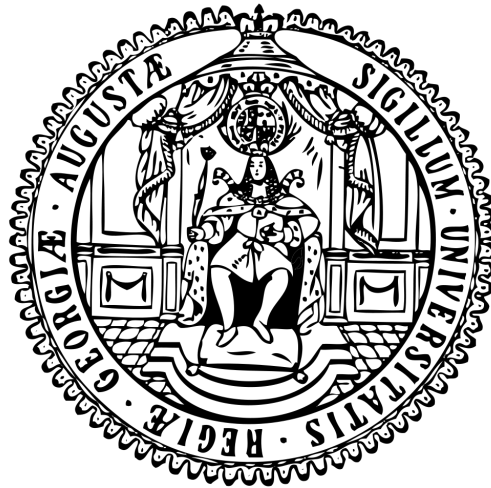


**Analyse der UPR vermittelten Stressantwort und ihrer  
Funktion während der biotrophen Entwicklung von  
*Ustilago maydis***



Dissertation  
zur Erlangung des mathematisch-naturwissenschaftlichen Doktorgrades  
"Doctor rerum naturalium"  
der Georg-August-Universität Göttingen

im Promotionsprogramm  
der Georg-August University School of Science (GAUSS)

vorgelegt von  
Martin Hampel

aus Stuttgart

Göttingen, 2016

## **Betreuungsausschuss**

Jun. Prof. Dr. Kai Heibel, Abteilung Molekulare Mikrobiologie und Genetik, Institut für Mikrobiologie und Genetik, Georg-August-Universität Göttingen.

Prof. Dr. Gerhard Braus, Abteilung Molekulare Mikrobiologie und Genetik, Institut für Mikrobiologie und Genetik, Georg-August-Universität Göttingen.

## **Mitglieder der Prüfungskommission**

Referent:

Jun. Prof. Dr. Kai Heibel, Abteilung Molekulare Mikrobiologie und Genetik, Institut für Mikrobiologie und Genetik, Georg-August-Universität Göttingen.

Korreferent:

Prof. Dr. Gerhard Braus, Abteilung Molekulare Mikrobiologie und Genetik, Institut für Mikrobiologie und Genetik, Georg-August-Universität Göttingen.

Weitere Mitglieder der Prüfungskommission:

Prof. Dr. Rolf Daniel, Abteilung Genomische und Angewandte Mikrobiologie, Institut für Mikrobiologie und Genetik, Georg-August-Universität Göttingen.

Prof. Dr. Stefanie Pöggeler, Abteilung Genetik eukaryotischer Mikroorganismen, Institut für Mikrobiologie und Genetik, Georg-August-Universität Göttingen.

PD Dr. Michael Hoppert, Abteilung Allgemeine Mikrobiologie, Institut für Mikrobiologie und Genetik, Georg-August-Universität Göttingen.

Dr. Oliver Valerius, Abteilung Molekulare Mikrobiologie und Genetik, Institut für Mikrobiologie und Genetik, Georg-August-Universität Göttingen.

Tag der mündlichen Prüfung: 18. Oktober 2016

Die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit wurden unter Betreuung von Herrn Jun. Prof. Dr. Kai Heibel in der Abteilung für Molekulare Mikrobiologie und Genetik der Georg-August-Universität Göttingen durchgeführt.

Teile dieser Arbeit wurden in den folgenden Artikeln veröffentlicht:

**Hampel, M.**, Jakobi, M., Schmitz, L., Meyer, U., Finkernagel, F., Doehlemann, G. und Heibel, K. (2016). "Unfolded Protein Response (UPR) Regulator Cib1 Controls Expression of Genes Encoding Secreted Virulence Factors in *Ustilago maydis*." PLoS One **11**(4): e0153861.

Lo Presti, L., López Díaz, C., Turrà, D., Di Pietro, A., **Hampel, M.**, Heibel, K. und Kahmann, R. (2015). "A conserved co-chaperone is required for virulence in fungal plant pathogens." New Phytol **209**(3): 1135-1148.

Heibel, K., Freitag, J., **Hampel, M.**, Ast, J., Böcker, M. und Kämper, J. (2013). "Crosstalk between the unfolded protein response and pathways that regulate pathogenic development in *Ustilago maydis*." Plant Cell **25**(10): 4262-4277.

## Erklärung

Ich versichere, dass ich meine Dissertation mit dem Titel „Analyse der UPR vermittelten Stressantwort und ihrer Funktion während der biotrophen Entwicklung von *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 im In- oder Ausland eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

---

Ort, Datum

---

Martin Hampel

# Inhaltsverzeichnis

<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>V</b>
<b>Summary</b> .....	<b>VI</b>
<b>1 Einleitung</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1 Die Antwort auf ungefaltete Proteine (UPR)</b> .....	<b>1</b>
1.1.1 IRE1: der konservierte UPR-Signalweg .....	2
1.1.2 Die UPR in pathogenen Pilzen: ein zentraler Regulator der Virulenz .....	4
<b>1.2 Der phytopathogene Basidiomycet <i>Ustilago maydis</i></b> .....	<b>5</b>
1.2.1 Der Lebenszyklus von <i>U. maydis</i> .....	7
1.2.2 Der <i>a</i> -Locus steuert die interzelluläre Erkennung .....	9
1.2.3 Die UPR und die b-vermittelte Regulationskaskade .....	10
1.2.4 Die Funktion sekretierter Effektoren innerhalb der pathogenen Entwicklung von <i>U. maydis</i> .....	13
1.2.5 Die Regulation der Effektorgenexpression .....	15
<b>1.3 Zielsetzung der Arbeit</b> .....	<b>16</b>
<b>2 Ergebnisse</b> .....	<b>17</b>
<b>2.1 Der zentrale UPR Regulator Cib1 in <i>U. maydis</i></b> .....	<b>17</b>
2.1.1 Struktur und Homologie der <i>cib1</i> mRNA .....	17
2.1.2 Die Expression von <i>cib1</i> komplementiert die erhöhte ER-Stresssensitivität der $\Delta$ <i>HAC1</i> Mutante in <i>S. cerevisiae</i> .....	19
2.1.3 Partielle Komplementation der $\Delta$ <i>cib1</i> Mutante durch XBP1 aus <i>Homo sapiens</i> .	19
2.1.4 ER-Stress führt zum Spleißen der <i>cib1</i> mRNA und zur Induktion des UPR-Zielgens <i>bip1</i> .....	20
2.1.5 Die Expressionsanalyse weiterer UPR-Zielgene unter ER-Stress .....	22
<b>2.2 Die Struktur des <i>cib1</i> Gens und der kodierenden Proteine Cib1 und Cib1<sup>u</sup></b> .....	<b>25</b>
<b>2.3 Cib1<sup>u</sup>, ein möglicher Repressor der UPR in <i>U. maydis</i></b> .....	<b>26</b>
2.3.1 Die Überexpression von <i>cib1<sup>s</sup></i> inhibiert das Zellwachstum .....	27
2.3.2 Konstruktion eines unspleißbaren <i>cib1</i> Allels .....	28
2.3.3 Die Expression von <i>cib1<sup>us</sup></i> reduziert die ER-Stressresistenz und Aktivierung von UPR-Zielgenen .....	30
2.3.4 Die Expression von <i>cib1<sup>us</sup></i> stellt die ER-Stresssensitivität der $\Delta$ <i>cib1</i> Mutante teilweise wieder her .....	31
2.3.5 Humanes XBP1 <sup>u</sup> kann die ER-Stresssensitivität der $\Delta$ <i>cib1</i> Mutante partiell komplementieren .....	33
<b>2.4 Die Interaktion von Cib1 mit Clp1, einem zentralen Regulator der biotrophen     Entwicklung in <i>U. maydis</i></b> .....	<b>34</b>

2.4.1	Die Interaktion von Cib1 mit Clp1 führt zu einer erhöhten ER-Stressresistenz...	35
2.4.2	Die Expression von <i>clp1</i> reduziert die Aktivierung der UPR.....	36
2.4.3	Die Aktivierung der UPR führt zu erhöhten Clp1 Mengen .....	37
2.4.4	Einfluss der DNA-Bindung von Cib1 auf die Clp1 Stabilität.....	38
<b>2.5</b>	<b>Die UPR während der biotrophen Entwicklung.....</b>	<b>40</b>
2.5.1	Die Genexpression konservierter UPR-Zielgene wird spezifisch während der biotrophen Entwicklung aktiviert.....	40
2.5.2	Die konstitutive <i>cib1</i> Expression zum frühen Zeitpunkt der pathogenen Entwicklung ist nicht ausreichend für die Virulenz .....	41
<b>2.6</b>	<b>UPR Response Elements (UPREs) in <i>U. maydis</i> .....</b>	<b>42</b>
2.6.1	Bioinformatische Analyse der UPRE im Genom von <i>U. maydis</i> .....	43
2.6.2	Cib1 bindet an ein UPRE im eigenen Promotor .....	45
<b>2.7</b>	<b>Cib1 reguliert die Expression von Effektorgenen .....</b>	<b>46</b>
2.7.1	Bioinformatische Analyse der UPRE in sekretierten Effektorgenen.....	47
2.7.2	qRT-PCR basierter Screen zur Untersuchung der UPR abhängigen Expression der UPRE Kandidatengene .....	48
2.7.3	UPR abhängige Expression von <i>tin1-1</i> , <i>pit1</i> und <i>pit2</i> .....	49
2.7.4	Die Deletion von <i>pit1/2</i> hat keinen Einfluss auf die ER-Stressresistenz.....	50
2.7.5	Cib1 bindet an die Promotoren von <i>tin1-1</i> , <i>pit1</i> und <i>pit2</i> .....	51
2.7.6	Das UPRE-Motiv im <i>pit1/2</i> Promotor ist für die UPR abhängige Genexpression notwendig .....	52
2.7.7	Der Verlust der UPR abhängigen Regulation von <i>pit1</i> und <i>pit2</i> führt zu reduzierter Virulenz .....	55
2.7.8	Die Aktivierung der UPR führt zu erhöhter Pit2 Sekretion.....	57
<b>3</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>60</b>
<b>3.1</b>	<b>Cib1 als zentraler Regulator der UPR in <i>U. maydis</i> .....</b>	<b>60</b>
3.1.1	Cib1 ist das Homolog zu Hac1p aus <i>S. cerevisiae</i> .....	60
3.1.2	Die Autoregulation von <i>cib1</i> durch Bindung an das UPRE im Promotorbereich führt zur Identifikation des negativen UPR Regulators Cib1 <sup>u</sup> .....	61
<b>3.2</b>	<b>Cib1<sup>u</sup> wirkt als negativer UPR Regulator einer UPR Hyperaktivierung entgegen .....</b>	<b>62</b>
<b>3.3</b>	<b>Die Verknüpfung von UPR und pathogener Entwicklung in <i>U. maydis</i> .....</b>	<b>65</b>
3.3.1	Die Modulation der UPR durch die Clp1-Cib1 Interaktion .....	65
3.3.2	Die korrekte Koordination der UPR-Aktivierung ist für die Infektion des Wirts notwendig .....	68
<b>3.4</b>	<b>Die Identifizierung von UPR-Zielgenen im Genom von <i>U. maydis</i> .....</b>	<b>69</b>
<b>3.5</b>	<b>Cib1 steuert die Genexpression von <i>pit2</i> und <i>tin1-1</i> .....</b>	<b>71</b>

---

3.6	<b>Der genomische Kontext hat Auswirkungen auf die Transkription der Virulenzfaktoren Pit1 und Pit2</b> .....	74
3.7	<b>Modell der UPR-Funktion in <i>U. maydis</i></b> .....	75
3.8	<b>Fazit</b> .....	77
4	<b>Material und Methoden</b> .....	78
4.1	<b>Material und Bezugsquellen</b> .....	78
4.1.1	Chemikalien .....	78
4.1.2	Puffer und Lösungen .....	78
4.1.3	Enzyme .....	78
4.1.4	Verwendete Kits .....	78
4.1.5	Antikörper .....	79
4.2	<b>Kultivierung von Mikroorganismen</b> .....	79
4.2.1	Medien für die Kultivierung von <i>E. coli</i> .....	79
4.2.2	Medien für die Kultivierung von <i>U. maydis</i> .....	79
4.2.3	Medien für die Kultivierung von <i>S. cerevisiae</i> .....	81
4.2.4	Bestimmung der Zelldichte von Kulturen .....	81
4.3	<b>Stämme, Plasmide und Oligonukleotide</b> .....	82
4.3.1	<i>E. coli</i> Stämme .....	82
4.3.2	<i>S. cerevisiae</i> Stämme .....	82
4.3.3	<i>U. maydis</i> Stämme .....	82
4.3.4	Plasmide und Plasmidkonstruktionen .....	84
4.3.5	Oligonukleotide .....	89
4.4	<b>Mikrobiologische Methoden</b> .....	95
4.4.1	Transformation von <i>E. coli</i> .....	95
4.4.2	Transformation von <i>S. cerevisiae</i> nach Ito <i>et al.</i> , 1983 .....	96
4.4.3	Transformation von <i>U. maydis</i> .....	96
4.4.4	Test auf filamentöses Wachstum .....	97
4.4.5	Infektion von <i>Zea mays</i> mit <i>U. maydis</i> .....	97
4.4.6	Induktion von ER-Stress in <i>U. maydis</i> .....	98
4.5	<b>Genetische Methoden</b> .....	98
4.5.1	Gendeletion mittels homologer Rekombination .....	98
4.5.2	Integration von Konstrukten in den <i>ip</i> Locus von <i>U. maydis</i> .....	99
4.6	<b>Molekularbiologische Standard-Methoden</b> .....	100
4.6.1	Restriktion und Dephosphorylierung von DNA .....	100
4.6.2	Ligation von DNA .....	100
4.6.3	Sequenzierung von DNA .....	100
4.6.4	Agarosegel-Elektrophorese .....	100

4.6.5	Polymerase-Kettenreaktion (PCR) .....	101
4.6.6	Quantitative Echtzeit PCR (qRT-PCR) .....	101
4.6.7	Präparation von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> .....	102
4.6.8	Isolierung von genomischer DNA aus <i>U. maydis</i> .....	103
4.6.9	Handhabung von Nukleinsäuren .....	103
4.6.10	Auftrennung und Nachweis von Nukleinsäuren (Southern Blot) .....	103
4.6.11	RNA-Isolierung nach der Trizol-Methode .....	106
<b>4.7</b>	<b>Biochemische Methoden</b> .....	<b>106</b>
4.7.1	Isolierung von denaturierten Proteinen aus <i>U. maydis</i> .....	106
4.7.2	Isolierung von nativen Proteinen aus <i>U. maydis</i> .....	107
4.7.3	Isolierung von Proteinen aus dem Kulturüberstand nach Lo Presti <i>et al.</i> , 2015a .....	107
4.7.4	SDS-Gelelektrophorese von Proteinen .....	108
4.7.5	Transfer und Nachweis von Proteinen (Western-Blot) .....	109
4.7.6	Quantitative Chromatin Immunpräzipitation (qChIP) nach Heimel <i>et al.</i> , 2010b .....	109
<b>4.8</b>	<b>Bioinformatik und Sequenzanalyse</b> .....	<b>111</b>
4.8.1	Sequenzierung von DNA .....	111
4.8.2	Sequenz- und Strukturanalyse .....	111
4.8.3	<i>In silico</i> Vorhersage von UPREs (unfolded protein response elements) .....	111
<b>5</b>	<b>Literatur</b> .....	<b>112</b>
<b>6</b>	<b>Anhang</b> .....	<b>127</b>
6.1	ER-Stressresistenz von SG200 <i>cib1-3xHA</i> .....	127
6.2	Die Gendeletion des Erj5p Homologs in <i>U. maydis</i> .....	127
6.3	Komplementation der $\Delta$ <i>cib1</i> Mutante durch konstitutive Expression von <i>cib1</i> .....	129
6.4	Bioinformatische Analyse der UPRE im Genom von <i>U. maydis</i> .....	130
6.5	qRT-PCR basierender Screen zur Untersuchung der UPR abhängigen Expression der UPRE Kandidatengene .....	137
	Abbildungsverzeichnis .....	141
	Tabellenverzeichnis .....	143
	Abkürzungen .....	144
	Lebenslauf .....	145
	Posterpräsentationen .....	146
	Danksagung .....	147



## Zusammenfassung

Die Unfolded Protein Response (UPR) ist ein in Eukaryoten konservierter Signalweg, der durch Akkumulation von un-/fehlgefalteten Proteinen im endoplasmatischen Retikulum (ER) aktiviert wird um die Proteinhomöostase zu gewährleisten. In *Saccharomyces cerevisiae* wird die UPR durch den ER-Stresssensor Ire1p und den bZIP Transkriptionsfaktor Hac1p, oder XBP1 in höheren Eukaryoten, reguliert. In dieser Arbeit konnten die Homologe der zentralen UPR-Regulatoren im biotrophen Pilz *Ustilago maydis* charakterisiert und die UPR als essenzieller Koordinator der pathogenen Entwicklung identifiziert werden.

Die Komplementation der  $\Delta HAC1$  Mutante durch *cib1* (Homolog von *HAC1*) und umfassende Expressionsanalysen zeigten, dass die Regulationsmechanismen der UPR in *U. maydis* weitestgehend konserviert sind, das Spektrum der regulierten Zielgene jedoch sekretierte Virulenzfaktoren beinhaltet die für die pathogene Entwicklung notwendig sind. So konnten durch *in silico* Vorhersage möglicher Cib1 Bindestellen (UPRE) mit *pit1/pit2* und *tin1-1* drei bereits charakterisierte Effektorgene als direkt regulierte UPR-Zielgene identifiziert werden. Die gezielte Deletion des vorhergesagten UPREs führt zu einer Aufhebung der ER-Stress induzierten und Cib1 abhängigen Expression von *pit2* und verringert die Virulenz signifikant. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass eine funktionelle UPR sowohl notwendig für eine verstärkte Expression wie auch für die korrekte Prozessierung des Pit2-Effektors innerhalb des ERs ist.

Im Gegensatz zur Bäckerhefe *S. cerevisiae* und den filamentösen Ascomyceten *Aspergillus niger* und *Trichoderma reesei* kodiert die ungespleißte *XBP1* mRNA in höheren Eukaryoten für einen negativen Regulator der UPR. Mit den vorliegenden Untersuchungen in *U. maydis* konnte erstmals für niedere Eukaryoten gezeigt werden, dass die ungespleißte *cib1* mRNA für einen negativen Regulator kodiert, der darüber hinaus eine bislang unbeschriebene und vermutlich konservierte Funktion in der Antwort auf ER-Stress besitzt.

Die genaue Kontrolle der UPR-Aktivität ist Voraussetzung für die korrekte Ausführung der verschiedenen Schritte innerhalb der pathogenen Entwicklung von *U. maydis*. Während eine vorzeitige UPR-Aktivierung zur Inhibition des zur Pflanzeninfektion notwendigen filamentösen Wachstums führt, ist die gezielte Aktivierung der UPR nach erfolgreicher Penetration der Pflanzenoberfläche und ihre andauernde Aktivität während des Wachstums *in planta* notwendig für die pathogene Entwicklung. Die direkte Interaktion zwischen Cib1 und dem Entwicklungsregulator Clp1 während dieser Entwicklungsphase führt zur Stabilisierung von Clp1 und der Modulation der Cib1 abhängigen Genexpression. Auf diese Weise wird die Proliferation *in planta* ermöglicht und eine erhöhte ER-Stressresistenz vermittelt. Zusammenfassend zeigen die gewonnenen Ergebnisse, dass die UPR in *U. maydis* als Kontrollpunkt dient, um die zelluläre Physiologie, den Entwicklungsverlauf und die Sekretion von Effektoren aufeinander abzustimmen.

## Summary

The unfolded protein response (UPR) is a conserved eukaryotic signaling network that is activated by accumulation of misfolded proteins in the endoplasmic reticulum (ER) to ensure protein homeostasis. In the baker's yeast *Saccharomyces cerevisiae*, the UPR signaling pathway is controlled by the ER stress sensor Ire1p and the bZIP transcription factor Hac1p or XBP1 in higher eukaryotes. In this study homologs of the central UPR regulators in the biotrophic fungus *Ustilago maydis* were characterized, identifying the UPR as an essential coordinator of pathogenic development.

In *S. cerevisiae* the accumulation of un- or misfolded proteins leads to unconventional splicing of the *HAC1* mRNA by Ire1p allowing the translation of the central regulator Hac1p. The complementation of the  $\Delta$ *HAC1* mutant by *cib1* (homolog of *HAC1*) and comprehensive expression analysis showed that the regulatory mechanisms of the UPR in *U. maydis* are largely conserved. However, the range of regulated target genes includes secreted virulence factors that are essential for pathogenic development. *In silico* prediction of unfolded protein response elements (UPREs) in promoter regions identified the three previously characterized effector genes *pit1/pit2* and *tin1-1*, as UPR target genes. Targeted deletion of the predicted UPRE abolishes *cib1*-dependent expression of *pit2* and leads to significantly reduced virulence. Furthermore a functional UPR is necessary for elevated expression and correct processing of Pit2 in the ER.

This study showed that the unspliced *cib1* mRNA encodes Cib1<sup>u</sup>, a negative regulator of UPR signalling, which is in stark contrast to *S. cerevisiae* and the filamentous ascomycetes *Aspergillus niger* and *Trichoderma reesei*, but analagous to UPR regulation in higher eukaryotes. In addition we discovered a previously undescribed function of Cib1<sup>u</sup> in response to ER-stress that is likely conserved.

The exact control of the UPR activity is required for the correct timing of the different steps within the pathogenic development of *U. maydis*. A premature activation of the UPR leads to an inhibition of the filamentous growth, which is necessary for plant infection. The specific activation of the UPR after successful penetration of the plant surface and their continuous activity during growth *in planta* is essential for the pathogenic development. Direct interaction between Cib1 and development regulator Clp1 during development leads to stabilization of Clp1 and modulation of Cib1-dependent gene expression, that triggers poliferation *in planta* and confers increased ER stress resistance during biotrophic growth. In summary, our data reveal that in *U. maydis* the UPR serves as a checkpoint to coordinate and align cellular physiology, developmental progress and secretion of effector proteins.

# 1 Einleitung

## 1.1 Die Antwort auf ungefaltete Proteine (UPR)

Das endoplasmatische Retikulum (ER) ist ein weit verzweigtes Membransystem, das für die Faltung und Modifizierung aller Proteine des sekretorischen Weges verantwortlich ist. Das Membransystem ist in Form und Größe sehr variabel und kann sich deshalb schnell an wechselnde äußere Einflüsse anpassen (Borgese *et al.*, 2006; Westrate *et al.*, 2015). Die sekretorischen Proteine werden cotranslational in das ER-Lumen transloziert, gefaltet, modifiziert und einer Qualitätskontrolle unterzogen. Zu den wichtigsten Proteinmodifikationen zählen die N-Glykosylierung (Silberstein und Gilmore, 1996) und die Ausbildung von Disulfidbrücken (Fassio und Sitia, 2002). Korrekt gefaltete und prozessierte Proteine werden über den Golgi-Apparat zur Plasmamembran transportiert oder gelangen in das Endomembransystem anderer Kompartimente wie den Mitochondrien und Peroxisomen. An der Zellperipherie werden die Proteine entweder sekretiert oder in der Plasmamembran verankert (Ellgaard und Helenius, 2003; Buchberger *et al.*, 2010). Der Zustrom von Proteinen in das ER ist variabel und wird durch äußere Einflüsse, Zelldifferenzierungsprozesse und den jeweiligen physiologischen Zustand der Zelle beeinflusst. Um eine derartige Dynamik zu gewährleisten, muss die Zelle die Proteinfaltungskapazität des ERs schnell an diese aktuellen Bedürfnisse anpassen können (Schröder, 2008).

Ein Ungleichgewicht zwischen fehlerhafter Proteinfaltung und der ER-Kapazität wird als ER-Stress bezeichnet. Die UPR (unfolded protein response), ein hochkonservierter eukaryotischer Signalweg, wird als zelluläre Antwort auf die Ansammlung von un- oder fehlgefalteten Proteinen im ER-Lumen aktiviert um ER-Stress entgegenzuwirken und die ER-Homöostase sicherzustellen (Cox und Walter, 1996; Mori *et al.*, 1996). Dies geschieht durch eine verstärkte Synthese von Membranlipiden, Chaperonen und Foldasen, was zu einer Vergrößerung der ER-Membranoberfläche führt und die korrekte Faltung von Proteinen im ER sicherstellt (Hurtley *et al.*, 1989; Murray *et al.*, 2004; Schuck *et al.*, 2009). Kann die Homöostase im ER nicht wiederhergestellt werden, erfolgt die Induktion der Apoptose um den Organismus vor potenziell toxischen Effekten der un- oder fehlgefalteten Proteine zu schützen (Sano und Reed, 2013).

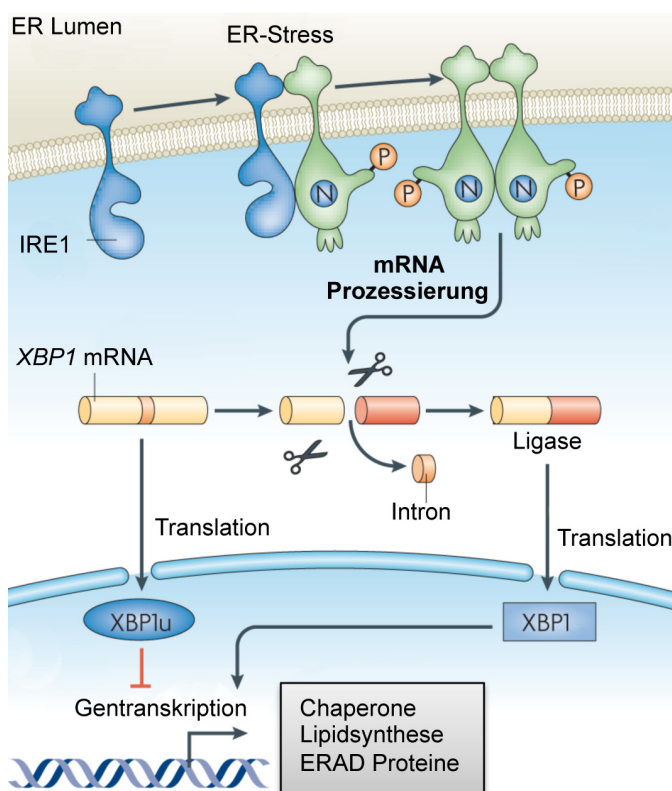
In höheren Eukaryoten besteht die UPR aus drei Signalwegen, die die Proteinhomöostase im ER überwachen und durch ER-Membran lokalisierte Stresssensoren reguliert werden. Der durch IRE1 (inositol requiring enzyme 1) induzierte Signalweg ist in höheren und in niederen Eukaryoten konserviert (siehe auch 1.1.1) (Mori, 2009). Ausschließlich in höheren Eukaryoten zu finden sind der ATF6 (activating transcription factor 6) und PERK abhängige Signalweg (protein kinase RNA-like endoplasmic reticulum kinase). ATF6 gehört zu einer Klasse von Metazoa spezifischen ER-Stresssensoren und besitzt einen C-terminalen

Bereich durch den ER-Stress detektiert werden kann (Haze *et al.*, 1999). Unter ER-Stressbedingungen wird ATF6 zum Golgi-Apparat transportiert und durch die Proteasen S1P (site-1 protease) und S2P (site-2 protease) prozessiert, was zur Freisetzung der DNA bindenden cytosolischen Domäne ATF6f (f für Fragment) führt. ATF6f fungiert als bZIP (basic Leucin-Zipper) Transkriptionsfaktor und aktiviert die Genexpression von UPR-Zielgenen, die teilweise spezifisch, zum größten Teil aber auch überlappend durch den Ire1 abhängigen Signalweg reguliert werden (Haze *et al.*, 1999). Ein weiterer ER-Stresssensor ist PERK, dessen Aktivierung durch Oligomerisierung und Trans-autophosphorylierung nach der Detektion von ER-Stress erfolgt (Bertolotti *et al.*, 2000). In seiner aktiven Form phosphoryliert PERK die  $\alpha$ -Untereinheit von eIF2 (eukaryotic initiation factor 2), wodurch der für die Translationsinitiation notwendige Austausch von GDP zu GTP nicht mehr stattfinden kann, was letztendlich zu einer global reduzierten Translationsinitiationsaktivität führt (Harding *et al.*, 1999). Die Translation der *ATF4* (activating transcription factor 4) mRNA unter diesen Bedingungen ist jedoch verstärkt (Harding *et al.*, 2003). ATF4 reguliert eine Vielzahl von Genen, die an der Autophagie, der Steuerung des Aminosäuremetabolismus und der Antwort auf oxidativen Stress beteiligt sind. Eine anhaltende Aktivierung des PERK-Signalwegs führt zur Expression von CHOP (C/EBP-homologous protein), wodurch die Apoptose als terminale Antwort auf anhaltenden ER-Stress induziert wird (Ma *et al.*, 2002; Oyadomari und Mori, 2004).

### 1.1.1 IRE1: der konservierte UPR-Signalweg

In der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* wird die UPR ausschließlich durch den ER-Transmembransensor Ire1p gesteuert (Walter und Ron, 2011). Ire1p ist ein bifunktionaler Typ I ER-Transmembranrezeptor mit einer Kinase- und Endoribonuklease (RNase)-Domäne (Cox *et al.*, 1993; Sidrauski und Walter, 1997; Credle *et al.*, 2005). ER-Stress, ausgelöst durch un- oder fehlgefaltete Proteine, führt zur Bindung dieser an die N-terminale Domäne von Ire1p im ER-Lumen. In Kombination mit der Dissoziation des ER-Chaperons Kar2p/Bip1 löst dies eine Konformationsänderung und Oligomerisierung von Ire1p aus (Kimata *et al.*, 2007; Gardner und Walter, 2011). Durch Trans-autophosphorylierung wird die RNase-Funktion von Ire1p aktiviert (Sidrauski und Walter, 1997; Korennykh *et al.*, 2009). Neben ihrer Funktion innerhalb des Aktivierungsprozesses von Ire1p ist die Kinase-Aktivität ebenso für ein zeitnahes Deaktivieren des UPR-Signalwegs nach erfolgter Wiederherstellung der ER-Homöostase notwendig (Rubio *et al.*, 2011). Das Substrat von IRE1 ist eine „pre-messenger-RNA“, die für den Transkriptionsfaktor Hac1p (homologous to ATF/CREB1) in *S. cerevisiae* (Cox und Walter, 1996; Mori *et al.*, 1996) und XBP1 (X-box binding protein 1) in höheren Eukaryoten (Yoshida *et al.*, 2001) kodiert. Die RNase-Aktivität vermittelt das

Spleißen des in der *HAC1* und *XBP1* mRNA enthaltenen Introns. Die daran anschließende Ligation der beiden Exon-Fragmente erfolgt durch die tRNA Ligase Trl1p, was zur Bildung der unkonventionell gespleißten *HAC1* mRNA führt und die Translation des zentralen UPR-Regulators Hac1p ermöglicht (Sidrauski *et al.*, 1996). Hac1p gehört zur Gruppe der bZIP Transkriptionsfaktoren und bindet die UPRs (unfolded protein response elements) im Promotorbereich der Zielgene (Mori *et al.*, 1992). Die durch Hac1p regulierten Gene kodieren unter anderem für ER-Chaperone (Kozutsumi *et al.*, 1988; Murray *et al.*, 2004), Proteine der Lipidsynthese (Cox *et al.*, 1997) und Komponenten des ERAD (endoplasmic reticulum associated protein degradation) Signalwegs (Travers *et al.*, 2000). Durch die verstärkte Expression dieser Proteine wird die Wiederherstellung der ER-Homöostase sichergestellt.



**Abb. 1: Schema der Aktivierung des UPR-Signalwegs über IRE1 in höheren Eukaryoten.** In gestressten Zellen oligomerisiert IRE1 in der ER-Membran. Dies hat die Trans-autophosphorylierung der cytoplasmatischen IRE1 Kinasedomäne zur Folge und führt zur Aktivierung der Endoribonukleasedomäne (Sidrauski und Walter, 1997). IRE1 schneidet sequenzspezifisch ein kleines Fragment (Intron) aus der mRNA *XBP1* in höheren Eukaryoten, *HAC1* (homologous to ATF/CREB1) in Hefe heraus. Die zwei Enden der mRNA werden durch eine Ligase zusammengespleißt. Durch das Spleißen des Introns verschiebt sich der Leserahmen der kodierenden Sequenz (gezeigt durch den Farbwechsel von gelb zu rot). Die gespleißte *XBP1* mRNA kodiert für einen transkriptionellen Aktivator XBP1, wohingegen die ungespleißte *XBP1* mRNA für einen Inhibitor (*XBP1<sup>u</sup>*) der UPR kodiert (Yoshida *et al.*, 2006). Quelle: Abbildung modifiziert nach Ron und Walter, 2007.

Die Translation der ungespleißten *HAC1* mRNA wird in *S. cerevisiae* und in filamentösen Ascomyceten durch verschiedene Mechanismen unterdrückt (Rueggsegger *et al.*, 2001; Saloheimo *et al.*, 2003; Mulder *et al.*, 2004; Richie *et al.*, 2009). Im Gegensatz dazu wird in höheren Eukaryoten auch die ungespleißte mRNA (*XBP1<sup>u</sup>*) translatiert (Calfon *et al.*, 2002; Yoshida *et al.*, 2006). Das resultierende Protein *XBP1<sup>u</sup>* fungiert als negativer Regulator der UPR und vermittelt durch Heterodimerisierung mit dem UPR-Aktivator XBP1 den Kernexport und den daran anschließenden proteasomalen Abbau im Cytoplasma (Tirosh *et al.*, 2006; Yoshida *et al.*, 2006; Yoshida *et al.*, 2009).

### 1.1.2 Die UPR in pathogenen Pilzen: ein zentraler Regulator der Virulenz

In allen bislang untersuchten human- und phytopathogenen Pilzen konnte die UPR als ein konservierter Regulator der Virulenz identifiziert werden (Heimel, 2015). Phänotypische Analysen der Deletionsmutanten der *HAC1* und *IRE1* Homologe in pathogenen Pilzen deuten darauf hin, dass die UPR notwendig für die Anpassung an veränderte Umgebungsbedingungen während der Infektion ist. So ist der humanpathogene Pilz *A. fumigatus* sehr temperatortolerant, wobei  $\Delta hacA$  (*HAC1* Homolog) und insbesondere  $\Delta ireA$  (*IRE1* Homolog) Mutanten eine deutlich reduzierte Hitzestressresistenz aufweisen (Richie *et al.*, 2009; Richie *et al.*, 2011). Auch im humanpathogenen Pilz *Cryptococcus neoformans* führt der Verlust der UPR zu einer erhöhten Temperatursensitivität, was für eine konservierte Funktion des UPR-Signalwegs bezüglich des Wachstums bei erhöhten Temperaturen spricht (Cheon *et al.*, 2011). Für das Wachstum auf komplexen Nährstoffquellen wird in *A. fumigatus* und weiteren filamentösen Ascomyceten ebenfalls eine funktionelle UPR benötigt. Der Wachstumsdefekt der  $\Delta hacA$  und  $\Delta ireA$  Mutanten korreliert mit einer reduzierten sekretorischen Kapazität, was zu einer verminderten Nährstoffaufnahme aus dem Wirtsgewebe und einer dadurch reduzierten Virulenz dieser Stämme führen könnte (Mulder und Nikolaev, 2009; Feng *et al.*, 2011).

Die Plasmamembran und die Zellwand des Pilzes stehen im direkten Kontakt mit der Wirtsumgebung und bilden die zentrale Schnittstelle für die Interaktion mit dem Wirt. Ein Verlust der UPR führt neben einer reduzierten ER-Stressresistenz zu einer erhöhten Sensitivität gegenüber Zellwandstress (Richie *et al.*, 2009; Cheon *et al.*, 2011). Viele Fungizide die zur klinischen Behandlung von Pilzinfektion eingesetzt werden beeinflussen die Zusammensetzung der Zellwand/Plasmamembran des Pilzes (Tada *et al.*, 2013). Damit übereinstimmend konnte in *C. neoformans* und *A. fumigatus* gezeigt werden, dass der Verlust der UPR zu einer höheren Sensitivität gegenüber den meisten klinisch eingesetzten Fungiziden führt (Richie *et al.*, 2009; Cheon *et al.*, 2011). Dies unterstreicht die Bedeutung der UPR in pathogenen Pilzen und macht deren Untersuchung zu einem vielversprechenden Forschungsgebiet bei der Entwicklung neuer antifungaler Wirkstoffe. Eine Möglichkeit für neue klinische Therapien ist beispielsweise durch die gezielte Inhibition der enzymatischen Funktion von IreA gegeben (Krishnan und Askew, 2014).

Eine funktionelle UPR ist auch in dem nekrotrophen Ascomyceten *Alternaria brassicicola* für die pathogene Entwicklung notwendig (Joubert *et al.*, 2011). In *A. brassicicola* wird die UPR sowohl durch ER-Stress wie auch durch Pflanzensignale aktiviert. Die Behandlung des Myzels mit Camalexin, einem Pflanzenabwehrstoff, führt zur Aktivierung der UPR und Stämme mit inaktiver UPR sind deutlich sensitiver gegenüber Camalexin (Joubert *et al.*, 2011). In *Magnaporthe oryzae*, dem Erreger des Reisbrandes, wird eine funktionelle UPR für

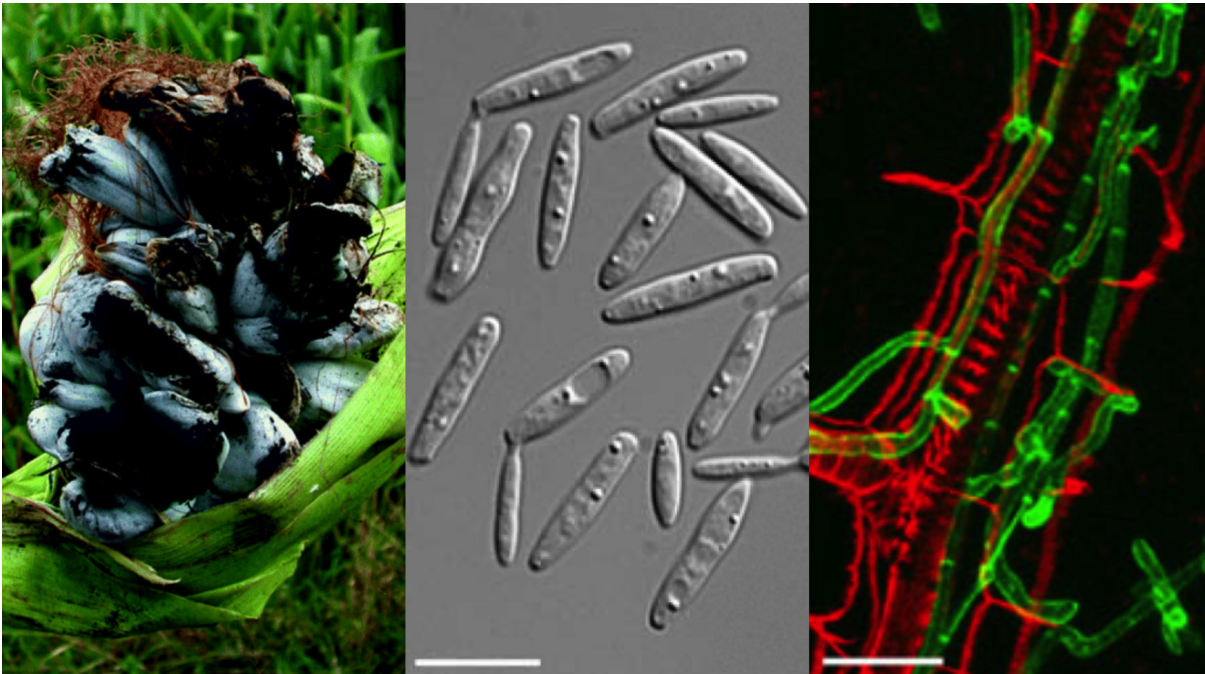
die Penetration der Pflanzenoberfläche und das invasive Hyphenwachstum *in planta* benötigt (Tang *et al.*, 2015).

Im Gegensatz zu den meisten anderen Pilzen ist der Ire1-Hac1 UPR-Signalweg in *Candida glabrata* und *Schizosaccharomyces pombe* nicht konserviert. In beiden Organismen ist das zu Ire1p homologe Protein für die ER-Stressresistenz essenziell, die Regulation jedoch unabhängig vom UPR-Regulator Hac1p. Während in *C. glabrata* ein Hac1p Homolog vorhanden ist, dieses aber nicht durch Ire1 gespleißt wird, besitzt *S. pombe* kein Hac1 Homolog. Hier prozessiert Ire1 die *Bip1* mRNA, was zu deren Stabilisierung und zur erhöhten Translation des Chaperons Bip1 führt (Kimmig *et al.*, 2012; Miyazaki *et al.*, 2013).

In den letzten Jahren wurde in einer Vielzahl von pathogenen Pilzen ein weitgehend konservierter UPR-Signalweg nachgewiesen und beschrieben. In allen bislang untersuchten pathogenen Pilzen wird eine funktionelle UPR vor allem während der Interaktion mit dem Wirt benötigt und ist wichtig für Steuerung der pathogenen Entwicklung. Da die zu Grunde liegenden Regulationsmechanismen jedoch nur ansatzweise verstanden sind, ist die Untersuchung der UPR vermittelten Stressantwort notwendig für ein tieferes Verständnis pilzlicher Entwicklungs- und Pathogenitätsprozesse.

## 1.2 Der phytopathogene Basidiomycet *Ustilago maydis*

*Ustilago maydis*, der Erreger des Maisbeulenbrands, gehört systematisch zu den Basidienpilzen (Basidiomycota) und zur Familie der Ustilaginaceae. Der phytopathogene Pilz besitzt ein enges Wirtsspektrum und befällt ausschließlich Mais (*Zea mays*) und die in Mexiko vorkommende Teosinte (*Zea mays ssp. mexicana*, *Zea mays ssp. pavigluminis*), die vermutlich die Wildform des Kulturmais darstellt (Doebley, 1992). Von einer Infektion durch *U. maydis* können alle oberirdischen, sich im Wachstum befindlichen Teile der Maispflanze, betroffen sein. Die initialen Infektionssymptome der Maispflanze sind die Ausbildung von Chlorosen und eine verstärkte Anthocyansynthese. Zu einem späteren Infektionsstadium entstehen die charakteristischen Tumore, die während einer massiven Proliferation der Pilzhyphen innerhalb der Wirtspflanze und einer damit einhergehenden erhöhten Teilungsrate der pflanzlichen Zellen entstehen. Im reifen Zustand enthalten diese Gewebestrukturen große Mengen an Teliosporen, die die Pflanze nach Freisetzung „verbrannt“ (lateinisch: *ustilare* = verbrennen) erscheinen lassen (Abb. 2) (Christensen, 1963).



