-Hybrid-Analysen

II.1.4 Plasmide

Plasmidbezeichnung	Verwendung	Selektionsmarker
pMF1-c (pUMa260)	Carboxin-Resistenzkassette	Ampicillin
pMF1-g (pUMa1057)	Geneticin-Resistenzkassette	Ampicillin
pMF1-hs (pUMa194)	Hygromycin-Resistenzkassette	Ampicillin
pRS426	Klonierung von <i>U. maydis</i> -Deletionskonstrukten in <i>S. cerevisiae</i> und <i>E. coli</i>	Ampicillin, Ura3-Auxotrophie
pSV2 (pJet2.1)	Klonierung von <i>U. maydis</i> -Deletionskonstrukten in <i>E. coli</i>	Ampicillin
potef-GFP-CbxR (p1742)	Klonierung von <i>U. maydis</i> <i>potef</i> :GFP-Konstrukten in <i>E. coli</i>	Ampicillin, Carboxin
p _{pcrg} -GFP-CbxR (p1747)	Klonierung von <i>U. maydis</i> <i>pcrg</i> :GFP-Konstrukten in <i>E. coli</i>	Ampicillin, Carboxin
pAS2-1	Gal4-DNA-BD-Konstrukt für Hefe-2-Hybrid Experimente	Ampicillin, Trp1-Auxotrophie
pBridge	Gal4-DNA-BD-Konstrukt für Hefe-2-Hybrid Experimente inkl. eines dritten Faktors	Ampicillin, Trp1-Auxotrophie
pGADT7	Gal4-AD-Konstrukt für Hefe-2-Hybrid Experimente	Ampicillin, Leu1-Auxotrophie
pLAM5'1	Gal4-DNA-BD-Fusion mit menschlichem Lamin, zusammen mit dem pTD1-1 Produkt Negativkontrolle für Hefe-2-Hybrid Experimente (Takara Bio)	Trp1-Auxotrophie
pVA3-1	Gal4-DNA-BD-Fusion mit p53 aus der Maus, zusammen mit pTD1-1 Positivkontrolle für Hefe-2-Hybrid Experimente (Takara Bio)	Trp1-Auxotrophie
pTD1-1	Gal4-AD-Fusion mit dem großen T-Antigen aus SV40; Kontrollplasmid für Hefe-2-Hybrid Experimente (Takara Bio)	Leu1-Auxotrophie

II.1.5 Oligonukleotide

In der folgenden Tabelle sind sowohl Primer für die qRT-PCR-Experimente enthalten, als auch diejenigen für die Klonierungen der GFP- bzw. Y2H-Fusionen mit Wco1, Wco2, Phy1, Ops1 und Ops2. Im Bereich der großgeschriebenen Nukleotide ist der Primer homolog zur Ziel-DNA, kleingeschriebene Teile entsprechen Überhängen und unterstrichen sind Schnittstellen für Restriktionsenzyme.

Primer	Sequenz von 5' nach 3'	Verwendung
cyc1 fwd #1(22.11.11)	GAACTTCAAGCTCTCGCAC	qRT-PCR UMAG_03726 (<i>cyc1</i> ; Cyclophliin)
cyc1 rev #2(22.11.11)	TCTCGATAGCCTTGACGATG	
mfa1 fwd #19(20.01.17)	ATGCTTTCGATCTTCGCTCAG	qRT-PCR UMAG_02382 (<i>mfa1</i> ; Pheromon)
mfa1 rev #1(03.03.17)	CTAGGCAACAACACAGCTGGAG	
ops1 fwd #7(22.11.11)	ACTCTTCGCTCGTTCTCACC	qRT-PCR UMAG_02629 (<i>ops1</i> ; Opsin 1)
ops1 rev #8(22.11.11)	CCTCGTAGTCTGAAAAGTTGCC	
ops2 fwd #17(11.01.14)	TTTGCTCGATACATTGACTGG	qRT-PCR UMAG_00371 (<i>ops2</i> ; Opsin 2)
ops2 rev #18(11.01.14)	GGATGAACACCAGCAATCAC	
Li. Flanke wco2 fwd #5(28.03.14)	<u>gacaata</u> TTGAGAGTAACTGATACTCTCGAC	Deletion von UMAG_02664 (<i>wco2</i>)
Li. Flanke wco2 rev #6 (28.03.14)	at <u>atggccatctaggcc</u> GTCTCGAGTTGAAGTGCAGT	
Re. Flanke wco2 fwd #7 (28.03.14)	at <u>atggcctgagtggcc</u> GACCTCATCATCCTGGCG	
Re. Flanke wco2 rev #8 (28.03.14)	<u>gacaatatt</u> GATATGACTCTTTCATACAGCCA	
GFP-wco1 fwd #7(11.04.14)	tac <u>gacgcgta</u> ACGGATACTTTCGATTTTCGACGCT	GFP-Fusion von UMAG_03180 (<i>potef</i> :GFP-Wco1)
GFP-wco1 rev #8(11.04.14)	aac <u>ggcggccgc</u> AGGCTTCGGCCGAGCCAGAG	
GFP-wco2 fwd #7(04.07.19)	cgcc <u>acgcgt</u> ATGCAGGGTCAGGGTTGG	GFP-Fusion von UMAG_02664 (<i>p_{org}</i> :GFP-Wco2)
GFP-wco2 rev #8(04.07.19)	ccg <u>ctctaga</u> TCACATGTGACCGCCGCC	
GFP-phy1 fwd #9(04.07.19)	cgcc <u>acgcgt</u> ATGTCGTCGCCTCCGCAAAAAG	GFP-Fusion von UMAG_05732 (<i>p_{org}</i> :GFP-Phy1)
GFP-phy1 rev #10(04.07.19)	ccg <u>ctctaga</u> TCACGCACTGGGCGAGCT	
ops1-GFP fwd #1(04.12.17)	at <u>ggtacc</u> ATGAACGTCGTATCCGAGCTGC	GFP-Fusion von UMAG_02629 (<i>p_{org}</i> :Ops1-GFP)
ops1-GFP rev #2(04.12.17)	at <u>ggtacc</u> CTGGGTAACGGTGTGCATTTGG	
ops2-GFP fwd #3(21.11.15)	at <u>ggtacc</u> ATGAACTCGTTCTACTACGACAGCGTC	GFP-Fusion von UMAG_00371 (<i>potef</i> :Ops2-GFP)
ops2-GFP rev #4(21.11.15)	ta <u>tccggg</u> GGCGTCTTCAGCGCGGGGTTCC	
ops2-GFP fwd #2(31.07.18)	ca <u>ggtacc</u> ATGAACTCGTTCTACTACGACAGCGTCCT GG	GFP-Fusion von UMAG_00371 (<i>p_{org}</i> :Ops2-GFP)
ops2-GFP rev #3(31.07.18)	gt <u>ggtacc</u> GGCGTCTTCAGCGCGGGGTTCC	

AD-/BD-wco1 fwd #11(11.04.14)	ccggcccgggcACGGATACTTTTCGATTTTCGACGCT	Y2H AD- bzw. DNA-BD-Fusion von UMAG_03180
AD-/BD-wco1 rev #4(28.03.14)	aattgaattcTCAGGCTTCGGCCGAGCCAG	
AD-/BD-wco2 fwd #12 (11.04.14)	ccggcccgggGCAGGGTCAGGGTTGGTCTAGC	Y2H AD- bzw. DNA-BD-Fusion von UMAG_02664
AD-/BD-wco2 rev #2(28.03.14)	aattgaattcACATGTGACCGCCGCCCA	
AD-phy1 fwd #8(31.07.18)	tcactatagggcgagcgccgcatggaaATGTCGTGCGCCTCC GCAAAAAG	Y2H AD-Fusion von UMAG_05732
AD-phy1 rev #9(31.07.18)	atctgcagctcgagctcgatggatccTCACGCACTGGGCGAG CTGAG	
BD-phy1 fwd #4(31.07.18)	gacagttgactgtatcgccggaattcATGTCGTGCGCCTCCGCA AAAAGCC	Y2H DNA-BD- Fusion von UMAG_05732
BD-phy1 rev #5(31.07.18)	tagcttggtgctgaggtcgacggatccTCACGCACTGGGCGAG CTG	
hem1 fwd #6(31.07.18)	ctaagaagaagagaaaggtggcgccgcATGACATGCCATT TGCCAAG	Y2H UMAG_00783 (<i>hem1</i> ; Hämoxxygenase)
hem1 rev #7(31.07.18)	gacatgggagatcagcccgaagatctCTAAGCATGGACGCC ACG	

II.1.6 Geräte

Gerät	Bezeichnung und Hersteller
Agarosegelkammern Spannungsquelle Kamera	BioMax QS 710/ BioMax MP 1015; Kodak Elektrophorese-Powerpack P24; Biometra Doc-Print-1000/ 20M
Bioanalyzer Priming Station Vortexer	2100 Bioanalyzer; Agilent Chip Priming Station; Agilent Chip Vortexer IKA MS 3; Agilent
Chemolumineszenzkamera	Chemostar Professional Apparatur; Intas Science Imaging
Heizrührer	RCT basic; IKA
Hybridisierungssofen	PerfectBlot; Peqlab
Inkubationsschränke	B 6060/ B 5042 E; Heraeus
LED-Kammern LED-Schränke	floraLED ^s ; CLF Plant Climatics AR-75L; CLF Plant Climatics
Mikroskope	- Binokular MZ 8; Leica - Axio Observer Z1-Widefield Microscope; Zeiss - Elyra S.1 Structured Illumination Microscope; Zeiss
Pipetten (2,5 µl; 10 µl; 20 µl; 100 µl; 200 µl; 1000 µl)	Research/ Research plus; Eppendorf
Optometer	P-2000; Gigahertz-Optik
Photometer	- GeneQuant 1300; Heraeus - Nano Drop ND 1000 Spectrophotometer; Thermo Scientific
Schüttler	- G25 Incubator Shaker; New Brunswick Scientific - Rotamax 120; heidolph - 3005, GFL

Spiegelreflexkamera	Fine Pix S2 Pro; Sigma
Sterilbänke	- Aura H 130; Ehret Labor- und Pharmatechnik - KBN-4; FASTER - KS 12; Thermo Scientific - Hera Safe, Class II, Safety Cabinet; Thermo Scientific
Thermocycler	- Mastercycler gradient; Eppendorf - Rotor-Gene Q; Qiagen
Thermomixer	- Thermomixer comfort; Eppendorf - ThermoStat plus; Eppendorf
UV-Gerät	Stratalinker UV Crosslinker 2400; Stratagene
Vortexer	Vortex-Genie 2; Scientific Industries Inc.
Waagen	- Präzisionswaage; Sartorius AG - 770 Analysenwaage; Kern&Sohn GmbH
Zählkammer	Thoma-Kammer, Tiefe 0,100 mm, 0,0025 mm ²
Zellmühle	Schwingmühle MM200; Retsch
Zentrifugen	- Laborfuge 400R (Rotor 8179); Heraeus - 5417R (Rotor F45-30-11); Eppendorf - Mikro 200; Hettich - Biofuge pico; Heraeus

II.2 Methoden

II.2.1 Molekularbiologische Methoden

Für die Klonierung der verschiedenen Konstrukte wurden unterschiedliche Methoden verwendet. Wo es möglich war, wurde eine klassische Klonierung über kompatible Schnittstellen von Restriktionsenzymen gewählt. Aufgrund der Größe einzelner Gene, wie zum Beispiel bei *phy1*, gelang dies nicht bei allen Klonierungen. Bei einigen Ansätzen wurden Vektor und Insert deshalb über die Gibson-Reaktion ligiert. Für wieder andere Konstrukte wurden die einzelnen Bestandteile des Endkonstruktes in Hefe eingebracht, wo der Organismus das Zusammensetzen übernahm.

Die Konstrukte für *Ustilago maydis* wurden zur Sicherung und Überprüfung durch Kolonie-PCR, Restriktions-Testverdau und Sequenzierung zunächst in *E. coli* eingebracht und danach stabil über homologe Rekombination in das Genom von *Ustilago maydis* Zellen integriert. Eine erfolgreiche Transformation von *U. maydis* wurde dann mittels Kolonie-PCR und Southern Blot überprüft.

II.2.1.1 Klonierung über Restriktionsschnittstellen

Zum Beispiel für die Klonierung der Fusionen aus GFP mit den Opsinen konnten Restriktionsschnittstellen genutzt werden. Dafür wurde der Protein-kodierende Bereich der entsprechenden Gene zunächst mittels Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) amplifiziert. Als nächstes wurden sowohl Insert als auch der Vektor mit entsprechenden Restriktionsenzymen der Firma New England Biolabs geschnitten und anschließend die kompatiblen Teile *in-vitro* zusammenligiert.

Um zwei Teile mit entsprechenden Überhängen zu ligieren wurde die T4 DNA-Ligase (New England Biolabs; NEB) benutzt. Zunächst wurde Vektor-DNA mit dem Insert in einem 1:5 Verhältnis vermischt, die einzusetzende Menge des Inserts hing von der Größe der Stücke ab und wurde mit folgender Formel berechnet.

$$\text{ng Insert} = \frac{100 \text{ ng Vektor} * \text{kb Insert} * 5}{\text{kb Vektor}}$$

Der Ansatz wurde auf 16 µl verdünnt und dann für 5 min bei 65°C erhitzt, um Sekundärstrukturen der DNA aufzubrechen. Nach schneller Abkühlung auf Eis wurde die Reaktion zusammen mit 2 µl 10x Reaktionspuffer und 2 µl T4 DNA-Ligase für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert.

II.2.1.2 Gibson-Klonierung

Für die Klonierungen der induzierbaren Fusionen GFP-Wco2 und GFP-Phy1 sowie einzelner Hefe-2-Hybrid-Konstrukte wurde die Gibson-Methode gewählt, die eine reibungsfreie Klonierung von zwei oder auch mehreren Fragmenten ermöglicht und bei der auch relativ große Fragmente kein Problem darstellen. Diese *in-vitro* Ligation erfolgt durch das Zusammenspiel aus drei Enzymen. Eine 5'-Exonuklease generiert lange Überhänge, wodurch sich homologe DNA-Sequenzen anlagern können. Eine Polymerase füllt die übriggebliebenen Lücken wieder auf und eine DNA-Ligase verbindet die Bruchkanten (Gibson 2011).

Die einzelnen Fragmente müssen für diese Methode an den Enden einen homologen Bereich von mindestens 15-20 Basenpaaren aufweisen. Dies wird weitestgehend dadurch erreicht, dass PCR-Produkte mithilfe der Primer einen Anhang mit der homologen Sequenz des benachbarten Fragments erhalten. Für das Designen der jeweiligen Primer wurde der Online-Dienst NEBuilder® Assembly Tool (nebuilder.neb.com) zu Rate gezogen. Die verwendeten Vektor-Produkte wurden ebenfalls über PCR hergestellt oder über Restriktionsverdau für die Ligation vorbereitet.

Folgender 5 µl-Ligationsansatz wurde für 60 min bei 50°C inkubiert.

Linearisierter Vektor	50 ng
Inserts	x ng
NEBuilderHiFi DNA Assembly Master Mix (NEB)	2,0 µl

Die Berechnung der Insertmenge erfolgte ähnlich zur *in-vitro* Ligation des vorherigen Abschnitts, das Verhältnis aus Vektor zu Insert sollte jedoch nur 1:2 betragen. Die über Gibson-Klonierung hergestellten Plasmide wurden anschließend in *E. coli* eingebracht und sequenziert.

II.2.1.3 *In-vivo* Ligation in Hefe

Eine weitere Klonierungsmethode, mit der komplexe Konstrukte aus mehreren Fragmenten hergestellt werden können, bedient sich der sehr effizienten homologen Rekombinationsfähigkeit von *S. cerevisiae* (Ma *et al.* 1987; Oldenburg *et al.* 1997). Auch in diesem Fall werden Produkte mit sequenzhomologen Überhängen von mindestens 25 Basenpaaren hergestellt. Im Gegensatz zur vorherigen Methode werden die Fragmente jedoch in Hefe eingebracht, wo die Ligation *in-vivo* stattfindet (Finnigan und Thorner 2015). Anschließend wird das Plasmid aus den Hefezellen isoliert und wie bei den anderen Klonierungsmethoden *E. coli* transformiert.

II.2.1.4 Polymerase-Ketten-Reaktionen

Bei jeder Klonierung wurde für die Amplifikation der Zielgene und teilweise der Vektoren eine PCR mit der Q5 High-Fidelity DNA-Polymerase (New England Biolabs) nach Herstellerangaben durchgeführt. Diese Polymerase zeichnet sich durch eine schnelle Reaktion aus und besitzt die Fähigkeit Fehler beim Einbau von Nukleotiden zu verbessern, wodurch eine geringe Fehlerrate vorliegt.

Es wurde jeweils ein 50 µl Ansatz der Reaktion mit genomischer DNA von *Ustilago maydis* und genspezifischen Primern verwendet, die die erforderlichen Schnittstellen oder komplementäre Bereiche zu weiteren Fragmenten beinhalteten.

Templat: genomische DNA	1,0 µl
5x Q5 Reaktionspuffer	10,0 µl
10 mM dNTPs	1,0 µl
10 µM Primer forward	2,5 µl
10 µM Primer reverse	2,5 µl
Q5 DNA-Polymerase	0,5 µl
Wasser	32,5 µl

Die jeweilige Anlagerungstemperatur der Primer wurde mit dem Online-Dienst Tm Calculator von NEB ermittelt (TmCalculator.neb.com).

Primäre Denaturierung	98°C, 30 s	} 45 Zyklen
Denaturierung	98°C, 10 s	
Primer-Anlagerung	x°C, 30 s	
Elongation	72°C, 30 s/kb	
Finale Elongation	72°C, 2 min	

Um zu testen, ob die Transformation von *E. coli* oder *U. maydis* erfolgreich war, wurden Kolonie-PCRs durchgeführt. In beiden Fällen wurden getestete Kolonien sowohl auf neue Selektionsplatten überstrichen als auch für die PCR lysiert.

E. coli-Zellen wurden in 50 µl 0,1 M Tris/HCl-Puffer (pH 7) aufgenommen, für 5 min bei 94°C aufgeköcht und anschließend 1 µl als Templat für die PCR eingesetzt. *U. maydis*-Zellen wurden in 20 µl 0,1 M NaOH resuspendiert und für 30 min auf Eis inkubiert. Nach dem Abzentrifugieren unlöslicher Bestandteile an einer Tischzentrifuge wurde ebenfalls 1 µl des Überstands für die PCR eingesetzt.

Für diese Reaktion wurde die OneTaq Quick-Load Polymerase von NEB verwendet. Die Primer für Kolonie-PCRs wurden so gewählt, dass nur dann ein Produkt entsteht, wenn die Klonierung erfolgreich war.

Templat: lysierte Kolonie	1,0 µl
5x OneTaq Standard Puffer	5,0 µl
10 mM dNTPs	0,5 µl
10 µM Primer forward	0,5 µl
10 µM Primer reverse	0,5 µl
OneTaq Quick-Load DNA-Polymerase	0,125 µl
Wasser	17,375 µl

Das Programm für eine PCR mit der OneTaq-Polymerase lautete:

Primäre Denaturierung	94°C, 30 s	} 35 Zyklen
Denaturierung	94°C, 30 s	
Primer-Anlagerung	x°C, 30 s	
Elongation	68°C, 60 s/kb	
Finale Elongation	68°C, 5 min	

II.2.1.5 Restriktionsverdau

Für diese Schritte wurden die Enzyme und zugehörigen Reaktionspuffer der Firma NEB verwendet. Für die Klonierung wurde folgender auf 50 µl verdünnter Ansatz für zwei Stunden bei der vom Hersteller angegebenen Reaktionstemperatur inkubiert.

Templat PCR-Produkt/Vektor	2,0 µg
10x Reaktionspuffer	5,0 µl
Enzym	2,0 µl

Die aus *E. coli* isolierten Klonierungsplasmide wurden zum Testen ebenfalls mit Restriktionsenzymen verdaut und auf ein Agarosegel geladen. Über die Größe der aufgetrennten Fragmente konnte überprüft werden, ob die Klonierung erfolgreich war. In diesem Fall galt folgender Ansatz, der auf 25 µl aufgefüllt und für eine Stunde bei der entsprechenden Temperatur inkubiert wurde.

Isoliertes Plasmid	2,0 µl
10x Reaktionspuffer	5,0 µl
Enzym	2,0 µl

II.2.1.6 Agarosegel-Elektrophorese

Puffer und Reagenzien

TBE-Puffer	10,8 g/l Tris; 5,5 g/l Borsäure; 2 mM EDTA/NaOH (pH 8,0)
Größenstandards	2-log DNA-Ladder (NEB) O'Gene Ruler Low Range DNA-Ladder (Thermo Scientific)

Für die Auftrennung von DNA- und RNA-Fragmenten anhand ihrer Größe wurde die Agarosegel-Elektrophorese genutzt. 120 µl TBE-Puffer wurden mit der gewünschten Agarosekonzentration aufgekocht, abhängig von der Größe der Nukleinsäuren betrug diese zwischen 0,8 und 3 %. Nach Zugabe des Farbstoffes Midori Green, der mit Nukleinsäuren interagiert und unter UV-Licht detektierbar ist, wurde das Gemisch zum Auspolymerisieren in spezielle Gießkammern gegossen.

Für die Elektrophorese wurde das Gel in einer Laufkammer mit TBE-Puffer überschichtet. Die Proben wurden mit 6x Orange Ladepuffer (NEB) versetzt und in vorbereitete Aussparungen im Gel pipettiert. Die Auftrennung erfolgte für ein bis zwei Stunden bei 110 V.

II.2.1.7 Herstellung chemisch kompetenter Hefe

Medien

YPD	10 g/l Hefeextrakt; 20 g/l Pepton; 2 g/l Glucose
1,1x TE/LiAc	110 mM Lithiumacetat; 11 mM Tris/HCl (pH 8,0); 1,1 mM EDTA

Der Hefestamm Matchmaker Y2HGold wurde zunächst auf YPD-Platten ausgestrichen und für drei Tage bei 30°C inkubiert. 3 ml YPD wurden dann mit einer Kolonie angeimpft und über Nacht bei 30°C und 250 rpm geschüttelt. Von dieser Vorkultur wurden 50 µl in 50 ml YPD überführt und für weitere 20 h geschüttelt, bis eine OD₆₀₀ von 0,15 bis 0,30 vorlag. Anschließend wurden die Zellen für 5 min bei 1000 g zentrifugiert, in 100 ml YPD aufgenommen und weiter geschüttelt, bis eine OD₆₀₀ von 0,4 bis 0,5 erreicht wurde. Dann wurden sie mit 30 ml sterilem Wasser gewaschen und in 1,5 ml 1,1x TE/LiAc resuspendiert. Zum Schluss wurde für 30 s mit Maximalgeschwindigkeit zentrifugiert und die Zellen in 600 µl TE/LiAc aufgenommen.

II.2.1.8 Transformation von *S. cerevisiae***Medien und Reagenzien**

YPD	10 g/l Hefeextrakt; 20 g/l Pepton; 2 g/l Glucose
PEG/LiAc	40 % (w/v) PEG 3350; 110 mM Lithiumacetat; 10 mM Tris/HCl (pH 8,0); 1,1 mM EDTA
Carrier-DNA	10 µg/µl Lachssperma-DNA
SDO (-Leu) (single dropout)	6,7 g/l <i>Yeast Nitrogen Base</i> (ohne Aminosäuren und Ammoniumsulfat; BD); 1,54 g/l Aminosäuremischung ohne Leucin; 2 g/l Glucose; 15 g/l Bacto-Agar
SDO (-Trp) (single dropout)	6,7 g/l <i>Yeast Nitrogen Base</i> (ohne Aminosäuren und Ammoniumsulfat; BD); 1,54 g/l Aminosäuremischung ohne Tryptophan; 2 g/l Glucose; 15 g/l Bacto-Agar
DDO (-Leu/-Trp) (double dropout)	6,7 g/l <i>Yeast Nitrogen Base</i> (ohne Aminosäuren und Ammoniumsulfat); 1,54 g/l Aminosäuremischung ohne Leucin und Tryptophan; 2 g/l Glucose; 15 g/l Bacto-Agar

Für die Transformationen, bei denen Hefe eine *in-vivo* Ligation durchführen sollte, wurden die hergestellten Teilfragmente zu kompetenten ESM356-Hefezellen gegeben und mit 300 µl PEG vermengt. Nach 30 min bei Raumtemperatur wurden die Zellen für die DNA-Aufnahme für 15 min bei 42°C inkubiert. Die bei 2000 rpm (380 g) für 3 min pelletierten Zellen wurden dann mit 1 ml YPD-Medium gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation wurde überschüssiger Überstand abgegossen und die im Restmedium resuspendierten Zellen auf Platten mit SDO-Selektionsmedium ausgestrichen. Nach ca. drei Tagen Inkubation bei 30°C wurde das klonierte Plasmid aus den Hefezellen isoliert.

Für die Transformation der Hefe-2-Hybrid-Konstrukte wurden jeweils 100 ng der gewünschten Plasmide eingesetzt. Als Transformationskontrolle dienten die gekauften Kontrollplasmide der Firma Takara Bio, die ebenfalls auf SDO-Medium wachsen sollten. Die gewünschten Plasmidkombinationen wurden mit 5 µl Lachsspermien-DNA vermengt, ein notwendiger Schritt für eine effiziente Transformation mehrerer Plasmide in Hefe. Nach 5 min Denaturierung bei 95°C wurden die Ansätze zu 100 µl frischen, kompetenten Matchmaker Y2HGold Hefezellen gegeben und gemischt. Nach Zugabe von 500 µl PEG/LiAc wurden die Zellen für 30 min bei 30°C inkubiert. Zusammen mit 20 µl DMSO wurden die Ansätze im Wasserbad für 15 min bei 42°C erhitzt und anschließend für 30 s mit Maximalgeschwindigkeit pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in 1 ml YPD-Medium für 30 min bei 30°C und 300 rpm im Thermomixer inkubiert. Zuletzt wurden die Zellen erneut zentrifugiert und in 100 µl 0,9 % NaCl aufgenommen. Der komplette Ansatz wurde auf Auxotrophie-Selektionsplatten ausgestrichen und für drei Tage bei 30°C inkubiert.

II.2.1.9 Transformation von *E. coli***Medium**

LB	5 g/l Hefeextrakt; 5 g/l Bacto-Trypton; 5 g/l NaCl (15 g/l Bacto-Agar für Platten)
----	--

Jeweils die Hälfte der verschiedenen Ligationsansätze wurde zu 100 µl chemisch kompetenter *E. coli* TOP10-Zellen gegeben und für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte ein Hitzeschock für eine Minute bei 42°C und eine Inkubation für zwei Minuten auf Eis. Die Zellen wurden mit 1 ml LB-Medium gemischt und für eine Stunde bei 37°C und 300 rpm in einem Thermomixer inkubiert. Durch Zentrifugation bei 5000 rpm (2376 g) für 3 min und anschließendem Abgießen des Überstands wurden die Zellen ankonzentriert. Der komplette Transformationsansatz wurde dann auf Selektionsplatten mit Ampicillin (100 µg/ml) ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert.

II.2.1.10 Plasmidisolierung aus *E. coli* und *S. cerevisiae*

Der Unterschied zwischen der Plasmidisolierung aus *E. coli* oder *S. cerevisiae* bestand darin, dass bei Hefe aufgrund der Zellwand zunächst eine effiziente Zellyse stattfinden musste. Dies wurde durch Inkubation in der Zelmühle für 5 min bei 30 Hz erreicht. Für die Plasmidisolierung aus *E. coli* und *S. cerevisiae* wurde dann entweder das QIAprep Mini Kit von Qiagen oder das NucleoSpin Plasmid Mini-Kit von Macherey-Nagel verwendet und die Angaben der Hersteller befolgt.

II.2.1.11 Protoplastierung von *U. maydis***Medien**

SCS	1 M Sorbitol; 20 mM Natriumcitrat (pH 5,8)
SCS/Lysing Enzymes	1 M Sorbitol; 20 mM Natriumcitrat (pH 5,8) 25 mg/ml Lysing Enzymes aus <i>Trichoderma harzianum</i>
STC	1 M Sorbitol; 10 mM Tris/HCl (pH 7,4); 100 mM CaCl ₂ (pH 5,8)

Für die Protoplastierung wurde eine über-Nacht-Kultur aus 20 ml YESP_{light} (250 rpm, 28°C) für 5 min bei 3500 rpm (2383 g) pelletiert. Nach einem Waschschriff mit 20 ml SCS wurden die Zellen in 2 ml frisch angesetztem SCS mit speziellen Lyseenzymen aufgenommen und für ca. 25 min inkubiert, bis die pilzliche Zellwand bei ca. 70 % der Zellen abgebaut war und die Zellen als Protoplasten vorlagen. Den Zellen wurden 10 ml SCS hinzugegeben und dann

wurden sie für 10 min bei 2300 rpm (1029 g) zentrifugiert. Es folgten zwei Waschschriffe mit jeweils 10 ml SCS und ein Waschschriff mit 20 ml STC. Letztlich wurden die Protoplasten in 400 µl eiskaltem STC aufgenommen und zu je 80 µl aliquotiert. Sie wurden bis zur Verwendung bei -80°C aufbewahrt.

II.2.1.12 Transformation von *U. maydis*

Medien und Reagenzien

STC-PEG	1 M Sorbitol; 10 mM Tris/HCl (pH 7,4); 100 mM CaCl ₂ (pH 5,8); 40 % PEG 4000
Regenerationsagar	10 g/l Hefeextrakt; 4 g/l Pepton; 0,4 g/l Saccharose; 1 M Sorbitol
PD-Agar	24 g/l Potato Dextrose Broth; 2 g/l Bacto-Agar
Antibiotika	20 µg/ml Carboxin 200 µg/ml Geneticin 1 mg/ml Hygromycin

Der komplette Ansatz der linearisierten Plasmide wurde zu einem Aliquot der entsprechenden *U. maydis* Protoplasten gegeben, vorsichtig gemischt und für 10 min auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 500 µl STC-PEG erfolgte eine weitere Inkubation für 20 min auf Eis. Dann wurde der gesamte Transformationsansatz auf eine frisch gegossene Platte ausgestrichen und für fünf Tage bei 28°C inkubiert. Danach wurden Kolonien auf PD-Platten mit dem entsprechenden Antibiotikum überstrichen und getestet.

Die frisch gegossene Transformationsplatte bestand aus zwei Phasen. Für die untere Phase wurden 10 ml Regenerationsagar mit der zweifachen Konzentration des entsprechenden Selektionsantibiotikum vermengt. Die obere Phase bestand aus 10 ml Regenerationsagar mit Ampicillin (150 µg/ml). Das Ampicillin sollte verhindern, dass Verunreinigungen auf den Platten wachsen konnten. Darüber hinaus bedingt die obere Phase, dass die *U. maydis* Zellen zunächst ohne Selektionsdruck ihre Zellwand wiederaufbauen können, bevor sie mit dem Selektions-Antibiotikum in Berührung kommen, das mit der Zeit durch die obere Phase diffundierte.

II.2.1.13 DNA-Extraktion aus *U. maydis*

Für die DNA-Extraktion wurden 5 ml einer über-Nacht-Kultur (250 rpm, 28°C) bei 4000 rpm (3113 g) und 4°C für 5 min pelletiert und bei -80°C eingefroren. Die Zellen wurden in 1 ml Phenol/Chloroform-Gemisch (1:1) resuspendiert, mit ca. 500 µl Glaskügelchen versetzt und in einer Zelmühle für 5 Minuten bei 30 Hz aufgeschlossen. Eine Zentrifugation bei 13000 g und

4°C für 15 min brachte eine Phasentrennung, wobei die obere wässrige Phase mit der DNA abgenommen wurde. Die DNA wurde anschließend mit dem gleichen Volumen 100 % Ethanol für 15 min bei Raumtemperatur gefällt und durch Zentrifugation bei 13000 rpm (17949 g) und 4°C für 15 min pelletiert. Das DNA-Pellet wurde zweimal mit 70 % Ethanol gewaschen und anschließend an einer Sterilbank getrocknet. Für die Elution wurden 100 µl Nuklease-freies Wasser verwendet und die DNA für 20 min bei 50°C inkubiert.

II.2.1.14 Southern Blot

Puffer und Reagenzien

Natriumphosphat-Puffer	1 M Na ₂ HPO ₄ ; 1 M NaH ₂ PO ₄ gemischt, bis pH 7 erreicht wurde
Southern Hyb Puffer	0,5 M Natriumphosphat-Puffer; 70 g/l SDS
Southern Waschpuffer	0,1 M Natriumphosphat-Puffer; 70 g/l SDS
DIG1 Puffer	11,61 g/l Maleinsäure; 150 mM NaCl; auf pH 7,5 eingestellt
DIG Waschpuffer	3 % (v/v) Tween-20 in DIG1
DIG2 Puffer	10x Blocking Solution in DIG1
DIG3 Puffer	0,1 M NaCl; 50 mM MgCl ₂ · 6 H ₂ O; mit 1 M Tris/HCl auf pH 9,5 eingestellt
CDP-Star-Lösung	1 % (v/v) CDP-Star Reagenz in DIG3

Isolierte DNA der zu testenden *U. maydis* Linien wurde mit einem Restriktionsenzym geschnitten, das im Wildtyp ein anderes Schnittmuster aufwies als in den Mutanten. Für Deletionsmutanten wurde eines gewählt, das neben einer Schnittstelle außerhalb der verwendeten Flanke eine weitere entweder in der Restriktionskassette oder im kodierenden Bereich des Ursprungsgens zeigte. Für die Integrationen in den ip-Lokus konnte immer das Enzym MseI verwendet werden, da es sowohl im Genom und auch in den eingesetzten Plasmiden passend schneidet. Über die Anzahl an unterschiedlichen Banden war zusätzlich zu einer positiven Klonierung auch ersichtlich, ob eine Einfach- oder Mehrfachintegration des Plasmides in dem Genom vorlag (Abb. II.1). Für den Southern Blot wurden 10-30 µg isolierter DNA mit 1 µl der gewählten Enzyme in einem 20 µl Ansatz über Nacht bei der vom Hersteller angegebenen Temperatur verdaut.

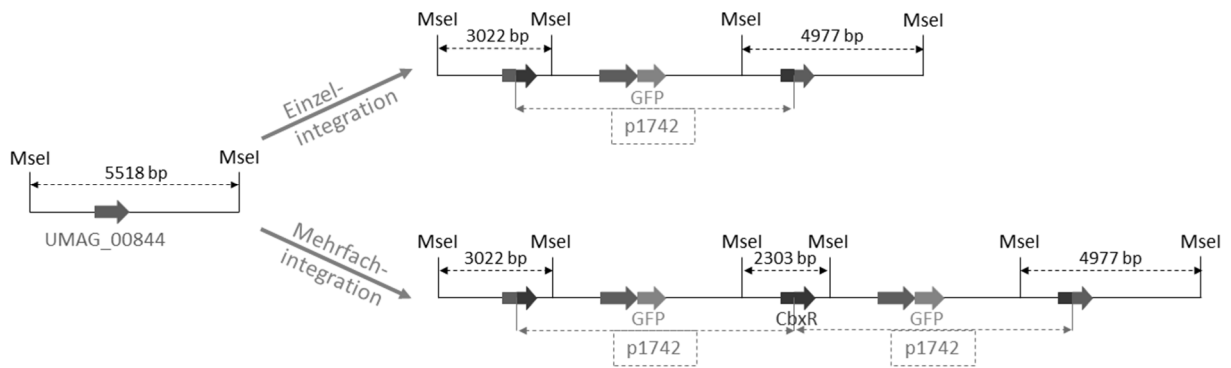


Abbildung II.1: Schematische Darstellung der Konstruktintegration in den ip-Lokus. Ohne Integration entsteht durch MseI-Verdau ein 5518 bp-Fragment. Bei einfacher Integration des Plasmids p1742 werden unabhängig von der Größe des integrierten Zielgens zwei Fragmente mit der gleichen Sonde detektiert. Bei weiteren Kopien des Konstrukts kommt es zu drei nachweisbaren Banden. Gezeigt ist das Beispiel des $p_{\text{otef:Ops1}}$ -GFP-Konstruktes.

Die verdauten DNA-Proben wurden mit 6x Ladepuffer versetzt und auf zwei Agarosegele der gleichen Konzentration verteilt. Der Großteil der Proben wurde in ein Gel geladen, das für den eigentlichen Blot bestimmt war und ohne den Farbstoff Midori Green gegossen wurde, da dieser die spätere Detektion stören würde. Parallel dazu wurde ein zweites Gel gegossen, das Midori Green enthielt und mit 3-5 μl der Proben beladen wurde. Gleichzeitig wurden die DNA-Fragmente auf beiden Gelen für 1,5 Stunden bei 110 V aufgetrennt. Das zweite Gel diente lediglich als Referenz und wurde nur zur Identifikation der Gelbereiche verwendet, die für die Southern Blot-Analyse wichtig waren. Das von unwichtigen Teilen befreite Blotgel wurde daraufhin kopfüber in eine Schale gegeben und zweimal für je 15 min mit 0,25 M HCl inkubiert, gefolgt von zweimaligem Waschen mit Wasser. Dann wurde das Gel für 30 min in 0,5 M NaOH 1 M NaCl (pH 14) und zweimal für je 30 min in 1 M NH_4Ac 0,02 M NaOH (pH 7,5) inkubiert.

Anschließend erfolgte der eigentliche Blot. Dafür wurde das Gel immer noch kopfüber auf eine Frischhaltefolie auf der Laborbank platziert. Darauf wurde eine zugeschnittene Roti®-Nylon plus Membran mit einer Porengröße von 0,45 μm (Roth) gelegt, darauf zwei Lagen extra dickes Blotpapier (Biorad) und eine 10-15 cm Schicht aus Küchenrollepapieren. Abgeschlossen wurde der Aufbau mit einem Gewicht. Über Kapillarkräfte erfolgte dadurch über Nacht ein effizienter Transfer der DNA vom Gel auf die Membran.

Am nächsten Tag wurde die Membran mit der bisherigen Seite nach oben zunächst getrocknet. Um die DNA kovalent an die Membran zu binden, wurde diese dann in einem UV-Crosslinker mit UV-Licht (254 nm) und einer Energiedichte von 120000 $\mu\text{J}/\text{cm}^2$ bestrahlt. Danach wurde die Membran in eine Hybridisierungsröhre gegeben und mit 30 ml Southern Hyb Puffer im Hybridisierungssofen bei 65°C auf die Hybridisierung vorbereitet. Währenddessen wurde die im Vorfeld hergestellte DIG-markierte Sonde in 30 ml Southern Hyb Puffer gegeben und für 10 min im Wasserbad aufgeköcht.

Als Sonde wurde in Deletionsmutanten eine der beiden flankierenden Regionen des Gens ausgewählt, bei Integration von Konstrukten in den ip-Lokus der Protein-kodierende Bereich des Gens UMAG_00188 (Succinat-Dehydrogenase). Sowohl im Wildtyp als auch in den Mutanten sollten die Sonden an komplementäre DNA binden können, allerdings sollten die DNA-Fragmente eine gut zu unterscheidende Größe aufweisen. Die Sonde wurde mit dem PCR DIG Labeling Mix von Roche über eine PCR hergestellt. Der Mix enthält neben den normalen Nukleotiden auch Digoxigenin-markierte Uracile, die während der PCR eingebaut werden. Für die PCR wurden die gleichen Bedingungen gewählt, die während der Klonierung für ein spezifisches Produkt der entsprechenden Flanke gesorgt haben.

Anstelle des Southern Hyb Puffers wurde dann die Sonde zur Membran gegeben und über Nacht im Hybridisierungssofen bei 65°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Sonde zur Wiederverwendung abgenommen und bei -20°C gelagert.

Die Membran wurde zweimal für jeweils 20 min mit 30 ml vorgewärmtem Southern Waschpuffer bei 65°C und einmal für 5 min mit 30 ml DIG Waschpuffer bei Raumtemperatur gewaschen. Das Blocken unspezifischer Stellen auf der Membran wurde mit der Inkubation mit 40 ml DIG2-Puffer für 30 min erreicht. Währenddessen wurde 1 µl Anti-Digoxigenin-Antikörper-Lösung in 10 ml DIG2-Puffer gelöst. Die Membran wurde mit dieser Antikörperlösung anschließend für eine Stunde inkubiert. Danach wurde die Membran zweimal für 15 min mit DIG Waschpuffer gewaschen und für 5 min mit 30 ml DIG3-Puffer inkubiert, bevor 10 ml der Substratlösung CDP-Star zugegeben wurde. Nach 5 min wurde die feuchte Membran aus der Hybridisierungsröhre entnommen, gegen Feuchtigkeitsverlust eingeschweißt und für 15 min bei 37°C inkubiert. In dieser Zeit erfolgte die Umsetzung des CDP-Star-Substrats durch die alkalische Phosphatase, die an die Antikörper gebunden ist. Die dabei abgestrahlte Lumineszenz wurde an einer Chemolumineszenzkamera detektiert und fotografiert. Die Belichtungszeit betrug je nach Signalstärke ca. 1-5 min.

II.2.1.15 RNA-Isolation aus *U. maydis*

Die eingefrorenen Zellen des Belichtungsexperiments wurden in 1 ml TRIzol (Thermo Fisher Scientific) resuspendiert und in ein 2 ml Reaktionsgefäß mit ca. 500 µl Glaskügelchen überführt. Die Pilzzellen wurden dann für 5 min bei 30 Hz in einer Zelmühle aufgeschlossen und anschließend für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Dies sollte eine komplette Dissoziation der Proteine von gebundenen Nukleinsäuren gewährleisten.

Daraufhin wurden 300 µl Chloroform dazugegeben und die Proben kräftig geschüttelt. 5 min Inkubation bei Raumtemperatur und Zentrifugation bei 12000 g, 4°C für 15 min resultierten in einer Phasentrennung. Von der dabei entstehenden wässrigen Phase, die die RNA enthielt, wurden 500 µl in ein neues Reaktionsgefäß überführt und nochmals mit 500 µl

Chloroform gemischt. Nach erneuter Zentrifugation wurden 400 µl der oberen Phase in ein weiteres Reaktionsgefäß überführt.

Beim nächsten Schritt wurden die Nukleinsäuren mit 500 µl Isopropanol gefällt. Nach kräftigem Durchmischen wurde für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert und dann für 15 min bei 4°C und 12000 rpm (15294 g) abzentrifugiert. Das RNA-Pellet wurde anschließend zweimal mit 1 ml Ethanol (70 %) gewaschen und für 10 min bei 4°C und 15394 g zentrifugiert.

Die RNA wurde nach Abnahme des Ethanols für 10 min luftgetrocknet und dann in 90 µl RNase-freiem Wasser aufgenommen. Zum besseren Lösen wurden die Proben für 20 min bei 55°C inkubiert.

II.2.1.16 DNase-Verdau und RNA-Aufreinigung

Um störende DNA-Kontaminationen aus den RNA-Proben zu entfernen, wurde das Turbo DNA-Free™ Kit von Thermo Fisher Scientific verwendet. Zu 89 µl isolierter RNA wurden 2 µl DNase und 10 µl Reaktionspuffer gegeben und der Ansatz für 30 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden 10 µl DNase-Inaktivierungsreagenz hinzugegeben und bei 1000 rpm im Thermomixer für 5 min bei Raumtemperatur geschüttelt. Nach Zentrifugation für 90 s bei 10000 rpm (9503 g) wurde der gesamte Überstand, der nun DNA-freie RNA enthielt, für die Aufreinigung verwendet.

Hier wurde vom RNeasy® Mini Kit von Qiagen Gebrauch gemacht und dessen Protokoll mit geringen Abweichungen befolgt. Zum Waschen der Säulen wurde der Puffer RPE hinzugegeben und die Säule dann mehrfach invertiert und gedreht, um alle Bereiche der Säule gut durchzuwaschen. Vor Elution der RNA wurde die Säule für 5 min bei 60°C getrocknet. Dann wurden 40 µl auf 60°C vorgewärmtes, RNase-freies Wasser auf die Membran gegeben, für 3 min bei 60°C inkubiert und dann für 1 min bei 13000 rpm (16060 g) abzentrifugiert. Der Durchfluss wurde erneut auf die Membran gegeben, für 3 min bei 60°C inkubiert und noch einmal zentrifugiert.

II.2.1.17 Bioanalyser

Die aufgereinigte RNA wurde mittels Bioanalyser auf Qualität überprüft, es wurde das Agilent RNA 6000 Nano Kit verwendet und die Herstelleranweisungen weitestgehend eingehalten. Vor Beladen der RNA-Proben und des Größenstandards wurden diese für 3 min bei 72°C denaturiert. Zum Säubern der Elektroden des Analysegerätes wurden diese zunächst für 30 s in RNase-ZAP getaucht und anschließend mit Nuklease-freiem Wasser gereinigt. Währenddessen wurde der Bioanalyser-Chip für 1 min in einem IKA-Vortexer bei 2400 rpm

geschüttelt. Dann wurden die RNA-Proben auf dem Chip elektrophoretisch aufgetrennt und die Qualität analysiert.

II.2.1.18 Reverse Transkription

Als Vorstufe für die quantitative Realtime-PCR wurden 2 µg der aufgereinigten RNA in cDNA umgeschrieben. Es wurde das FastGene® Scriptase Basic cDNA Synthesis Kit von Nippon Genetics verwendet. Zunächst wurde die RNA mit 1 µl oligo-dT Primern und Wasser vermengt, für 5 min bei 42°C inkubiert und anschließend sofort auf Eis gestellt. Dies sollte ein Aufschmelzen von Sekundärstrukturen in der RNA und ein anschließendes Anlagern der Primer an die RNA bewirken. Danach wurde laut Hersteller-Protokoll ein Mix aus Reaktionspuffer, dNTPs, DTT, einem RNase-Inhibitor und der Reversen Transkriptase hinzugegeben und für 60 min bei 42°C die cDNA-Synthese durchgeführt. Zum Schluss wurde das Enzym für 15 min bei 70°C deaktiviert. Die cDNA wurde dann mit Nuklease-freiem Wasser auf 150 µl verdünnt und für die Realtime-PCR eingesetzt.