**Abb. 2: Maiskolben infiziert mit *Ustilago maydis* und mikroskopische Aufnahmen der Sporidien wie auch der Hyphen innerhalb der Maispflanze.** Links: Ein infizierter Maiskolben mit Tumoren, die bereits teilweise durch Aufplatzen die schwarzen Teliosporen freigesetzt haben. Quelle: Kahmann und Kämper, 2004. Mitte: Haploide Sporidien wachsen in Flüssigkultur hefeartig durch Knospung. Maßstabsbalken: 10  $\mu\text{m}$  Quelle: Steinberg und Perez-Martin, 2008. Rechts: Kolonisierung eines Maisblattes zwei Tage nach Inokulation. Die Hyphenzellen sind mit WGA (wheat germ agglutinin)-AlexaFluor488 (grün) und die Pflanzenzellwand Propidiumiodid (rot) gefärbt. Maßstabsbalken: 20  $\mu\text{m}$  Quelle: Bielska *et al.*, 2014.

*U. maydis* hat im Vergleich zu den Mehltau- und Rostpilzen, die jährlich Ernteschäden in Höhe von mehreren Milliarden Dollar verursachen, ökonomisch eine eher geringe Bedeutung (Dean *et al.*, 2012). Die einfache Kultivierung und genetische Zugänglichkeit von *U. maydis* erlauben jedoch die genaue Untersuchung von pathogenitätsrelevanten Signalkaskaden und Entwicklungsvorgängen, die in den ökonomisch relevanten Pilzen aufgrund ihrer obligat biotrophen Lebensweise nur schwer zu analysieren sind.

Die haploiden saprophytisch wachsenden Sporidien teilen sich hefeartig durch Knospung (Abb. 2), können leicht im Labor kultiviert und durch homologe Rekombination genetisch verändert werden (Holliday, 2004; Kämper, 2004). Eine Vielzahl von Promotorsystemen ermöglicht die konstitutive oder auch induzierte Genexpression zu unterschiedlichen Zeitpunkten in der Entwicklung (Banks *et al.*, 1993; Bottin *et al.*, 1996; Spellig *et al.*, 1996; Brachmann *et al.*, 2001a). Mit fluoreszierenden Proteinen, verschiedenen Färbetechniken und Lebendzell-Mikroskopie stehen weitere Methoden zur Verfügung, welche die subzelluläre Lokalisation von Proteinen und die Visualisierung des Pilzes während des Wachstums innerhalb der Pflanze ermöglichen (Abb. 2) (Steinberg und Perez-Martin, 2008; Böhmer *et al.*, 2009; Mendoza-Mendoza *et al.*, 2009; Baumann *et al.*, 2016).

Neben dem saprophytischen Stadium kann auch die initiale Phase der biotrophen Entwicklung unter Laborbedingungen untersucht werden. Für die pathogene Entwicklung ist die Paarung von zwei kompatiblen, haploiden Sporidien und Bildung eines dikaryotischen



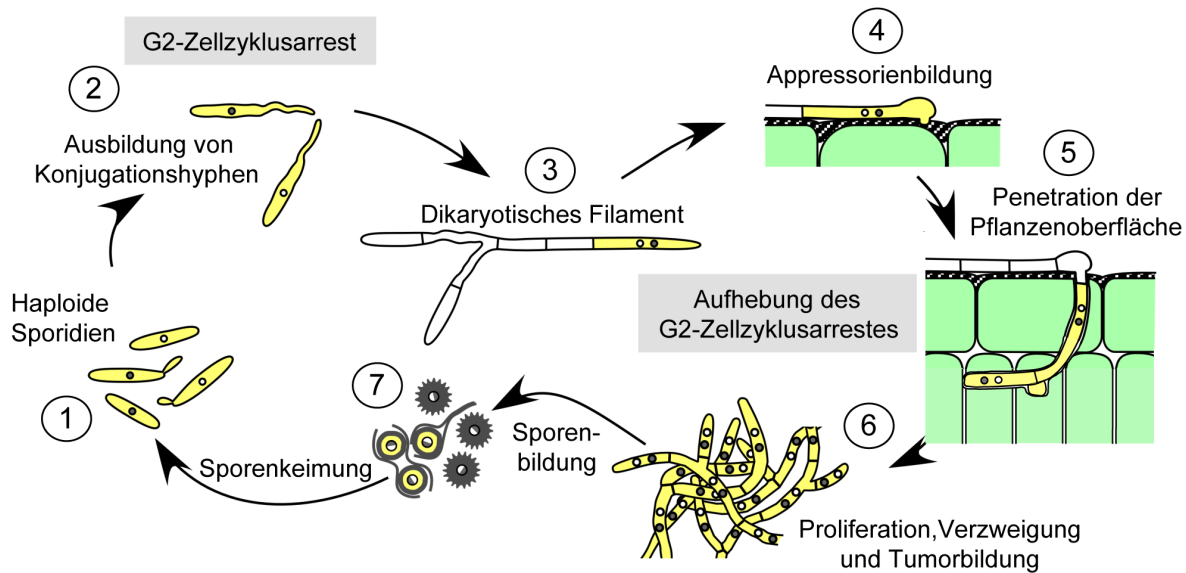
Filaments essenziell. Dabei kodiert der *a*-Paarungstyp-Locus für ein Pheromon-Rezeptor-System und ist für die Zell-Zell-Erkennung und Bildung des Dikaryons notwendig (Bölker *et al.*, 1992; Urban *et al.*, 1996a). Alle nachfolgenden Prozesse der pathogenen Entwicklung, wie das filamentöse Wachstum, die Penetration der Pflanzenoberfläche und die Entwicklung innerhalb der Pflanze werden durch den *b*-Paarungstyp-Locus, der für den heterodimeren *bE/bW*-Transkriptionsfaktor kodiert, gesteuert (Brefort *et al.*, 2009; Heimel *et al.*, 2010a; Heimel *et al.*, 2010b). Für die Analyse von Virulenzmechanismen eignet sich insbesondere der haploide solopathogene Laborstamm SG200, der durch die Expression kompatibler Komponenten der *a*- und *b*-Paarungstyp-Loci (siehe auch 1.2.1) keinen Kreuzungspartner zur Infektion der Maispflanze benötigt und eine direkte phänotypische Analyse von Gendeletionsmutanten ermöglicht (Bölker *et al.*, 1995a; Kämper *et al.*, 2006).

Das Genom von *U. maydis* wurde im Jahr 2006 vollständig entschlüsselt und ist mit 20,5 Megabasenpaaren im Vergleich zu anderen pilzlichen Phytopathogenen relativ klein (Kämper *et al.*, 2006). *U. maydis* wird als Modelorganismus für Pilz/Pflanzeninteraktionen, die Untersuchung von DNA-Rekombination und vielfältigen zellbiologischen Fragestellungen verwendet (Holliday, 1964, 2004; Steinberg und Perez-Martin, 2008; Göhre *et al.*, 2012; Castanheira und Perez-Martin, 2015; Perez-Martin *et al.*, 2016).

### 1.2.1 Der Lebenszyklus von *U. maydis*

*U. maydis* zeichnet sich durch einen dimorphen Lebenszyklus aus, der in drei verschiedene Kernphasen unterteilt werden kann. Die haploiden Zellen vermehren sich hefeartig durch Knospung und werden als Sporidien bezeichnet (Abb. 3). In diesem Stadium wächst der Pilz saprophytisch und kann die Wirtspflanze nicht infizieren. Die Regulation der sexuellen und pathogenen Entwicklung ist eng miteinander verknüpft und wird durch ein tetrapolares Paarungssystem bestehend aus zwei Paarungstyp-Loci, die als *a* und *b* bezeichnet werden, kontrolliert (Bölker *et al.*, 1992; Brachmann *et al.*, 2001a). Der Wechsel vom saprophytischen zum biotrophen Wachstum beginnt mit der Fusion von zwei kompatiblen Sporidien auf der Oberfläche von Maisblättern. Der biallelische *a*-Locus kodiert für ein Pheromon-Rezeptorsystem, wodurch sich kompatible Kreuzungspartner erkennen können (Schulz *et al.*, 1990; Bölker *et al.*, 1992). Dies hat die Ausbildung von Konjugationshyphen und einem parallel induzierten G2-Zellzyklusarrest zur Folge (Banuett, 1992; Garcia-Muse *et al.*, 2003). Die kompatiblen Kreuzungspartner wachsen entlang eines Pheromon-Gradienten aufeinander zu und bilden durch Zellfusion ein heterodikaryotisches Filament, das die pathogene Form von *U. maydis* darstellt (Snetselaar und Mims, 1992, 1993). Während des ausgeprägten Spitzenwachstums auf der Pflanzenoberfläche besteht das Filament aus einer einzelnen heterodikaryotischen, apikalen Zelle und aus distalen Bereichen, die durch Septen

getrennt sind und kein Cytoplasma enthalten (Banuett und Herskowitz, 1994; Banuett, 1995). Auf hydrophoben Oberflächen wie aktivkohlehaltigem Medium kann die Zellfusion und Bildung eines Dikaryons *in vitro* untersucht werden (Day *et al.*, 1971). Alle weiteren Schritte der sexuellen Entwicklung sind von der Wirtspflanze abhängig.



**Abb. 3: Schematische Darstellung des Lebenszyklus von *U. maydis*.** In der saprophytischen Phase vermehren sich die haploiden Sporidien hefeartig durch Knospung (1). Durch Pheromon-Stimulation werden Konjugationshyphen ausgebildet (2) und es kommt zur Zellfusion zweier Sporidien. Das gebildete Heterodikaryon, die pathogene Form von *U. maydis*, wächst anschließend filamentös (3). Um die Pflanzenoberfläche zu penetrieren, wird ein Appressorium ausgebildet (4). Nach erfolgreicher Penetration wird der Zellzyklusarrest aufgehoben (5) und die massive Proliferation bzw. Tumorbildung (6) beginnt. Am Ende des Lebenszyklus kommt es zur Karyogamie und anschließender Differenzierung der Teliosporen (7). Quelle: Abbildung modifiziert nach Kämper *et al.*, 2006.

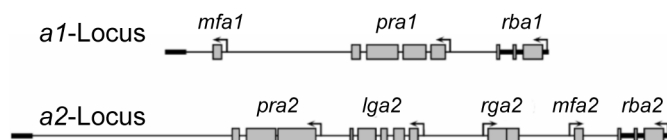
Die Penetration der Pflanzenzellwand wird mit der Ausbildung eines Appressoriums an der Spitze des dikaryotischen Filaments auf der Blattoberfläche eingeleitet (Snetselaar und Mims, 1992, 1993). In *U. maydis* wird die Penetration der Zellwand hauptsächlich durch Sekretion von lytischen Enzymen erreicht (Schirawski *et al.*, 2005). Dies steht im Gegensatz zu anderen phytopathogenen Pilzen, welche die Cuticula durch mechanische Kraft penetrieren (Deising *et al.*, 2000). Die Bildung von Appressorien kann unter Laborbedingungen durch eine hydrophobe Oberfläche in Kombination mit pflanzlichen Cutin-Monomeren wie 16-Hydroxyhexadecansäure *in vitro* induziert werden (Mendoza-Mendoza *et al.*, 2009).

Nach erfolgreicher Penetration der Pflanzenoberfläche erfolgt die Aufhebung des G2-Zellzyklusarrests, wodurch die Proliferation innerhalb der Maispflanze eingeleitet wird (Banuett und Herskowitz, 1994). Während des heterodikaryotischen Wachstums innerhalb des Pflanzengewebes erfolgt die korrekte Verteilung der Zellkerne durch die Bildung von Schnallenzellen (Banuett und Herskowitz, 1996; Scherer *et al.*, 2006). Nach massiver

Proliferation der heterodikaryotischen Hyphen innerhalb des Wirts kommt es zur Ausbildung der charakteristischen Tumore der Maispflanze. In den Tumoren findet die Karyogamie und die daran anschließende Differenzierung der diploiden Teliosporen statt (Snetselaar und Mims, 1993; Banuett und Herskowitz, 1996). Die reifen Sporen werden durch Aufplatzen der Tumore freigesetzt und durch verschiedene Vektoren wie Wind, Regen und Insekten verbreitet. Unter geeigneten Umweltbedingungen keimen die Teliosporen aus und die haploiden Basidiosporen werden vom gebildeten Promyzel nach Abschluss der Meiose abgeschnürt (Christensen, 1963; Banuett und Herskowitz, 1996). Mit dem Auskeimen der Basidiosporen beginnt ein neuer Lebenszyklus.

### 1.2.2 Der *a*-Locus steuert die interzelluläre Erkennung

Der Eintritt in die pathogene Entwicklungsphase wird durch den biallelischen *a*-Locus gesteuert und beginnt mit der Fusion zweier kompatibler Sporidien (Bölker *et al.*, 1992; Urban *et al.*, 1996a). Für eine erfolgreiche Zellfusion sind unterschiedliche *a*-Allele, *a1* und *a2*, nötig. Die Gene des *a1*-Locus kodieren für eine Vorstufe des Pheromons Mfa1 (mating factor a 1) und für den Pheromonrezeptor Pra1 (pheromon receptor a 1) (Abb. 4). Der *a2*-Locus beinhaltet zusätzlich zu den Genen *mfa2* und *pra2* die Gene *lga2* und *rga2*, die für mitochondriale Proteine kodieren (Abb. 4) und Spaltungs- und Fusionsdynamiken der Mitochondrien regulieren (Urban *et al.*, 1996a; Mahlert *et al.*, 2009).



**Abb. 4: Schematische Darstellung des *a1*- und *a2*-Locus.** *mfa1* und *mfa2* kodieren für die Vorstufen der Pheromone. *pra1* und *pra2* für die Pheromonrezeptoren. *lga2* und *rga2* kodieren für Proteine, die an der Regulation von mitochondrialer Spaltungs- und Fusionsdynamik beteiligt sind. Quelle: Abbildung modifiziert nach Brachmann, 2001b.

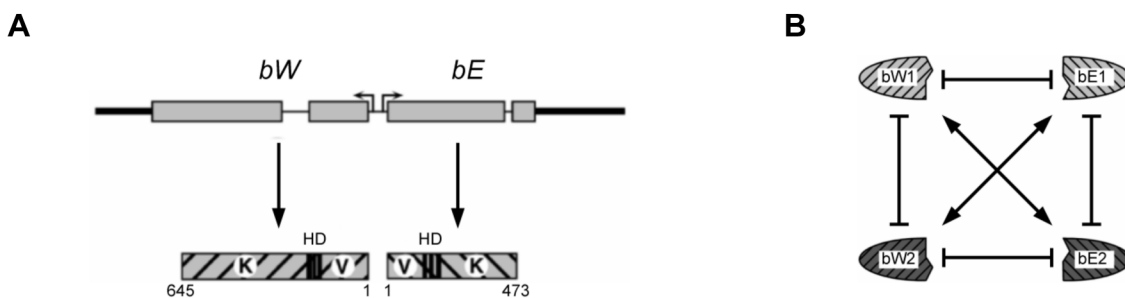
Nach einer posttranslationalen Prozessierung und Modifikation wird das Pheromon sekretiert und vom Pheromonrezeptor des jeweils komplementären Kreuzungspartner perzipiert, wodurch die Zell-Zell-Erkennung gesteuert wird (Spellig *et al.*, 1994). Die Sporidien wachsen entlang eines Pheromongradienten durch Ausbildung von Konjugationshyphen aufeinander zu und fusionieren an deren Spitze (Spellig *et al.*, 1994). Parallel zu diesen Vorgängen wird der Zellzyklus in der G<sub>2</sub>-Phase arretiert (Snetselaar *et al.*, 1996).

Auf molekularer Ebene wird durch die Bindung des Pheromons an den Rezeptor (Pra1/Pra2) ein PKA (Proteinkinase A) abhängiger Signalweg und eine MAPK (Mitogen aktivierte Proteinkinase) Kaskade aktiviert (Brachmann *et al.*, 2003), was zur differenziellen

Phosphorylierung des HMG (high mobility group) Transkriptionsfaktors Prf1 (pheromone response factor 1), dem zentralen Regulator der Pheromonantwort in *U. maydis*, führt (Hartmann *et al.*, 1996; Kaffarnik *et al.*, 2003). Dieser Transkriptionsfaktor reguliert abhängig von seinem Phosphorylierungsstatus unterschiedliche Zielgene (Zarnack *et al.*, 2008), zu denen die *a*-Locus Gene *mfa* und *pra* (Urban *et al.*, 1996a), die *b*-Locus Gene *bE* und *bW* (Hartmann *et al.*, 1996), *rbf1* (Heimel *et al.*, 2010b) und *prf1* selbst gehören. Die Zellfusion ermöglicht die Bildung eines heterodimerischen bE/bW-Transkriptionsfaktors, der indirekt die Expression von *mfa* und *pra* reprimiert und die weitere pathogene Entwicklung steuert (Urban *et al.*, 1996b; Heimel *et al.*, 2010a).

### 1.2.3 Die UPR und die b-vermittelte Regulationskaskade

Die Filamentbildung, die Aufrechterhaltung des G2-Zellzyklusarrests und die Infektion der Maispflanze wird durch den *b*-Locus kodierten heterodimerischen bE/bW-Transkriptionsfaktor gesteuert (Schulz *et al.*, 1990; Kämper *et al.*, 1995). Ein bE/bW-Komplex kann nur gebildet werden, wenn die Proteine von unterschiedlichen Allelen stammen (Abb. 5B) (Kämper *et al.*, 1995). Im Vergleich zum biallelischen *a*-Locus liegt der *b*-Locus in mindestens 19 verschiedenen Allelen vor. Die Gene *bEast* (*bE*) und *bWest* (*bW*) werden unter Kontrolle eines divergenten Promotors exprimiert. Während die Proteine einen hochkonservierten C-terminalen Bereich aufweisen, ist der N-Terminus der Proteine sehr variabel (Abb. 5A) und vermittelt die Heterodimerisierung beider Proteine (Kronstad und Leong, 1990; Gillissen *et al.*, 1992). Notwendig für die Funktionalität des Heterodimers sind darüber hinaus die Homeodomänen beider Proteine, welche die DNA-Bindung vermitteln (Abb. 5A) (Romeis *et al.*, 1997; Schlesinger *et al.*, 1997).



**Abb. 5: Schematische Darstellung des *b*-Locus. (A)** Der *b*-Locus kodiert für die Homeodomänen-Proteine bW und bE. Bei der Darstellung der Proteine bezeichnet V die variablen und K die konstanten Bereiche. HD steht für die Homeodomäne. **(B)** Kompatibilität von bE und bW. Ein Heterodimer kann nur gebildet werden, wenn bE und bW von unterschiedlichen Allelen stammen. Quelle: Abbildung modifiziert nach Brachmann, 2001b.

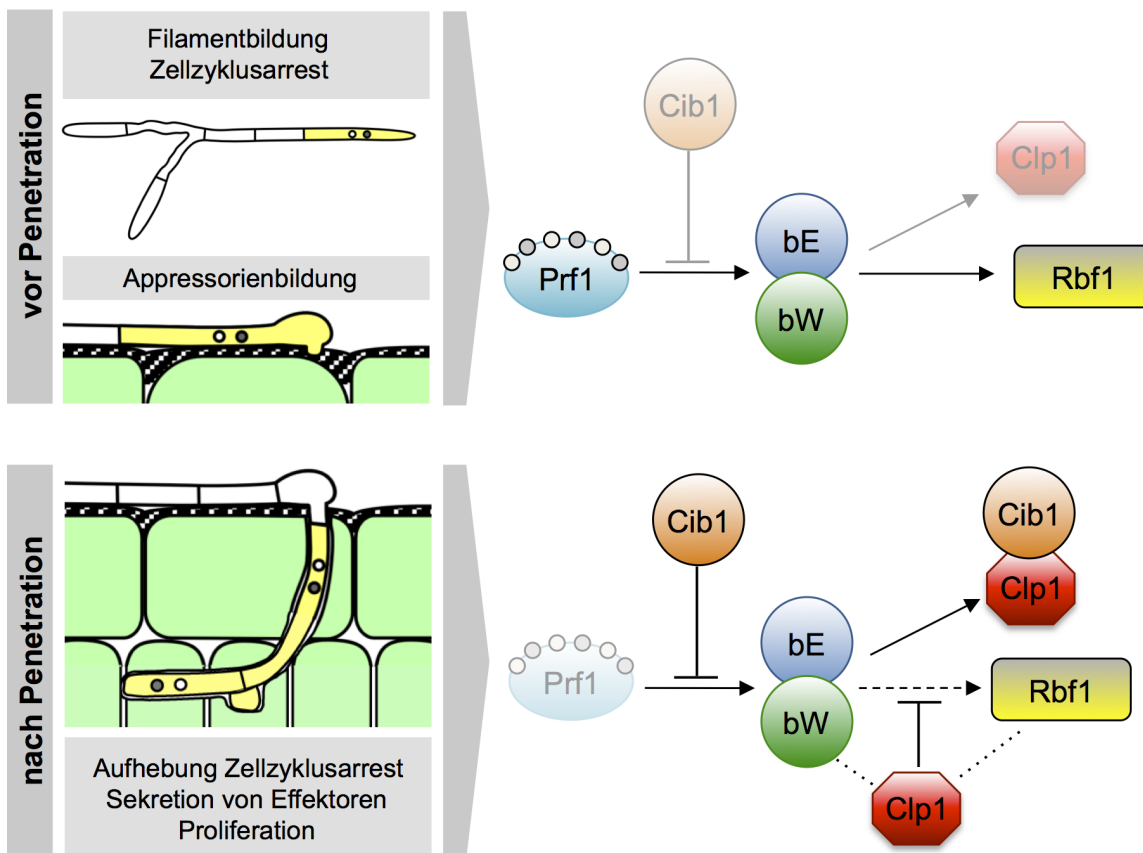
Die Expression eines aktiven b-Heterodimeres induziert den Wechsel vom hefeartigen zum filamentösen Wachstum und ist notwendig und ausreichend für die pathogene Entwicklung von *U. maydis* (Bölker *et al.*, 1995b; Brachmann *et al.*, 2001a; Wahl *et al.*, 2010). Das

bE/bW-Heterodimer reguliert ein hierarchisch strukturiertes Netzwerk, welches aus 345 b-abhängig regulierten Genen besteht (Heimel *et al.*, 2010b). Die direkte Regulation der b-abhängigen Gene wird durch die Bindung des bE/bW-Heterodimers an ein konserviertes Sequenzmotiv, die bbs (b binding site), vermittelt. Das Sequenzmotiv konnte in den b-abhängigen induzierten Genen *Iga2* (Romeis *et al.*, 2000), *frb52* (Brachmann *et al.*, 2001a), *clp1* (Scherer *et al.*, 2006) und *rbf1* (Heimel *et al.*, 2010b) identifiziert und experimentell bestätigt werden. Mehr als 90% der b-abhängig regulierten Gene werden jedoch indirekt über den C2H2 Zinkfinger-Transkriptionsfaktor Rbf1 (regulator of b-filament 1) reguliert (Heimel *et al.*, 2010b). Rbf1 ist notwendig und ausreichend für das b-vermittelte filamentöse Wachstum, den b-induzierten G2-Zellzyklusarrest, die Bildung von Appressorien und die Penetration der Pflanzenoberfläche und repräsentiert somit den Masterregulator innerhalb des b-abhängigen Regulationsnetzwerks (Heimel *et al.*, 2010a; Heimel *et al.*, 2010b).

Für die Proliferation *in planta* wird der Pathogenitätsfaktor Clp1 (clampless 1) benötigt. Als direkt b-reguliertes Gen kann die *clp1* Expression unmittelbar nach Induktion des bE/bW-Heterodimers detektiert werden. Das Clp1 Protein kann jedoch erst nach erfolgreicher Penetration der Pflanzenoberfläche nachgewiesen werden (Heimel *et al.*, 2010a). Clp1 koordiniert durch direkte physikalische Interaktion mit bW und Rbf1 die a- und b-abhängigen Signalwege und dadurch die Proliferation der Hyphen innerhalb der Pflanze. Die Interaktion von Clp1 mit bW reprimiert die b-abhängige Genregulation, wohingegen die Interaktion mit Rbf1 zur Repression des Pheromon-Signalwegs führt, was schlussendlich die Aufhebung des Zellzyklusarrests nach erfolgreicher Pflanzenpenetration zur Folge hat und die Proliferation innerhalb der Wirtspflanze ermöglicht (Heimel *et al.*, 2010a).

In vorangegangenen Studien konnte gezeigt werden, dass in *U. maydis* neben den bekannten Pathogenitätsfaktoren bW und Rbf1 auch Cib1 (Clp1 interacting bZIP 1), das Homolog des zentralen UPR Regulators Hac1p, mit Clp1 interagiert. Cib1 reguliert neben der UPR nicht nur die ER-Stressantwort, sondern koordiniert durch die Wechselwirkung mit Clp1 auch die biotrophe Entwicklung von *U. maydis* (Heimel *et al.*, 2013). Die Deletion von *cib1* hat analog zur  $\Delta clp1$  Mutante einen vollständigen Verlust der Pathogenität zur Folge. Zudem ist die Proliferation beider Deletionsmutanten nach Penetration der Blattoberfläche blockiert (Scherer *et al.*, 2006; Heimel *et al.*, 2010a). Obwohl auf Transkriptebene konstitutiv exprimiert, kann die Expression des Cib1-GFP Fusionsproteins, ähnlich wie für Clp1 beschrieben, erst nach erfolgreicher Penetration der Pflanzenoberfläche nachgewiesen werden (Heimel *et al.*, 2010a). Die Interaktion zwischen Clp1 und Cib1 wird durch den C-terminalen Bereich von Cib1 (Clp1-ID, Aminosäure 434-574) vermittelt und hat die Stabilisierung von Clp1 zur Folge. Die erhöhten Mengen an Clp1 ermöglichen die Aufhebung

des G2-Zellzyklusarrests und die Proliferation der dikaryotischen Hyphen *in planta* (Heimel *et al.*, 2013).



**Abb. 6: Model der Cib1 Interaktion mit der b-vermittelten Regulationskaskade.** Filamentöses Wachstum wird durch die *bE/bW* abhängige Induktion der *rbf1* Expression ausgelöst. Erhöhte Mengen an *Rbf1* werden für das filamentöse Wachstum, die Aufrechterhaltung des G2-Zellzyklusarrests und die Penetration der Maispflanze benötigt. Nach Penetration der Pflanze werden die Proteine *Clp1* und *Cib1* gebildet. Die Interaktion von *Clp1* und *Cib1* hat die Stabilisierung von *Clp1* zur Folge. Die erhöhten *Clp1* Mengen führen zur Suppression des *b*-Signalwegs durch Interaktion mit *bW* und *Rbf1* (gestrichelte Linien). Das Ergebnis ist die Aufhebung des Zellzyklusarrests, die verstärkte Sekretion von Effektoren und die Kolonisierung der Maispflanze. Quelle: Abbildung modifiziert nach Heimel *et al.*, 2013.

Die entwicklungspezifische UPR-Aktivierung ist notwendig für die pathogene Entwicklung von *U. maydis*. Eine vorzeitige UPR Aktivierung führt zu einer verringerten Expression der *bE*, *bW* und *rbf1* Gene und wirkt dem morphologischen Wechsel vom hefeartigen zum filamentösen Wachstum entgegen. Die Wechselwirkungen der UPR mit den Signalwegen der pathogenen Entwicklung finden auf verschiedenen Ebenen statt und stellen einen zentralen Regulationsmechanismus der biotrophen Wachstumsphase dar. Eine zeitlich abgestimmte Koordination und die Modulation der entwicklungspezifischen Signalwege durch die UPR sind Voraussetzung für die pathogene Entwicklung von *U. maydis* (Heimel *et al.*, 2013). Die zu Grunde liegenden Regulationsmechanismen wurden bisher unzureichend charakterisiert und sollen im Rahmen dieser Arbeit weitergehend untersucht werden.

#### 1.2.4 Die Funktion sekretierter Effektoren innerhalb der pathogenen Entwicklung von *U. maydis*

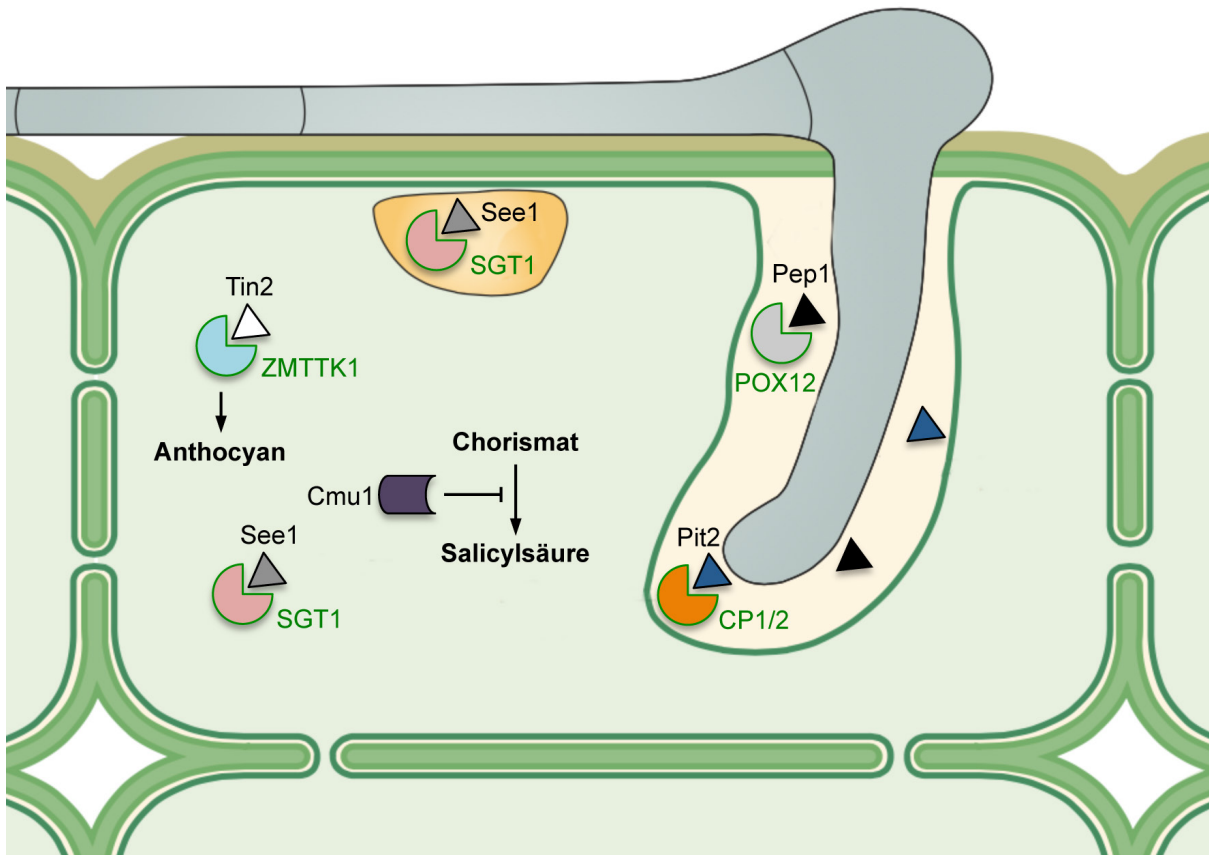
Für eine erfolgreiche Infektion müssen biotrophe Pathogene eine kompatible Interaktion mit der Wirtspflanze etablieren, indem sie aktiv die Pflanzenabwehr supprimieren und den Stoffwechsel der Wirtszellen beeinflussen (Okmen und Doehlemann, 2014; Lo Presti *et al.*, 2015b). Die durch Pflanzen dauerhaft sekretierten Chitinasen führen bei Kontakt eines Pilzes mit der Pflanzenoberfläche zur Hydrolyse der pilzlichen Zellwand und damit zur Freisetzung von Chitin-Fragmenten. Chitin ist ein sogenanntes PAMP (pathogen-associated molecular pattern), das im Apoplasten der Pflanze durch die Bindung an PRRs (pattern recognition receptors) erkannt wird und eine als PTI (PAMP-triggered immunity) bezeichnete Immunantwort auslöst (Zipfel, 2009). Dieser wirkt das Pathogen durch die Sekretion von Effektoren in einem Prozess, der als ETS (effector triggered susceptibility) bezeichnet wird, entgegen.

Ein Kennzeichen für die erfolgreiche Erkennung eines Pathogens durch die Pflanze ist die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS), den Schlüsselmolekülen der Pflanzenabwehrreaktion (Lamb und Dixon, 1997). Bei einer Infektion mit *U. maydis* wird die Freisetzung von ROS verhindert, indem der apoplastische Effektor Pep1 direkt an die pflanzliche Peroxidase POX12 bindet, wodurch die Aktivität der Peroxidase inhibiert wird. Die Deletion von *pep1* führt zu einem vollständigen Verlust der Pathogenität und verhindert die erfolgreiche Penetration der Pflanzenoberfläche (Doehlemann *et al.*, 2009; Hemetsberger *et al.*, 2012).

Pflanzen reagieren auf die Anwesenheit von Pathogenen zusätzlich mit der Produktion von Phytohormonen, den zentralen Regulatoren der Pflanzenabwehr (Pieterse *et al.*, 2012). Das Phytohormon Salicylsäure (SA) wird als Reaktion auf biotrophe Pathogene gebildet und induziert die Apoptose der Pflanzenzellen (Vlot *et al.*, 2009). *U. maydis* ist in der Lage, die SA abhängige Immunantwort der Pflanze durch die Sekretion von Effektoren zu unterdrücken. Während der apoplastische Protease-Inhibitor Pit2 eine Gruppe von Cystein-Proteasen der Maispflanze inhibiert (Doehlemann *et al.*, 2011), reduziert die Chorismatmutase Cmu1 die SA-Synthese durch Interaktion mit der pflanzlichen Chorismatmutase ZmCm2 (Djamei *et al.*, 2011). Cmu1 wird ins Cytoplasma der Pflanzenzelle transloziert und breitet sich von dort auf noch nicht infizierte Nachbarzellen aus, wodurch die SA-Produktion auch im angrenzenden Gewebe reduziert und eine anschließende Infektion durch den Pilz erleichtert wird (Djamei *et al.*, 2011).

Neben Phytohormonen wird auch die Bildung von Sekundärmetaboliten der Pflanze, wie Anthocyan, durch Effektoren beeinflusst. Tin2 ist ein Effektor, der ins Cytoplasma der Pflanzenzelle transloziert wird und dort die Anthocyan-Biosynthese beeinflusst. Tin2 interagiert mit der pflanzlichen Proteinkinase ZmTTK1, wodurch die Expression von Genen,

die an der Anthocyan synthese beteiligt sind, induziert werden. Da Anthocyan synthese und Lignifizierung sich gegenseitig ausschließen, wird auf diese Art und Weise eine Lignifizierung unterdrückt und die Kolonisierung der Pflanzenzellen durch den Pilz erleichtert (Tanaka *et al.*, 2014).



**Abb. 7: Lokalisierung der charakterisierten Effektor Proteine *in planta*.** Durch Penetration der Pflanzenzellwand entsteht ein Extrazellularraum, genannt Apoplast, zwischen Pilzhyphe und Plasmamembran der Pflanzenzelle. In diesem Bereich sind die Effektoren Pep1 und Pit2 lokalisiert. Die zweite Gruppe, die cytoplasmatischen Effektoren, werden von der Pflanzenzelle aufgenommen. Tin2 ist ausschließlich im Cytoplasma lokalisiert wohingegen See1 und Cmu1 auch im Zellkern der Pflanze nachgewiesen werden konnten. Quelle: Abbildung modifiziert nach Giraldo und Valent, 2013.

Auch eine organspezifische Expression von Effektoren konnte beobachtet werden. Der cytoplasmatische Effektor See1 (seedling efficient effector 1) wird spezifisch für die Tumorbildung in den Blättern von Maiskeimlingen benötigt. See1 interagiert mit dem Homolog von SGT1 (suppressor of G2 allele of *skp1*) der Maispflanze wodurch die MAPK induzierte Phosphorylierung von SGT1 moduliert wird. Dies ist Voraussetzung für die Tumorentwicklung in Maisblättern und trägt zur Reaktivierung der pflanzlichen DNA-Synthese bei (Redkar *et al.*, 2015).



### 1.2.5 Die Regulation der Effektorgenexpression

Das Genom von *U. maydis* enthält 386 Gene, die für potenziell sekretierte Proteine kodieren und somit als Effektoren fungieren könnten (Mueller *et al.*, 2008). Viele dieser möglichen Effektor kodierenden Gene sind in Clustern organisiert und ihre Expression ist während der Kolonisierung der Pflanze induziert (Kämper *et al.*, 2006; Schirawski *et al.*, 2010). Dabei ist die Expression von Effektoren auf definierte Entwicklungsstadien oder verschiedene Wirtsumgebungen während der Kolonisierung ausgerichtet (Kleemann *et al.*, 2012; O'Connell *et al.*, 2012). So ist die Expression der Gene, die für die Effektoren Pit2 und Pep1 kodieren, bereits in der frühen Phase der Infektion induziert und notwendig für die Etablierung einer kompatiblen Interaktion zwischen Pathogen und Wirtspflanze (Doehlemann *et al.*, 2009; Doehlemann *et al.*, 2011; Hemetsberger *et al.*, 2012; Mueller *et al.*, 2013). Im Gegensatz dazu sind andere Effektoren wie See1 und Tin2 erst zu einem späten Zeitpunkt der Tumorgenese induziert (Tanaka *et al.*, 2014; Redkar *et al.*, 2015). Allerdings ist der zu Grunde liegende Mechanismus der Effektorgenregulation bisher noch weitgehend unbekannt. In *Epichloë festucae* und *Leptosphaeria maculans* konnte eine Regulation der Effektorgenexpression auf epigenetischer Ebene nachgewiesen werden (Chujo und Scott, 2014; Soyer *et al.*, 2014). Die Expression einiger Effektorgene in *U. maydis* wird bereits von der Pflanzenpenetration induziert und überwiegend durch die Transkriptionsfaktoren Biz1 und Hdp2 gesteuert (Flor-Parra *et al.*, 2006; Heimel *et al.*, 2010b; Lanver *et al.*, 2014). Diese Transkriptionsfaktoren wiederum werden durch Rbf1, dem Masterregulator des b-abhängigen Regulationsnetzwerks, induziert (Heimel *et al.*, 2010a; Heimel *et al.*, 2010b). Da eine aktive UPR die *rbf1* Expression supprimiert, könnte die Effektorexpression durch Biz1 und Hdp2 negativ beeinflusst werden (Heimel *et al.*, 2013). In der weiteren Entwicklung wird für die Tumorgenese in *U. maydis* eine organspezifische Genexpression sowohl beim Wirt als auch beim Pathogen benötigt (Skibbe *et al.*, 2010).

Wie bereits beschrieben, wird die Expression einer Vielzahl von Effektor kodierender Gene während der frühen Phase der biotrophen Entwicklung von *U. maydis* massiv induziert. Die verstärkte Sekretion der Effektoren stellt eine enorme Belastung für das ER und den sekretorischen Apparat dar. Es wird vermutet, dass auf diese Weise die UPR aktiviert wird, welche für die weitere Entwicklung *in planta* und für die Aufrechterhaltung der Homöostase im ER während der Sekretion von Effektoren essenziell ist (Heimel *et al.*, 2013; Lo Presti *et al.*, 2015a). Die Infektion von Maispflanzen durch die  $\Delta cib1$  Mutante hat eine erhöhte *pr* (pathogenesis-related) Genexpression zur Folge, was auf eine Beteiligung der UPR bei der Suppression des pflanzlichen Immunsystems durch die Sekretion von Effektoren hindeutet. Weiter wird eine funktionelle UPR für die Entwicklungskontrolle *in planta* benötigt und ist eng mit den Signalwegen verknüpft, welche die pathogene Entwicklung in *U. maydis* steuern (Heimel *et al.*, 2013). Diese mehrschichtige Verknüpfung zwischen der UPR und den

zentralen Regulatoren der pathogenen Entwicklung in *U. maydis* lässt vermuten, dass neben der Effektorsekretion auch die Transkriptionsregulation von Effektor kodierenden Genen durch den UPR-Signalweg beeinflusst werden könnte.

### **1.3 Zielsetzung der Arbeit**

Die UPR (unfolded protein response) ist ein hoch konservierter Signalweg, der für die Aufrechterhaltung der Homöostase im ER notwendig ist (Walter und Ron, 2011). Mit dem essenziellen Pathogenitätsfaktor Cib1 konnte das Homolog des zentralen UPR Regulators Hac1p in *U. maydis* identifiziert werden. Die UPR wird spezifisch nach erfolgreicher Penetration der Blattoberfläche aktiviert und ist eng mit den Signalwegen verknüpft, welche die pathogene Entwicklung steuern. So ist die Suppression des b-abhängigen Signalwegs durch die Interaktion von Cib1 mit Clp1, einem essenziellen Regulator der pathogenen Entwicklung, Voraussetzung für die Aufhebung des G2-Zellzyklusarrests und die Proliferation *in planta* (Heimel *et al.*, 2013). Ziel dieser Arbeit ist es, den UPR-Signalweg in *U. maydis* genauer zu charakterisieren und die regulatorischen Verknüpfungen und Modulation der entwicklungsspezifischen Signalwege infolge einer aktiven UPR genauer zu untersuchen. Darüber hinaus sollen im Zusammenhang mit der drastisch verstärkten Sekretion von Effektoren während der pathogenen Entwicklung mögliche Verknüpfungen zwischen dem UPR-Signalweg und der Regulation und Sekretion spezifischer Effektoren untersucht werden. Vergleiche der UPR-Signalwege aus *S. cerevisiae* und *H. sapiens* mit *U. maydis* sollen Rückschlüsse ermöglichen, in welchem Umfang die regulatorischen Mechanismen der UPR in *U. maydis* konserviert sind.

## 2 Ergebnisse

In *Ustilago maydis* wurde Clp1 als wichtiger Entwicklungsregulator identifiziert, der durch direkte Interaktion mit bW und dem Masterregulator Rbf1 die Proliferation *in planta* steuert. Die Regulation von Clp1 findet sowohl auf transkriptioneller Ebene durch das b-Heterodimer, als auch auf posttranskriptioneller Ebene statt. Obwohl die *clp1* mRNA bereits 1 h nach Aktivierung des b-Signalwegs nachweisbar ist, kann ein fluoreszenzmarkiertes Clp1-Fusionsprotein erst nach Penetration der Pflanzenoberfläche mikroskopisch detektiert werden (Heimel *et al.*, 2010a). Als Interaktionspartner von Clp1 konnte neben bW und Rbf1 der bZIP Transkriptionsfaktor Cib1 (Clp1 interacting bZip1, *UMAG\_11782*) identifiziert werden, wobei sowohl *clp1* als auch *cib1* essenziell für die pathogene Entwicklung sind. Die Deletion von *cib1* hat eine Phänokopie der  $\Delta clp1$  Mutante zur Folge: beide Mutanten können die Pflanzenoberfläche penetrieren, die Proliferation innerhalb der Pflanze ist jedoch blockiert (Scherer *et al.*, 2006; Heimel *et al.*, 2010a).

Expressionstudien konnten zeigen, dass die Expression des Cib1-Proteins ebenfalls posttranskriptionell durch konditionales Spleißen reguliert ist. Das Spleißen des *cib1* Transkriptes erfolgt nach der Penetration der Pflanzenoberfläche, wodurch die Expression des aktiven bZIP Transkriptionsfaktors Cib1 induziert wird (Heimel *et al.*, 2010a). Weiterführende Untersuchungen zeigten eine deutlich erhöhte ER-Stresssensitivität der  $\Delta cib1$  Mutanten, was darauf hindeutet, dass es sich bei Cib1 um das Homolog von Hac1p dem zentralen UPR (unfolded protein response) Regulator in *S. cerevisiae* handeln könnte.

### 2.1 Der zentrale UPR Regulator Cib1 in *U. maydis*

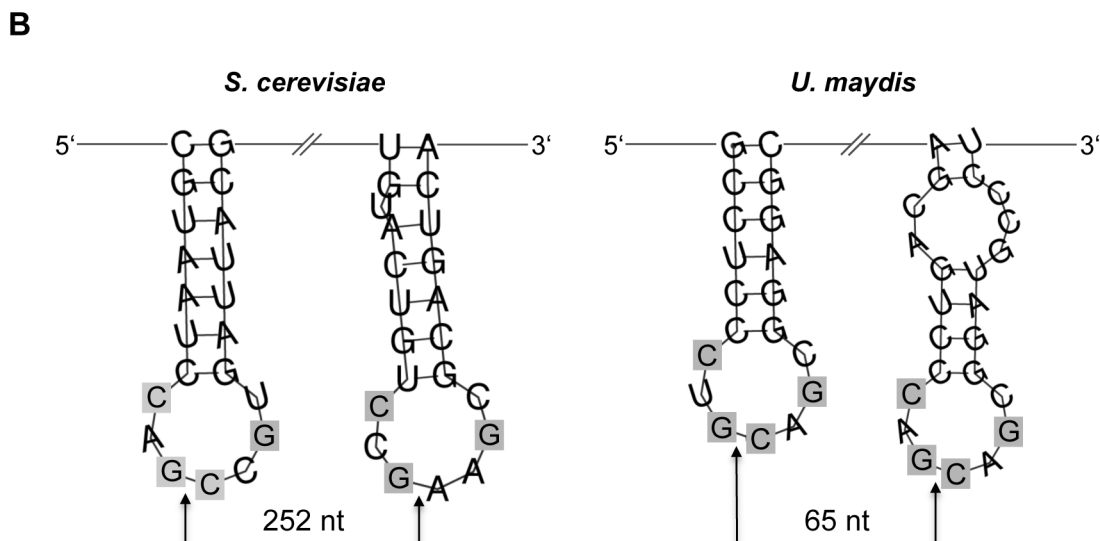
Der linear aufgebaute UPR-Signalweg in *S. cerevisiae* wird durch den Stresssensor Ire1p (inositol requiring enzyme 1) und den bZIP Transkriptionsfaktor Hac1p (homologous to ATF-CREB1) reguliert. Die Akkumulation von un- oder fehlgefalteten Proteinen führt zur Aktivierung von Ire1p und zum sequenzspezifischen unkonventionellen Spleißen der *HAC1* mRNA. Die gespleißte *HAC1* mRNA kodiert für den zentralen UPR-Regulator Hac1p, der die Expression der UPR-Zielgene induziert, wodurch die Homöostase im ER wiederhergestellt werden kann (Walter und Ron, 2011; Hetz, 2012).

#### 2.1.1 Struktur und Homologie der *cib1* mRNA

Die mRNA der zu Hac1p homologen Proteine besitzt eine typische Sekundärstruktur. Um zu überprüfen, ob die *cib1* mRNA eine entsprechende Sekundärstruktur aufweist, wurden entsprechende Sequenzvergleiche durchgeführt. Die Sequenzvergleiche zeigen, dass die Intron/Exon Grenzen von *cib1* vollständig mit der Konsensussequenz (CNG'CNGN) aus

Hooks und Griffiths-Jones, 2011 übereinstimmen (Abb. 8A). Diese spezifische Sequenz ist in weiteren Basidio- und Ascomyceten und in höheren Eukaryoten konserviert (Saloheimo *et al.*, 2003; Wimalasena *et al.*, 2008; Richie *et al.*, 2009; Cheon *et al.*, 2011) (Abb. 8A).

	5' Spleißregion	3' Spleißregion
Sc	CGUAAUCCAG <b>CCG</b> UGAUUAC	<b>GUACUGUCCGAAGCG</b> CAGUC
Um	CGCCUCC <b>UGCAG</b> CGGAGGC	<b>GCAGUCCAGCAGCG</b> GAUGC
Tr	CAACGUCC <b>UGCAG</b> AGAUGUU	<b>GUGCGACCCGCAG</b> UGUCAAU
Af	CAACAUCC <b>UGCAG</b> CGGUGUU	<b>GUGCGACCUGCAG</b> UGUCAGU
Ca	GCUGAUUU <b>AGCAG</b> CAAUCAG	<b>GUCUAGCCAGCAG</b> AGCCAAU
Cn	UGCCACU <b>CAGCAG</b> UAGUGGC	<b>UGUGGCCCUCCAG</b> CGGGCGA
Hs	GCUGAGUCC <b>GCAG</b> CACUCAG	<b>UGCACCUCUGCAG</b> CAGGUGC
Konsensus	-----C- <b>GCAG</b> ---U----	G-----CC- <b>GCAG</b> -G-----
Hooks <i>et al.</i>	-----C-GC-G-----	-----C-GC-G-----



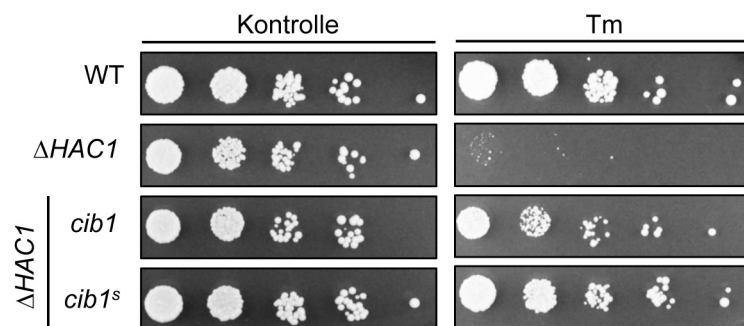
**Abb. 8: Überblick der Spleißregionen der *HAC1* Homologe.** (A) Vergleich der unkonventionellen Spleißregionen der mRNAs verschiedener *HAC1* Homologe. Grau unterlegt ist die Intronsequenz dargestellt. Konservierte Nukleotide sind fett gedruckt. Die Sequenz nach Hooks und Griffiths-Jones, 2011 ist bei fünf von sieben Spezies vollständig konserviert. Sc = *Saccharomyces cerevisiae HAC1*; Um = *Ustilago maydis cib1*; Tr = *Trichoderma reesei hac1*; Af = *Aspergillus fumigatus hacA*; Ca = *Candida albicans HAC1*; Cn = *Cryptococcus neoformans HXL1*; Hs = *Homo sapiens XBP1*. Quelle: Abbildung modifiziert nach Heimel *et al.*, 2013. (B) Vorhersage der Sekundärstruktur der unkonventionellen Spleißregionen in *S. cerevisiae HAC1* und *U. maydis cib1* mRNA. Die Schnittstellen des Ire1 vermittelten unkonventionellen Spleißens sind durch Pfeile gekennzeichnet. Das Intron bei *S. cerevisiae* ist mit 252 Nucleotiden (nt) deutlich größer als bei *U. maydis* (65 nt). Die konservierten Nukleotide der Sequenzen nach Hooks und Griffiths-Jones, 2011 sind grau hinterlegt. Zur Vorhersage der Sekundärstruktur wurde das Programm RNAfold verwendet (<http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAfold.cgi>).

Ein weiterer Hinweis auf eine mögliche Homologie von *cib1* und *HAC1* kann durch die vorhergesagte Sekundärstruktur der 5' bzw. 3' Spleißregion der *cib1* mRNA abgeleitet werden. Die durch das Programm RNAfold (<http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAfold.cgi>) vorhergesagte Sekundärstruktur der *cib1* mRNA zeigt die für *HAC1* Homologe beschriebene charakteristische Haarnadelstruktur (Gonzalez *et al.*, 1999; Niwa *et al.*, 2005). Die endonukleolytische Spaltungsstelle, an welcher das Spleißen durch Ire1p stattfindet, ist wie

in *S. cerevisiae* nach einem G an dritter Position der sieben-Nukleotid-Schleife lokalisiert (Abb. 8B). Zusammenfassend unterstützen diese Beobachtungen die Annahme, dass es sich bei Cib1 um das Homolog des zentralen UPR Regulators Hac1p handelt.

### 2.1.2 Die Expression von *cib1* komplementiert die erhöhte ER-Stresssensivität der $\Delta HAC1$ Mutante in *S. cerevisiae*

Um eine mögliche Konservierung der Funktion von Cib1 und Hac1p zu überprüfen, wurde eine Komplementationsstudie in *S. cerevisiae* durchgeführt. Hierzu wurde der  $\Delta HAC1$  Stamm (Herzog *et al.*, 2013) mit Derivaten des p414MET25 CEN-Plasmids (single copy) (Mumberg *et al.*, 1994) transformiert, das *cib1* oder *cib1<sup>s</sup>* (ohne Intron) unter Kontrolle des MET25 Promotors exprimiert. Zur Analyse der ER-Stressresistenz wurden Verdünnungen der Stämme auf YNB Festmedium getropft. Zur Induktion von ER-Stress wurde Tunicamycin (Tm), ein Inhibitor der N-Glykosylierung, verwendet. Im Vergleich zum WT zeigt der  $\Delta HAC1$  Stamm eine drastisch reduzierte ER-Stressresistenz (Abb. 9), die durch Expression von *cib1* oder der gespleißten Form *cib1<sup>s</sup>* nahezu vollständige wiederhergestellt werden kann (Abb. 9). Folglich zeigen diese Untersuchungen, dass Cib1 die Funktion von Hac1p übernehmen kann und die durch *cib1* kodierte mRNA durch Ire1p in Hefe gespleißt wird.



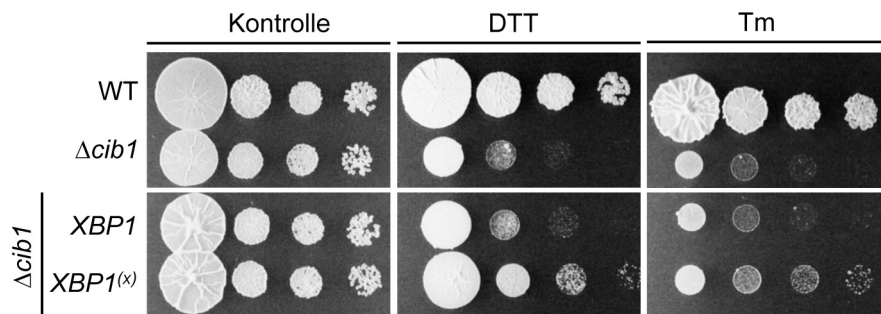
**Abb. 9: Komplementation des zentralen UPR-Regulators *HAC1* durch *cib1* in *S. cerevisiae*.** 10-fach Verdünnungsreihen des *S. cerevisiae* Stammes  $\Sigma 1278b$  (WT) (Strittmatter *et al.*, 2006) und Derivate wurden auf YNB Festmedium mit und ohne 0,5  $\mu\text{g/ml}$  Tunicamycin (Tm) getropft. Zur Komplementation wurden in den  $\Delta HAC1$  Stamm Derivate des Plasmids p414MET25 (Mumberg *et al.*, 1994), das den offenen Leserahmen von *cib1*, mit oder ohne Intron (*cib1<sup>s</sup>*) enthält, transformiert. Die Expression erfolgt unter Kontrolle des *MET25* Promotors. Die Platten wurden 48 h bei 30°C inkubiert.

### 2.1.3 Partielle Komplementation der $\Delta cib1$ Mutante durch XBP1 aus *Homo sapiens*

In Wirbeltieren besteht die UPR aus einem komplexen Netzwerk von Signalwegen, die verschiedene zelluläre Antworten vermitteln. Die Regulation dieser Vorgänge wird durch die drei ER-Stresssensoren IRE1 (inositol requiring enzyme 1), ATF6 (activating transcription factor 6) und PERK (protein kinase RNA-like ER kinase), gesteuert (Hetz, 2012). Der in niederen Eukaryoten konservierte IRE1 Signalweg wird in *H. sapiens* durch den

Transkriptionsfaktor XBP1 (X-box binding protein 1), welcher homolog zu Hac1p aus *S. cerevisiae* ist, reguliert (Calfon *et al.*, 2002).

Im Weiteren wurde eine mögliche Komplementation von  $\Delta cib1$  Stämmen durch Expression von XBP1 aus *H. sapiens* untersucht. Hierzu wurde die XBP1 cDNA (Mammalian Gene Collection) unter dem konstitutiv aktiven *otef* Promotor (Spellig *et al.*, 1996) im FB1  $\Delta cib1$  Stamm exprimiert. In der Analyse zeigte der  $\Delta cib1$  Stamm eine deutlich reduzierte ER-Stressresistenz im Vergleich zum WT (Abb. 10). Durch mehrfache Integration des XBP1 exprimierenden Plasmids ( $XBP1^{(x)}$ ) in den *ip* Locus (Keon *et al.*, 1991) kann die ER-Stressresistenz der  $\Delta cib1$  Mutante teilweise wiederhergestellt werden (Abb. 10). Durch diesen Ansatz konnten erste Hinweise auf eine mögliche funktionelle Übereinstimmung der UPR-Regulation zwischen *U. maydis* und *H. sapiens* erlangt werden.



**Abb. 10: Komplementation der  $\Delta cib1$  Mutante durch XBP1 aus *H. sapiens*.** 10-fach Verdünnungsreihen des FB1 Stammes und Derivate wurden auf YNB Festmedium getropft. ER-Stress wurde durch 2  $\mu$ g/ml Tunicamycin (Tm) oder 2 mM DTT induziert. Für die Komplementationsanalyse wurde XBP1 unter Kontrolle des konstitutiv aktiven *otef* Promotors in den *ip* Locus der  $\Delta cib1$  Mutante integriert. (x) steht für eine mehrfache Integration des Plasmids in den *ip* Locus. Die Platten wurden 48 h bei 28°C inkubiert.

#### 2.1.4 ER-Stress führt zum Spleißen der *cib1* mRNA und zur Induktion des UPR-Zielgens *bip1*

Die bioinformatischen Analysen und die Komplementationsstudien von *cib1* geben einen deutlichen Hinweis darauf, dass die Regulation des Ire1 abhängigen UPR-Signalwegs in *U. maydis* konserviert ist. Um diese Annahme weitergehend zu untersuchen, wurden umfangreiche qRT-PCR Analysen in *U. maydis* durchgeführt. Zum einen wurde das Spleißen der *cib1* mRNA analysiert, indem die Expressionslevel der gespleißten (*cib1<sup>s</sup>*) und ungespleißten (*cib1<sup>u</sup>*) mRNA bestimmt wurden (siehe auch Abb. 14A). Zum anderen wurde die Aktivierung der UPR durch die Expressionslevel von *UMAG\_15034* ermittelt, das für das Ortholog des ER-Chaperon Kar2p/Bip1 (e-value: 0) kodiert. *KAR2/BiP1* ist ein konserviertes UPR-Zielgen, und die Expression wird durch ER-Stress stark induziert (Normington *et al.*, 1989; Rose *et al.*, 1989).

Für die Analyse wurde der Stamm SG200 (WT) und verschiedene Derivate in YNB Flüssigmedium kultiviert und zur Induktion von ER-Stress mit Tunicamycin (Tm) oder

Dithiothreitol (DTT) behandelt. Bei SG200 handelt es sich um einen solopathogenen Stamm, der ein kompatibles b-Heterodimer exprimiert und somit ohne einen Kreuzungspartner Maispflanzen infizieren kann (Kämper *et al.*, 2006).

In Abwesenheit von ER-Stress kann im WT eine Basalexpression der gespleißten *cib1* mRNA (*cib1<sup>s</sup>*) beobachtet werden. ER-Stress dagegen führt zu einer Induktion der Expression von *cib1<sup>s</sup>* und *bip1* (Abb. 11). Dies zeigt, dass ER-Stress das Spleißen der *cib1* mRNA induziert, und die UPR aktiviert wird.

Im Gegensatz dazu kann im  $\Delta$ *cib1* Hintergrund keine *bip1* Induktion durch ER-Stress beobachtet werden. Dies kann durch Integration von *cib1* unter dem nativen Promotor in den *ip* Locus der  $\Delta$ *cib1* Mutante wiederhergestellt werden (Abb. 11). Aus diesen Beobachtungen kann man schließen, dass Cib1 essenziell für die ER-Stress abhängige Expression von *bip1* ist.

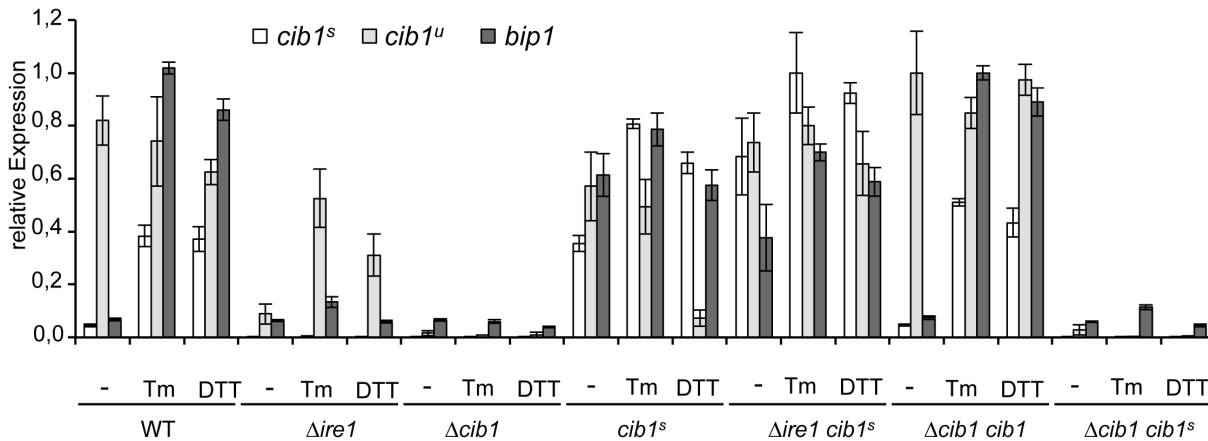
Aus *S. cerevisiae* ist bekannt, dass unter ER-Stress die *HAC1* mRNA durch Ire1p gespleißt wird (Cox und Walter, 1996). Die Deletion von *UMAG\_03481*, dem möglichen *ire1* Homolog aus Hefe (e-value: 1,6e-95), führt zu einem Verlust des Spleißens der *cib1* mRNA, was durch das Fehlen der *cib1<sup>s</sup>* Expression deutlich wird. Neben dem Spleißen ist eine Aktivierung der UPR, nachweisbar durch die Expression des UPR-Zielgens *bip1* unter ER-Stress, ebenfalls blockiert (Abb. 11). Der Verlust der UPR-Aktivierung durch das fehlende Spleißen der *cib1* mRNA unter ER-Stress bestätigt eine *ire1* abhängige Regulation der UPR und deutet darauf hin, dass es sich bei *UMAG\_03481* um das funktionelle Homolog von Ire1p in *S. cerevisiae* handeln könnte.

Um zu überprüfen, ob die Expression der gespleißten und damit aktiven *cib1* Form (*cib1<sup>s</sup>*) ausreichend für die Aktivierung der UPR ist, wurde *cib1<sup>s</sup>* unter Kontrolle des nativen Promotors in den *ip* Locus des WT und der  $\Delta$ *ire1* Mutante integriert. Die Expression von *cib1<sup>s</sup>* im WT zeigt bereits in Abwesenheit von ER-Stress eine Induktion von *bip1* und somit eine UPR-Aktivierung. Während durch Induktion von ER-Stress das Expressionslevel von *cib1<sup>s</sup>* im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle nochmals deutlich erhöht ist, bleibt das Expressionslevel von *bip1* konstant (Abb. 11). Folglich sind die *cib1<sup>s</sup>* Level in Abwesenheit von ER-Stress bereits ausreichend, um die *bip1* Expression vollständig zu induzieren. Die Expressionslevel von *cib1<sup>u</sup>*, *cib1<sup>s</sup>* und *bip1* im  $\Delta$ *ire1 cib1<sup>s</sup>* Stamm sind analog zum *cib1<sup>s</sup>* Stamm (Abb. 11). Dies zeigt, dass die UPR durch *cib1<sup>s</sup>* Expression unabhängig von ER-Stress und vom Spleißen der *cib1* mRNA aktiviert werden kann.

Zusätzlich wurde *cib1<sup>s</sup>* in den  $\Delta$ *cib1* Stamm eingebracht, womit getestet werden soll, ob die Expression von *cib1<sup>s</sup>* ausreichend für die UPR-Regulation ist. In diesem Stamm konnte keine *cib1<sup>s</sup>* Expression detektiert werden, und das Expressionsmuster entsprach der  $\Delta$ *cib1* Mutante (Abb. 11). Eine mögliche Erklärung ist, dass die Expression von *cib1<sup>s</sup>* in diesem

Stammhintergrund letal ist, und dieser Stamm somit kein funktionelles *cib1<sup>s</sup>* integriert hat (siehe 2.6.2).

Zusammenfassend konnte mit dieser initialen Expressionsstudie gezeigt werden, dass ER-Stress analog zu *S. cerevisiae* zum Spleißen der *cib1* mRNA führt und die Expression des UPR-Zielgens *bip1* aktiviert wird. Für eine Aktivierung der UPR ist sowohl *cib1* als auch *ire1* essenziell, da die Deletion dieser Gene den Verlust der Regulation zur Folge hat. Weiter ist die Expression von *cib1<sup>s</sup>* im WT und  $\Delta ire1$  Stamm ausreichend um die UPR zu aktivieren.



**Abb. 11: Die Genexpression von *cib1<sup>s</sup>*, *cib1<sup>u</sup>* und *bip1* in den Stämmen SG200 und Derivaten unter ER-Stress.** Die RNA wurde aus exponentiell wachsenden *U. maydis* Kulturen SG200 (WT) und Derivaten in YNB Flüssigmedium isoliert. ER-Stress wurde durch Zugabe von 5 µg/ml Tunicamycin (Tm) für 4 h bzw. 3 mM DTT für 3 h induziert. Die Expressionslevel wurden mittels qRT-PCR analysiert. Zur Untersuchung der UPR-Aktivierung wurden Primerpaare spezifisch für die gespleißte *cib1* mRNA (*cib1<sup>s</sup>*), ungespleißte *cib1* mRNA (*cib1<sup>u</sup>*) und *bip1* (*UMAG\_15034*) verwendet. Die Normalisierung der relativen Genexpression erfolgte unter Verwendung von *eIF2b* (*UMAG\_04869*). Gezeigt sind die Mittelwerte von drei biologischen sowie zwei technischen Replikaten. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung (SD) an.

### 2.1.5 Die Expressionsanalyse weiterer UPR-Zielgene unter ER-Stress

In der initialen Expressionsstudie wurde festgestellt, dass ER-Stress in *U. maydis* zum Spleißen der *cib1* mRNA und Induktion des UPR-Zielgens *bip1* führt. Es ist bekannt, dass durch die Aktivierung der UPR weitere Zielgene aktiviert werden, um die Homöostase im ER zu gewährleisten (Travers *et al.*, 2001). Durch Literaturrecherche und Sequenzvergleiche wurden vier weitere konservierte UPR-Zielgene identifiziert, welche in einer qRT-PCR Analyse auf eine UPR abhängige Regulation getestet wurden. Zu den vier UPR-Zielgenen zählen: *UMAG\_00904*, was für das vorhergesagte Hefe Ortholog des ER-Chaperons Lhs1p (e-value: 1,0e-49) (Craven *et al.*, 1996), *UMAG\_05352*, was für das vorhergesagte Hefe Ortholog der Protein-Disulfid-Isomerase Mpd1p (e-value: 6,0e-25) (Tachikawa *et al.*, 1995), *UMAG\_10287*, das für das vorhergesagte Hefe Ortholog des Glycoprotein Chaperons Cne1p (e-value: 3,0e-65) (Travers *et al.*, 2000) und *UMAG\_02729*, welches für das vorhergesagte Ortholog der *Plasmodium falciparum* Signal-Peptidase Spp1 (e-value: 3,0e-46) (Li *et al.*, 2008), kodiert. Der Stamm  $\Delta cib1 cib1<sup>s</sup>$  wurde aus dieser Analyse ausgeschlossen, da die

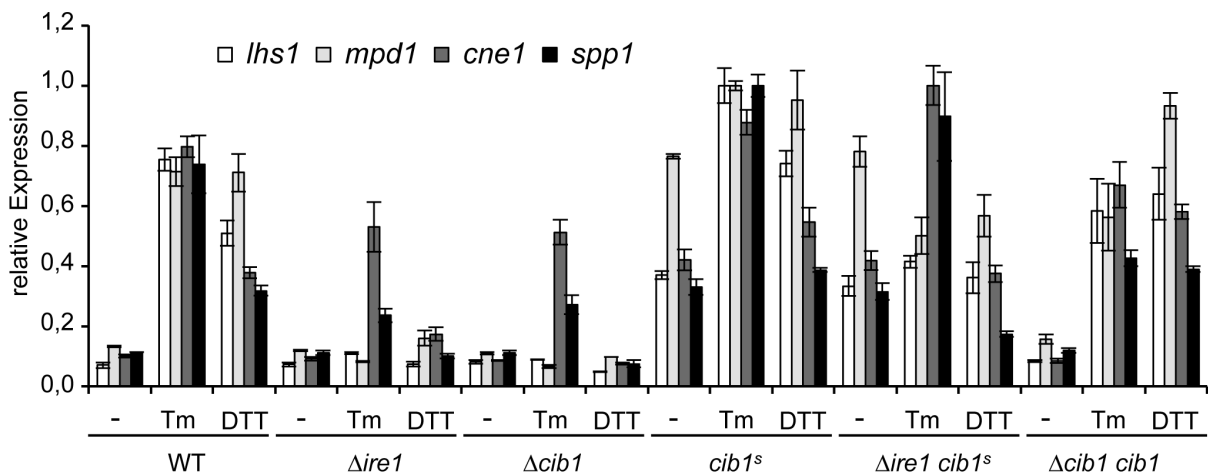


entsprechenden Stämme bei der Überprüfung keine *cib1<sup>s</sup>* Expression zeigten. Dies ist interessant, da in *S. cerevisiae* die Expression der gespleißten *HAC1* Form möglich ist (Kimata *et al.*, 2006).

Durch ER-Stress ist die Expression aller getesteten UPR-Zielgene signifikant induziert (Abb. 12). Die Deletion von *cib1* oder *ire1* hat den Verlust der ER-Stress abhängigen Regulation dieser UPR-Zielgene zur Folge (Abb. 12). Eine Ausnahme bilden *cne1* und *spp1* unter Tm induziertem ER-Stress, was auf eine unspezifische Induktion dieser Gene durch Tm hindeutet.

Durch die Expression von *cib1* unter dem nativen Promotor, kann die Regulation aller getesteten Gene in der  $\Delta$ *cib1* Mutante ( $\Delta$ *cib1 cib1*) wieder vollständig hergestellt werden (Abb. 12). Dies lässt den Schluss zu, dass die Induktion der getesteten UPR-Zielgene abhängig von *cib1* und *ire1* reguliert wird.

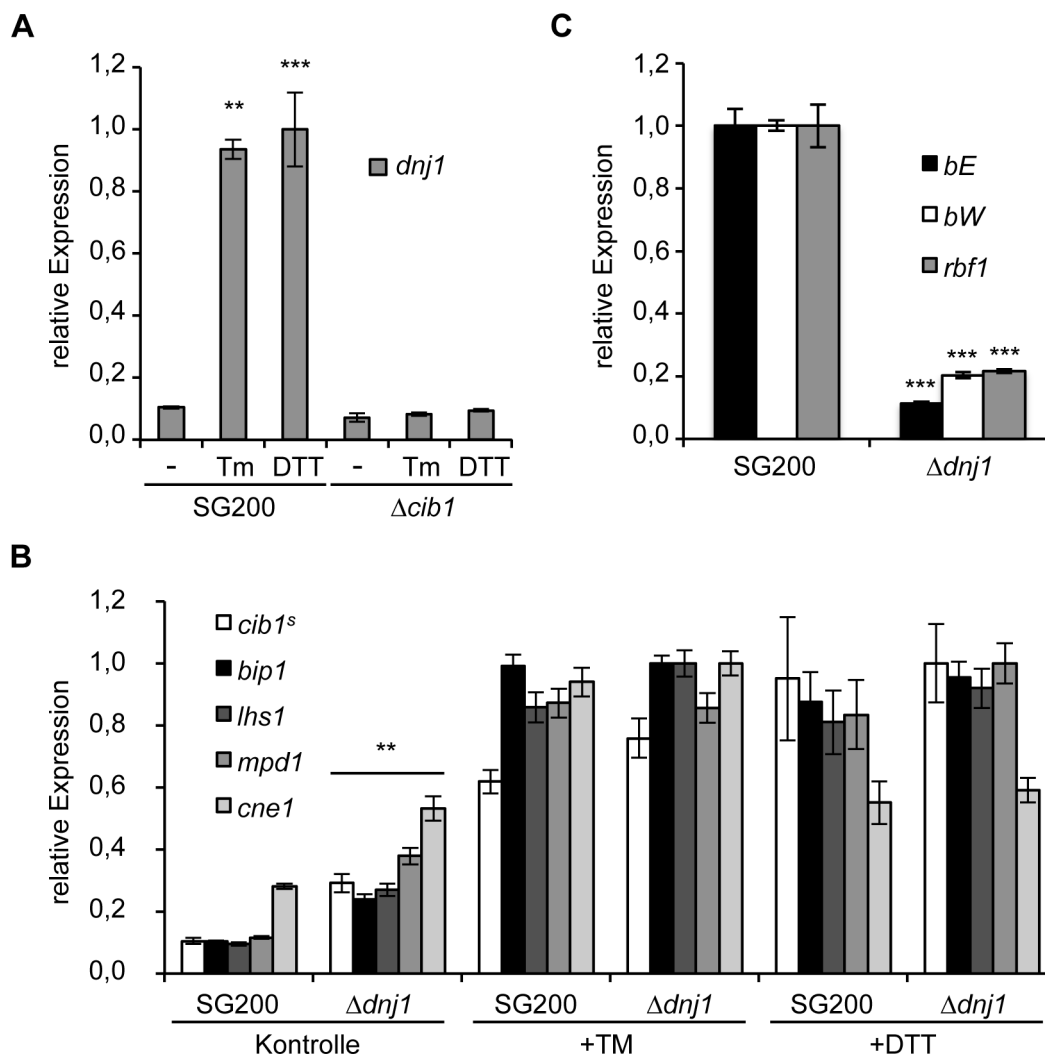
In der initialen Expressionanalyse wurde festgestellt, dass die Expression von *cib1<sup>s</sup>* ausreichend für die Induktion des Zielgenes *bip1* ist. Übereinstimmend zeigte sich, dass die Expression der weiteren UPR-Zielgene im WT und  $\Delta$ *ire1* Hintergrund ebenfalls durch die *cib1<sup>s</sup>* Expression unabhängig von ER-Stress induziert werden kann (Abb. 12).



**Abb. 12: Die Expression von weiteren UPR-Zielgenen in den Stämmen SG200 und Derivaten als Antwort auf ER-Stress.** Die RNA wurde aus exponentiell wachsenden *U. maydis* Kulturen SG200 (WT) und Derivaten in YNB Flüssigmedium isoliert. ER-Stress wurde durch Zugabe von 5  $\mu$ g/ml Tm für 4 h bzw. 3 mM DTT für 3 h induziert. Die Expressionslevel der vier UPR-Markergene *lhs1* (UMAG\_00904), *mpd1* (UMAG\_05352), *cne1* (UMAG\_10287) und *spp1* (UMAG\_02729) wurden mittels qRT-PCR analysiert. Die Normalisierung der relativen Genexpression erfolgte unter Verwendung von *eIF2b* (UMAG\_04869). Gezeigt sind die Mittelwerte von drei biologischen sowie zwei technischen Replikaten. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung (SD) an.

Als weiteres UPR reguliertes Zielgen konnte *UMAG\_05173* (*dnoj1*) identifiziert werden (Abb. 13A), welches für ein ER-lokalisiertes Co-Chaperon der DnaJ Familie kodiert und Ähnlichkeiten zum humanen DnaJC3 (e-value 6,8e-45) aufweist. In Kollaboration mit dem Labor von Frau Prof. Regine Kahmann wurde eine mögliche Funktion von Dnj1 innerhalb der pathogenen Entwicklung untersucht. Hierbei zeigte sich, dass die Deletion von *dnoj1* zu einer deutlichen reduzierten Virulenz führt (Lo Presti *et al.*, 2015a). ER-Stresstests zeigten eine

Inhibition des Wachstums von  $\Delta dnj1$  Stämmen unter Tm induzierten Stressbedingungen, wohingegen DTT induzierter ER-Stress keinen Einfluss auf das Wachstum von  $\Delta dnj1$  Stämmen im Vergleich zum verwendeten Kontrollstamm SG200 (WT) hat (siehe 6.2). Durch eine qRT-PCR Analyse sollte ein möglicher Einfluss der verschiedenen ER-Stressoren auf die Expression verschiedener UPR-Markergene in  $\Delta dnj1$  Stämmen untersucht werden. Hierbei zeigte sich im  $\Delta dnj1$  Hintergrund eine signifikant erhöhte Basalexpression aller getesteten UPR-Markergene im Vergleich zum WT. Ein Einfluss auf die transkriptionelle Regulation der UPR-Markergene unter Tm oder DTT induziertem ER-Stress wurde jedoch nicht beobachtet (Abb. 13B).



**Abb. 13: Die *dnj1* Expression wird UPR abhängig induziert und die  $\Delta dnj1$  Mutante zeigt eine erhöhte basale UPR-Zielgenexpression. (A)** qRT-PCR Analyse von *dnj1* nach ER-Stress. Die RNA wurde aus exponentiell wachsenden *U. maydis* Stämme SG200 und SG200 $\Delta cib1$  in YNB Flüssigmedium isoliert. ER-Stress wurde durch Zugabe von 5  $\mu$ g/ml Tm für 4 h bzw. 3 mM DTT für 3 h induziert. **(B)** qRT-PCR Analyse von UPR-Zielgenen in SG200 und SG200 $\Delta dnj1$ . Die Zellen wurden wie in (A) beschrieben behandelt, und daraus die RNA isoliert. **(C)** qRT-PCR Analyse von *bE*, *bW* und der *rbf1* Expression. Die Stämme SG200 und SG200 $\Delta dnj1$  wurden auf Festmedium mit Aktivkohle kultiviert und nach zwei Tagen die RNA aus den Zellen isoliert. Die Normalisierung der relativen Genexpression aller gezeigten Analysen erfolgte unter Verwendung von *eIF2b* (*UMAG\_04869*). Gezeigt sind die Mittelwerte von drei biologischen sowie zwei technischen Replikaten. Die Fehlerbalken geben die Standardfehler (SE) an. \* geben den p-Wert an: \* < 0,05, \*\* < 0,01 und \*\*\* < 0,001.

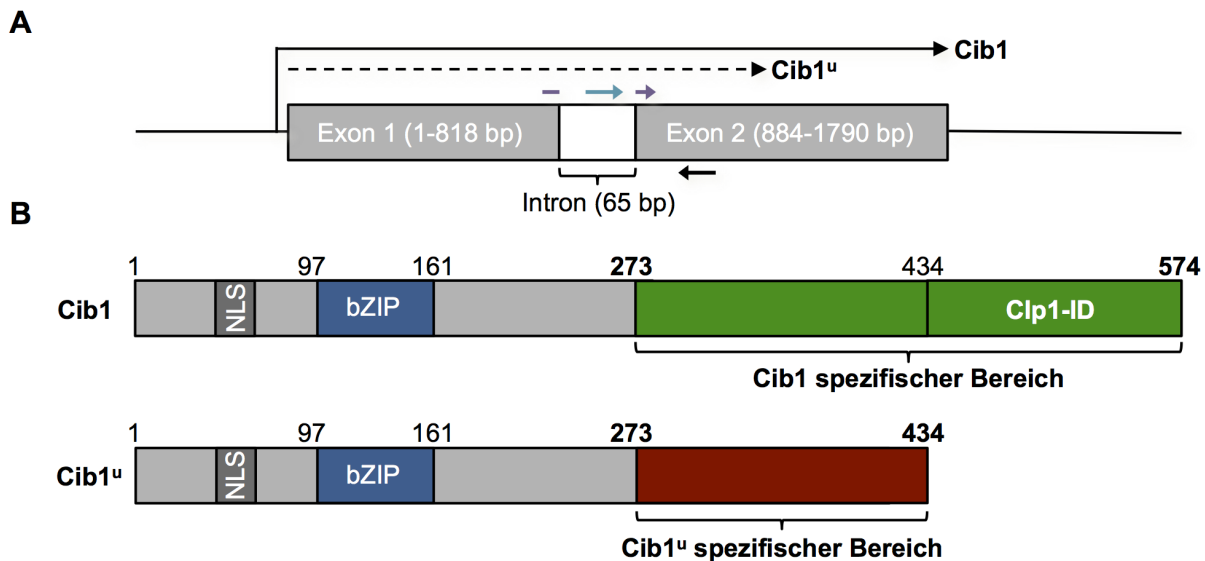
Eine erhöhte UPR-Basalaktivität führt zu einer Inhibition des filamentösen Wachstums auf aktivkohlehaltigem Festmedium, welche durch eine verringerte Expression der *bE*, *bW* und *rbf1* Genexpression bedingt ist (Heimel *et al.*, 2013). Aus diesem Grund wurde die Expression dieser Gene im  $\Delta dnj1$  Hintergrund mit dem des Ausgangsstammes SG200 (WT) verglichen. Hierbei zeigte sich eine signifikant reduzierte Expression aller drei Gene (Abb. 13C). Übereinstimmend mit diesen Untersuchungen zeigte die phänotypische Analyse eine leicht reduzierte Filamentbildung von  $\Delta dnj1$  Stämmen auf aktivkohlehaltigem Festmedium (Lo Presti *et al.*, 2015a).

Zusammenfassend hat die Aktivierung der UPR in *U. maydis* die Induktion verschiedener konservierter UPR-Zielgene zur Folge, die in Abhängigkeit von *cib1* und *ire1* reguliert werden. Mit Dnj1 konnte darüber hinaus ein neuer UPR regulierter Virulenzfaktor identifiziert werden, dessen Funktion auch in dem phytopathogenen Ascomyceten *Fusarium oxysporum* konserviert ist (Lo Presti *et al.*, 2015a).

## 2.2 Die Struktur des *cib1* Gens und der kodierenden Proteine Cib1 und Cib1<sup>u</sup>

Der vorhergesagte offene Leserahmen des *cib1* Gens (*UMAG\_11782*) umfasst laut *U. maydis* Datenbank (<http://mips.helmholtz-muenchen.de/genre/proj/ustilago/>) 1790 Nukleotide (nt), und die ungespleißte mRNA wird in das Protein Cib1<sup>u</sup> translatiert (434 AS) (Abb. 14A). Unter ER-Stressbedingungen wird durch Ire1 vermitteltes, unkonventionelles Spleißen der mRNA der offene Leserahmen von *cib1* verschoben, was zur der Entstehung eines neuen Translationsstops führt. Das daraus hervorgehende 1725 nt große Transkript kodiert für den bZIP Transkriptionsfaktor Cib1 (574 AS).

Innerhalb des in beiden Proteinen identischen N-terminalen Bereichs (bis AS 273) befindet sich ein Kernlokalisationsignal (NLS) und, laut Vorhersage von SMART (Schultz *et al.*, 1998), eine bZIP Domäne (97-161 AS, Abb. 14B). bZIP Domänen sind zusammengesetzt aus einer basischen, DNA-bindenden Region und einer hydrophoben  $\alpha$ -Helix (Leucin-Zipper), welche die Homo- oder Heterodimerisierung vermittelt (Ellenberger *et al.*, 1994). Zusätzlich besitzt Cib1 im spezifischen C-terminalen Bereich eine Domäne (AS 434 bis 574), die für die Interaktion mit Clp1 und für die Virulenz benötigt wird (Heimel *et al.*, 2013).