II.2.1.19 Quantitative Realtime-PCR

Bei dieser Methode bedient man sich des Farbstoffs SYBR-Green, der in doppelsträngige DNA interkaliert und dann fluoresziert, so dass mit zunehmender DNA-Menge während der PCR ebenfalls die Fluoreszenz in der Probe steigt. Es wurde der 2x qPCR SyGreen No ROX Mix von PCR Biosystems (Nippon Genetics) verwendet. Der Reaktionsansatz hatte folgende Zusammensetzung.

cDNA Templat	5,0 µl
Reaktionsmischung	10,0 µl
Primer forward	0,8 µl
Primer reverse	0,8 µl
Wasser	3,4 µl

Für jedes Gen wurden sequenzspezifische Primer verwendet. Zusätzlich wurde für jede Probe das Gen Cyclophilin (UMAG_03726) als interner Standard untersucht. Neben dem Ansetzen von jeweils drei technischen Replikaten wurde für jedes Primerpaar ein Ansatz mit Wasser als Negativkontrolle pipettiert. Am RotorGene Q Cycler von Qiagen wurde folgendes PCR-Programm mit einer anschließenden Temperaturerhöhung für eine Schmelzanalyse der gebildeten Produkte eingestellt.

Primäre Denaturierung	95°C, 2 min	
Denaturierung	95°C, 5 s	}45 Zyklen
Primer-Anlagerung und Elongation	60°C, 30 s	
Schmelzanalyse	72 – 95°C	Schrittweise Erhöhung um 1°C

Zunächst wurden die C_T -Werte der Gene auf den internen Standard normiert. Um die Abweichungen der technischen Replikat einzuberechnen wurde für diesen Schritt eine Kreuztabelle angewendet. Für die Primereffizienz wurde immer ein Wert von 2 eingesetzt, daher ergab sich folgende vereinfachte Formel.

$$\frac{2^{-C_T}(\text{untersuchtes Gen})}{2^{-C_T}(\text{interner Standard})}$$

Für einen besseren Überblick über die relativen Expressionswerte wurde auf die jeweiligen Dunkelwerte in den einzelnen Genotypen normiert bzw. für die Dunkelfunktion der Photorezeptoren auf die Bedingung Wildtyp-Dunkel. Um die x-fache Induktion der Gene durch Licht zu berechnen, wurden die Mittelwerte der Licht- durch die Dunkelbedingung dividiert.

II.2.2 Transkriptomanalyse

II.2.2.1 Belichtungsexperiment

Medien	
PD-Agar	24 g/l Potato Dextrose Broth; 2,0 g/l Bacto-Agar
YEPS _{light}	10 g/l Hefeextrakt; 4 g/l Pepton; 0,4 g/l Saccharose; 100 µg/ml Ampicillin (frisch zugegeben)
YNB + Glucose	1,7 g/l Yeast Nitrogen Base, pH 5,8; 0,2 g/l Ammoniumsulfat; 2,0 g/l Glucose (nach dem Autoklavieren hinzugegeben); 100 µg/ml Ampicillin (frisch zugegeben)

Zu Beginn der Experimente wurden Zellen aus Glycerin-Dauerkulturen auf PD-Agarplatten ausgestrichen und über Nacht bei 28°C inkubiert. Anschließend wurde Zellmaterial von der Platte abgenommen und in Kulturröhrchen mit 3 ml YEPS_{light} überführt. Diese Kulturen wurden über Nacht bei 28°C und 250 rpm angezogen. Um während der Belichtung einen Effekt durch die Farbe und der daraus resultierenden Absorptionseigenschaften des Mediums auszuschließen, wurden am nächsten Tag 30 µl der Vorkultur in 3 ml des farblosen YNB-Mediums überführt und weiterhin bei 28°C und 250 rpm geschüttelt.

Am Vortag der Belichtung wurde dann eine über-Nacht-Kultur vorbereitet. Dafür wurde die OD₆₀₀ der Kultur in 50 ml YNB-Medium so eingestellt, dass am nächsten Vormittag eine OD₆₀₀

von 0,5 vorlag. Die Kultur wurde bei 28°C, 250 rpm und Dunkelheit geschüttelt. Ab diesem Zeitpunkt galt die Kultur als dunkeladaptiert und wurde in Dunkelheit oder wenn nötig unter grünem Sicherheitslicht weiterbehandelt.

Um die Kultur in der logarithmischen Wachstumsphase zu halten, wurde die Kultur am nächsten Vormittag nochmals mit frischem YNB-Medium auf eine OD₆₀₀ von 0,2 in 105 ml verdünnt und für weitere 3 h inkubiert. Dann wurde die Kultur auf zwei Zellkulturflaschen zu je 50 ml aufgeteilt. Eine Probe wurde in schwarzes Tuch und Alufolie eingewickelt und galt als Dunkelprobe, die andere wurde unverpackt genutzt. Beide Kulturflaschen wurden zusammen in einer LED-Kammer bei 28°C und 100 rpm geschüttelt und für 60 min mit verschiedenen Lichtbedingungen bestrahlt. Verwendet wurde Blaulicht (471 nm), Rotlicht (655 nm) oder Dunkelrotlicht (740 nm), mit einer Fluenzrate von jeweils 10 µmol/m²s.

Nach 60 min wurden die Zellen bei 4000 rpm (1699 g) und 4°C für 5 min pelletiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70°C bis zur RNA-Isolation gelagert. Die aus den belichteten Zellen isolierte RNA wurde später mit DNase behandelt und aufgereinigt. Die Proben wurden dann entweder mittels Bioanalyzer auf Qualität überprüft und über Illumina RNA Sequenzierung analysiert oder in cDNA umgeschrieben und über qRT-PCR analysiert.

II.2.2.2 RNA-Sequenzierung und Datenanalyse

Verwendung	Programm – Version – Einstellungen
Entfernen der Adapter	bcl2fastq2-v2.17.1.14
Qualitätstest	fastqc 0.11.2 (http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/)
Mapping	GSNAP 2015-12-31.v5 A: sam; N: 1; split-output; failed-input
Annotation	Umaydis521_2.0.33 GI_72256214 (http://fungi.ensembl.org/Ustilago_maydis/Info/Index)
Dateiformatierung	Samtools 1.3.1 (Li <i>et al.</i> 2009)
Read-Quantifizierung	subread feature Counts version 1.5.1 p; B; t; mRNA; g Parent
DEG Generierung	R 3.3.1 edgeR 3.14.0 (Robinson <i>et al.</i> 2010) DESeq2 1.12.3 (Love <i>et al.</i> 2014) NOISeq 2.16.0 (Tarazona <i>et al.</i> 2011)

Am Kölner Genomzentrum (Cologne Center for Genomics) wurde das Herstellerprotokoll des Illumina® TruSeq® Stranded RNA Präparationskits auf einem HiSeq 4000-System befolgt

und eine *paired-end* Sequenzierung (2x75 bp) durchgeführt. Direkt nach der Sequenzierung wurden die Probenadapter entfernt. Dafür wurde die *bcl2fastq* Software mit Standardeinstellungen verwendet.

Die folgende Analyse der Rohdaten wurde von Fabian Haas aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Stefan Rensing durchgeführt. Dafür wurden die einzelnen Schritte einer standardisierten Vorgehensweise befolgt (Perroud *et al.* 2018).

Grob zusammengefasst wurde jede Probe zunächst auf die Qualität der einzelnen Sequenzstücke (*reads*) überprüft. Anschließend wurden die einzelnen Sequenzfragmente mitochondrialen bzw. nukleären Genen aus *Ustilago maydis* zugeordnet (*mapping*). Als mitochondriales Genom stand GI_72256214 und für das Kerngenom die Annotation Umaydis521_2.0.33 zur Verfügung. Sequenzen, die einer bestimmten Stelle im Genom zugeordnet werden konnten, wurden weiter analysiert. Gene, bei denen in keiner getesteten Probe ein Fragment gefunden wurde, wurden aus der Analyse entfernt. Der nächste Schritt bestand in der Quantifizierung der *reads* für die einzelnen Gene.

Letztlich wurden differentiell exprimierte Gene (DEGs) mit einem mindestens zweifachen Unterschied bestimmt, die bei drei Funktionen des Programms R die eingestellten Kriterien erfüllten. Für edgeR und DESeq2 wurde neben dem mindestens zweifachen Unterschied eine statistische Grenze von 0,001 gewählt, für NOISeq sollte die Wahrscheinlichkeit für eine unterschiedliche Expression bei mindestens 0,9 liegen.

II.2.2.3 Funktionelle Analyse

Für die funktionelle Analyse der differentiell exprimierten Gene wurde analysiert, welche Genontologie (GO)-Begriffe in den einzelnen Lichtantworten im Vergleich zum Genom von *Ustilago maydis* überrepräsentiert waren. Auch diese Analyse wurde von Fabian Haas mit einem bereits veröffentlichten Ablauf durchgeführt (Widiez *et al.* 2014).

Signifikant ($q = 0,01$) überrepräsentierte Kategorien der einzelnen Lichtantworten wurden mit dem Programm Wordle (<http://www.wordle.net>) abgebildet. Die Wortgröße ist dabei proportional zu $-\log_{10}(q)$, die Schriftfarbe war dunkelgrün, wenn dieser Wert ≤ 4 und hellgrün, wenn $-\log_{10}(q)$ zwischen 2 und 4 lag.

II.2.2.4 Expression Licht-abhängiger Gene während der biotrophen Entwicklung

Die Expressionsdaten von *U. maydis* während der biotrophen Entwicklung wurden aus Lanver *et al.* (2018) entnommen. In deren Analyse wurden wie in der vorliegenden Arbeit nur die Gene einbezogen, die in mindestens einem Vergleich zwischen den Infektionszeitpunkten einen signifikanten Expressionsunterschied aufwiesen. Gene, die in axenischer Kultur und

während der gesamten pathogenen Entwicklung ein vergleichbares Expressionsmuster aufwiesen, wurden in einem Modul zusammengefasst. Insgesamt wurden 14 verschiedene Module definiert. Beim Vergleich der Lichtantwort mit der biotrophen Entwicklung wurde dann anhand der Gennummern überprüft, in welchen Modulen die einzelnen Licht-regulierten Gene klassifiziert wurden.

Für Tabelle IV.1 wurden pro Zeitpunkt zunächst die Module identifiziert, die eine überdurchschnittliche Expression aufwiesen. Dann wurde für einzelne Lichtbedingungen die Gesamtzahl der Gene bestimmt, die in den entsprechenden Modulen eingeteilt waren. Von den differentiell exprimierten Genen während der Maisinfektion wurde außerdem der Prozentsatz bestimmt, der durch die unterschiedlichen Lichtbedingungen beeinflusst war. Der gleiche Ablauf galt für die Gene, die zu den einzelnen Zeitpunkten eine unterdurchschnittliche Expression zeigten.

Für Tabelle VII.1 wurden teilweise mehrere Zeitpunkte zusammengefasst. Die Expression in einer axenischen Kultur wurde weiterhin einzeln betrachtet. Dagegen wurden die Phasen der Pheromonantwort, Filament- und Appressorienbildung (0,5 dpi) bis zum Eindringen der Appressorien in die Maispflanze (1 dpi) als frühe Entwicklung zusammengefasst. Die anschließende Entwicklung der Hyphen mit Tumorbildung ist die mittlere Infektionsphase. Sie umfasst die Phase mit dikaryotischen Hyphen mit *clamp connections*, die die biotrophe Interaktion zwischen Pilz und Pflanze vermitteln (2 dpi), die Phase massiver Ausbreitung der Hyphen (4 dpi) und die Phase, bei der die Hyphen anfangen zu aggregieren (6 dpi). Als späte Entwicklungsschritte wurden die beginnenden Prozesse der Hyphenfragmentierung (8 dpi) bis hin zu den vollständig entwickelten Sporen (12 dpi) definiert (Lanver *et al.* 2018).

Für jedes Modul wurde dann bestimmt, ob die Expression während der vier Phasen eher überdurchschnittlich (+), durchschnittlich (o) bzw. unterdurchschnittlich (-) war. Die entsprechenden Expressionsmuster wurden den einzelnen Licht-abhängigen Genen zugeordnet.

II.2.3 Fluoreszenzmikroskopie

Medien und Reagenzien

PD	24 g/l Potato Dextrose Broth
YNB + Arabinose	1,7 g/l Yeast Nitrogen Base; 0,2 g/l Ammoniumsulfat; 2 g/l Arabinose; auf pH 5,8 eingestellt
Fluoreszenzfarbstoffe	2,5 µM SYTO™ 59 0,5 µl/ml pHrodo™ Red; 5 µl/ml PowerLoad™ 25 µM Ceramid 9-4

Die Fluoreszenzmikroskopie wurde zusammen mit den Kooperationspartnern Priv.-Doz. Dr. Ulrich Terpitz und Sabine Panzer am Biozentrum der Universität in Würzburg durchgeführt.

Für alle Konstrukte wurde mit einer 20 ml über-Nacht-Kultur in PD-Medium gestartet, die bei 100 rpm und 28°C geschüttelt wurde. Am nächsten Morgen wurden die konstitutiv exprimierenden Stämme mit dem GFP-Wco1- bzw. dem Ops2-GFP-Konstrukt in neuem PD-Medium verdünnt, wodurch die Kulturen in einer Wachstumsphase gehalten werden sollten. Für die restlichen Zelllinien erfolgte zu diesem Zeitpunkt die Induktion der Fusionsproteine. Dafür wurden 2 ml der über-Nacht-Kulturen für 3 min bei 4000 g pelletiert, mit 1 ml Wasser gewaschen und in 5 ml YNB mit Arabinose aufgenommen. Nach drei bis vier weiteren Stunden Inkubation bei 100 rpm und 28°C wurden bei allen Linien ca. 500 µl der Kultur abzentrifugiert, mit 1 ml Wasser gewaschen und in Wasser aufgenommen, so dass eine Zelldichte von ungefähr $6,5 \cdot 10^5$ Zellen/ml vorlag.

250 µl der Zellen wurden in Poly-D-Lysin beschichtete Mikroskopiekammern gegeben und für eine Stunde bei 28°C im Weißlicht bei rund 5 W/m² inkubiert, so dass sie sich absetzen und am Boden anhaften konnten. Anschließend wurde das Wasser in den Kammern vorsichtig abgenommen und durch verschiedene Kombinationen an Fluoreszenzfarbstoffen ausgetauscht. Für die Visualisierung der Cytoplasmamembran wurde ein Ceramid (α -Azido-C16-Ceramid) genutzt, das mit dem Fluoreszenzfarbstoff Cy5 gekoppelt wurde (Walter *et al.* 2017), allerdings wurde der Farbstoff zusammen mit Teilen der Plasmamembran nach kurzer Zeit internalisiert. Nukleinsäuren sollten mit 2,5 µM SYTO59 angefärbt werden, in lebenden *Ustilago maydis*-Zellen leuchteten jedoch nur die Mitochondrien. Für die Visualisierung von Bereichen mit niedrigem pH, der vor allem in Vakuolen und an der Cytoplasmamembran auftritt, wurden 0,125 µl pHrodoRed in 1,25 µl Powerload gelöst. Die Kombinationen der Farbstoffe wurden mit Wasser auf ein Volumen von 250 µl verdünnt und auf die Zellen gegeben. Nach einer Stunde Inkubation bei 28°C im Dunkeln wurden die Kammern erneut gewaschen und in 250 µl 400 mM Sorbitol mikroskopiert.

Am verwendeten *structured illumination* Mikroskop (SIM) in Würzburg wurde für die Anregung von GFP ein Laser mit einer Wellenlänge von 488 nm verwendet, pHrodoRed wurde mit einem 555 nm- und SYTO59 mit einem 640 nm-Laser angeregt. Die Bilder wurden mit dem Programm Fiji prozessiert.

II.2.4 Interaktionsanalyse über Hefe-2-Hybrid-Konstrukte

Beim Hefe-2-Hybrid-System wurden die zu untersuchenden Proteine zunächst mit der DNA-Bindedomäne bzw. mit der Aktivierungsdomäne des Gal4-Transkriptionsfaktors fusioniert. Mit dem Vektor pGADT7 wurden Fusionen mit der Aktivierungsdomäne (AD) und mit den Vektoren pAS2-1 und pBridge Fusionen mit der DNA-Bindedomäne (BD) des

Transkriptionsfaktors Gal4 generiert. Das Plasmid pBridge besitzt eine zweite Klonierungsstelle, wo ein dritter Faktor für die Interaktionsstudie eingebracht werden kann, der dann exprimiert wird, wenn kein Methionin im Medium vorhanden ist. Da das Enzym Hämoxygenase für die Biliverdin-Biosynthese nicht in dem verwendeten Hefestamm vorhanden war, wurde das Gen UMAG_00783 ebenfalls über die zweite Klonierungsstelle im pBridge-Plasmid in die Hefezellen eingebracht.

Als Interaktionskontrollen wurden Kombinationen mit entsprechenden Leervektoren und die Kontrollplasmide der Firma Takara Bio verwendet. Als Positivkontrolle dienten das Tumorsuppressorgen p53 aus der Maus, dessen Interaktion mit dem großen T-Antigen aus SV40 im Hefe-2-Hybrid System mehrfach gezeigt wurde (Iwabuchi *et al.* 1993; Li und Fields 1993). Die Negativkontrolle bestand aus dem großen T-Antigen des SV40 Virus zusammen mit menschlichem Lamin, die nachgewiesenermaßen nicht interagieren (Yu *et al.* 2018).

II.2.4.1 Wachstum auf Auxotrophie-Platten

Medien	
SDO (-Leu) (<i>Single Dropout</i>)	6,7 g/l <i>Yeast Nitrogen Base</i> (ohne Aminosäuren und Ammoniumsulfat); 1,54 g/l Aminosäuremischung ohne Leucin; 2 g/l Glucose; 15 g/l Bacto-Agar
DDO (-Leu/-Trp) (<i>Double Dropout</i>)	6,7 g/l <i>Yeast Nitrogen Base</i> (ohne Aminosäuren und Ammoniumsulfat); 1,54 g/l Aminosäuremischung ohne Leucin und Tryptophan; 2 g/l Glucose; 15 g/l Bacto-Agar
TDO (-Leu/-Trp/-His) (<i>Triple Dropout</i>)	6,7 g/l <i>Yeast Nitrogen Base</i> (ohne Aminosäuren und Ammoniumsulfat); 1,54 g/l Aminosäuremischung ohne Leucin, Tryptophan und Histidin; 2 g/l Glucose; 15 g/l Bacto-Agar
TDO +AbA	6,7 g/l <i>Yeast Nitrogen Base</i> (ohne Aminosäuren und Ammoniumsulfat); 1,54 g/l Aminosäuremischung ohne Leucin, Tryptophan und Histidin; 2 g/l Glucose; 0,2 mg/l Aureobasidin A; 15 g/l Bacto-Agar
TDO -Met +AbA	6,7 g/l <i>Yeast Nitrogen Base</i> (ohne Aminosäuren und Ammoniumsulfat); 1,54 g/l Aminosäuremischung ohne Leucin, Tryptophan, Histidin und Methionin; 2 g/l Glucose; 0,2 mg/l Aureobasidin A; 15 g/l Bacto-Agar

Von jedem Transformationsansatz wurden neun Kolonien gewählt, um die Interaktion der transformierten Ansätze zu überprüfen. Die Zellen wurden zunächst in 50 µl sterilem Wasser gewaschen, um vermeintliche Kontaminationen durch den SDO-Transformationsagar loszuwerden. Sie wurden dann in 15 µl 0,7 % NaCl aufgenommen und jeweils 2 µl auf entsprechende Selektionsplatten getropft. Für die Ansätze ohne die Hämoxygenase wurde das Wachstum auf TDO +AbA-Platten überprüft. Die Hämoxygenase stand in den Klonierungsansätzen unter der Kontrolle des Met25-Promoters, der dann aktiv ist, wenn kein

Methionin im Medium vorliegt. Deshalb wurden die Ansätze, bei denen der Phytochrom-Cofaktor gebildet werden soll, auf Platten ausgebracht, die neben den anderen Selektionsstufen kein Methionin enthalten (TDO -Met +AbA).

Die Platten wurden für fünf Tage bei jeweils 10 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ Blau- (450 nm), Rot- (658 nm) oder Dunkelrotlicht (741 nm) bzw. im Dunkeln inkubiert und anschließend mit einer Spiegelreflexkamera fotografiert.

II.2.4.2. α -Galactosidase-Assay

Puffer	
Assay-Puffer	0,33 M Natriumacetat; 10 mg/ml 4-Nitrophenol- α -D-galactopyranosid
Stop-Lösung	2M Natriumcarbonat

Durch die erfolgreiche Zusammensetzung des Gal4-Transkriptionsfaktors wird ebenfalls das Enzym α -Galactosidase exprimiert und in das Medium abgegeben. Wird dem Überstand einer positiven Zellkultur 4-Nitrophenol- α -D-galactopyranosid zugegeben, erfolgt eine Spaltung des Substrats und die Entstehung eines der Endprodukte kann über die Absorption bei 410 nm nachgewiesen werden. Dadurch kann eine quantitative Aussage über die Stärke der Interaktion gemacht werden.

Dafür wurde jeweils eine Kolonie der verschiedenen Konstrukt-Kombinationen, die vorher in der Wachstumsanalyse getestet wurde, in 2 ml DDO (-Leu/-Trp) bzw. DDO-Met über Nacht bei 30°C und 100 rpm im Dunkeln oder bei 10 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ Blau- (450 nm), Rot- (658 nm) oder Dunkelrotlicht (741 nm) angezogen, bis eine OD_{600} von ca. 0,7 vorlag. Die Zellen wurden durch Zentrifugation bei 16000 g für 5 min pelletiert und 100 μl des Überstands mit 300 μl des Assay-Puffers vermengt. Nach Inkubation für 16 h bei 30 °C wurde die Reaktion mit 100 μl der Stop-Lösung beendet. Anschließend wurde die Absorption von Nitrophenol bei 410 nm gemessen und mit der folgenden Formel die Enzymaktivität berechnet.

$$\alpha\text{-Galactosidase-Aktivität [Miller Units]} = \frac{1000 \cdot \text{OD}_{410}}{V \cdot t \cdot \text{OD}_{600}}$$

V steht dabei für das Volumen der verwendeten Zellkultur, deren OD_{600} zum Start der Substratumsetzung gemessen wird und t ist die Dauer der Reaktion. Da bereits die Positivkontrolle einen gewissen Lichteffect zeigte, wurden die Ergebnisse auf die Negativkontrollen aus Lamin und T-Antigen in den entsprechenden Lichtbedingungen normiert.

II.2.5 Pheromon-Assay

Medien und Reagenzien

PD-Agar	24 g/l Potato Dextrose Broth; 2,0 g/l Bacto-Agar
YEPS _{light}	10 g/l Hefeextrakt; 4 g/l Pepton; 0,4 g/l Saccharose; 100 µg/ml Ampicillin frisch zugegeben
<i>mfa2</i> Pheromon	2 g/l synthetisch hergestelltes Pheromon in DMSO

Für diesen Versuch wurden zunächst 3 ml YEPS_{light} mit Zellmaterial von PD-Platten angeimpft und über Nacht bei 28°C und 250 rpm inkubiert. Am nächsten Tag wurde eine 1:50-Verdünnung in 5 ml YEPS_{light} angesetzt und für zwei weitere Stunden geschüttelt. Dann wurde das Volumen für eine OD₆₀₀ von 0,6 in einem Volumen von 1,1 ml berechnet und je zwei Ansätze bei 5000 rpm (2376 g) für 3 min pelettiert. Die Zellen wurden gewaschen und in 1,1 ml Wasser aufgenommen. Zu einem Ansatz wurden 2,2 µl synthetisches Pheromon *mfa2* gegeben und beide Ansätze nach gutem Durchmischen auf zwei Reaktionsgefäße zu je 1,05 ml aufgeteilt. Eine Probe wurde in Alufolie eingewickelt und zusammen mit der unverpackten in einem über-Kopf-Rotor für 5 h bei 28°C unter verschiedenen Lichtbedingungen inkubiert. Auch hier wurden Blaulicht (450 nm), Rotlicht (658 nm) und Dunkelrotlicht (741 nm) bei einer Fluenzrate von 10 µmol/m²s verwendet.

Für die Auswertung wurden jeweils insgesamt 30 µl der beiden Proben auf drei Rasterbereiche in Thoma-Kammern verteilt und unter einem Lichtmikroskop bei 40-facher Vergrößerung die Anzahl aller vorhandenen Zellen in den Rastern bestimmt sowie die Anzahl der Zellen, die Konjugationshyphen auswiesen. Für jedes Experiment wurde dann der Prozentsatz der Zellen mit Pheromonantwort berechnet und mindestens drei biologische Replikate gemittelt.

II.2.6 Filamentation

Medien

PD-Aktivkohle-Agar	24 g/l Potato Dextrose Broth; 1,0 g/l Aktivkohle; 2,0 g/l Bacto-Agar
YEPS _{light}	10 g/l Hefeextrakt; 4 g/l Pepton; 0,4 g/l Saccharose; 100 µg/ml Ampicillin frisch zugegeben

Auch für diesen Versuch wurden zunächst 3 ml YEPS_{light}-Medium mit Zellmaterial der FB1, FB2 bzw. SG200-Stämme von PD-Platten angeimpft und über Nacht bei 28°C und 250 rpm

inkubiert. Um die Kulturen in der logarithmischen Phase zu halten, wurden am nächsten Morgen 30 µl in 3 ml frisches Medium überführt und für weitere drei Stunden geschüttelt.

Nach dem Einstellen der einzelnen Kulturen auf eine OD₆₀₀ von 1,0 wurden die jeweiligen FB1- und FB2-Stämme im gleichen Verhältnis gemischt. Sowohl von den angesetzten Kreuzungen wie auch von den SG200-Zelllinien wurden jeweils 10 µl auf PD-Aktivkohle-Platten getropft. Zur Kontrolle wurden auch die Zellen von FB1 bzw. FB2 alleine auf die Platten ausgebracht.

Die Zellen wurden dann für 24 h bzw. 48 h bei 28°C entweder im Dunkeln inkubiert oder mit jeweils 10 µmol/m²s Blaulicht (450 nm), Rotlicht (658 nm) oder Dunkelrotlicht (741 nm) bestrahlt. Anschließend wurde die Koloniemorphologie an einem Binokular festgehalten.

II.2.7 Maisinfektion

Medium

YEPS _{light}	10 g/l Hefeextrakt; 4 g/l Pepton; 0,4 g/l Saccharose; 100 µg/ml Ampicillin (frisch zugegeben)
-----------------------	--

Für diesen Versuch wurden über-Nacht-Kulturen in 50 ml YEPS_{light} angezogen. Dann wurde das Kulturvolumen für eine OD₆₀₀ von 1,0 in 50 ml pelletiert, mit 20 ml sterilem Wasser gewaschen und letztlich in 50 ml Wasser aufgenommen.

Mit je 1 ml der Zellsuspension wurden dann Maiskeimlinge der Sorte „Early Golden Bantam“ infiziert, die eine Woche alt waren. Hierbei wurden die Zellen mit einer Kanüle ca. 1 cm oberhalb der Erde in die Mitte des zylinderförmigen Stengels gespritzt.

12 Tage nach der Infektion wurden die Symptome der einzelnen Pflanzen festgehalten. Für die Auswertung wurde das System von Kämper (Kämper *et al.* 2006) verwendet, bei dem die Symptome in sieben verschiedene Kategorien eingeteilt werden. Von jeder Pflanze wurde nur das stärkste Symptom gewertet und die Verteilung der Symptome verglichen.

In einer ersten Auswertung wurden für die einzelnen Zelllinien die Symptomverteilungen mehrerer Experimente zusammengezählt und die Verteilungen der Photorezeptormutanten mit dem Wildtyp verglichen. Die Analyse der Pflanzensymptome nach Infektion zeigte allgemein nur geringe Unterschiede zwischen Wildtyp und allen getesteten Mutanten, was durch die Betrachtung der Symptomverteilungen oftmals nicht leicht zu erkennen war. Auch eine statistische Analyse von Verteilungen mit jeweils sieben Kategorien erwies sich als schwierig.

	Bezeichnung	Beschreibung
0	asymptom	Keine Infektionssymptome erkennbar
1	Chlorose/Anthocyan	Weißer Bereiche mit Chlorose oder rote Bereiche mit Anthocyanbildung
2	Ligulaschwellung	Tumore an der Blattligula; Größe nicht bedeutend
3	kleine Tumore	Tumore von einer Größe bis zu 0,5 cm oder wenige größere Tumore
4	normale Tumore	Mehr als 5 größere Tumore
5	schwere Tumore	Veränderung der Wachstumsachse durch Tumorbildung am Stengelansatz
6	tote Pflanze	Tote Pflanze

Deshalb wurde ein neues Auswertungssystem entwickelt, womit die Stärke der Pathogenität verschiedener *U. maydis* Linien deutlicher zu unterscheiden und statistisch einfacher zu analysieren war. Dafür wurde jeder Symptomkategorie (Kämper *et al.* 2006), entsprechend ihrer Stärke, eine Zahl von 0-6 zugewiesen. Anhand dieser Zahlen war folgender Zusammenhang abzulesen. Je größer die Zahl, also je stärker die Symptome infizierter Pflanzen, desto pathogener die Zelllinie.

Jeder infizierten Pflanze wurde also bei der Auswertung anhand ihres stärksten Symptoms ein Zahlenwert zugewiesen. Pro Infektionsexperiment konnte dann der Mittelwert dieser Werte berechnet werden, der dann die mittlere Stärke der Infektion und damit die mittlere Pathogenität der *U. maydis* Zelllinie wiedergab. Unterschiede zwischen Wildtyp und Mutanten waren anhand der Zahlenwerte der mittleren Pathogenität leichter zu erkennen.

Anstatt die Symptome der einzelnen Infektionsexperimente für die einzelnen Mutanten zusammenzuzählen, wurden der Mittelwert und die Standardabweichung der mittleren Pathogenität berechnet. Dieser wurde mit dem entsprechenden Pathogenitätswert der zeitgleich erfolgten Wildtypinfektionen verglichen. Über den *student's* T-Test konnte auch eine statistische Analyse der Unterschiede durchgeführt werden.

Teilweise, beispielsweise bei SG200 $\Delta ops3$, wurden für die Maisinfektion mehrere Zelllinien mit dem gleichen Genotyp verwendet. Da letztlich eine allgemeine Aussage über den Effekt der Deletion von *ops3* gemacht werden sollte und sich die Zelllinien eigentlich nicht unterscheiden sollten, wurden zum Schluss auch die mittleren Pathogenitäten verschiedener Zelllinien gemittelt und mit dem entsprechend gemittelten Wildtypwert verglichen.

III. Ergebnisse

Zu Beginn dieser Arbeit waren kaum Beispiele bekannt, dass *Ustilago maydis* Licht erkennen und darauf reagieren kann. Um einen möglichen Einfluss von Licht auf die Genexpression in *Ustilago maydis* zu überprüfen, wurden Belichtungsexperimente mit einzelligen Sporidien durchgeführt. In diesem Stadium ist der Pilz unabhängig vom Kreuzungspartner oder der Maispflanze als Wirt.

Die Zellen wurden zunächst in Flüssigkultur im Dunkeln angezogen, so dass die Zellen zum Startzeitpunkt dunkeladaptiert waren. Dann wurden sie entweder weiterhin im Dunkeln gehalten oder für 60 Minuten mit blauem, rotem oder dunkelrotem Licht inkubiert. Um herauszufinden, welche Lichtqualität am wirksamsten ist, wurden gleiche Fluenzraten von $10 \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ eingestrahlt. Aus diesen Zellen wurde RNA isoliert und eine Transkriptomanalyse mit Illumina RNA Sequenzierung durchgeführt.

III.1 Der Effekt von Licht auf die Genexpression von *Ustilago maydis*

Es sollte zunächst herausgefunden werden, ob und gegebenenfalls welche Gene durch Licht in ihrer Expression beeinflusst werden. Als differentiell exprimiert und somit durch Licht beeinflusst wurde in diesem Fall ein signifikanter ($p \leq 0,1$), mindestens zweifacher Unterschied zwischen der Dunkel- und Lichtbedingung definiert.

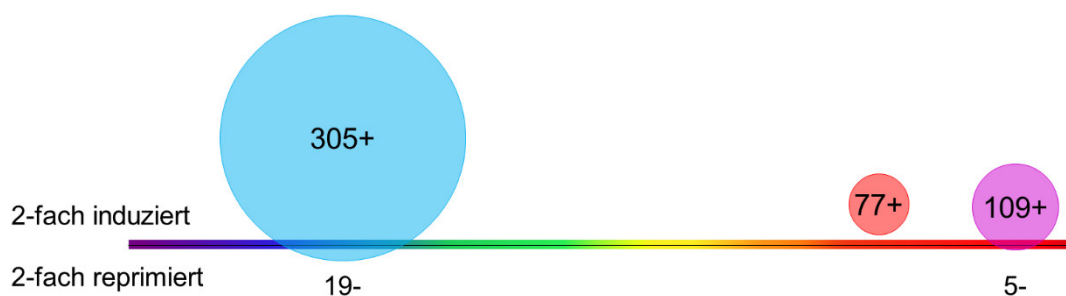


Abbildung III.1: Anzahl der Licht-regulierten Gene im FB1 Wildtyp von *U. maydis*. Dunkeladaptierte saprophytische Zellen wurden für 60 min mit $10 \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ Blaulicht (471 nm), Rotlicht (655 nm) oder Dunkelrotlicht (740 nm) bestrahlt bzw. im Dunkeln gehalten. Aus den Zellen wurde RNA isoliert und durch Illumina RNA Sequenzierung eine Transkriptomanalyse durchgeführt. Gezeigt ist die Anzahl der Gene, die einen signifikanten ($p \leq 0,1$), mindestens zweifachen Expressionsunterschied zwischen Licht- und Dunkelbedingungen aufwiesen. Die Daten basieren jeweils auf drei experimentellen Replikaten. +: höheres Transkriptlevel im Licht; -: höheres Transkriptlevel im Dunkeln.

Es zeigte sich, dass im Wildtyp im Blaulicht 324 Gene differentiell exprimiert wurden, was 4,7 % der insgesamt 6902 Protein-kodierenden Gene im Genom von *Ustilago maydis* entspricht (Abb. III.1) (Kämper *et al.* 2006). Die meisten von ihnen waren dabei im Blaulicht

stärker exprimiert, lediglich 19 wurden inhibiert. Im roten Licht zeigten 77 Gene (1,1 %) eine stärkere Expression als im Dunkeln und bei Inkubation in dunkelrotem Licht wurde die Expression von 109 Genen induziert und fünf Gene wurden reprimiert (1,7 %) (Abb. III.1). Somit konnte gezeigt werden, dass *Ustilago maydis* Licht verschiedener Wellenlängen erkennen kann und darauf mit veränderter Genexpression reagiert.

Ein Vergleich der einzelnen Lichtantworten zeigte eine Vielzahl an Genen, deren Expression nicht nur bei einer Lichtbedingung verändert wurde (Abb. III.2). Etwa ein Drittel der Blaulicht- bzw. der Dunkelrotlichtantwort wiesen eine Co-Regulation mit anderen Wellenlängen auf. Der Vergleich der Lichtantworten zeigte außerdem, dass es kein Gen gab, das ausschließlich durch Rotlicht induziert wurde. Alle differentiell im Rotlicht exprimierten Gene wurden durch mindestens eine weitere Lichtbedingung reguliert. Auffällig ist, dass alle co-regulierten Gene in den verschiedenen Lichtbedingungen der gleichen Tendenz folgten, sie wurden immer induziert.

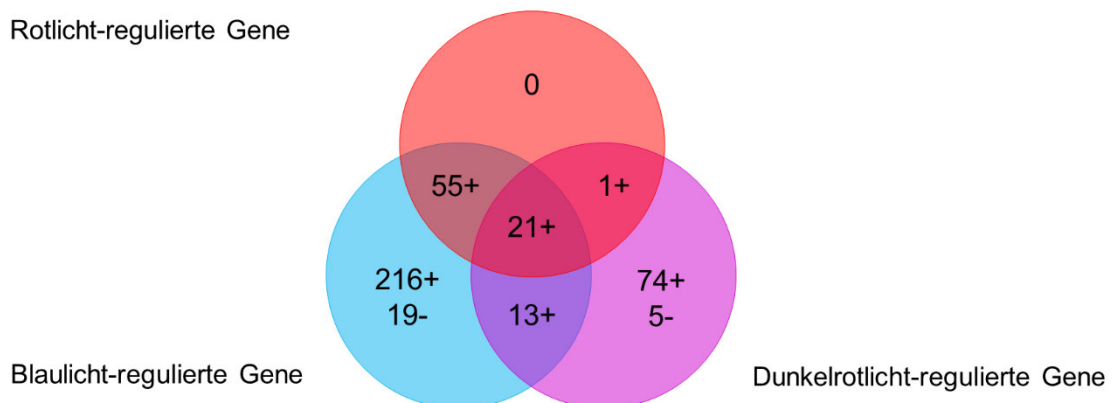


Abbildung III.2: Co-Regulation der differentiell exprimierten Gene der Lichtantwort in *Ustilago maydis*. Dunkeladaptierte FB1 Wildtyp-Zellen wurden für 60 min mit 10 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ Blaulicht (471 nm), Rotlicht (655 nm) oder Dunkelrotlicht (740 nm) bestrahlt bzw. im Dunkeln gehalten. Aus den Zellen wurde RNA isoliert und durch Illumina RNA Sequenzierung eine Transkriptionsanalyse durchgeführt. Gezeigt ist der Vergleich der unterschiedlichen Lichtantworten und die Anzahl der Gene, die in einer oder mehreren Bedingungen reguliert sind. Jeder Datensatz basiert jeweils auf drei experimentellen Replikaten. +: höheres Transkriptlevel im Licht; -: höheres Transkriptlevel im Dunkeln.

55 Gene wurden im Blau- und Rotlicht induziert, ein weiteres Gen wies eine Induktion bei Belichtung mit Rotlicht und Dunkelrot auf. Für 13 blaulicht-induzierte Gene trat ebenfalls eine Regulation im Dunkelrot auf. Bei 21 Genen zeigte die Bestrahlung bei allen drei Bedingungen eine Erhöhung der Transkriptmenge (Abb. III.2).

Über alle Lichtbedingungen hinweg wurden somit im FB1 Wildtyp 404 unterschiedliche Gene gefunden, deren Expression im Licht mindestens zweifach höher bzw. niedriger war als im Dunkeln (Abb. III.2; Tab. S1). Dies entspricht 5,9 % der Protein-kodierenden Gene von *Ustilago maydis* (Kämper *et al.* 2006).

III.1.1 Identifikation der Photorezeptoren für die Lichtantwort

Um herauszufinden, welche Photorezeptoren für die einzelnen Lichtantworten verantwortlich sind, wurden Deletionsmutanten der Photorezeptorgene hergestellt. Als Kandidat für einen möglichen Blaulichtrezeptor wurde White-collar 1 (*wco1*) gewählt und als möglicher Rot- und Dunkelrotlicht-Rezeptor wurde das Phytochrom (*phy1*) getestet. Analog zum Wildtyp wurden dunkeladaptierte Sporidien dieser Mutantenlinien im Dunkeln gehalten oder unter den verschiedenen Lichtbedingungen inkubiert und anschließend eine Transkriptomanalyse mittels RNA-Sequenzierung durchgeführt (Tab. III.1).

Tabelle III.1: Anzahl der Licht-regulierten Gene im Wildtyp im Vergleich zu den Mutanten $\Delta wco1$ und $\Delta phy1$. Die Daten basieren auf jeweils drei experimentellen Replikaten. +: höheres Transkriptlevel im Licht; -: höheres Transkriptlevel im Dunkeln.

	Blaulicht	Rotlicht	Dunkelrotlicht
Wildtyp	305+ 19-	77+ 0-	109+ 5-
$\Delta wco1$	0	0	36+ 5-
$\Delta phy1$	278+ 68-	0	0

Es zeigte sich, dass durch die Deletion von *Wco1* im Blaulicht überhaupt keine Gene mehr differentiell exprimiert wurden (Tab. III.1), was bedeutet, dass White-collar 1 für die Blaulichtantwort essentiell ist und als Photorezeptor für diesen Wellenlängenbereich fungiert. Wie schon bei Bestrahlung mit blauem Licht war in der $\Delta wco1$ -Mutante auch im Rotlicht kein Gen mehr differentiell exprimiert (Tab. III.1). Im Dunkelrotlicht wurden insgesamt noch 41 Gene (0,6 % aller Protein-kodierenden Gene von *U. maydis*) in $\Delta wco1$ differentiell exprimiert, was eine deutliche Reduktion im Vergleich zum Wildtyp darstellt. Allein die Zahlen deuteten also an, dass der *Wco1* einen positiven Einfluss auf die Rot- bzw. Dunkelrotlichtantwort hat. Bei näherer Betrachtung der Datensätze fiel auf, dass sich durch die Deletion von *wco1* nicht allein die Anzahl differentiell exprimierter Gene in der Mutante reduzierte, es wurden auch andere Gene im Dunkelrotlicht reguliert. Nur sieben von ihnen wurden in der Mutante und im Wildtyp reguliert und vier davon wiesen sogar eine gegensätzliche Regulation auf, d.h. sie wurden im Wildtyp induziert und in der Mutante reprimiert. Im Wildtyp und der $\Delta wco1$ -Mutante zusammen betrachtet, wurde die Expression von 148 Genen (2,1 %) im dunkelroten Licht beeinflusst (Tab. S1).

Auch für das Phytochrom konnte die Signalfunktion für den roten Wellenlängenbereich bestätigt werden, denn eine Lichtantwort auf Rot und Dunkelrot war in $\Delta phy1$ nicht mehr zu detektieren (Tab. III.1). Daneben scheint Phytochrom auch auf die Blaulichtantwort Einfluss zu nehmen (Tab. III.1). In der $\Delta phy1$ -Mutante wurden in dieser Bedingung zahlenmäßig sogar

mehr Gene differentiell exprimiert als im Wildtyp, was eher für einen inhibitorischen Effekt von Phy1 im Blaulicht spricht. In diesem Fall war der Großteil der im Wildtyp regulierten Gene (221) auch noch in der $\Delta phy1$ -Mutante reguliert. Das restliche Drittel der Blaulichtantwort im Wildtyp wurde in der Mutante nicht mehr differentiell exprimiert, stattdessen gab es Unterschiede bei 143 anderen Genen. Im Vergleich zum Wildtyp stieg die Anzahl der reprimierten Gene dabei deutlich an. Somit zeigten insgesamt 467 Gene (6,8 %) eine differentielle Genexpression im Blaulicht (Tab. S1).

III.1.2 Die Licht-unabhängige Funktion der Photorezeptoren

Neben der Funktion als Photorezeptoren wurde für Wco1 und Phy1 auch untersucht, ob sich durch deren Deletion bereits Unterschiede der Genexpression im Dunkeln zeigten. Hierfür wurden die Transkriptlevel der Dunkelproben in den Mutanten mit denen im Wildtyp verglichen (Abb. III.3).

Die $\Delta wco1$ -Mutante wies bei dieser Analyse 81 Gene mit einem zweifachen Unterschied auf. 30 von ihnen zeigten eine verringerte Expression ohne White-collar 1, sie waren also im Dunkeln durch Wco1 aktiviert. Die Transkription der anderen 51 wurde durch Wco1 dagegen inhibiert. Auch bei der $\Delta phy1$ -Mutante zeigten sich im Dunkeln Unterschiede zum Wildtyp. 71 Gene wurden ohne Phy1 stärker exprimiert, während fünf Gene eine geringere Transkriptmenge aufwiesen. Für beide Photorezeptoren konnte demnach nicht nur eine Regulationsfunktion im Licht beschrieben werden, sondern auch eine lichtunabhängige Funktion. Beim Vergleich der Licht-unabhängigen Funktionen von Wco1 und Phy1 zeigten 45 Gene eine Regulation durch beide Photorezeptoren (Abb. III.3).

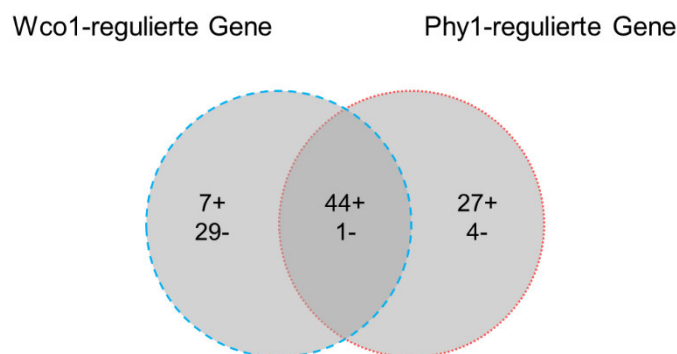


Abbildung III.3: Differentielle Genexpression in $\Delta wco1$ und $\Delta phy1$ im Vergleich zum Wildtyp im Dunkeln. Dunkeladaptierte Zellen des FB1 Wildtyps, der $\Delta wco1$ - und der $\Delta phy1$ -Mutante wurden für weitere 60 min im Dunkeln gehalten. Aus den Zellen wurde RNA isoliert und durch Illumina RNA Sequenzierung eine Transkriptomanalyse durchgeführt. Gezeigt ist der Vergleich der beiden Datensätze und die Anzahl der Gene, die durch einen oder beide Photorezeptoren reguliert werden. Jeder Datensatz basiert jeweils auf drei experimentellen Replikaten. +: höheres Transkriptlevel in der Mutante; -: höheres Transkriptlevel im Wildtyp.