**Abb. 14: Struktur des *cib1* Gens und der translatierten Proteine. (A)** Der offene Leserahmen von *cib1* aus der *U. maydis* Datenbank (<http://mips.helmholtz-muenchen.de/genre/proj/ustilago/>) umfasst 1790 bp. Er besteht aus zwei Exons und einem 65 bp großen Intron. Die ungespleißte *cib1* mRNA kodiert für *Cib1<sup>u</sup>*. Das unkonventionelle Spleißen der *cib1* mRNA führt zu einer Verschiebung des offenen Leserahmens und kodiert für *Cib1*. Der lilafarbene Pfeil repräsentiert den für die qRT-PCR Analyse verwendeten Forward-Primer, der am Intron/Exon Übergang bindet und damit spezifisch für *cib1<sup>s</sup>* ist. Der türkisfarbene Pfeil stellt den Forward-Primer spezifisch für *cib1<sup>u</sup>* und der schwarze Pfeil den Reverse-Primer dar. **(B)** Durch Translation der gespleißten mRNA entsteht ein 574 Aminosäuren großes Protein (*Cib1*). Die ungespleißte mRNA kodiert für ein Protein mit 434 Aminosäuren (*Cib1<sup>u</sup>*). Bis zu Aminosäure 273 sind beide Proteine identisch und besitzen ein Kernlokalisierungssignal (NLS) und eine DNA-binde Domäne (bZIP). Im spezifischen C-terminalen Bereich unterscheiden sich beide Proteine. Bei *Cib1* konnte in diesem Bereich die Interaktionsdomäne mit Clp1 (Clp1-ID) identifiziert werden.

In einer vorangegangenen Studie konnte gezeigt werden, dass die für bZIP Transkriptionsfaktoren typischen Homodimere (*Cib1-Cib1* bzw. *Cib1<sup>u</sup>-Cib1<sup>u</sup>*) vermutlich durch hydrophobe Wechselwirkungen der bZIP-Domänen gebildet werden können (Siebert, 2014). Interessanterweise konnte über die zusätzliche Interaktion der spezifischen C-terminalen Bereiche von *Cib1* und *Cib1<sup>u</sup>* eine Heterodimerisierung (*Cib1-Cib1<sup>u</sup>*) beobachtet werden (Siebert, 2014). Die Heterodimerisierung von XBP1 ist in höheren Eukaryoten Voraussetzung für die negative Regulation der UPR durch XBP1<sup>u</sup> (Yoshida *et al.*, 2006).

### 2.3 *Cib1<sup>u</sup>*, ein möglicher Repressor der UPR in *U. maydis*

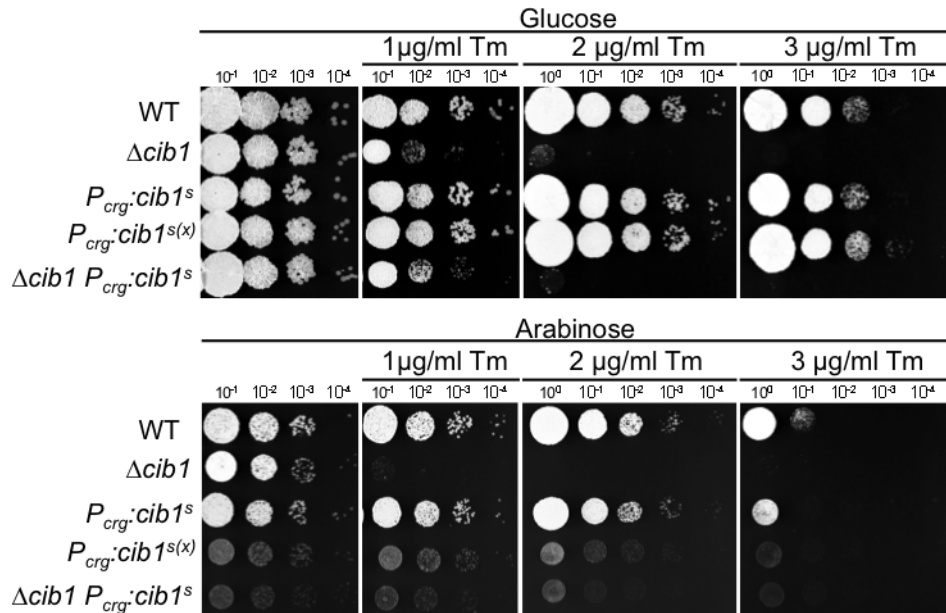
In höheren Eukaryoten kodiert die *XBP1* mRNA für zwei unterschiedliche Proteine. Neben der gespleißten Form (*XBP1*), die durch das Spleißen der *XBP1* mRNA gebildet wird, kodiert die ungespleißte mRNA für den negativen Regulator der UPR *XBP1<sup>u</sup>* (Yoshida *et al.*, 2001; Byrd und Brewer, 2012). Dies konnte bisher ausschließlich in höheren Eukaryoten beobachtet werden, da in niederen Eukaryoten die Translation der ungespleißten mRNA blockiert ist (Heimel, 2015). In *U. maydis* war es nicht möglich *cib1<sup>s</sup>* im  $\Delta$ *cib1* Hintergrund zu exprimieren (siehe 2.1.4). Eine mögliche Ursache dafür könnte eine potenzielle positive Autoregulation von *Cib1* oder das Fehlen eines negativen Regulators der UPR in Form von *Cib1<sup>u</sup>* sein.

### 2.3.1 Die Überexpression von *cib1<sup>s</sup>* inhibiert das Zellwachstum

Um den Effekt der *cib1<sup>s</sup>* Expression auf das Zellwachstum in der  $\Delta$ *cib1* Mutante untersuchen zu können, wurde *cib1<sup>s</sup>* unter Kontrolle des durch Arabinose induzierbaren *crg1* Promotors exprimiert (Bottin *et al.*, 1996). Mit diesem System kann durch den Wechsel der Kohlenstoffquelle von Glucose zu Arabinose die Expression des zu untersuchenden Gens induziert werden. Zur diesem Zweck wurde das Plasmid *P<sub>crg</sub>:cib1<sup>s</sup>* in den *ip* Locus der Stämme FB1 (WT) und dem entsprechenden  $\Delta$ *cib1* Derivat integriert.

Unter reprimierenden Bedingungen (Glucose als Kohlenstoffquelle) hat die Integration des *cib1<sup>s</sup>* Plasmids keinen Einfluss auf das Zellwachstum (Abb. 15). Die Induktion von ER-Stress durch Tm Zugabe führt zu einer konzentrationsabhängigen Reduktion des Wachstums, die erwartungsgemäß in den  $\Delta$ *cib1* Stämmen stärker ausgeprägt ist als im WT Hintergrund. Die Induktion der *cib1<sup>s</sup>* Expression (Arabinose als Kohlenstoffquelle) im WT Hintergrund hat bei einfacher Integration des *cib1<sup>s</sup>* Plasmids keine Auswirkung auf das Zellwachstum (Abb. 15), wohingegen die mehrfache Integration von *cib1<sup>s</sup>* (*cib1<sup>s(x)</sup>*) zu einem deutlich verringerten Zellwachstum führt. Interessanterweise ist im  $\Delta$ *cib1* Hintergrund bereits eine einfache Integration des *cib1<sup>s</sup>* Plasmides ausreichend, um eine vergleichbare Inhibition des Zellwachstums zu erzielen (Abb. 15). Unter ER-Stress Bedingungen und induzierter *cib1<sup>s</sup>* Expression sind die Unterschiede zwischen dem WT und dem  $\Delta$ *cib1* Hintergrund noch deutlicher zu erkennen.

Zusammenfassend führt die Expression von *cib1<sup>s</sup>* zu einer dosisabhängigen Reduktion des Zellwachstums im WT Hintergrund. Es konnte gezeigt werden, dass im  $\Delta$ *cib1* Stamm dieser Effekt deutlich stärker ausgeprägt ist. Dies lässt vermuten, dass zusätzlich zur Expression von *cib1<sup>s</sup>* eine ungespleißte Form Cib1<sup>u</sup> vorhanden sein könnte, die den toxischen Effekten einer starken Cib1 Expression entgegen wirkt.



**Abb. 15: Dosisabhängige Inhibition des Zellwachstums durch die Überexpression von *cib1<sup>s</sup>*.** ER-Stresstest der *U. maydis* Stämme FB1 und Derivate ohne (Glucose) oder mit (Arabinose) der Induktion von *cib1<sup>s</sup>*. 10-fache Verdünnungsreihen wurden auf YNB Festmedium mit Glucose oder Arabinose als Kohlenstoffquelle getropft. Die *cib1<sup>s</sup>* Expression ist unter der Kontrolle des durch Arabinose induzierbaren *crg1*-Promotors (*P<sub>crg</sub>*). Tunicamycin (Tm) wurde in den angegebenen Konzentrationen verwendet, um ER-Stress zu induzieren. (x) markiert eine mehrfache Integration des *cib1<sup>s</sup>* Plasmides. Die Platten wurden 48 h bei 28°C inkubiert.

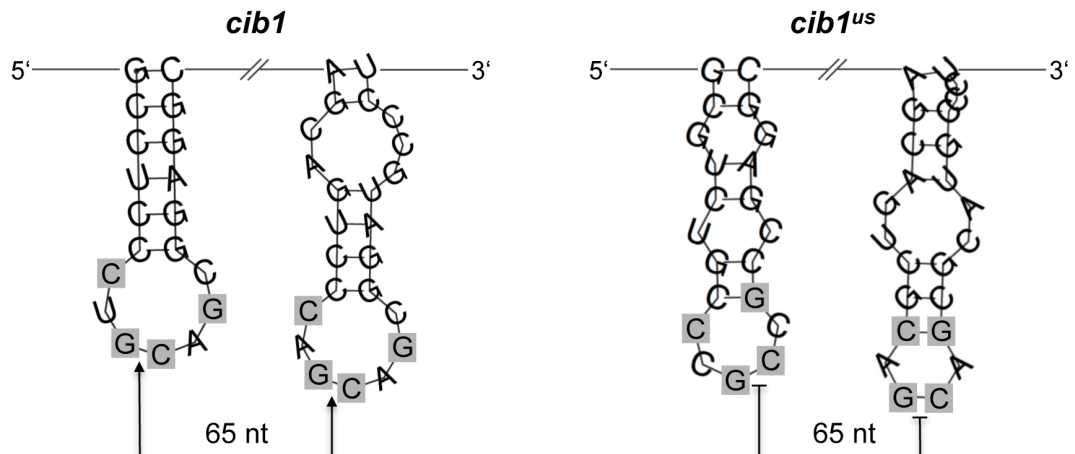
### 2.3.2 Konstruktion eines unspleißbaren *cib1* Allels

Es konnte beobachtet werden, dass die Inhibition des Wachstums durch *cib1<sup>s</sup>* Expression im WT Hintergrund deutlich geringer als im Δ*cib1* Hintergrund ist (Abb. 15). Dies lässt vermuten, dass die ungespleißte *cib1* mRNA für einen negativen Regulator (Cib1<sup>u</sup>) kodiert, welche der *cib1<sup>s</sup>* Expression entgegen wirkt. Um einen möglichen Einfluss von Cib1<sup>u</sup> auf die Aktivierung der UPR und das Zellwachstum näher untersuchen zu können, wurde die Spleißregion der *cib1* mRNA mutiert, wodurch das unkonventionelle Spleißen der mRNA unterdrückt und eine spezifische Expression von Cib1<sup>u</sup> gewährleistet werden sollte. Hierzu wurde ein Bereich von 117 Basenpaaren (nt) ausgewählt, der aus dem Intron (65 nt), 16 nt des 5'- und 36 nt des 3'-Bereichs besteht (Abb. 16A). Das Einfügen von 27 stillen Mutationen unter Berücksichtigung der *U. maydis* spezifischen Dicodon-Usage (<http://dicodon-optimization.appspot.com/>) in diese Sequenz hat den Verlust der charakteristischen Sekundärstruktur der *cib1* mRNA zur Folge (Abb. 16B). Diese unspleißbare *cib1* Variante (*cib1<sup>us</sup>*) wurde unter Kontrolle des konstitutiv aktiven *otef* Promotors in den *ip* Locus der Stämme SG200 (WT) und Δ*cib1* integriert.

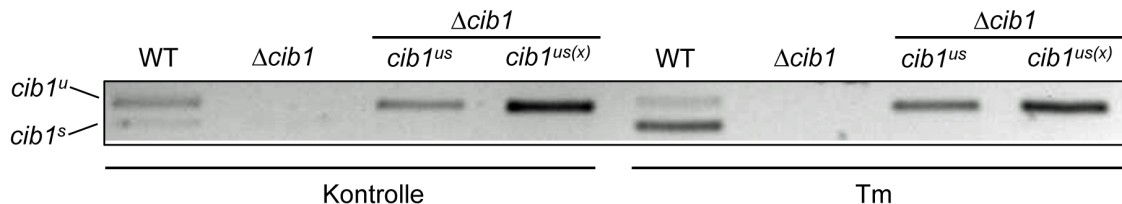
A

*cib1* 796 **GGCGTTCGCCTCCCTGCAGCGGAGGCGACCTGCTCTGATGCACCATCTTGTGCGCC**  
*cib1<sup>us</sup>* 796 **GGTGTGCGTCTGCCCGCCGAGGCCACCTGCTCGGACGCTCCCTCGTGCCGTC**  
  
*cib1* 851 **AAGATGCTGAGCTCGAGCAGTCCAGCAGCGGATGCCCTCACACAGTTTGGAGAGT**  
*cib1<sup>us</sup>* 851 **AGGACGCCGAGCTCGAGCAGTCGCAGCAGCGCATGCCCTCGCACTCGCTGCGCGT**  
  
*cib1* 906 **GTCGCTG**  
*cib1<sup>us</sup>* 906 **CTCGCTC**

B



C



**Abb. 16: Die Mutationen in den Spleißregionen verhindern das unkonventionelle Spleißen der *cib1* mRNA.**  
**(A)** Vergleich der Sequenzen des WT (*cib1*) und der Mutante (*cib1<sup>us</sup>*) im mutierten Bereich. Das 65 Nukleotide große Intron ist grau unterlegt und die konservierten Nukleotide sind fett gedruckt. **(B)** Die Vorhersage der Sekundärstruktur der Spleißregionen von *cib1* und *cib1<sup>us</sup>* mRNA. Die Schnittstellen des durch Ire1 vermittelten unkonventionellen Spleißens sind durch Pfeile gekennzeichnet. Die konservierten Nukleotide der Sequenz nach Hooks und Griffiths-Jones, 2011 sind grau hinterlegt. Zur Vorhersage der Sekundärstruktur wurde das Programm RNAfold (<http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAfold.cgi>) verwendet. **(C)** qPCR Analyse von gespleißter (*cib1<sup>s</sup>*) und ungespleißter (*cib1<sup>u</sup>*) mRNA der *U. maydis* Stämme SG200 und Derivaten. Die RNA wurde aus exponentiell wachsenden *U. maydis* Kulturen in YNB Flüssigmedium isoliert und das Spleißen durch 5 µg/ml Tm induziert. *cib1<sup>us</sup>* wurde unter Kontrolle des konstitutiv aktiven *otef* Promotors in den *ip* Locus der Deletionsmutante ( $\Delta$ *cib1*) integriert. Die amplifizierten Fragmente wurden in einem Agarose-Gel (2%) aufgetrennt und anschließend mittels UV-Licht detektiert. (x) steht für eine multiple Integration des Plasmides.

Die Integration von *cib1<sup>us</sup>* unter der Kontrolle des konstitutiv aktiven *otef*-Promotors ( $P_{otef}::cib1^{us}$ ) in die  $\Delta$ *cib1* Mutante sollte ausschließlich zur Expression der unspleißbaren *cib1<sup>us</sup>* mRNA führen. Dies würde die Untersuchung von *cib1<sup>u</sup>* spezifischen Effekten unabhängig von *cib1<sup>s</sup>* erlauben. Die *cib1<sup>s</sup>* und *cib1<sup>u</sup>* Expression wurde mittels qPCR untersucht. Durch spezifisch bindende Primer (3'- bzw. 5'-Bereich außerhalb des Introns) können die amplifizierten Produkte aufgrund des fehlenden Introns bei *cib1<sup>s</sup>* (65 nt) voneinander unterschieden werden.

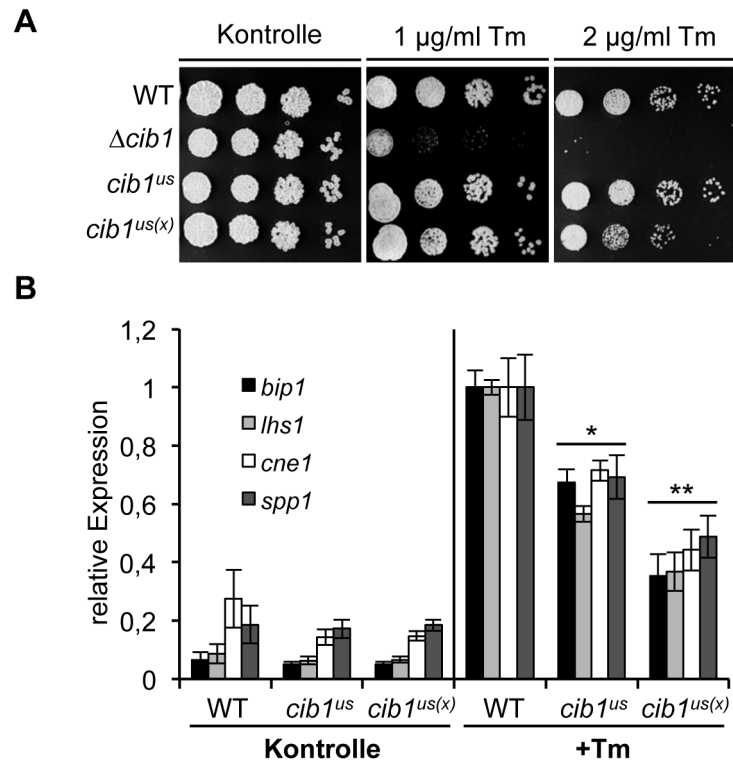
Beim WT überwiegt im unbehandelten Zustand das *cib1<sup>u</sup>* Fragment. Nach ER-Stressinduktion wird *cib1* gespleißt und die relativen Verhältnisse zwischen gespleißter und ungespleißter Form kehren sich um (Abb. 16C). Dies zeigt, dass unter diesen Versuchsbedingungen das Spleißen der *cib1* mRNA in den Tm behandelten WT-Zellen effizient stattfindet. Bei der  $\Delta$ *cib1* Mutante konnte keine Expression von *cib1* festgestellt werden, und die durch das *cib1<sup>us</sup>* Plasmid vermittelte Expression zeigt ausschließlich die ungespleißte Form der *cib1<sup>us</sup>* mRNA (Abb. 16C). Dies bestätigt, dass die mutierte *cib1* mRNA nicht mehr gespleißt und dementsprechend nur *cib1<sup>u</sup>* exprimiert wird. Die mehrfache Integration des Plasmids (*cib1<sup>us(x)</sup>*) führt wie erwartet zu einem entsprechend stärkeren Signal.

### 2.3.3 Die Expression von *cib1<sup>us</sup>* reduziert die ER-Stressresistenz und Aktivierung von UPR-Zielgenen

Die Konstruktion eines unspleißbaren *cib1* Allels (*cib1<sup>us</sup>*) ermöglicht eine genauere Charakterisierung von *Cib1<sup>u</sup>*. Um den Einfluss von *Cib1<sup>u</sup>* auf ER-Stress und die UPR-Zielgenexpression untersuchen zu können, wurde *cib1<sup>us</sup>* unter Kontrolle des *otef* Promotors in den *ip* Locus von SG200 (WT) integriert. Die *cib1<sup>us</sup>* Expression hat in Abwesenheit von ER-Stress keine Auswirkung auf das Zellwachstum. Die einfache Integration des *cib1<sup>us</sup>* Plasmids führt unter ER-Stress zu keiner Veränderung der Resistenz im Vergleich zum WT. Die mehrfache Integration des *cib1<sup>us</sup>* Plasmids (*cib1<sup>us(x)</sup>*) hingegen hat eine deutliche Verringerung der ER-Stressresistenz zur Folge (Abb. 17A).

Ausgehend von der für *XBP1<sup>u</sup>* beschriebenen Funktion könnte die UPR-Aktivierung durch *cib1<sup>us</sup>* gedämpft werden. Um dies zu testen, wurde eine Genexpressionsanalyse der bekannten UPR-Zielgene (*bip1*, *lhs1*, *cne1* und *spp1*) durchgeführt. Im Stamm SG200 (WT) führt die Zugabe von Tm zur Induktion aller getesteten Zielgene. Die Expression von *cib1<sup>us</sup>* führt zu einer signifikant reduzierten Expression der UPR-Zielgene nach ER-Stressinduktion im Vergleich zum WT (Abb. 17B). Dieser Effekt ist bei einer mehrfachen Integration des Plasmids (*cib1<sup>us(x)</sup>*) deutlich verstärkt. Folglich ist ein dosisabhängiger Einfluss von *cib1<sup>us</sup>* auf das Zellwachstum unter ER-Stress und auf die *Cib1* abhängige Genexpression festzustellen. Diese Beobachtungen geben einen weiteren Hinweis darauf, dass *Cib1<sup>u</sup>* als negativer Regulator der UPR fungiert.



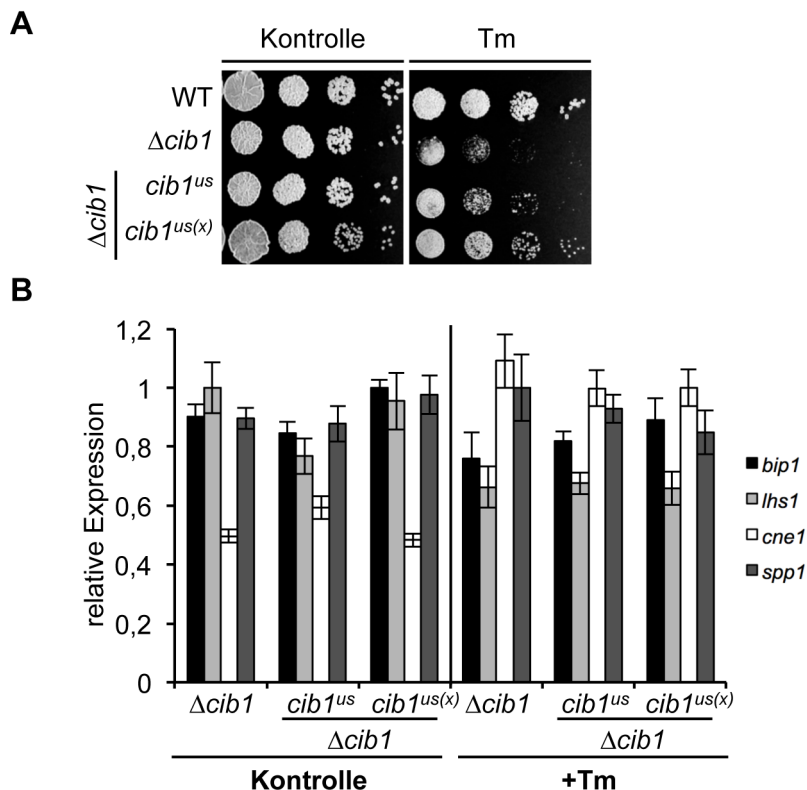


**Abb. 17: Der dosisabhängige Einfluss von *cib1<sup>us</sup>* auf die ER-Stressresistenz und die Induktion von UPR-Zielgenen im WT Hintergrund. (A)** ER-Stresstest der *U. maydis* Stämme SG200 (WT) und Derivate. Die *cib1<sup>us</sup>* Expression (*cib1<sup>us</sup>*) ist unter Kontrolle des konstitutiv aktiven *otef* Promotors im WT Hintergrund. 10-fach Verdünnungsreihen wurden auf YNB Festmedium mit Glucose als Kohlenstoffquelle getropft. Tunicamycin (Tm) wurde in den angegebenen Konzentrationen verwendet. Die Platten wurden 48 h bei 28°C inkubiert. (x) steht für eine mehrfache Integration des *cib1<sup>us</sup>* Plasmids. **(B)** qRT-PCR Analyse der UPR-Zielgene *bip1* (UMAG\_15034), *cne1* (UMAG\_10287), *lhs1* (UMAG\_00904), *mpd1* (UMAG\_05352) und *spp1* (UMAG\_02729). Der *U. maydis* Stamm SG200 (WT) und Derivate wurden bis zu OD<sub>600</sub> = 0,3 in YNB Flüssigmedium mit Glucose kultiviert. Anschließend wurde zu einem Teil der Proben Tm mit einer Endkonzentration von 5 μg/ml hinzugegeben, für weitere 4 h inkubiert und die RNA isoliert. (x) steht für eine mehrfache Integration des *cib1<sup>us</sup>* Plasmids. Die Normalisierung der relativen Genexpression erfolgte unter Verwendung von *eIF2b* (UMAG\_04869). Gezeigt sind die Mittelwerte von drei biologischen sowie zwei technischen Replikaten. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung (SD) an. \* geben den p-Wert an: \* < 0,05 und \*\* < 0,01.

### 2.3.4 Die Expression von *cib1<sup>us</sup>* stellt die ER-Stresssensitivität der *Δcib1* Mutante teilweise wieder her

Es konnte gezeigt werden, dass die *cib1<sup>us</sup>* Expression im WT-Hintergrund die ER-Stressresistenz und die Expression von UPR-Zielgenen reduziert. Um Effekte unabhängig von *cib1<sup>s</sup>* untersuchen zu können, wurde *cib1<sup>us</sup>* im *Δcib1* Hintergrund exprimiert (Abb. 16C). Die Expression von *cib1<sup>us</sup>* hat in Abwesenheit von ER-Stress keinen Einfluss auf das Zellwachstum im Vergleich zum WT und der *Δcib1* Mutante (Abb. 18A). Unter ER-Stressbedingungen zeigt die *Δcib1* Mutante einen deutlichen Wachstumsdefekt. Eine einfache Integration des Konstrukts (*cib1<sup>us</sup>*) in den *ip* Locus der *Δcib1* Mutante führt zu einer partiellen Komplementation der ER-Stressresistenz. Durch mehrfache Integration des *cib1<sup>us</sup>* Plasmids (*cib1<sup>us(x)</sup>*) kann die ER-Stresssensitivität des *Δcib1* Stamms nahezu vollständig wiederhergestellt werden (Abb. 18A).

Aus diesen Beobachtungen ergab sich die Fragestellung, ob die UPR durch *cib1<sup>us</sup>* unabhängig von *cib1<sup>s</sup>* aktiviert werden kann. Hierzu wurde die Expression der bekannten UPR-Zielgene (*bip1*, *lhs1*, *cne1* und *spp1*) untersucht. Es zeigte sich, dass keines der untersuchten UPR-Zielgene durch die Expression von *cib1<sup>us</sup>* induziert wird. Die Expressionslevel der UPR-Zielgene sind sowohl bei einfacher (*cib1<sup>us</sup>*) als auch mehrfacher (*cib1<sup>us(x)</sup>*) Integration von *cib1<sup>us</sup>* im Vergleich zur  $\Delta$ *cib1* Mutante unverändert (Abb. 18B). Daraus kann geschlossen werden, dass es einen alternativen, von einer konventionellen UPR unabhängigen Mechanismus geben muss, durch den *Cib1<sup>u</sup>* eine erhöhte ER-Stressresistenz im  $\Delta$ *cib1* Hintergrund vermittelt.



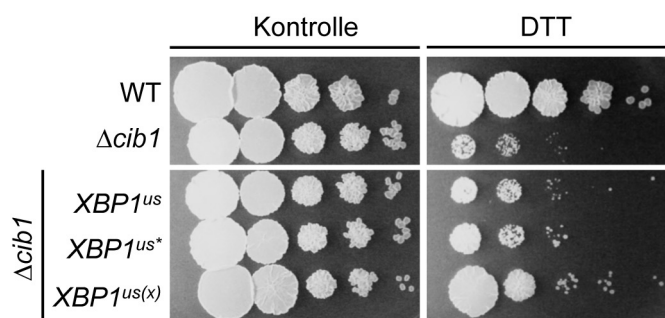
**Abb. 18: Die Expression von *cib1<sup>us</sup>* kann die ER-Stressresistenz der  $\Delta$ *cib1* Mutanten teilweise wiederherstellen. (A) ER-Stresstest der *U. maydis* Stämme SG200 (WT) und Derivate. Die *cib1<sup>us</sup>* Expression (*cib1<sup>us</sup>*) ist unter Kontrolle des konstitutiv aktiven *otef* Promotors im  $\Delta$ *cib1* Hintergrund. 10-fach Verdünnungsreihen wurden auf YNB Festmedium mit Glucose als Kohlenstoffquelle getropft. Tunicamycin (Tm) wurde in einer Konzentration von 1  $\mu$ g/ml zur Induktion von ER-Stress verwendet. Die Platten wurden 48 h bei 28°C inkubiert. (x) steht für eine mehrfache Integration des *cib1<sup>us</sup>* Plasmids. (B) qRT-PCR Analyse der UPR-Zielgene *bip1* (UMAG\_15034), *cne1* (UMAG\_10287), *lhs1* (UMAG\_00904), *mpd1* (UMAG\_05352) und *spp1* (UMAG\_02729). Der *U. maydis* Stamm SG200 (WT) und Derivate wurden bis zu OD<sub>600</sub> = 0,3 in YNB Flüssigmedium mit Glucose kultiviert. Anschließend wurde zu einem Teil der Proben Tm in einer Endkonzentration von 5  $\mu$ g/ml hinzugegeben und für 4 h inkubiert. (x) steht für eine mehrfache Integration des *cib1<sup>us</sup>* Plasmids. Die Normalisierung der relativen Genexpression erfolgte unter Verwendung von *eIF2b* (UMAG\_04869). Gezeigt sind die Mittelwerte von drei biologischen sowie zwei technischen Replikaten. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung (SD) an.**

### 2.3.5 Humanes XBP1<sup>u</sup> kann die ER-Stresssensitivität der $\Delta cib1$ Mutante partiell komplementieren

In höheren Eukaryoten kodiert XBP1<sup>u</sup> für einen negativen Regulator der UPR. Dieser Regulationsmechanismus bietet die Möglichkeit gezielter und schneller auf Umwelteinflüsse reagieren zu können (Byrd und Brewer, 2012). In einer initialen Komplementationsstudie konnte bereits gezeigt werden, dass XBP1 die Funktion von Cib1 teilweise übernehmen kann (siehe 2.1.3). Die Überexpression von *cib1<sup>u</sup>* in *U. maydis* führt zur Dämpfung der UPR-Zielgenexpression und im  $\Delta cib1$  Stamm zu einer erhöhten Stressresistenz unabhängig der bekannten UPR-Zielgenen im Vergleich zu  $\Delta cib1$ . Um zu testen, ob XBP1<sup>u</sup> die Stressresistenz ähnlich zu *cib1<sup>u</sup>* komplementieren kann, wurde eine unspleißbare XBP1<sup>us</sup> Form in den Stamm FB1  $\Delta cib1$  integriert.

Als Basis für die Analyse diente die XBP1 cDNA. Analog zur Erzeugung von *cib1<sup>us</sup>* (siehe 2.3.2) wurden unter Berücksichtigung der Dicodon-Usage (<http://dicodon-optimization.appspot.com/>) stille Mutationen in die Spleißregion eingefügt. Dies hat den Verlust der charakteristischen Sekundärstruktur der mRNA zur Folge. Das unspleißbare Allel XBP1<sup>us</sup> wurde unter Kontrolle des konstitutiv aktiven *otef* Promotors in den *ip* Locus des  $\Delta cib1$  Stammes integriert.

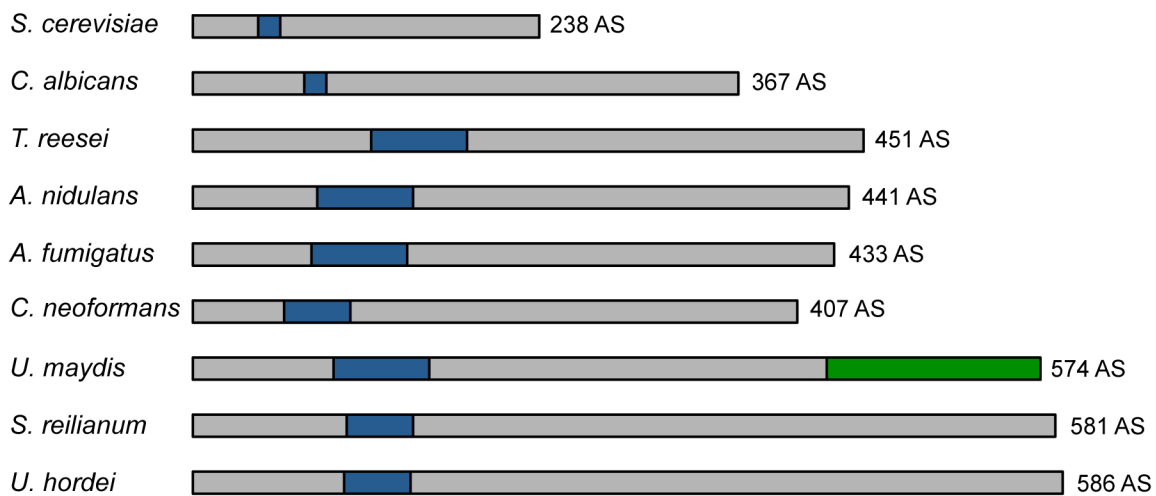
Unter ER-Stressbedingungen zeigt die  $\Delta cib1$  Mutante ein reduziertes Zellwachstum im Vergleich zur WT Kontrolle (Abb. 19). Die einfache und zweifache Integration des XBP1<sup>us</sup> Plasmids konnte das Wachstum unter diesen Bedingungen nicht wiederherstellen. Dagegen stellt die mehrfache Integration des XBP1<sup>us</sup> Plasmids (XBP1<sup>us(x)</sup>) die ER-Stressresistenz der  $\Delta cib1$  Mutante, ähnlich zu *cib1<sup>us</sup>* (Abb. 18A), teilweise wieder her (Abb. 19). Dies lässt vermuten, dass die gezeigte durch Cib1<sup>u</sup> vermittelte ER-Stressresistenz auch in höheren Eukaryoten konserviert sein könnte.



**Abb. 19: Humanes XBP1<sup>u</sup> kann die ER-Stressresistenz der  $\Delta cib1$  Mutante teilweise wiederherstellen.** 10-fach Verdünnungsreihen des *U. maydis* Stammes FB1 (WT) und Derivate wurden auf YNB Festmedium mit Glucose als Kohlenstoffquelle getropft. Zur ER-Stress Induktion wurden 1 mM DTT verwendet. XBP1<sup>us</sup> wurde unter Kontrolle des konstitutiv aktiven *otef* Promotors in der  $\Delta cib1$  Mutante exprimiert. \* gibt eine zweifache und (x) eine mehrfache Integration des XBP1<sup>us</sup> Plasmids an. Die Platten wurden 48 h bei 28°C inkubiert.

## 2.4 Die Interaktion von Cib1 mit Clp1, einem zentralen Regulator der biotrophen Entwicklung in *U. maydis*

Vergleiche der Domänenstruktur der pilzlichen Hac1p Homologe zeigten, dass Cib1 neben der konservierten bZIP-Domäne einen zusätzlichen C-terminalen Bereich besitzt (Abb. 20). In vorhergehenden Studien wurde gezeigt, dass das Entfernen dieses Bereiches (140 Aminosäuren, Cib1<sup>433</sup>) zu einem Verlust der Interaktion mit Clp1 führt, was diesen Bereich als Clp1-Interaktionsdomäne identifiziert (Heimel *et al.*, 2013). Bei den nahe verwandten Brandpilzen *Sporisorium reilianum* und *Ustilago hordei* ist dieser C-terminale Bereich ebenfalls vorhanden (Abb. 20), was für eine evolutionäre Konservierung in Brandpilzen spricht.



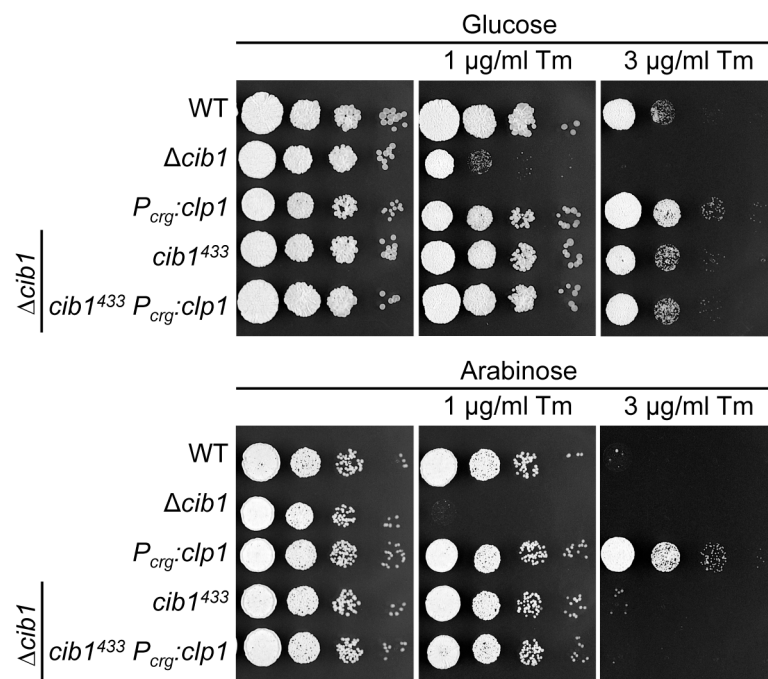
**Abb. 20: Schematische Übersicht von Hac1p und Homologen.** Gezeigt ist die Lokalisation der bZIP Domäne in blau und die Clp1 Interaktionsdomäne (Aminosäure 434-574 in *U. maydis*) in grün. Die Proteinlängen sind relativ zur Anzahl der Aminosäuren (AS) dargestellt. Folgende Proteine wurden verwendet: *Saccharomyces cerevisiae* Hac1p (NP\_116622.1), *Candida albicans* Hac1 (ABS83487), *Trichoderma reesei* Hac1 (Q8TFF3.1), *Aspergillus nidulans* AN9397 (XP\_682666.1), *Aspergillus fumigatus* HacA (ACJ61678.1), *Cryptococcus neoformans* Hxl1 (AFR98359.1), *Ustilago maydis* Cib1 (UMAG\_11782, XP\_759656), *Sporisorium reilianum* Sr14500 (CBQ73912.1), *Ustilago hordei* UHOR\_05396 (CCF51433.1).

Clp1 ist einer der zentralen Regulatoren der pathogenen Entwicklung in *U. maydis* und kann auf Proteinebene erst nach der Penetration der Pflanzenoberfläche nachgewiesen werden. Durch Clp1 wird die b-abhängige Blockierung des Zellzyklus aufgehoben und die Proliferation *in planta* aktiviert (Heimel *et al.*, 2010a). In vorangegangenen Studien konnte gezeigt werden, dass die direkte Cib1-Clp1 Interaktion zur Stabilisierung von Clp1 führt und für die Virulenz notwendig ist (Heimel *et al.*, 2013). In dieser Arbeit wurde der Schwerpunkt auf die Untersuchung des Einflusses der Cib1-Clp1 Interaktion auf die UPR gelegt.

### 2.4.1 Die Interaktion von Cib1 mit Clp1 führt zu einer erhöhten ER-Stressresistenz

Die Deletion von *clp1* hat keine Auswirkung auf die ER-Stressresistenz in *U. maydis* (Heimel *et al.*, 2013). Es ist dagegen bekannt, dass durch *clp1* Überexpression die ER-Stressresistenz drastisch erhöht wird, was auf einen Einfluss von *clp1* auf die UPR hindeutet (Heimel *et al.*, 2013). Aufgrund dieser Beobachtungen sollte getestet werden, ob die Clp1-Cib1 Interaktion für die *clp1* vermittelte, erhöhte ER-Stressresistenz notwendig ist und wodurch diese vermittelt wird.

Zu diesem Zweck wurde *clp1* unter dem Arabinose induzierbaren *crg1* Promotor in den Stämmen JB1 (Scherer *et al.*, 2006) und JB1  $\Delta cib1 cib1^{433}$  exprimiert. Bei JB1 handelt es sich um ein Derivat von FB1 (Banuett und Herskowitz, 1989), bei dem der *b*-Locus deletiert ist. Dies ermöglicht die Untersuchung der Interaktion von Clp1 mit Cib1 unabhängig vom *b*-Signalweg. Im Stamm JB1  $\Delta cib1 cib1^{433}$  wurde *cib1* durch eine verkürzte *cib1* Variante (*cib1*<sup>433</sup>) ohne die Clp1-Interaktionsdomäne ersetzt.



**Abb. 21: Die Überexpression von *clp1* führt zu einer erhöhten ER-Stressresistenz in Abhängigkeit von der Cib1-Clp1 Interaktion.** 10-fach Verdünnungsreihen des *U. maydis* Stammes JB1 (WT) und Derivate wurden auf YNB Festmedium mit Glucose (Kontrolle) oder Arabinose (*clp1* Induktion) als Kohlenstoffquelle getropft. Die *clp1* Expression ist unter der Kontrolle des Arabinose induzierbaren *crg1* Promotors ( $P_{crg}$ ). Bei Stämmen mit *cib1*<sup>433</sup> ist die Clp1-Cib1 Interaktionsdomäne nicht mehr vorhanden (unterste zwei Reihen). Tunicamycin (Tm) wurde in den angegebenen Konzentrationen verwendet. Die Platten wurden 48 h bei 28°C inkubiert.

Bei der Untersuchung der ER-Stressresistenz führte die *clp1* Expression im Stamm JB1  $P_{crg}:clp1$  zu einer deutlichen erhöhten ER-Stressresistenz im Vergleich zum WT und der nicht induzierten Kontrolle (Abb. 21). Die Expression von *cib1*<sup>433</sup> im  $\Delta cib1$  Hintergrund hat keinen Einfluss auf die ER-Stressresistenz in Vergleich zum WT. Die Induktion von *clp1* in

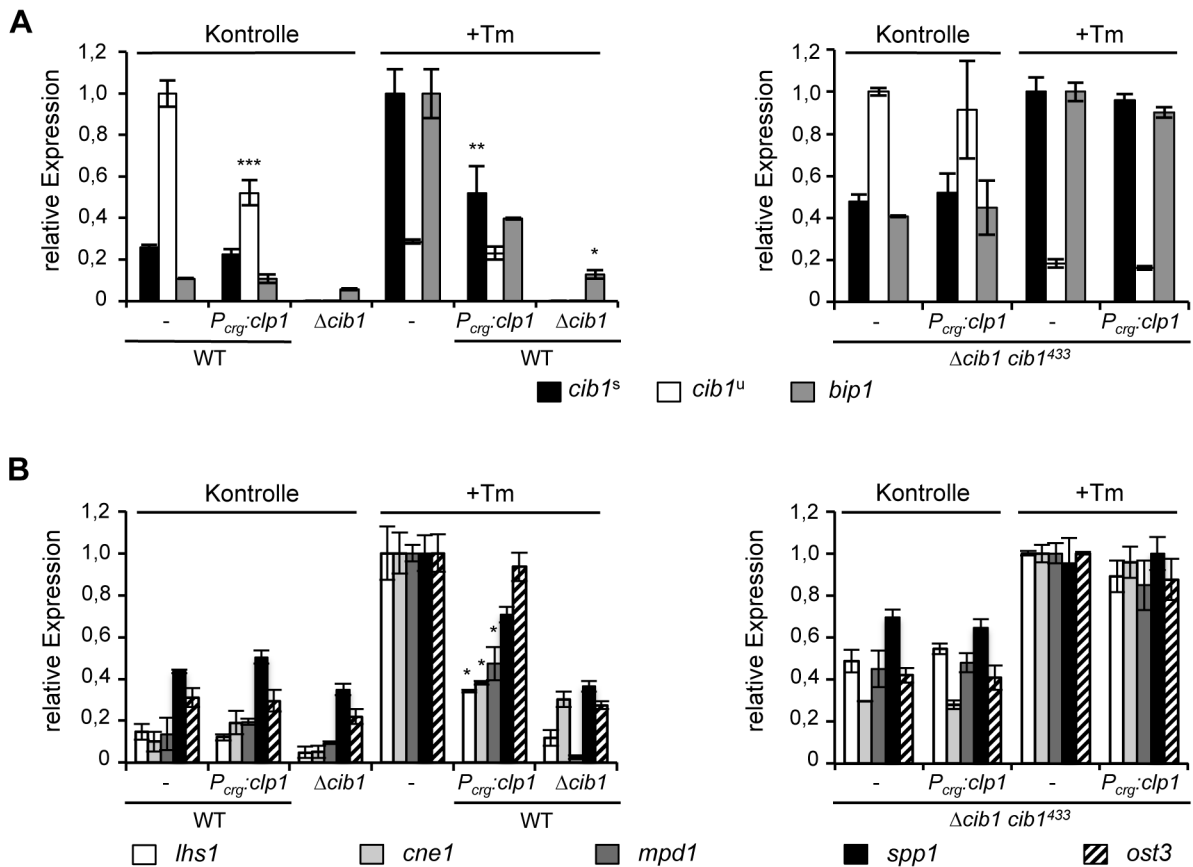
diesem Hintergrund ( $\Delta cib1 cib1^{433}$ ) hat keine Auswirkung auf die ER-Stressresistenz (Abb. 21). Dies zeigt, dass die physikalische Interaktion zwischen Clp1 und Cib1 notwendig für die durch Clp1 vermittelte erhöhte Stressresistenz ist.

#### 2.4.2 Die Expression von *clp1* reduziert die Aktivierung der UPR

Im Folgenden wurde der Einfluss der *clp1* Expression auf die transkriptionelle Antwort nach UPR Aktivierung der Stämme aus 2.4.1 untersucht. Im WT führt die Zugabe von Tunicamycin (Tm) zu einer signifikanten Aktivierung der UPR erkennbar durch die Induktion der Expression von *cib1<sup>s</sup>* und des UPR-Zielgens *bip1* (Abb. 22A). Die zusätzliche Überexpression von *clp1* hat deutlich reduzierte *cib1<sup>s</sup>* und *bip1* Level zur Folge (Abb. 22A), woraus auf eine verringerte UPR-Aktivität geschlossen werden kann. Zudem zeigte der WT, der *clp1* unter Kontrolle des *crp1* Promotors exprimiert, bereits in der Kontrolle (ohne Induktion der UPR) reduzierte *cib1* Transkriptlevel. Im Gegensatz dazu ist in den  $\Delta cib1 cib1^{433}$  Stämmen die Verringerung der UPR-Aktivität durch die *clp1* Überexpression nicht zu beobachten. In diesem Stammhintergrund sind die Transkriptlevel von *cib1<sup>s</sup>* und *bip1* unter ER-Stress auf dem Niveau des WT (Abb. 22A). Folglich ist für die Aktivierung der UPR die *cib1<sup>433</sup>* Expression in  $\Delta cib1$  Mutante ausreichend. Für eine Verringerung der UPR Aktivität durch Clp1 ist jedoch die Clp1-Cib1 Interaktion notwendig.

Um zu testen, ob zusätzlich zu *bip1* weitere UPR-Zielgene Clp1 abhängig reguliert sind, wurde die Expression von weiteren UPR regulierten Genen getestet. Neben den schon bekannten UPR-Zielgenen *lhs1*, *mpd1*, *cne1* und *ssp1* (siehe 2.1.5) wurde zusätzlich noch *UMAG\_04198*, das Ortholog von *OST3* (e-value: 3,6e-11), getestet. In *S. cerevisiae* kodiert *OST3* für die  $\gamma$ -Einheit des OST (oligosaccharyl transferase) Komplexes, der bei der N-Glykosylierung von Proteinen im ER beteiligt ist (Karaoglu *et al.*, 1995). Alle fünf Gene sind im WT und  $\Delta cib1 cib1^{433}$  nach UPR Aktivierung stark induziert (Abb. 22B). Die Überexpression von *clp1* führt zu einer signifikanten Reduktion der Expression von *lhs1*, *mpd1* und *cne1* (Abb. 22B). Im Vergleich dazu ist die Expression von *ssp1* nur geringfügig reduziert und *ost3* zeigt keine veränderte Expression. In den *cib1<sup>433</sup>* Stämmen ist keine Suppression durch *clp1* zu beobachten (Abb. 22B).

Diese Ergebnisse zeigen, dass die Expression von *clp1* zu einer reduzierten Induktion der UPR-Zielgene unter ER-Stress führt. Der heterogene Einfluss auf die Zielgenexpression weist auf eine durch Clp1 vermittelte differenzielle Regulation des UPR Signalwegs hin, die zu einer deutlich erhöhten ER-Stressresistenz führt. Voraussetzung für diese UPR-Modulation ist eine physikalische Interaktion zwischen Clp1 und Cib1, da *Cib1<sup>433</sup>*-Stämme weder in ihrer ER-Stressresistenz noch in ihrer Genexpression durch Clp1 beeinflusst werden.

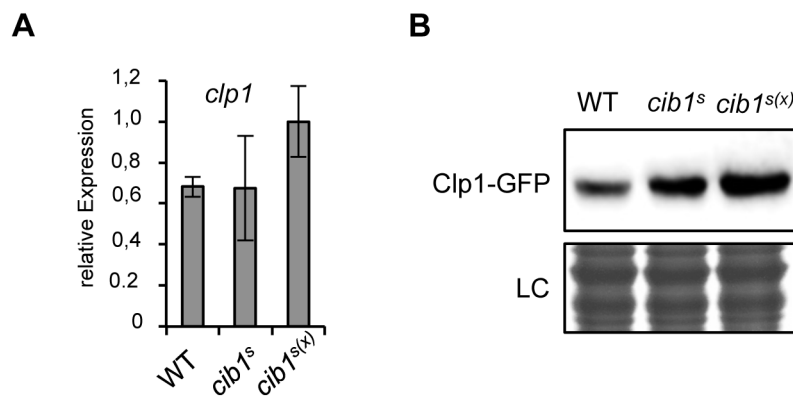


**Abb. 22: Differenzielle Reduktion der UPR-Zielgenexpression durch *clp1*.** Der *U. maydis* Stamm JB1 (WT) und Derivate wurden bis zu  $OD_{600} = 0,2$  in YNB Medium mit Glucose kultiviert. Anschließend wurden die Zellen in YNB Flüssigmedium mit Arabinose überführt, um die *clp1* Expression bei Stämmen mit *clp1* unter dem *crg1* Promotor zu induzieren. Tm wurde in einer Endkonzentration von 5  $\mu$ g/ml hinzugegeben, die Stämme 4 h inkubiert und anschließend die RNA isoliert. Bei Stämmen mit *cib1<sup>433</sup>* ist die Clp1-Cib1 Interaktionsdomäne nicht mehr vorhanden (rechte Seite). Der Stamm  $\Delta$ *cib1* dient als Negativkontrolle, um unspezifische Aktivierung der Expression ausschließen zu können. **(A)** Expressionsanalyse der Gene *cib1<sup>s</sup>*, *cib1<sup>u</sup>* und *bip1*. Gezeigt sind die Mittelwerte von drei biologischen Replikaten sowie zwei technischen Duplikaten. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung (SD) an. \* geben den p-Wert an: < 0,05, \*\* < 0,01 und \*\*\* < 0,001. **(B)** Expressionsanalyse der Gene *lhs1*, *cne1*, *mpd1*, *spp1* und *ost3* (*UMAG\_04198*). Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung (SD) an. \* geben den p-Wert an: < 0,05. Die Normalisierung der relativen Genexpression aller gezeigten Analysen erfolgte unter Verwendung von *eIF2b* (*UMAG\_04869*).

### 2.4.3 Die Aktivierung der UPR führt zu erhöhten Clp1 Mengen

Die *clp1* Expression führt zu einer erhöhten ER-Stressresistenz und der Verringerung der UPR-Aktivität. Um den Einfluss einer aktiven UPR auf die Abundanz des Clp1 Proteins zu untersuchen, wurde ein Derivat des Stammes AB31, der Clp1 als GFP Fusionsprotein exprimiert, verwendet (Scherer *et al.*, 2006; Heibel *et al.*, 2010b). Durch Arabinose kann in diesem Stamm die Expression des b-Heterodimers und damit auch die des Clp1-GFP Fusionsproteins induziert werden. Die zusätzliche Integration von *cib1<sup>s</sup>* unter Kontrolle des nativen Promotors in den *ip* Locus dieses Stammes führt zu einer konstitutiv aktiven UPR. Damit sollen die Auswirkungen der *cib1<sup>s</sup>* Expression auf die mRNA- und Proteinlevel von Clp1 untersucht werden.

Sowohl die einfache als auch die mehrfache (*cib1<sup>s(x)</sup>*) Integration des *cib1<sup>s</sup>* Plasmids hat keine signifikante Auswirkung auf die *clp1* Transkriptlevel im Vergleich zum WT (Abb. 23A). Im Gegensatz dazu können auf Proteinebene deutlich höhere Mengen an Clp1-GFP in Stämmen die *cib1<sup>s</sup>* exprimieren nachgewiesen werden (Abb. 23B). Dieser Effekt ist dosisabhängig, da die mehrfache Integration des *cib1<sup>s</sup>* Plasmids (*cib1<sup>s(x)</sup>*) zu deutlich höheren Proteinnengen führt. Dies deutet auf eine postranskriptionelle Clp1 Regulation durch die *cib1<sup>s</sup>* abhängige UPR Aktivierung hin und kann auf die Stabilisierung von Clp1 durch die Interaktion mit Cib1 zurückgeführt werden.



**Abb. 23: Erhöhte Proteinlevel von Clp1 durch die Hyperaktivierung der UPR.** (A) Analyse der *clp1* Genexpression während *cib1<sup>s</sup>* abhängiger UPR Aktivierung. Der Stamm AB31 *clp1:gfp* (WT) und Derivate, die *cib1<sup>s</sup>* unter dem nativen Promotor exprimieren, wurden in CM Flüssigmedium mit Glucose kultiviert. Anschließend wurden die Zellen in CM Flüssigmedium mit Arabinose als Kohlenstoffquelle überführt, um die *bE1/bW2* Expression zu induzieren. Die Kulturen wurden 6 h bei 28°C inkubiert, und die *clp1* Level mit qRT-PCR untersucht. Die *clp1* Expression ist durch *cib1<sup>s</sup>* nicht signifikant beeinflusst (p-Wert >0,1). Die Normalisierung der relativen Genexpression erfolgte unter Verwendung von *eIF2b* (*UMAG\_04869*). Gezeigt sind die Mittelwerte von drei biologischen sowie zwei technischen Replikaten. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung (SD) an. (B) Die Analyse von Clp1-GFP während *cib1<sup>s</sup>* abhängiger UPR Aktivierung. Für die Durchführung des Immunblots wurden die gleichen Kulturen wie bei (A) verwendet. Zum Nachweis von Clp1-GFP wurde ein GFP spezifischer Antikörper eingesetzt. Die Clp1-GFP Mengen sind bei *cib1<sup>s</sup>* und *cib1<sup>s(x)</sup>* deutlich erhöht im Vergleich zum WT. Als Ladekontrolle (LC) wurde eine Coomassie Färbung durchgeführt. (x) steht für eine mehrfache Integration des *cib1<sup>s</sup>* Plasmids.

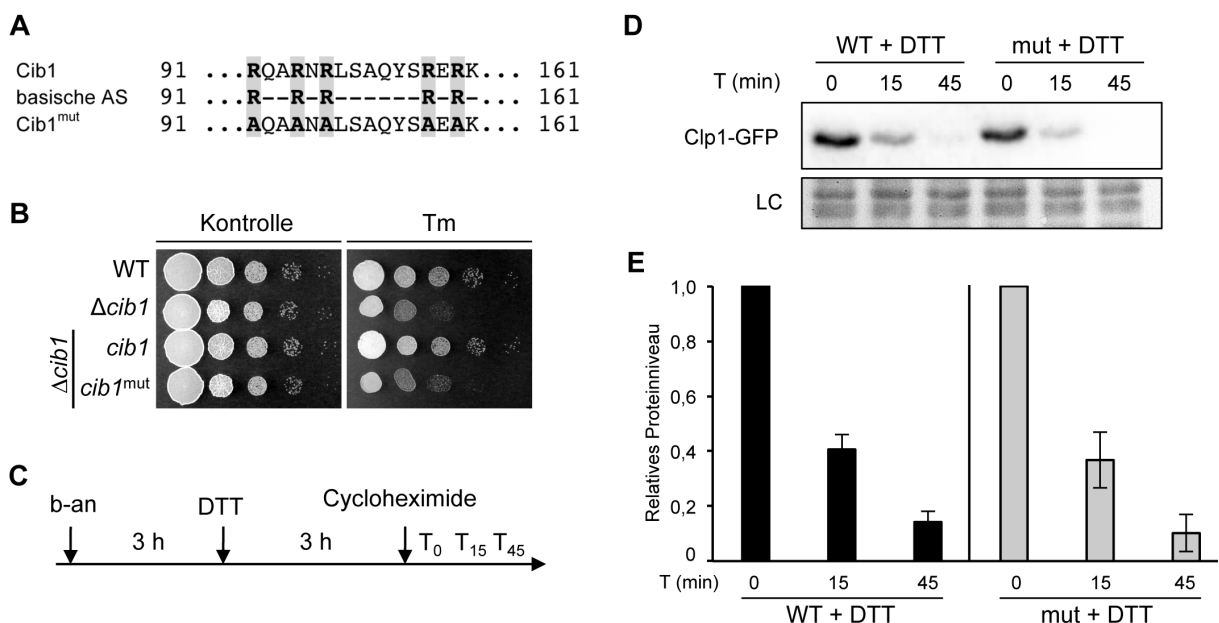
#### 2.4.4 Einfluss der DNA-Bindung von Cib1 auf die Clp1 Stabilität

In vorangegangenen Studien konnte gezeigt werden, dass für die Stabilisierung von Clp1 die Interaktion mit Cib1 essenziell ist (Heimel *et al.*, 2013). Daraus ergibt sich die Fragestellung, ob die Funktion von Cib1 als Transkriptionsfaktor einen Einfluss auf die Stabilität von Clp1 hat. Die DNA-Bindung von Cib1 wird durch die bZIP Domäne (AS 97 bis 161) vermittelt. Diese Domäne setzt sich aus einem basischen Bereich, der für die DNA-Bindung verantwortlich ist und einer Leucin-Zipper Region, welche für die Homo- bzw. Heterodimerisierung benötigt wird, zusammen (Ellenberger *et al.*, 1994; Hurst, 1995). Um den Effekt der DNA-Bindung zu untersuchen, wurden die Arginine der basischen Domäne von Cib1 durch Alanine ersetzt, wodurch die DNA-Bindung und die Funktion als Transkriptionsfaktor unterbunden werden sollte (Abb. 24A). Das hergestellte Plasmid



(*cib1<sup>mut</sup>*) wurde in den *ip* Locus des Stammes AB31 *clp1:gfp Δcib1* unter Kontrolle des konstitutiv aktiven *otef* Promoters integriert. Als Kontrolle (WT) wurde ein Plasmid mit *cib1* ohne Mutationen verwendet.

Die Expression von (*cib1<sup>mut</sup>*) führt im Vergleich zum  $\Delta$ *cib1* Ausgangsstamm zu keiner ER-Stressresistenz, wohingegen die Expression von *cib1* die ER-Stressresistenz der  $\Delta$ *cib1* Mutante vollständig wiederherstellt (Abb. 24B). Diese Beobachtung zeigt, dass für die ER-Stressresistenz eine intakte basische Domäne benötigt wird und die eingebrachten Mutationen vermutlich die DNA-Bindung durch Cib1 verhindern.



**Abb. 24: Die Mutation des basischen Bereichs der bZIP Domäne führt zu reduzierter ER-Stressresistenz, die Clp1 Stabilität ist jedoch nicht beeinflusst. (A)** Vergleich des basischen Bereichs der bZIP Domäne mit und ohne Mutationen. Fett gedruckt sind die basischen Aminosäuren, die von Arginin zu Alanin mutiert wurden. **(B)** ER-Stresstest der Komplementationsstämme ohne (*cib1*) und mit (*cib1<sup>mut</sup>*) Mutation der basischen Domäne. Die Plasmide wurden in den *ip* Locus von AB31 *clp1:gfp Δcib1* integriert und die Expression von *cib1* bzw. *cib1<sup>mut</sup>* ist unter Kontrolle des *otef* Promoters. 10-fach Verdünnungsreihen der *U. maydis* Stämme AB31 *clp1:gfp* (WT) und Derivate wurden auf YNB Festmedium mit Glucose getropft. Durch die Zugabe von 2 µg/ml Tm wurde ER-Stress induziert. Die basische Mutante verhält sich ähnlich wie der Deletionsstamm ( $\Delta$ *cib1*). **(C)** Versuchsaufbau zur Untersuchung der Clp1 Stabilität während UPR Induktion. Die Stämme AB31 *clp1:gfp Δcib1 P<sub>otef</sub>:cib1* (WT) und AB31 *clp1:gfp Δcib1 P<sub>otef</sub>:cib1<sup>mut</sup>* (mut) wurden in CM Flüssigmedium mit Arabinose überführt, um die Expression von *bE1/bW2* zu induzieren (b-an). Nach 3 h wurde DTT (3 mM) zugegeben, um die UPR zu aktivieren. Weitere 3 h später wurden 100 µg/ml Cycloheximide hinzugegeben, um die Proteinbiosynthese zu blockieren. Die Proben wurden vor (T<sub>0</sub>) und 15 Minuten (T<sub>15</sub>) oder 45 Minuten (T<sub>45</sub>) nach Cycloheximide Zugabe genommen. **(D)** Immunblot der Zellextrakte aus dem in **(C)** beschriebenen Experiment zur Untersuchung der Stabilität von Clp1-GFP während DTT abhängiger UPR Aktivierung. Zum Nachweis von Clp1-GFP wurde ein GFP spezifischer Antikörper verwendet. Als Ladekontrolle (LC) wurde die Membran mit Ponceau gefärbt. **(E)** Die Quantifizierung der Stabilität von Clp1-GFP während der UPR Aktivierung. Die Clp1-GFP Level zu den angegebenen Zeitpunkten wurden mittels ImageJ bestimmt, normalisiert und relativ zum Zeitpunkt T<sub>0</sub> gesetzt. Gezeigt sind die Mittelwerte von drei biologischen Replikaten, die Fehlerbalken geben die Standardabweichung (SD) an.

Um die möglichen Unterschiede bezüglich der Stabilität von Clp1 in diesen Stämmen zu untersuchen, wurde eine Analyse analog zur beschriebenen Vorgehensweise in Heimel *et al.*, 2013 durchgeführt. Die Stämme wurden in CM Glucose angezogen, die Aktivierung des b-Signalwegs und damit die Expression von Clp1-GFP wurde durch einen

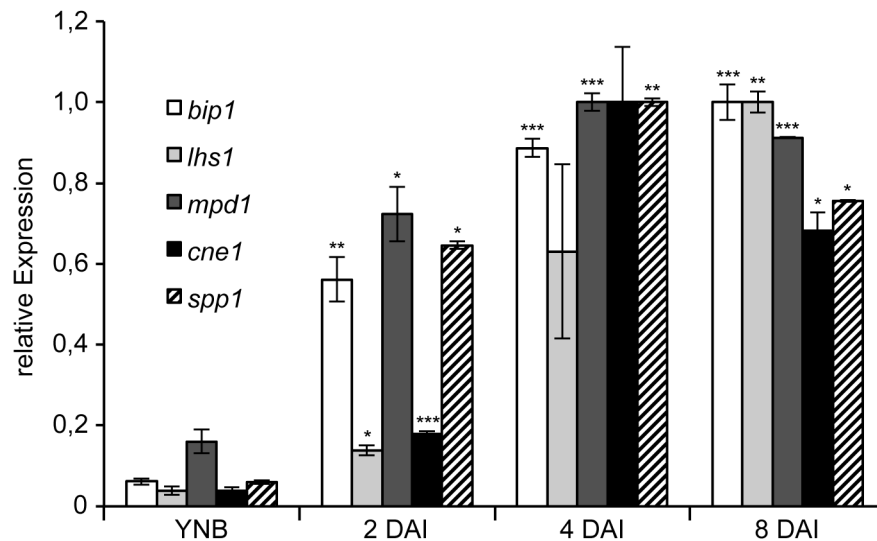
Medienwechsel zu CM Arabinose induziert. Nach 3 h wurde die UPR durch Zugabe von 3 mM DTT aktiviert, weitere 3 h später wurde die Translation durch Cycloheximid blockiert und Proben zu den angegebenen Zeitpunkten genommen (Abb. 24C). Die Quantifizierung der relativen Clp1-GFP Mengen zeigten keinen Unterschied zwischen den Stämmen mit der mutierten *cib1* Form (*mut*) und dem WT (Abb. 24E). Diese Beobachtungen deuten darauf hin, dass weder die UPR an sich, noch die Funktion von Cib1 als Transkriptionsfaktor für die Stabilisierung von Clp1 durch Cib1 notwendig ist.

## 2.5 Die UPR während der biotrophen Entwicklung

Der Infektionsprozess von *U. maydis* benötigt effektive Strategien, um die Pflanzenabwehr zu überwinden und um die Kolonisierung der Wirtspflanze zu ermöglichen. Die Expression von Genen, die mit der Wirtsinfektion assoziiert sind, werden typischerweise nach Penetration der Pflanzenoberfläche induziert (Stergiopoulos und de Wit, 2009; de Jonge *et al.*, 2011; Lo Presti *et al.*, 2015a). Es ist bekannt, dass die UPR spezifisch nach erfolgreicher Penetration der Pflanzenoberfläche aktiviert wird (Heimel *et al.*, 2010a) und eine funktionelle UPR für die Virulenz von *U. maydis* essenziell ist (Heimel *et al.*, 2010a; Heimel *et al.*, 2013). Gegenstand der weiteren Untersuchungen ist die Verknüpfung zwischen UPR und der Regulation der pathogenen Entwicklung.

### 2.5.1 Die Genexpression konservierter UPR-Zielgene wird spezifisch während der biotrophen Entwicklung aktiviert

Um die UPR Aktivierung während der biotrophen Entwicklung näher zu untersuchen wurde eine Expressionsanalyse konservierten UPR-Zielgene zu verschiedenen Entwicklungszeitpunkten *in planta* durchgeführt. Hierzu wurde die RNA aus Blättern der Maispflanze zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach der Infektion isoliert. Alle fünf UPR-Zielgene (*bip1*, *lhs1*, *mpd1*, *cne1* und *spp1*) zeigen eine signifikant induzierte Genexpression während der biotrophen Entwicklung im Vergleich zum Wachstum in axenischer Kultur (YNB) (Abb. 25). Zwei Tage nach Infektion (2 DAI) sind die Gene *bip1*, *mpd1* und *ssp1* bereits deutlich induziert. Nach vier Tagen (4 DAI) ist die Expression aller fünf getesteten Gene hochreguliert. Nach Induktion der UPR-Zielgene bleiben die Expressionslevel bis acht Tage nach Infektion (8 DAI) überwiegend konstant (Abb. 25). Mit dieser Analyse konnte gezeigt werden, dass die UPR-Zielgene analog zur Induktion durch ER-Stress, spezifisch während der pathogenen Entwicklung von *U. maydis in planta* verstärkt exprimiert sind, und die Expressionslevel nach Aktivierung über den gesamten Betrachtungszeitraum konstant bleiben. Weiter wird deutlich, dass die Induktion der UPR-Zielgene bereits in der frühen Phase der pathogenen Entwicklung stattfindet.



**Abb. 25: Untersuchung der UPR-Zielgenexpression während der biotrophen Entwicklung.** Die RNA wurde aus dem exponentiell wachsenden *U. maydis* Stamm SG200 (WT) in axenischer Kultur (YNB) und aus infizierten Blättern 2, 4 und 8 Tage nach Infektion (DAI), isoliert. Die Expression der UPR Markergene *bip1* (UMAG\_15034), *cne1* (UMAG\_10287), *lhs1* (UMAG\_00904), *mpd1* (UMAG\_05352) und *spp1* (UMAG\_02729) wurden zur Untersuchung der Expressionslevel mittels qRT-PCR verwendet. Gezeigt sind die Mittelwerte von drei biologischen sowie zwei technischen Replikaten bei YNB und zwei biologischen und zwei technischen Replikaten bei den Pflanzenproben (bestehend aus je 10 infizierten Blättern). Die Normalisierung der relativen Genexpression erfolgte unter Verwendung von *actin* (UMAG\_11232). Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung (SD) an. Der t-Test wurde für die Kalkulation der statistischen Signifikanz der Expressionswerte während der biotrophen Entwicklung im Vergleich zum Wachstum in axenischer Kultur (YNB) verwendet. \* geben den p-Wert an: < 0,05, \*\* < 0,01 und \*\*\* < 0,001.

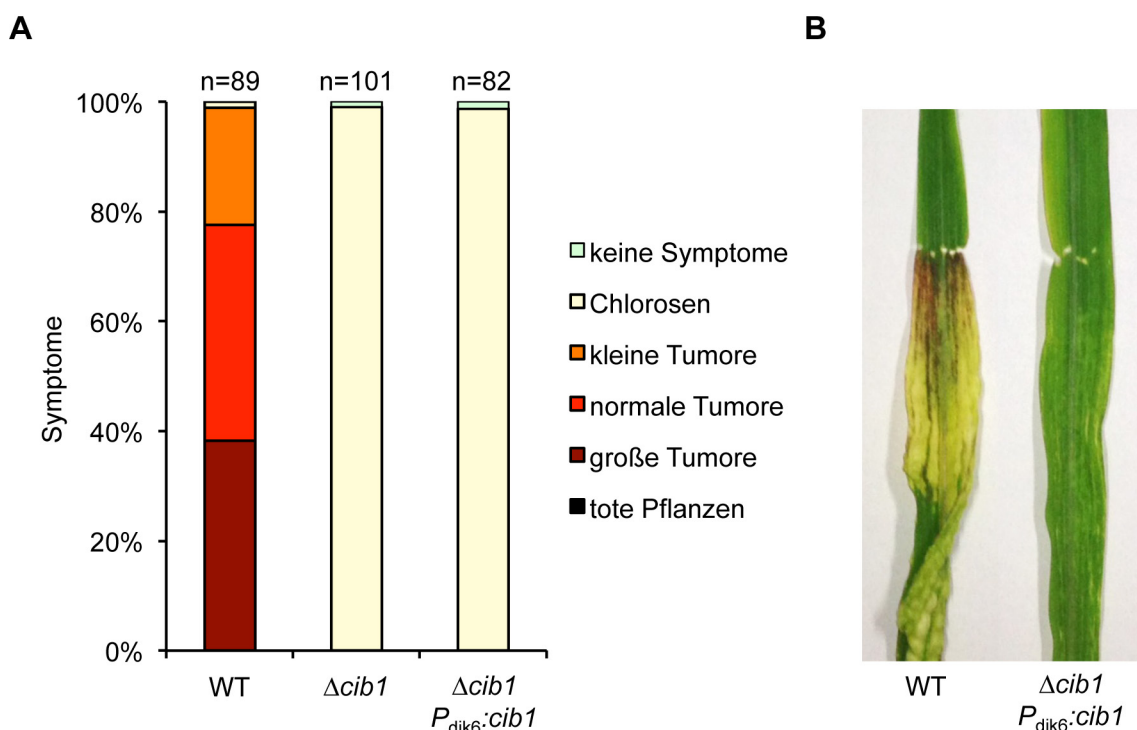
## 2.5.2 Die konstitutive *cib1* Expression zum frühen Zeitpunkt der pathogenen Entwicklung ist nicht ausreichend für die Virulenz

In den durchgeführten Expressionsanalysen wird deutlich, dass die UPR bereits in der frühen Phase der biotrophen Entwicklung aktiv ist (siehe 2.5.1). Diese Phase der Entwicklung ist ein kritischer Punkt, da der Pilz das basale Immunsystem der Pflanze überwinden muss, um eine kompatible Interaktion mit dem Wirt zu etablieren. Zusätzlich ist bekannt, dass eine vorzeitige Aktivierung der UPR zu einer reduzierten Virulenz führt. Die Induktion der UPR vor Penetration der Pflanzenzelle hat eine reduzierte Filamentbildung zur Folge, was die reduzierte Virulenz erklärt (Heimel *et al.*, 2013). Dies gibt einen Hinweis darauf, dass die zeitliche Koordinierung der UPR-Aktivierung eine entscheidende Rolle bei der Virulenz von *U. maydis* spielt.

Die Expression von *cib1* unter dem konstitutiven *otef* Promotor führt zu einer vollständigen Komplementation der Virulenz der  $\Delta$ *cib1* Mutante (siehe 6.3). Um zu testen, ob die *cib1* Expression zum frühen Zeitpunkt der biotrophen Entwicklung ausreichend ist um die Virulenz der  $\Delta$ *cib1* Mutante zu komplementieren, wurde *cib1* unter Kontrolle des *dik6* Promotors (UMAG\_04130) in den *ip* Locus des Stammes SG200 $\Delta$ *cib1* integriert. Aus Microarray-Daten ist bekannt, dass der *dik6* Promotor ausschließlich in den ersten zwei Tagen nach der

Infektion aktiv ist (K. Heibel, pers. Mitteilung). Dementsprechend wird *cib1* im  $\Delta cib1$   $P_{dik6}:cib1$  Stamm nur zu einem frühen Zeitpunkt der pathogenen Entwicklung exprimiert.

Um die Virulenz der verschiedenen Stämme zu untersuchen, wurden sieben Tage alte Maispflanzen mit SG200 (WT) und Derivaten inokuliert, die Bonitur der Pflanzen erfolgte acht Tage nach Infektion. Bei den mit dem WT infizierten Pflanzen zeigten sich überwiegend normale und große Tumore, während die Infektion mit dem Komplementationsstamm, der *cib1* unter Kontrolle des *dik6* Promotors exprimiert, ausschließlich zur Bildung von Chlorosen führte (Abb. 26). Damit entspricht der Phänotyp des Komplementationsstammes dem der  $\Delta cib1$  Mutante. Dies zeigt, dass die Expression von *cib1* ausschließlich zum frühen Zeitpunkt der Entwicklung nicht ausreichend für die pathogene Entwicklung von *U. maydis* ist.



**Abb. 26: Die Expression von *cib1* in der frühen Phase der pathogenen Entwicklung ist für die Komplementation der  $\Delta cib1$  Mutante nicht ausreichend.** Die Virulenzanalyse der Stämme SG200 (WT), der *cib1* Deletion ( $\Delta cib1$ ) und der Komplementation ( $\Delta cib1$   $P_{dik6}:cib1$ ). Für die Komplementation der  $\Delta cib1$  Mutante wurde *cib1* unter Kontrolle des *dik6* Promotors (*UMAG\_04130*) in den *ip* Locus integriert. **(A)** Die Bonitur der Krankheitssymptome acht Tage nach Infektion. n gibt die Anzahl der untersuchten Pflanzen an. Sowohl der Deletionsstamm als auch der Komplementationsstamm zeigen ausschließlich die Bildung von Chlorosen. **(B)** Visueller Vergleich der Krankheitssymptome zwischen WT und der  $\Delta cib1$  Komplementation durch Expression von *cib1* unter dem *dik6* Promotor ( $P_{dik6}$ ) acht Tage nach Infektion.

## 2.6 UPR Response Elements (UPREs) in *U. maydis*

Nachdem Cib1 als Homolog des UPR-Regulators Hac1p bestätigt werden konnte, und die UPR-Aktivierung zur Expression von konservierten UPR-Zielgenen (*bip1*, *lhs1*, *mpd1*, *cne1* und *ssp1*) führt, sollen durch die Analyse der Cib1-Bindestelle direkte Zielgene identifiziert werden. In *S. cerevisiae* aktiviert Hac1p die Expression von UPR-Zielgenen im Zellkern

durch die direkte Bindung an sogenannte „cis-acting“ UPR Elemente (UPRE) in den Promotoren entsprechender Zielgene (Mori *et al.*, 1992; Mori *et al.*, 1998; Fordyce *et al.*, 2012).

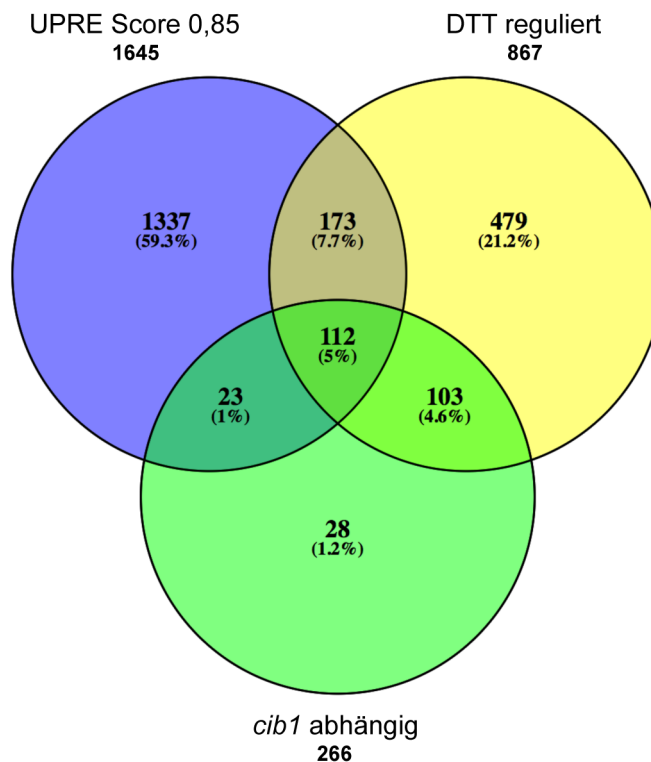
### 2.6.1 Bioinformatische Analyse der UPRE im Genom von *U. maydis*

Zur Untersuchung der direkten Bindung von Cib1 an die Promotorbereiche verschiedener UPR-Zielgene wurde zunächst eine bioinformatische Analyse der Promotorregionen des *U. maydis* Genoms aus der Datenbank (MUMDB) des Helmholtz Zentrum München ([ftp://ftpmips.gsf.de/fungi/Ustilaginaceae/Ustilago\\_maydis\\_521/](ftp://ftpmips.gsf.de/fungi/Ustilaginaceae/Ustilago_maydis_521/)) durchgeführt. Um potenzielle UPREs zu identifizieren, wurde eine Positions-Gewichts-Matrix (PWM) der Sequenzmotive UPRE1 und UPRE2 analog zu Fordyce *et al.*, 2012 erstellt. Die Promotorbereiche wurden als 1 kb große Region stromaufwärts des vorhergesagten Translationstarts definiert (durchgeführt von F. Finkernagel, IMT, Marburg).

In 1645 von 6772 Genen konnte ein UPRE mit einem Score von  $>0,85$  identifiziert werden. UPR regulierte Gene wurden anhand einer vorliegenden Microarray-Analyse (K. Heimel, pers. Mitteilung) ermittelt, wobei nur positiv regulierte Gene berücksichtigt wurden. In den Microarray-Analysen wurden 867 Gene als DTT abhängig reguliert definiert (Regulation im WT +DTT vs. WT  $>2$ ). 266 Gene wurden als *cib1* abhängig reguliert definiert (Regulation im WT +DTT vs.  $\Delta cib1$  +DTT  $>2$ ). Als UPR reguliert wurden 215 Gene definiert, die sowohl eine DTT als auch *cib1* abhängige Regulation zeigten. Innerhalb dieser Gruppe konnten 112 UPR Gene mit einer UPRE-Vorhersage von größer als 0,85 identifiziert werden (siehe 6.4 Tabelle 10). Im Vergleich zum Gesamtgenom (1645 von 6772) konnte eine signifikante Anreicherung von UPREs in dem Promotor UPR regulierter Gene (112 von 215) ( $p$ -Wert:  $8,0e-18$ ) ermittelt werden (Fishers exact test).

In der Analyse konnten fünf verschiedene UPRE-Motive identifiziert werden, die bei mindestens vier möglichen UPR-Zielgenen identisch sind: CAACGTGTCA (*UMAG\_01861* chr03, *UMAG\_00481* chr01, *UMAG\_04461* chr14 (ähnlich zu Pmr1), *UMAG\_03001* chr07, *UMAG\_02498* chr05, *UMAG\_03023* chr07), TGACACGTGA (*UMAG\_01055* chr02, *UMAG\_06089* chr21, *UMAG\_02945* chr07, *UMAG\_05216* chr04), CAACGTGTCG (*UMAG\_00196* chr01, *UMAG\_01988* chr03, *UMAG\_11056* chr11, *UMAG\_05118* chr04), TGCCACGTTCG (*UMAG\_10156* chr05 (ähnlich zu PDI), *UMAG\_11782* chr09 (Cib1), *UMAG\_01374* chr02 (Pit1), *UMAG\_01375* chr02 (Pit2)), TGACGTGTTC (*UMAG\_15034* chr02 (ähnlich zu Bip1), *UMAG\_00610* chr01, *UMAG\_02005* chr03, *UMAG\_03067* 7, *UMAG\_15085* chr20). Es wurde vermutet, dass Gene mit identischem UPRE funktionell verknüpft sind oder in Clustern angeordnet sind. Eine Lokalisation der Gene in Clustern im Genom kann ausgeschlossen werden, da die Gene mit identischem UPRE überwiegend auf

unterschiedlichen Chromosomen liegen. Eine funktionelle Verknüpfung ist jedoch möglich, da eine Vielzahl der Gene noch nicht oder unzureichend charakterisiert ist.



**Abb. 27: Die Identifizierung von UPR regulierten Genen mit vorhergesagten UPREs.** Zur bioinformatischen Analyse wurden die Gene (1645) verwendet, die einen UPRE Score von  $>0,85$  in der durchgeführten UPRE-Vorhersage besitzen. Zusätzlich wurde eine Microarray-Analyse (K. Heimel, pers. Mitteilung) genutzt, um UPR regulierte Zielgene zu ermitteln. DTT regulierte Gene (867) weisen eine  $>2$ -fache Regulation durch DTT Zugabe im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (gelb) auf. Die *cib1* abhängigen Gene (266) sind definiert durch  $>2$ -fache Regulation unter DTT vom WT im Vergleich zur  $\Delta cib1$  Mutante (grün). Bei 112 Genen mit vorhergesagtem UPRE stimmen beide Kriterien überein. Das Diagramm wurde mit Venny 2.1 erstellt (<http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html>).

Anhand von Orthologen in anderen Organismen konnte bei 21 der ermittelten Kandidaten eine mögliche Rolle bei der UPR vorhergesagt werden (Tabelle 1). Der größten Gruppe wurde eine mutmaßliche Funktion bei der Proteinfaltung zugeordnet. Hierzu zählen auch die bereits untersuchten UPR-Zielgene, die für die Hsp70 Chaperone Lhs1p und Bip1/Kar2p kodieren. Zu den weiteren Kandidaten zählen die für Ost3 und die Signal-Peptide-Peptidase (Spp1) kodierende Gene. In dieser Arbeit wurden diese konservierten UPR-Zielgene für Expressionsanalysen verwendet. Darüberhinaus beinhaltet die Liste das in *U. maydis* bereits charakterisierte und pathogenitätsrelevante Co-Chaperon Dnj1 (Lo Presti *et al.*, 2015a).

Bei vielen dieser UPR regulierten Gene in *U. maydis* stimmt die UPRE Vorhersage mit den Beobachtungen in *S. cerevisiae* überein. Hierzu zählen unter anderem Gene, die für die vorhergesagten Orthologen von Sec66, Bip1, Lhs1, Ero1 und Fmo1 kodierten. In all diesen Genen konnte in *S. cerevisiae* bereits ein UPRE nachgewiesen werden (Fordyce *et al.*, 2012).

**Tabelle 1: Funktionelle Einordnung der UPR regulierten Gene mit vorhergesagten UPREs aus *U. maydis*.** Durch Sequenzvergleiche konnte bei 21 der UPR regulierten Gene eine mögliche direkte oder indirekte UPR-Funktion vermutet werden. Zur besseren Übersicht wurden diese Gene in funktionelle Gruppen eingeteilt.