Von den insgesamt 112 Genen (1,6 %), die im Dunkeln durch die Photorezeptoren kontrolliert wurden, wurden nur 24 Gene nicht im Licht reguliert. Die restlichen 79 % wiesen eine differentielle Expression in mindestens einer getesteten Lichtbedingung auf.

Von den im Dunkeln durch Wco1 kontrollierten Genen wurden 55 ebenfalls im Blaulicht beeinflusst. Dabei wurde für die Mehrheit von ihnen eine gleichläufige Tendenz der Regulation durch Wco1 und im Blaulicht gefunden. Oft wurde die Expression durch Wco1 im Dunkeln aktiviert und im Blaulicht nochmals gesteigert, weitere Gene wurden sowohl im Dunkeln als auch im Blaulicht reprimiert. Nur wenige Gene zeigten eine gegenläufige Regulation, sie wurden durch Wco1 im Dunkeln reprimiert und durch Blaulicht aktiviert. Die meisten Gene dieser Gruppe wurden aber neben Wco1 auch durch Phy1 bzw. dunkelrotes Licht beeinflusst.

48 Gene, die im Dunkeln durch Phytochrom beeinflusst wurden, wurden auch im dunkelroten Licht differentiell exprimiert. Hier zeigt sich eine einheitlich gegenläufige Tendenz, die meisten wiesen in der $\Delta phy1$ -Mutante im Dunkeln ein höheres Transkriptlevel als im Wildtyp auf, wurden aber durch Einfluss von Dunkelrotlicht aktiviert.

III.1.3 Funktionelle Analyse der differentiell exprimierten Gene

Neben der Identifikation der Gene, die durch Licht in ihrer Expression beeinflusst sind, war es für weitere Experimente auch interessant, welche Prozesse in der Zelle durch Licht beeinflusst wurden. Für diese Analyse wurden die annotierten Gen-Ontologie-Kategorien (GO) der differentiell exprimierten Gene betrachtet, die in der jeweiligen Lichtantwort im Vergleich zum Gesamttranskriptom statistisch signifikant ($q \leq 0,01$) überrepräsentiert waren (Ashburner *et al.* 2000; Mi *et al.* 2017; Perroud *et al.* 2018).

Abbildung III.4 zeigt jeweils die 15 Kategorien, die in den einzelnen Lichtbedingungen am stärksten überrepräsentiert waren. In allen drei Lichtbedingungen wurden relativ viele Kategorien des Metabolismus gefunden. Bei der Blau- und der Dunkelrotlichtantwort machten diese ein Drittel der überrepräsentierten GO-Kategorien aus. Dabei reagierte *Ustilago maydis* unterschiedlich auf die einzelnen Lichtbedingungen. Bei genauer Betrachtung zeigte sich, dass die Gene, die im Blaulicht reguliert wurden, ausschließlich in katabolen Prozessen annotiert waren (Abb. III.4A). Unter diesen 14 Kategorien fanden sich zum Beispiel Gene für den Abbau von Lipiden und Kohlenhydraten. Auch die differentiell exprimierten Gene der Rotlichtantwort hatten überwiegend eine katabole Funktion im Metabolismus (Abb. III.4B). Im Gegensatz dazu wurde bei Dunkelrotbestrahlung vermehrt die Biosynthese aktiviert (Abb. III.4C). Induziert wurden beispielsweise Gene für die Synthese von Aminosäuren, Tetrapyrrolen oder auch Pigmenten. Weiterhin wurden im Dunkelrotlicht im metabolischen Bereich auch spezifische Stoffwechselwege gefunden (Abb. III.4C). Gene für den Citratzyklus waren ebenso induziert wie Gene für die darauf folgenden Schritte der Atmungskette, bei der

die Elektronenübertragung letztlich in der ATP-Synthese und damit in der Energieerzeugung resultiert.



Abbildung III.4: Funktionelle Zuordnung Licht-regulierter Gene im FB1 Wildtyp. Die Gen-Ontologie (GO) Analyse zeigt jeweils die 15 Kategorien, die unter den differentiell exprimierten Genen im (A) Blau-, (B) Rot-, oder (C) Dunkelrotlicht überrepräsentiert sind. Die Größe der GO-Kategorien ist proportional zu $-\log_{10}(q)$ und die Farbe ist dunkel, wenn dieser Wert ≤ 4 ist bzw. hell, wenn er zwischen 2 und 4 liegt.

Am deutlichsten von der Blaulichtbestrahlung betroffen waren jedoch Oxidations-Reduktions-Prozesse. Alleine in dieser Kategorie waren 69 Gene differentiell reguliert. Außerdem wurden in dieser Bedingung Kategorien der Stressantwort beeinflusst. Bei der Photoreaktivierung, zu der die Reparatur von Pyrimidindimeren gehört, waren drei von fünf annotierten Genen induziert. Diese waren die beiden Photolyasen *phr1* und *phr2* sowie das DASH-Cryptochrom *cry2*.

Um zu überprüfen, welche Prozesse durch die Deletion dieser beiden Photorezeptoren beeinflusst waren, wurde die Funktionsanalyse für die Lichtantworten in den Mutanten analog zum Wildtyp durchgeführt und die Unterschiede betrachtet (Abb. III.5).

Im Blaulicht blieben ohne Phy1 die Kategorien der Stressantwort auf DNA-Schäden sowie die große Anzahl an Genen für Oxidations-Reduktions-Prozesse bestehen. Ebenfalls war

immer noch eine Reihe an Stoffwechselprozessen beeinflusst (Abb. III.5A). Obwohl Gene für den Abbau von Lipiden und Kohlenhydraten nicht mehr verstärkt auftraten, blieb der Trend für katabole Prozesse gleich. Neu hinzugekommen waren in dieser Bedingung die Kategorien des Citratzyklus und der zellulären Atmungskette mit der energiebringenden ATP-Synthese (Abb. III.5A), also die Prozesse, die im Wildtyp durch dunkelrotes Licht beeinflusst waren. Gene, die in diesen Kategorien annotiert waren, wurden in der $\Delta phy1$ -Mutante im Blaulicht jedoch reprimiert, es kam also zur Hemmung dieser Prozesse beim Fehlen von Phy1.

A



B

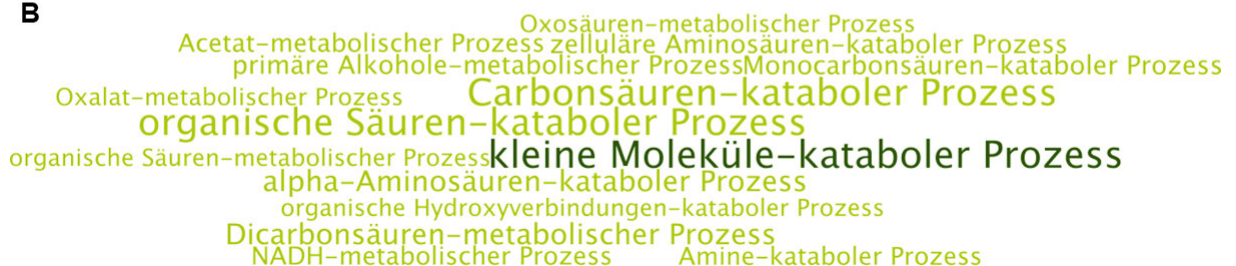


Abbildung III.5: Die Funktion der Licht-regulierten Gene in den Mutanten $\Delta phy1$ und $\Delta wco1$. Die Gen-Ontologie (GO) Analyse zeigt jeweils die 15 Kategorien, die unter den differentiell exprimierten Genen der (A) Blaulichtantwort in $\Delta phy1$ bzw. (B) Dunkelrotlichtantwort in $\Delta wco1$ überrepräsentiert sind. Die Größe der GO-Kategorien ist proportional zu $-\log_{10}(q)$ und die Farbe ist dunkel, wenn dieser Wert ≤ 4 ist bzw. hell, wenn er zwischen 2 und 4 liegt.

Mit der Deletion von White-collar 1 war der Metabolismus durch dunkelrotes Licht immer noch stark betroffen. Im Gegensatz zum Wildtyp wurde in diesem Genotyp aber eine Mehrzahl von Stoffklassen abgebaut (Abb. III:5B), was sich unter anderem an den Aminosäuren zeigt. Sie wurden im Wildtyp im Dunkelrotlicht synthetisiert, in der $\Delta wco1$ -Mutante wurden sie jedoch abgebaut.

Auch die Funktion der Gene, die im Dunkeln durch White-collar 1 oder Phytochrom reguliert wurden, wurde untersucht. Die Wco1-regulierten Gene waren in mehr als 100 überrepräsentierten Kategorien annotiert und durch Phy1 wurden insgesamt 80 Kategorien deutlich beeinflusst (Abb. III.6).

Die Auswertung der Daten ergab eine Gruppe von Kategorien, die nicht durch Licht kontrolliert wurde (Abb. III.6A). *Ustilago maydis* regulierte im Dunkeln Wco1-abhängig die Expression mehrerer Gene, die an der Homöostase von Eisenionen mitwirken. So wurden

beispielsweise Gene für die Synthese von Ferrichromen induziert, einer Art von Siderophoren, die für den Transport und die Speicherung der Metallionen zuständig sind (Gerwien *et al.* 2018).

Daneben waren auch im Dunkeln mehrere Stoffwechselkategorien überrepräsentiert (Abb. III.6). Gene für den Citratzyklus und die Atmungskette wurden sowohl durch Wco1 als auch durch Phy1 negativ beeinflusst, die Prozesse wurden also im Dunkeln gehemmt. Das gleiche galt für Gene, die an der Biosynthese von Aminosäuren beteiligt sind.

A



B



Abbildung III.6: Die Funktion der Wco1- und Phy1-regulierten Gene im Dunkeln. Die Gen-Ontologie (GO) Analyse zeigt jeweils die 15 Kategorien, die unter den differentiell exprimierten Genen der Licht-unabhängigen (**A**) Wco1- bzw. (**B**) Phy1-Funktion überrepräsentiert sind. Die Größe der GO-Kategorien ist proportional zu $-\log_{10}(q)$ und die Farbe ist dunkel, wenn dieser Wert ≤ 4 ist bzw. hell, wenn er zwischen 2 und 4 liegt.

III.2 Ein möglicher Komplex aus White-collar-Proteinen und Phytochrom

III.2.1 Die Lokalisation der Blau- und Rotlichtrezeptoren

Sowohl in der Lichtantwort im *Ustilago maydis* Wildtyp als auch für die Dunkelfunktion der beiden betrachteten Photorezeptoren Wco1 und Phy1 konnte ein gewisses Maß an Überschneidung festgestellt werden. Zusätzlich zeigten die Daten, dass Wco1 einen Einfluss auf die Antwort im roten Lichtspektrum hatte und Phy1 an der Blaulichtantwort mitwirkte. Dementsprechend stellte sich die Frage, ob die gegenseitige Beeinflussung von Wco1 und Phy1 auf die Nutzung gleicher Komponenten im Signalweg zurückzuführen ist oder ob es wie in *Aspergillus nidulans* zur einer direkten Interaktion und zur Ausbildung eines Photorezeptorkomplexes kommt (Bayram *et al.* 2010).

Um diese Frage zu klären, wurde die Lokalisation der einzelnen Photorezeptoren überprüft. Hierfür wurden Linien von *U. maydis* hergestellt, die eine Fusion aus dem Fluoreszenzprotein GFP und dem jeweiligen Photorezeptor tragen. Für Wco1 konnte ein konstitutiv exprimierender Stamm mit $\Delta wco1$ -Hintergrund verwendet werden, bei den beiden anderen Kandidaten, wco2 und phy1, war dies aufgrund der extrem schwachen Expression der Fusionsproteine nicht möglich. Deshalb wurde für diese Gene ein Arabinose-induzierbares System im Wildtyp-Hintergrund gewählt.

Eine Kernfärbung lebender *Ustilago maydis*-Zellen war nicht sehr erfolgreich, die DNA-Farbstoffe Hoechst und DAPI wurden nur selten von den Zellen aufgenommen und bei den Zellen, die einen leuchtenden Kern aufwiesen, war das GFP-Signal gestört. Deshalb wurde der Farbstoff pHrodoRed verwendet, der in saurem Milieu leuchtet und somit Vakuolen und den Protonengradienten über die Plasmamembran kennzeichnet. Dadurch ließen sich nach dem Ausschlussprinzip Zellkerne als die runden Strukturen identifizieren, die nicht leuchteten.

Das Signal für das Fusionsprotein GFP-Wco1 wurde demnach hauptsächlich im Zellkern und in geringerer Stärke ebenfalls im Cytoplasma gefunden (Abb. III.7). Das induzierte GFP-Wco2-Fusionsprotein zeigte die gleiche Lokalisation, das GFP-Signal wurde im Cytoplasma und deutlicher im Zellkern beobachtet. Die Co-Lokalisierung der beiden Proteine spricht dafür, dass auch in *Ustilago maydis* ein White-collar Komplex gebildet wird und vermutlich als Transkriptionsfaktor fungieren kann.

Das stärkste Signal des induzierten GFP-Phy1-Konstruktes wurde im Cytoplasma gefunden, der Zellkern zeigte nur ein sehr geringes Signal (Abb. III.7). Da das verwendete Mikroskop zwar sehr hochauflösend jedoch nicht konfokal war, könnte die beobachtete Fluoreszenz im Kern auch daher kommen, dass das Signal aus anderen Fokusebenen in diesen Bereich hineinstrahlte.

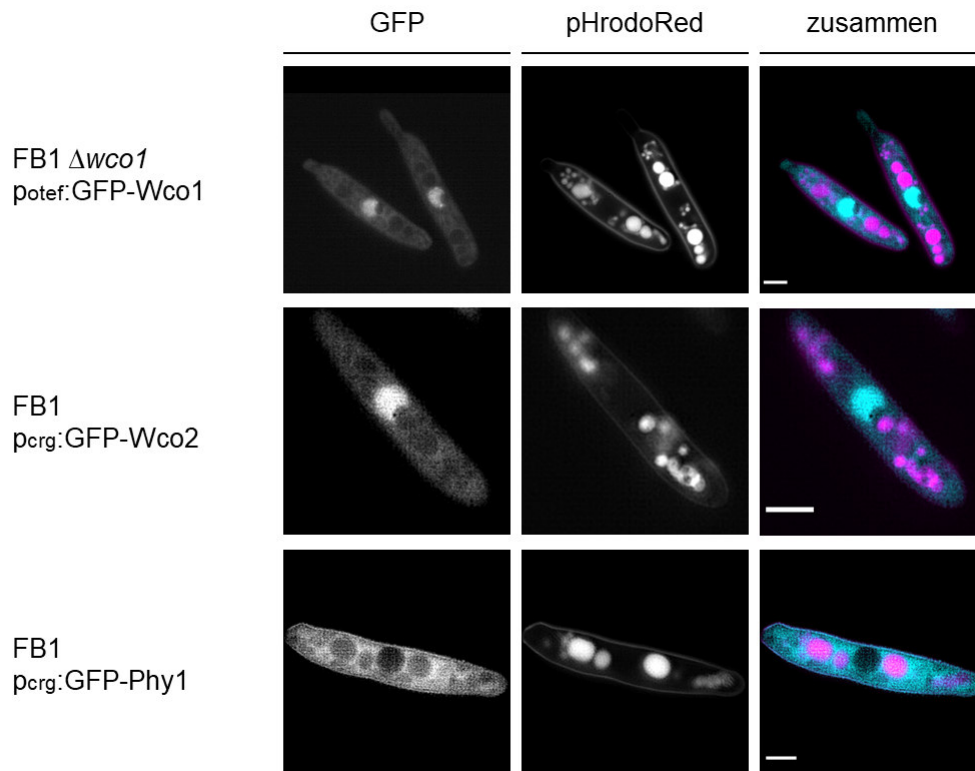


Abbildung III.7: Die Lokalisation von Wco1, Wco2 und Phy1 in *U. maydis* Sporidien. Die verschiedenen Zelllinien mit konstitutiv exprimierendem GFP-Wco1-Konstrukt im $\Delta wco1$ -Hintergrund bzw. mit induzierbarem GFP-Wco2 und GFP-Phy1 im Wildtyp-Hintergrund wurden in Vollmedium angezogen. Für die Induktion der Konstrukte mit dem *crg*-Promotor wurden die Kulturen anschließend in Medium mit Arabinose für drei Stunden inkubiert. Alle Zellen wurden dann gewaschen und in beschichtete Mikroskopiekammern gegeben, so dass sie am Boden anhaften konnten. Die Färbung mit pHrodoRed (pH-sensitiv; Vakuolen; magenta) erfolgte anschließend für 30 Minuten im Dunkeln. GFP-Signal cyan. Die Bilder wurden an einem Structured Illumination Mikroskop (SIM) aufgenommen. Der Größenstandard beträgt jeweils 2,5 μm .

Die Ergebnisse zeigten, dass eine mögliche Interaktion zwischen White-collar Komplex und Phytochrom, wenn überhaupt, eher im Cytoplasma stattfindet. Eine Komplexbildung im Zellkern kann aber aufgrund dieser Befunde nicht komplett ausgeschlossen werden.

III.2.2 Interaktionsanalyse mittels Hefe-2-Hybrid

Um zu überprüfen, ob die drei Proteine nicht nur co-lokalisieren sondern auch direkt interagieren, wurden Fusionen der Proteine mit der Aktivierungsdomäne bzw. der DNA-Bindedomäne des Transkriptionsfaktors Gal4 generiert, die dann in einen für Hefe-2-Hybrid-Versuche geeigneten Hefestamm eingebracht wurden. Bei direkter Interaktion zweier Zielproteine kommen im Idealfall auch die beiden Hälften von Gal4 in räumliche Nähe und der Transkriptionsfaktor wird aktiv. In dem verwendeten Hefestamm Matchmaker Y2HGold bindet er an vier Promotoren und kontrolliert die Expression zweier Gene, die die Auxotrophie von Adenin und Histidin komplementieren und eines weiteren für die Resistenz gegenüber dem

Antibiotikum Aureobasidin A. Das vierte Gen kodiert für das Enzym α -Galactosidase, das für eine quantitative Aussage der Interaktion genutzt werden kann.

Damit Phy1 aus *U. maydis* photochemisch aktiv sein konnte, musste der Chromophor Biliverdin gebildet und gebunden werden. Der letzte Schritt in der Biosynthese dieses Cofaktors wird durch das Enzym Hämoxxygenase katalysiert, das aber nicht im Genom von *S. cerevisiae* kodiert ist. Es musste somit zusätzlich zu den oben genannten Konstrukten in Hefe eingebracht werden. In den Vektor pBridge kann ein drittes Gen für die Analyse in Hefezellen integriert werden, wo es ohne Methionin im Reaktionsmedium induziert wird.

Um eine erfolgreiche Transformation der Hefezellen zu überprüfen, wurden die Ansätze auf Platten ohne Leucin und Tryptophan ausgestrichen. Damit wurden die Zellen selektioniert, die sowohl das Plasmid mit einem Konstrukt der Aktivierungsdomäne als auch das Plasmid mit der Fusion aus DNA-Bindungsdomäne und Zielprotein enthielten (Abb. III.8A, B). Um die eigentliche Interaktion der Photorezeptoren zu testen, wurden pro Ansatz mehrere Kolonien auf Platten getropft, denen nicht nur Leucin und Tryptophan, sondern auch die Aminosäuren Histidin und Methionin fehlten und die mit dem Antibiotikum Aureobasidin A (AbA) versetzt wurden. Auf diesen Platten sollten nur die Zellen wachsen, in denen die untersuchten Proteine direkt interagierten und dadurch der rekonstituierte Gal4-Transkriptionsfaktor aktiv war. Um eine mögliche Konformationsänderung der Photorezeptoren im Licht zu berücksichtigen, wurden die Hefezellen sowohl im Dunkeln als auch im Blau-, Rot- oder Dunkelrotlicht für mehrere Tage inkubiert.

Abbildung III.8A zeigt, dass Phy1 aus *U. maydis* in keiner der getesteten Lichtbedingungen mit einem weiteren Phytochrommolekül interagiert, denn auf dem Minimalmedium konnte kein Zellwachstum festgestellt werden. Zudem wies die BD-Phy1-Fusion keine Interaktion mit einem der beiden White-collar Proteine auf (Abb. III.8A). Eine Interaktion von AD-Phy1 mit Fusionen von Wco1 oder Wco2 mit der DNA-Bindungsdomäne von Gal4 konnte nicht untersucht werden, da die Kontrollen von BD-Wco1 und BD-Wco2 ohne Interaktionspartner bereits alleine ein deutliches Zellwachstum auf Selektionsmedium zeigten (Abb. III.8B). In Folge dessen konnte bei zwei eingebrachten Konstrukten nicht mehr unterschieden werden, ob eine direkte Interaktion vorlag oder ob es sich nur um die Autoaktivierung der White-collar Proteine handelte.

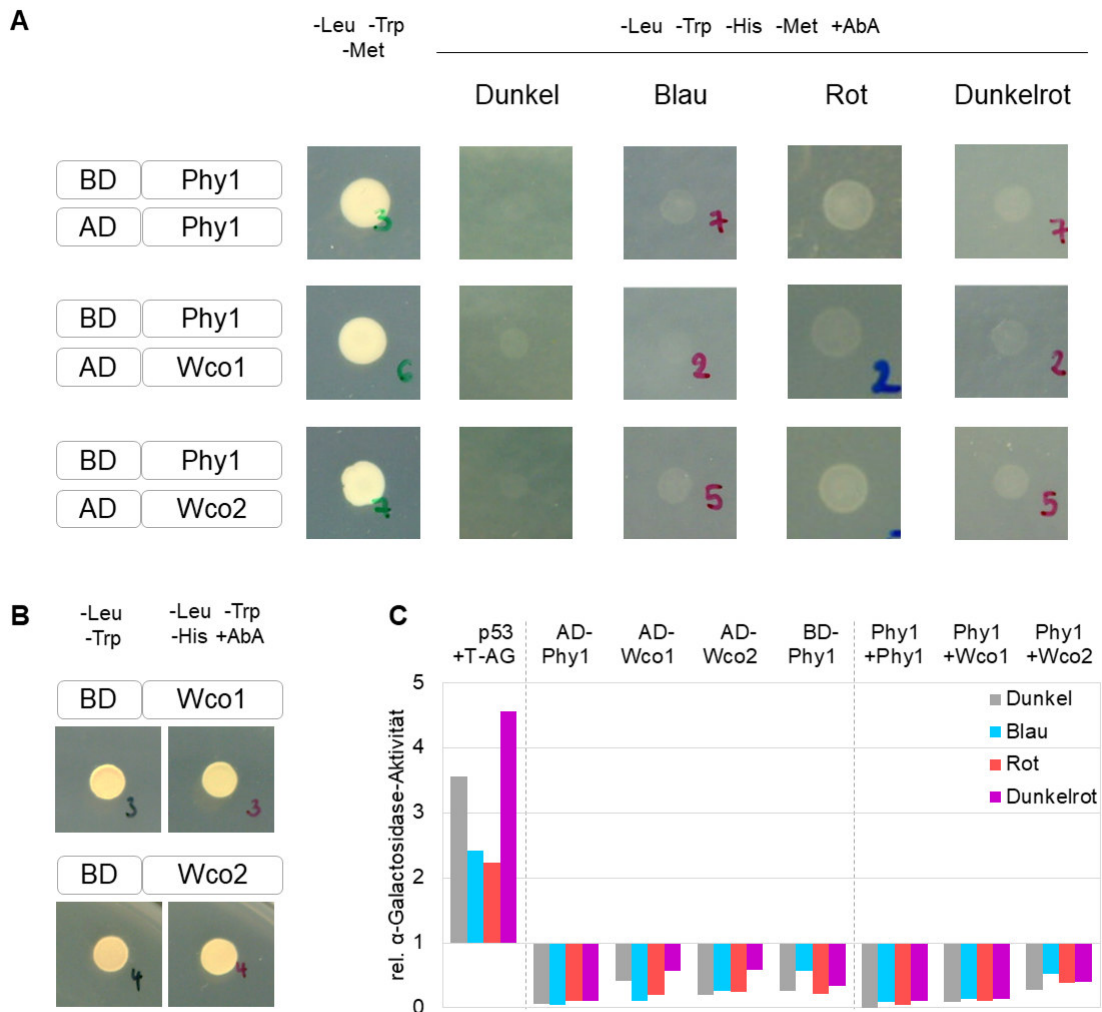


Abbildung III.8: Y2H Analyse möglicher Proteininteraktion von Phytochrom und den White-collar Proteinen. Der Hefestamm Matchmaker Y2HGold wurde mit den gezeigten Konstrukten transformiert, die Fusionen aus *U. maydis* Phy1, Wco1 oder Wco2 mit der Aktivierungsdomäne (AD) oder DNA-Bindedomäne (BD) des Gal4-Transkriptionsfaktors enthielten. Sie wurden als Kontrolle auf Doppel-Dropout (-Leu/-Trp)-Platten ohne Methionin und für die Interaktionsanalyse auf Selektionsplatten getropft und für mehrere Tage im Dunkeln bzw. bei 10 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ Blau- (450 nm), Rot- (658 nm) oder Dunkelrotlicht (741 nm) inkubiert. Gezeigt ist jeweils eine von neun Kolonien pro Ansatz. (A) Interaktionsanalyse von zwei Fusionsproteinen (B) Kontrollen der BD-Wco-Konstrukte. (C) Quantitative Interaktionsanalyse mittels α -Galactosidase-Aktivität mit jeweils einer Kolonie des Wachstumstests. Zellen wurden über Nacht in Flüssigmedium (-Leu/-Trp/-His/-Met) im Dunkeln oder im blauen, roten oder dunkelroten Licht angezogen. Nach Zugabe des Substrats wurde nach mehreren Stunden die Produktmenge photometrisch gemessen und auf die Negativkontrolle des entsprechenden Lichtprogramms normiert, die aus der großen Untereinheit des T-Antigens aus SV40 zusammen mit menschlichem Lamin bestand. Die Positivkontrolle bestand aus der großen Untereinheit des T-Antigens aus SV40 zusammen mit p53 aus der Maus.

Für eine quantitative Aussage über die Interaktion der Photorezeptoren konnte das vierte Gen herangezogen werden, das in dem verwendeten Hefestamm unter der Kontrolle von Gal4 stand. *MEL1* kodiert für das Enzym α -Galactosidase, das von den Hefezellen in das Medium abgegeben wird. Dort katalysiert das Enzym die Spaltung des Substrats 4-Nitro- α -D-Galactopyranosid, wobei ein Produkt entsteht, das photometrisch durch die Absorption bei 410 nm detektiert werden kann. Je nach Stärke der Absorption können Rückschlüsse auf

die Menge der α -Galactosidase im Medium und letztlich auf die Interaktion der Proteine gemacht werden.

Getestet wurde jeweils eine Kolonie mit den Ansätzen, bei denen eine Kombination der BD-Phy1-Fusion mit der Fusion aus Aktivierungsdomäne mit Phy1, Wco1 oder Wco2 vorlag. Außerdem wurde jeweils eine Kolonie der Transformanten analysiert, bei denen nur ein Fusionsprotein in den Zellen vorhanden war (Abb. III.8C). Auch bei diesem Versuch wurde der Einfluss von Licht auf die Interaktion der Photorezeptoren untersucht, indem die Zellen über Nacht unter verschiedenen Lichtbedingungen inkubiert wurden. Als Positivkontrolle dienen zwei Proteine aus der Maus, deren Interaktion im Hefe-2-Hybrid System mehrfach gezeigt wurde (Iwabuchi *et al.* 1993; Li und Fields 1993). Da selbst die Kontrollen einer gewissen Lichtabhängigkeit unterlagen, wurden alle Proben auf die Negativkontrolle in den jeweiligen Lichtbedingungen normiert. Diese bestand aus dem großen T-Antigen des SV40 Virus zusammen mit menschlichem Lamin, die nachgewiesenermaßen nicht interagieren (Yu *et al.* 2018).

Wie bereits aus den Wachstumsversuchen zu erwarten war, zeigten die Kontrollexperimente mit einem Fusionsprotein keine Umsetzung des Substrates. Die Werte der relativen α -Galactosidase-Aktivität lagen bei allen getesteten Lichtbedingungen sogar noch unter denen der Negativkontrolle (Abb. III.8C). Auch die Ergebnisse der Interaktionsanalyse aus den Wachstumsexperimenten wurden durch den α -Galactosidase-Assay bestätigt, denn auch hier war keine erhöhte Enzymaktivität gegenüber der entsprechenden Negativkontrolle vorhanden (Abb. III.8C). Eine Interaktion zwischen Phytochrom und einem der White-collar Proteine konnte demnach durch diese Methode nicht gezeigt werden.

III.3 Einfluss von Licht auf Entwicklungsprozesse in *U. maydis*

Nachdem die Frage geklärt wurde, ob *U. maydis* überhaupt in der Lage ist, Licht zu erkennen und darauf zu reagieren, sollte auch untersucht werden, ob Licht für die Entwicklung von *U. maydis* eine Rolle spielt. Dafür wurde der Lichteinfluss auf verschiedene Prozesse im Lebenszyklus des Pilzes untersucht.

III.3.1 Pheromonantwort und Ausbildung von Konjugationshyphen

Unter den differentiell exprimierten Genen war das Gen UMAG_02382, das als Pheromon *mfa1* annotiert ist. Im Wildtyp waren die Transkriptlevel im Blaulicht niedriger als im Dunkeln. Auch schien es unter Kontrolle von White-collar 1 zu stehen, denn im Dunkeln lagen die RPKM-Werte in der $\Delta wco1$ -Mutante unter denen des Wildtyps und ohne Wco1 wurde dieses Gen auch im Licht nicht mehr aktiviert (Abb. III.9).

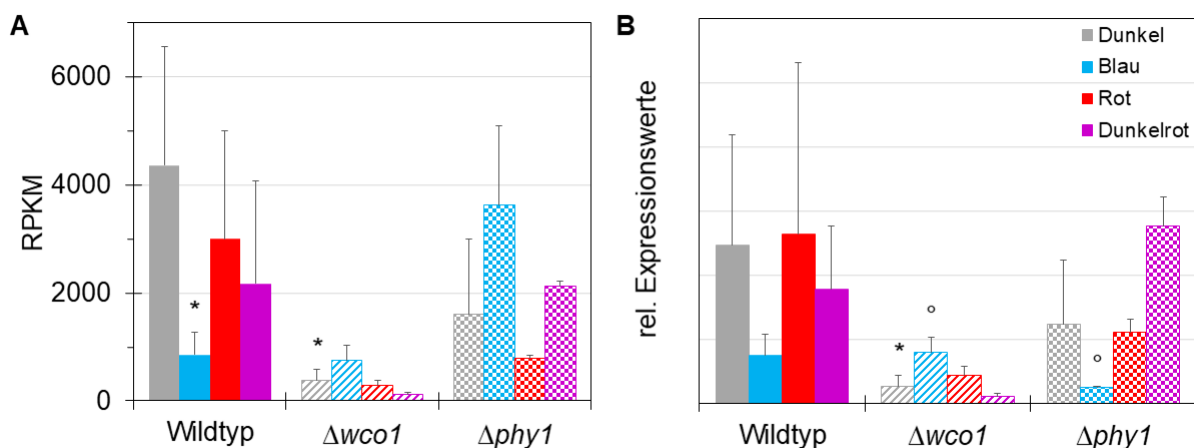


Abbildung III.9: Regulation der Pheromonexpression durch Licht, Wco1 und Phy1. Dunkeladaptierte saprophytische Zellen wurden für 60 min im Dunkeln gehalten oder mit 10 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ Blau- (471 nm), Rot- (655 nm) bzw. Dunkelrotlicht (741) bestrahlt und anschließend eine Transkriptomanalyse durchgeführt. (A) RPKM-Werte der RNA-Seq Daten für das Gen UMAG_02382 (*mfa1*). (B) Relative Expressionswerte aus qRT-PCR-Analysen. Normiert wurde gegen den internen Standard Cyclophilin. * signifikanter Unterschied zu Wildtyp-Dunkel, ° signifikanter Unterschied zum Dunkelwert des gleichen Genotyps. Die Daten beruhen jeweils auf mindestens drei experimentellen Replikaten.

Die Regulation der Expression von *mfa1* durch Licht und die Photorezeptoren wurde mittels qRT-PCR-Analysen überprüft. Trotz teilweise großer Unterschiede zwischen den einzelnen Replikaten folgten die qRT-PCR-Ergebnisse im Großen und Ganzen denen der RNA-Seq Daten, die Expressionswerte im Wildtyp waren durch Blaulicht ebenfalls niedriger als im Dunkeln und auch die Regulation durch Wco1 im Dunkeln konnte bestätigt werden. Im Gegensatz zu den RPKM-Werten zeigten die qRT-PCR-Daten in der $\Delta wco1$ -Mutante allerdings eine signifikante Induktion der *mfa1*-Level im Blaulicht. In der $\Delta phy1$ -Mutante wurde

sogar eine signifikante Reduktion von *mfa1* im Blaulicht im Vergleich zur Induktion von *mfa1* in den RNA-Seq Daten erhalten.

Das Pheromon ist für den ersten Entwicklungsschritt von *U. maydis* hin zu einer pathogenen Lebensweise wichtig. Weil die Expression des Pheromons selbst durch Licht reguliert wurde, sollte als nächstes überprüft werden, ob auch die Antwort auf Pheromon durch Licht oder die Photorezeptoren beeinflusst wurde.

Dies wurde getestet, indem FB1-Zellen nicht mit einem kompatiblen Kreuzungspartner, sondern mit einem synthetisch hergestellten Pheromon Mfa2 gemischt und für fünf Stunden in einem über-Kopf-Rotor inkubiert wurden. Dieser Schritt erfolgte entweder im Dunkeln oder bei Bestrahlung mit Blau-, Rot- oder Dunkelrotlicht. Für die Auswertung des Versuches wurde am Mikroskop die Gesamtzahl der Zellen bestimmt sowie der Prozentsatz der Zellen, die auf das zugegebene Pheromon mit der Bildung von Konjugationshyphen reagierten.

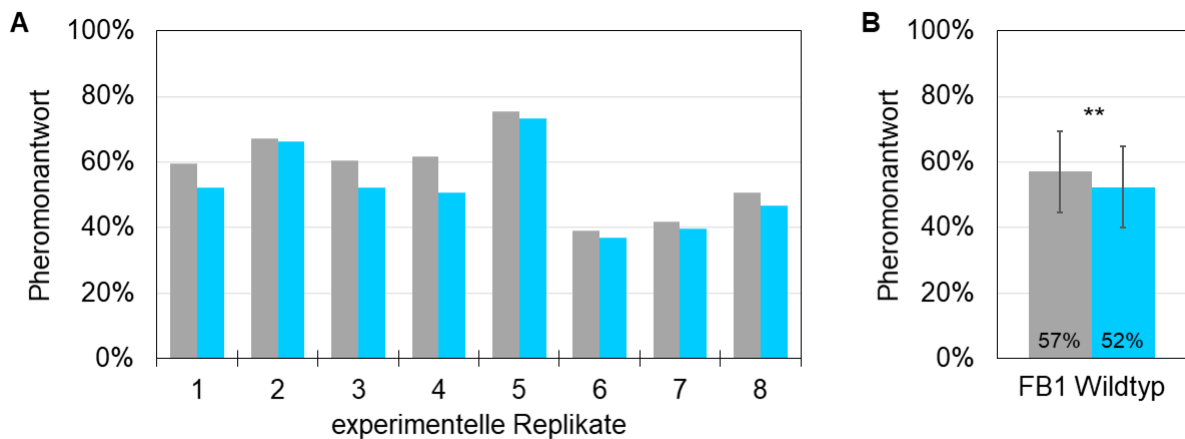


Abbildung III.10: Der Effekt von Blaulicht auf die Pheromonantwort von *U. maydis* FB1 Wildtyp. FB1 Sporidien wurden mit synthetischem Pheromon von FB2 gemischt und für 5 h im Dunkeln oder unter Blaulicht ($10 \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$; 450 nm) rotiert. **(A)** Für beide Bedingungen wurde der Quotient der Zellen mit Konjugationshyphen zu der Gesamtzahl an Zellen ermittelt und **(B)** von den experimentellen Replikaten Mittelwert und Standardabweichung berechnet. Die Farben der Balken entsprechen dem Lichtprogramm: Dunkel (grau), Blaulicht (blau). ** $p \leq 0,01$

In Abbildung III.10A sind acht Replikate für den Versuch mit FB1 Wildtyp gezeigt, bei denen die Zellen entweder im Dunkeln oder im Blaulicht inkubiert wurden. Allgemein fiel auf, dass der Prozentsatz der Zellen, die eine Reaktion auf das Pheromon zeigten, sehr variierte. Bei genauer Betrachtung war der Wert im Blaulicht aber immer geringer als der Dunkelwert. Die Berechnung des Mittelwerts ergab einen signifikanten Unterschied ($p=0,014$), obwohl eine große Standardabweichung vorlag (Abb. III.10B).

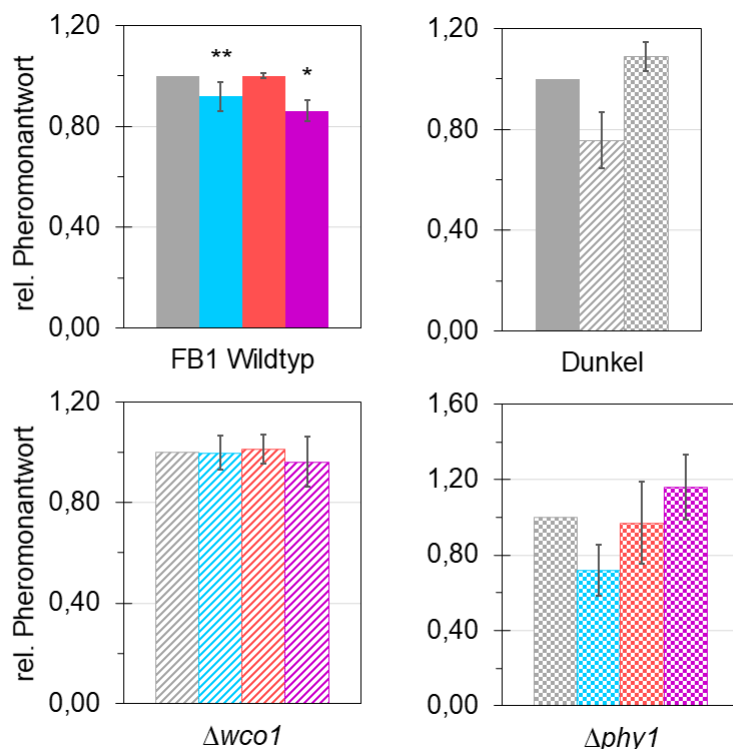


Abbildung III.11: Der Einfluss verschiedener Lichtbedingungen auf die Ausbildung von Konjugationshyphen. FB1 Sporidien wurden mit synthetischem Pheromon Mfa2 gemischt und für 5 h im Dunkeln oder im Blau- (450 nm), Rot- (658 nm) oder Dunkelrotlicht (741 nm) bei $10 \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ rotiert. Für die einzelnen Lichtbedingungen wurde der Quotient der Zellen mit Pheromonantwort zur Gesamtzahl an Zellen ermittelt. Die Lichtwerte wurden dann auf die jeweils zugehörigen Dunkelwerte normiert und Mittelwert und Standardabweichung berechnet. Die Farben der Balken entsprechen dem Lichtprogramm: Dunkel (grau), Blaulicht (blau), Rotlicht (rot), Dunkelrotlicht (pink). Die Füllungen zeigen die verschiedenen Genotypen: Wildtyp (gefüllt), $\Delta wco1$ (schraffiert), $\Delta phy1$ (kariert). Gezeigt sind die Daten von mindestens drei experimentellen Replikaten. * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$

Um trotz der von Experiment zu Experiment beobachteten Schwankungen (Abb. S1) eine Aussage treffen zu können, wurden im weiteren Verlauf der Dunkelwert der einzelnen Versuche auf 1,0 gesetzt und die Lichtwerte auf den entsprechenden Dunkelwert normiert. Dies ergab, dass im Wildtyp mit einem normierten Wert von 0,92 im Blaulicht weniger Zellen Konjugationshyphen bildeten als im Dunkeln. Während Wildtypzellen im dunkelroten Licht im Vergleich zum Dunkeln mit einem Faktor von 0,86 sogar eine noch stärkere Hemmung der Hyphenbildung als Blaulicht zeigten, hatte Rotlicht keinen Effekt auf die Pheromonantwort (Abb. III.11).

Auch dieses Experiment wurde mit den Deletionsmutanten $\Delta wco1$ und $\Delta phy1$ im FB1-Hintergrund durchgeführt, um eine Beteiligung der Photorezeptoren an der Pheromonantwort zu ermitteln. In $\Delta wco1$ war in keiner der drei Lichtbedingungen ein signifikanter Unterschied zu den entsprechenden Dunkelproben vorhanden. Im Dunkeln konnte in $\Delta wco1$ im Vergleich zum Wildtyp zwar eine Reduktion der Pheromonantwort festgestellt werden, jedoch war diese nicht signifikant (Abb. III.11). Ohne Phytochrom war eine leicht inhibierende Wirkung im

Blaulich und eine leicht fördernde unter dunkelroten Lichtbedingungen erkennbar, jedoch waren auch diese Werte nicht signifikant (Abb. III.11).

Diese Ergebnisse zeigten, dass die Bildung von Konjugationshyphen als Antwort auf externes Pheromon weitgehend dem gleichen Lichteinfluss unterliegt wie die Expression des eigenen Pheromons. Beide Prozesse waren durch Blaulicht beeinflusst und die Deletion von *White-collar 1* führte zu einer Reduktion der Genexpression von *mfa1* und zu einer Hemmung der Bildung von Konjugationshyphen.

III.3.2 Lichtregulation der Filamentation

Auch der nächste Schritt im Lebenszyklus von *Ustilago maydis* konnte im Labor untersucht werden. Wenn kompatible Zellen miteinander gemischt werden, kommt es zur Fusion der beiden Zellen und zur Ausbildung von Filamenten. Dies ist gut auf schwarzen Aktivkohleplatten zu beobachten, denn solche Kolonien weisen einen sogenannten *fuzzy*-Phänotyp auf und besitzen ein weißes Aussehen.

Zunächst wurden die kompatiblen Zellen vom FB1 und FB2 Wildtyp im gleichen Verhältnis gemischt, auf Aktivkohleplatten getropft und erneut auf den Einfluss von Licht untersucht. Getestet wurden die gleichen Bedingungen wie in den vorherigen Versuchen, also blaues, rotes und dunkelrotes Licht bei einer Fluenzrate von $10 \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$.

Bereits nach 24 Stunden waren auf den Aktivkohleplatten Filamente erkennbar, die Kolonien zeigten weiße Bereiche. Dabei hatte Licht keinen Einfluss auf die Fähigkeit der Zellen Filamente auszubilden, die Kolonien wiesen im Dunkeln genauso wie in allen Lichtbedingungen den *fuzzy*-Phänotyp auf (Abb. III.12). Auch Versuche mit dem solopathogenen SG200 Wildtyp, der Filamente ohne einen Partner bilden kann, zeigten vergleichbare Ergebnisse wie für die Kreuzung aus FB1 und FB2. Es wurde auch hier kein Einfluss von Licht auf die Fähigkeit der Filamentbildung festgestellt (Abb. III.12). Der Versuch wurde erneut auch mit Deletionsmutanten durchgeführt, um zu überprüfen, ob diese an dem Prozess der Filamentbildung beteiligt sind. Es wurde aber weder für die $\Delta wco1$ -Mutante noch für $\Delta wco2$ und $\Delta phy1$ ein Unterschied zum Wildtyp festgestellt (Abb. S2).

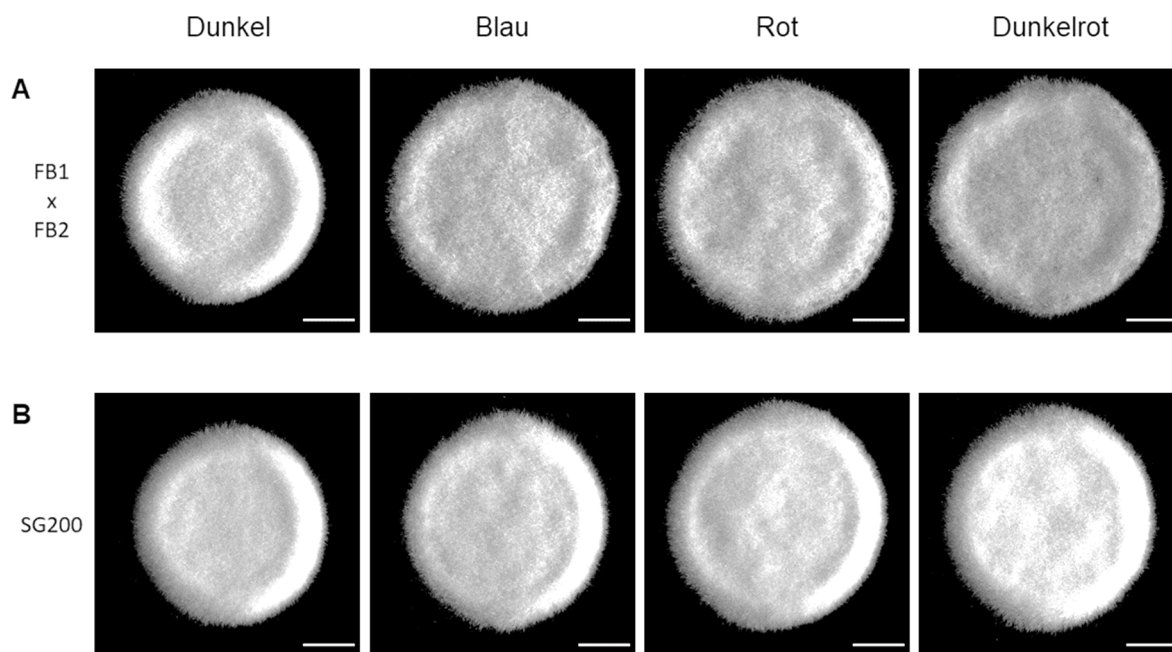


Abbildung III.12: Der Einfluss von Licht auf das Filamentationsverhalten von *U. maydis*. (A) Eine äquivalente Mischung aus FB1 und FB2 Wildtyp-Zellen bzw. (B) SG200 Wildtyp-Zellen wurden auf Aktivkohleplatten ausgetropft und für 24 Stunden im Dunkeln bzw. bei $10 \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ Blau- (474 nm), Rot- (658 nm) oder Dunkelrotlicht (741 nm) inkubiert. Die Bilder wurden an einem Binokular aufgenommen, der Größenstandard beträgt jeweils 1 mm.

Es wurden auch Zellen von FB1 oder FB2 alleine ausgebracht. Ohne passenden Kreuzungspartner sollten sich die Kulturen weiterhin hefeähnlich vermehren. Hier wurden trotz konstanter Versuchsbedingungen teilweise deutliche Unterschiede erkennbar. Zum einen wurde deutlich, dass sich bereits FB1 und FB2 Wildtyp Sporidien deutlich unterscheiden. Nach einem Tag sind die Kolonien von FB1 etwas kleiner als die von FB2. Nach einem weiteren Tag bildet FB1 dicke, gleichmäßig verteilte Wölbungen über die gesamte Kolonie. FB2 dagegen wächst flacher mit wenigen dünnen, dafür aber relativ hohen Strukturen, die oben am Rand oftmals zweigeteilt sind (Abb. III.13; Abb. S3).

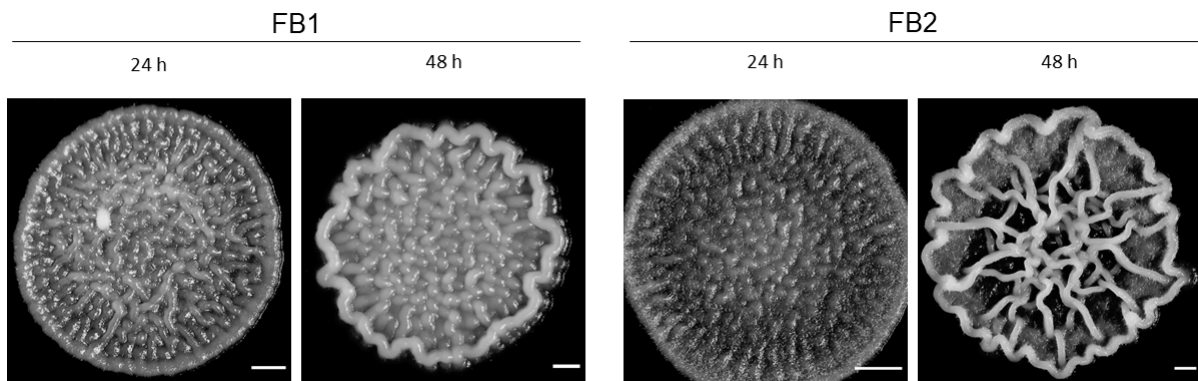


Abbildung III.13: Unterschiede in der Koloniemorphologie von FB1 und FB2 Wildtyp. FB1 bzw. FB2 Zellen wurden auf Aktivkohleplatten ausgetropft und für 24 bzw. 48 Stunden bei $10 \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ Blaulicht inkubiert. Die Bilder wurden an einem Binokular aufgenommen, der Größenstandard beträgt 1 mm.

Bei diesen Kolonien konnte auch ein Effekt von Licht festgestellt werden. Im Blaulicht hatte die Kolonie des FB1 Wildtyps ein rein glänzendes Aussehen. Im Dunkeln und unter rotem und dunkelrotem Licht entwickelten sich dagegen Kolonien mit kurzen „Härchen“ vor allem bei Randzellen was zu beobachten (Abb. III.14B). FB2 zeigt eine ähnliche Koloniemorphologie, im Allgemeinen war die „Härchenbildung“ aber etwas stärker, so dass die Kolonien auch im Blaulicht nicht komplett glatt waren (Abb. III.14B).

Die Kolonien von FB1 $\Delta wco1$ und $\Delta wco2$ hatten im Gegensatz zum Wildtyp bei jeder Lichtbedingung ein glänzendes Erscheinungsbild, es wurden nur vereinzelt „Härchen“ gefunden (Abb. III.14A). Bei den Linien im FB2-Hintergrund wurde die Bildung der kurzen Filamente nicht komplett unterdrückt, es ist noch ein deutlicher Unterschied zum Wildtyp zu erkennen, zusätzlich dazu ist noch ein Blaulichteffekt vorhanden (Abb. III.14B). Der White-collar Komplex scheint also im Dunkeln an der Regulation der Koloniemorphologie beteiligt zu sein.

Die Kolonien der $\Delta phy1$ -Mutante zeigten im FB1-Hintergrund die gleichen Oberflächenstrukturen wie der Wildtyp (Abb. III.14). Beim Vergleich der FB2-Zelllinien wurden dagegen Unterschiede erkennbar, denn vor allem im Rotlicht ist die $\Delta phy1$ -Kolonie weißer als die entsprechende Wildtyp-Kolonie. Somit scheint Phytochrom die Koloniemorphologie in bestimmten Zelllinien zu regulieren, jedoch nicht in allen.

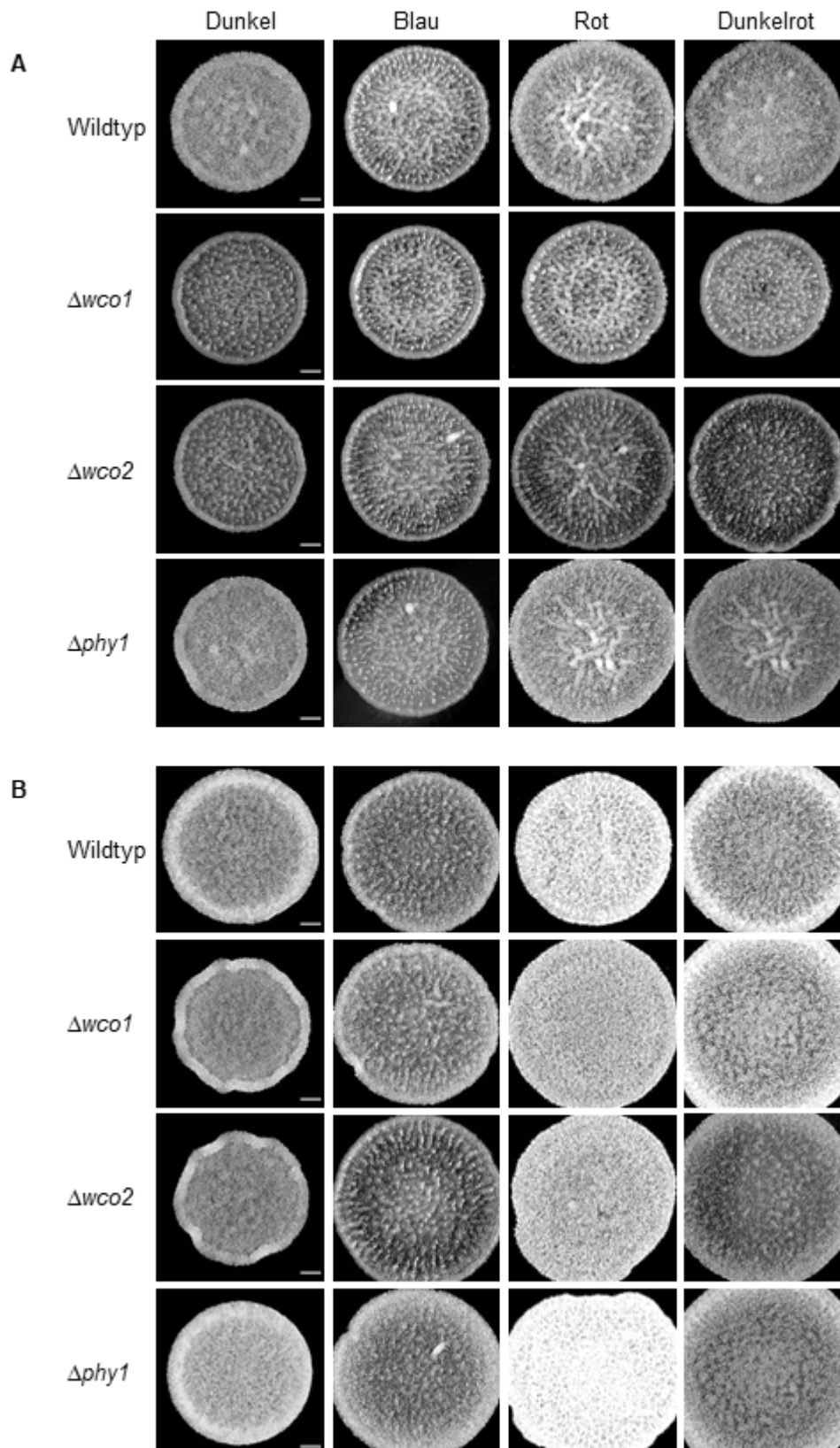


Abbildung III.14: Einfluss von Licht und Photorezeptoren auf die Koloniemorphologie von FB1 und FB2. (A) *FB1* bzw. (B) *FB2* Zellen gleicher Anzahl wurden auf Aktivkohleplatten getropft und nach 22 Stunden Inkubation im Dunkeln oder $10 \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ Blau- (450 nm), Rot- (658 nm) bzw. Dunkelrotlicht (741 nm) am Binokular fotografiert. Der Größenstandard beträgt 1 mm.

III.3.3 Die Bedeutung von White-collar 1 für die Pathogenität von *U. maydis*

Die Lichtregulation sollte auch in der biotrophen Wachstumsphase von *U. maydis* untersucht werden. Hierfür wurden Maispflanzen mit dem Pilz infiziert. Da auch Pflanzen auf Licht reagieren, war es in diesem Fall schwierig, die Versuche unter verschiedenen Lichtbedingungen durchzuführen, weil die Anzucht von Maispflanzen unter monochromatischen Lichtbedingungen zu deutlichen Wachstumsdefekten führten (Daten nicht gezeigt). Lichteffekte könnten auf der Reaktion beider Organismen beruhen. Deshalb wurden die Maisinfektionen mit verschiedenen Photorezeptor-Deletionsmutanten von *U. maydis* durchgeführt.

In der Natur werden Maispflanzen von zwei kompatiblen *U. maydis* Stämmen infiziert. Wie bereits bei den Filamentationstests (Abb. III.13) zu erkennen war, verhalten sich Zelllinien von FB1 und FB2 jedoch nicht immer exakt gleich. Deshalb wurden in den Experimenten Zelllinien im SG200-Hintergrund verwendet. Zwar fielen die Infektionen im Allgemeinen nicht so stark aus wie mit Kreuzungen kompatibler Zellen, sie hatten jedoch den Vorteil, dass Unterschiede nur auf eine Ursprungslinie zurückzuführen waren.

Es wurden SG200-Zellen mit einer Kanüle in junge Maispflanzen gespritzt und diese für knapp zwei Wochen im Gewächshaus gehalten. Dann wurde die Stärke der jeweiligen Infektion analysiert, indem jede Pflanze nach ihrem stärksten Symptom in eine von sieben Kategorien eingeteilt wurde. Entschieden wurde unter anderem, ob auf der Maispflanze Tumorbildung zu erkennen war, ebenso war deren Anzahl und Größe von Bedeutung. Die so erhaltenen Symptomverteilungen sollten dann mit anderen Infektionen verglichen werden.

In den ersten Versuchen zeigte sich, dass selbst die Infektionen mit dem SG200 Wildtyp nicht immer die gleiche Stärke aufwiesen, sondern sich abhängig von den schwankenden Bedingungen im Gewächshaus teilweise deutlich unterschieden. Um eine bessere Aussage über die Abhängigkeit der Pathogenität von den Deletionen verschiedener Photorezeptoren zu erhalten, wurden bei jedem Experiment mit Photorezeptormutanten parallel weitere Pflanzen mit dem Wildtyp infiziert. Daten wurden dann nur zwischen gleichzeitig infizierten Pflanzen verglichen.

Für einen besseren Vergleich und eine statistische Aussage wurden den einzelnen Symptomklassen abhängig von ihrer Gewichtung Werte von 0-6 zugeordnet (Abb. III.15) und der Mittelwert der Verteilungen ermittelt. Mit dem *student's* T-Test aller experimenteller Replikate wurde dann ermittelt, ob die Unterschiede in der Pathogenität der einzelnen Mutanten zu den jeweils zeitgleich infizierten Wildtyp-Durchgängen signifikant waren (Abb. III.15C).

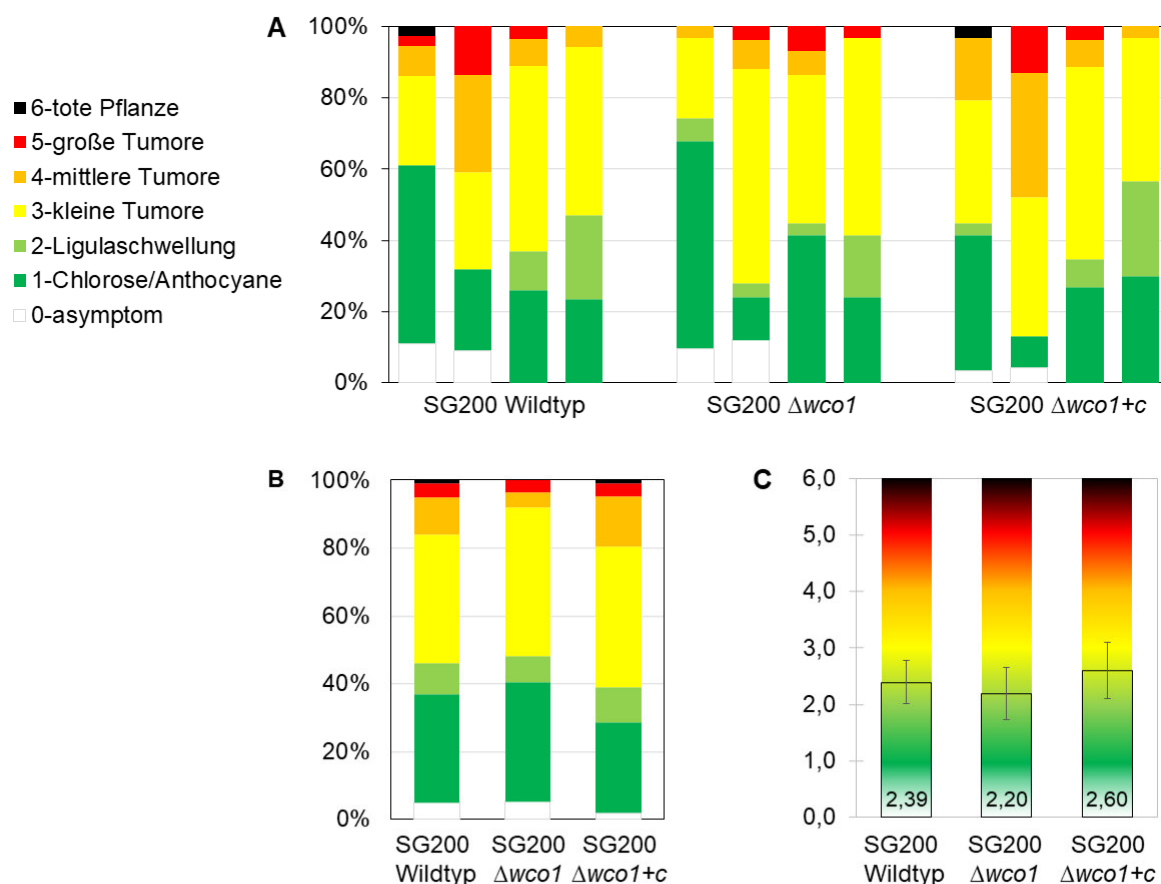


Abbildung III.15: Die Bedeutung von White-collar 1 für die Symptomausprägung von Maispflanzen bei Infektion durch *U. maydis*. Je 1 ml exponentiell wachsender SG200-Kulturen wurde in sieben Tage alte Maispflanzen gespritzt und diese im Gewächshaus gehalten. Nach zwölf Tagen wurden die Symptome jeder Pflanze untersucht und einer von sieben Kategorien zugeteilt. Hier wurden Infektionen mit SG200 Wildtyp, der $\Delta wco1$ Deletionsmutante und einer White-collar 1 Komplementationslinie ($\Delta wco1+c$) ermittelt. Gezeigt sind (A) einzelne Infektionsexperimente mit bis zu 40 Pflanzen, (B) die addierten Symptomverteilungen der experimentellen Replikate und (C) die Berechnung der mittleren Pathogenität, wofür den Kategorien Werte zugeordnet und Mittelwert sowie Standardabweichung berechnet wurden.

Zunächst wurde bei der Maisinfektion der Einfluss von *Wco1* untersucht. Pflanzen, die mit der $\Delta wco1$ -Mutante infiziert wurden, zeigten im Vergleich zur parallel durchgeführten Wildtypinfektion nach drei von vier Durchgängen vermehrt schwächere Symptome bzw. weniger der schweren Symptome (Abb. III.15A). Wurden die einzelnen Replikate zu einer Symptomverteilung von mehr als 100 Pflanzen zusammengezählt, war dies noch deutlicher zu erkennen (Abb. III.15B). Als Gegenkontrolle wurde mit einer Zelllinie infiziert, bei der *Wco1* unter Expression des eigenen Promotors am Lokus der Succinat-Dehydrogenase wieder in das Genom integriert wurde. In diesem Fall war die leicht verringerte Pathogenität der $\Delta wco1$ -Mutante aufgehoben und die Infektion verlief sogar etwas stärker als beim Wildtyp (Abb. III.15B, C). Diese Ergebnisse lassen auf einen Einfluss von *Wco1* auf die Pathogenität von *U. maydis* schließen. Dieser ist jedoch nur gering, was auch dadurch bestätigt wird, dass

der Unterschied zwischen den Mutanten und dem Wildtyp nicht signifikant ausfiel ($\Delta wco1$ $p=0,13$; $\Delta wco1+c$ $p=0,32$).

Die Bedeutung von Phytochrom für die Pathogenität von *U. maydis* wurde in der Masterarbeit von Katharina Parzefall untersucht (Parzefall 2017). Es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen der Pathogenität des SG200 Wildtyps und der $\Delta phy1$ -Mutante festgestellt werden.

III.4 Charakterisierung der Opsine aus *U. maydis*

III.4.2 Expression der Opsine

Neben den White-collar Proteinen und Phytochrom waren auch die drei Opsin-Kandidaten aus *U. maydis* als mögliche Photorezeptoren von Interesse. Bereits zuvor wurde beobachtet, dass die Expression von Opsin 1 und Opsin 2 im Weißlicht induziert wird (Estrada *et al.* 2009). Über Transkriptomanalysen konnten in der vorliegenden Arbeit weitere Erkenntnisse über die Expressionsbedingungen der Opsine gesammelt werden, welche durch qRT-PCR überprüft wurden (Abb. III.16).

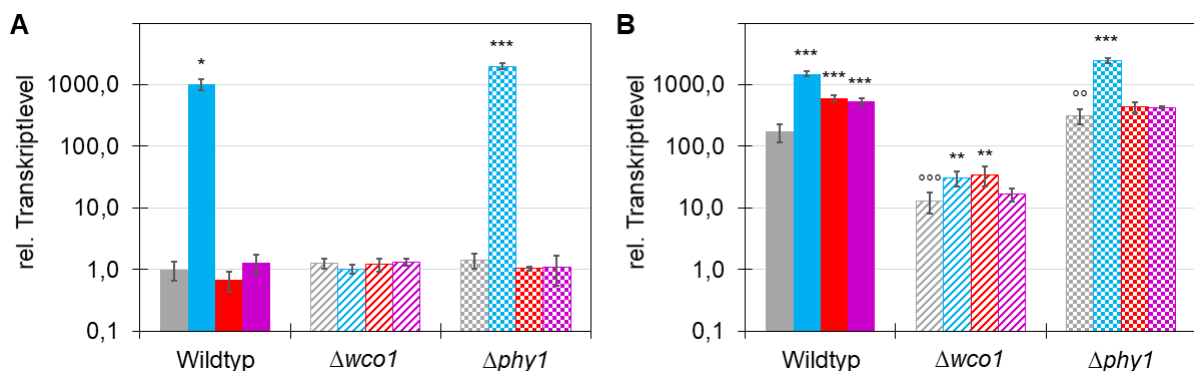


Abbildung III.16: Licht-abhängige Expression von *U. maydis* ops1 und ops2. Dunkeladaptierte saprophytische Zellen wurden für 60 min im Dunkeln gehalten oder mit 10 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ Blau- (471 nm), Rot- (655 nm) bzw. Dunkelrotlicht (741 nm) bestrahlt und anschließend eine Transkriptomanalyse durchgeführt. Gezeigt sind relative Expressionswerte aus qRT-PCR-Analysen für (A) *ops1* (UMAG_02629) und (B) *ops2* (UMAG_00371). Normiert wurde gegen den internen Standard Cyclophilin und auf den Wert von *ops1* im Wildtyp im Dunkeln. Die Farben der Balken entsprechen dem Lichtprogramm: Dunkel (grau), Blaulicht (blau), Rotlicht (rot), Dunkelrot (pink). Die Füllungen zeigen die verschiedenen Genotypen: Wildtyp (gefüllt), $\Delta wco1$ (schraffiert), $\Delta phy1$ (kariert). **/°° $p \leq 0,01$; ***/°°° $p \leq 0,001$; * im Vergleich zum Dunkelwert des jeweiligen Genotyps; ° im Vergleich zu Wildtyp-Dunkel. Die Daten beruhen jeweils auf drei experimentellen Replikaten.

Die Unterschiede der Transkriptlevel von Opsin 1, die durch qRT-PCR-Analysen berechnet wurden, waren ähnlich zu den RNA-Sequenzierungsdaten. Im Dunkeln waren die Transkriptmengen in allen drei getesteten Genotypen gleich und auch Rot- und Dunkelrotlicht hatten keinen Einfluss auf die Expression dieses Gens (Abb. III.16A). Im Blaulicht wurde für *ops1* im Wildtyp eine Transkriptmenge detektiert, die um das Tausendfache höher lag als im

Dunkeln und auch in der $\Delta phy1$ -Mutante wurde diese starke Induktion erreicht (Abb. III.16A). Der große Unterschied zwischen Dunkel und Blaulicht kam aber dadurch zustande, dass alle Werte auf den Dunkelwert von Opsin 1 normiert wurden. Die RNA-Sequenzierungen zeigten, dass das Gen in dieser Bedingung nahezu nicht exprimiert wurde, die entsprechenden RPKM-Werte lagen bei höchstens 1. Den gleichen Wert wies die $\Delta wco1$ -Mutante im Blaulicht auf, was darauf hinweist, dass die Genexpression von Opsin 1 unter diesen Bedingungen ausschließlich unter Wco1-Kontrolle steht.

Die Transkriptlevel von Opsin 2 lagen bereits im Dunkeln deutlich über denen von *ops1*, in dieser Bedingung wurden sie aber sowohl durch Wco1 als auch durch Phy1 kontrolliert (Abb. III.16B). Im Wildtyp wurde für *ops2* in allen getesteten Lichtbedingungen ein Unterschied zu den Dunkelwerten gefunden, wenn auch nicht so deutlich wie bei Opsin 1 (Abb. III.16B). Der Blaulichteffekt in der $\Delta wco1$ -Mutante blieb bei der qRT-PCR-Analyse bestehen (2,35-fach). Dieser Unterschied lag in den RNA-Sequenzierungen unter zwei und wurde demnach nicht erfasst, genau wie der Effekt von Rotlicht, der in der PCR-Analyse einen Unterschied von 2,67-fach bewirkt. Bestätigt werden konnte dafür, dass weder in der $\Delta wco1$ - noch der $\Delta phy1$ -Mutante langwelliges Licht einen Einfluss auf die Genexpression von *ops2* hatte (Abb. III.16B).

Opsin 3 war in keiner getesteten Bedingung exprimiert und zeigte dementsprechend auch keine Lichtabhängigkeit.

III.4.1 Einfluss der Opsine auf die Pathogenität von *U. maydis*

Weil Opsingene vermehrt in phytopathogenen Pilzarten vorkommen, sollte ebenfalls untersucht werden, ob die Opsine aus *U. maydis* an der Pathogenität beteiligt sind. *U. maydis* Zelllinien, bei denen jeweils ein Opsingen deletiert wurde, zeigten im Filamentationsverhalten keine Auffälligkeiten (Castro Márquez 2016) und auch eine Maisinfektion mit diesen Mutanten ergab mit einer mittleren Pathogenität von 2,45 bzw. 2,55 im Vergleich zum Wildtyp (2,77) keinen signifikanten Unterschied.

Deshalb wurden Doppelmutanten von *ops1* und *ops2* hergestellt und jeweils vier Durchgänge an Maisinfektionen durchgeführt. Obwohl es zu Schwankungen zwischen den einzelnen Replikaten kam, wiesen alle drei getesteten Linien einen mittleren Pathogenitätswert auf, der relativ deutlich unter dem des zugehörigen Wildtypwertes lag (Abb. III.17A). Für eine allgemeine Aussage über den Effekt der Doppeldeletion beider Opsine wurden die Einzelergebnisse der einzelnen Infektionsexperimente und Mutantenlinien zusammengerechnet. Die erhaltene mittlere Pathogenität für den Genotyp $\Delta ops1\Delta ops2$ ist demnach etwas geringer als die des Wildtyps, aber nicht signifikant unterschiedlich (Abb. III.17A).

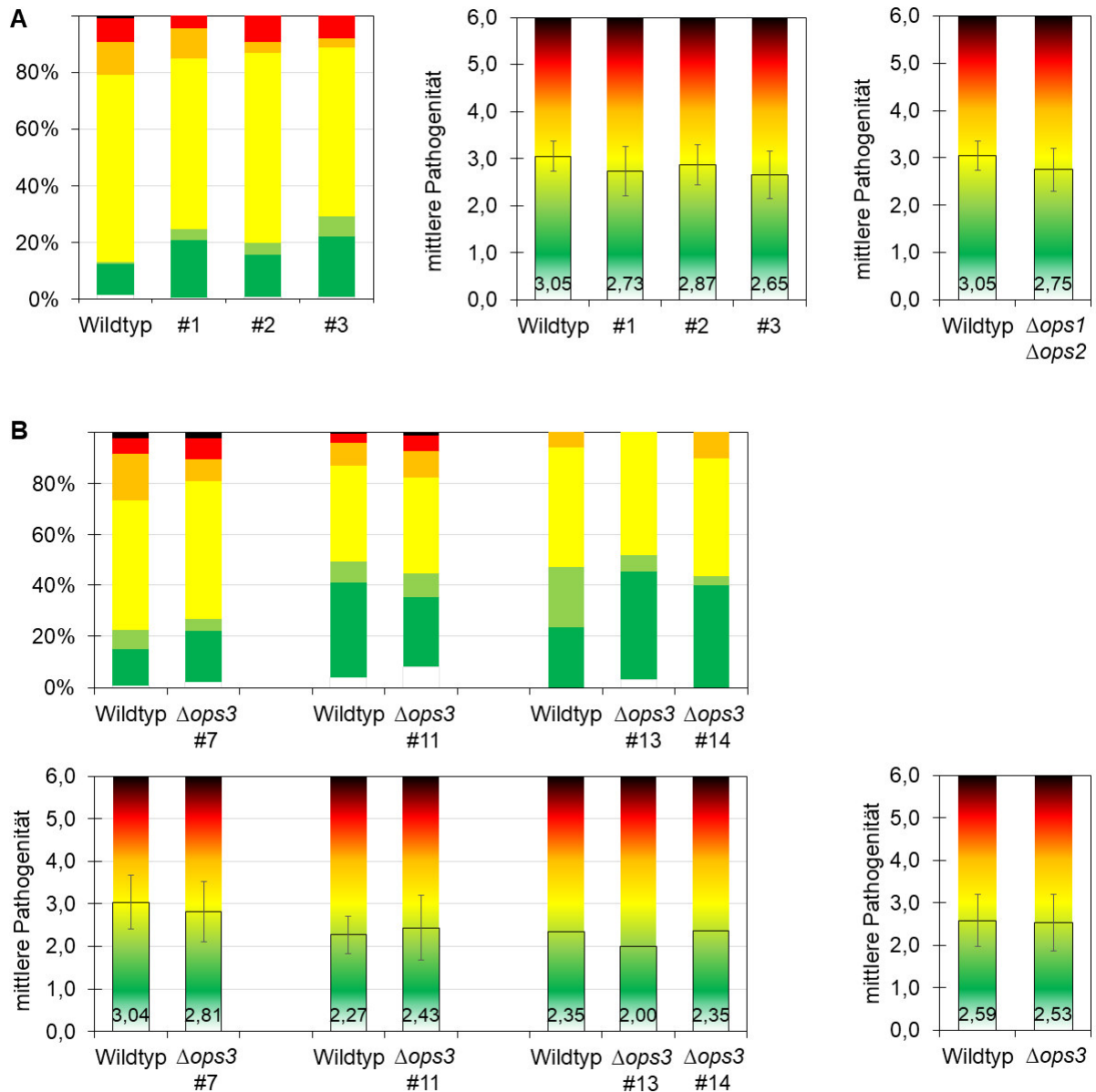


Abbildung III.17: Die Bedeutung der Opsine für die Symptomausprägung bei Maisinfektion durch *U. maydis*. Je 1 ml exponentiell wachsender SG200-Zellkulturen wurde in sieben Tage alte Maispflanzen gespritzt und im Gewächshaus inkubiert. Nach zwölf Tagen wurde jede Pflanze auf das stärkste Symptom untersucht und einer von sieben Kategorien zugeteilt. Gezeigt sind die zusammengezählten Symptomverteilungen und mittleren Pathogenitätswerte von (A) vier Infektionen mit drei unterschiedlichen $\Delta ops1\Delta ops2$ -Doppelmutanten (#1, #2, #3) und (B) mehreren Versuchen mit verschiedenen $\Delta ops3$ -Einzelmutanten und den jeweils parallel infizierten Wildtypdaten.

Einen Hinweis darauf, dass *ops3* möglicherweise innerhalb der Maispflanze wichtig ist, erbrachten frühere Analysen anderer Arbeitsgruppen. Zum einen wurde eine deutliche Aktivierung der Genexpression in der biotrophen Phase festgestellt, zum anderen hatte die Deletion des Gens UMAG_04125 eine Reduktion der Pathogenität zur Folge (Ghosh 2014; Lanver *et al.* 2018). Letzteres sollte mit neu hergestellten Deletionsmutanten reproduziert werden.

Bei vier getesteten $\Delta ops3$ -Linien konnte jedoch keine einheitliche Tendenz festgestellt werden (Abb. III.17B). Zwei von ihnen wiesen eine geringere Pathogenität als der Wildtyp auf, die Infektion mit einem weiteren Stamm führte dagegen zu stärkeren Symptomen und bei der letzten Mutante wurde überhaupt kein Unterschied zum Wildtyp beobachtet. Insgesamt fiel die etwas geringere Pathogenitätsstärke für die $\Delta ops3$ -Deletion im Vergleich zum Wildtyp nicht signifikant aus.

III.4.2 Lokalisation der Opsine

Um mehr über eine mögliche Funktionsweise der Opsine in Erfahrung zu bringen, wurde die Lokalisation der Proteine in *U. maydis* Sporidien untersucht. Hierfür wurden Konstrukte hergestellt, die eine C-terminale GFP-Fusion unter der Kontrolle des konstitutiv aktiven *otef*-Promotors oder des induzierbaren *crg*-Promotors in FB1 Sporidien exprimieren sollten.

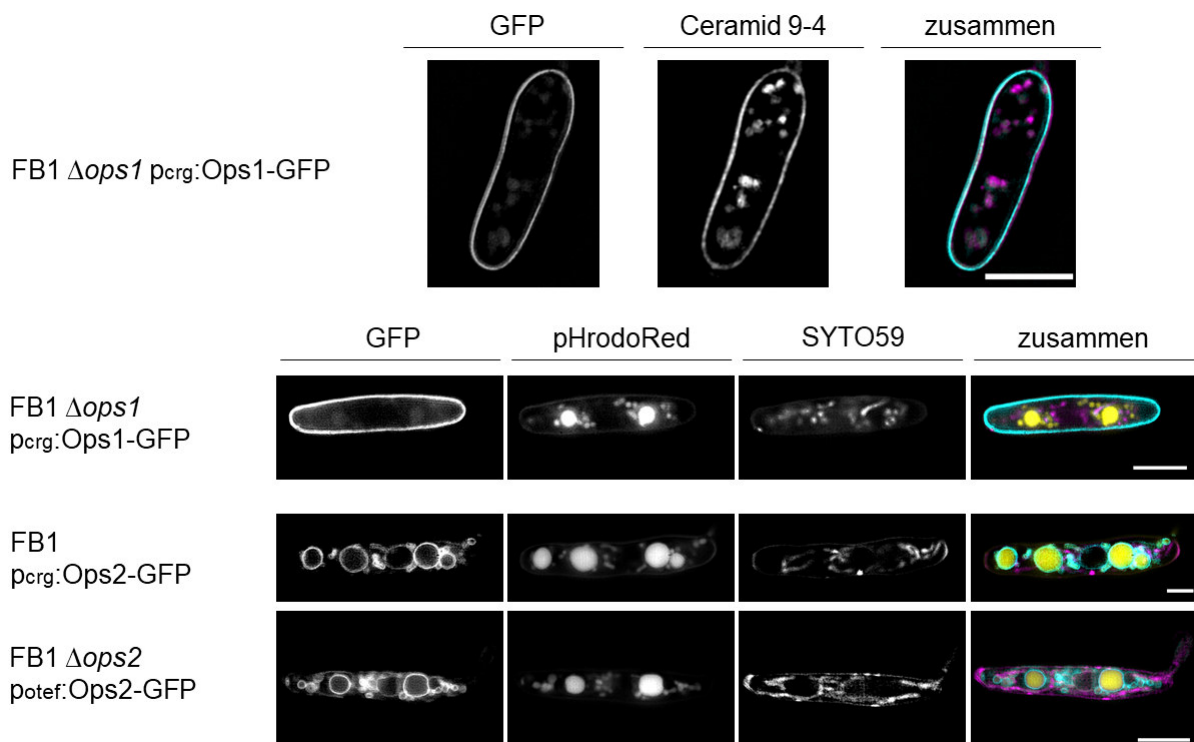


Abbildung III.18: Lokalisation von Ops1 und Ops2 in *U. maydis* Sporidien. Sowohl die Zellen mit konstitutiv exprimiertem Ops2-GFP im $\Delta ops2$ -Hintergrund, als auch die Zellen mit den induzierbaren Konstrukten, bei Ops1-GFP im $\Delta ops1$ -Hintergrund bzw. bei Ops2-GFP im Wildtyp-Hintergrund, wurden zunächst in Vollmedium angezogen. Für die Induktion der Konstrukte mit dem *crg*-Promotor wurden die Kulturen anschließend in Medium mit Arabinose überführt. Nach drei Stunden wurden alle Zellen gewaschen und in beschichtete Mikroskopiekammern gegeben, so dass sie am Boden anhaften konnten. Die Färbung mit Ceramid 9-4 (Membranlipid gekoppelt mit einem Cy5-Farbstoff), pHrodoRed (pH-sensitiv; Vakuolen; gelb) und SYTO59 für Mitochondrien (magenta) erfolgte anschließend für 30 Minuten im Dunkeln. GFP-Signal cyan. Die Bilder wurden an einem Structured Illumination Mikroskop (SIM) an der Universität Würzburg, AK Terpitz durchgeführt. Der Größenstandard beträgt jeweils 2,5 μm .

Die konstitutiv exprimierten Fusionen mit *ops1* und *ops3* zeigten kein Fluoreszenzsignal. Um dennoch die Lokalisation der Ops1-GFP-Fusion untersuchen zu können, wurden Konstrukte mit dem induzierbaren *crg*-Promotor hergestellt. Mit diesem Konstrukt wurde nach ausreichender Induktionszeit ein deutliches Signal erhalten. Über die Co-Färbung mit Ceramid 9-4 konnte nachgewiesen werden, dass Ops1-GFP ausschließlich in der Cytoplasmamembran lokalisierte (Abb. III.18).

Ops2-GFP zeigte bereits bei konstitutiver Expression eine gut erkennbare Fluoreszenz, die sich vom Ops1-Konstrukt unterschied. Das Signal wurde in der Membran intrazellulärer Strukturen beobachtet (Abb. III.18). Eine Co-Färbung mit dem pH-sensitiven Farbstoff pHrodoRed bewies, dass es sich dabei hauptsächlich um Vakuolen handelte. Ops2 integrierte aber nicht in die Mitochondrienmembran, was die Färbung mit dem Farbstoff SYTO59 anzeigte. Bei konstitutiver Expression war außerdem ein leichtes Signal um den Zellkern vorhanden, mit dem induzierbaren Konstrukt war diese Fluoreszenz nochmals schwächer, aber immer noch vorhanden (Abb. III.18).

IV. Diskussion

IV.1 Lichtantwort in *U. maydis*

Ustilago maydis ist ein Modellorganismus für das Studium der Interaktion zwischen Pilz und Pflanze. Sequenzanalysen zeigten zehn mögliche Photorezeptorkandidaten, aber es gab zu Beginn dieser Arbeit nur sehr wenige Analysen über die Photobiologie in diesem Pilz.

In Experimenten zur Carotenoidbiosynthese in *U. maydis* wurde hauptsächlich die Antwort auf weißes Licht betrachtet und es zeigte sich eine Licht-abhängige Induktion mehrerer Enzyme dieses Syntheseweges und der Opsine 1 und 2 (Estrada *et al.* 2009). Eine weitere Studie untersuchte den Effekt verschiedener Lichtbedingungen auf die Bildung von Fruchtkörpern, die in *Ustilago maydis* eher ungewöhnlich ist (Cabrera-Ponce *et al.* 2012).

Um die Frage zu adressieren, ob und wie der Pilz auf Licht verschiedener Wellenlängen reagiert und welche Photorezeptoren an der Reaktion beteiligt sind, wurden in der vorliegenden Arbeit saprophytisch wachsende Zellen aus dem Dunkeln ins Licht überführt. Über RNA-Illumina-Sequenzierung wurde dann analysiert, wie sich die Genexpression durch Belichtung verändert.

Bereits in vorausgegangenen Microarray-Experimenten konnte gezeigt werden, dass *U. maydis* auf Blaulicht reagiert (Brych *et al.* 2016). Diese Ergebnisse sollten zunächst bestätigt werden. Die Transkriptomanalyse dieser Bedingung mittels RNA-Sequenzierung zeigte, dass *U. maydis* auch niedrige Blaulichtintensitäten ($10 \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$) erkennt und die Expression von insgesamt 324 Genen verändert, wobei die meisten Gene induziert wurden. Mit diesen knapp 5 % der Protein-kodierenden Gene in *U. maydis* standen deutlich mehr Gene unter Blaulichteinfluss als in der Microarray-Analyse gefunden wurden, bei der die Belichtung mit einer höheren Fluenzrate von $30 \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$, ebenfalls für eine Stunde, die Expression von 60 Genen aktivierte und von einem weiteren inhibierte (Brych *et al.* 2016). Nur vier der damals identifizierten Gene wurden nicht in der geringeren Lichtintensität reguliert. Dass hingegen eine Reihe neuer Gene identifiziert wurde, ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass die RNA-Sequenzierung im Vergleich zur Microarray-Analyse eine sensitivere Methode ist, mit der auch geringe Transkriptmengen nachgewiesen werden können und dass sie das komplette Genom von *U. maydis* abdeckt, im Gegensatz zur Microarray-Analyse, bei der 5824 Gene auf dem Chip vorhanden waren.

Zusätzlich zur Blaulichtbestrahlung wurde die Analyse im roten und dunkelroten Licht durchgeführt. In beiden Bedingungen konnte eine Reaktion beobachtet werden, im Rotlicht wurden 77, im Dunkelrotlicht mit 114 sogar noch mehr Gene differentiell reguliert (Abb. III.1).

Insgesamt konnte somit gezeigt werden, dass *U. maydis* in der Lage ist, Licht zu erkennen und unterschiedliche Wellenlängen zu unterscheiden. Betrachtet für alle drei getesteten

Wellenlängen wurden im FB1 Wildtyp insgesamt 404 unterschiedliche Gene durch Licht beeinflusst und in den getesteten Deletionsmutanten $\Delta wco1$ und $\Delta phy1$ weitere 137. Zusammen machen diese 541 Licht-abhängig exprimierten Gene 7,8 % des Genoms aus.

Mit diesem Wert bewegt sich das Ausmaß der Lichtantwort von *U. maydis* in der gleichen Größenordnung wie bei anderen Pilzen. *N. crassa* reguliert rund 5,6 % seiner Gene nach Belichtung, wenn die früh und spät regulierten Gene zusammengefasst werden (Chen *et al.* 2009). In *A. nidulans* standen ebenfalls rund 5 % der Gene unter Kontrolle von Licht (Ruger-Herreros *et al.* 2011). In *C. neoformans* zeigte dagegen nur ein einziges Gen im Licht eine zweifach höhere Transkriptmenge als im Dunkeln (Idnurm *et al.* 2010). Allerdings beruhten alle diese Analysen auf Weißlichtbestrahlungen und unterschieden demnach nicht zwischen Reaktionen in verschiedenen Spektralbereichen oder verschiedener Photorezeptoren.

IV.2 Das Zusammenspiel von Blaulicht- und Rotlicht-Photorezeptoren

Um eine mögliche Zusammenarbeit von Blaulicht- und Rotlicht-Photorezeptoren in *U. maydis* näher zu betrachten, wurden die Gene von White-collar 1 (*wco1*) bzw. von Phytochrom (*phy1*) deletiert und die Reaktion dieser Mutanten auf Belichtung in axenischen Kulturen untersucht.

Es zeigte sich, dass ohne *Wco1* die Blaulichtantwort komplett ausfiel, weil kein Gen eine differentielle Expression mehr zeigte. Damit wurde *Wco1* bzw. der White-collar Komplex in *U. maydis* als essentieller Rezeptor für diese Lichtbedingung identifiziert. Eine Beteiligung weiterer Photorezeptoren an der Blaulichtantwort, wie dies zuvor diskutiert wurde (Brych *et al.* 2016), war aufgrund dieser Ergebnisse eher unwahrscheinlich. Allerdings konnte eine Beteiligung des Gens *UMAG_02502* an der Licht-abhängigen Bildung von Fruchtkörpern beobachtet werden (Sánchez-Arreguin *et al.* 2020). Dieses Gen könnte aufgrund seiner Sequenz ein zweites White-collar Protein in *U. maydis* kodieren. Weil diesem Protein allerdings die typische LOV-Domäne mit der Flavinbindestelle fehlt, wurde es in der vorliegenden Arbeit und zuvor (Brych *et al.* 2016) nicht als Photorezeptor in Betracht gezogen.

Über die Deletion von *phy1* konnte das *U. maydis* Phytochrom als Rezeptor im roten und dunkelroten Bereich identifiziert werden, denn in der Mutante hatten beide Lichtbedingungen keinen Einfluss mehr auf die Genexpression. Erste biochemische und spektroskopische Untersuchungen an der rekombinant exprimierten lichtsensorischen Domäne von *Phy1* aus *U. maydis* zeigten, dass dieser Photorezeptor reversibel in die beiden Formen *Pr* und *Pfr* überführt werden kann (Parzefall 2017). Vorhergehende Untersuchungen an *A. nidulans* postulierten, dass pilzliche Phytochrome im Dunkeln in der *Pr*-Form gebildet werden und im Rotlicht in ihrer aktiven Form *Pfr* vorliegen (Brandt *et al.* 2008). Die RNA-Seq Daten aus

U. maydis zeigten dagegen einen deutlicheren Effekt von Phy1 im Dunkelrotlicht, was eher auf die Pr-Form als aktive Konformation hindeutet. Weitere Analysen müssen in diesem Zusammenhang durchgeführt werden, z.B. die Klärung der Frage, welche Form von Phy1 in *U. maydis* im Dunkeln gebildet wird und welche Konformation als Histidinkinase aktiver ist.

Neben der Funktion von Wco1 und Phy1 in ihren jeweiligen primären Absorptionsbereichen wurde in jeder Lichtbedingung ein gewisses Maß an gegenseitiger Regulation deutlich, die in Abbildung IV.1 in einem Modell dargestellt ist.