Gen <sup>a</sup>	Beschreibung	Position <sup>b</sup>	Sequenz des UPRE <sup>c</sup>	UPRE Score
<b>TRANSLOKATION</b>				
UMAG_00481	ähnlich zu Sec11	-266	tgacacgttg	0,983
UMAG_02546	ähnlich zu Sec62	-629	AGACGTGTCA	0,897
UMAG_02833	ähnlich zu Sec66	-383	tgacacgtgt	0,937
<b>PROTEINMODIFIKATION</b>				
UMAG_04198	ähnlich zu Ost3	-910	TGACACGTCG	0,911
<b>PROTEINFALTUNG</b>				
UMAG_00904	ähnlich zu Lhs1	-268	ggacacgtag	0,863
UMAG_01540	ähnlich zu Fmo1	-121	acacgtggct	0,878
UMAG_05173	Dnj1	-494	tcacgtggtt	0,866
UMAG_05219	ähnlich zu Ero1	-358	AGACACGTAT	0,961
UMAG_10099	ähnlich zu Erj5	-145	AGCCACGTTG	0,925
UMAG_10156	ähnlich zu PDI	-300	tgccacgtcg	0,865
UMAG_12210	ähnlich zu Hut1	-164	tgacgtggca	0,878
UMAG_15034	ähnlich zu Bip1	-152	tgacgtgttc	0,859
<b>INTRAZELLULÄRER TRANSPORT</b>				
UMAG_01624	ähnlich zu Sec23	-491	CTACGTGTTG	0,855
UMAG_02736	ähnlich zu Sec16	-971	GACCACGTTA	0,885
UMAG_03355	ähnlich zu Erv25	-456	AGACACGTGA	0,951
UMAG_04173	ähnlich zu Cop1	-416	AGACACGTCT	0,885
UMAG_04461	ähnlich zu Pmr1	-675	TGACACGTTG	0,983
UMAG_11027	ähnlich zu Sec22	-276	aaacacgtgc	0,865
UMAG_12062	ähnlich zu Erd2	-549	ctacgtggcc	0,914
<b>ERAD</b>				
UMAG_02729	ähnlich zu Spp1	-150	ggacacgtag	0,961
<b>WEITERE</b>				
UMAG_11782	Cib1	-369	TGCCACGTCG	0,865

<sup>a</sup> Nummer gemäß MUMDB

<sup>b</sup> relativ zu (A) des ersten ATG in der mRNA

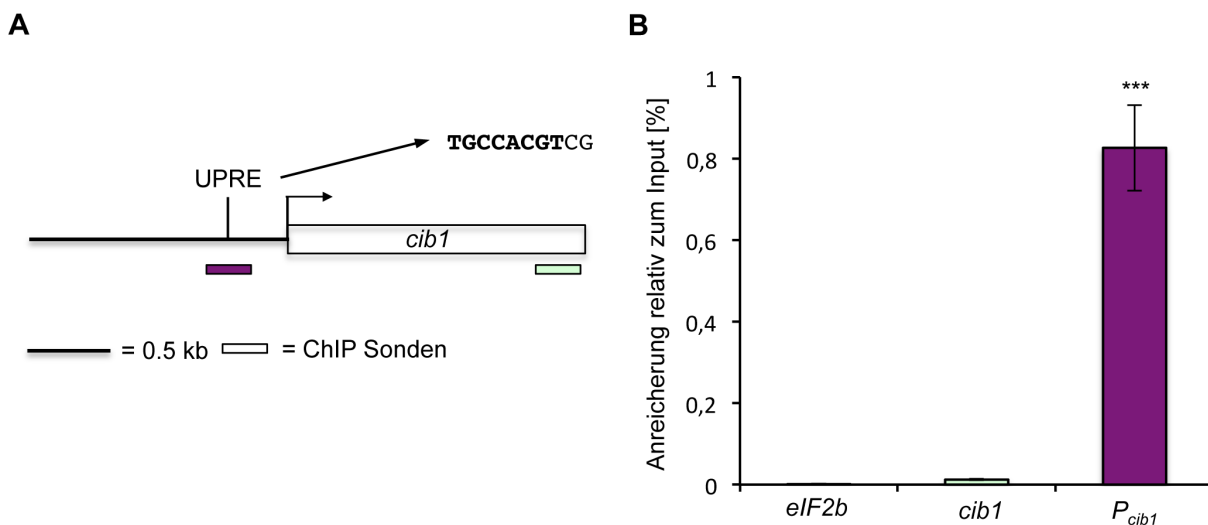
<sup>c</sup> Großbuchstaben: Gene auf dem Watson Strang, Kleinbuchstaben: Gene auf dem Crick Strang

## 2.6.2 Cib1 bindet an ein UPRE im eigenen Promotor

In *S. cerevisiae* ist die Autoregulation von Hac1p durch dessen Bindung an ein UPRE im eigenen Promotor ausreichend und notwendig für eine funktionelle UPR (Ogawa und Mori, 2004). Durch bioinformatische Analyse konnte auch im Promotor von *cib1* ein potenzielles UPRE identifiziert werden (Tabelle 1). Eine mögliche Autoregulation von *cib1*, wodurch Cib1 seine eigene Expression verstärkt, könnte den toxischen Effekt einer *cib1*<sup>s</sup> Expression im  $\Delta$ *cib1* Hintergrund erklären (siehe 2.3.1). Um zu überprüfen, ob Cib1 tatsächlich an den vorhergesagten Promotorbereich bindet, wurde eine quantitative Chromatin-

Immunopräzipitation (qChIP) durchgeführt. Zu diesem Zweck wurde der Stamm SG200 *cib1-3xHA* verwendet, der ein Cib1-3xHA Fusionsprotein unter dem nativen Promotor exprimiert. Die ER-Stresssensitivität von SG200 *cib1-3xHA* ist nicht von der des Ausgangsstammes SG200 zu unterscheiden, was die vollständige Funktionalität des Fusionsproteins demonstriert (siehe 6.1).

Die Analyse zeigte eine eindeutig nachweisbare Bindung von Cib1 an den eigenen Promotor. Im Vergleich zu den als Negativkontrollen verwendeten ORFs von *cib1* und *eIF2b* konnte eine 62,2 fache (+/- 8,0) Anreicherung des PCR-Amplikons des *cib1* Promotors ( $P_{cib1}$ ) im Vergleich zum offenen Leserahmen von *cib1* festgestellt werden (Abb. 28B). Diese Ergebnisse bieten eine mögliche Erklärung für die letalen Effekte von *cib1<sup>s</sup>* unter dem nativen Promotor im  $\Delta cib1$  Hintergrund.



**Abb. 28: qChIP Analyse der Cib1 Bindestelle im *cib1* Promotor. (A)** Schematische Übersicht des *cib1* Promotors mit der Cib1 Bindestelle (UPRE) und die Sondenbereiche, die für die qChIP Analyse verwendet wurden. **(B)** qChIP Analyse der Cib1 Bindung an den *cib1* Promotor im Stamm SG200 *cib1-3xHA* nach 3 h DTT (3 mM) Behandlung. Das HA-markierte Protein wurde durch einen anti-HA Antikörper, welcher an Agarosebeads gebunden ist, immunpräzipitiert. Gezeigt ist die Anreicherung der immunpräzipitierten DNA relativ zur Input-Kontrolle. Die PCR-Amplikons des *cib1* Promotors sind signifikant angereichert im Vergleich zu den Kontrollen (*eIF2b* und *cib1*). Keine signifikante Anreicherung zeigte sich bei den PCR-Amplikons des *cib1* ORFs im Vergleich zu der *eIF2b* Kontrolle. Gezeigt sind die Mittelwerte von vier biologischen Replikaten. Die Fehlerbalken geben die Standardfehler (SE) an. \* geben den p-Wert an: \* < 0,05, \*\* < 0,01 und \*\*\* < 0,001.

## 2.7 Cib1 reguliert die Expression von Effektorgenen

Bei der Unterdrückung der Pflanzenabwehr und der Etablierung einer kompatiblen Interaktion zwischen Pilz und Pflanze spielen sekretierte Effektoren eine entscheidende Rolle (Doehlemann *et al.*, 2009; Doehlemann *et al.*, 2011; Hemetsberger *et al.*, 2012; Mueller *et al.*, 2013; Lanver *et al.*, 2014; Redkar *et al.*, 2015). Während die Funktion der Effektoren bereits umfassend untersucht wurde, gibt es über deren Regulation auf transkriptioneller Ebene nur wenige Informationen. Das Genom von *U. maydis* enthält 386 Gene, die für mögliche sekretierte Proteine kodieren und eine Funktion als Effektoren haben könnten

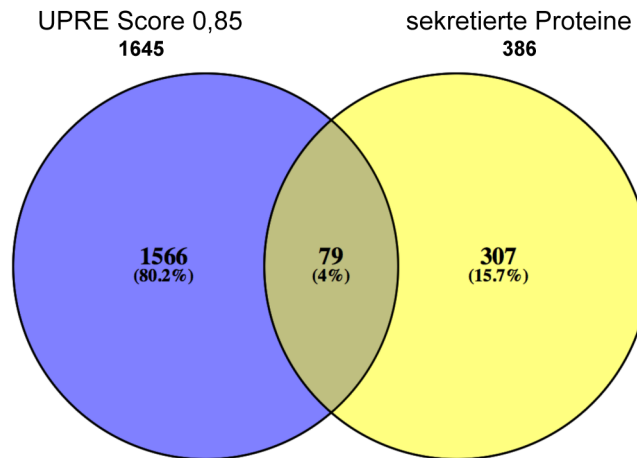


(Mueller *et al.*, 2008). Viele dieser Effektor kodierenden Gene sind in Clustern organisiert und werden spezifisch während der biotrophen Entwicklung innerhalb der Pflanze exprimiert (Kämper *et al.*, 2006). Die massive Effektorgenexpression führt zur Belastung des sekretorischen Weges und aufgrund der Vielzahl an synthetisierten Proteinen zu ER-Stress. Die UPR wird als Antwort auf un- oder fehlgefaltete Proteine aktiviert und gewährleistet die Homöostase im ER.

### 2.7.1 Bioinformatische Analyse der UPRE in sekretierten Effektorgen

Eine vermutete posttranskriptionelle Verknüpfung zwischen der UPR und der Sekretion von Effektoren wurde im Vorfeld dieser Arbeit vermutet und konnte für die Chorismatmutase Cmu1 experimentell bestätigt werden (Heimel *et al.*, 2013; Lo Presti *et al.*, 2015a). Eine mögliche Verknüpfung auf transkriptioneller Ebene wurde jedoch bislang nicht untersucht. In der bioinformatischen Analyse konnten 1645 Gene (UPRE Score >0,85) identifiziert werden, die eine mögliche Cib1 Bindestelle im Promotor besitzen (siehe 2.6.1). Um zu überprüfen, ob sich unter diesen möglichen UPR-Zielgenen auch sekretierte Effektoren befinden, wurde die Schnittmenge zwischen der bioinformatischen Analyse und den 386 vorhergesagten Genen (Mueller *et al.*, 2008), die für sekretierte Proteine ohne eine enzymatische Funktion kodieren, bestimmt.

Abzüglich von fünf Kandidaten, die eine mögliche Funktion innerhalb der UPR haben (*UMAG\_02833*, *UMAG\_04171*, *UMAG\_05173*, *UMAG\_10099*, *UMAG\_11187*), konnten 74 potenzielle Effektorgene (UPRE Score >0,85) identifiziert werden, die eine UPRE Region im Promotor besitzen. Die Liste (siehe 6.4 Tabelle 11) beinhaltet unter anderem die schon charakterisierten Effektorgene *pit2* (*UMAG\_01375*) und *pep1* (*UMAG\_01987*) (Doehlemann *et al.*, 2009; Doehlemann *et al.*, 2011; Hemetsberger *et al.*, 2012; Mueller *et al.*, 2013). Weitere Gene konnten den Effektorgenclustern 2B (*UMAG\_01302*), 6A (*UMAG\_02535*, *UMAG\_02537*), 10A, (*UMAG\_03748*, *UMAG\_03750*) und 19A (*UMAG\_05294*, *UMAG\_05299*, *UMAG\_05309*, *UMAG\_10555*) zugeordnet werden. Zusätzlich konnten auch die Gene *mig2\_1* (*UMAG\_06178*), *mig2\_2* (*UMAG\_06179*) und *mig2\_3* (*UMAG\_1250*) nachgewiesen werden, die während der pathogenen Entwicklung stark induziert sind, jedoch keine essenzielle Funktion in der pathogenen Entwicklung haben (Basse *et al.*, 2000; Basse *et al.*, 2002; Kämper *et al.*, 2006; Brefort *et al.*, 2014).



**Abb. 29: Identifizierung von Effektorgenen mit vorhergesagten UPREs.** Für die bioinformatischen Analysen wurden Gene mit einem UPRE Score von >0,85 (1645) verwendet. Diese wurden mit 386 Genen aus Mueller *et al.*, 2008 verglichen, die als sekretierte Proteine ohne enzymatische Funktion vorhergesagt wurden. Durch den bioinformatischen Vergleich konnten 79 Gene, die für mögliche Effektoren kodieren und einen UPRE Score >0,85 besitzen, identifiziert werden (siehe 6.4 Tabelle 11). Das gezeigte Diagramm wurde mit Venny 2.1 (<http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html>) erstellt.

## 2.7.2 qRT-PCR basierter Screen zur Untersuchung der UPR abhängigen Expression der UPRE Kandidatengene

Um zu überprüfen, ob die 74 bioinformatisch vorhergesagten Effektoren mit einer möglichen Cib1 Bindestelle (siehe 2.7.1) UPR abhängig reguliert sind, wurde ein qRT-PCR basierter Screen durchgeführt. Hierzu wurden die Stämme SG200 und SG200 $\Delta$ *cib1* in YNB Flüssigmedium kultiviert und mit DTT (3 mM, 3 h) oder Tm (5  $\mu$ g/ml, 4 h) versetzt. Aus diesen Kulturen wurde die RNA isoliert und für den qRT-PCR Screen verwendet. Die charakterisierten Effektorgene *tin2* (UMAG\_05302, UPRE score 0,708) und *cmu1* (UMAG\_05731, UPRE score 0,845) wurden trotz eines UPRE Scores von <0,85 in die Analyse miteinbezogen (Djamei *et al.*, 2011; Tanaka *et al.*, 2014). Das konservierte UPR-Markergene *bip1* (UMAG\_15034, UPRE score 0.859) fungierte als Positivkontrolle.

Als UPR reguliert wurden Gene eingeordnet bei einer mindestens zweifach erhöhten Expression nach DTT und Tm Behandlung im Vergleich zur unbehandelten WT-Kontrolle. Zusätzlich musste die Expression *cib1* abhängig reguliert sein. Dies ist der Fall, wenn die Expression im WT mit DTT und Tm Behandlung mehr als zweifach höher im Vergleich zu den entsprechenden Proben des  $\Delta$ *cib1* Kontrollstamms ist. 66 der 76 getesteten Gene zeigten keine UPR Regulation nach den oben genannten Kriterien (siehe 6.5 Tabelle 12). Die Gene *pep1*, UMAG\_03313, *mig2\_2*, UMAG\_06255, UMAG\_10555 und UMAG\_11002 zeigten ausschließlich bei DTT Zugabe eine signifikante *cib1* abhängige Induktion der Expression (Tabelle 2). Die Expression der Gene UMAG\_01750 und UMAG\_02535 ist dagegen nur bei Tm Zugabe *cib1* abhängig induziert. Eine *cib1* abhängige Expression unter DTT und Tm konnte nur bei den Genen *pit2* und *tin1-1* (UMAG\_05294) nachgewiesen werden (Tabelle 2).

**Tabelle 2: Auszug aus dem qRT-PCR basierenden Screen.** In der gezeigten Liste sind alle Gene dargestellt, die mindestens ein Kriterium für die UPR Regulation erfüllen. Die gesamte Liste ist im Anhang zu finden (siehe 6.5 Tabelle 12). Als Positivkontrolle für die UPR Regulation wurde *bip1* (*UMAG\_15034*) verwendet (fett gedruckt).

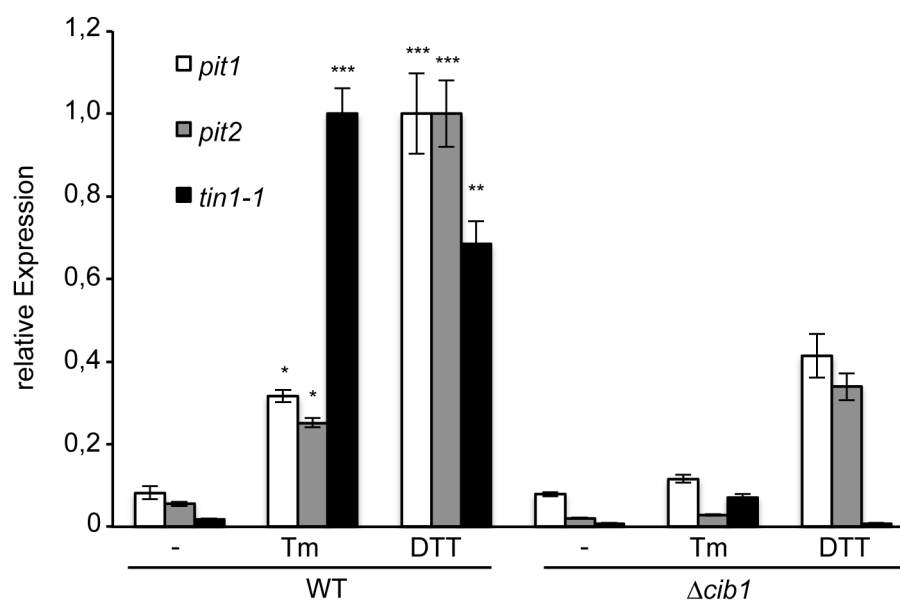
Gennummer (MUMAG_DB)	Genname/ Behandlung	x-fache Expression kein Stress vs Stress		x-fache Expression unter ER-Stress	
		WT vs DTT/Tm	Regulation (>2-fach)	WT vs $\Delta cib1$	Regulation (> 2-fach)
<b>UMAG_15034</b>	<b><i>bip1</i></b>	control	JA		JA
	DTT	20,18		28,83	
	Tm	14,26		6,51	
UMAG_01375	<i>pit2</i>		JA		JA
	DTT	21,119		3,072	
	Tm	5,560		12,524	
UMAG_01695			NEIN		NEIN
	DTT	1,706		0,674	
	Tm	0,251		1,076	
UMAG_01750			JA		NEIN
	DTT	3,073		1,144	
	Tm	3,376		3,183	
UMAG_01987	<i>pep1</i>		NEIN		JA
	DTT	5,599		3,997	
	Tm	1,835		3,400	
UMAG_02535			JA		NEIN
	DTT	6,250		0,686	
	Tm	2,148		3,098	
UMAG_02981			NEIN		JA
	DTT	0,192		4,243	
	Tm	0,402		3,685	
UMAG_03154			JA		NEIN
	DTT	6,433		0,878	
	Tm	2,842		0,157	
UMAG_03585			JA		NEIN
	DTT	3,222		0,777	
	Tm	2,222		0,654	
UMAG_03750			JA		NEIN
	DTT	8,334		1,071	
	Tm	2,013		0,149	
UMAG_05294	<i>tin1-1</i>		JA		JA
	DTT	53,505		56,399	
	Tm	59,067		14,704	
UMAG_05604			JA		NEIN
	DTT	3,955		0,319	
	Tm	10,134		0,425	
UMAG_06179	<i>mig2_2</i>		NEIN		JA
	DTT	21,291		2,616	
	Tm	1,338		2,483	
UMAG_11002			JA		NEIN
	DTT	9,003		11,320	
	Tm	3,822		1,647	

### 2.7.3 UPR abhängige Expression von *tin1-1*, *pit1* und *pit2*

Die Gene *tin1-1* und *pit2*, die als mögliche UPR abhängige Effektorgene identifiziert wurden, sollen im Weiteren näher untersucht werden. *tin1-1* ist Teil des Effektorgenclusters 19A, welches aus 24 vorhergesagten Effektorgen besteht. Es wurde gezeigt, dass die Deletion des gesamten Genclusters zum Verlust der Tumorbildung führt (Kämper *et al.*, 2006). Im Gegensatz dazu hat die Deletion von *tin1-1* nur eine geringe Auswirkung auf die Virulenz (Brefort *et al.*, 2014). *pit2* kodiert für einen sekretierten Cystein-Protease Inhibitor und ist durch einen bidirektionalen Promoter genetisch mit *pit1* (kodiert für ein Transmembranprotein mit unbekannter Funktion) verbunden. Beide Gene sind während des Infektionsprozesses

stark hochreguliert und essenziell für die pathogene Entwicklung von *U. maydis* (Doehlemann *et al.*, 2011). Aufgrund der vorhergesagten Cib1 Bindestelle (UPRE) im bidirektionalen Promotor von *pit1* und *pit2* wurde vermutet, dass die Expression beider Gene durch direkte Bindung an den Promotor reguliert werden.

Der qRT-PCR basierte Screen gab einen ersten Hinweis auf eine UPR abhängige Regulation der Gene *pit2* und *tin1-1*. Um dies zu verifizieren, wurden die Expressionslevel von *tin1-1* und *pit2* sowie *pit1* näher untersucht. Sowohl bei DTT als auch bei Tm induziertem ER-Stress zeigen alle drei Gene eine signifikante Induktion der Expression (Abb. 30). Die Deletion von *cib1* ( $\Delta cib1$ ) hat den Verlust dieser Induktion zur Folge (Abb. 30), was die Annahme bestätigt, dass die Expression von *pit1*, *pit2* und *tin1-1* UPR abhängig reguliert ist.

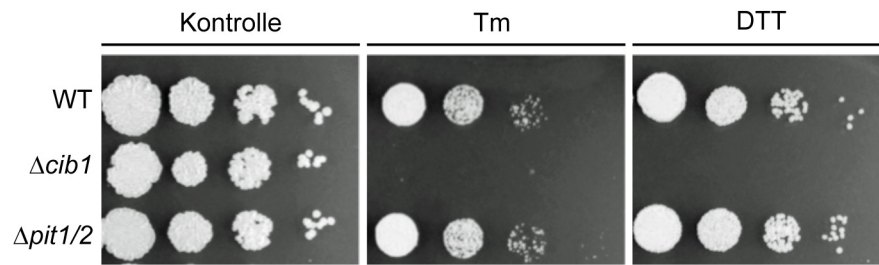


**Abb. 30: Die UPR abhängige Regulation der Gene *pit1*, *pit2* und *tin1-1*.** Die RNA wurde aus den exponentiell wachsenden *U. maydis* Stämmen SG200 (WT) und  $\Delta cib1$  in YNB Flüssigmedium isoliert. Die UPR wurde zuvor durch Zugabe von 5  $\mu$ g/ml Tunicamycin (Tm) für 4 h oder durch 3 mM DTT für 3 h aktiviert. Die Expression der Gene wurde mittels qRT-PCR analysiert. Die Normalisierung der relativen Genexpression erfolgte unter Verwendung von *eIF2b* (*UMAG\_04869*). Gezeigt sind die Mittelwerte von drei biologischen sowie zwei technischen Replikaten. Die Fehlerbalken geben die Standardfehler (SE) an. \* geben den p-Wert an: \* < 0,05, \*\* < 0,01 und \*\*\* < 0,001.

#### 2.7.4 Die Deletion von *pit1/2* hat keinen Einfluss auf die ER-Stressresistenz

Aufgrund der zuvor gezeigten UPR abhängigen Expression von *pit1* und *pit2* wurde eine mögliche Funktion beider Gene innerhalb der ER-Stressantwort überprüft. Zu diesem Zweck wurde das Zellwachstum der  $\Delta pit1/2$  Mutante unter ER-Stressbedingungen getestet.

Als Positivkontrolle wurde der *cib1* Deletionsstamm ( $\Delta cib1$ ) verwendet, der eine deutlich höhere ER-Stresssensitivität als der WT aufweist. Im Vergleich zum WT zeigte die Deletion von ( $\Delta pit1/2$ ) keinen Einfluss auf das Wachstum unter ER-Stressbedingungen (Abb. 31).

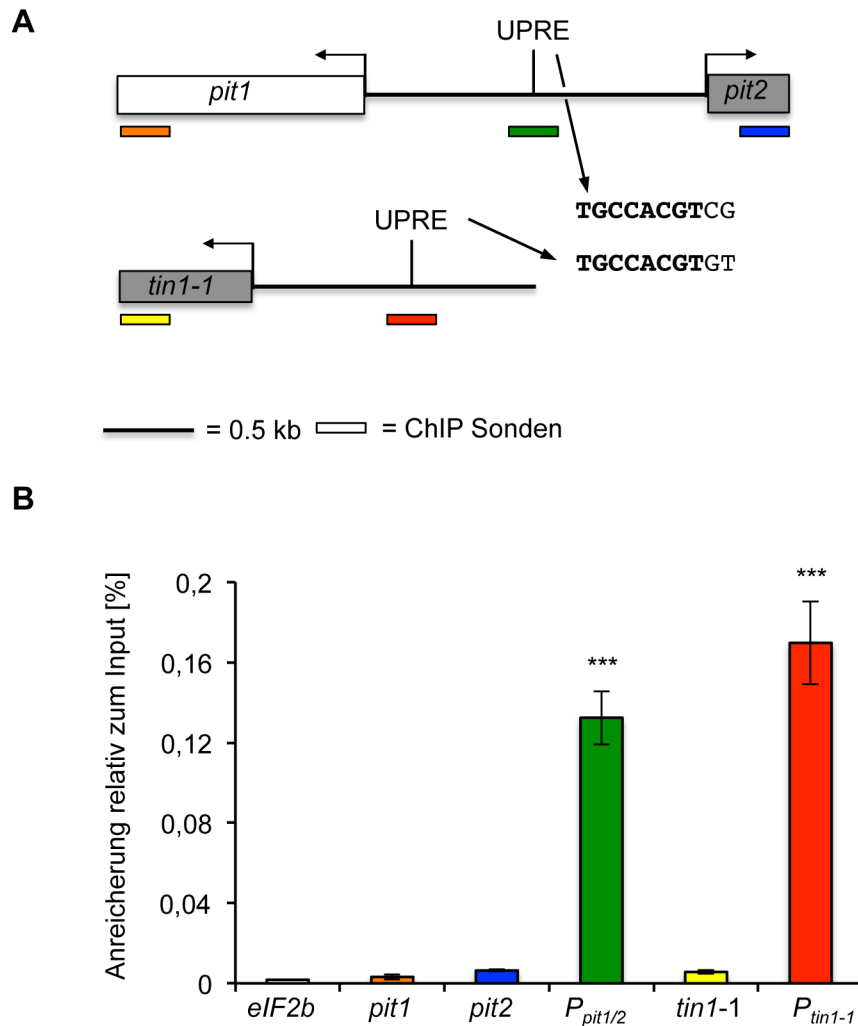


**Abb. 31: Die ER-Stressresistenz der  $\Delta pit1/2$  Mutante.** 10-fach Verdünnungsreihen des *U. maydis* Stammes SG200 (WT) und Derivate wurden auf YNB Festmedium mit Glucose als Kohlenstoffquelle getropft. Zur ER-Stressinduktion wurden 2 mM DTT oder 2  $\mu$ g/ml Tunicamicin (Tm) verwendet. Die Platten wurden 48 h bei 28°C inkubiert.

### 2.7.5 Cib1 bindet an die Promotoren von *tin1-1*, *pit1* und *pit2*

Da eine *cib1* abhängige Regulation von *tin1-1*, *pit1* und *pit2* eindeutig nachgewiesen werden konnte, stellte sich die Frage, ob die Regulation über eine direkte Bindung von Cib1 an die vorhergesagten UPREs in Promotoren dieser Gene stattfindet. Um diese Annahme zu überprüfen, wurde eine qChIP Analyse durchgeführt (Versuchsdurchführung siehe 2.6.2).

Zur Analyse der Promotorfragmente wurden die Primer so gewählt, dass ein Bereich inklusive der Cib1 Bindestelle (UPRE) amplifiziert wurde. Als Kontrollen wurden Bereiche in dem offenen Leserahmen der dazugehörigen Gene verwendet und als zusätzliche Kontrolle fungierte der offene Leserahmen des *eIF2b* Gens, welches nicht UPR abhängig reguliert wird (Abb. 32A). Die Anreicherung der Fragmente wurde relativ zur Input-Kontrolle der Promotorregionen mit UPREs und zu den Fragmenten der dazugehörigen offenen Leserahmen (ORF) von *pit1*, *pit2*, *tin1-1* oder *eIF2b* bestimmt. Es konnte eine signifikante Anreicherung der Promotorregionen von *pit1/2* und *tin1-1* mit UPREs im Vergleich zu den entsprechenden ORFs erzielt werden. Im Vergleich zur *eIF2b* Kontrolle waren die *pit1/2* Promotorfragmente mit UPRE 74,9-fach (+/- 7,8) und die *tin1-1* Promotorfragmente 95,1-fach (+/- 11,7) angereichert (Abb. 32B). Dieses Experiment bestätigt die Annahme, dass Cib1 die Expression von *pit1*, *pit2* und *tin1-1* durch direkte Bindung an die UPRE dieser Gene reguliert.

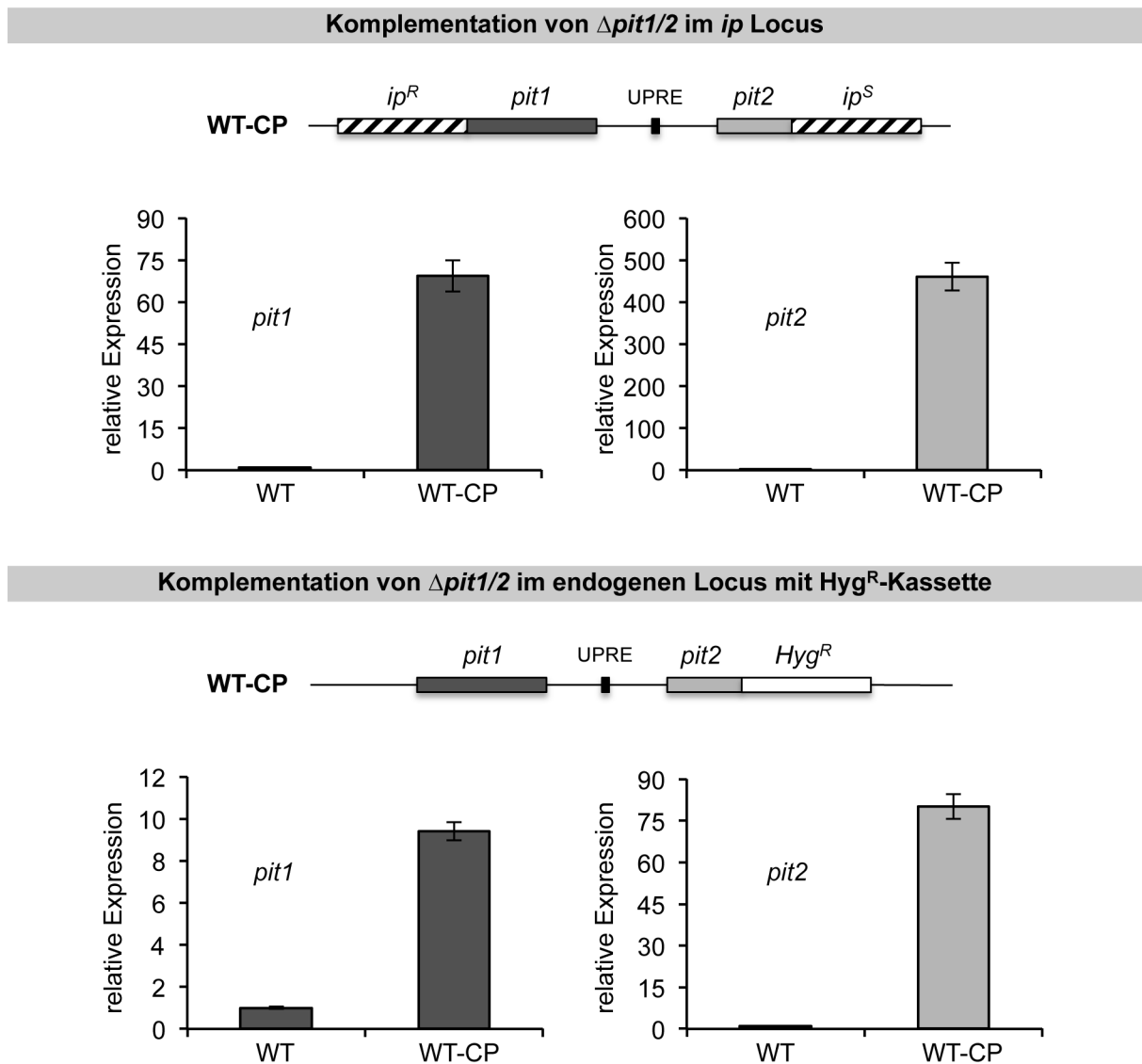


**Abb. 32: Cib1 bindet an das UPRE in den Promotoren von *pit1/2* und *tin1-1*.** (A) Schematische Übersicht der Promotororganisation und der Sondenbereiche, die für die qChIP Analyse verwendet wurden. Gezeigt sind die Cib1 Bindestellen (UPRE) in den Promotorbereichen von *pit1/2* und *tin1-1*. Fett gedruckte Nukleotide sind in beiden Promotorbereichen konserviert. (B) qChIP Analyse des *pit1/2* und *tin1-1* Promotors. Gezeigt ist die Anreicherung der immunpräzipitierten DNA relativ zur Input-Kontrolle. PCR-Amplikons des *pit1/2* und *tin1-1* Promotors sind signifikant angereichert im Vergleich zu den ORF Kontrollen. Keine signifikante Anreicherung zeigte sich bei den PCR-Amplikons der *pit1*, *pit2* und *tin1-1* ORFs im Vergleich zu der *eIF2b* Kontrolle. Gezeigt sind die Mittelwerte von vier biologischen Replikaten. Die Fehlerbalken geben die Standardfehler (SE) an. \* geben den p-Wert an: \* < 0,05, \*\* < 0,01 und \*\*\* < 0,001.

### 2.7.6 Das UPRE-Motiv im *pit1/2* Promotor ist für die UPR abhängige Genexpression notwendig

Die Notwendigkeit der Cib1 Bindestelle (TGCCACGTCG) für die UPR abhängige Genexpression von *pit1* und *pit2* wurde durch eine Komplementationsanalyse der  $\Delta pit1/2$  Mutante überprüft. Als Kontrolle wurde zunächst ein Konstrukt bestehend aus den Genen *pit1*, *pit2* und dem nativen Promotor (mit UPRE-Motiv) in den *ip* Locus der  $\Delta pit1/2$  Mutante integriert. Beim Vergleich der Expressionslevel von SG200 (WT) und dem Komplementationsstamm (WT-CP) zeigte sich eine drastische erhöhte basale Expression von *pit1* (69,3-fach (+/- 5,6)) und *pit2* (461,1-fach (+/- 33,3)) (Abb. 33), was zu einer möglichen Beeinträchtigung der UPR abhängigen Regulation führen könnte. Aus diesem

Grund wurde im nächsten Schritt die Komplementation im nativen Locus durchgeführt. Dazu wurde ein Konstrukt, bestehend aus den Genen *pit1* und *pit2* unter Kontrolle des nativen Promotors und der Hygromycin-Resistenzkassette (Hyg<sup>R</sup>), mittels homologer Rekombination integriert. Auch bei dieser Methode konnte eine stark erhöhte basale Expression, wenn auch deutlich schwächer als bei Integration in den *ip* Locus, festgestellt werden. Die Expressionslevel von *pit1* sind 9,4-fach (+/- 0,4) und von *pit2* 80,1-fach (+/- 4,5) höher als im WT (Abb. 33).



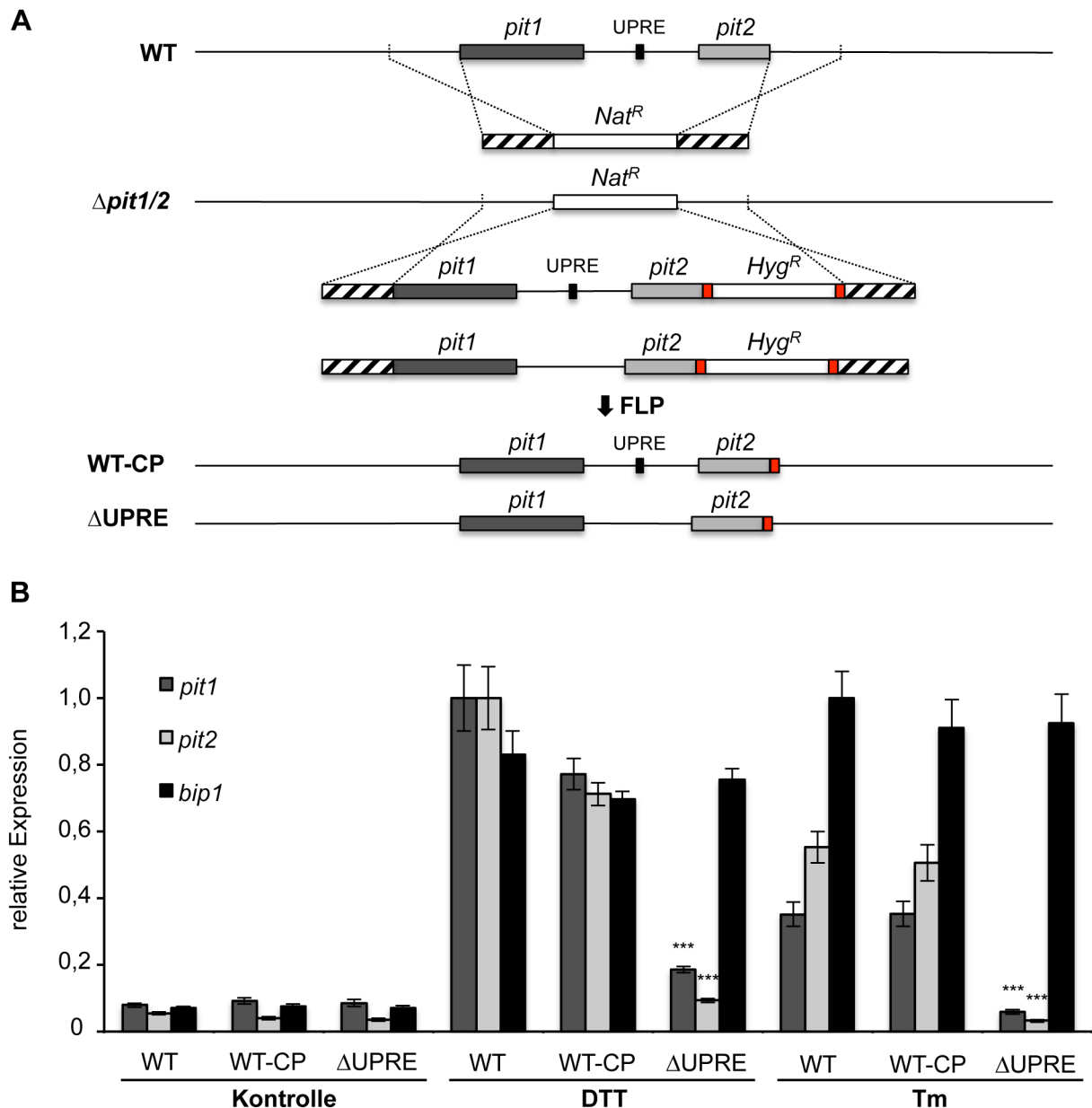
**Abb. 33: Stark erhöhte basale Expression von *pit1* und *pit2* bei der Komplementation der  $\Delta pit1/2$  Mutante.** Zur Komplementation der  $\Delta pit1/2$  Mutante wurden verschiedene Strategien angewendet. Zum einen wurde das Komplementationkonstrukt in den *ip* Locus und zum anderen in den endogenen Locus inklusive der Hygromycin-Resistenzkassette (Hyg<sup>R</sup>) der  $\Delta pit1/2$  Mutante integriert. Die basale Expression der Gene *pit1* und *pit2* wurde in SG200 (WT) und im Komplementationsstamm (WT-CP) durch eine qRT-PCR Analyse ermittelt und gegen *eIF2b* (UMAG\_04869) normalisiert. Gezeigt sind die Mittelwerte von drei biologischen sowie zwei technischen Replikaten. Die Fehlerbalken geben die Standardfehler (SE) an.

Es bestand die Vermutung, dass durch Integration der Hyg<sup>R</sup>-Kassette die Chromatinstruktur in diesem Bereich verändert wird und daraus die erhöhte basale Expression resultiert. Aus diesem Grund wurde eine Methode verwendet, die die Exzision der Hyg<sup>R</sup>-Kassette nach erfolgreicher Integration ermöglicht (Khrunyk *et al.*, 2010). Bei dieser Technik wird durch Induktion einer FLP Rekombinase die Hyg<sup>R</sup>-Kassette, welche von FRT-Bereichen flankiert ist, aus dem Genom herausgeschnitten.

Hierzu wurde im ersten Schritt der gesamte *pit1* und *pit2* Locus im Stamm SG200 deletiert. Zu diesem Zweck wurden die Gene *pit1*, *pit2* und der dazugehörige native Promotor durch die Nourseothricin-Resistenzkassette (Nat<sup>R</sup>) ersetzt. Anschließend wurde die Nat<sup>R</sup>-Kassette durch das Konstrukt für die Komplementation mit der entsprechenden Hyg<sup>R</sup>-Kassette (mit FRT-Bereichen) mittels homologer Rekombination substituiert. Die Induktion der Rekombinase (FLP), welche als freireplizierendes Plasmid eingebracht wurde, führt zum Entfernen der Hyg<sup>R</sup>-Kassette aus dem Genom (Abb. 34A). Auf diesem Weg wurden Stämme hergestellt, die das Komplementationskonstrukt im nativen Locus ohne die Hyg<sup>R</sup>-Kassette integriert haben. Zur funktionellen Untersuchung des UPRE im *pit1/2* Promotor wurde ein Komplementationskonstrukt mit einer Deletion des UPRE-Motivs im Promotorbereich ( $\Delta$ UPRE) verwendet.

Die hergestellten Komplementationsstämme ohne (WT-CP) oder mit Deletion des UPRE im Promotor von *pit1/2* ( $\Delta$ UPRE) zeigten im Vergleich zum WT keine veränderte basale Expression von *pit1* und *pit2* (Abb. 34B). Die Aktivierung der UPR durch DTT oder Tm führte im WT wie auch in den beiden Komplementationsstämmen zur einer UPR Aktivierung, die durch eine Induktion der *bip1* Expression überprüft wurde. Im Gegensatz dazu wurde eine UPR abhängige *pit1* und *pit2* Expression nur in den Stämmen WT und WT-CP beobachtet (Abb. 34B). Die Deletion des UPRE ( $\Delta$ UPRE) im *pit1/2* Promotor hat somit den Verlust der UPR abhängigen *pit1* und *pit2* Expression zur Folge. Dies zeigt, dass das identifizierte UPRE-Motiv für die UPR abhängige Regulation von *pit1* und *pit2* essenziell ist.