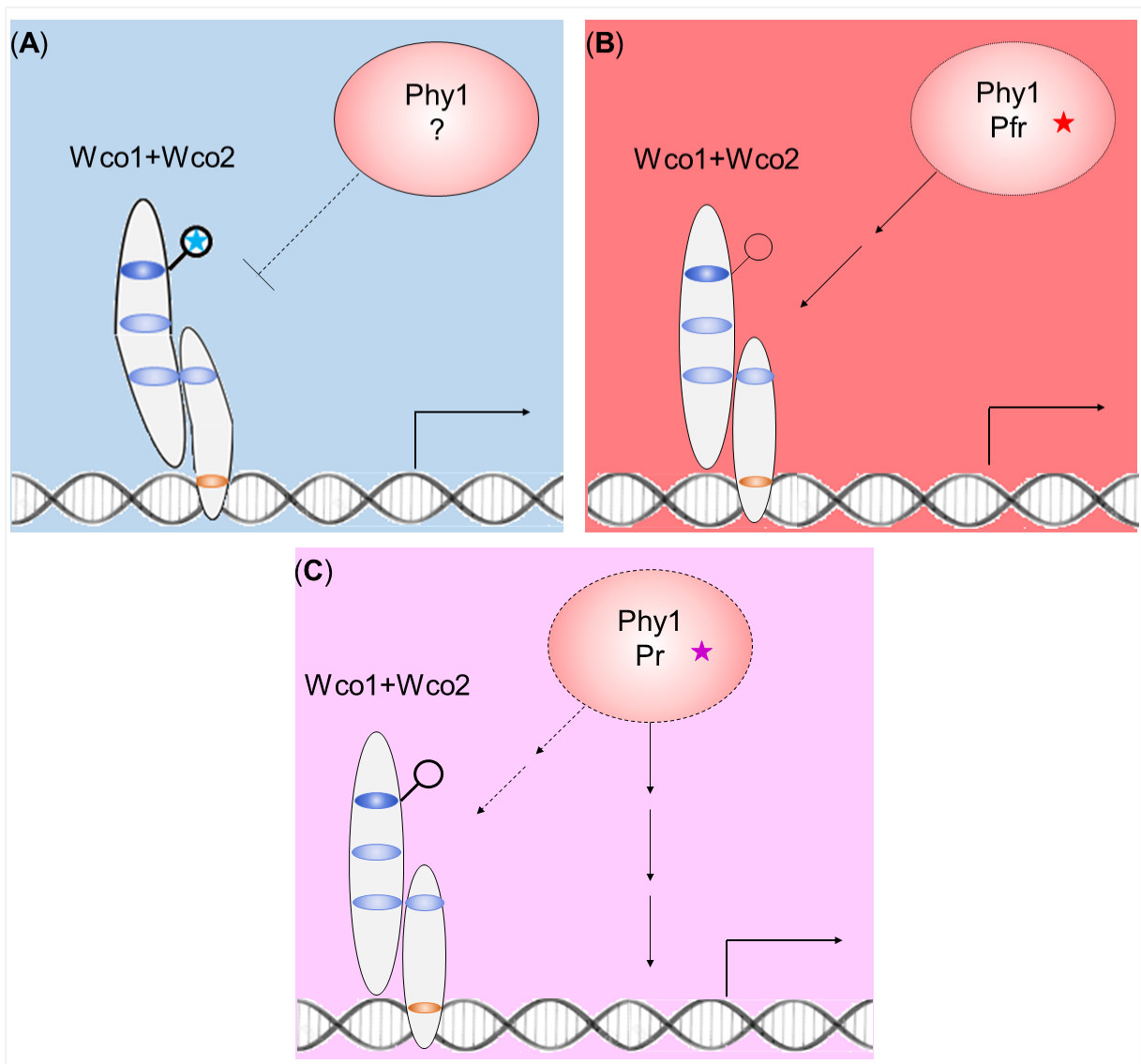


Abbildung IV.1: Modell der Lichtantwort mit Beteiligung der Photorezeptoren White-collar Komplex (Wco1+Wco2) und Phytochrom (Phy1). (A) Im Blaues Licht ist die Regulation der Genexpression vollständig von Wco1 abhängig, der in dieser Lichtbedingung durch Phytochrom unter inhibitorischer Kontrolle steht. (B) Im Rotlicht liegt das aktivierte Phytochrom hauptsächlich in der Pfr-Form vor, die Regulation der Genexpression ist abhängig von Phytochrom und dem White-collar Komplex. (C) Im Dunkelrotlicht ist überwiegend die Pr-Form des Phytochroms vorhanden. Phy1 kann die Expression einiger Gene alleine regulieren, für eine Untergruppe an Genen ist jedoch der White-collar Komplex wichtig.

Im Blaulicht war das angeregte Wco1 für die Lichtantwort essentiell und steuerte die Genexpression direkt (Abb. IV.1A). Da ohne Phytochrom eine erhöhte Zahl an Genen im Blaulicht reguliert wurde, scheint Phy1 einen negativen Einfluss auf den White-collar Komplex zu haben. Dabei ist zu diesem Zeitpunkt nicht gezeigt, in welchem Zustand das Phytochrom in der Zelle vorliegt.

Im Rotlicht wurde Phytochrom angeregt und lag somit vermutlich vermehrt in der Pfr-Form vor (Abb. IV.1B). Die Genexpression in dieser Bedingung war allerdings auch von White-collar 1 abhängig, denn ohne diesen Blaulichtrezeptor konnte kein Effekt von Rotlicht auf die Genexpression festgestellt werden. Es wird somit postuliert, dass das Lichtsignal von Phy1 auf die White-collar Proteine weitergeleitet wird und anschließend der White-collar Komplex die Genexpression auch im Rotlicht steuert.

Die Reaktion auf dunkelrotes Licht war komplett abhängig von Phytochrom (Abb. IV.1C), das in dieser Lichtbedingung wahrscheinlich überwiegend in der Pr-Form vorlag. Die $\Delta wco1$ -Mutante zeigte in dieser Lichtbedingung eine geringere Anzahl an differentiell exprimierten Genen. Dementsprechend wird angenommen, dass Phytochrom im dunkelroten Licht die Expression einiger Gene unabhängig vom White-collar Komplex reguliert. Für die Regulation anderer Gene wird das Lichtsignal aber erneut auf den White-collar Komplex übertragen, der dann die Transkription aktiviert.

IV.2.1 Interaktion zwischen White-collar Komplex und Phy1

Das vorangegangene Modell beschreibt die Zusammenarbeit der Photorezeptoren Wco1 und Phytochrom bei der Antwort auf verschiedene Lichtbedingungen. Ob dabei eine direkte Interaktion der Photorezeptoren erforderlich ist oder das Signal über Komponenten dazwischen weitergegeben wird, war jedoch nicht bekannt. Um dies zu prüfen, wurde zum einen die Lokalisation der Photorezeptoren in *U. maydis* Zellen betrachtet und zum anderen in Hefe auf eine direkte Interaktion der White-collar Proteine mit Phy1 getestet.

Lokalisationsstudien mittels Fluoreszenzmikroskopie zeigten GFP-Fusionen der White-collar Proteine aus *U. maydis* hauptsächlich im Zellkern und mit geringerer Signalstärke auch im Cytoplasma. Damit ist es auch in diesem Basidiomyceten durchaus möglich, dass der White-collar Komplex im Zellkern als Transkriptionsfaktor fungiert und direkt die Genexpression reguliert, wie dies beispielsweise für *N. crassa* gezeigt wurde (Chen *et al.* 2009; Schwerdtfeger und Linden 2000). Auch in dem Ascomyceten sind die White-collar Proteine stark im Zellkern angereichert. Die Kernlokalisation war in dem Ascomyceten unabhängig von der Lichtbedingung, bei Blaulichtbestrahlung wurden die White-collar Proteine aktiviert, mit der Zeit hyperphosphoryliert, ins Cytoplasma transportiert und dort abgebaut (Cha *et al.* 2008; Talora *et al.* 1999).

Bislang nicht für die *U. maydis* Photorezeptoren untersucht wurde die Abhängigkeit deren Lokalisation von verschiedenen Lichtbedingungen. So bleibt zu zeigen, ob es wie in *N. crassa* im Blaulicht zu einem teilweisen Export der White-collar Proteine kommt. Auch für das *U. maydis* Phytochrom sollte untersucht werden, ob wie beim Vertreter aus *A. nidulans* keine Lichtabhängigkeit hinsichtlich Lokalisation besteht (Blumenstein *et al.* 2005), oder ob es wie pflanzliche Phytochrome unter Bestrahlung mit rotem oder dunkelrotem Licht vermehrt in den Zellkern importiert wird (Yamaguchi *et al.* 1999).

In dieser Arbeit konnte das Phytochrom in *U. maydis* hauptsächlich im Cytoplasma nachgewiesen werden, was den Ergebnissen vergleichbarer Studien an FphA-GFP in *A. nidulans* entspricht (Blumenstein *et al.* 2005). Mittlerweile konnte für *A. nidulans* gezeigt werden, dass der cytoplasmatische Anteil von FphA die Genexpression indirekt regulieren kann, ohne selbst in den Zellkern transportiert zu werden (Yu *et al.* 2016). Im Cytoplasma kam es nach Aktivierung von FphA zur Desphosphorylierung des Phosphotransferproteins YpdA. Dieses Protein ist Bestandteil der HOG-Signalkaskade (*high osmolarity glycerol pathway*), die neben der Lichtantwort in *A. nidulans* ebenfalls die Antwort auf hyperosmotischen Stress und andere Umweltsignale reguliert. Über mehrere Phosphorylierungen wurde das Signal von YpdA auf die Stress-aktivierte Kinase SakA übertragen, die in den Zellkern wanderte und dort den Transkriptionsfaktor AtfA aktivierte, was letztlich in einer veränderten Genexpression resultierte (Yu *et al.* 2016). Da Komponenten dieses Signalweges auch in *U. maydis* vorkommen, beispielsweise die Homologe von YpdA (UMAG_10726; *ypd1*) und von AtfA (UMAG_02357, *hog1*), ist dies theoretisch eine Möglichkeit, wie das cytoplasmatische Phy1 in *U. maydis* die Genregulation unabhängig vom White-collar Komplex steuern kann. Über Interaktionsanalysen müsste eine direkte Interaktion des *U. maydis* Homologs von YpdA mit Phytochrom und somit eine Kontrolle des HOG-Signalwegs noch bewiesen werden.

Wird das Lichtsignal auch in *U. maydis* von Phy1 über den HOG- übertragen, muss es somit nicht zu einer direkten Interaktion zwischen Phytochrom und dem White-collar Komplex kommen. In *A. nidulans* wurde über bimolekulare Fluoreszenzkomplementation eine Interaktion von FphA mit dem White-collar 2 Homolog im Zellkern beobachtet. Neben der deutlichen Lokalisation im Cytoplasma war also in *A. nidulans* eine geringe Menge des Phytochroms im Zellkern lokalisiert, wo FphA zusammen mit dem White-collar Komplex die Genexpression regulieren konnte (Purschwitz *et al.* 2008). Mit der Y2H Analyse konnte in dieser Arbeit jedoch keine Interaktion von Phytochrom weder mit White-collar 1 noch mit White-collar 2 festgestellt werden. Auch die Interaktion mit einem zweiten Phy1-Molekül, wie es in *A. nidulans* der Fall ist (Purschwitz *et al.* 2008), wurde nicht beobachtet.

Allerdings gab es bei der in dieser Arbeit durchgeführten Y2H Analyse Schwierigkeiten, die somit eine Interaktion von Phy1 mit White-collar Proteinen nicht ausschließen lassen. Zum einen konnten in den Y2H Assays nicht alle Kombinationen getestet werden, da die Fusionen

der Gal4-DNA-Bindedomäne mit den White-collar Proteinen in dem verwendeten Hefestamm bereits ohne Interaktionspartner eine Autoaktivierung zeigten. Somit konnte die im Vorfeld nachgewiesene Interaktion von Wco1 mit Wco2 (Brych *et al.* 2016) nicht bestätigt werden. Für die Analyse der Interaktion von Phy1 mit einem der beiden White-collar Proteine blieb dementsprechend auch jeweils nur eine Kombination möglich, nämlich BD-Phy1 mit der Fusion der White-collar Proteine mit der AD-Domäne.

Weiterhin muss für ein photoaktives Phytochrom der Cofaktor Biliverdin vorliegen. Das Enzym für dessen Biosynthese war in dem verwendeten Hefestamm jedoch nicht kodiert. Über ein spezielles Plasmid wurde das Gen für die Hämoxygenase zwar in den Teststamm eingebracht, für eine erfolgreiche Expression gab es aber keinen Beweis. Auch Versuche, funktionsfähiges Phytochrom in den Hefezellen spektroskopisch nachzuweisen, blieben erfolglos. Zwar musste in *A. nidulans* für die Interaktion von FphA mit LreB kein Chromophorhaltiges Phytochrom vorliegen (Purschwitz *et al.* 2008), jedoch ist dies für die Situation in *U. maydis* nicht auszuschließen.

Dementsprechend sollten für eine Aussage über die Interaktion der Proteine Phy1, Wco1 und Wco2 in *U. maydis* weitere Analysen durchgeführt werden, beispielsweise über Coimmunopräzipitation oder Massenspektrometrie. Außerdem könnten dadurch weitere Signalkomponenten identifiziert werden.

IV.3 Funktion der Licht-regulierten Gene in *U. maydis*

In der durchgeführten Transkriptom-Analyse wurde der Übergang aus einem dunkeladaptierten Zustand der Zellen ins Licht analysiert. In der Natur ist dieser Wechsel meist einhergehend mit der Änderung weiterer abiotischer Faktoren wie Temperatur, Trockenheit oder Nährstoffangebot. Zellen müssen sich an diese Umweltveränderungen anpassen, ansonsten können erhebliche Schäden entstehen, die im extremen Fall auch zum Tod führen (Rodriguez-Romero *et al.* 2010).

IV.3.1 Energieerzeugung abhängig vom Nährstoffangebot

Um sich an die neuen Bedingungen zu adaptieren, müssen die Zellen zunächst Energie bereitstellen. In der vorliegenden Analyse wurden durch Licht verschiedener Wellenlängen Gene induziert, die an energieerzeugenden Stoffwechselwegen beteiligt sind. Im Blaulicht waren vor allem Gene für Glykolyse, die aerobe Atmung und den mitochondrialen Elektronentransport verstärkt exprimiert. Im dunkelroten Licht waren zusätzlich noch Gene des Citratzyklus und speziell die Atmungskette mit der endständigen ATP-Synthese hochreguliert.

Ein Unterschied zwischen Blaulicht und Dunkelrotlicht zeigte sich bei der Analyse, welche Substratklassen beeinflusst waren (Abb. III.4). Gene für den Aminosäuremetabolismus wurden in beiden Lichtbedingungen stark reguliert. Speziell waren im Blaulicht aber vermehrt solche Gene induziert, die am Abbau von Aminosäuren eine Rolle spielen sowie weitere Gene, die am Abbau von Lipiden und Kohlenstoffverbindungen beteiligt sind. Im Gegensatz dazu wurden durch dunkelrotes Licht vermehrt Gene induziert, die an der Synthese von Aminosäuren und Kohlenstoffverbindungen beteiligt sind.

Ustilago maydis war demnach nicht nur in der Lage, verschiedene Bereiche des Lichtspektrums zu detektieren. Vielmehr nutzt der Pilz die einzelnen Lichtbedingungen als Hinweis auf erschließbare Nährstoffvorkommen, woraufhin speziell Prozesse aktiviert werden, die auf die vorherrschende Situation angepasst sind.

In der Natur nimmt *Ustilago maydis* vor allem dann Blaulicht wahr, wenn er sich außerhalb des Bodens befindet, jedoch noch nicht in die Maispflanze eingedrungen ist. In dieser Phase kann der Pilz nicht mehr auf das reiche Nährstoffangebot aus dem Boden und noch nicht auf die Nährstoffreservoirs der Pflanze zugreifen und muss sich demnach zunächst auf interne Energiespeicher verlassen (Solomon *et al.* 2003). Ein Vergleich mit der Transkriptomanalyse während der biotrophen Entwicklung von *U. maydis* zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Maisinfektion (Lanver *et al.* 2018) zeigte, dass die meisten Blau- und Rotlicht-regulierten Gene ebenfalls auf der Pflanzenoberfläche bzw. während der Penetration und der frühen Phase der biotrophen Interaktion zwischen Pflanze und Pilz induziert wurden (Tab. IV.1). Während der Tumorbildung waren die meisten Blau- und Rotlicht-abhängigen Gene auf der Pflanze herunterreguliert und schließlich waren zur beginnenden Sporenbildung einige Gene erneut leicht induziert (Tab. IV.1) (Lanver *et al.* 2018).

Die Induktion von Genen des Anabolismus verschiedener Stoffklassen im Dunkelrotlicht spricht dagegen eher dafür, dass diese Lichtbedingung dann von Bedeutung ist, wenn der Pilz auf externe Nährstoffquellen zugreifen kann und diese zum Aufbau von Speicherstoffen nutzen kann. Dunkelrotlicht ist innerhalb und in der Nähe von Pflanzen angereichert, weil diese durch Chlorophylle den Blau- und Rotlichtanteil des Spektrums absorbieren (Sheerin und Hiltbrunner 2017). Die Antwort auf Dunkelrotlicht könnte also an der Blattoberfläche oder innerhalb der Pflanze eine Rolle spielen. Viele Gene, die im Dunkelrotlicht differentiell exprimiert waren, wiesen in der Analyse der biotrophen Entwicklung die höchste Expression während der ersten Schritte der Infektion auf (Tab. IV.1). Weitere Dunkelrotlicht-regulierte Gene waren in axenischer Kultur und in einer Phase kurz nach dem Eindringen in die Pflanze stark exprimiert. Diese Phasen zeichnen sich durch eine hohe metabolische und zelluläre Aktivität aus (Lanver *et al.* 2018).. Während der späteren Entwicklung von der Tumor- bis zur Sporenbildung sind die Dunkelrotlicht-abhängigen Gene aber unterdurchschnittlich exprimiert (Tab. IV.1) (Lanver *et al.* 2018).

Tabelle IV.1: Vergleich der Licht-abhängig exprimierten Gene mit der Expression während verschiedener Infektionszeitpunkte. Gezeigt ist die Anzahl der Gene, die in axenischer Kultur (ax.) bzw. an verschiedenen Zeitpunkten der Maisinfektion (0,5, 1, 2, 4, 6, 8 bzw. 12 dpi) eine über- bzw. unterdurchschnittliche Expression zeigten (Lanver *et al.* 2018). Anschließend wurde anhand der Gennummern für jeden Zeitpunkt der Infektion überprüft, wie viele Gene ebenfalls durch Licht beeinflusst wurden und welchem Anteil dies entspricht. Der Farbcode verdeutlicht, zu welchen Zeitpunkten eine große Übereinstimmung zwischen den beiden Analysen vorlag. WT: Wildtyp; BL: Blaulicht; RL: Rotlicht; DRL: Dunkelrotlicht

	überdurchschnittliche Expression							
	ax.	0,5	1	2	4	6	8	12
biotroph	2524	2530	1998	2443	2681	2681	3532	2761
BL +RL +DRL +D in WT + $\Delta wco1$ + $\Delta phy1$	220 9%	343 14%	237 12%	125 5%	106 4%	106 4%	211 6%	173 6%
WT BL	102 4%	227 9%	158 8%	35 1%	60 2%	60 2%	149 4%	129 5%
WT RL	11 0%	62 2%	56 3%	9 0%	10 0%	10 0%	30 1%	23 1%
WT DRL	54 2%	57 2%	43 2%	45 2%	17 1%	17 1%	17 0%	13 0%
	unterdurchschnittliche Expression							
	ax.	0,5	1	2	4	6	8	12
biotroph	3695	3337	2212	2589	1771	1454	2793	2131
BL +RL +DRL +D in WT + $\Delta wco1$ + $\Delta phy1$	202 5%	142 4%	95 4%	339 13%	267 15%	223 15%	292 10%	147 7%
WT BL	119 3%	52 2%	53 2%	226 9%	176 10%	135 9%	144 5%	38 2%
WT RL	29 1%	7 0%	4 0%	57 2%	44 2%	42 3%	44 2%	3 0%
WT DRL	33 1%	43 1%	20 1%	54 2%	47 3%	47 3%	78 3%	54 3%

Bereits im Dunkeln reguliert *U. maydis* Wco1-abhängig die Expression von Genen für die Synthese von Ferrichromen. Dies sind spezielle Siderophore, die Metallionen extrazellulär binden und dann in die Zellen transportieren (Budde und Leong 1989). Der Organismus braucht eine gewisse Konzentration dieser Metallionen, da viele Enzyme in ihrer Aktivität von Eisen abhängen (Philpott *et al.* 2012). Zu hohe Konzentrationen, vor allem von Fe³⁺-Ionen, bergen jedoch auch ein gewisses Risiko, da unter Lichteinfluss eine Reduktion zu Fe²⁺ erfolgen und es dabei zur Bildung von Hydroxylradikalen kommen kann (Gerwien *et al.* 2018). An Siderophore gebundenes Fe³⁺ kann jedoch nicht reduziert werden, so dass intrazelluläre Siderophore die Zellen vor toxischen Eiseneffekten schützen können (Gerwien *et al.* 2018). Für *U. maydis* und auch *A. fumigatus* wurde bereits gezeigt, dass die Synthese dieser Siderophore essentiell für die Virulenz ist (Mei *et al.* 1993; Schrettl *et al.* 2004). Für *C. neoformans* konnte ebenfalls ein Zusammenhang zwischen Eisenaufnahme und Pathogenität beobachtet werden (Idnurm und Heitman 2010).

IV.3.2 Vorbereitung auf Stress

U. maydis ist in seinem Lebenszyklus vielen Quellen von Stress ausgesetzt. In dieser Arbeit wurde nur die Antwort auf monochromatisches Licht analysiert. In der freien Natur treffen jedoch nicht einzelne Wellenlängen auf den Pilz, sondern das gesamte Sonnenspektrum. Neben dem sichtbaren Teil des Sonnenlichts wird *Ustilago maydis* auch der potentiell gefährlichen UV-Strahlung ausgesetzt. Auch muss der Pilz zu Beginn der Infektion mit oxidativem Stress im Zuge der pflanzlichen Immunreaktion rechnen (Lanver *et al.* 2018).

Um sich davor zu schützen, werden durch Blaulicht vor allem Gene induziert, die oxidativem Stress oder solchem, der durch reaktive Sauerstoffspezies hervorgerufen wird, entgegenzuwirken. Zum Beispiel wurden durch Blaulicht die beiden Photolyasen *phr1* (UMAG_06079) und *phr2* (UMAG_02144) sowie eines der DASH-Cryptochrome (*cry1*, UMAG_05917) induziert, die wiederum Blaulicht-abhängig UV-Schäden in der DNA reparieren (Brych *et al.* 2016). Ebenso wird als Reaktion auf oxidativen Stress eine Katalase (UMAG_11067) gebildet, die die Umwandlung von Wasserstoffperoxid zu Wasser katalysieren (Molina und Kahmann 2007). Weiterhin induziert wurden im Blaulicht die Phytoen-Synthase (UMAG_06287) und die *Carotenoid cleavage dioxygenase* (UMAG_00965), Enzyme die an der Bildung von Carotenoiden beteiligt sind. Dies sind Pigmente, die ebenfalls Photonen im Blaubereich absorbieren können und somit der Bildung reaktiver Sauerstoffspezies entgegenwirken (Estrada *et al.* 2009). Sowohl durch Blaulicht als auch durch Dunkelrotlicht induziert wurde die Ferrochelatase (UMAG_10440). Dieses Enzym ist für den Einbau von Eisen in Porphyrin zuständig, so dass Häm gebildet wird. Dadurch wird verhindert, dass freie Porphyrinmoleküle Licht absorbieren und photooxidative Schäden hervorrufen können (Idnurm und Heitman 2010).

IV.4 Weitere Licht-abhängige Gene in *U. maydis*

Auch wenn in dieser Arbeit gezeigt wurde, dass die Expression zahlreicher Gene in *Ustilago maydis* durch Licht beeinflusst ist, so werden vermutlich durch die gewählten Versuchsbedingungen nicht alle Licht-abhängigen Gene erfasst.

Es wurde bereits erwähnt, dass nur monochromatisches Licht verwendet wurde und nicht der komplette Spektralbereich von Weißlicht. So ist beispielsweise ungeklärt, ob auch grünes Licht und die in diesem Bereich agierenden Opsine einen Effekt auf die Genexpression haben. Bislang wurde ebenfalls nur gezeigt, dass mehrere Gene in mehr als einer monochromatischen Bedingung reguliert wurden. Wie die Genexpression reguliert wird, wenn mehrere Photorezeptoren bei bi- oder polychromatischen Bestrahlungen gleichzeitig angeregt werden, muss in weiteren Analysen geklärt werden.

Für die Analyse wurde mit $10 \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ eine relativ geringe Lichtintensität gewählt. Im Sommer herrscht in Deutschland an sonnigen Tagen ein Energiefluss von bis zu $1000 \text{ W}/\text{m}^2$ über den gesamten Spektralbereich (Loeti 2013). Bei den hier durchgeführten Belichtungsexperimenten betrug die Lichtstärke im Blaulicht lediglich $2,55 \text{ W}/\text{m}^2$, im Rot- und Dunkelrotlicht sogar noch weniger. Es sollte unter anderem damit herausgefunden werden, ob die Intensität von $10 \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ ausreichend ist, um in *U. maydis* eine vergleichbare Reaktion hervorzurufen wie bei dreifach höherer Fluenzrate, die zuvor gewählt wurde (Brych *et al.* 2016). Es ist nicht auszuschließen, dass einige Gene erst bei höheren Intensitäten differentiell exprimiert werden und demnach in der vorliegenden Transkriptomanalyse nicht erfasst wurden. Durch die geringe Intensität sollte außerdem die Lichtantwort von der Antwort auf Stress abgegrenzt werden, die eher bei höheren Lichtintensitäten auftreten kann. Wachstumskinetiken zeigten eine langsamere Zunahme der Zellzahl bei höheren Intensitäten, vor allem im Blaulicht (nicht gezeigt). Zu hohe Strahlung kann teilweise auch bei eigentlich ungefährlichen Wellenlängen zur Bildung reaktiver Sauerstoffspezies führen, die die Zellen zur Aktivierung einer Stressantwort veranlassen. Bei vorherigen Versuchen mit $100 \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ Blaulicht wurden über 700 Gene differentiell exprimiert gefunden (pers. Mitteilung A. Batschauer). In diesem Fall waren die meisten von ihnen, im Gegensatz zu den hier gezeigten Ergebnissen, im Licht herunterreguliert, ein Zeichen dafür, dass die Zellen deutlich gestresst waren. Allerdings wurden die Zellen in diesem Fall auf saurem Medium angezogen, wodurch der Unterschied zu den hier gezeigten Daten vermutlich nicht alleine auf den Lichtbedingungen beruht.

Ein weiterer Aspekt, warum vermutlich mehr Gene als hier gefunden in *U. maydis* durch Licht reguliert werden, ist die Probennahme an nur einem Zeitpunkt. Dadurch ist keine Aussage darüber möglich, ob die Licht-regulierten Gene wie in *N. crassa* unterschiedliche Expressionskinetiken aufweisen (Chen *et al.* 2009). Nur einem im Blaulicht induzierten Gen wurde eine regulatorische Funktion bei der Transkription zugeschrieben (UMAG_03153; GO:0006357) und dieses Gen war nicht direkt als Transkriptionsfaktor annotiert. Es ist unbekannt, ob zu späteren Zeitpunkten zusätzliche Regulatoren induziert werden, die dann eine weitere Ebene der Lichtantwort auslösen. Auch konnte durch die Endpunktanalyse nicht herausgefunden werden, ob es in *U. maydis* mit der Zeit zu einer Anpassung an die Lichtbedingungen kommt. Sollte es in *U. maydis* zur Photoadaptation kommen, müsste der Mechanismus dafür näher analysiert werden, da in diesem Organismus kein Homolog des Gens Vivid gefunden wurde, das diese Reaktion in *N. crassa* vermittelt (Schwerdtfeger und Linden 2003). Eventuell reicht es in *U. maydis* aus, wenn Wco1 analog zu WC-1 in *N. crassa* im Licht hyperphosphoryliert und dadurch vermehrt abgebaut wird (Schwerdtfeger und Linden 2000).

Weiterhin ist es möglich, dass sich in anderen Entwicklungsstadien der Einfluss von Licht auf verschiedene Gene ändert. Zum Beispiel ist die Synthese von Carotenoiden in *N. crassa* in Hyphen im Licht induziert, in Konidien wurde aber kein Effekt von Licht festgestellt (Harding und Turner 1981). In weiteren Versuchen könnten beispielsweise *U. maydis* SG200-Stämme verwendet werden, um die Lichtantwort in filamentös wachsenden Zellen aufzuklären. Schwieriger wäre eine Analyse für die pathogene Phase auf der Maispflanze, da in diesem Fall zwischen den Reaktionen des Pilzes und der Pflanze auf die Lichtbedingungen differenziert werden müsste. Für die Analyse einer Lichtantwort in der Pflanze könnten ebenfalls SG200-Stämme oder Kreuzungen aus kompatiblen FB1- und FB2-Linien verwendet werden. Dadurch werden vermutlich ebenfalls andere Gene Licht-abhängig differentiell exprimiert als im FB1-Hintergrund.

Zu guter Letzt ist eine differentielle Expression nicht nur auf die Ebene der Transkription beschränkt. Eine höhere Menge an mRNA bedeutet nicht unbedingt, dass auch die Proteinlevel des Gens in Reaktion auf die Lichtbedingung ansteigen. Dies wird dadurch bekräftigt, dass in *U. maydis* im Blaulicht die Genexpression vieler ribosomaler RNAs und Proteine 1,5- bis zweifach herunterreguliert wurden (nicht gezeigt) und ein negativer Regulator der Translationsinitiation induziert wurde (UMAG_04987; GO:0045947). Obwohl also die Transkription vieler Gene lichtabhängig induziert wurde, wurde vermutlich die Translationsrate eher reduziert. In *N. crassa* sorgt eine erhöhte Proteaseaktivität im Licht ebenfalls dafür, dass die Proteinlevel nicht in gleichem Maße wie die Transkriptlevel ansteigen (Ram *et al.* 1984). Für mehrere Proteine konnte in verschiedenen Studien zum Primärmetabolismus ebenfalls ein Lichteinfluss auf ihre Aktivität nachgewiesen werden (Tisch und Schmoll 2010). So werden mehrere Enzyme im Kohlenhydratstoffwechsel von *N. crassa* durch Licht eher inaktiviert (Ram *et al.* 1984). Im Gegensatz dazu wurde in *T. atroviride* eine erhöhte Aktivität der cAMP-abhängigen Proteinkinase A im Licht beobachtet (Casas-Flores *et al.* 2006).

IV.5 Lichteffekte auf die Entwicklung von *U. maydis*

Neben der Beantwortung der Frage, ob generell die Aktivität von Genen in *U. maydis* durch Licht beeinflusst wird, sollte auch untersucht werden, ob bestimmte Entwicklungsschritte Licht-abhängig reguliert wurden.

In diesem Zusammenhang konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass das Gen für das Pheromon *mfa1* selbst bei geringer Intensität von Blaulicht und Dunkelrotlicht bereits leicht herunterreguliert wurde und dass diese Reaktion unter Wco1-Kontrolle stand. Diese Regulierung würde der Antwort auf externes Pheromon entgegenwirken, die in der Induktion der *mfa1*-Expression resultieren würde.

Um diesen Lichteffect auf die Expression von *mfa1* auf den ersten Schritt in der Entwicklung von *U. maydis* hin zu einer pathogenen Lebensweise phänotypisch zu untersuchen, wurden den Zellen synthetisch hergestelltes Pheromon zugegeben und die Bildung von Konjugationshyphen ausgewertet. Beim Wildtyp bildeten durchschnittlich knapp mehr als die Hälfte der Zellen Hyphen als Antwort auf das Pheromon. Dieser Wert schwankte jedoch zwischen den Versuchen und lag deutlich unter dem Ergebnis, das in früheren Analysen berichtet wurde und bei knapp 80 % lag (Müller *et al.* 2003). Dennoch konnte analog zur reduzierten Pheromonexpression eine leichte Reduktion der Hyphenbildung im Blaulicht und Dunkelrotlicht nachgewiesen werden, es waren aber immer noch einige Konjugationshyphen erkennbar. Durch die Deletion von *wco1* bzw. *phy1* wurde bei der Pheromonantwort kein signifikanter Unterschied zum Wildtyp beobachtet. Somit führte die Deletion der Photorezeptoren nicht zu einem kompletten Ausbleiben der Hyphenbildung, wie es beispielsweise bei Mutationen in Komponenten des MAPK-Signalwegs der Fall ist (Feldbrügge *et al.* 2004; Müller *et al.* 2003).

Unabhängig davon, ob die Pheromonantwort durch Licht reduziert oder verzögert wurde, war der geringe Unterschied zwischen Dunkel- und Lichtproben vermutlich auch der Grund dafür, dass im nächsten Entwicklungsschritt von *U. maydis*, der Filamentbildung, kein offensichtlicher Lichteffect zu erkennen war. Im Gegensatz zur Pheromonantwort wurde die Filamentbildung hauptsächlich qualitativ ausgewertet, indem makroskopisch die Phänotypen von Kolonien kompatibler Stämme betrachtet wurden. Dabei wiesen alle Kolonien unabhängig von den Lichtbedingungen den weißen *fuzzy*-Phänotyp auf. Eine quantitative Analyse wurde in diesem Zusammenhang jedoch nicht durchgeführt. Aufgrund der geringen Unterschiede bei der Pheromonantwort kam es wahrscheinlich auch bei der Filamentbildung, wenn überhaupt, nur zu kleinen Differenzen zwischen Licht- und Dunkelproben. Eine mikroskopische Auswertung dieser Reaktion könnte eventuell bessere Erkenntnisse liefern.

Sowohl bei Pheromonantwort als auch bei Filamentation könnte Licht somit eher modulierend wirken, nicht aber die sexuelle Reproduktion von *U. maydis* blockieren. Allerdings wurde analog zu den Transkriptomanalysen auch für diese Versuche eine geringe Lichtintensität gewählt und diese war eventuell zu schwach, um einen größeren Effekt hervorzurufen. In den meisten Pilzen wird die sexuelle Fortpflanzung dann gehemmt, wenn die Organismen Nährstoffmangel oder anderen Stressbedingungen in Form reaktiver Sauerstoffspezies, intensiver Lichteinstrahlung oder hoher Osmolarität ausgesetzt sind und die Zellen somit ums Überleben kämpfen müssen (Schumacher 2017). Situationen guter Versorgung mit Nährstoffen und Abwesenheit umweltbedingter Stressfaktoren nutzen Pilze dagegen eher zur Verbreitung über sexuelle Reproduktion (Osmani und Goldman 2008; Champe *et al.* 1994). Dementsprechend könnte eine Erhöhung der Lichtintensität auch in

U. maydis bei der Entscheidung, welche Form der Reproduktion eingeschlagen wird, zu unterschiedlichen Ergebnissen führen.

Eine Wirkung von Licht auf die Bildung von Appressorien wurde in *U. maydis* bislang nicht betrachtet. Dagegen war bekannt, dass die Bildung der Infektionsstrukturen auf Signale der Pflanze reagiert, eine hydrophobe Oberfläche und langkettige Fettsäuren steigerte die Appressorienbildung (Lanver *et al.* 2010). Ein Pflanzen-unabhängiger Versuchsaufbau mit den genannten physikalischen und chemischen Signalen (Lanver *et al.* 2010) konnte trotz mehrfacher Versuche nicht in einer Weise etabliert werden, die eine effiziente Quantifizierung der Appressorienbildung möglich machte. Ein Einfluss von Licht auf die Appressorienbildung von *U. maydis* ist demnach bislang nicht bewiesen, ist jedoch nicht unwahrscheinlich. Einerseits waren die dem Eindringen des Pilzes in die Pflanze vorangegangenen Prozesse in geringem Maße Licht-abhängig. Andererseits sind einige der Licht-regulierten Gene, die in der Transkriptomanalyse identifiziert wurden, auch in frühen Phasen der Maisinfektion differentiell exprimiert (Lanver *et al.* 2018).

IV.6 Einfluss von Licht auf die Symptomausprägung auf der Maispflanze

Weil sowohl für den humanpathogenen Pilz *C. neoformans* als auch für das Phytopathogen *M. oryzae* eine Regulation der Pathogenität durch den White-collar Komplex beobachtet wurde (Idnurm und Heitman 2005), lag es nahe, auch für *U. maydis* den Einfluss von White-collar 1 auf die Stärke der Pathogenität zu testen. Tatsächlich induzierte die $\Delta wco1$ -Mutante schwächere Symptome als der Wildtyp, was teilweise durch die Funktionen der Wco1-abhängig regulierten Gene im Blaulicht zu erklären ist. Ein Vergleich mit den Transkriptomdaten zu unterschiedlichen Zeiten nach Infektion (Lanver *et al.* 2018) zeigte, dass die Blaulicht-regulierten Gene vor allem zu Beginn der Infektion wichtig sind. Beispielsweise schien es von Vorteil, im Vorfeld der Infektion Gene zu induzieren, die an der Abwehr von oxidativem Stress beteiligt sind, so dass die Zellen bereits gegen die pflanzliche Immunabwehr gewappnet waren.

Neben Mutanten von White-collar 1 wurde auch untersucht, ob Deletionen der *U. maydis* Opsingene einen Effekt auf die Maisinfektion haben. Rhodopsine wurden hauptsächlich in phytopathogenen Pilzen gefunden und es wurde postuliert, dass diese Photorezeptoren ebenfalls an der Infektion mitwirken (García-Martínez *et al.* 2015). In *U. maydis*, wie auch in *Alternaria brassicicola*, konnte eine Induktion von Opsinen während der Infektion gezeigt werden (Cho *et al.* 2013; Ghosh 2014). Maispflanzen, die mit Einzeldelationen von Opsin 1 und Opsin 2 infiziert wurden, entwickelten allerdings die gleiche Symptomstärke wie nach Infektion mit dem Wildtyp, erst die $\Delta ops1\Delta ops2$ -Doppelmutante zeigte eine leicht geringere Pathogenität. Ergebnisse früherer Analysen, bei denen Opsin 3 als Hitzeschockprotein

annotiert wurde und analoge Deletionsmutanten eine signifikante Reduktion der Pathogenität zeigten (Ghosh 2014), konnten nicht bestätigt werden. Die Pflanzen, die mit selbst generierten $\Delta ops3$ -Mutanten infiziert wurden, zeigten im Vergleich zum Wildtyp nur wenig Unterschiede bei der Symptomausbildung.

Dabei könnte ein Zusammenhang zwischen der Funktion der Rhodopsine als Grünlicht-abhängige Protonenpumpen und der Bedeutung der pH-Homöostase während der Pflanzeninfektion bestehen (Alkan *et al.* 2013). Für die Opsine 1 und 2 aus *U. maydis* konnte gezeigt werden, dass beide als Grünlicht-abhängige Protonenpumpen agieren (Panzer *et al.* 2019). Während Opsin 1 in der Cytoplasmamembran lokalisiert ist und somit möglicherweise den Extrazellulärraum ansäuert, scheint Opsin 2 einen Einfluss in der Zelle auf die pH-Homöostase zu haben, da dieses in der Vakuolenmembran zu finden ist (Panzer *et al.* 2019).

Meist war bei einzelnen Infektionsexperimenten die Pathogenität der Mutanten $\Delta wco1$, $\Delta ops1\Delta ops2$ oder auch $\Delta ops3$ geringer im Vergleich zum Wildtyp, jedoch fielen diese Unterschiede aufgrund der Schwankungen zwischen den Durchgängen nicht signifikant aus. Dies lag zum großen Teil daran, dass die äußeren Bedingungen während der Infektionen im Gewächshaus starken Schwankungen unterlagen. Einige dieser Rahmenbedingungen könnten optimiert werden, um in Zukunft auch für geringe Unterschiede der Pathogenität einen signifikanten Unterschied zu erhalten (Abb. S5; Abb. S6).

Zu diesen variablen Rahmenbedingungen zählen die eingestrahlte Lichtmenge innerhalb eines Tages aufgrund der herrschenden Wetterbedingungen und auch die Dauer des eingestrahlichten Lichts im Laufe eines Jahres. Zwar waren in dem Gewächshaus, in dem die Infektionsexperimente durchgeführt wurden, zusätzlich Lampen vorhanden, jedoch konnten diese nicht die Unterschiede in der Sonneneinstrahlung ausgleichen. Das Gleiche galt auch für die Temperatur, die zwar im Gewächshaus konstant eingestellt war, jedoch trotzdem abhängig von den Wetterbedingungen schwankte. Um diese beiden Faktoren zu standardisieren, könnten die Infektionen in großen LED-Schränken oder Phytokammern durchgeführt werden, die Licht, Temperatur und Luftfeuchte konstant halten.

Neben den äußeren Bedingungen könnten auch mehrere Parameter bei der Anzucht der Maispflanzen zu einem gleichmäßigeren Ergebnis führen. Beim bislang verwendeten Verfahren für die Anzucht wiesen die Pflanzen zum Zeitpunkt der Infektion keine einheitliche Größe auf, was unter anderem daran lag, dass die ausgesäten Maiskörner zu unterschiedlichen Zeitpunkten gekeimt waren. Um dies zu standardisieren, könnten Maiskörner zunächst auf feuchtem Tuch zum Keimen gebracht und anschließend solche mit ähnlichem Entwicklungsstand eingetopft werden. Ein weiterer Aspekt wäre die Verwendung eines Substrates wie Vermiculit ohne Makro- und Mikroelemente, dem diese dann in definierter Konzentration zugesetzt würden, anstelle der bisher genutzten Pflanzenerde, die naturgemäß eine gewisse Variabilität aufweist. Wenn die Pflanzen einzeln in Töpfen angezogen werden,

könnten auch Interaktionen verschiedener Pflanzen innerhalb eines Topfes ausgeschlossen werden. Weiterhin sollte ein gleichmäßiges Gießen durchgeführt werden, so dass alle Pflanzen zur gleichen Zeit die gleiche Menge Wasser bekommen und keine Unterschiede aufgrund der Wasserverfügbarkeit entstehen.

Weiterhin sollte auch der Zeitpunkt der Infektion in die Versuchsplanung einbezogen werden. Versuche an Reispflanzen zeigten, dass Infektionen, die am Tagesanfang durchgeführt wurden, zu stärkeren Symptomen führten als solche zu einem späteren Zeitpunkt (Kim *et al.* 2011). Bedingt wurde dieser Effekt durch die Immunabwehr der Reispflanzen, die Licht-abhängig verstärkt wird (Griebel und Zeier 2008). Für *U. maydis* zeigten die RNA-Seq-Daten dieser Arbeit, dass im Licht Gene induziert wurden, die an der Stressabwehr beteiligt sind und der Pilz somit besser auf die Immunantwort der Pflanze vorbereitet ist. Zumindest Unterschiede zwischen Wildtyp und Photorezeptormutanten des Pathogens könnten also verstärkt werden, wenn der Pilz bereits im Licht angezogen wird und die Pflanze kurz nach Beginn der Lichtphase infiziert wird.

IV.7 Mögliche Lichteffekte auf die Sporenkeimung

Ein weiterer Entwicklungsschritt, der im Zuge dieser Arbeit nicht betrachtet wurde, ist die Keimung von Sporen. Bereits 1983 wurde eine erste Analyse der Sporenkeimung in *U. maydis* veröffentlicht (Wulf und Schauz 1983). Die Autoren fanden einen positiven Effekt von blauem Licht, das sowohl zu einer Beschleunigung des Prozesses als auch zu einer höheren Anzahl gekeimter Sporen führte. In deren Arbeit wurde Cryptochrom als zuständiger Photorezeptor diskutiert, allerdings war zu diesem Zeitpunkt die bedeutende Rolle der White-collar Proteine als Blaulichtrezeptoren in Pilzen noch nicht bekannt (Ballario *et al.* 1998; Linden und Macino 1997; Rodriguez-Romero *et al.* 2010). Auch Phytochrome wurden in Pilzen erst später gefunden und charakterisiert (Blumenstein *et al.* 2005; Mooney und Yager 1990). Trotzdem wurde damals bereits die Beteiligung eines Phytochroms bei der Sporenkeimung in *U. maydis* ausgeschlossen, da Rotlicht keinen Einfluss auf die Sporenkeimung hatte und die Reaktion auch nicht reversibel war (Wulf und Schauz 1983).

In *A. nidulans* sind sowohl die White-collar Proteine als auch das Phytochrom an der Licht-abhängigen Verzögerung der Keimung beteiligt. Daneben hatten sowohl Cryptochrom *cryA* als auch das Velvet-Protein *veA* Einfluss auf die Sporenkeimung (Röhrig *et al.* 2013). In *Fusarium fujikuroi* hatte Licht den gleichen Effekt, allerdings war dieser vom Rhodopsin *CarO* abhängig (García-Martínez *et al.* 2015). Aufgrund des Vorkommens all dieser Photorezeptoren in *U. maydis* und der Wirkung von Licht auf die Sporenkeimung in anderen Pilzen, wäre dieser Prozess für zukünftige Analysen einer Rolle von Licht auf *U. maydis* ebenfalls vielversprechend.

V. Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde die weitgehend unbekannte Photobiologie des Basidiomyceten *Ustilago maydis* näher betrachtet. Über Transkriptomanalysen konnte gezeigt werden, dass dunkeladaptierte *U. maydis* Sporidien monochromatisches Blau-, Rot- und Dunkelrotlicht erkennen und daraufhin die Expression zahlreicher Gene regulieren. Im FB1 Wildtyp wurden insgesamt 404 Gene in einer oder mehreren Lichtbedingungen differentiell exprimiert, was ca. 5,9 % der Protein-kodierenden Gene in *U. maydis* entspricht.

Als essentieller Photorezeptor für den blauen Spektralbereich konnte White-collar 1 (Wco1) und als Photorezeptor für rotes und dunkelrotes Licht Phytochrom (Phy1) identifiziert werden. Daneben beeinflusste Wco1 die Genexpression im roten und dunkelroten Licht und Phy1 beeinflusste die Anzahl differentiell exprimierter Gene im Blaulicht. Beide Photorezeptoren wiesen außerdem eine Licht-unabhängige Funktion auf.

Bei der funktionellen Analyse waren Gene für Oxidations-Reduktions-Prozesse im Blaulicht am deutlichsten betroffen, daneben waren in allen Lichtbedingungen vor allem Gene des Metabolismus beeinflusst. Im Dunkeln durch Wco1 reguliert war zudem die Expression von Genen für die Synthese von Ferrichromen.

Lokalisationsstudien zeigten Wco1 und Wco2 hauptsächlich im Zellkern und in geringerer Konzentration im Cytoplasma, Phy1 dagegen wurde fast ausschließlich im Cytoplasma gefunden. Eine direkte Interaktion von Wco1, Wco2 und Phy1 konnte über Hefe-2-Hybrid-Studien jedoch nachgewiesen werden.

Auch die Bedeutung von Licht allgemein und von Wco1 und Phy1 im Speziellen wurde für verschiedene Entwicklungsprozesse von *U. maydis* analysiert. Blaues und dunkelrotes Licht hatten einen geringen Einfluss auf die Ausbildung von Konjugationshyphen und diese Lichtabhängigkeit war in $\Delta wco1$ bzw. $\Delta phy1$ Deletionsmutanten aufgehoben. Auf die Fähigkeit von kompatiblen *U. maydis* Zellen, Filamente auszubilden, hatten weder verschiedene Lichtbedingungen noch die Deletion von Wco1 oder Phy1 eine Auswirkung. Für die Symptomausbildung infizierter Maispflanzen konnte eine geringe Bedeutung von Wco1 festgestellt werden.

Auf die Entwicklung von *U. maydis* haben Licht und die Photorezeptoren Wco1 und Phy1, zumindest in den hier verwendeten experimentellen Bedingungen, somit nur einen geringen regulatorischen Effekt.

VI. Literaturverzeichnis

- Adam, A.; Deimel, S.; Pardo-Medina, J.; García-Martínez, J.; Konte, T. *et al.* 2018. Protein Activity of the *Fusarium fujikuroi* Rhodopsins CarO and OpsA and Their Relation to Fungus-Plant Interaction. *Int J Mol Sci* 19(1): 215. doi:10.3390/ijms19010215.
- Alkan, N.; Espeso, E.; Prusky, D. 2013. Virulence regulation of phytopathogenic fungi by pH. *Antioxid Redox Signal* 19(9): 1012–1025. doi:10.1089/ars.2012.5062.
- Anderson, S.; Dragnea, V.; Masuda, S.; Ybe, J.; Moffat, K. *et al.* 2005. Structure of a novel photoreceptor, the BLUF domain of AppA from *Rhodobacter sphaeroides*. *Biochemistry* 44(22): 7998–8005. doi:10.1021/bi0502691.
- Ashburner, M.; Ball, C.; Blake, J.; Botstein, D.; Butler, H. *et al.* 2000. Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium. *Nat Genet* 25(1): 25–29. doi:10.1038/75556.
- Bahn, Y.-S.; Xue, C.; Idnurm, A.; Rutherford, J.; Heitman, J. *et al.* 2007. Sensing the environment: lessons from fungi. *Nat Rev Microbiol* 5(1): 57–69. doi:10.1038/nrmicro1578.
- Ballario, P.; Talora, C.; Galli, D.; Linden, H.; Macino, G. 1998. Roles in dimerization and blue light photoresponse of the PAS and LOV domains of *Neurospora crassa* white collar proteins. *Mol Microbiol* 29(3): 719–729. doi:10.1046/j.1365-2958.1998.00955.x.
- Ballario, P.; Vittorioso, P.; Magrelli, A.; Talora, C.; Cabibbo, A. *et al.* 1996. White collar-1, a central regulator of blue light responses in *Neurospora*, is a zinc finger protein. *EMBO J* 15(7): 1650–1657. doi:10.1002/j.1460-2075.1996.tb00510.x.
- Banuett, F. 1995. Genetics of *Ustilago maydis*, a fungal pathogen that induces tumors in maize. *Annual Review of Genetics* 29: 179–208. doi:10.1146/annurev.ge.29.120195.001143.
- Bayram, O.; Biesemann, C.; Krappmann, S.; Galland, P.; Braus, G. 2008. More than a repair enzyme: *Aspergillus nidulans* photolyase-like CryA is a regulator of sexual development. *Mol Biol Cell* 19(8): 3254–3262. doi:10.1091/mbc.e08-01-0061.
- Bayram, O.; Braus, G.; Fischer, R.; Rodriguez-Romero, J. 2010. Spotlight on *Aspergillus nidulans* photosensory systems. *Fungal Genet Biol* 47(11): 900–908. doi:10.1016/j.fgb.2010.05.008.
- Berrocal-Tito, G.; Esquivel-Naranjo, E.; Horwitz, B.; Herrera-Estrella, A. 2007. *Trichoderma atroviride* PHR1, a fungal photolyase responsible for DNA repair, autoregulates its own photoinduction. *Eukaryotic Cell* 6(9): 1682–1692. doi:10.1128/EC.00208-06.
- Bieszke, J.; Braun, E.; Bean, L.; Kang, S.; Natvig, D. *et al.* 1999. The nop-1 gene of *Neurospora crassa* encodes a seven transmembrane helix retinal-binding protein homologous to archaeal rhodopsins. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 96(14): 8034–8039. doi:10.1073/pnas.96.14.8034.
- Blumenstein, A.; Vienken, K.; Tasler, R.; Purschwitz, J.; Veith, D. *et al.* 2005. The *Aspergillus nidulans* phytochrome FphA represses sexual development in red light. *Curr Biol* 15(20): 1833–1838. doi:10.1016/j.cub.2005.08.061.
- Bölker, M.; Basse, C.; Schirawski, J. 2008. *Ustilago maydis* secondary metabolism—from genomics to biochemistry. *Fungal Genet Biol* 45 Suppl 1: S88–93. doi:10.1016/j.fgb.2008.05.007.
- Bölker, M.; Urban, M.; Kahmann, R. 1992. The a mating type locus of *U. maydis* specifies cell signaling components. *Cell* 68(3): 441–450. doi:10.1016/0092-8674(92)90182-C.
- Braatsch, S.; Gomelsky, M.; Kuphal, S.; Klug, G. 2002. A single flavoprotein, AppA, integrates both redox and light signals in *Rhodobacter sphaeroides*. *Mol Microbiol* 45(3): 827–836. doi:10.1046/j.1365-2958.2002.03058.x.

- Brandt, S.; Stetten, D. von; Günther, M.; Hildebrandt, P.; Frankenberg-Dinkel, N. 2008. The fungal phytochrome FphA from *Aspergillus nidulans*. *J Biol Chem* 283(50): 34605–34614. doi:10.1074/jbc.M805506200.
- Brefort, T.; Doehlemann, G.; Mendoza-Mendoza, A.; Reissmann, S.; Djamei, A. *et al.* 2009. *Ustilago maydis* as a Pathogen. *Annu Rev Phytopathol* 47: 423–445. doi:10.1146/annurev-phyto-080508-081923.
- Briggs, W.; Christie, J.; Salomon, M. 2001. Phototropins: a new family of flavin-binding blue light receptors in plants. *Antioxid Redox Signal* 3(5): 775–788. doi:10.1089/15230860152664975.
- Brown, L. 2004. Fungal rhodopsins and opsin-related proteins: eukaryotic homologues of bacteriorhodopsin with unknown functions. *Photochemical & photobiological sciences: Official journal of the European Photochemistry Association and the European Society for Photobiology* 3(6): 555–565. doi:10.1039/b315527g.
- Brown, L.; Jung, K.-H. 2006. Bacteriorhodopsin-like proteins of eubacteria and fungi: the extent of conservation of the haloarchaeal proton-pumping mechanism. *Photochemical & photobiological sciences: Official journal of the European Photochemistry Association and the European Society for Photobiology* 5(6): 538–546. doi:10.1039/b514537f.
- Brudler, R.; Hitomi, K.; Daiyasu, H.; Toh, H.; Kucho, K.-i. *et al.* 2003. Identification of a New Cryptochrome Class. *Molecular Cell* 11(1): 59–67. doi:10.1016/s1097-2765(03)00008-x.
- Brych, A.; Mascarenhas, J.; Jaeger, E.; Charkiewicz, E.; Pokorny, R. *et al.* 2016. White collar 1-induced photolyase expression contributes to UV-tolerance of *Ustilago maydis*. *Microbiologyopen* 5(2): 224–243. doi:10.1002/mbo3.322.
- Budde, A.; Leong, S. 1989. Characterization of siderophores from *Ustilago maydis*. *Mycopathologia* 108(2): 125–133. doi:10.1007/bf00436063.
- Burgie, E.; Zhang, J.; Vierstra, R. 2016. Crystal Structure of *Deinococcus* Phytochrome in the Photoactivated State Reveals a Cascade of Structural Rearrangements during Photoconversion. *Structure* 24(3): 448–457. doi:10.1016/j.str.2016.01.001.
- Butler, W.; Norris, K.; Siegelman, H.; Hendricks, S. 1959. Detection, assay, and preliminary purification of the pigment controlling photoresponsive development of plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 45(12): 1703–1708. doi:10.1073/pnas.45.12.1703.
- Cabrera-Ponce, J.; León-Ramírez, C.; Verver-Vargas, A.; Palma-Tirado, L.; Ruiz-Herrera, J. 2012. Metamorphosis of the Basidiomycota *Ustilago maydis*: transformation of yeast-like cells into basidiocarps. *Fungal Genet Biol* 49(10): 765–771. doi:10.1016/j.fgb.2012.07.005.
- Casal, J. 2012. Shade avoidance. *Arabidopsis Book* 10: e0157. doi:10.1199/tab.0157.
- Casas-Flores, S.; Herrera-Estrella, A. 2016. The Bright and Dark Sides of Fungal Life: Environmental and Microbial Relationships. *Springer International Publishing* Bd. 62: 41–77.
- Casas-Flores, S.; Rios-Momberg, M.; Bibbins, M.; Ponce-Noyola, P.; Herrera-Estrella, A. 2004. BLR-1 and BLR-2, key regulatory elements of photoconidiation and mycelial growth in *Trichoderma atroviride*. *Microbiology (Reading, Engl)* 150(Pt 11): 3561–3569. doi:10.1099/mic.0.27346-0.
- Casas-Flores, S.; Rios-Momberg, M.; Rosales-Saavedra, T.; Martínez-Hernández, P.; Olmedo-Monfil, V. *et al.* 2006. Cross talk between a fungal blue-light perception system and the cyclic AMP signaling pathway. *Eukaryotic Cell* 5(3): 499–506. doi:10.1128/EC.5.3.499-506.2006.
- Castro Márquez, A. 2016. Characterization of Opsins in *Ustilago maydis*. Bachelorarbeit. Philipps-Universität Marburg. Pflanzenphysiologie.
- Cha, J.; Chang, S.-S.; Huang, G.; Cheng, P.; Liu, Y. 2008. Control of WHITE COLLAR localization by phosphorylation is a critical step in the circadian negative feedback process. *EMBO J* 27(24): 3246–3255. doi:10.1038/emboj.2008.245.

- Champe, S.; Nagle, D.; Yager, L. 1994. Sexual sporulation. *Prog Ind Microbiol* 29: 429–454.
- Chaves, I.; Pokorný, R.; Byrdin, M.; Hoang, N.; Ritz, T. *et al.* 2011. The cryptochromes: blue light photoreceptors in plants and animals. *Annu Rev Plant Biol* 62: 335–364. doi:10.1146/annurev-arplant-042110-103759.
- Chen, C.-H.; Ringelberg, C.; Gross, R.; Dunlap, J.; Loros, J. 2009. Genome-wide analysis of light-inducible responses reveals hierarchical light signalling in *Neurospora*. *EMBO J* 28(8): 1029–1042. doi:10.1038/emboj.2009.54.
- Cheng, P.; He, Q.; He, Q.; Wang, L.; Liu, Y. 2005. Regulation of the *Neurospora* circadian clock by an RNA helicase. *Genes Dev* 19(2): 234–241. doi:10.1101/gad.1266805.
- Cheng, P.; Yang, Y.; Liu, Y. 2001. Interlocked feedback loops contribute to the robustness of the *Neurospora* circadian clock. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98(13): 7408–7413. doi:10.1073/pnas.121170298.
- Cho, Y.; Ohm, R.; Grigoriev, I.; Srivastava, A. 2013. Fungal-specific transcription factor AbPfl2 activates pathogenicity in *Alternaria brassicicola*. *Plant J* 75(3): 498–514. doi:10.1111/tpj.12217.
- Christie, J.; Gawthorne, J.; Young, G.; Fraser, N.; Roe, A. 2012. LOV to BLUF: flavoprotein contributions to the optogenetic toolkit. *Mol Plant* 5(3): 533–544. doi:10.1093/mp/sss020.
- Cohrs, K.; Schumacher, J. 2017. The Two Cryptochrome/Photolyase Family Proteins Fulfill Distinct Roles in DNA Photorepair and Regulation of Conidiation in the Gray Mold Fungus *Botrytis cinerea*. *Appl Environ Microbiol* 83(17). doi:10.1128/AEM.00812-17.
- Crosson, S.; Moffat, K. 2002. Photoexcited structure of a plant photoreceptor domain reveals a light-driven molecular switch. *Plant Cell* 14(5): 1067–1075. doi:10.1105/tpc.010475.
- Denault, D.; Loros, J.; Dunlap, J. 2001. WC-2 mediates WC-1-FRQ interaction within the PAS protein-linked circadian feedback loop of *Neurospora*. *EMBO J* 20(1-2): 109–117. doi:10.1093/emboj/20.1.109.
- Dobzhansky, T. 1973. Nothing in Biology Makes Sense except in the Light of Evolution. *The American Biology Teacher* 35(3): 125–129. doi:10.2307/4444260.
- Doehlemann, G.; Wahl, R.; Horst, R.; Voll, L.; Usadel, B. *et al.* 2008. Reprogramming a maize plant: transcriptional and metabolic changes induced by the fungal biotroph *Ustilago maydis*. *Plant J* 56(2): 181–195. doi:10.1111/j.1365-313X.2008.03590.x.
- Ernst, O.; Lodowski, D.; Elstner, M.; Hegemann, P.; Brown, L. *et al.* 2014. Microbial and animal rhodopsins: structures, functions, and molecular mechanisms. *Chem Rev* 114(1): 126–163. doi:10.1021/cr4003769.
- Estrada, A.; Brefort, T.; Mengel, C.; Díaz-Sánchez, V.; Alder, A. *et al.* 2009. *Ustilago maydis* accumulates beta-carotene at levels determined by a retinal-forming carotenoid oxygenase. *Fungal Genet Biol* 46(10): 803–813. doi:10.1016/j.fgb.2009.06.011.
- Feldbrügge, M.; Kämper, J.; Steinberg, G.; Kahmann, R. 2004. Regulation of mating and pathogenic development in *Ustilago maydis*. *Curr Opin Microbiol* 7(6): 666–672. doi:10.1016/j.mib.2004.10.006.
- Finnigan, G.; Thorner, J. 2015. Complex in vivo Ligation Using Homologous Recombination and High-efficiency Plasmid Rescue from *Saccharomyces cerevisiae*. *Bio Protoc* 5(13). doi:10.21769/bioprotoc.1521.
- Fischer, R.; Aguirre, J.; Herrera-Estrella, A.; Corrochano, L. 2016. The Complexity of Fungal Vision. *Microbiol Spectr* 4(6). doi:10.1128/microbiolspec.FUNK-0020-2016.
- Fraser, D.; Hayes, S.; Franklin, K. 2016. Photoreceptor crosstalk in shade avoidance. *Curr Opin Plant Biol* 33: 1–7. doi:10.1016/j.pbi.2016.03.008.

- Froehlich, A.; Chen, C.-H.; Belden, W.; Madeti, C.; Roenneberg, T. *et al.* 2010. Genetic and molecular characterization of a cryptochrome from the filamentous fungus *Neurospora crassa*. *Eukaryotic Cell* 9(5): 738–750. doi:10.1128/EC.00380-09.
- Fuller, K.; Loros, J.; Dunlap, J. 2015. Fungal photobiology: visible light as a signal for stress, space and time. *Curr Genet* 61(3): 275–288. doi:10.1007/s00294-014-0451-0.
- García-Esquivel, M.; Esquivel-Naranjo, E.; Hernández-Oñate, M.; Ibarra-Laclette, E.; Herrera-Estrella, A. 2016. The *Trichoderma atroviride* cryptochrome/photolyase genes regulate the expression of *blr1*-independent genes both in red and blue light. *Fungal Biol* 120(4): 500–512. doi:10.1016/j.funbio.2016.01.007.
- García-Martínez, J.; Brunk, M.; Avalos, J.; Terpitz, U. 2015. The CarO rhodopsin of the fungus *Fusarium fujikuroi* is a light-driven proton pump that retards spore germination. *Sci Rep* 5: 7798. doi:10.1038/srep07798.
- García-Muse, T.; Steinberg, G.; Pérez-Martín, J. 2003. Pheromone-induced G2 arrest in the phytopathogenic fungus *Ustilago maydis*. *Eukaryotic Cell* 2(3): 494–500. doi:10.1128/ec.2.3.494-500.2003.
- Gerwien, F.; Skrahina, V.; Kasper, L.; Hube, B.; Brunke, S. 2018. Metals in fungal virulence. *FEMS Microbiol Rev* 42(1). doi:10.1093/femsre/fux050.
- Ghosh, A. 2014. Small heat shock proteins (HSP12, HSP20 and HSP30) play a role in *Ustilago maydis* pathogenesis. *FEMS Microbiol Lett* 361(1): 17–24. doi:10.1111/1574-6968.12605.
- Gibson, D. 2011. Enzymatic assembly of overlapping DNA fragments. *Meth Enzymol* 498: 349–361. doi:10.1016/B978-0-12-385120-8.00015-2.
- Griebel, T.; Zeier, J. 2008. Light regulation and daytime dependency of inducible plant defenses in *Arabidopsis*: phytochrome signaling controls systemic acquired resistance rather than local defense. *Plant Physiol* 147(2): 790–801. doi:10.1104/pp.108.119503.
- Grimaldi, B.; Coiro, P.; Filetici, P.; Berge, E.; Dobosy, J. *et al.* 2006. The *Neurospora crassa* White Collar-1 dependent blue light response requires acetylation of histone H3 lysine 14 by NGF-1. *Mol Biol Cell* 17(10): 4576–4583. doi:10.1091/mbc.E06-03-0232.
- Haas, H. 2003. Molecular genetics of fungal siderophore biosynthesis and uptake: the role of siderophores in iron uptake and storage. *Appl Microbiol Biotechnol* 62(4): 316–330. doi:10.1007/s00253-003-1335-2.
- Harding, R.; Shropshire, W. 1980. Photocontrol of Carotenoid Biosynthesis. *Annu. Rev. Plant. Physiol.* 31(1): 217–238. doi:10.1146/annurev.pp.31.060180.001245.
- Harding, R.; Turner, R. 1981. Photoregulation of the Carotenoid Biosynthetic Pathway in Albino and White Collar Mutants of *Neurospora crassa*. *Plant Physiol* 68(3): 745–749. doi:10.1104/pp.68.3.745.
- He, Q.; Cheng, P.; Yang, Y.; Wang, L.; Gardner, K. *et al.* 2002. White collar-1, a DNA binding transcription factor and a light sensor. *Science* 297(5582): 840–843. doi:10.1126/science.1072795.
- Hedtke, M.; Rauscher, S.; Röhrig, J.; Rodríguez-Romero, J.; Yu, Z. *et al.* 2015. Light-dependent gene activation in *Aspergillus nidulans* is strictly dependent on phytochrome and involves the interplay of phytochrome and white collar-regulated histone H3 acetylation. *Mol Microbiol* 97(4): 733–745. doi:10.1111/mmi.13062.
- Heimel, K.; Scherer, M.; Vranes, M.; Wahl, R.; Pothiratana, C. *et al.* 2010. The transcription factor Rbf1 is the master regulator for b-mating type controlled pathogenic development in *Ustilago maydis*. *PLoS Pathog* 6(8): e1001035. doi:10.1371/journal.ppat.1001035.
- Hevia, M.; Canessa, P.; Müller-Esparza, H.; Larrondo, L. 2015. A circadian oscillator in the fungus *Botrytis cinerea* regulates virulence when infecting *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 112(28): 8744–8749. doi:10.1073/pnas.1508432112.

- Holliday, R. 2011. The recombination, repair and modification of DNA. *DNA Repair (Amst)* 10(10): 993–999. doi:10.1016/j.dnarep.2011.04.005.
- Idnurm, A.; Heitman, J. 2005. Light controls growth and development via a conserved pathway in the fungal kingdom. *PLoS Biol* 3(4): e95. doi:10.1371/journal.pbio.0030095.
- Idnurm, A.; Heitman, J. 2010. Ferrochelatase is a conserved downstream target of the blue light-sensing White collar complex in fungi. *Microbiology (Reading, Engl)* 156(Pt 8): 2393–2407. doi:10.1099/mic.0.039222-0.
- Idnurm, A.; Rodríguez-Romero, J.; Corrochano, L.; Sanz, C.; Iturriaga, E. *et al.* 2006. The *Phycomyces madA* gene encodes a blue-light photoreceptor for phototropism and other light responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103(12): 4546–4551. doi:10.1073/pnas.0600633103.
- Idnurm, A.; Verma, S.; Corrochano, L. 2010. A glimpse into the basis of vision in the kingdom Mycota. *Fungal Genet Biol* 47(11): 881–892. doi:10.1016/j.fgb.2010.04.009.
- Iseki, M.; Matsunaga, S.; Murakami, A.; Ohno, K.; Shiga, K. *et al.* 2002. A blue-light-activated adenylyl cyclase mediates photoavoidance in *Euglena gracilis*. *Nature* 415(6875): 1047–1051. doi:10.1038/4151047a.
- Iwabuchi, K.; Li, B.; Bartel, P.; Fields, S. 1993. Use of the two-hybrid system to identify the domain of p53 involved in oligomerization. *Oncogene* 8(6): 1693–1696.
- Jaeger, E. 2013. Analyse der Photolyasen Phr1 und Phr2 sowie der DASH Cryptochrome Cry1 und Cry2 in *Ustilago maydis*. Masterarbeit. Philipps-Universität Marburg. Genetik.
- Kämper, J.; Kahmann, R.; Bölker, M.; Ma, L.-J.; Brefort, T. *et al.* 2006. Insights from the genome of the biotrophic fungal plant pathogen *Ustilago maydis*. *Nature* 444(7115): 97–101. doi:10.1038/nature05248.
- Kämper, J.; Reichmann, M.; Romeis, T.; Bölker, M.; Kahmann, R. 1995. Multiallelic recognition: Nonself-dependent dimerization of the bE and bW homeodomain proteins in *ustilago maydis*. *Cell* 81(1): 73–83. doi:10.1016/0092-8674(95)90372-0.
- Keon, J.; White, G.; Hargreaves, J. 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(6): 475–481. doi:10.1007/bf00312739.
- Kim, S.; Singh, P.; Park, J.; Park, S.; Friedman, A. *et al.* 2011. Genetic and molecular characterization of a blue light photoreceptor MGWC-1 in *Magnaporthe oryzae*. *Fungal Genet Biol* 48(4): 400–407. doi:10.1016/j.fgb.2011.01.004.
- Kronstad, J.; Leong, S. 1990. The b mating-type locus of *Ustilago maydis* contains variable and constant regions. *Genes Dev* 4(8): 1384–1395. doi:10.1101/gad.4.8.1384.
- Kües, U.; Granada, J.; Hermann, R.; Boulianne, R.; Kertesz-Chaloupková, K. *et al.* 1998. The A mating type and blue light regulate all known differentiation processes in the basidiomycete *Coprinus cinereus*. *Molec. Gen. Genet.* 260(1): 81–91. doi:10.1007/s004380050873.
- Lanver, D.; Mendoza-Mendoza, A.; Brachmann, A.; Kahmann, R. 2010. Sho1 and Msb2-related proteins regulate appressorium development in the smut fungus *Ustilago maydis*. *Plant Cell* 22(6): 2085–2101. doi:10.1105/tpc.109.073734.
- Lanver, D.; Müller, A.; Happel, P.; Schweizer, G.; Haas, F. *et al.* 2018. The Biotrophic Development of *Ustilago maydis* Studied by RNA-Seq Analysis. *Plant Cell* 30(2): 300–323. doi:10.1105/tpc.17.00764.
- Lanver, D.; Tollot, M.; Schweizer, G.; Lo Presti, L.; Reissmann, S. *et al.* 2017. *Ustilago maydis* effectors and their impact on virulence. *Nat Rev Microbiol* 15(7): 409–421. doi:10.1038/nrmicro.2017.33.

- LeClerc, J. E.; Borden, A.; Lawrence, C. 1991. The thymine-thymine pyrimidine-pyrimidone(6-4) ultraviolet light photoproduct is highly mutagenic and specifically induces 3' thymine-to-cytosine transitions in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (88): 9685–9689.
- Lewis, Z.; Correa, A.; Schwerdtfeger, C.; Link, K.; Xie, X. *et al.* 2002. Overexpression of White Collar-1 (WC-1) activates circadian clock-associated genes, but is not sufficient to induce most light-regulated gene expression in *Neurospora crassa*. *Mol Microbiol* 45(4): 917–931. doi:10.1046/j.1365-2958.2002.03074.x.
- Li, B.; Fields, S. 1993. Identification of mutations in p53 that affect its binding to SV40 large T antigen by using the yeast two-hybrid system. *FASEB J* 7(10): 957–963. doi:10.1096/fasebj.7.10.8344494.
- Li, H.; Handsaker, B.; Wysoker, A.; Fennell, T.; Ruan, J. *et al.* 2009. The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics* 25(16): 2078–2079. doi:10.1093/bioinformatics/btp352.
- Linden, H.; Macino, G. 1997. White collar 2, a partner in blue-light signal transduction, controlling expression of light-regulated genes in *Neurospora crassa*. *EMBO J* 16(1): 98–109. doi:10.1093/emboj/16.1.98.
- Liu, Y.; He, Q.; Cheng, P. 2003. Photoreception in *Neurospora*: a tale of two White Collar proteins. *Cell Mol Life Sci* 60(10): 2131–2138. doi:10.1007/s00018-003-3109-5.
- Lo Presti, L.; Lanver, D.; Schweizer, G.; Tanaka, S.; Liang, L. *et al.* 2015. Fungal effectors and plant susceptibility. *Annu Rev Plant Biol* 66: 513–545. doi:10.1146/annurev-arplant-043014-114623.
- Loeti 2013. Globalstrahlung. *SBZ Monteur*. <https://www.sbz-monteur.de/erklaer-mal/erklaer-mal-globalstrahlung>, zuletzt geprüft am 20.07.2020.
- Love, M.; Huber, W.; Anders, S. 2014. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol* 15(12): 550. doi:10.1186/s13059-014-0550-8.
- Ma, H.; Kunes, S.; Schatz, P.; Botstein, D. 1987. Plasmid construction by homologous recombination in yeast. *Gene* 58(2-3): 201–216. doi:10.1016/0378-1119(87)90376-3.
- Masuda, S. 2013. Light detection and signal transduction in the BLUF photoreceptors. *Plant Cell Physiol* 54(2): 171–179. doi:10.1093/pcp/pcs173.
- Masuda, S.; Bauer, C. 2002. AppA Is a Blue Light Photoreceptor that Antirepresses Photosynthesis Gene Expression in *Rhodospirillum rubrum*. *Cell* 110(5): 613–623. doi:10.1016/S0092-8674(02)00876-0.
- Matei, A.; Ernst, C.; Günl, M.; Thiele, B.; Altmüller, J. *et al.* 2018. How to make a tumour: cell type specific dissection of *Ustilago maydis*-induced tumour development in maize leaves. *New Phytol* 217(4): 1681–1695. doi:10.1111/nph.14960.
- Mei, B.; Budde, A.; Leong, S. 1993. sid1, a gene initiating siderophore biosynthesis in *Ustilago maydis*: molecular characterization, regulation by iron, and role in phytopathogenicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 90(3): 903–907. doi:10.1073/pnas.90.3.903.
- Mendoza-Mendoza, A.; Berndt, P.; Djamei, A.; Weise, C.; Linne, U. *et al.* 2009. Physical-chemical plant-derived signals induce differentiation in *Ustilago maydis*. *Mol Microbiol* 71(4): 895–911. doi:10.1111/j.1365-2958.2008.06567.x.
- Mi, H.; Huang, X.; Muruganujan, A.; Tang, H.; Mills, C. *et al.* 2017. PANTHER version 11: expanded annotation data from Gene Ontology and Reactome pathways, and data analysis tool enhancements. *Nucleic Acids Res* 45(D1): D183–D189. doi:10.1093/nar/gkw1138.
- Molina, L.; Kahmann, R. 2007. An *Ustilago maydis* gene involved in H₂O₂ detoxification is required for virulence. *Plant Cell* 19(7): 2293–2309. doi:10.1105/tpc.107.052332.
- Mooney, J.; Yager, L. 1990. Light is required for conidiation in *Aspergillus nidulans*. *Genes Dev* 4(9): 1473–1482. doi:10.1101/gad.4.9.1473.

- Müller, P.; Weinzierl, G.; Brachmann, A.; Feldbrügge, M.; Kahmann, R. 2003. Mating and pathogenic development of the Smut fungus *Ustilago maydis* are regulated by one mitogen-activated protein kinase cascade. *Eukaryotic Cell* 2(6): 1187–1199. doi:10.1128/EC.2.6.1187–1199.2003.
- Müller, W.; Geinitz, C. 1999. Lichtfaktor. *Spektrum Akademischer Verlag*. Lexikon der Biologie. <https://www.spektrum.de/lexikon/biologie/lichtfaktor/39241>, zuletzt geprüft am 20.07.2020.
- Mussi, M.; Gaddy, J.; Cabruja, M.; Arivett, B.; Viale, A. *et al.* 2010. The opportunistic human pathogen *Acinetobacter baumannii* senses and responds to light. *Journal of Bacteriology* 192(24): 6336–6345. doi:10.1128/JB.00917-10.
- Oerke, E.-C. 2006. Crop losses to pests. *J. Agric. Sci.* 144(1): 31–43. doi:10.1017/S0021859605005708.
- Oldenburg, K.; Vo, K.; Michaelis, S.; Paddon, C. 1997. Recombination-mediated PCR-directed plasmid construction in vivo in yeast. *Nucleic Acids Res* 25(2): 451–452. doi:10.1093/nar/25.2.451.
- Olmedo, M.; Ruger-Herreros, C.; Luque, E.; Corrochano, L. 2010. A complex photoreceptor system mediates the regulation by light of the conidiation genes *con-10* and *con-6* in *Neurospora crassa*. *Fungal Genet Biol* 47(4): 352–363. doi:10.1016/j.fgb.2009.11.004.
- Osmani, Stephen A.; Goldman, Gustavo Henrique (Hg.) (2008). *The Aspergilli. Genomics, medical aspects, biotechnology, and research methods*. Boca Raton: Taylor & Francis (Mycology, v. 26).
- Palczewski, K. 2006. G protein-coupled receptor rhodopsin. *Annu Rev Biochem* 75: 743–767. doi:10.1146/annurev.biochem.75.103004.142743.
- Panzer, S.; Brych, A.; Batschauer, A.; Terpitz, U. 2019. Opsin 1 and Opsin 2 of the Corn Smut Fungus *Ustilago maydis* Are Green Light-Driven Proton Pumps. *Front Microbiol* 10: 735. doi:10.3389/fmicb.2019.00735.
- Parzefall, K. 2015. Analyse von Rhodopsingenen in *Ustilago maydis*. Bachelorarbeit. Philipps-Universität Marburg. Pflanzenphysiologie.
- Parzefall, K. 2017. Charakterisierung des Phytochroms Phy1 von *Ustilago maydis*. Masterarbeit. Philipps-Universität Marburg. Pflanzenphysiologie.
- Pérez-Martín, J.; Castillo-Lluva, S.; Sgarlata, C.; Flor-Parra, I.; Mielnichuk, N. *et al.* 2006. Pathocycles: *Ustilago maydis* as a model to study the relationships between cell cycle and virulence in pathogenic fungi. *Mol Genet Genomics* 276(3): 211–229. doi:10.1007/s00438-006-0152-6.
- Perroud, P.-F.; Haas, F.; Hiss, M.; Ullrich, K.; Alboresi, A. *et al.* 2018. The *Physcomitrella patens* gene atlas project: large-scale RNA-seq based expression data. *Plant J* 95(1): 168–182. doi:10.1111/tpj.13940.
- Pfeifer, A.; Majerus, T.; Zikihara, K.; Matsuoka, D.; Tokutomi, S. *et al.* 2009. Time-resolved Fourier transform infrared study on photoadduct formation and secondary structural changes within the phototropin LOV domain. *Biophys J* 96(4): 1462–1470. doi:10.1016/j.bpj.2008.11.016.
- Philpott, C.; Leidgens, S.; Frey, A. 2012. Metabolic remodeling in iron-deficient fungi. *Biochim Biophys Acta* 1823(9): 1509–1520. doi:10.1016/j.bbamcr.2012.01.012.
- Pruss, S.; Fetzner, R.; Seither, K.; Herr, A.; Pfeiffer, E. *et al.* 2014. Role of the *Alternaria alternata* blue-light receptor *LreA* (white-collar 1) in spore formation and secondary metabolism. *Appl Environ Microbiol* 80(8): 2582–2591. doi:10.1128/AEM.00327-14.
- Purschwitz, J.; Müller, S.; Kastner, C.; Fischer, R. 2006. Seeing the rainbow: light sensing in fungi. *Curr Opin Microbiol* 9(6): 566–571. doi:10.1016/j.mib.2006.10.011.
- Purschwitz, J.; Müller, S.; Kastner, C.; Schöser, M.; Haas, H. *et al.* 2008. Functional and physical interaction of blue- and red-light sensors in *Aspergillus nidulans*. *Curr Biol* 18(4): 255–259. doi:10.1016/j.cub.2008.01.061.

- Ram, S.; Nair, B.; Chhatpar, H. 1984. Photoregulation of some enzymes from *Neurospora crassa*. *Experientia* 40(12): 1382–1384. doi:10.1007/BF01951900.
- Robinson, M.; McCarthy, D.; Smyth, G. 2010. edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics* 26(1): 139–140. doi:10.1093/bioinformatics/btp616.
- Rockwell, N.; Lagarias, J. 2006. The structure of phytochrome: a picture is worth a thousand spectra. *Plant Cell* 18(1): 4–14. doi:10.1105/tpc.105.038513.
- Rodríguez-Romero, J.; Hedtke, M.; Kastner, C.; Müller, S.; Fischer, R. 2010. Fungi, hidden in soil or up in the air: light makes a difference. *Annu Rev Microbiol* 64: 585–610. doi:10.1146/annurev.micro.112408.134000.
- Röhrig, J.; Kastner, C.; Fischer, R. 2013. Light inhibits spore germination through phytochrome in *Aspergillus nidulans*. *Curr Genet* 59(1-2): 55–62. doi:10.1007/s00294-013-0387-9.
- Ruger-Herreros, C.; Rodríguez-Romero, J.; Fernández-Barranco, R.; Olmedo, M.; Fischer, R. *et al.* 2011. Regulation of conidiation by light in *Aspergillus nidulans*. *Genetics* 188(4): 809–822. doi:10.1534/genetics.111.130096.
- Ruiz-Roldán, M.; Garre, V.; Guarro, J.; Mariné, M.; Roncero, M. 2008. Role of the white collar 1 photoreceptor in carotenogenesis, UV resistance, hydrophobicity, and virulence of *Fusarium oxysporum*. *Eukaryotic Cell* 7(7): 1227–1230. doi:10.1128/EC.00072-08.
- Sancar, A. 2003. Structure and function of DNA photolyase and cryptochrome blue-light photoreceptors. *Chem Rev* 103(6): 2203–2237. doi:10.1021/cr0204348.
- Sánchez-Arreguin, J.; Cabrera-Ponce, J.; León-Ramírez, C.; Camargo-Escalante, M.; Ruiz-Herrera, J. 2020. Analysis of the photoreceptors involved in the light-depending basidiocarp formation in *Ustilago maydis*. *Arch Microbiol* 202(1): 93–103. doi:10.1007/s00203-019-01725-w.
- Sargent, M.; Briggs, W.; Woodward, D. 1966. Circadian nature of a rhythm expressed by an invertaseless strain of *Neurospora crassa*. *Plant Physiol* 41(8): 1343–1349. doi:10.1104/pp.41.8.1343.
- Schäfer, Eberhard; Nagy, Ferenc (2006). Photomorphogenesis in plants and bacteria. Function and signal transduction mechanisms. 3rd ed. Dordrecht: Springer. Online verfügbar unter <http://site.ebrary.com/lib/alltitles/docDetail.action?docID=10134009>.
- Schafmeier, T.; Diernfellner, A. 2011. Light input and processing in the circadian clock of *Neurospora*. *FEBS Lett* 585(10): 1467–1473. doi:10.1016/j.febslet.2011.03.050.
- Schirawski, J.; Böhnert, H.; Steinberg, G.; Snetselaar, K.; Adamikowa, L. *et al.* 2005. Endoplasmic reticulum glucosidase II is required for pathogenicity of *Ustilago maydis*. *Plant Cell* 17(12): 3532–3543. doi:10.1105/tpc.105.036285.
- Schirmer, T.; Jenal, U. 2009. Structural and mechanistic determinants of c-di-GMP signalling. *Nat Rev Microbiol* 7(10): 724–735. doi:10.1038/nrmicro2203.
- Schrettl, M.; Bignell, E.; Kragl, C.; Joechl, C.; Rogers, T. *et al.* 2004. Siderophore biosynthesis but not reductive iron assimilation is essential for *Aspergillus fumigatus* virulence. *J Exp Med* 200(9): 1213–1219. doi:10.1084/jem.20041242.
- Schumacher, J. 2017. How light affects the life of *Botrytis*. *Fungal Genet Biol* 106: 26–41. doi:10.1016/j.fgb.2017.06.002.
- Schuster, M.; Schweizer, G.; Reissmann, S.; Kahmann, R. 2016. Genome editing in *Ustilago maydis* using the CRISPR-Cas system. *Fungal Genet Biol* 89: 3–9. doi:10.1016/j.fgb.2015.09.001.
- Schwerdtfeger, C.; Linden, H. 2000. Localization and light-dependent phosphorylation of white collar 1 and 2, the two central components of blue light signaling in *Neurospora crassa*. *European Journal of Biochemistry* 267(2): 414–422. doi:10.1046/j.1432-1327.2000.01016.x.

- Schwerdtfeger, C.; Linden, H. 2003. VIVID is a flavoprotein and serves as a fungal blue light photoreceptor for photoadaptation. *EMBO J* 22(18): 4846–4855. doi:10.1093/emboj/cdg451.
- Selby, C.; Sancar, A. 2006. A cryptochrome/photolyase class of enzymes with single-stranded DNA-specific photolyase activity. *PNAS* (103 (47)): 17696–17700.
- Sheerin, D.; Hiltbrunner, A. 2017. Molecular mechanisms and ecological function of far-red light signalling. *Plant Cell Environ* 40(11): 2509–2529. doi:10.1111/pce.12915.
- Snetselaar, K.; Bölker, M.; Kahmann, R. 1996. Ustilago maydis Mating Hyphae Orient Their Growth toward Pheromone Sources. *Fungal Genetics and Biology* 20(4): 299–312. doi:10.1006/fgbi.1996.0044.
- Solomon, P.; Tan, K.-C.; Oliver, R. 2003. The nutrient supply of pathogenic fungi; a fertile field for study. *Mol Plant Pathol* 4(3): 203–210. doi:10.1046/j.1364-3703.2003.00161.x.
- Spudich, J. 2006. The multitasking microbial sensory rhodopsins. *Trends Microbiol* 14(11): 480–487. doi:10.1016/j.tim.2006.09.005.
- Spudich, John Lee; Briggs, Winslow R. (2005). Handbook of photosensory receptors. Weinheim: Wiley-VCH. Online verfügbar unter <http://site.ebrary.com/lib/alltitles/docDetail.action?docID=10300654>.
- Stelling, A.; Ronayne, K.; Nappa, J.; Tonge, P.; Meech, S. 2007. Ultrafast structural dynamics in BLUF domains: transient infrared spectroscopy of AppA and its mutants. *J Am Chem Soc* 129(50): 15556–15564. doi:10.1021/ja074074n.
- Szabó, Z.; Tönis, M.; Kessler, H.; Feldbrügge, M. 2002. Structure-function analysis of lipopeptide pheromones from the plant pathogen Ustilago maydis. *Mol Genet Genomics* 268(3): 362–370. doi:10.1007/s00438-002-0756-4.
- Tagua, V.; Pausch, M.; Eckel, M.; Gutiérrez, G.; Miralles-Durán, A. et al. 2015. Fungal cryptochrome with DNA repair activity reveals an early stage in cryptochrome evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 112(49): 15130–15135. doi:10.1073/pnas.1514637112.
- Talora, C.; Franchi, L.; Linden, H.; Ballario, P.; Macino, G. 1999. Role of a white collar-1-white collar-2 complex in blue-light signal transduction. *EMBO J* 18(18): 4961–4968. doi:10.1093/emboj/18.18.4961.
- Tarazona, S.; García-Alcalde, F.; Dopazo, J.; Ferrer, A.; Conesa, A. 2011. Differential expression in RNA-seq: a matter of depth. *Genome Res* 21(12): 2213–2223. doi:10.1101/gr.124321.111.
- Tisch, D.; Scholl, M. 2010. Light regulation of metabolic pathways in fungi. *Appl Microbiol Biotechnol* 85(5): 1259–1277. doi:10.1007/s00253-009-2320-1.
- Tschowri, N.; Lindenberg, S.; Hengge, R. 2012. Molecular function and potential evolution of the biofilm-modulating blue light-signalling pathway of Escherichia coli. *Mol Microbiol* 85(5): 893–906. doi:10.1111/j.1365-2958.2012.08147.x.
- Tucker, S.; Talbot, N. 2001. Surface attachment and pre-penetration stage development by plant pathogenic fungi. *Annu Rev Phytopathol* 39: 385–417. doi:10.1146/annurev.phyto.39.1.385.
- Urban, M.; Kahmann, R.; Bölker, M. 1996. The biallelic a mating type locus of Ustilago maydis: remnants of an additional pheromone gene indicate evolution from a multiallelic ancestor. *Molec. Gen. Genet.* 250(4): 414–420. doi:10.1007/bf02174029.
- Vollmeister, E.; Schipper, K.; Baumann, S.; Haag, C.; Pohlmann, T. et al. 2012. Fungal development of the plant pathogen Ustilago maydis. *FEMS Microbiol Rev* 36(1): 59–77. doi:10.1111/j.1574-6976.2011.00296.x.
- Walter, T.; Schlegel, J.; Burgert, A.; Kurz, A.; Seibel, J. et al. 2017. Incorporation studies of clickable ceramides in Jurkat cell plasma membranes. *Chem Commun (Camb)* 53(51): 6836–6839. doi:10.1039/C7CC01220A.

- Wang, Z.; Wang, J.; Li, N.; Li, J.; Trail, F. *et al.* 2018. Light sensing by opsins and fungal ecology: NOP-1 modulates entry into sexual reproduction in response to environmental cues. *Mol Ecol* 27(1): 216–232. doi:10.1111/mec.14425.
- Waschuk, S.; Bezerra, A.; Shi, L.; Brown, L. 2005. Leptosphaeria rhodopsin: bacteriorhodopsin-like proton pump from a eukaryote. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 102(19): 6879–6883. doi:10.1073/pnas.0409659102.
- Widiez, T.; Symeonidi, A.; Luo, C.; Lam, E.; Lawton, M. *et al.* 2014. The chromatin landscape of the moss *Physcomitrella patens* and its dynamics during development and drought stress. *Plant J* 79(1): 67–81. doi:10.1111/tpj.12542.
- Wu, Q.; Gardner, K. 2009. Structure and insight into blue light-induced changes in the BlrP1 BLUF domain. *Biochemistry* 48(12): 2620–2629. doi:10.1021/bi802237r.
- Wulf, K.; Schauz, K. 1983. Investigation on the light dependence of smut spore germination in *Ustilago maydis*. *Journal of Plant Diseases and Protection* (90): 495–499.
- Yamaguchi, R.; Nakamura, M.; Mochizuki, N.; Kay, S.; Nagatani, A. 1999. Light-dependent Translocation of a Phytochrome B-GFP Fusion Protein to the Nucleus in Transgenic Arabidopsis. *J Cell Biol* 145(3): 437–445. doi:10.1083/jcb.145.3.437.
- Yu, D.; Liao, L.; Zhang, J.; Zhang, Y.; Xu, K. *et al.* 2018. A novel, easy and rapid method for constructing yeast two-hybrid vectors using In-Fusion technology. *BioTechniques* 64(5): 219–224. doi:10.2144/btn-2018-0007.
- Yu, S.-M.; Ramkumar, G.; Lee, Y. 2013. Light quality influences the virulence and physiological responses of *Colletotrichum acutatum* causing anthracnose in pepper plants. *J Appl Microbiol* 115(2): 509–516. doi:10.1111/jam.12252.
- Yu, Z.; Armant, O.; Fischer, R. 2016. Fungi use the SakA (HogA) pathway for phytochrome-dependent light signalling. *Nat Microbiol* 1: 16019. doi:10.1038/nmicrobiol.2016.19.
- Yu, Z.; Fischer, R. 2019. Light sensing and responses in fungi. *Nat Rev Microbiol* 17(1): 25–36. doi:10.1038/s41579-018-0109-x.
- Zschiedrich, C.; Keidel, V.; Szurmant, H. 2016. Molecular Mechanisms of Two-Component Signal Transduction. *J Mol Biol* 428(19): 3752–3775. doi:10.1016/j.jmb.2016.08.003.