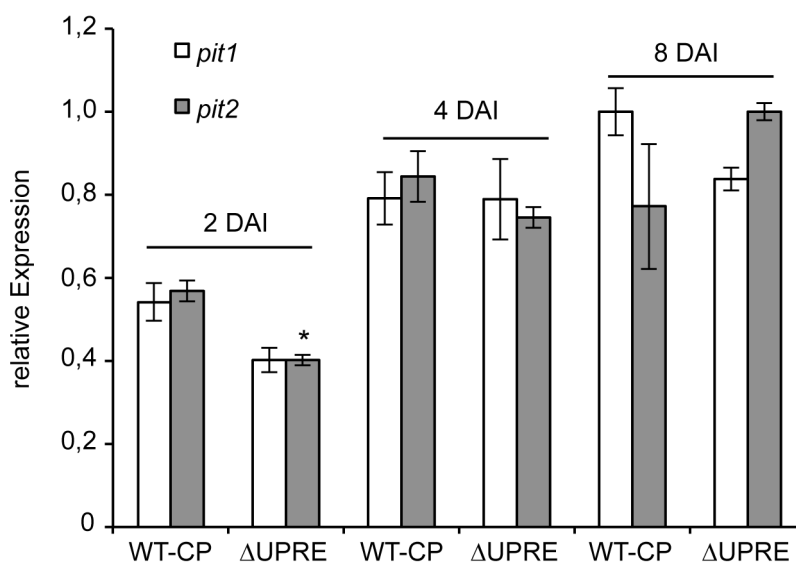
**Abb. 34: Das UPRE-Motiv ist für die UPR abhängige Expression von *pit1* und *pit2* notwendig.** (A) Schematische Darstellung der  $\Delta pit1/2$  Komplementation durch das FRT/FLP-System. Im ersten Schritt wurden *pit1* und *pit2* mittels homologer Rekombination durch die *Nat<sup>R</sup>*-Kassette ersetzt ( $\Delta pit1/2$ ). Zur Komplementation wurden Konstrukte verwendet, welche eine *Hyg<sup>R</sup>*-Kassette beinhalten, die von FRT-Regionen (rot) flankiert ist. Dies ermöglicht nach erfolgreicher Integration das Entfernen der *Hyg<sup>R</sup>*-Kassette aus dem Genom durch Expression der FLP Rekombinase. (B) qRT-PCR Analyse der UPR abhängigen *pit1*, *pit2* und *bip1* Expression. Die RNA wurde aus dem exponentiell wachsenden *U. maydis* SG200 (WT) Stamm und Derivaten in YNB Flüssigmedium isoliert. Die UPR wurde durch 5  $\mu$ g/ml Tunicamycin (Tm) für 4 h oder mit 3 mM DTT für 3 h aktiviert. Untersucht wurde die Expression von *pit1*, *pit2* und *bip1* in zwei unterschiedlichen Komplementationsstämmen mit (WT-CP) und ohne ( $\Delta$ UPRE) das vorhergesagte UPRE. Die Normalisierung der relativen Genexpression erfolgte unter Verwendung von *eIF2b* (*UMAG\_04869*). Gezeigt sind die Mittelwerte von drei biologischen sowie zwei technischen Replikaten. Die Fehlerbalken geben die Standardfehler (SE) an. \* geben den p-Wert an: \* < 0,05, \*\* < 0,01 und \*\*\* < 0,001.

### 2.7.7 Der Verlust der UPR abhängigen Regulation von *pit1* und *pit2* führt zu reduzierter Virulenz

Während der biotrophen Entwicklung ist die Expression von *pit1* und *pit2* deutlich induziert, und die Deletion der Gene hat einen nahezu vollständigen Verlust der Virulenz in *U. maydis*

zur Folge (Doehlemann *et al.*, 2011). Dies ermöglicht eine funktionelle Analyse der UPR abhängigen Regulation beider Gene durch Infektionsexperimente und Expressionsanalysen *in planta*.

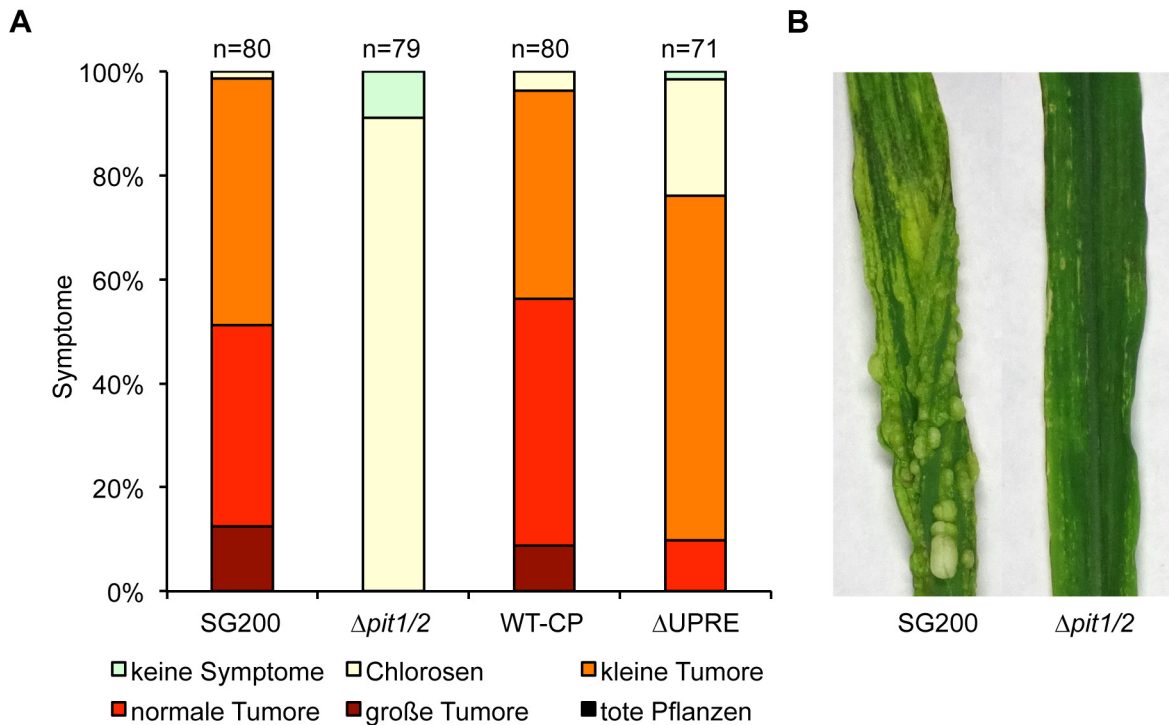
Zur Untersuchung der Expression *in planta* wurde die RNA aus Blättern infizierter Maispflanzen isoliert und anschließend analysiert. Die Quantifizierung durch qRT-PCR zeigte eine reduzierte Expression von *pit1* und *pit2* im  $\Delta$ UPRE Stamm zwei Tage nach Infektion (DAI) im Vergleich zum Kontrollstamm WT-CP (Abb. 35). Zu den anderen Zeitpunkten (4 DAI und 8 DAI) zeigten sich jedoch keine Unterschiede im Vergleich zur Kontrolle. Die UPR abhängige Regulation scheint demzufolge nur im frühen Stadium der biotrophen Entwicklung eine Auswirkung auf die Expression von *pit1* und *pit2* zu haben.



**Abb. 35: Die Deletion des UPRE-Motivs hat eine reduzierte Expression von *pit1* und *pit2* in der frühen pathogenen Entwicklung zur Folge.** qRT-PCR Analyse der RNA aus infizierten Maisblättern 2, 4 und 8 Tage nach Infektion (DAI). Die Zellen der entsprechenden Stämme ohne (WT-CP) und mit Deletion ( $\Delta$ UPRE) des UPRE-Motivs wurden in gleicher Anzahl in sieben Tage alte Maiskeimlinge inokuliert. Die RNA wurde aus drei unabhängigen Proben isoliert. Die Normalisierung der relativen Genexpression erfolgte unter Verwendung von *eIF2b* (*UMAG\_04869*). Die Fehlerbalken geben die Standardfehler (SE) an. \* gibt den p-Wert an: < 0,05.

Um den Einfluss der Cib1 abhängigen Regulation von *pit1/2* auf die Virulenz zu testen, wurden sieben Tage alte Maiskeimlinge mit dem Stamm SG200 (WT) und den entsprechenden Derivaten (WT-CP,  $\Delta$ UPRE) inokuliert. Die Deletion von *pit1* und *pit2* ( $\Delta$ *pit1/2*) führte erwartungsgemäß zu einem vollständigen Verlust der Virulenz (Abb. 36). Dies konnte durch Integration von *pit1* und *pit2* unter dem nativen Promotor in diesem Stamm (WT-CP) vollständig komplementiert werden. Im Gegensatz dazu führte die Deletion des UPRE-Motivs ( $\Delta$ UPRE) im Vergleich zum WT und WT-CP Stamm zu einer signifikant reduzierten Virulenz ( $p < 0,05$ ; Wilcoxon-Rank-Sum Test) (Abb. 36A).

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass das UPRE-Motiv für die Virulenz notwendig ist. Für die Expression von *pit1* und *pit2* *in planta* ist die Regulation durch die UPR jedoch ausschließlich im frühen Stadium der pathogenen Entwicklung wichtig.



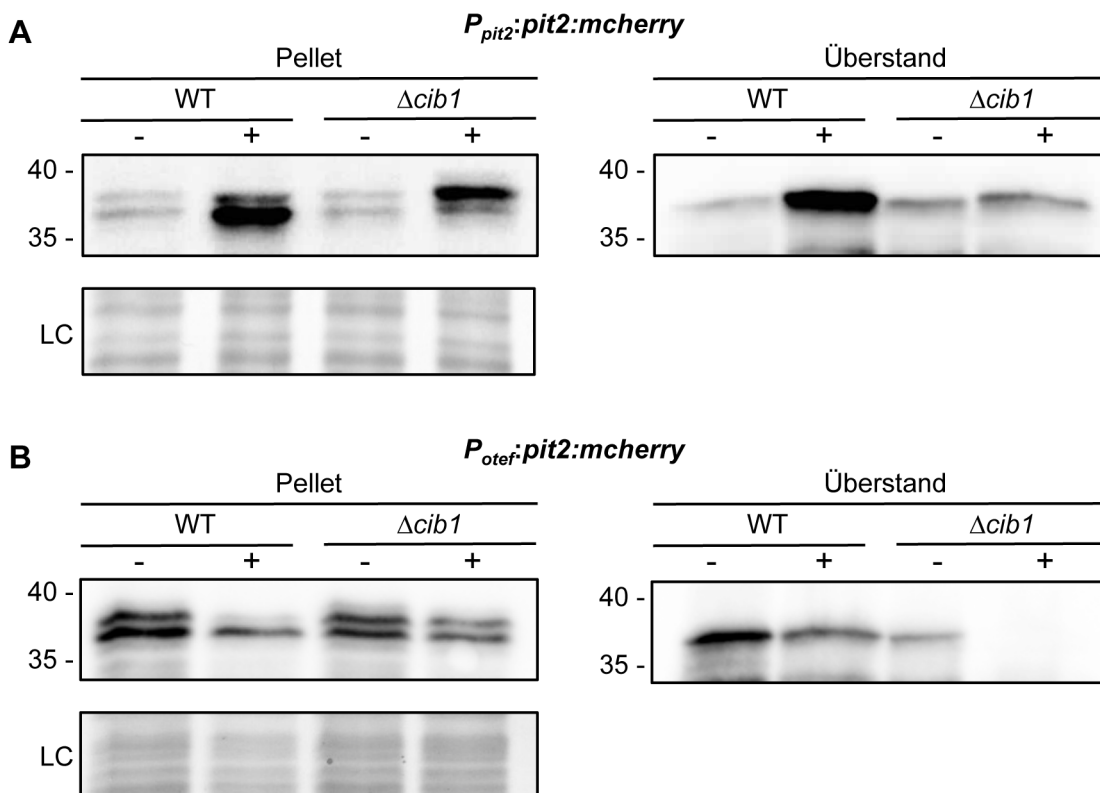
**Abb. 36: Die Deletion des UPRE-Motivs im *pit1/2* Promotor führt zu einer reduzierten Virulenz.** Es wurden sieben Tage alte Maiskeimlinge (Early Golden Bantam) mit den SG200 (WT), der  $\Delta cib1$  Mutante und den Komplementationsstämmen ohne (WT-CP) und mit ( $\Delta UPRE$ ) Deletion des UPRE inokuliert. (A) Die Bonitur erfolgte acht Tage nach Infektion. n gibt die Anzahl der untersuchten Pflanzen an. (B) Visueller Vergleich der Krankheitssymptome zwischen WT und der  $\Delta pit1/2$  Mutante acht Tage nach Infektion.

### 2.7.8 Die Aktivierung der UPR führt zu erhöhter Pit2 Sekretion

Die UPR wird für die Aufrechterhaltung der Homöostase im ER benötigt und ist daher vermutlich für die effiziente Sekretion von Effektoren während der biotrophen Phase von *U. maydis* wichtig (Heimel *et al.*, 2013; Lo Presti *et al.*, 2015a). Um die transkriptionellen und posttranskriptionellen Effekte einer aktiven UPR auf die Sekretion von Pit2 untersuchen zu können, wurde die Menge an sekretiertem und intrazellulärem Pit2-mCherry Fusionsprotein im Stamm SG200 $\Delta pit2$  *pit2:mcherry* und dem  $\Delta cib1$  Derivat analysiert. Diese Stämme exprimieren ein Pit2-mCherry Fusionsprotein unter Kontrolle des nativen Promotors.

Die Induktion von ER-Stress durch Zugabe von DTT führt zu stark erhöhten Mengen an sekretiertem Pit2-mCherry im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (Abb. 37A). Die Induktion von ER-Stress im  $\Delta cib1$  Hintergrund dagegen führt zu keiner erhöhten Sekretion von Pit2-mCherry. Die Analyse der Pelletfraktion zeigt, dass nach DTT Zugabe erhöhte Level von Pit2-mCherry im WT vorhanden sind. In der  $\Delta cib1$  Mutante dagegen ist die Menge an Pit2-mCherry in der Pelletfraktion geringer, was mit den verringerten *pit2* Expressionsleveln in der  $\Delta cib1$  Mutante (siehe Abb. 30) unter diesen Bedingungen übereinstimmt. Diese Daten zeigen, dass die UPR-Aktivierung eine verstärkte Expression vermittelt und notwendig für die effiziente Sekretion von Pit2-mCherry ist.

Interessanterweise ist bei der  $\Delta cib1$  Mutante unter ER-Stress eine höher laufende Bande erkennbar, die im WT Hintergrund und im Überstand nicht vorhanden ist. Bei der höher laufenden Bande handelt es sich vermutlich um das nicht prozessierte Pit2-mCherry Fusionsprotein, das ein 25 Aminosäuren großes Signalpeptid (39 kDa) besitzt. Dem gegenüber repräsentiert die niedriger laufende Bande das prozessierte Pit2-mCherry Fusionsprotein ohne Signalpeptid (36 kDa). Dies lässt vermuten, dass die UPR auch für die effiziente Prozessierung und Spaltung des Pit2 Signalpeptids wichtig ist.



**Abb. 37: Die Sekretion vom Pit2-mCherry wird durch ER-Stress Cib1 abhängig stark induziert. (A)** Der Einfluss auf Pit2-mCherry durch DTT abhängige UPR Aktivierung wurde mittels Immunblot durch Verwendung eines anti-mCherry Antikörpers in den Stämmen SG200 $\Delta pit2$   $P_{pit2}::pit2:mcherry$  (WT) und im  $cib1$  Deletionsstamm ( $\Delta cib1$ ) untersucht. Die Kultivierung erfolgte in CM Flüssigmedium mit 3 mM DTT (+), um die UPR zu induzieren oder ohne (-) als Kontrolle. Nach 4 h wurde das Zellpellet und der Überstand durch Zentrifugation separiert, und die isolierten Proteine mittels SDS-Page aufgetrennt. Der immunologische Nachweis der Proteine erfolgte mit einem anti-mCherry Antikörper. Als Ladekontrolle (LC) wurde eine Coomassie Färbung durchgeführt. **(B)** Die posttranskriptionellen Effekte einer aktiven UPR auf Pit2-mCherry wurden in SG200 $\Delta pit2$   $P_{otef}::pit2:mcherry$  (WT) und dem  $cib1$  Deletionsstamm ( $\Delta cib1$ ) untersucht. Die Expression von  $pit2:mcherry$  ist unter Kontrolle des konstitutiv aktiven  $otef$  Promotors. Das Experiment wurde, wie in **(A)** beschrieben, durchgeführt.

Um zwischen transkriptionellen und posttranskriptionellen Effekten der UPR auf die Pit2 Sekretion unterscheiden zu können, wurden Stämme verwendet, die  $pit2:mcherry$  unter Kontrolle des konstitutiv aktiven  $otef$  Promotors (SG200 $\Delta pit2$   $P_{otef}::pit2:mcherry$ ) exprimieren. In diesen Stämmen ist eine Regulation der  $pit2$  Genexpression durch die UPR nicht mehr möglich. Im WT hat die Induktion von ER-Stress keinen Einfluss auf die Pit2-mCherry Menge im Kulturüberstand. Dagegen konnte im  $\Delta cib1$  Hintergrund unter ER-Stressbedingungen

keine Sekretion von Pit2-mCherry nachgewiesen werden und auch in der unbehandelten Kontrolle waren die sekretierten Mengen an Pit2-mCherry im Vergleich zum WT reduziert (Abb. 37B). Im Gegensatz dazu zeigte sich bei der Analyse der Pellet-Fraktion kein Unterschied der intrazellulären Pit2-mCherry Mengen in den verschiedenen Stammhintergründen (Abb. 37B). Übereinstimmend mit den durchgeführten Experimenten unter dem nativen Promotor konnte in den unbehandelten Kontrollen eine höher laufende Bande beobachtet werden, die im WT unter ER-Stress verschwindet, im  $\Delta cib1$  Hintergrund jedoch weiterhin vorhanden ist.

Diese Ergebnisse verdeutlichen die wichtige Rolle der UPR für eine korrekte Prozessierung von Pit2-mCherry und zeigen, dass für eine effiziente Sekretion von großen Mengen an Pit2-mCherry eine UPR abhängige Regulation der *pit2* Genexpression benötigt wird.

### 3 Diskussion

In dieser Arbeit wurde der zentrale UPR Regulator Cib1 charakterisiert und die Verknüpfung mit der pathogenen Entwicklung in *U. maydis* näher untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass ER-Stress zum Spleißen der *cib1* mRNA und der Expression bekannter UPR-Zielgene führt. Analog zu höheren Eukaryoten konnte neben Cib1 auch dem aus der ungespleißten *cib1* mRNA hervorgehenden Cib1<sup>u</sup> Protein eine Funktion als Repressor von Cib1 und eine bislang noch unbekannt Funktion innerhalb der ER-Stressantwort nachgewiesen werden. Für die erfolgreiche Infektion von Maispflanzen durch *U. maydis* ist eine aktive UPR notwendig (Heimel *et al.*, 2013). Hier spielen die Interaktion von Cib1 mit Clp1 sowie der richtige Zeitpunkt der UPR-Aktivierung eine entscheidende Rolle. Es konnte gezeigt werden, dass die UPR eng mit der Effektorsekretion verknüpft ist. Mit *pit2* und *tin1-1* wurden zwei Effektoren identifiziert, deren Expression direkt durch Cib1 reguliert wird.

#### 3.1 Cib1 als zentraler Regulator der UPR in *U. maydis*

##### 3.1.1 Cib1 ist das Homolog zu Hac1p aus *S. cerevisiae*

Die zentralen Regulatoren des UPR-Signalwegs in *S. cerevisiae* sind der ER-Membransensor Ire1p und der bZIP Transkriptionsfaktor Hac1p. Die Aktivierung des linearen Signalwegs wird durch die Akkumulation von un- oder fehlgefalteten Proteinen im ER induziert. Dies führt zum unkonventionellen Spleißen der *HAC1* mRNA durch die Transmembran-Kinase/Endonuklease Ire1p, wodurch der aktive Hac1p Transkriptionsfaktor translatiert werden kann, der darauffolgend die Expression von UPR-Zielgenen induziert (Cox *et al.*, 1993; Cox und Walter, 1996).

Die posttranskriptionelle Regulation von Cib1 durch konditionales Spleißen während der pathogenen Entwicklung und dessen vorhergesagte Funktion als bZIP-Transkriptionsfaktor deuteten darauf hin, dass es sich bei Cib1 um das Homolog des UPR-Regulators Hac1p handeln könnte (Heimel *et al.*, 2010a). Ein Vergleich der Spleißregionen verschiedener *HAC1* Homologen (Hooks und Griffiths-Jones, 2011) mit den entsprechenden Regionen in *cib1* zeigte, dass diese Sequenzen nahezu vollständig konserviert sind. Die vorhergesagten Sekundärstrukturen der mRNA besitzen überdies eine charakteristische Haarnadelschleife (Sidrauski und Walter, 1997). Durch eine Komplementationsanalyse in *S. cerevisiae* konnte nachgewiesen werden, dass Cib1 trotz geringer Sequenzhomologie außerhalb der bZIP-Domäne die Funktion von Hac1p in *S. cerevisiae* vollständig ersetzen kann.

Neben dem Hac1p Homolog konnte durch Sequenzanalysen auch ein mögliches funktionelles Homolog zu Ire1p (*UMAG\_03481*) in *U. maydis* identifiziert werden (Heimel *et al.*, 2013). Durch Expressionsanalysen wurde gezeigt, dass die *cib1* mRNA unter ER-Stress

*ire1* abhängig gespleißt wird. Zudem konnte eine *ire1* und *cib1* abhängige Expression von sechs konservierten UPR-Zielgenen (*bip1*, *lhs1*, *mpd1*, *cne1*, *spp1* und *ost3*) nachgewiesen werden (Normington *et al.*, 1989; Rose *et al.*, 1989; Travers *et al.*, 2000; Martinez und Chrispeels, 2003; Casso *et al.*, 2012; Harbut *et al.*, 2012).

Mit den durchgeführten Analysen konnte die UPR in *U. maydis* näher charakterisiert und weitgehende Übereinstimmungen mit dem UPR-Signalweg in *S. cerevisiae* aufgezeigt werden. Die *ire1* und *cib1* abhängige UPR-Aktivierung und die Komplementationsanalyse der  $\Delta HAC1$  Mutante lassen vermuten, dass sowohl der ER-Membransensor Ire1 als auch der zentrale Regulator Cib1 funktionell konserviert sind.

### **3.1.2 Die Autoregulation von *cib1* durch Bindung an das UPRE im Promotorbereich führt zur Identifikation des negativen UPR Regulators Cib1<sup>u</sup>**

In *S. cerevisiae* bindet Hac1p an sogenannte UPREs (UPR response elements) im Promotor von UPR-Zielgenen und aktiviert dadurch deren Expression (Mori *et al.*, 1996; Fordyce *et al.*, 2012). Für eine stabile UPR-Aktivierung ist die Bindung von Hac1p an das UPRE im eigenen Promotor notwendig. Ein Verlust der Autoregulation führt zu reduzierten *HAC1* mRNA Level und einer dadurch verringerten ER-Stressresistenz (Ogawa und Mori, 2004). Eine Autoregulation konnte auch in dem filamentösen Ascomyceten *Aspergillus niger* beobachtet werden, was auf einen konservierten Mechanismus hindeutet (Mulder *et al.*, 2004).

Einen ersten Hinweis auf eine mögliche Autoregulation von Cib1 in *U. maydis* gab die letal wirkende Expression von *cib1<sup>s</sup>* (gespleißte Form) unter Kontrolle des nativen Promotors im  $\Delta cib1$  Hintergrund. Es wurde vermutet, dass Cib1 seine eigene Expression verstärkt, wodurch eine toxische Hyperaktivierung der UPR erreicht wird. Eine direkte Bindung von Cib1 an das durch bioinformatische Analysen vorhergesagte UPRE im *cib1* Promotor konnte durch eine qChIP-Analyse bestätigt werden. Um die *cib1<sup>s</sup>* Expression im  $\Delta cib1$  Stamm untersuchen zu können, wurde *cib1<sup>s</sup>* unter Kontrolle eines induzierbaren Promotors exprimiert. Durch die gezielte Expression von *cib1<sup>s</sup>* konnte der toxische *cib1<sup>s</sup>* Effekt auf das Zellwachstum bestätigt werden, wobei die Wirkung im  $\Delta cib1$  Hintergrund deutlich stärker ausgeprägt ist als im WT. Die Erkenntnis, dass die kritischen *cib1<sup>s</sup>* Level in der  $\Delta cib1$  Mutante deutlich geringer als im WT sind, lassen auf eine mögliche regulatorische Funktion schließen, die aus der ungespleißten *cib1* mRNA resultiert.

### 3.2 Cib1<sup>u</sup> wirkt als negativer UPR Regulator einer UPR Hyperaktivierung entgegen

Der Ire1 abhängige UPR-Signalweg unterscheidet sich in höheren und niederen Eukaryoten durch die Existenz eines negativen UPR-Regulators, der durch die ungespleißte mRNA des *HAC1* Homologes *XBP1* kodiert wird (Lee *et al.*, 2003). Es konnte gezeigt werden, dass das stetig synthetisierte *XBP1*<sup>u</sup> Protein extrem instabil ist und durch das Proteasom abgebaut wird (Tirosch *et al.*, 2006; Yoshida *et al.*, 2006). Im Gegensatz dazu ist die Translation der ungespleißten *HAC1* mRNA in *S. cerevisiae* durch Interaktion zwischen dem Intron und der 5'-UTR blockiert (Ruegsegger *et al.*, 2001). Ebenso ist die Translation der ungespleißten Form auch in den bisher untersuchten filamentösen Pilzen blockiert (Heimel, 2015).

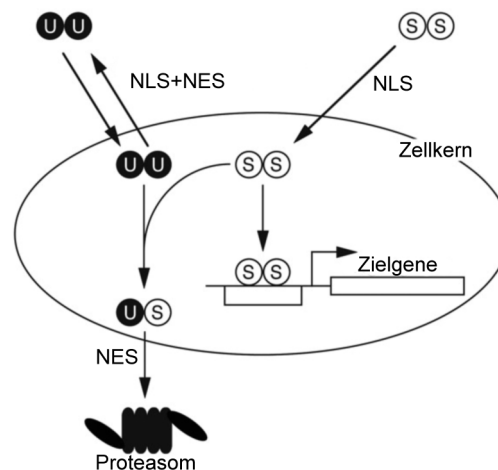
In *U. maydis* deuten die durchgeführten Analysen darauf hin, dass die ungespleißte *cib1* mRNA analog zu höheren Eukaryoten translatiert wird und Cib1<sup>u</sup> als negativer Regulator der UPR agieren könnte (Heimel *et al.*, 2013). Einen ersten Hinweis darauf gab die Expression von *cib1*<sup>s</sup> unter dem nativen Promotor in der  $\Delta$ *cib1* Mutante, die in diesem Stammhintergrund letal für die Zellen war. Weiterführende Untersuchungen zeigten, dass im Vergleich zum WT geringere *cib1*<sup>s</sup> Level im  $\Delta$ *cib1* Hintergrund einen toxischen Effekt auf das Zellwachstum haben. Eine mögliche Ursache könnte das Fehlen der ungespleißten *cib1* mRNA und somit auch das daraus translatierte Cib1<sup>u</sup> Protein im  $\Delta$ *cib1* Hintergrund sein. Diese Beobachtungen unterstützen die Annahme, dass mit Cib1<sup>u</sup> ein negativer Regulator der UPR in *U. maydis* existiert.

Zur eingehenden Untersuchung des Einflusses von Cib1<sup>u</sup> auf ER-Stress und die Expression von UPR-Zielgenen wurde ein unspleißbares *cib1* Allel (*cib1*<sup>us</sup>) erzeugt. Die Expression von *cib1*<sup>us</sup> im WT führt zu einer dosisabhängigen Reduktion der UPR-Zielgenexpression und der ER-Stressresistenz. Interessanterweise führt die Expression von *cib1*<sup>us</sup> in  $\Delta$ *cib1* Stämmen zu einer partiellen Komplementation der ER-Stressresistenz ohne die Expression bekannter UPR-Zielgene zu beeinflussen. Diese Beobachtungen deuten darauf hin, dass Cib1<sup>u</sup> neben der Repression der UPR, eine Cib1 unabhängige Funktion besitzt, welche die erhöhte ER-Stressresistenz in  $\Delta$ *cib1* Stämmen vermittelt. Hierbei könnte es sich um einen neuen und unbekanntem Regulationsmechanismus handeln, der unabhängig von dem bekannten UPR-Signalweg ist und ausgehend von den *XBP1*<sup>u</sup> erhaltenen Ergebnissen in höheren Eukaryoten konserviert sein könnte.

Die partielle Komplementation der  $\Delta$ *cib1* Mutante durch die Expression von *XBP1* (Allel mit Intron) deutet auf funktionelle Übereinstimmungen zwischen Cib1 und *XBP1* hin. Die negative Regulation der UPR in höheren Eukaryoten wird durch die direkte Interaktion von *XBP1*<sup>u</sup> (ungespleißte Form) mit *XBP1* (gespleißte Form) gesteuert (Abb. 38) (Yoshida *et al.*, 2006). Beide Proteine können sowohl Homo- als auch Heterodimere bilden. *XBP1* ist hauptsächlich im Zellkern lokalisiert, wo es als Homodimer (*XBP1*-*XBP1*) die Expression von



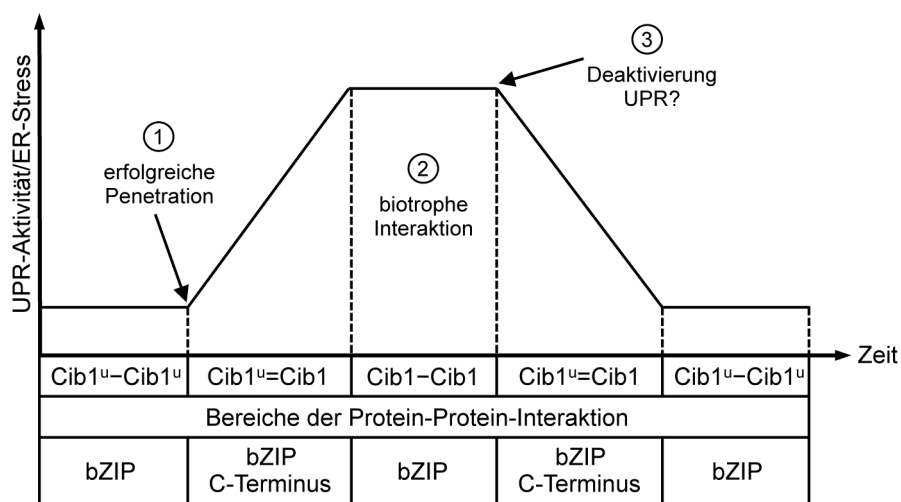
Zielgenen induziert (Yamamoto *et al.*, 2007). XBP1<sup>u</sup> hingegen besitzt ein NES (nuclear export signal), wodurch das Homodimer (XBP1<sup>u</sup>-XBP1<sup>u</sup>) zusätzlich im Cytoplasma lokalisiert ist (Yoshida *et al.*, 2006). Die Interaktion von XBP1<sup>u</sup> mit XBP1 führt zum Export des Heterodimers (XBP1-XBP1<sup>u</sup>) aus dem Zellkern ins Cytoplasma. Dies hat den Abbau des Heterodimers durch das Proteasom und eine Verringerung der UPR-Aktivität zur Folge (Tirosh *et al.*, 2006; Yoshida *et al.*, 2006).



**Abb. 38: Modell der XBP1<sup>u</sup> Rolle in der ER-Stress Antwort in höheren Eukaryoten.** Gezeigt sind Homo- bzw. Heterodimere der ungespleißten (U) und der gespleißten (S) XBP1 Form. XBP1<sup>u</sup> besitzt zusätzlich zu einem Kernimportsignal (NLS) noch ein Kernexportsignal (NES). Das Homodimer (S+S) aktiviert UPR-Zielgene durch die Bindung an ihre Promotoren. Im Gegensatz dazu wird das gebildete Heterodimer (U+S) aus dem Zellkern exportiert und im Cytoplasma durch das Proteasom abgebaut. Quelle: Abbildung modifiziert nach Yoshida *et al.*, 2006.

Mittels Hefe-Zwei-Hybrid Analysen konnten erste Hinweise erlangt werden, dass Cib1 ebenfalls zur Bildung von Homo- und Heterodimeren fähig ist (Siebert, 2014). Es ist bekannt, dass die in beiden Proteinen identischen bZIP-Domänen ein hydrophobes Strukturmotiv ( $\alpha$ -Helix) besitzen, das die Protein-Protein-Interaktion ermöglicht (Hurst, 1995). Da keine über die C-terminalen Bereiche vermittelte Homodimerisierung festgestellt werden konnte, wird vermutet, dass die Bildung der Cib1-Cib1 oder Cib1<sup>u</sup>-Cib1<sup>u</sup> Homodimere ausschließlich über die bZIP-Domänen der Proteine erfolgt, wohingegen Cib1-Cib1<sup>u</sup> Heterodimere durch die Interaktion zwischen den jeweiligen bZIP-Domänen und den spezifischen C-terminalen Bereiche entstehen (Abb. 39). In höheren Eukaryoten rekrutiert das naszierende XBP1<sup>u</sup> Protein die XBP1<sup>u</sup> mRNA an die ER-Membran, um die Effizienz des Spleißens der XBP1<sup>u</sup> mRNA durch IRE1 zu erhöhen (Yanagitani *et al.*, 2011). Der XBP1<sup>u</sup> Mechanismus, wodurch die XBP1 Aktivität reprimiert wird, hat für die Verkürzung der UPR-Aktivität und Inaktivierung der UPR eine bedeutende Rolle (Lee *et al.*, 2003; Yoshida *et al.*, 2006; Byrd und Brewer, 2012). Bei der Regulation der UPR in höheren Eukaryoten spielen zusätzlich posttranslationale Modifikationen des UPR-Regulators eine wichtige Rolle. Die Acetylierung von XBP1 stabilisiert das Protein und erhöht die transkriptionelle Aktivität (Wang *et al.*,

2011). Im Gegensatz dazu hat die Sumoylierung von XBP1 einen inhibitorischen Effekt (Chen und Qi, 2010). Eventuelle posttranslationale Modifikationen von Cib1 wurden bislang nicht untersucht, erscheinen jedoch angesichts der funktionellen Homologie zu XBP1 wahrscheinlich. In *U. maydis* wird eine aktive UPR für die Etablierung und Aufrechterhaltung der biotrophen Interaktion mit dem Wirt benötigt. Die Untersuchung der *cib1<sup>s</sup>* Level *in planta* ergab eine konstante UPR-Aktivität über einen Zeitraum von acht Tagen (Heimel *et al.*, 2010a). Der ausgedehnte Zeitraum dieser dauerhaft aktiven UPR erfordert eine Modulation des Signalwegs, um einer toxischen Hyperaktivierung entgegenzuwirken. Diese negative Funktion könnte sowohl durch Clp1 als auch durch Cib1<sup>u</sup> vermittelt werden (Abb. 39).



**Abb. 39: Modell der Cib1<sup>u</sup> und Cib1 Interaktion und die Auswirkungen auf die UPR-Aktivität.** Sowohl Cib1 (gespleißte Form) als auch Cib1<sup>u</sup> (ungespleißte Form) können Homo- und Heterodimere bilden. Die Interaktion der Homodimere erfolgt vermutlich über die bZIP-Domäne. Die Heterodimere werden zusätzlich durch die Interaktion über den C-Terminus der Proteine stabilisiert. Durch die Aktivierung von ER-Stress oder nach Penetration der Pflanzenzellwand wird Cib1 gebildet und hat die UPR-Aktivierung zur Folge. *In planta* wird die UPR für die Etablierung und vermutlich auch Aufrechterhaltung der biotrophen Interaktion mit dem Wirt benötigt. Im weiteren Verlauf der pathogenen Entwicklung könnte Cib1<sup>u</sup> die Deaktivierung der UPR durch Heterodimerisierung mit Cib1 vermitteln.

Die Ergebnisse in *U. maydis* deuten darauf hin, dass der Ire1 abhängige UPR-Signalweg im Vergleich zu höheren Eukaryoten konserviert sein könnte. Anders als in *S. cerevisiae* wird ein negativer Regulator durch die ungespleißte *cib1* mRNA kodiert. Zur weiteren Charakterisierung von Cib1<sup>u</sup> und zur Etablierung von *U. maydis* als Modellorganismus für die UPR in höheren Eukaryoten ist die weitere Untersuchung der Homo- und Heterodimerisierung ein erster Schritt, um mögliche Übereinstimmungen der UPR-Signalwege zu überprüfen. Zusätzlich könnte durch die Verwendung von humanen Zelllinien, in denen *XBP1* deletiert ist, die Funktion von Cib1<sup>u</sup>/XBP1<sup>u</sup> im humanen System gezielt untersucht werden.

### 3.3 Die Verknüpfung von UPR und pathogener Entwicklung in *U. maydis*

In verschiedenen pathogenen Pilzen konnte gezeigt werden, dass eine aktive UPR für die Virulenz benötigt wird. Hierzu gehören die humanpathogenen Pilze *Aspergillus fumigatus* (Richie *et al.*, 2009; Feng *et al.*, 2011; Krishnan und Askew, 2014), *Cryptococcus neoformans* (Cheon *et al.*, 2011), *Candida glabrata* (Miyazaki *et al.*, 2013) und *Candida albicans* (Wimalasena *et al.*, 2008). Auch in den phytopathogenen Pilzen *Ustilago maydis* (Heimel *et al.*, 2013), *Magnaporthe oryzae* (Yi *et al.*, 2009) und *Alternaria brassicicola* (Joubert *et al.*, 2011) wurde der für die Virulenz notwendige UPR-Signalweg näher untersucht. In den meisten der genannten Spezies ist die UPR-Aktivierung durch den linearen Ire1-Hac1 Signalweg überwiegend konserviert. Die humanpathogene Hefe *C. glabrata* bildet eine Ausnahme, da das *HAC1* Homolog nicht von Ire1 gespleißt wird, und die Deletion von *HAC1* im Gegensatz zur Deletion von *IRE1* keine Auswirkung auf die ER-Stressresistenz hat (Miyazaki *et al.*, 2013).

Eine entwicklungsspezifische Regulation und eine direkte Steuerung von Entwicklungsprozessen durch die UPR konnte bislang nur in höheren Eukaryoten beschrieben werden (Schröder und Kaufman, 2005; Wu und Kaufman, 2006; Hetz, 2012). So führt der Verlust von grundlegenden Komponenten des UPR-Signalwegs während der Mausentwicklung zur embryonalen Letalität (Kratochvilova *et al.*, 2016). Für die Differenzierung von B-Zellen zu Antikörper produzierenden Plasmazellen wird nicht nur eine funktionelle UPR, sondern auch deren Modulation von entscheidender Bedeutung (Iwakoshi *et al.*, 2003a; Iwakoshi *et al.*, 2003b). Weiter konnte durch genomweite ChIP Analysen von sekretorischen und Skelettmuskelzellen zelltyp- und konditionsspezifische XBP1 Zielgene identifiziert werden (Acosta-Alvear *et al.*, 2007). Folglich zeigen die Studien in höheren Eukaryoten, dass der UPR-Signalweg für unterschiedliche Entwicklungsprozesse benötigt wird und an dessen Regulation beteiligt ist.

In Pilzen ist der UPR-Signalweg für verschiedene Entwicklungsprozesse notwendig, die mechanistischen Grundlagen sind jedoch weitgehend unbekannt. In *S. cerevisiae* reprimiert die UPR das Wachstum von Pseudohyphen und die Meiose unter Stickstoffmangel (Schröder *et al.*, 2000). In *U. maydis* konnte erstmals eine direkte Verknüpfung und wechselseitige funktionelle Beeinflussung des UPR-Regulators Cib1 mit zentralen Entwicklungsregulatoren nachgewiesen werden (Heimel *et al.*, 2010a; Heimel *et al.*, 2013).

#### 3.3.1 Die Modulation der UPR durch die Clp1-Cib1 Interaktion

Während der Entwicklung von *U. maydis* wird die UPR spezifisch nach erfolgreicher Penetration der Pflanzenzellwand durch das Spleißen der *cib1* mRNA in *U. maydis* aktiviert. Die initialen Prozesse der pathogenen Entwicklung, die mit der Penetration der

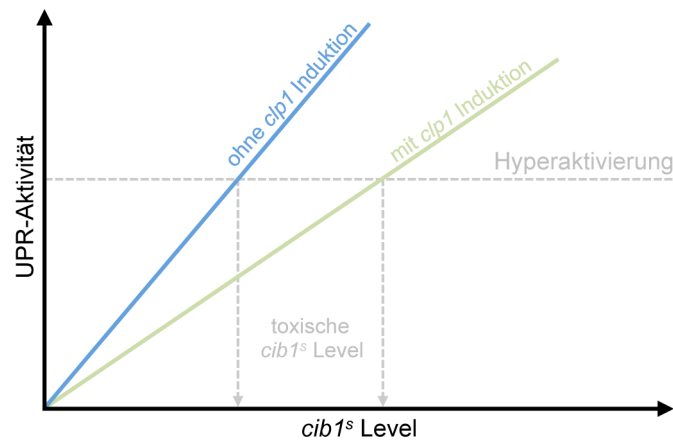
Pflanzenzellwand abgeschlossen sind, werden unabhängig von einer aktiven UPR reguliert. Alle weiteren Prozesse der pathogenen Entwicklung sind nur in Abhängigkeit von Clp1 und einer aktiven UPR möglich (Heimel *et al.*, 2010a; Heimel *et al.*, 2013). Nach erfolgreicher Penetration der Pflanzenoberfläche reprimiert Clp1 sowohl die a- als auch b-abhängigen Signalwege durch direkte physikalische Interaktion von Clp1 mit bW und Rbf1 (Heimel *et al.*, 2010a). Die Folge ist die Aufhebung des G2-Zellzyklusarrests und die anschließende Proliferation der diakryotischen Hyphen (Scherer *et al.*, 2006; Heimel *et al.*, 2010a). Cib1 ist analog zu Clp1 erst nach erfolgreicher Penetration der Pflanzenoberfläche nachweisbar. Durch die direkte physikalische Interaktion von Cib1 mit Clp1 konnte eine Verknüpfung der pathogenen Entwicklung mit der UPR gezeigt werden (Heimel *et al.*, 2010a; Heimel *et al.*, 2013). Durch diese Interaktion wird Clp1 stabilisiert, was zur Akkumulation von Clp1 führt und so die Aufhebung des G2-Zellzyklusarrests und die Proliferation der Hyphen innerhalb der Wirtspflanze vermittelt (Heimel *et al.*, 2013). Für die Virulenz ist die Cib1-Clp1 Interaktion allerdings nicht essenziell. Dies deutet auf die Existenz eines weiteren posttranskriptionellen Mechanismus der Clp1 Regulation hin (Heimel *et al.*, 2013). Im Vergleich zu Hac1p besitzt Cib1 einen verlängerten C-terminalen Bereich, der für die Interaktion mit dem Pathogenitätsfaktor Clp1 benötigt wird. Interessanterweise ist dieser Bereich bei den nahverwandten Brandpilzen *Sporisorium reilianum* und *Ustilago hordei* ebenfalls vorhanden, was auf eine funktionelle Konservierung hindeutet.