VII. Anhang

VII.1 Die Gene der Lichtantwort in *U. maydis*

Tabelle S1: x-fache Induktion der Licht- bzw. Wco1/Phy1-regulierten Gene in *U. maydis*. Gezeigt sind die Gene, die in mindestens einem Vergleich einen signifikanten ($p \leq 0,1$), mindestens zweifachen Unterschied zeigten. Diese Werte wurden in die in dieser Arbeit gezeigten Analysen einbezogen und in dieser Tabelle hervorgehoben. Geordnet wurde nach aufsteigender Gennummer. Die Daten beruhen auf jeweils drei experimentellen Replikaten.

Zusätzlich gezeigt sind Expressionsmuster der Licht- und Wco1-/Phy1-regulierten Gene im Laufe der biotrophen Entwicklung (Lanver *et al.* 2018). Die vier Zeichen stehen für die Expression in axenischer Kultur, in der frühen (0,5-1 dpi), mittleren (2-6 dpi) und späten (8-12) Phase der Infektion. o: durchschnittliche Expression; +: überdurchschnittlich; -: unterdurchschnittlich.

Gennummer	WT D-BL	WT D-RL	WT D-DRL	D WT- Δ wco1	Δ wco1 D-DRL	D WT- Δ phy1	Δ phy1 D-BL	biotrophe Entw.
UMAG_00017	1.91		-0.34	-0.73	0.17	-0.40	1.62	+ + - +
UMAG_00028	2.40	1.07	0.12	-0.48	0.26	-0.31	2.75	- o + +
UMAG_00036	-0.18	-0.35	1.37	1.19	-0.52	1.07	-1.08	- + - -
UMAG_00056	-1.14	-0.23	0.21	0.71	0.19	0.08	-0.79	+ - + -
UMAG_00072	-0.71	-0.53	0.76	-0.28	0.33	0.64	-1.43	+ + - -
UMAG_00078	0.47	0.14	0.87	1.02	3.11	0.99	-1.19	- o + +
UMAG_00085	1.68	0.70	0.18	-0.15	0.71	-0.06	1.56	+ - - o
UMAG_00089	1.70	0.56	0.22	0.35	0.14	0.25	1.18	- - + +
UMAG_00095	0.80	0.27	-0.15	-0.13	0.18	-0.34	1.43	+ - + -
UMAG_00096	-0.78	0.02	-0.28	-0.80	3.21	-0.21	-0.49	+ + - -
UMAG_00105	-0.75	-0.36	-2.26	-2.47	1.73	-1.75	1.15	+ + - -
UMAG_00109	1.44	0.24	1.45	-0.46	0.82	0.92	1.00	o + - -
UMAG_00118	-1.19	-0.10	-0.78	-0.55	-0.28	-0.49	-0.56	+ + - -
UMAG_00123	0.12	0.53	1.97	2.70	-1.38	2.04	-2.09	+ - + -
UMAG_00131	1.86	0.97	0.54	0.21	-0.16	0.17	1.61	+ + - +
UMAG_00133	3.09	1.61	1.01	0.81	-0.96	0.68	1.64	o + - -
UMAG_00160	0.99	0.41	0.07	-0.14	0.04	-0.26	1.32	o + - -
UMAG_00196	3.49	2.29	2.68	1.49	0.29	2.56	0.76	o + - -
UMAG_00205	2.58	1.15	0.05	-5.54	-0.36	-0.45	3.68	- + - +
UMAG_00210	1.80	0.39	-0.81	-0.91	0.72	-1.14	2.77	o + - -
UMAG_00330	-0.29	-0.12	0.45	-0.16	0.74	0.44	-1.58	o + - -
UMAG_00343	-0.35	-0.14	0.69	1.35	-0.68	1.08	-2.11	+ + - +
UMAG_00357	0.45	0.59	-0.46	-0.39	-0.33	-0.38	1.05	- - + +
UMAG_00358	2.69	1.06	0.69	0.13	-0.25	0.43	1.33	kein DEG
UMAG_00371	4.88	2.67	1.97	-2.73	0.63	1.16	3.79	- + - -
UMAG_00381	0.01	0.06	0.86	1.19	-0.71	1.10	-1.14	+ - + -
UMAG_00406	1.22	0.45	0.42	0.81	-0.40	0.40	0.53	+ + - +
UMAG_00424	1.17	0.25	0.30	-0.04	0.13	0.14	1.25	+ - - o
UMAG_00455	2.94	1.70	1.36	-0.60	1.55	0.90	2.12	o + - -
UMAG_00496	2.97	1.65	0.55	-5.12	0.92	-0.01	3.07	o + - -
UMAG_00545	1.14	0.36	-0.14	-0.05	0.11	-0.02	1.10	- - + +
UMAG_00567	-0.46	-0.24	0.30	0.00	0.10	0.39	-1.37	o + - -
UMAG_00573	4.09	1.83	2.54	-1.73	1.78	1.71	2.64	o + - -
UMAG_00583	0.67	0.20	1.77	0.58	2.14	0.91	-0.82	- + - -
UMAG_00589	2.29	0.90	1.00	0.85	-0.31	0.89	1.47	+ + - -
UMAG_00634	0.64	0.30	1.61	2.17	-1.13	1.96	-1.30	+ - + -
UMAG_00676	1.31	0.72	0.00	-0.06	0.31	-0.11	1.46	o + - -
UMAG_00700	0.59	0.38	-0.09	-0.12	0.66	-0.29	1.18	o + - -
UMAG_00719	6.64	1.83	1.82	0.67	-0.15	1.67	5.11	- + - -
UMAG_00723	4.71	2.46	2.61	-2.73	1.24	1.86	3.61	- + - -
UMAG_00749	3.24	0.27	-0.19	-0.32	-0.29	-0.33	2.92	+ - + -
UMAG_00753	0.55	0.44	-0.88	-1.32	1.17	-1.40	1.43	o + - -
UMAG_00783	-0.39	-0.34	-1.21	-1.61	1.04	-1.64	1.31	- + - +
UMAG_00784	-0.08	0.11	-1.16	-1.29	0.56	-1.48	1.34	- + - +
UMAG_00815	2.74	2.00	1.59	-0.16	0.05	1.26	1.51	o + - -
UMAG_00829	0.96	0.63	-2.04	-2.36	4.30	2.05	1.12	kein DEG
UMAG_00830	0.79	0.97	-0.13	0.02	0.89	0.00	1.37	- + - +
UMAG_00840	-3.04	-0.45	-2.97	-4.55	0.18	-2.32	-1.53	+ + - -
UMAG_00844	1.67	-0.06	3.83	4.33	-1.21	4.14	-2.23	+ + - -
UMAG_00965	1.88	0.65	-0.05	-0.50	0.04	-0.06	1.67	- + - -
UMAG_01017	1.52	0.68	0.00	0.40	0.13	0.06	1.36	o + - -
UMAG_01022	-0.70	-0.01	0.05	0.18	0.14	-0.01	-1.14	+ + - -

Gennummer	WT D-BL	WT D-RL	WT D-DRL	D WT- $\Delta wco1$	$\Delta wco1$ D-DRL	D WT- $\Delta phy1$	$\Delta phy1$ D-BL	biotrophe Entw.
UMAG_01049	1.52	-0.05	0.11	0.23	0.11	0.07	0.90	+ + - +
UMAG_01052	0.12	0.68	0.18	-1.15	-0.81	0.04	0.70	- - + +
UMAG_01055	1.73	0.70	1.18	0.66	0.11	1.16	0.68	o + - -
UMAG_01080	0.31	0.49	3.57	4.30	-1.47	3.91	-3.32	- - + -
UMAG_01114	2.10	0.88	0.39	0.48	-0.38	0.56	1.22	o + - -
UMAG_01115	1.27	0.39	0.64	0.46	0.34	0.56	0.70	+ + - -
UMAG_01146	1.20	0.26	0.00	-0.18	0.44	-0.25	1.32	+ + - -
UMAG_01172	1.24	-0.21	3.26	3.52	-0.69	3.37	-1.43	+ - - o
UMAG_01185	1.96	0.52	0.06	-0.02	-0.01	-0.33	2.41	- + - -
UMAG_01187	0.63	0.59	-0.65	-1.49	0.40	-0.77	1.24	+ - - o
UMAG_01192	3.28	1.73	1.29	0.19	0.32	0.82	2.60	- + - +
UMAG_01194	0.72	-0.02	-0.67	-1.70	2.13	-1.57	2.49	- + - +
UMAG_01205	-0.62	-0.36	0.51	0.26	0.93	0.58	-1.30	+ - - +
UMAG_01212	0.46	-0.04	3.09	3.32	-0.90	3.31	-2.48	+ + - -
UMAG_01213	0.03	-0.01	1.41	2.02	-0.33	0.96	-0.69	o + - -
UMAG_01269	1.65	0.89	0.41	-0.46	0.40	0.02	1.64	+ - - o
UMAG_01351	4.18	2.38	1.41	-2.83	0.31	0.62	3.59	- + - +
UMAG_01414	0.11	-0.15	1.87	1.66	0.26	1.69	-0.75	+ - - +
UMAG_01422	1.04	0.52	-0.08	-0.75	0.78	-0.39	0.84	o + - -
UMAG_01432	0.08	0.16	-1.47	-5.98	4.44	-2.23	2.89	+ + - -
UMAG_01433	-0.19	0.13	-1.82	-6.27	4.27	-2.45	2.46	+ + - -
UMAG_01434	0.03	-0.02	-2.66	-5.25	3.37	-2.33	2.48	o + - -
UMAG_01441	0.11	0.65	-0.62	-0.57	1.42	-0.65	1.30	- + - +
UMAG_01442	1.04	1.49	-4.69	-4.80	3.92	-4.82	5.34	kein DEG
UMAG_01466	1.02	0.05	1.95	2.27	-0.45	2.07	-1.27	o + - -
UMAG_01476	1.56	0.78	0.66	0.35	0.37	0.79	0.76	+ - o +
UMAG_01478	-0.05	-0.24	0.98	1.08	-0.19	1.06	-0.94	+ - - +
UMAG_01508	2.06	1.27	0.80	-0.86	-0.20	0.43	2.01	- o + +
UMAG_01515	1.08	0.37	-0.25	-0.43	0.00	-0.40	1.43	+ + - +
UMAG_01552	1.51	0.23	0.13	-0.11	0.98	-0.11	1.74	- - + +
UMAG_01610	1.21	0.54	-0.14	-0.40	-0.05	-0.10	1.36	o + - -
UMAG_01614	5.61	2.95	2.76	-1.00	-0.22	1.60	3.98	o + - -
UMAG_01619	1.69	0.44	1.01	0.93	0.58	0.66	1.34	+ + - -
UMAG_01656	3.67	2.37	2.26	-0.30	1.09	2.19	1.73	- o + +
UMAG_01664	0.44	-0.29	1.63	1.37	-0.24	1.50	-0.58	+ - - +
UMAG_01665	1.33	0.64	0.39	-0.07	0.20	0.17	1.73	- + - +
UMAG_01686	-0.22	-0.23	1.05	0.54	-0.02	0.83	-0.92	- + - -
UMAG_01712	1.77	0.90	0.23	-0.42	0.28	-0.30	2.35	+ + - -
UMAG_01724	1.88	0.31	0.26	0.20	-0.31	0.22	1.63	+ + - -
UMAG_01725	1.59	0.70	0.63	0.49	-1.13	0.57	0.85	o + - -
UMAG_01728	1.92	0.43	-0.30	-0.31	-0.11	-0.44	2.42	+ + - +
UMAG_01733	6.80	0.36	-0.07	-0.43	0.09	-0.24	6.97	kein DEG
UMAG_01750	1.21	0.36	-0.05	0.03	-0.35	-0.23	1.46	kein DEG
UMAG_01753	1.66	0.54	-0.46	-0.39	0.69	-0.66	2.25	+ + - -
UMAG_01771	0.27	0.36	-0.50	-0.29	-0.05	-0.68	1.08	- - + +
UMAG_01787	-1.16	-0.35	-0.11	-0.08	-0.47	-0.03	-0.78	+ - - +
UMAG_01788	-1.45	-0.17	-0.71	-0.84	-0.88	-0.15	-0.87	- - + -
UMAG_01792	2.51	1.25	0.41	0.25	0.05	0.24	2.34	+ + - +
UMAG_01793	3.77	0.95	0.27	0.23	0.26	-0.27	4.84	- + - +
UMAG_01804	-1.44	-0.36	-0.70	-0.52	0.79	-0.43	-0.61	- - + +
UMAG_01805	3.72	2.43	1.46	-1.77	1.14	1.09	2.78	o + - -
UMAG_01812	0.87	0.09	-1.06	-1.49	0.75	-1.25	2.06	o + - -
UMAG_01814	1.37	0.39	-0.24	-0.24	0.14	-0.38	1.90	- - + +
UMAG_01815	4.07	0.91	0.22	-0.56	0.07	-0.17	4.70	- o + +
UMAG_01835	1.32	0.85	0.37	-0.14	0.83	-0.23	1.81	o + - -
UMAG_01843	-0.44	-0.07	-0.24	-0.29	1.74	-0.35	0.03	o + o o
UMAG_01856	3.45	1.73	0.98	-0.04	0.13	0.44	2.97	o + o o
UMAG_01859	0.79	0.34	-0.29	-0.77	0.37	-0.46	1.41	- + - -
UMAG_01885	3.75	2.84	2.03	0.20	1.40	0.85	4.32	o + o o
UMAG_01886	1.20	0.39	-0.33	-0.03	0.32	-0.35	1.37	+ + - +
UMAG_01888	0.78	0.21	1.17	0.68	0.32	0.80	-0.68	- + - +
UMAG_01894	1.53	0.72	0.41	0.27	0.07	0.20	1.14	o + - -
UMAG_01898	2.04	0.22	-0.22	-0.04	0.28	-0.18	1.96	+ - - o
UMAG_01900	3.50	0.87	1.25	1.81	-0.40	1.05	1.54	+ + - +
UMAG_01902	2.74	0.89	0.77	1.04	-0.39	0.53	1.42	+ + - +
UMAG_01903	-0.06	0.59	-0.97	-1.42	0.53	-1.50	1.86	o + - -
UMAG_01904	0.41	0.76	-0.60	-1.06	0.59	-1.22	2.19	o + - -
UMAG_01911	-0.31	0.19	-1.50	-0.79	-0.47	-1.87	1.85	- + - -
UMAG_01933	1.91	1.15	0.01	-1.19	0.10	-0.45	2.63	- - - -
UMAG_01945	2.35	1.75	0.68	-1.33	0.90	-0.14	2.57	- - + +
UMAG_01952	4.88	2.60	2.33	-1.56	0.99	1.78	3.26	o + - -

Gennummer	WT D-BL	WT D-RL	WT D-DRL	D WT- $\Delta wco1$	$\Delta wco1$ D-DRL	D WT- $\Delta phy1$	$\Delta phy1$ D-BL	biotrophe Entw.
UMAG_01976	-0.25	-0.25	-1.20	-0.72	0.67	-0.93	0.40	o + - -
UMAG_01984	2.42	0.96	3.85	1.82	2.28	3.00	-1.45	- + - -
UMAG_01994	0.92	0.41	-0.07	-0.55	0.82	-0.44	1.28	+ + - +
UMAG_02008	-0.68	-0.06	0.48	1.32	-0.84	0.92	-2.58	o + - -
UMAG_02037	3.38	2.16	1.45	-0.54	1.28	1.15	2.67	+ + - -
UMAG_02039	1.06	0.40	0.01	-0.25	0.03	-0.24	1.50	+ + - +
UMAG_02070	3.18	0.57	-0.06	-0.40	0.35	-0.39	3.52	+ + - +
UMAG_02080	3.61	2.24	1.67	-0.25	0.09	0.89	3.13	- o + +
UMAG_02108	2.12	-0.04	0.70	0.70	-0.08	0.65	1.58	- - + +
UMAG_02114	0.25	0.38	0.20	-0.48	1.86	0.14	-0.45	- - + +
UMAG_02124	-0.86	-0.20	-1.01	-0.98	-0.55	-0.99	-0.44	- - + +
UMAG_02142	-0.01	0.05	-0.13	-0.15	2.27	-0.30	0.00	- - + +
UMAG_02144	3.16	0.21	0.00	0.04	0.24	0.18	2.74	o + o o
UMAG_02161	3.71	2.32	1.57	-0.97	0.74	1.01	2.54	o + - -
UMAG_02172	1.05	0.36	-0.54	-0.82	-0.86	-0.74	1.90	- + + +
UMAG_02181	1.04	0.30	0.10	-0.27	0.67	-0.08	1.07	+ - - o
UMAG_02191	-0.23	-0.36	-1.74	-2.86	2.82	-2.51	2.49	- + - +
UMAG_02201	-0.27	0.27	0.32	0.13	1.31	0.28	-0.55	o + - -
UMAG_02203	3.84	2.76	1.82	-2.48	1.96	1.08	3.12	- + - +
UMAG_02208	2.13	0.47	1.07	1.03	0.66	0.88	1.21	+ + - -
UMAG_02212	3.16	1.52	1.13	-0.64	1.15	0.73	2.69	- - + +
UMAG_02215	-0.59	0.30	-1.38	-2.64	-2.06	-2.00	3.67	- o + +
UMAG_02217	1.27	0.59	0.25	0.08	0.35	-0.03	1.49	- - + +
UMAG_02264	1.21	0.13	0.68	0.25	0.07	0.56	0.68	- + - -
UMAG_02267	-0.07	-0.57	2.07	2.31	-0.18	2.12	-1.39	- + - -
UMAG_02272	1.01	0.49	-0.03	-0.21	0.21	-0.42	1.22	+ - - o
UMAG_02300	2.91	1.93	1.18	-1.15	0.86	0.49	2.26	+ - - o
UMAG_02336	2.23	1.15	0.37	0.28	0.00	0.16	2.16	o + - -
UMAG_02347	2.17	0.93	0.43	-0.27	0.64	-0.03	1.82	+ + - -
UMAG_02361	1.16	0.60	-0.48	-0.86	0.13	-0.76	1.73	+ + - +
UMAG_02376	-0.02	-0.28	1.46	1.52	-0.20	1.44	-0.87	- - + +
UMAG_02377	-0.21	-0.24	3.59	3.66	-1.42	3.64	-2.83	+ - + -
UMAG_02382	-2.35	-0.54	-1.01	-3.54	-1.72	-1.45	1.18	- o + +
UMAG_02392	1.03	0.00	-0.33	0.05	0.35	-0.33	0.97	+ + - +
UMAG_02396	1.95	1.19	0.25	-0.01	0.03	-0.19	2.25	- - + +
UMAG_02411	0.48	-0.05	1.35	1.16	0.91	1.36	0.14	- + - -
UMAG_02412	0.47	-0.34	1.48	0.96	0.05	1.13	-0.59	+ + - -
UMAG_02416	4.48	2.68	1.73	-2.13	0.05	0.88	3.83	o + - -
UMAG_02463	1.45	0.65	0.88	0.86	0.02	0.94	0.47	+ + - -
UMAG_02469	0.16	-0.30	1.36	1.04	0.15	1.11	-0.34	+ - + -
UMAG_02508	1.82	0.43	2.45	1.23	2.09	1.64	-0.43	o + - -
UMAG_02521	3.55	2.04	1.20	-0.20	0.73	0.57	3.27	- o + +
UMAG_02527	1.43	0.44	0.02	0.12	0.55	-0.22	1.64	o + - -
UMAG_02575	2.05	1.08	0.03	-0.50	0.43	-0.64	2.95	o + - -
UMAG_02592	1.07	0.71	-0.11	-0.23	0.24	-0.34	1.42	+ + - -
UMAG_02625	-1.88	0.44	-2.65	-2.68	-2.64	-3.05	3.76	- o + +
UMAG_02629	8.41	-0.44	-1.03	-0.78	-0.68	-0.33	8.66	- + - -
UMAG_02642	0.74	0.62	-0.18	-0.48	0.84	-0.69	1.86	- + + +
UMAG_02667	-0.59	-0.10	-0.06	-0.20	1.61	-0.26	-0.42	o + o o
UMAG_02697	0.11	-0.27	1.28	1.07	0.27	1.12	-0.35	+ - + -
UMAG_02707	2.82	1.54	0.70	0.41	-0.33	0.88	2.05	o + - -
UMAG_02708	-0.10	-0.08	2.82	3.61	-1.89	3.03	-2.53	+ - + -
UMAG_02719	1.11	0.31	0.79	1.00	-0.28	0.86	0.30	+ - + -
UMAG_02721	2.22	0.08	-0.39	-0.89	0.27	-0.57	2.57	+ + - +
UMAG_02723	6.88	0.45	-0.19	-0.54	0.22	-0.91	7.99	kein DEG
UMAG_02768	-0.37	-0.07	0.06	-0.45	-0.31	0.13	-1.26	+ - + -
UMAG_02769	2.64	0.89	1.10	-0.52	1.62	0.60	2.25	o + - -
UMAG_02778	-0.02	-0.21	1.26	1.07	-0.02	1.08	-0.63	- + + +
UMAG_02792	0.37	-0.28	1.24	1.61	0.36	1.04	-0.15	+ - o +
UMAG_02801	-0.51	-0.24	-0.61	-1.15	0.66	-0.99	0.33	o + - -
UMAG_02803	-0.73	-0.51	1.42	2.70	3.55	0.38	-1.63	+ + - -
UMAG_02804	-0.20	-0.28	1.57	2.41	3.94	0.40	-1.08	+ + - +
UMAG_02844	1.13	0.57	-0.03	-0.19	-0.13	-0.02	1.30	+ + - +
UMAG_02876	2.31	0.33	-0.29	-0.26	-0.17	-0.31	2.51	- - + +
UMAG_02881	-0.05	-0.24	1.72	1.42	-0.09	1.37	-0.74	+ - + -
UMAG_02888	3.69	1.81	1.01	-0.80	-0.31	-0.10	5.22	- - + +
UMAG_02899	-0.14	-0.03	4.02	4.19	-0.76	4.15	-3.14	+ + - -
UMAG_02900	0.91	0.29	2.07	2.59	-1.53	2.09	-1.46	+ + - -
UMAG_02919	1.06	-0.08	0.17	0.32	0.24	0.24	1.01	+ + - +
UMAG_02922	-0.17	0.14	1.97	2.19	-1.12	2.10	-1.36	- - + -
UMAG_02978	0.74	0.52	-0.08	-0.12	0.54	-0.31	1.10	o + - -

Gennummer	WT D-BL	WT D-RL	WT D-DRL	D WT- $\Delta wco1$	$\Delta wco1$ D-DRL	D WT- $\Delta phy1$	$\Delta phy1$ D-BL	biotrophe Entw.
UMAG_02980	0.28	0.42	4.50	4.61	-1.80	4.86	-4.55	+ + - -
UMAG_02981	-0.80	-0.13	-0.07	-0.08	-0.26	-0.07	-1.09	+ - + -
UMAG_02984	-0.82	0.18	-1.65	-3.15	-2.15	-2.46	3.95	- o + +
UMAG_02985	-0.73	0.22	-1.09	-1.59	-0.79	-1.25	1.97	- o + +
UMAG_03002	1.12	0.40	0.07	0.51	-0.13	0.31	0.18	o + - -
UMAG_03006	2.22	1.10	0.25	-0.54	0.71	-0.48	2.90	- + - +
UMAG_03009	1.05	0.11	-0.50	-0.47	-0.54	-0.52	1.46	- - + +
UMAG_03016	4.03	2.36	1.62	-1.69	0.56	1.13	3.07	o + - -
UMAG_03049	1.56	1.01	6.05	3.24	6.98	4.79	-3.74	- + - -
UMAG_03063	-0.04	-0.06	2.73	3.02	-1.45	2.87	-2.51	- + - -
UMAG_03068	0.96	0.15	-0.23	-0.49	0.20	-0.37	1.16	- + - +
UMAG_03069	1.39	0.44	0.92	0.30	1.32	0.50	1.24	o + - -
UMAG_03073	1.67	0.49	-0.54	0.33	-0.28	-0.73	2.25	+ + - +
UMAG_03078	2.02	0.82	0.21	0.33	0.29	0.20	1.78	- + - -
UMAG_03083	2.17	1.39	0.60	-0.16	0.10	0.39	1.30	+ - + -
UMAG_03103	1.43	0.79	0.55	0.15	-0.10	0.31	1.35	- o + +
UMAG_03139	3.72	2.74	1.82	-1.54	1.16	1.51	2.30	- + - +
UMAG_03153	1.31	-0.15	0.40	0.44	-0.14	0.40	1.11	+ - o +
UMAG_03177	3.41	2.03	1.01	-2.44	0.20	0.22	3.73	- + - +
UMAG_03192	1.03	0.37	-0.28	-0.12	0.04	-0.29	1.29	+ - + -
UMAG_03233	0.85	0.41	-0.36	-0.63	0.27	-0.49	1.16	+ - - o
UMAG_03284	0.65	0.17	1.24	0.22	1.22	0.72	-0.83	- + - -
UMAG_03351	-0.43	-0.04	1.08	1.50	-0.75	1.30	-1.32	+ - + -
UMAG_03365	0.57	0.42	-0.32	-0.07	0.49	-0.35	1.18	+ + - +
UMAG_03372	3.61	2.53	1.51	-2.24	0.56	0.88	3.05	o + - -
UMAG_03398	2.51	2.05	3.50	2.56	0.26	3.24	-1.06	- + - -
UMAG_03402	2.02	1.61	1.49	2.01	-0.61	1.33	0.50	o + - -
UMAG_03436	2.50	0.66	1.14	0.83	0.24	1.14	0.73	o + - -
UMAG_03451	1.47	0.37	0.42	0.89	-0.30	0.27	0.20	+ + - +
UMAG_03456	4.18	-0.14	0.24	-0.17	0.48	0.03	4.31	- + - +
UMAG_03460	1.01	0.40	-0.20	-0.33	0.10	-0.45	1.31	- + - +
UMAG_03481	1.62	0.08	-0.18	0.30	-0.12	-0.13	1.61	- - + +
UMAG_03485	4.62	2.82	2.35	-1.17	1.53	1.78	2.65	- + - -
UMAG_03494	-0.55	-0.40	1.72	1.70	0.11	1.62	-1.01	+ - + -
UMAG_03506	3.79	2.18	1.22	-0.65	1.11	0.77	2.99	o + - -
UMAG_03508	1.96	1.05	0.39	0.19	0.01	0.39	1.51	+ + - +
UMAG_03517	1.02	0.33	-0.45	-0.27	-0.02	-0.56	1.63	- + - +
UMAG_03556	3.76	2.29	1.40	-2.33	0.79	0.52	3.25	o + - -
UMAG_03580	2.13	0.89	0.46	0.60	0.37	0.54	1.84	+ + - -
UMAG_03602	1.08	0.50	-0.25	0.20	-0.17	-0.34	1.31	- + - +
UMAG_03608	-0.41	-0.37	1.32	1.03	-0.20	1.04	-0.56	o + + -
UMAG_03619	5.31	3.02	3.22	-2.51	2.56	2.73	2.22	- + - -
UMAG_03654	-0.63	-0.57	1.69	1.56	0.01	1.60	-1.09	- - + -
UMAG_03669	1.52	0.58	0.79	0.36	0.77	0.56	1.21	o + - -
UMAG_03678	3.17	1.37	2.22	0.99	1.43	1.67	2.25	o + - -
UMAG_03704	1.50	0.81	-0.30	-1.09	0.05	-0.57	1.73	- + - +
UMAG_03737	1.93	0.81	0.26	0.23	0.52	0.04	1.90	- + - -
UMAG_03776	0.36	-0.50	1.76	1.64	0.70	1.29	-0.07	+ + - -
UMAG_03779	2.52	0.34	-0.49	-1.32	0.67	-0.73	2.84	- - + +
UMAG_03788	0.81	0.45	-0.11	-0.36	-0.14	-0.39	1.25	+ - + -
UMAG_03816	1.78	0.69	0.76	0.45	0.56	0.53	1.50	o + - -
UMAG_03822	1.39	0.27	1.10	0.23	1.25	0.93	0.09	o + - -
UMAG_03824	1.25	-0.39	0.85	0.90	0.24	0.89	0.45	+ - o +
UMAG_03845	0.44	0.22	2.42	2.93	-1.45	2.65	-2.16	+ - - o
UMAG_03850	0.44	-0.01	4.31	4.54	-1.20	4.58	-3.63	o + o o
UMAG_03933	0.69	-0.29	1.59	0.75	0.28	1.25	-0.24	+ - - o
UMAG_03949	1.44	0.47	0.30	0.01	0.38	0.29	0.95	+ + - -
UMAG_03994	4.18	2.19	1.46	-0.80	0.88	0.78	3.50	o + - -
UMAG_03995	-0.73	0.44	-1.08	-1.55	-1.10	-1.32	2.42	- o + +
UMAG_04000	2.61	1.13	2.05	1.72	0.14	2.03	0.82	o + - -
UMAG_04005	3.41	1.21	0.33	-0.04	0.22	-0.07	3.43	- + - +
UMAG_04015	1.08	0.40	-0.15	0.13	-0.22	-0.17	1.34	- - + +
UMAG_04053	-0.11	-0.06	1.27	1.52	-0.67	1.50	-1.46	- - + -
UMAG_04057	0.83	0.49	-0.29	-0.65	0.18	-0.50	1.24	o + - -
UMAG_04060	-0.54	0.71	1.88	2.18	-1.27	1.90	-2.89	- + - -
UMAG_04066	1.35	0.45	-0.47	-0.26	0.29	-0.27	1.16	- + - +
UMAG_04074	1.24	0.45	-0.15	0.14	0.29	-0.17	1.38	+ + - +
UMAG_04080	-0.06	-0.43	3.10	2.84	0.25	2.71	-1.02	- o + +
UMAG_04126	2.32	1.14	0.83	-0.11	0.94	0.78	1.97	- - + +
UMAG_04161	1.57	0.17	-0.08	-0.04	0.48	-0.13	1.57	+ + - +
UMAG_04163	1.13	0.36	-0.14	0.34	0.02	-0.16	1.38	+ + - -

Gennummer	WT D-BL	WT D-RL	WT D-DRL	D WT- $\Delta wco1$	$\Delta wco1$ D-DRL	D WT- $\Delta phy1$	$\Delta phy1$ D-BL	biotrophe Entw.
UMAG_04164	1.80	0.12	0.62	0.28	0.45	0.34	1.73	- + - +
UMAG_04181	3.16	0.99	0.36	0.57	0.74	0.54	2.20	- + - -
UMAG_04193	-0.37	0.10	1.91	2.42	-1.32	2.09	-2.43	- + - -
UMAG_04194	-0.49	0.12	1.15	1.47	-0.72	1.19	-1.37	- - + -
UMAG_04241	1.99	1.24	0.61	-0.30	-0.68	0.31	1.55	- o + +
UMAG_04248	0.04	-0.79	1.81	1.11	1.68	1.41	-2.81	- + - -
UMAG_04253	-0.55	-0.45	1.30	1.39	-0.60	1.24	-1.36	o + + -
UMAG_04282	0.08	-0.20	1.80	0.54	3.01	1.52	-1.84	- + - -
UMAG_04324	1.22	0.02	0.42	0.36	0.35	0.25	0.68	o + - -
UMAG_04329	1.03	0.44	-0.21	-0.73	-0.13	-0.51	1.38	o + - -
UMAG_04347	-0.08	-0.27	2.40	2.90	-1.04	2.56	-3.27	o + - -
UMAG_04352	-0.61	-0.02	-0.03	-0.16	-0.46	0.06	-1.24	- o + +
UMAG_04370	-0.61	0.37	-1.37	-2.20	-0.89	-1.80	3.29	- o + +
UMAG_04390	0.50	-0.14	1.11	0.92	-0.02	0.78	-0.25	+ + - -
UMAG_04399	1.15	0.58	0.50	0.10	0.92	0.12	0.42	o + - -
UMAG_04400	1.34	0.39	1.30	1.14	0.66	1.03	0.44	o + - -
UMAG_04410	-0.06	-0.26	-2.58	-2.67	1.88	-1.56	1.96	+ + - -
UMAG_04444	3.26	1.96	1.26	0.97	0.58	0.94	2.04	+ + - +
UMAG_04480	2.57	0.64	1.19	-0.52	0.58	0.42	2.70	o + - -
UMAG_04500	2.24	-0.03	-0.69	0.25	-0.01	-0.94	2.56	o + - -
UMAG_04523	-0.12	-0.29	0.27	0.27	-0.43	0.53	-1.27	- + - -
UMAG_04528	3.49	1.46	1.07	-2.79	0.26	0.29	3.61	o + - -
UMAG_04561	1.73	1.12	0.34	-0.27	0.04	0.19	1.76	o + - -
UMAG_04575	4.69	2.89	1.74	-3.35	0.94	0.56	3.88	o + - -
UMAG_04659	0.93	0.19	0.31	-0.23	0.57	-0.01	1.17	+ + - -
UMAG_04667	0.63	0.78	1.49	0.98	-0.63	1.61	-1.58	+ + - -
UMAG_04712	3.59	0.48	-0.12	-0.69	0.35	-0.31	3.87	+ - o +
UMAG_04724	2.29	0.47	-0.04	0.05	0.10	-0.03	2.04	+ + - +
UMAG_04733	0.63	0.33	-0.50	-0.39	-0.06	-0.59	1.08	- + - +
UMAG_04739	1.05	0.39	-0.16	-0.11	0.14	-0.16	0.81	+ + - +
UMAG_04742	3.26	0.92	0.86	0.37	0.17	0.45	2.31	o + - -
UMAG_04749	2.40	0.25	0.43	0.51	0.45	0.32	2.08	- - + +
UMAG_04782	-0.23	-0.42	1.15	1.03	0.21	1.00	-0.29	+ - + -
UMAG_04796	2.42	1.27	0.85	0.39	0.65	0.73	1.89	o o - +
UMAG_04800	1.56	0.52	-0.02	0.31	0.26	-0.13	1.98	o + - -
UMAG_04813	2.64	0.96	2.41	2.62	-0.81	2.48	0.32	+ - - o
UMAG_04847	3.22	1.70	0.94	-0.64	0.90	0.56	2.78	o + - -
UMAG_04897	1.79	0.97	0.56	-0.05	0.05	0.24	1.63	+ + - +
UMAG_04898	0.45	0.05	1.12	1.25	-0.67	1.28	-1.10	+ - + -
UMAG_04910	-1.75	0.16	-1.16	0.43	-1.74	-1.09	-0.84	- + - +
UMAG_04922	3.67	2.06	1.43	-1.01	1.13	1.01	2.45	+ - + -
UMAG_04926	1.50	0.41	0.11	-0.13	0.47	-0.23	1.58	o + - -
UMAG_04967	1.10	0.24	0.91	0.52	0.50	0.50	0.90	+ - + -
UMAG_04972	0.40	0.40	1.40	2.04	-1.19	1.62	-1.24	+ + - +
UMAG_04974	1.13	1.12	0.11	-0.26	-0.58	-0.30	1.98	- + - +
UMAG_04987	1.28	1.06	0.36	-0.16	1.04	-0.05	1.56	- o + +
UMAG_05023	0.07	-0.10	0.63	0.66	-0.44	0.96	-1.60	+ + - -
UMAG_05036	0.25	-0.08	-0.44	-0.28	0.64	-0.38	1.39	o + - -
UMAG_05038	0.05	-0.20	1.90	0.92	5.95	1.09	-1.40	- o + +
UMAG_05059	0.00	-0.20	1.62	1.63	-0.16	1.53	-0.77	+ + - -
UMAG_05103	0.41	0.10	1.46	1.48	-0.10	1.46	-0.64	+ - + -
UMAG_05122	0.18	-0.03	5.93	6.17	-0.74	6.10	-6.11	- - + +
UMAG_05137	0.34	-0.76	1.69	1.35	0.22	1.42	-0.65	+ - + -
UMAG_05170	3.62	2.01	2.02	-1.09	4.58	0.31	3.29	- + - +
UMAG_05202	2.35	1.38	0.21	-0.60	0.27	-0.01	2.23	o + - -
UMAG_05222	4.17	2.41	1.60	-1.33	0.22	1.01	3.12	o + - -
UMAG_05226	2.83	1.96	1.04	-0.58	-0.06	0.24	2.92	- + - +
UMAG_05278	-0.59	-0.06	0.22	0.56	-0.73	0.48	-1.15	+ - - o
UMAG_05291	1.68	0.84	0.24	0.27	-0.05	0.03	1.64	+ + - -
UMAG_05325	4.40	2.33	4.64	2.46	1.53	4.40	1.50	o + - -
UMAG_05328	7.55	0.77	1.36	0.82	-0.89	1.33	6.00	- - + +
UMAG_05390	-0.17	0.05	0.54	0.25	-0.10	0.53	-1.48	- + - +
UMAG_05393	-0.67	-0.05	0.92	1.00	-0.21	0.99	-2.15	o + - -
UMAG_05411	-0.68	-0.37	0.86	1.19	-0.09	1.10	-1.90	o + - -
UMAG_05422	-0.18	-0.47	0.66	0.28	1.30	0.71	-1.08	- + - +
UMAG_05434	0.53	0.34	-0.24	-0.20	-0.32	-0.42	1.03	+ + - -
UMAG_05446	0.89	-0.05	0.45	0.36	0.34	0.22	1.07	- - + -
UMAG_05473	-0.01	-0.45	1.22	1.10	0.12	1.15	-0.36	- - + -
UMAG_05521	0.71	0.28	1.27	1.49	-0.35	1.32	-0.43	o + - -
UMAG_05555	1.04	0.37	0.09	0.16	0.28	0.06	0.78	+ + - -
UMAG_05596	4.38	2.24	1.90	-3.31	2.22	1.03	3.32	o + - -

Gennummer	WT D-BL	WT D-RL	WT D-DRL	D WT- $\Delta wco1$	$\Delta wco1$ D-DRL	D WT- $\Delta phy1$	$\Delta phy1$ D-BL	biotrophe Entw.
UMAG_05610	2.37	0.22	0.69	0.35	0.44	0.42	2.45	-- ++
UMAG_05617	1.38	0.39	0.48	0.74	-0.43	0.38	-0.34	+ + - -
UMAG_05674	-1.29	-0.31	-0.04	-0.14	-0.35	0.09	-1.01	+ + - -
UMAG_05677	0.26	0.43	-0.49	-0.77	0.18	-0.93	1.22	+ + - +
UMAG_05679	0.84	0.61	-0.29	-0.22	0.28	-0.30	1.26	+ + - +
UMAG_05686	2.39	1.38	0.52	-0.12	0.37	-0.10	2.35	+ + - +
UMAG_05689	-0.20	-0.19	-1.86	-4.30	5.02	-3.43	2.32	o + - -
UMAG_05694	2.35	1.99	0.67	-0.69	0.87	0.09	2.67	kein DEG
UMAG_05708	1.02	0.24	2.16	1.99	0.13	1.51	0.08	o + - -
UMAG_05718	-0.38	-0.12	-0.52	-0.68	-0.16	-0.67	1.20	+ - + -
UMAG_05728	1.09	0.48	-0.23	-0.66	0.30	-0.50	1.42	+ + - +
UMAG_05733	1.21	0.50	-0.05	-0.18	-0.04	-0.05	1.36	- - + +
UMAG_05740	-0.56	-0.26	1.19	1.44	-0.54	1.32	-1.48	+ - + -
UMAG_05741	-0.81	-0.11	0.07	0.11	-0.57	0.40	-1.34	- o + +
UMAG_05783	-1.01	0.08	-0.14	-0.17	-0.30	-0.25	-0.61	+ + - -
UMAG_05785	-1.08	-0.04	-0.75	-0.74	-0.32	-0.45	-0.42	+ + - -
UMAG_05786	-1.02	0.08	-0.40	-0.52	-0.76	-0.26	-0.58	+ + - -
UMAG_05806	-0.52	-0.24	1.23	1.57	-0.67	1.33	-1.42	+ - + -
UMAG_05831	-0.07	-0.07	1.12	1.75	0.20	0.99	-0.07	+ - + -
UMAG_05844	0.97	0.58	-0.06	-0.24	0.00	-0.29	1.32	o + o o
UMAG_05889	-0.54	-0.39	0.13	0.78	-0.13	0.06	-2.64	- o + +
UMAG_05894	3.26	1.68	0.41	-1.10	0.58	0.37	2.77	- + + +
UMAG_05906	0.62	-0.30	1.29	0.85	0.37	1.01	0.20	- - + -
UMAG_05917	6.29	0.63	1.47	0.99	0.03	1.16	5.36	o + - -
UMAG_05944	0.04	0.31	1.00	1.39	-0.98	1.27	-1.11	+ - + -
UMAG_05949	0.26	-0.30	1.17	0.62	0.42	0.84	0.00	- - + -
UMAG_05952	2.37	0.87	1.04	0.40	-0.28	0.99	0.85	- + - -
UMAG_05953	0.55	0.40	0.83	0.85	-0.61	1.12	-1.41	o + - -
UMAG_05961	3.96	0.40	0.49	0.77	-0.08	0.27	3.31	- o + +
UMAG_05967	0.52	-0.30	1.78	1.54	7.92	1.74	-1.03	- + + +
UMAG_05972	0.43	0.19	1.00	1.03	-0.57	1.30	-1.88	+ - - o
UMAG_05984	1.83	0.59	1.06	0.58	1.02	0.68	1.84	o + - -
UMAG_05988	0.52	0.14	2.13	2.43	-0.30	2.29	-2.12	- + + +
UMAG_05989	1.04	0.44	0.58	0.48	0.13	0.54	0.48	+ + - +
UMAG_05995	2.48	0.86	0.37	-0.03	0.67	0.33	2.63	- o + +
UMAG_06010	-0.37	-0.18	2.21	2.28	-0.92	2.28	-2.04	- - + -
UMAG_06012	-0.98	-0.51	2.61	3.71	-0.50	2.80	-6.43	- + - +
UMAG_06033	2.05	1.13	0.07	-0.28	0.75	-0.59	2.76	+ + + +
UMAG_06042	-0.32	0.06	-0.06	-0.09	-0.79	-0.35	1.21	- o + +
UMAG_06059	1.58	0.85	0.27	0.46	-0.09	0.12	1.64	o + - -
UMAG_06063	3.85	1.79	1.62	-1.36	3.19	0.90	2.72	- + + +
UMAG_06064	1.60	0.43	1.20	0.71	0.57	0.97	0.37	o + - -
UMAG_06079	5.51	0.59	0.58	0.49	0.00	0.34	5.37	- - + +
UMAG_06080	0.05	-0.47	1.62	1.27	0.16	1.52	-0.51	+ - + -
UMAG_06090	-0.43	-0.27	1.27	1.21	0.03	1.06	-0.85	o + + -
UMAG_06092	2.05	0.83	0.15	0.27	0.37	0.17	1.81	- o + +
UMAG_06140	1.70	0.60	0.73	0.02	0.39	0.35	1.28	+ + - +
UMAG_06157	1.03	0.06	-0.48	0.41	-0.09	-0.59	1.17	+ + + +
UMAG_06193	-0.81	-0.36	1.57	2.21	-0.50	1.26	-1.53	+ - + -
UMAG_06194	1.29	0.34	0.68	1.34	0.02	0.35	1.26	+ - - o
UMAG_06259	-0.23	0.45	-0.09	1.58	0.64	-0.33	0.67	+ - + -
UMAG_06287	1.61	0.35	-0.29	-0.57	0.01	-0.26	1.68	o + - -
UMAG_06298	-0.46	-0.27	1.71	1.72	-1.26	1.62	-1.96	- - + +
UMAG_06323	-0.29	-0.55	1.34	1.19	0.00	1.20	-0.91	+ - + -
UMAG_06336	0.46	0.39	0.57	-1.59	2.86	0.31	0.65	- + - -
UMAG_06359	5.01	1.89	1.55	-0.61	-0.20	0.76	4.60	- + + +
UMAG_06374	1.05	0.57	-0.27	-0.52	0.41	-0.70	2.07	o + - -
UMAG_06391	0.04	-0.20	0.72	-0.19	2.92	0.85	-1.39	- + - -
UMAG_06405	1.11	0.77	0.31	0.21	0.02	0.15	0.95	- o + +
UMAG_06406	2.99	1.68	2.13	1.40	-0.31	1.84	0.93	+ + - +
UMAG_06422	1.02	0.13	0.16	0.23	0.44	-0.03	0.69	- + + +
UMAG_06429	0.98	0.12	-0.43	-0.36	0.30	-0.42	1.12	+ + - +
UMAG_06430	1.47	1.13	0.49	1.33	1.08	0.28	2.06	o + - -
UMAG_06450	0.53	0.04	1.30	0.98	-0.06	1.00	-0.51	+ + - -
UMAG_06490	-0.97	-0.27	-0.90	-1.07	-1.18	-0.79	0.28	+ - + -
UMAG_06497	-0.20	0.15	0.11	-3.04	-0.38	0.12	0.17	- + - -
UMAG_10002	2.07	0.52	0.45	-0.42	1.09	-0.13	2.83	+ + - -
UMAG_10003	2.72	1.61	0.76	-0.58	0.29	0.11	2.66	+ + - +
UMAG_10012	1.00	-0.40	-1.59	-1.82	-0.44	-1.45	1.39	o + - -
UMAG_10013	1.33	-0.13	0.14	-0.11	0.23	0.04	1.37	- - + +
UMAG_10023	-0.70	-0.23	-1.86	-2.37	1.38	-1.86	1.24	+ + - -

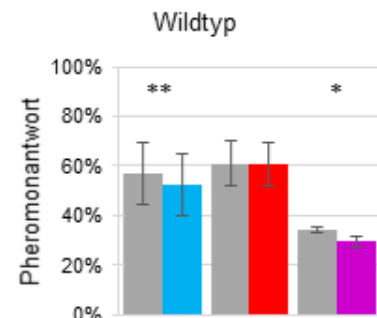
Gennummer	WT D-BL	WT D-RL	WT D-DRL	D WT- $\Delta wco1$	$\Delta wco1$ D-DRL	D WT- $\Delta phy1$	$\Delta phy1$ D-BL	biotrophe Entw.
UMAG_10029	2.44	0.78	0.04	-0.11	0.48	-0.21	2.66	+ + - +
UMAG_10031	3.08	1.83	0.86	-1.46	1.32	0.19	2.27	o + - -
UMAG_10055	2.34	0.75	0.05	-1.44	-0.84	-0.33	4.31	- o + +
UMAG_10056	2.66	1.24	1.11	0.15	0.27	1.07	1.98	o + - -
UMAG_10062	3.22	2.17	0.90	-1.07	0.58	0.19	3.30	o + - -
UMAG_10080	1.05	0.42	0.10	-0.76	0.31	-0.18	1.96	+ + - +
UMAG_10085	1.23	0.16	0.06	-0.10	0.23	-0.08	1.42	+ + - -
UMAG_10144	1.27	0.37	-0.05	-0.46	-0.36	-0.30	1.35	+ + - +
UMAG_10148	0.33	-0.61	2.19	1.67	0.14	1.68	-0.58	kein DEG
UMAG_10162	0.37	-0.39	2.23	2.06	0.11	2.09	-1.05	+ - + -
UMAG_10175	2.11	0.73	1.18	0.63	0.47	0.89	1.57	- - + +
UMAG_10186	-1.05	-0.13	-0.51	-0.42	-0.76	-0.23	-1.24	+ + - -
UMAG_10188	0.28	0.06	-1.34	-4.06	0.73	-2.74	3.78	+ + - +
UMAG_10207	1.72	0.20	0.03	-0.02	-0.09	-0.02	1.49	- + - +
UMAG_10208	4.70	2.05	1.99	-1.74	-0.05	1.15	3.74	+ + - +
UMAG_10232	0.36	0.26	0.95	1.20	-0.93	1.15	-1.06	- - + +
UMAG_10260	0.77	0.34	-0.18	-0.01	-0.23	-0.24	1.32	- - + +
UMAG_10263	1.66	0.74	0.02	-0.09	0.63	-0.18	1.88	+ + - +
UMAG_10268	1.70	0.72	0.54	0.48	0.10	0.65	0.63	o + - -
UMAG_10326	-1.28	-0.58	-0.60	-0.56	-0.07	-0.43	-1.03	+ - - o
UMAG_10337	0.72	0.57	-0.64	-0.47	0.13	-0.67	1.35	- + - +
UMAG_10375	0.11	-0.12	1.60	1.47	-0.07	1.28	-0.69	+ + - -
UMAG_10392	3.03	1.71	0.75	-0.96	0.34	-0.16	3.49	- o + +
UMAG_10401	-1.12	-0.48	-0.40	-0.05	-0.58	-0.29	-0.73	- - + -
UMAG_10412	1.48	0.26	0.43	0.50	0.48	0.32	1.29	o + - -
UMAG_10414	-0.44	-0.40	0.19	-0.22	0.05	0.21	-1.14	- - + -
UMAG_10432	3.82	0.03	0.00	0.18	-0.49	0.18	3.47	+ - + -
UMAG_10440	2.99	0.22	2.02	2.06	-0.35	2.05	1.17	+ - + -
UMAG_10474	0.01	-0.89	3.27	1.70	2.61	2.88	-3.86	- + - -
UMAG_10481	0.85	0.41	-0.34	-0.54	-0.04	-0.51	1.27	+ + - +
UMAG_10483	1.46	0.67	0.41	-0.76	0.13	0.00	1.67	o + - -
UMAG_10484	1.02	0.28	1.18	1.59	-0.64	1.40	-0.34	- o + +
UMAG_10507	-0.09	-0.13	0.74	0.85	-0.44	1.08	-1.06	+ - + -
UMAG_10540	2.44	1.17	-0.07	-2.04	-0.11	-0.69	3.53	- + - -
UMAG_10590	1.85	0.27	-0.08	-0.16	-0.70	0.08	1.86	- o + +
UMAG_10595	1.70	0.26	-0.04	-0.35	0.45	-0.23	2.08	+ - o +
UMAG_10627	1.48	0.47	0.21	0.15	0.08	0.19	0.98	- + - +
UMAG_10657	5.65	1.55	0.77	-1.25	0.76	-0.11	5.76	- + - +
UMAG_10676	7.58	0.82	2.21	0.72	0.33	0.97	7.67	- + - -
UMAG_10682	0.88	0.44	2.40	2.85	-0.81	2.66	-2.06	o + - -
UMAG_10685	1.61	0.58	0.14	0.83	0.53	0.04	1.71	+ - + -
UMAG_10689	0.04	-0.07	3.10	3.43	-1.06	3.23	-2.32	- - + -
UMAG_10690	5.01	0.18	0.45	0.72	-0.77	0.57	3.94	kein DEG
UMAG_10692	4.36	1.48	0.60	-1.37	-0.01	-0.04	4.06	- - + +
UMAG_10695	0.12	-0.16	2.28	2.31	-0.60	2.43	-1.70	+ - + -
UMAG_10699	0.11	-0.32	1.10	0.65	0.49	0.92	-0.20	+ - + -
UMAG_10714	0.59	0.23	0.01	-0.32	1.49	-0.17	0.47	- + - +
UMAG_10731	-0.03	-0.02	0.74	0.57	-0.35	0.74	-1.04	+ - - o
UMAG_10760	0.92	0.51	0.14	-0.58	0.43	-0.39	1.44	+ + - +
UMAG_10769	0.90	0.34	-0.18	-1.09	0.39	-0.62	1.41	+ + - +
UMAG_10780	2.18	-0.03	-0.15	-0.37	-0.12	-0.19	2.18	- + - +
UMAG_10783	0.97	0.47	-0.25	-0.50	-0.28	-0.47	1.59	+ + - +
UMAG_10789	4.73	2.29	0.94	-0.12	0.42	1.25	3.73	- o + +
UMAG_10790	-0.30	-0.33	1.29	1.13	-0.16	1.02	-0.77	+ - + -
UMAG_10811	1.50	0.40	0.07	-0.10	-0.13	0.03	1.26	o + - -
UMAG_10815	-0.28	0.21	-0.09	0.42	-1.35	0.47	-1.51	+ - - o
UMAG_10865	6.59	0.74	-0.03	-0.22	-0.01	0.27	5.62	- - + +
UMAG_10868	2.64	0.24	-0.38	-0.25	-0.36	-0.19	2.79	- + - +
UMAG_10869	2.16	-0.42	-1.35	-1.40	1.20	-1.39	3.38	kein DEG
UMAG_10871	1.84	0.90	1.12	0.93	-0.72	0.96	1.14	- + - +
UMAG_10872	1.57	0.64	-0.12	-0.15	0.05	-0.36	2.08	+ - o +
UMAG_10880	1.30	0.44	-0.40	-0.27	0.04	-0.36	1.60	+ + - +
UMAG_10893	1.15	0.36	0.06	0.06	-0.04	-0.09	1.26	+ - o +
UMAG_10905	3.20	1.76	1.16	0.11	0.66	0.63	2.47	o + - -
UMAG_10938	2.94	1.62	0.57	-0.47	0.76	-0.19	3.14	- + - +
UMAG_11005	1.18	-0.29	1.47	1.59	-0.36	1.58	0.16	- - + -
UMAG_11017	-1.57	-0.12	0.09	-0.01	0.01	0.07	-1.62	- + - +
UMAG_11020	3.92	2.60	1.96	-2.45	0.05	1.52	2.12	- + - -
UMAG_11038	0.31	0.21	1.40	1.77	-1.11	1.65	-1.35	+ - + -
UMAG_11053	1.02	0.47	-0.32	-0.17	-0.11	-0.31	1.25	+ + - -
UMAG_11067	0.75	0.13	2.58	2.92	-0.14	2.62	-0.84	o + - -

Gennummer	WT D-BL	WT D-RL	WT D-DRL	D WT- $\Delta wco1$	$\Delta wco1$ D-DRL	D WT- $\Delta phy1$	$\Delta phy1$ D-BL	biotrophe Entw.
UMAG_11078	0.07	0.45	-0.17	-0.66	1.78	-0.21	0.45	--++
UMAG_11097	-0.13	0.12	0.57	0.87	-0.83	0.78	-1.05	+--+
UMAG_11098	-0.02	-0.29	1.88	1.84	-0.32	1.93	-1.97	+++
UMAG_11133	1.65	0.88	0.23	-0.10	0.09	-0.21	1.76	++--
UMAG_11162	0.24	-0.12	0.90	1.12	-0.37	1.09	-0.90	+--+
UMAG_11170	1.11	-0.12	2.48	2.38	-0.64	2.49	-1.05	+-+o
UMAG_11172	-0.28	0.14	0.87	1.26	-1.08	1.20	-1.93	---+
UMAG_11174	1.26	0.72	0.21	-0.19	0.15	-0.03	1.14	o+--
UMAG_11179	3.62	1.69	0.40	-0.61	0.83	0.65	3.21	-+++
UMAG_11203	1.86	1.08	0.27	-1.28	-0.17	-0.14	2.48	-+++
UMAG_11229	2.87	1.70	1.09	-3.87	0.71	0.31	2.89	o+--
UMAG_11238	2.97	1.97	1.04	-0.52	0.44	0.51	2.37	o+--
UMAG_11244	-1.05	-0.25	-2.41	-4.37	1.62	-2.99	2.04	-+--
UMAG_11248	1.23	0.37	0.26	0.71	-0.38	0.50	0.48	-+--+
UMAG_11249	7.62	0.55	0.59	-0.01	-0.42	0.20	6.92	o+--
UMAG_11255	-1.28	-0.84	-1.16	-0.99	-0.54	-0.98	-0.98	-o++
UMAG_11256	-0.20	0.16	1.62	0.26	0.35	1.58	-2.38	o+--
UMAG_11258	-0.19	-0.54	0.78	0.54	-0.09	0.75	-1.15	+--+
UMAG_11271	1.02	0.06	0.07	0.13	0.76	-0.13	1.33	--+
UMAG_11274	1.08	0.40	0.04	0.00	0.55	-0.01	0.93	o+--
UMAG_11288	-0.08	0.08	0.77	1.17	-1.17	1.00	-1.13	+--+
UMAG_11339	-0.61	-0.20	-1.74	-5.92	4.75	-2.41	2.31	+--+
UMAG_11349	2.12	1.14	0.40	-0.14	-0.17	0.42	1.43	o+--
UMAG_11363	0.55	0.21	-0.37	-0.24	0.12	-0.59	1.25	+--o
UMAG_11366	0.75	0.50	-0.65	-0.80	0.14	-0.79	1.67	o+--
UMAG_11368	0.29	0.04	3.27	4.02	-1.88	3.40	-3.04	o+--
UMAG_11373	1.26	0.54	0.45	-0.36	0.86	0.17	0.88	o+--
UMAG_11378	1.35	1.00	0.20	-0.20	0.41	-0.15	1.31	o+--
UMAG_11400	0.33	1.01	1.30	1.37	-0.56	1.04	-0.70	-o++
UMAG_11403	5.25	2.88	2.68	-3.08	1.23	1.58	3.98	-+--
UMAG_11413	2.09	0.86	0.04	0.39	-0.42	0.00	1.69	-o++
UMAG_11421	0.26	0.35	0.72	0.72	0.09	0.87	-1.51	+--+
UMAG_11441	0.98	0.58	-0.17	-0.62	-0.54	-0.40	1.25	o+--
UMAG_11448	0.31	0.15	2.48	2.92	-1.07	2.73	-2.14	+--o
UMAG_11451	0.85	0.52	-0.05	-0.13	0.04	-0.32	1.11	+o+
UMAG_11454	0.11	0.25	1.81	2.20	-1.02	2.05	-1.68	o+o
UMAG_11494	1.27	0.29	0.30	0.36	0.41	0.05	1.40	+--o
UMAG_11505	6.15	0.43	0.48	-0.96	-0.05	-0.18	6.07	-+--+
UMAG_11528	-0.93	0.20	-2.03	-5.22	3.50	-3.32	3.01	kein DEG
UMAG_11534	0.14	-0.15	1.21	1.42	-0.60	1.49	-1.30	+--+
UMAG_11569	2.80	0.78	1.93	0.87	0.56	1.87	1.36	o+--
UMAG_11570	-1.15	-0.16	0.86	1.43	-1.06	0.97	-2.05	+--+
UMAG_11577	-0.23	-0.34	2.39	2.19	0.44	2.10	-0.79	+--+
UMAG_11585	-1.08	-0.06	-0.55	-0.63	-0.27	-0.41	-0.28	+--+
UMAG_11587	-0.58	-0.07	-0.07	0.18	-0.73	0.11	-1.10	+--+
UMAG_11590	0.02	-0.15	0.88	1.12	-0.45	1.06	-0.84	+--+
UMAG_11598	0.91	0.65	-0.06	-0.69	0.62	-0.57	1.73	+--+
UMAG_11693	2.03	1.02	0.49	-0.35	0.20	0.16	1.98	-+--+
UMAG_11741	0.74	0.71	0.04	-0.09	0.55	-0.15	1.23	+--+
UMAG_11743	-0.17	0.17	0.58	1.31	-1.15	0.80	-0.31	+--+
UMAG_11744	0.43	0.15	2.26	2.90	-1.45	2.59	-1.89	+--o
UMAG_11750	0.34	-0.25	1.57	1.55	0.11	1.22	-0.58	+--+
UMAG_11775	1.80	1.20	0.35	-1.13	0.08	0.18	1.89	-+--+
UMAG_11794	0.36	-0.02	1.17	1.05	0.05	1.01	-0.24	+--o
UMAG_11795	3.28	2.07	0.99	-0.10	0.52	0.54	2.56	-+--
UMAG_11807	-0.10	-0.49	1.04	0.67	-0.18	1.01	-0.82	+--+
UMAG_11815	-0.16	-0.11	-2.39	-5.13	4.06	-3.51	3.22	kein DEG
UMAG_11851	1.67	0.99	0.02	-0.18	0.00	-0.24	1.83	o+--
UMAG_11895	2.60	1.60	0.87	-1.20	0.01	0.07	2.72	-+--+
UMAG_11896	0.05	0.04	0.91	1.10	-0.83	1.05	-1.00	+--+
UMAG_11908	1.01	0.13	0.75	0.19	0.89	0.67	0.30	o+--
UMAG_11911	0.34	0.45	-0.51	-0.42	0.23	-0.61	1.49	+--+
UMAG_11918	-0.14	-0.18	1.30	1.07	0.61	1.05	-0.36	+--+
UMAG_11922	-0.34	-0.26	1.33	0.45	1.79	1.27	-2.30	-o++
UMAG_11923	-0.46	-0.22	1.31	1.46	-0.30	1.36	-1.12	--+
UMAG_11961	-0.51	0.01	-0.42	-1.41	0.08	-0.42	0.19	+--+
UMAG_11978	2.89	2.03	1.12	-1.03	0.38	0.45	2.73	o+--
UMAG_12017	1.68	0.94	0.23	-0.44	0.21	-0.14	1.60	o+--
UMAG_12039	0.10	-0.01	0.38	0.55	-0.62	0.62	-1.01	+--+
UMAG_12048	-0.18	-0.23	1.36	1.43	-0.45	1.08	-0.80	+--+
UMAG_12049	0.11	0.06	0.65	0.96	-0.70	0.77	-1.00	+--o

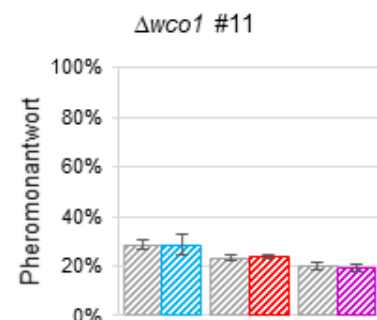
Gennummer	WT D-BL	WT D-RL	WT D-DRL	D WT- $\Delta wco1$	$\Delta wco1$ D-DRL	D WT- $\Delta phy1$	$\Delta phy1$ D-BL	biotrophe Entw.
UMAG_12055	0.40	0.32	-0.28	-0.50	0.27	-0.35	1.02	+ + - +
UMAG_12098	1.64	1.03	0.60	0.13	-0.36	0.61	0.93	o + - -
UMAG_12132	0.96	0.31	-0.16	-0.03	-0.42	-0.20	1.23	- - + +
UMAG_12143	1.12	0.53	-0.09	-0.33	-0.05	-0.42	1.44	- + - +
UMAG_12150	0.77	0.41	-0.21	-0.28	-0.09	-0.40	1.27	+ - - o
UMAG_12158	2.17	1.04	-0.09	-1.27	0.04	-0.65	2.32	+ + - +
UMAG_12169	-0.55	-0.35	0.75	1.26	-0.40	0.91	-1.28	+ + - +
UMAG_12173	2.59	1.22	-0.03	-0.20	0.07	-0.61	3.60	o + - -
UMAG_12178	-0.23	0.13	-0.39	-0.42	8.18	-0.36	0.31	- o + +
UMAG_12196	0.82	0.14	-0.12	-0.40	0.20	-0.38	1.06	o + - -
UMAG_12213	0.56	0.32	-0.29	-0.42	-0.14	-0.41	1.10	+ - - -
UMAG_12267	3.25	1.69	1.33	0.14	0.68	1.04	2.24	- + - +
UMAG_12297	1.68	0.13	0.32	0.19	0.18	0.23	1.33	- - + +
UMAG_12356	0.82	-0.22	0.12	0.51	1.24	0.45	1.27	- + - +
UMAG_15025	1.72	0.71	0.30	-0.01	0.22	0.21	1.52	- - + +
UMAG_15043	3.82	2.35	0.49	-2.21	-0.88	0.10	3.78	+ + - +
UMAG_15051	-0.14	-0.34	0.76	0.63	1.20	0.70	-1.67	- + - -
UMAG_15097	1.42	-0.14	0.55	0.04	0.82	0.17	1.20	- o + +

VII.2 Prozentualer Anteil an Zellen mit Konjugationshyphen

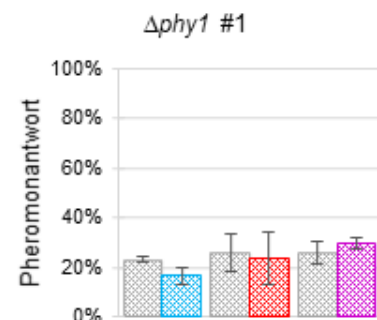
	D	BL	D	RL	D	DRL
WT	59%	52%	51%	51%	34%	27%
	67%	66%	64%	64%	36%	32%
	61%	52%	68%	68%	33%	29%
	62%	51%				
	75%	73%				
	39%	37%				
	42%	40%				
MW	57%	52%	61%	61%	34%	30%
STABW	12%	12%	9%	9%	1%	2%
N	5674	5274	2920	2659	1475	1603



	D	BL	D	RL	D	DRL
$\Delta wco1$ #11	28%	27%	25%	24%	22%	20%
	27%	26%	23%	24%	19%	17%
	31%	33%	22%	23%	19%	20%
MW	29%	29%	23%	24%	20%	19%
STABW	2%	4%	1%	1%	2%	2%
N	1083	1134	1682	1741	1341	1369



	D	BL	D	RL	D	DRL
$\Delta phy1$ #1	24%	21%	38%	41%	30%	29%
	21%	14%	20%	23%	25%	32%
	24%	15%	18%	13%	21%	27%
			24%	17%		
		28%	25%			
MW	23%	16%	26%	24%	26%	29%
STABW	1%	4%	8%	11%	5%	2%
N	1768	1736	2598	2282	1018	924



	WT	$\Delta wco1$ #11	$\Delta phy1$ #1
D	37%	28%	39%
	46%	40%	48%
	49%	31%	56%
MW	44%	33%	48%
STABW	6%	6%	8%
N	1353	1929	1400

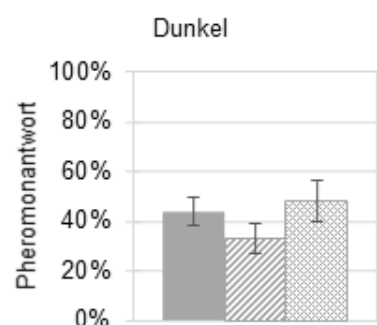


Abbildung S1: Einfluss von Licht auf den Anteil der Zellen mit Konjugationshyphen als Antwort auf externes Pheromon. FB1 Sporidien wurden mit synthetischem Pheromon von FB2 gemischt und für 5 h im Dunkeln oder unter 10 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ Blau- (450 nm), Rot- (658 nm) bzw. Dunkelrotlicht (741 nm) rotiert. Es wurde jeweils der Quotient der Zellen mit Konjugationshyphen zu der Gesamtzahl an Zellen ermittelt und von den experimentellen Replikaten Mittelwert und Standardabweichung berechnet. Die Farben der Balken entsprechen dem Lichtprogramm: Dunkel (grau), Blaulicht (blau), die Füllungen den Genotypen: Wildtyp (gefüllt), $\Delta wco1$ (gestreift), $\Delta phy1$ (kariert). MW: Mittelwert; STABW: Standardabweichung; N: Gesamtzahl der ausgewerteten Zellen; ** $p \leq 0,01$; * $p \leq 0,05$

VII.3 Koloniemorphologie verschiedener Photorezeptormutanten

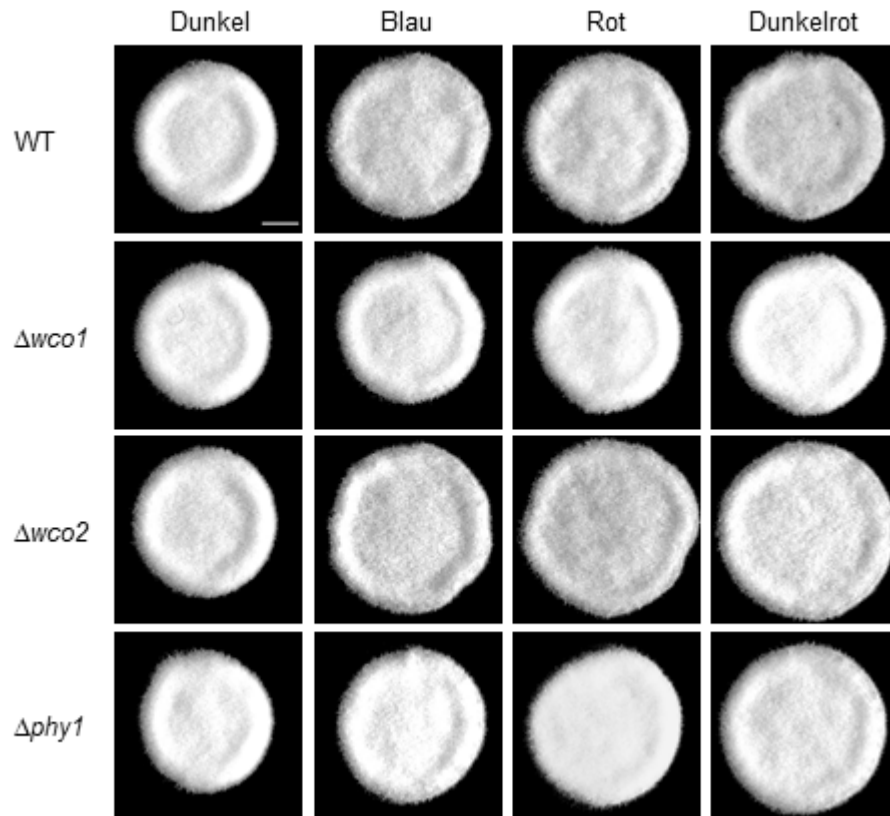


Abbildung S2: Der Einfluss von Licht, *wco1*, *wco2* und *phy1* auf das Filamentationsverhalten von *U. maydis*. Eine äquivalente Mischung aus FB1 und FB2 Wildtyp-Zellen wurden auf Aktivkohleplatten ausgetropft und für 24 Stunden im Dunkeln bzw. bei 10 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ Blau- (450 nm), Rot- (658 nm) oder Dunkelrotlicht (741 nm) inkubiert. Die Bilder wurden an einem Binokular aufgenommen, der Größenstandard beträgt jeweils 1 mm.

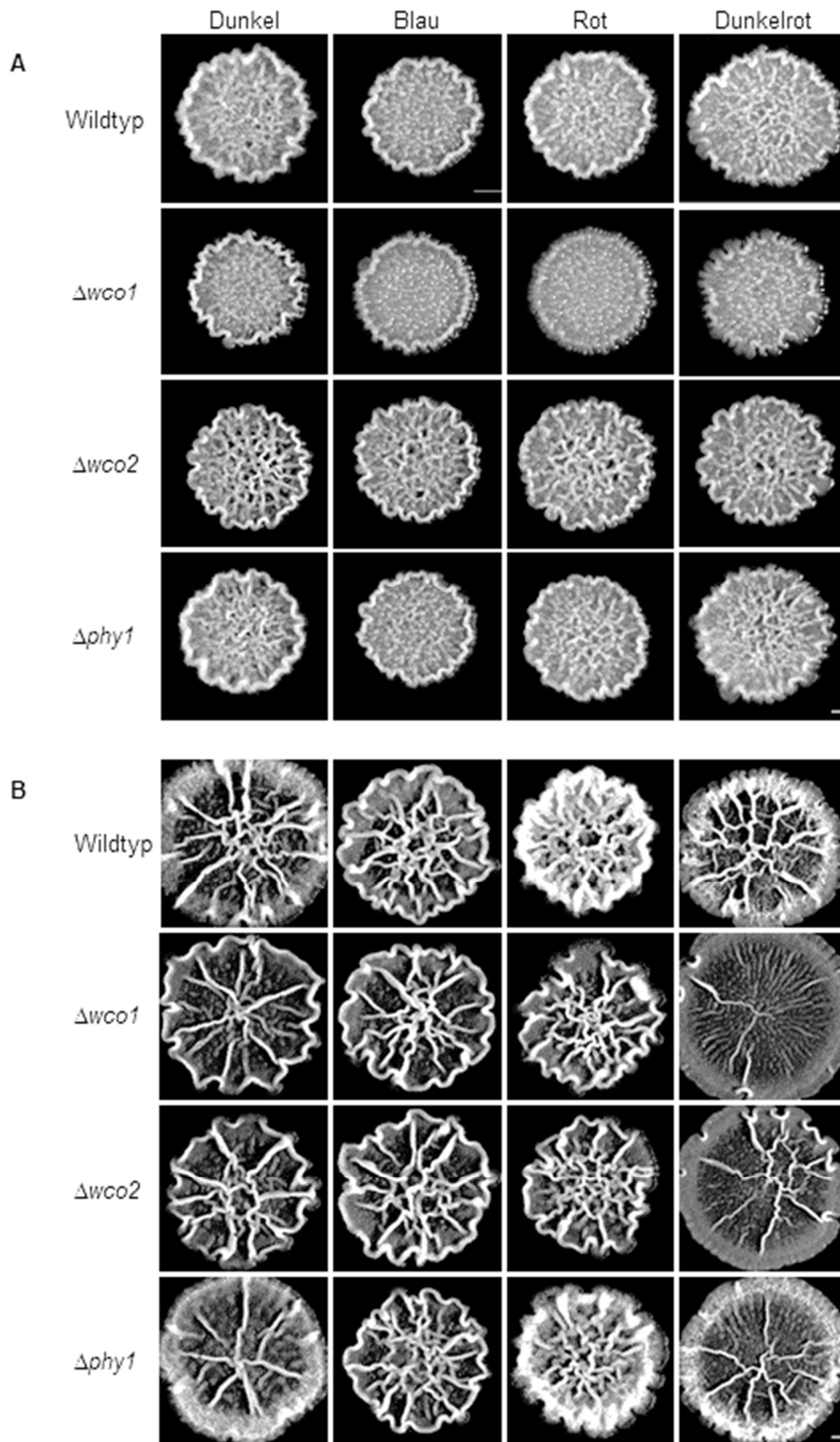


Abbildung S3: Einfluss von Licht und Photorezeptoren auf die Koloniemorphologie von FB1 und FB2. (A) FB1 bzw. (B) FB2 Zellen gleicher Anzahl wurden auf Aktivkohleplatten getropft und nach 48 Stunden Inkubation im Dunkeln oder 10 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ Blau- (450 nm), Rot- (658 nm) bzw. Dunkelrotlicht (741 nm) am Binokular fotografiert. Der Größenstandard beträgt 1 mm.

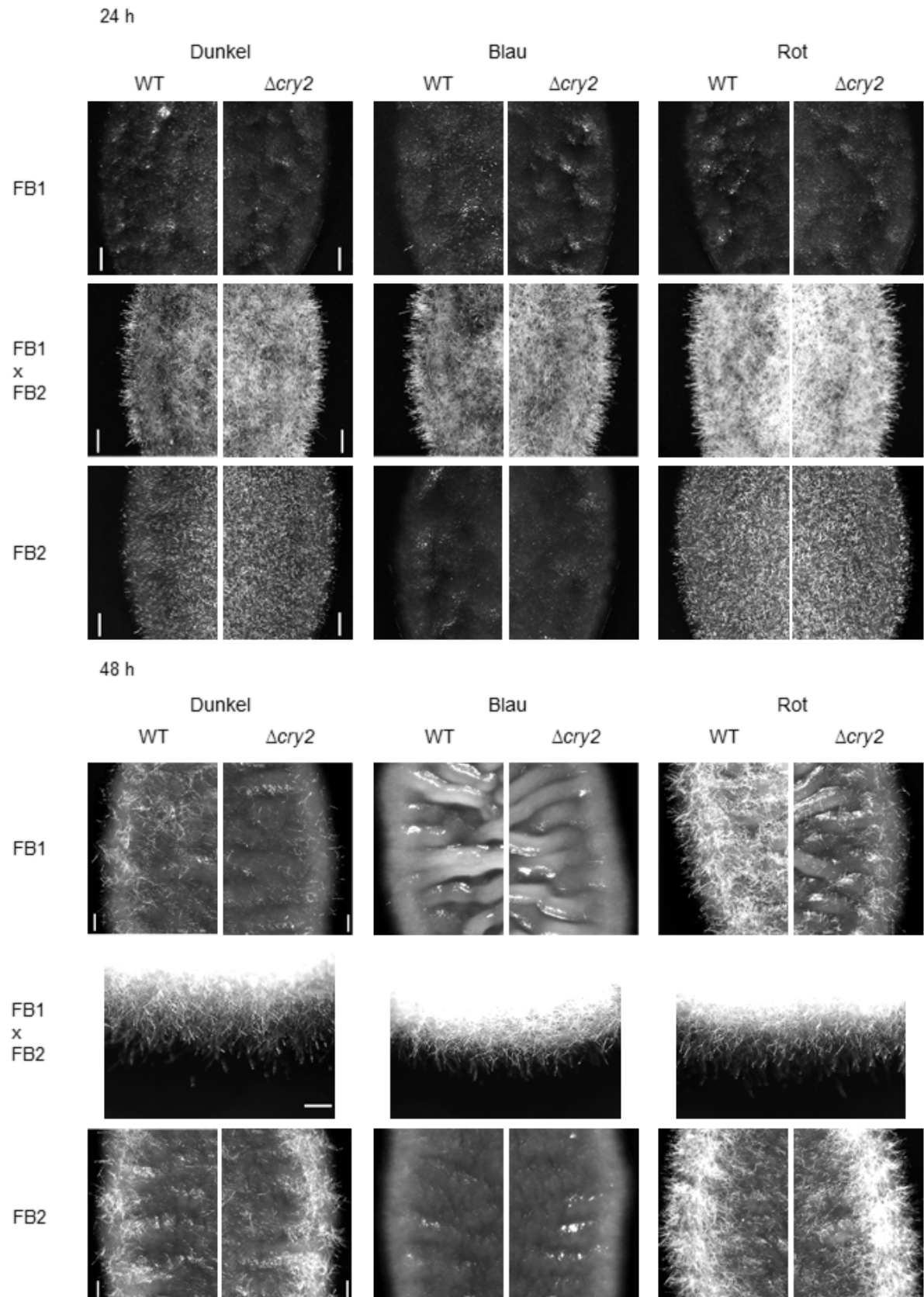


Abbildung S4: Einfluss von Licht und *cry1* auf die Koloniemorphologie von FB1 und FB2. (A) FB1 bzw. (B) FB2 Zellen gleicher Anzahl wurden auf Aktivkohleplatten getropft und nach 24 bzw. 48 Stunden Inkubation im Dunkeln oder 10 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ Blau- (450 nm), Rot- (658 nm) bzw. Dunkelrotlicht (741 nm) am Binokular fotografiert. Der Größenstandard beträgt jeweils 0,1 mm.

VII.4 Symptome bei Infektionen im Gewächshaus bzw. in LED-Kammern

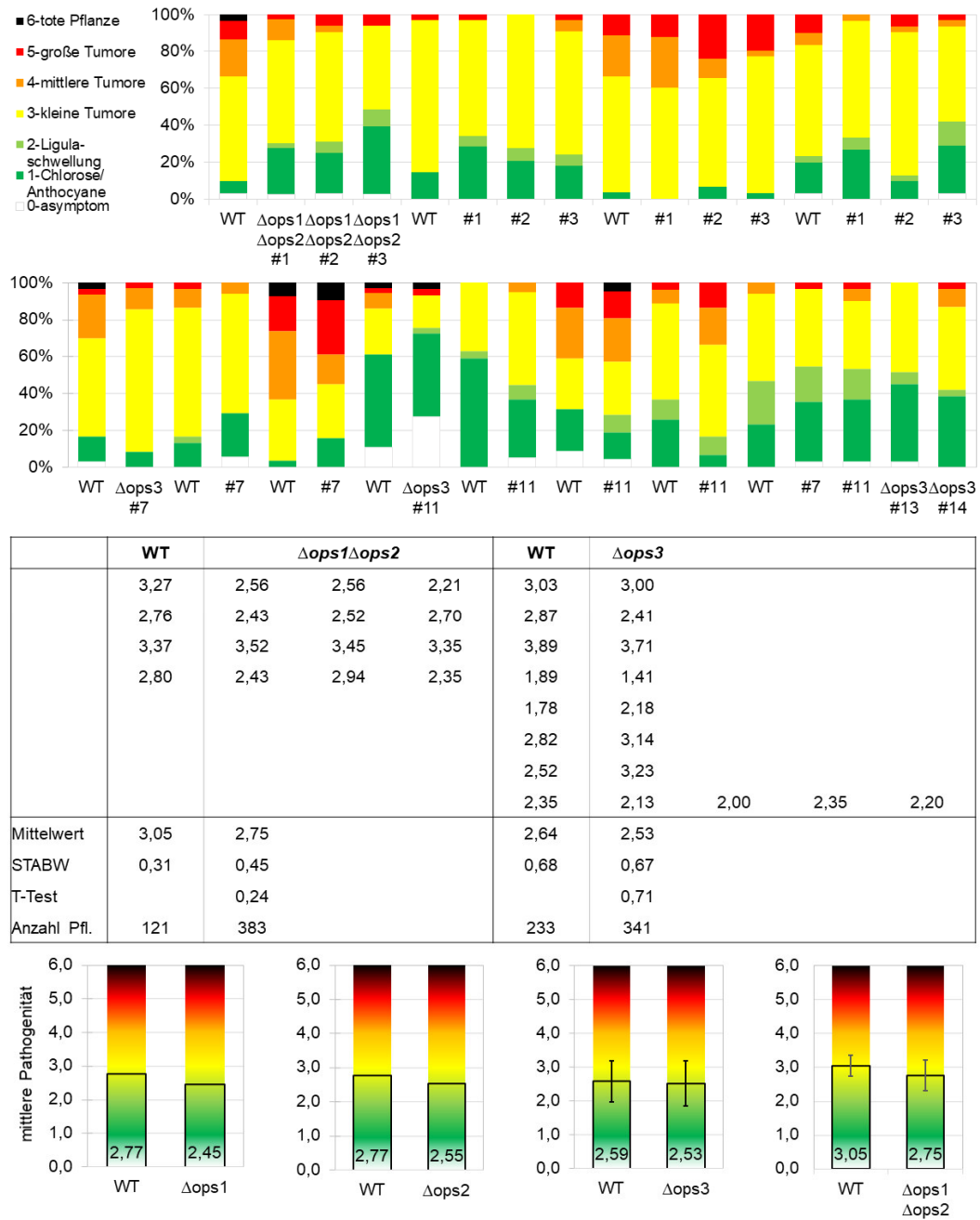


Abbildung S5: Relative Pathogenität verschiedener Opsin-Deletionsmutanten bei Infektionen im Gewächshaus. .7 Tage alte Maiskörner der Sorte „Early Golden Bantam“ wurden mit je 1 ml *U. maydis* SG200-Kulturen gleicher Zellzahl infiziert. Nach 12 Tagen wurden die stärksten Symptome jeder Pflanze ausgewertet und die relative Pathogenität für einzelne Replikate und *U. maydis* Zelllinien berechnet. Zum Schluss wurden verschiedene Zelllinien des gleichen Genotyps gemittelt und mit den gemittelten Werten der zeitgleich infizierten Wildtyp-Daten verglichen. STABW: Standardabweichung

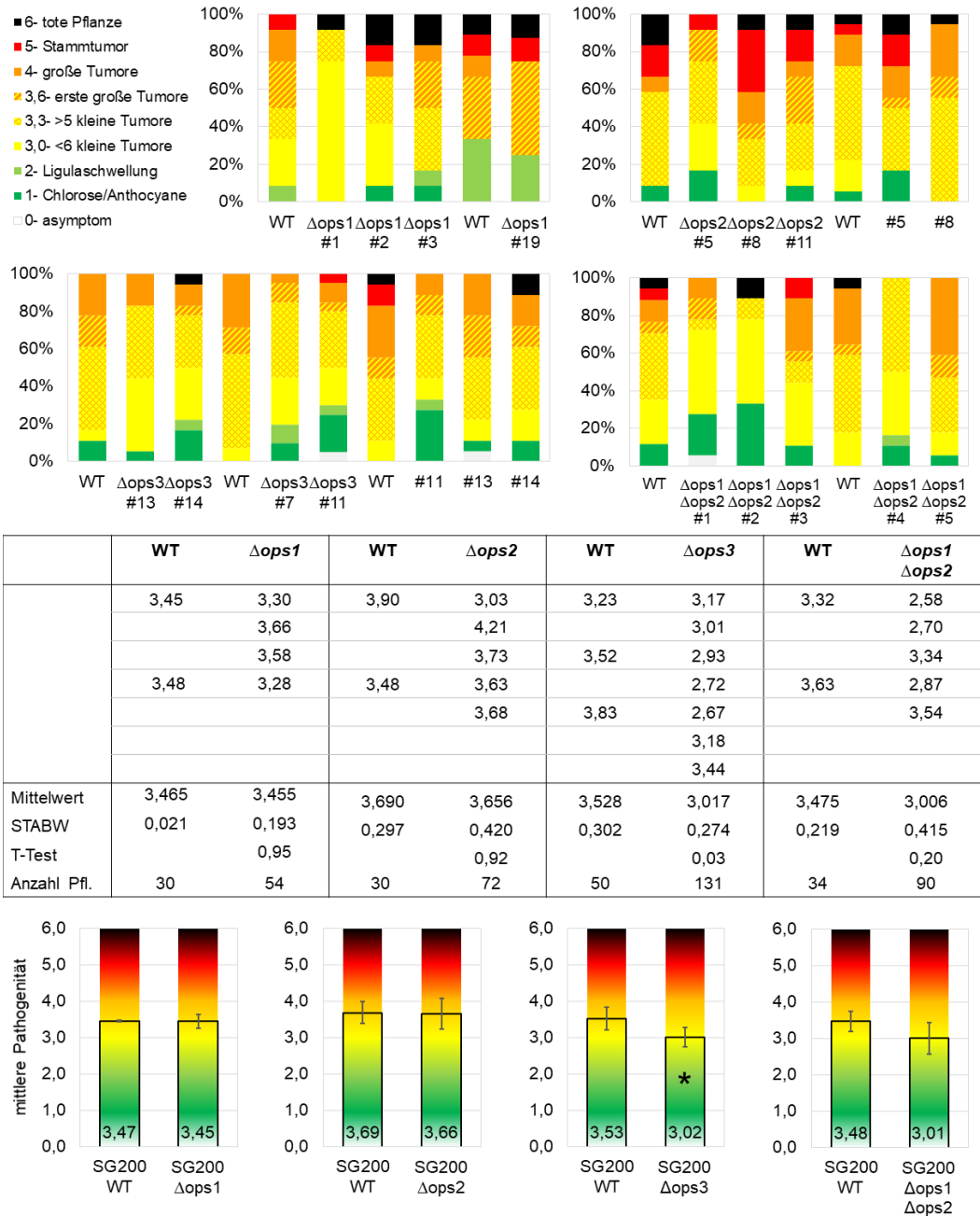


Abbildung S6: Relative Pathogenität verschiedener Opsin-Deletionsmutanten bei Infektionen unter kontrollierten Bedingungen. Maiskörner der Sorte „Golden Bantam“ wurden über Nacht zum Quellen in Leitungswasser mit Luftzufuhr inkubiert. Anschließend wurden sie zum Keimen für 3 Tage auf feuchtem Tuch in einer Phytokammer inkubiert. Es folgte das Eintopfen von jeweils einem Maiskorn pro Topf in Vermiculit und Gießen mit 1/2 MS Medium. Ab diesem Zeitpunkt wurden die Pflanzen in LED-Kammern unter definierten Bedingungen gehalten. Es galt ein Tag-Nacht-Rhythmus (Tag 16 h/28°C/60%/WL~315 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$; Nacht 8 h/20°C/40%/D) mit je einer Stunde Sonnenauf- und Sonnenuntergang, der mit der gleichmäßigen Zunahme der Lichtintensität in drei Stufen eingestellt wurde. Diese Maßnahmen sorgten für eine relativ gleichmäßige Größe der Maispflanzen bei der Infektion.

Nach weiteren vier Tagen wurden die Pflanzen am Vormittag mit *U. maydis* SG200-Kulturen gleicher Zellzahl infiziert, die über Nacht bei Weißlicht anwuchsen. Es folgte weiterhin eine Inkubation in den LED-Kammern mit einem definierten Gießplan. Nach 12 Tagen wurden die stärksten Symptome der infizierten Pflanzen ausgewertet und relative Pathogenität für einzelne Replikate und *U. maydis* Zelllinien berechnet. Zum Schluss wurden verschiedene Zelllinien des gleichen Genotyps gemittelt und mit den gemittelten Werten der zeitgleich infizierten Wildtyp-Daten verglichen. * $p \leq 0,05$; STABW: Standardabweichung.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei einigen bedanken, die zum Erfolg dieser Arbeit und zu meinem Wohl während der gesamten Zeit besonders beigetragen haben.

Zunächst möchte ich Prof. Dr. Alfred Batschauer dafür danken, dass ich die Arbeit bei ihm anfertigen konnte und für die Unterstützung, die ich während dieser Zeit erfahren habe.

Ein großer Dank geht auch an die gesamte Arbeitsgruppe Batschauer, mit allen Mitgliedern, die mich und meine Arbeit während meiner gesamten Doktorandenzeit unterstützt haben. Allen, die mir bei regelmäßig wiederkehrenden Fragen zu Klonierungen und Proteinangelegenheiten mit Rat und Tat zur Seite standen und zu einer sehr angenehmen Arbeitsatmosphäre beigetragen haben, möchte ich danken. Der Dank geht vor allem an Maike Münstermann und Agnes Damm, die für meine alltäglichen Probleme im Labor und privat immer ein offenes Ohr hatten und mich regelmäßig motivieren konnten, wenn die Versuche mal wieder nicht so funktionierten, wie ich wollte.

Ich danke auch den Mitgliedern meiner „zweiten Arbeitsgruppe“, dem AK Essen, die mich während der Mittagspause als eine der ihren aufgenommen haben. Viele angeregte, informative und auch witzige Gespräche und die Entspannung durch diverse Malaktionen haben mir immer die Kraft und Ruhe für den restlichen Tag gegeben.

Bei Prof. Dr. Michael Bölker bedanke ich mich für die Zweitkorrektur meiner Arbeit. Ihm, seiner Arbeitsgruppe und der Arbeitsgruppe rund um Prof. Dr. Regine Kahmann möchte ich außerdem dafür danken, dass sie mir ihre Expertise, Materialien und Einrichtungen zur Verfügung stellten. Besonders Björn Sandrock und Daniela Aßmann danke ich, dass sie mir geduldig bei meinen zahlreichen Fragen zu *Ustilago maydis* weitergeholfen haben. Fabian Haas und Prof. Dr. Stefan Rensing gebührt Dank für die Hilfe bei der Auswertung der RNA-Seq Daten.

Ich bedanke mich außerdem bei Prof. Dr. Lars Voll und Prof. Dr. Uwe Maier für die Bereitschaft, als Prüfer bei meiner Arbeit mitzuwirken.

Danke auch an Priv. Doz. Dr. Ulrich Terpitz und Sabine Panzer. Das Arbeiten in Würzburg, das gemeinsame Ausprobieren neuer Dinge und eure Freude über die Ergebnisse wirkte ansteckend und hat mir super viel Spaß gemacht!

Zuletzt möchte ich mich bei meinen Freunden und meiner Familie bedanken, die für den nötigen Ausgleich abseits der Uni gesorgt haben. Es tat unglaublich gut, gemeinsam Erfolge zu feiern und Rückschläge zusammen durchzustehen. Danke, dass ihr während der gesamten Zeit für mich da wart und mich unterstützt habt.

Lebenslauf

Aus Datenschutzgründen in der elektronischen Version nicht enthalten.

Erklärung

Ich, Annika Brych, versichere, dass ich meine Dissertation

„Lichtregulation der Genexpression und Entwicklung in *Ustilago maydis*“

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.

Marburg, 21.07.2020