In dieser Arbeit wurde untersucht, ob die UPR abhängige Genexpression einen Einfluss auf die Stabilität von Clp1 hat, oder die Stabilisierung allein durch die direkte Interaktion mit dem zentralen UPR-Regulator Cib1 vermittelt wird. Zu diesem Zweck wurde die DNA bindende basische Domäne von Cib1 so mutiert, dass die Interaktion mit Clp1 noch möglich, die Funktion als Transkriptionsfaktor aber blockiert ist. Durch die eingeführten Mutationen findet keine transkriptionelle Aktivierung der UPR statt, was einen Verlust der ER-Resistenz zur Folge hat. Im Gegensatz dazu änderte sich die Stabilität von Clp1 nicht. Dies lässt darauf schließen, dass die Cib1-Clp1 Interaktion ausreichend ist, um die Stabilisierung von Clp1 zu erreichen und dieser Mechanismus unabhängig von der Aktivierung von UPR-Zielgenen ist.

Um die Clp1 vermittelte UPR-Modulation zu untersuchen, wurde *clp1* unter Kontrolle eines induzierbaren *crg1* Promotors exprimiert was zu einer deutlich höheren ER-Stressresistenz im Vergleich zum WT führte. Es konnte gezeigt werden, dass sowohl die Dämpfung der UPR-Aktivität, als auch die erhöhte ER-Stressresistenz abhängig von einer funktionellen Clp1-Cib1 Interaktion sind. Nach der Induktion von *clp1* ist die Expression verschiedener UPR-Zielgene deutlich verringert, wobei der Einfluss von Clp1 auf die verschiedenen UPR-Zielgene unterschiedlich stark ausgeprägt ist, was auf eine differenzielle Regulierung dieser Gene hinweist.

In höheren Eukaryoten findet die Induktion der UPR-Zielgene durch XBP1 Homodimere im Zellkern statt und die Bildung des XBP1-XBP1<sup>u</sup> Heterodimers hat die Deaktivierung der UPR durch den Zellkernexport und den proteasomalen Abbau des XBP1-XBP1<sup>u</sup> Komplexes zur Folge (Yoshida *et al.*, 2006). Unter ER-Stress ist Cib1 im Zellkern lokalisiert und bindet wahrscheinlich analog zu höheren Eukaryoten als Homodimer an die UPREs von Zielgenen, um ihre Expression zu induzieren (Heimel *et al.*, 2010a). Ein mögliches Modell für die UPR-Modulation *in planta* wäre eine veränderte Bindungsaffinität von Cib1 für die UPREs in den Promotoren der Zielgene durch die Interaktion mit Clp1, was wiederum zu einer differenziellen Regulation der verschiedenen UPR-Zielgene führen könnte. Kürzlich konnte gezeigt werden, dass nicht nur Clp1, sondern auch Cib1 durch die Interaktion der beiden Proteine miteinander stabilisiert wird (N. Pinter, pers. Mitteilung). Die wechselseitige Stabilisierung könnte darauf hinweisen, dass die Aktivierung der UPR-Zielgene während der pathogenen Entwicklung durch einen Komplex bestehend aus dem Cib1 Homodimer und Clp1 erfolgen könnte (Heimel *et al.*, 2010a). Die Interaktion von Clp1 mit Cib1 könnte neben der Stabilisierung der Proteine auch die Bildung von Cib1-Cib1<sup>u</sup> Heterodimeren verringern und so den möglichen Abbau von Cib1 verhindern, wodurch die dauerhafte UPR-Aktivität während der pathogenen Entwicklung gewährleistet werden könnte.

Die erhöhte ER-Stressresistenz könnte durch die gedämpfte UPR-Aktivität infolge der *clp1* Expression erklärt werden, wobei die positive Rückkopplung der UPR auf die Clp1 Stabilität eine vollständige Repression der UPR verhindern und eine für die ER-Stressantwort notwendige UPR-Aktivität sichergestellt würde. Dies ermöglicht höhere *cib1<sup>s</sup>* Level bevor ein kritisches Niveau der UPR erreicht ist und eine Hyperaktivierung der UPR zur Apoptose der Zellen führt (Abb. 40). Nicht nur die UPR-Zielgenexpression ist durch die Cib1-Clp1 Interaktion reduziert, sondern auch die *cib1<sup>s</sup>* und *cib1<sup>u</sup>* Level. Vermutlich wird durch die Cib1-Clp1 Interaktion auch die Autoregulation von Cib1 negativ beeinflusst, was analog zu den UPR-Zielgenen im Modell durch die reduzierte Bindung an das UPRE im eigenen Promotor erklärt werden könnte.



**Abb. 40: Modell zum Einfluss der *clp1* Expression auf die Hyperaktivierung der UPR.** Die UPR-Aktivität ist in Abhängigkeit der *cib1<sup>s</sup>* Level aufgetragen. Die gestrichelten grauen Linien symbolisieren den Schwellenwert, der für eine Hyperaktivierung der UPR notwendig ist. Es sind Stämme mit und ohne *clp1* Induktion gegenübergestellt. Die *clp1* Induktion (grün) erhöht die Toleranz gegenüber toxischen *cib1<sup>s</sup>* Leveln im Vergleich zur nicht induzierten Kontrolle (blau) deutlich.

Die Cib1-Clp1 Interaktion stellt einen Kontrollpunkt dar, um die Physiologie der Zelle an die pathogene Entwicklung anzupassen. Eine direkte Auswirkung auf die UPR ist die beschriebene erhöhte ER-Stressresistenz und die differenzielle, graduierte Repression von UPR-Zielgenen. Die Expressionsstudien *in planta* haben gezeigt, dass die UPR während der gesamten pathogenen Entwicklung kontinuierlich aktiv ist (Heimel *et al.*, 2010a). Mit Clp1 konnte ein Faktor identifiziert werden der die UPR-Aktivität moduliert, wodurch die ER-Stressresistenz der Zelle erhöht wird und somit eine vermeintlich toxische dauerhafte Aktivierung der UPR ermöglicht wird. Durch diese Modulation könnte die effiziente und andauernde Sekretion von Effektoren, die für eine erfolgreiche Kolonisierung der Wirtspflanze notwendig sind, gewährleistet werden.

### 3.3.2 Die korrekte Koordination der UPR-Aktivierung ist für die Infektion des Wirts notwendig

Neben der Modulation der UPR spielt der richtige Zeitpunkt der Aktivierung eine entscheidende Rolle bei der pathogenen Entwicklung. Nach erfolgreicher Penetration der Pflanzenoberfläche wird die UPR aktiviert und bleibt bis acht Tage nach Infektion auf einem konstant hohen Niveau aktiv (Heimel *et al.*, 2013). Eine konstitutive UPR-Aktivierung durch eine ER-Stress unabhängige, konstitutive Expression von *cib1<sup>s</sup>* führt im WT-Hintergrund zu einer reduzierten Virulenz (Heimel *et al.*, 2013). Dies ist darauf zurückzuführen, dass die *cib1<sup>s</sup>* Expression vor der Penetration der Pflanzenoberfläche der Filamentbildung entgegenwirkt, wodurch die Virulenz negativ beeinflusst wird.

Expressionsanalysen bekannter UPR-Zielgene ergaben, dass ihre Expression bereits im frühen Stadium der Infektion induziert ist. So ist die Expression der Gene *bip1*, *mpd1* und *spp1* bereits zwei Tage nach Infektion deutlich induziert, wohingegen für *lhs1* und *cne1* eine

verstärkte Genexpression erst zu einem späteren Zeitpunkt beobachtet wurde (4 DAI). Durch welche Signale die UPR *in planta* moduliert und in ihrer Aktivität beeinflusst wird, ist derzeit noch unklar. Möglicherweise spielen hierbei spezifische Pflanzensignale, die Sekretion von Effektoren oder eine Kombination aus beiden Faktoren eine entscheidende Rolle. So konnte in *Alternaria brassicicola* die UPR *in vitro* durch die Behandlung des Myzels mit dem Pflanzenabwehrstoff Camalexin aktiviert werden (Joubert *et al.*, 2011).

Um zu überprüfen, ob die Expression von *cib1* zu einem frühen Zeitpunkt der biotrophen Interaktion ausreichend ist, um die Proliferation innerhalb der Pflanze und alle weiteren Prozesse einzuleiten, wurde *cib1* unter Kontrolle des *dik6* Promotors in der  $\Delta$ *cib1* Mutante exprimiert. Hierbei zeigte sich, dass *cib1* unter Kontrolle des *dik6* Promotors den Phänotyp der  $\Delta$ *cib1* Mutante nicht komplementieren kann. Die Expression von *cib1* zu einem frühen Zeitpunkt der Infektion scheint also nicht ausreichend für die weitere pathogene Entwicklung des Pilzes zu sein. Dies zeigt übereinstimmend mit den Expressionsdaten, dass eine aktive UPR nicht nur für die Aufhebung des Zellzyklusarrests nach erfolgreicher Penetration notwendig ist, sondern auch kritisch für die weitere pathogene Entwicklung ist.

Neben der zeitlichen Koordination sind noch weitere Faktoren denkbar, welche die *cib1* abhängige Regulation beeinflussen könnten. Die Expressionsstärke von *cib1* könnte einer dieser Faktoren sein, da die UPR ein sehr dynamischer Prozess ist und eine genau abgestimmte UPR-Aktivität notwendig für eine Anpassung an verschiedene Wirtsumgebungen ist. In *S. cerevisiae* etwa konnte gezeigt werden, dass die Autoregulation für eine funktionelle UPR notwendig ist (Ogawa und Mori, 2004), die im durchgeführten Infektionsexperiment durch Verwendung des *dik6* Promotors jedoch unterbunden wird.

Zusammenfassend wurde festgestellt, dass eine funktionelle UPR vermutlich nicht nur in der initialen Phase nach erfolgreicher Penetration sondern auch zu späteren Zeitpunkten der pilzlichen Entwicklung notwendig ist.

### 3.4 Die Identifizierung von UPR-Zielgenen im Genom von *U. maydis*

Um Erkenntnisse über das regulatorische Netzwerk der UPR in *U. maydis* zu erhalten, wurde eine bioinformatische Analyse der aus *S. cerevisiae* bekannten UPRE Sequenzmotive durchgeführt (Fordyce *et al.*, 2012). Im Genom von *U. maydis* konnten 1645 von 6772 Gene mit potenziellen Cib1 Bindestellen identifiziert werden. Durch einen Vergleich dieser Gene mit Microarray-Daten (K. Heimel, pres. Mitteilung) konnten innerhalb dieser 1645 Kandidaten 112 Gene als UPR reguliert identifiziert werden, wovon durch Sequenzvergleiche bei 21 Kandidaten eine wahrscheinliche UPR-Funktion festgestellt werden konnte.

Zu den prominentesten Kandidaten gehören Gene, die für Orthologe der Hsp70 Chaperone Lhs1p (UPRE Score 0,863) und Kar2p (UPRE Score 0,859), sowie Ost3p (UPRE

Score 0,911) und die Signal-Peptide-Peptidase Ssp1 (UPRE Score 0,961), kodieren. Hierbei handelt es sich um bekannte UPR-Zielgene, die auch in *U. maydis* funktionell konserviert sind. Ost3p bildet die  $\gamma$ -Untereinheit des Ost-Komplexes, der beim Proteinimport in das ER und der N-Glykosylierung von Proteinen beteiligt ist (Knauer und Lehle, 1994; Karaoglu *et al.*, 1995). In *Arabidopsis thaliana* führt die Deletion von *ost3/6* zu einer Aktivierung der UPR und zur Hypersensitivität gegenüber osmotischem Stress (Farid *et al.*, 2013). Die Deletion des Orthologs der Signal-Peptide-Peptidase Spp1 in *U. maydis* führt zu einem vollständigen Verlust der Virulenz (N. Pinter, pers. Mitteilung). Signal-Peptide-Peptidasen sind in der ER-Membran lokalisiert und vermitteln den Abbau oder die Prozessierung von Transmembranproteinen. In *Plasmodium falciparum* konnte eine Verknüpfung zwischen Spp1 und dem ERAD-Signalweg gezeigt werden (Harbut *et al.*, 2012).

In den Promotoren von zwei weiteren *U. maydis* Genen, *dnj1* (UPRE Score 0,866) und *UMAG\_10099*, die für Co-Chaperone der DnaJ Familie kodieren, wurden ebenfalls UPRE-Motive vorhergesagt. DnaJ Proteine sind durch eine J Domäne und die Interaktion mit Hsp70 Proteinen definiert (Qiu *et al.*, 2006). Es ist bekannt, dass DnaJs die ATP-Hydrolyse von Hsp70 Chaperonen stimulieren und diese dadurch aktiviert werden. In *U. maydis* konnte eine Interaktion von Dnj1 mit Bip1 (Ortholog von Kar2p) nachgewiesen werden. Die  $\Delta dnj1$  Mutante zeigt eine höhere Sensitivität gegenüber ER-Stress und Dnj1 ist für die pathogene Entwicklung und die Sekretion des Effektors Cmu1 notwendig (Lo Presti *et al.*, 2015a). Auch in *Fusarium oxysporum*, ein hemibiotropher Pilz, wird das Dnj1 Ortholog für die Virulenz benötigt und kann die Funktion von Dnj1 in *U. maydis* teilweise komplementieren (Lo Presti *et al.*, 2015a).

In den Expressionsstudien konnte gezeigt werden, dass *dnj1* durch ER-Stress induziert wird und *cib1* abhängig reguliert ist. Die Deletion von *dnj1* führt zu einer signifikant erhöhten basalen Expression von *cib1<sup>s</sup>* und weiteren UPR-Zielgenen. Dies konnte auch für die Deletion anderer Chaperone in embryonalen Maus-Fibroblasten und im filamentösen Pilz *Magnaporthe oryzae* beobachtet werden (Molinari *et al.*, 2004; Yi *et al.*, 2009). Im Gegensatz zu diesen Studien hat die Deletion von *dnj1* jedoch keinen Einfluss auf die UPR-Genexpression und die  $\Delta dnj1$  Mutante weist eine TM spezifische ER-Stresssensitivität auf. Die Deletion des zweiten Co-Chaperons *UMAG\_10099*, das für ein Ortholog von ERJ5 kodiert, führt ebenfalls zu einer reduzierten Virulenz in *U. maydis* (siehe Anhang 6.2). In *S. cerevisiae* wird ERJ5 durch die UPR reguliert und für die Herstellung einer optimalen Umgebung für die Proteinfaltung im ER benötigt (Carla Fama *et al.*, 2007). Diese zwei Beispiele zeigen, dass die Deletion von UPR-Zielgenen, die als mögliche Chaperone identifiziert wurden, eine direkte Auswirkung auf die Virulenz von *U. maydis* haben.

Insgesamt konnten durch die bioinformatischen Analysen bei 112 von 215 UPR regulierten Genen ein UPRE vorhergesagt werden, wobei bei einer Vielzahl von Genen



Übereinstimmungen mit bereits publizierten UPR-Zielgenen mit UPRE aus *S. cerevisiae* gefunden werden konnten (Mori *et al.*, 1992; Mori *et al.*, 1998; Fordyce *et al.*, 2012). Dies zeigt, dass die angewandten Kriterien der UPRE-Analyse zu einer verwertbaren Vorhersage geführt haben. Um die vorhergesagten Cib1 Bindestellen verifizieren zu können, müssen aber weitere Analysen durchgeführt werden. Möglichkeiten hierzu wären die gezielte Deletion der UPREs und die anschließende Überprüfung der UPR abhängigen Induktion der Gene oder eine genomweite Untersuchung der Promotorbindung mittels einer ChIP-Seq-Analyse.

Die 103 UPR regulierten Gene ohne vorhergesagtem UPRE werden basierend auf dieser Analyse vermutlich nicht direkt durch Cib1 reguliert, wobei weitere noch unbekannte Faktoren eine Rolle spielen könnten. In höheren Eukaryoten besteht die UPR aus drei Signalwegen, welche durch die ER-lokalisierte Transmembranproteine IRE1 (Yoshida *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 2002), PERK (Harding *et al.*, 1999) und ATF6 (Haze *et al.*, 1999) gesteuert werden. Es sind drei Sequenzmotive, ERSE (ER stress response element), ERSEII und UPRE (UPR response element) bekannt, welche analog zu Hefe und *U. maydis*, direkt von den UPR-Regulatoren XBP1 (Homolog zu Hac1p) und ATF6 gebunden werden (Yoshida *et al.*, 1998; Kokame *et al.*, 2001; Yoshida *et al.*, 2001). Das ERSE-Motiv wird hauptsächlich von ATF6 gebunden, wohingegen das UPRE Motiv ausschließlich durch XBP1 erkannt wird (Yamamoto *et al.*, 2004). Ob in *U. maydis* neben Ire1-Cib1 weitere UPR-Signalwege vorhanden sind, ist bislang nicht bekannt und könnte Gegenstand zukünftiger Studien sein.

### 3.5 Cib1 steuert die Genexpression von *pit2* und *tin1-1*

Sekretierte Effektorproteine spielen in der pathogenen Entwicklung von *U. maydis* eine entscheidende Rolle und sind insbesondere für die Etablierung einer kompatiblen biotrophen Interaktion zwischen Pathogen und Wirt, jedoch auch zu späteren Entwicklungszeitpunkten notwendig (Brefort *et al.*, 2009). In *A. fumigatus* konnte nachgewiesen werden, dass die UPR den sekretorischen Weg restrukturiert, um eine erhöhte Sekretion von Komponenten, die der Pilz bei der Infektion benötigt, zu ermöglichen (Richie *et al.*, 2011).

In *U. maydis* wird der UPR-Signalweg nach erfolgreicher Penetration der Pflanzenoberfläche aktiviert und ist eng mit der b-Regulationskaskade, einem hierarchischen Netzwerk bestehend aus Transkriptionsfaktoren, das auch die Effektorgenexpression reguliert, verbunden (Heimel *et al.*, 2010a; Heimel *et al.*, 2013; Lanver *et al.*, 2014). Zudem scheint eine funktionelle UPR wichtig für die effiziente Sekretion von Effektoren zu sein. So führt die Inokulation von Maispflanzen mit der  $\Delta cib1$  Mutante zu einer erhöhten *pr* (pathogenesis-related) Genexpression der Wirtspflanze und die Sekretion der Chorismatmutase Cmu1 unter ER-Stress ist abhängig von dem UPR regulierten ER Co-Chaperon Dnj1 (Heimel *et al.*,

2013; Lo Presti *et al.*, 2015a). Die erhöhten Anforderungen an den sekretorischen Weg durch die massive Expression von Effektoren lassen darauf schließen, dass die UPR zu diesem Zeitpunkt aktiviert wird, um die Homöostase im ER sicherzustellen (Heimel *et al.*, 2013; Lo Presti *et al.*, 2015a). Die gegenseitige Beeinflussung von UPR und den Regulationswegen der pathogenen Entwicklung hat zu der Frage geführt, ob die Funktion der UPR auf die Sekretion von Effektoren begrenzt ist oder zusätzlich die Expression der Effektorgene reguliert.

Die Expression verschiedener Effektorgene kann bereits vor der Penetration der Pflanzenoberfläche detektiert werden (Heimel *et al.*, 2010b; Lanver *et al.*, 2014). Die Mehrzahl der für Effektoren kodierenden Gene wird jedoch spezifisch nach erfolgreicher Penetration der Pflanzenoberfläche induziert oder verstärkt exprimiert (D. Lanver/R. Kahmann, pers. Mitteilung). Als zentrale Regulatoren der Effektorgenexpression fungieren der C2H2-Zinkfinger-Transkriptionsfaktor Biz1 und der Homeodomänen-Transkriptionsfaktor Hdp2 (Flor-Parra *et al.*, 2006; Lanver *et al.*, 2014). Die Expression beider Transkriptionsfaktoren wird durch Rbf1, dem Masterregulator des b-abhängigen regulatorischen Netzwerkes, gesteuert (Heimel *et al.*, 2010a; Heimel *et al.*, 2010b). Weiter wurde festgestellt, dass die UPR einen supprimierenden Effekt auf die *rbf1* Expression hat (Heimel *et al.*, 2013). Folglich könnte die durch Biz1 und Hdp2 vermittelte Effektorgenregulation durch eine aktive UPR negativ beeinflusst werden.

In der durchgeführten, bioinformatischen Vorhersage der Cib1 Bindestellen (UPREs) in *U. maydis* wurden 74 mögliche Effektorgene als potenzielle UPR-Zielgene identifiziert. Überraschenderweise zeigten mit *pit2* und *tin1-1* jedoch nur zwei Gene eine UPR abhängige Expression und damit die Anwesenheit eines funktionellen UPREs im jeweiligen Promotor. Das im *pit1/2* Promotor identifizierte UPRE-Motiv ist ebenso in den Promotoren von *cib1* und sieben weiteren Genen zu finden, von denen jedoch nicht für alle eine UPR abhängige Expression in Microarray-Experimenten beobachtet werden konnte. Folglich scheinen weitere Sequenzelemente notwendig, um eine UPR abhängige Genregulation zu vermitteln. Im Gegensatz dazu ist das vorhergesagte UPRE im *tin1-1* Promotor in keinem weiteren Promotorbereich vorhanden. Pit2 fungiert als Cystein-Protease-Inhibitor und verhindert die Salicylsäure induzierte Apoptose der Zellen (Doehlemann *et al.*, 2011; Mueller *et al.*, 2013). Dagegen ist Tin1-1 nicht essenziell für die Virulenz und die maximalen Expressionslevel von *tin1-1* können zur späten Phase der pathogenen Entwicklung detektiert werden (Brefort *et al.*, 2014).

Durch qChIP-Analysen konnte eine direkte Bindung von Cib1 an die Promotoren von *pit2* und *tin1-1* gezeigt werden. Die gezielte Deletion des UPRE in *pit1/2* Promotor zeigt die Notwendigkeit des vorhergesagten UPREs für eine UPR abhängige Expression beider Zielgene (*pit1* und *pit2*), hatte jedoch nur einen geringen Einfluss auf die Expression in

*planta*. Interessanterweise zeigten die entsprechenden  $\Delta$ UPRE Mutanten eine signifikant reduzierte Virulenz im Vergleich zu den Kontrollstämmen. Angesichts dieser Beobachtungen scheint es möglich, dass die UPR abhängige *pit1/2* Expression eine für die Virulenz notwendige Feinjustierung der Effektorgenexpression vermittelt, wodurch eine effiziente Anpassung an wechselnde Umgebungen innerhalb der Wirtspflanze realisiert werden könnte. Die physiologische Rolle der UPR abhängigen *tin1-1* Regulation ist bis jetzt unbekannt und muss noch weiter untersucht werden. Weiterhin kann nicht ausgeschlossen werden, dass zusätzliche Effektorgene durch die UPR reguliert werden, jedoch in dieser Untersuchung nicht identifiziert werden konnten.

In den verwandten Brandpilzen *Sporisorium reilianum* und *Ustilago hordei* konnte im Gegensatz zu *U. maydis* keine signifikant induzierte Expression zu *pit1* oder *pit2* orthologen Gene durch ER-Stress festgestellt werden (Daten nicht gezeigt). Dies deutet darauf hin, dass die Regulation von *pit1/2* durch die UPR eine spezifische Adaption von *U. maydis* ist. Die verschiedenartigen Lebensweisen von *S. reilianum* und *U. hordei* in Vergleich zu *U. maydis* könnten die unterschiedliche Regulation erklären. Im Gegensatz zu anderen Brandpilzen führt die Infektion durch *U. maydis* zur Ausbildung der charakteristischen Tumore innerhalb derer die Teliosporen gebildet werden (Banuett und Herskowitz, 1996). Die Sporenbildung von *S. reilianum* und *U. hordei* ist auf reproduktives Gewebe der Wirtspflanze begrenzt (Laurie *et al.*, 2012). Auf Grund dieser unterschiedlichen Biologie kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Expression spezifischer Effektorgene auch in *S. reilianum* und *U. hordei* durch die UPR erfolgt, dabei aber andere Zielgene als in *U. maydis* zu finden sind.

Wie zuvor beschrieben, konnte durch die bioinformatische Analyse der UPRE im Genom von *U. maydis* das ER Co-Chaperon Dnj1 identifiziert werden (siehe 3.4). Dnj1 wird für die Sekretion der Chorismat-Mutase Cmu1 unter ER-Stress Bedingungen benötigt (Lo Presti *et al.*, 2015a). Aufgrund dieser Beobachtungen wurde eine UPR abhängige Sekretion von Pit2 vermutet. Es konnte gezeigt werden, dass die UPR-Aktivierung in Stämmen, die *pit2-mcherry* unter der Kontrolle des nativen Promotor exprimieren, zu einer verstärkten Expression und Sekretion von Pit2-mCherry führt. Unter identischen Bedingungen konnte in der  $\Delta$ *cib1* Mutante keine Sekretion des Pit2-mCherry Fusionsproteins nachgewiesen werden. Zusätzlich zeigte die Akkumulation von nicht prozessiertem Protein in der  $\Delta$ *cib1* Mutante, dass eine funktionelle UPR für die Prozessierung von Pit2 notwendig ist. Um zwischen transkriptionellen und posttranskriptionellen Effekten einer aktiven UPR auf die Sekretion von Pit2-mCherry unterscheiden zu können, wurde *pit2-mcherry* zusätzlich unter Kontrolle des *otef* Promotors exprimiert. Dies führte zu einem Verlust der UPR abhängigen Regulation der Sekretion von Pit2 und unterstützt die Aussage, dass sowohl die UPR abhängige Regulation der Effektorgenexpression, als auch die UPR auf posttranslationeller Ebene für eine effektive Sekretion von Pit2 benötigt werden. Eine derartige Verknüpfung zwischen Genexpression

und Sekretion der Effektoren könnte somit eine effiziente Lösung darstellen, um die Menge an nicht prozessierten oder fehlgefalteten Effektoren im ER möglichst gering zu halten. Die Expression der meisten Effektoren wird durch den Wirt induziert und ist auf bestimmte Entwicklungsstadien und/oder verschiedene Wirts-Umgebungen abgestimmt. Genomweite Analysen haben ergeben, dass diese Gene in aufeinanderfolgenden Wellen abhängig vom Entwicklungszeitpunkt transkribiert werden (Skibbe *et al.*, 2010; Kleemann *et al.*, 2012; O'Connell *et al.*, 2012). Ob die UPR in *U. maydis* nur in der frühen Phase zur Etablierung einer Pilz-Pflanzen Interaktion oder auch in späteren Phasen der Entwicklung benötigt wird, ist noch unklar. Die *cib1<sup>s</sup>* Expressionslevel *in planta* sind bis acht Tage nach Infektion stabil, was auf eine aktive UPR während der gesamten pathogenen Entwicklung hindeutet (Heimel *et al.*, 2013). Neben der Suppression der Pflanzenabwehr zum frühen Zeitpunkt der pathogenen Entwicklung ist das Umprogrammieren der Wirtszelle durch sekretierte Effektoren eine weitere Voraussetzung für eine erfolgreiche Kolonisierung des Wirtsgewebes und könnte ebenfalls durch eine aktive UPR beeinflusst werden (Mueller *et al.*, 2008; Lo Presti *et al.*, 2015b).

### 3.6 Der genomische Kontext hat Auswirkungen auf die Transkription der Virulenzfaktoren Pit1 und Pit2

Bei Komplementationsanalysen von Gendelektionen in *U. maydis* ist es gängige Praxis Expressionskonstrukte in den *ip* Locus durch homologe Rekombination zu integrieren (Keon *et al.*, 1991). Zusätzlich zum Promotor-Gen Fragment wird neben dem nativen *ip* Locus (*ip<sup>S</sup>*) der für die Succinatdehydrogenase (*Sdh1*; *UMAG\_01172*) kodiert, eine mutierte Variante (*ip<sup>R</sup>*) eingebracht, welche die Resistenz gegenüber dem Fungizid Carboxin vermittelt.

Die Untersuchung der Expression von *pit1/2* unter dem nativen Promotor im *ip* Locus der  $\Delta$ *pit1/2* Mutante zeigte drastisch erhöhte basale Expressionswerte im Vergleich zum WT. Die Expression von *pit1* war 69,3-fach und bei *pit2* 461,1-fach erhöht. Diese deutlichen Unterschiede könnten auf mögliche Positionseffekte und einer damit verknüpften unterschiedlichen Chromatinstruktur hinweisen. Es ist bekannt, dass Chromatin eine dynamische Struktur hat, und die DNA durch Methylierung, Acetylierung und andere Modifikationen der Histone mehr oder weniger zugänglich für die Transkription sein kann (Venkatesh und Workman, 2015). Sogenannte Haushaltsgene, die konstitutiv exprimiert werden und zu denen auch *sdh1* (*ip* Locus) zählt, sind meist im Euchromatin, den für die Transkriptionsmaschinerie leicht zugänglichen Bereichen des Genoms lokalisiert. Mit Hda1 und Rum1 sind zwei Faktoren in *U. maydis* bekannt, die die Transkription von Zielgenen über Histondeacetylierung des Chromatins regulieren und deren Deletion zur Expression von Effektorgen führt (Reichmann *et al.*, 2002; Treutlein, 2007). Durch Microarrayanalysen

wurden für *pit1* und *pit2* in  $\Delta hda$  und  $\Delta rum1$  Stämmen eine drei- bis fünffach erhöhte Expression gemessen (Treutlein, 2007), was auf eine Regulation von *pit1* und *pit2* durch epigenetische Faktoren hindeutet. Eine epigenetisch regulierte Effektorgenexpression wurde sowohl in dem pflanzenpathogenen Pilz *Leptosphaeria maculans* (Soyer *et al.*, 2014) und dem endophytischen Pilz *Epichloë festucae* beobachtet (Chujo und Scott, 2014).

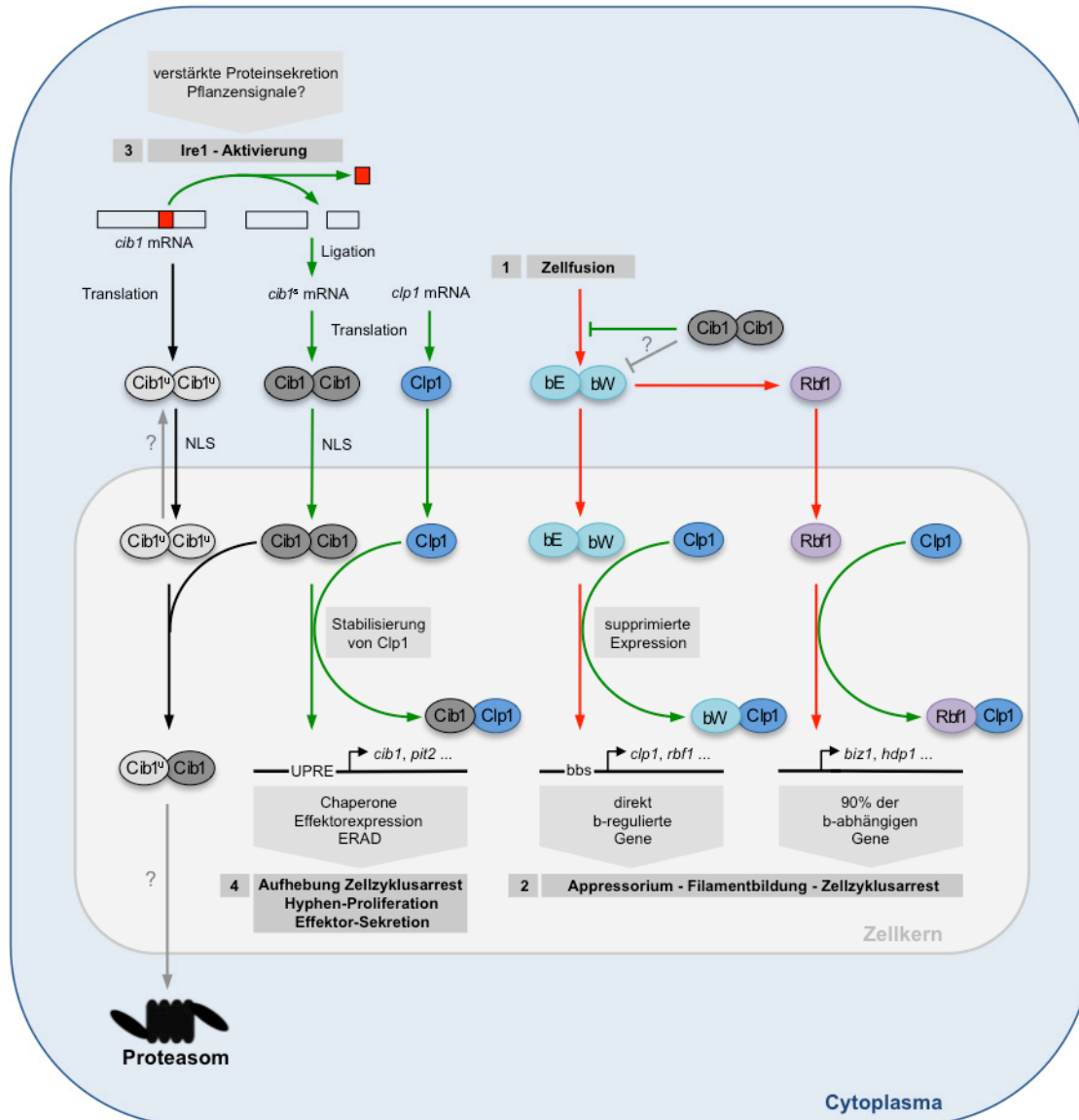
Um derartige Positionseffekte zu umgehen, wurde das Expressionskonstrukt in den nativen Locus von *pit1/2* integriert. Bei dieser Methode handelt es sich um einen Gen-Knock-in, wodurch die Hygromycin-Resistenzkassette (Hyg<sup>R</sup>) der  $\Delta pit1/2$  Mutante mittels homologer Rekombination durch ein Fragment bestehend aus Promotor, Gen und Nourseothricin-Resistenzkassette (Nat<sup>R</sup>) ersetzt wird. Die basalen Expressionslevel waren jedoch auch in diesem Stamm im Vergleich zum WT deutlich erhöht (*pit1* 9,4-fach und *pit2* 80,1-fach). Eine Ursache hierfür wurde in einer durch die eingebrachte Nat<sup>R</sup>-Kassette lokal veränderten Chromatin-Struktur vermutet.

Durch das Entfernen der Hyg<sup>R</sup>-Kassette aus dem Genom mittels FLP Rekombinase (Khrunyk *et al.*, 2010) war es möglich eine ähnliche basale Expression wie im WT zu erreichen. Somit konnten drastische Auswirkungen der genomischen Lokalisation und vermutlich damit verknüpfte epigenetische Einflüsse auf die Genexpression in *U. maydis* gezeigt werden. Neben der Genregulation durch den Transkriptionsfaktor Cib1 konnte auf diese Weise ein weiteres potenzielles Element der Genregulation von *pit1/2* identifiziert werden.

### 3.7 Modell der UPR-Funktion in *U. maydis*

Die pathogene Entwicklung beginnt mit der Fusion von zwei Sporidien auf der Blattoberfläche, wodurch das b-Heterodimer gebildet werden kann (Abb. 41). Dieser Transkriptionsfaktor reguliert die Expression von 345 Genen, von denen circa 90% durch den Masterregulator Rbf1 reguliert werden (Heimel *et al.*, 2010b). Die Aktivierung der b-Signalkaskade führt zur Ausbildung/Aufrechterhaltung des G2-Zellzyklusarrests, der Bildung des heterodikaryotischen Filaments und in Abhängigkeit von zusätzlichen Pflanzensignalen zur Ausbildung von Appressorien (Abb. 41).

Nach erfolgreicher Penetration der Pflanzenzellwand wird die UPR durch unkonventionelles Spleißen der *cib1* mRNA aktiviert (Abb. 41). Mögliche Signale, welche die Aktivierung von Ire1 vermitteln, könnten zum einen Pflanzensignale oder zum anderen die verstärkte Expression und Sekretion von Effektorproteinen sein. Der zentrale UPR-Regulator Cib1 aktiviert durch Bindung an UPREs die Expression von Zielgenen wie den ER-Chaperonen Bip1 und Lhs1.



**Abb. 41: Modell der Verknüpfung der UPR mit der pathogenen Entwicklung in *U. maydis*.** Zur besseren Übersicht sind Prozesse vor der Penetration der Pflanze mit roten Pfeilen und Prozesse nach erfolgter Penetration mit grünen Pfeilen dargestellt. Nach der Zelfusion (1) kann das b-Heterodimer gebildet werden und aktiviert die Expression der direkt b-regulierten Gene *clp1* und *rbf1*. Mehr als 90% der b-abhängig regulierten Gene werden vom Masterregulator Rbf1 reguliert. Die Aktivierung der b-vermittelten Regulationskaskade hat die Filamentbildung, die Aufrechterhaltung des G2-Zellzyklusarrests und die Infektion der Maispflanze (2) zur Folge. Nach Penetration der Pflanzenzellwand wird die Expression von *cib1* induziert. Die Regulation von *cib1* erfolgt durch unkonventionelles Spleißen der *cib1* mRNA durch die Kinase/RNase Ire1 (3). Es ist möglich, dass Ire1 durch die erhöhte Sekretion von lytischen Enzymen und Effektoren oder durch Pflanzensignale aktiviert wird. Cib1 Homodimere aktivieren durch Bindung an UPREs im Promotor die Expression von Zielgenen wie *pit2* oder *bip1*. Die Autoregulation von Cib1 hat die Amplifikation des UPR-Signals zur Folge. Zusätzlich interagiert Cib1 mit Clp1, was die Stabilisierung von Clp1 zur Folge hat. Die UPR-Aktivierung führt zur Suppression des b-Signalwegs (bE, bW und Rbf1), wodurch der Zellzyklusarrest aufgehoben und die Proliferation der Hyphen eingeleitet wird (4). Clp1 führt zusätzlich zu einer erhöhten ER-Stressresistenz und die Inhibition der b-Kaskade durch Cib1 findet sowohl transkriptionell als auch posttranskriptionell statt. Cib1<sup>u</sup> fungiert ähnlich wie im Menschen als negativer Regulator der UPR. Es gibt erste Hinweise darauf, dass Cib1<sup>u</sup> auch Heterodimere mit Cib1 bildet. Ob der nukleare Export des Heterodimers und der Abbau durch das Proteasom ebenfalls konserviert sind, muss in nachfolgenden Studien untersucht werden.

In dieser Arbeit konnte neben der Regulation bekannter UPR-Zielgene auch eine Regulation der Effektorgenexpression durch Cib1 nachgewiesen werden. Dieser neu identifizierte Regulationsmechanismus könnte dazu genutzt werden die Effektorexpression an definierte

Phasen der pathogenen Entwicklung zu koppeln und das Pathogen auf die massive Sekretion von Effektoren vorzubereiten und zeigt somit eine Anpassung der UPR an die spezifischen Anforderungen von biotrophen Pilzen.

Neben der Funktion als Transkriptionsfaktor interagiert Cib1 mit dem Entwicklungsregulator Clp1, wodurch dieser stabilisiert wird (Heimel *et al.*, 2013), woraufhin der G2-Zellzyklusarrest aufgehoben und die Proliferation der Hyphen ermöglicht wird (Abb. 41). Zusätzlich konnte eine differentielle Regulation von UPR-Zielgenen durch *clp1* nachgewiesen werden, was eine erhöhte ER-Stressresistenz in Abhängigkeit der Cib1-Clp1 Interaktion vermittelt. Es konnte gezeigt werden, dass die Expression von *cib1<sup>s</sup>* einen negativen Einfluss auf die *bE*, *bW* und *rbf1* Expression hat (Heimel *et al.*, 2013).

Im Gegensatz zu allen anderen bislang untersuchten Pilzen und ähnlich zu höheren Eukaryoten, konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die ungespleißte *cib1* mRNA translatiert wird und als negativer Regulator der UPR wirkt (Abb. 41). Cib1<sup>u</sup> dämpft die UPR auf transkriptioneller Ebene und wirkt so einer toxischen Hyperaktivierung der UPR entgegen. Der zugrundeliegende Mechanismus ist noch unbekannt. Es gibt jedoch Hinweise, dass sowohl Homo- (Cib1-Cib1 und Cib1<sup>u</sup>-Cib1<sup>u</sup>) als auch Heterodimere (Cib1-Cib1<sup>u</sup>) gebildet werden. Ob die Regulation analog zum Mechanismus in höheren Eukaryoten erfolgt, ist derzeit noch unklar und im Fokus weitergehender Untersuchungen. In diesem Zusammenhang sollten Dimerisierung, Lokalisation von Cib1<sup>u</sup>, ein potenzieller Zellkernexport von Cib1<sup>u</sup> und ein möglicherweise beschleunigter Abbau des Cib1-Cib1<sup>u</sup> Heterodimers durch das Proteasom untersucht werden.

### 3.8 Fazit

Mit dieser Arbeit konnte erstmals in Pilzen eine direkte Verknüpfung und wechselseitige funktionelle Beeinflussung des UPR-Signalwegs und den Entwicklungsregulatoren gezeigt werden. Die zentralen Regulationsmechanismen sind hierbei die zeitliche Koordinierung der UPR-Aktivierung, die Modulation der aktiven UPR durch den Entwicklungsregulator Clp1 und die transkriptionelle Regulation von Effektorgenen wie auch bekannter UPR-Zielgene durch die Bindung von Cib1 an UPRE in den Promotorbereichen. Interessanterweise konnte mit Cib1<sup>u</sup> ein negativer Regulator der UPR in *U. maydis* nachgewiesen werden, der bis dato ausschließlich aus höheren Eukaryoten bekannt ist. Dies lässt vermuten, dass die Regulation der UPR in *U. maydis* eine für Pilze bislang unbekannte Ähnlichkeit zu der in höheren Eukaryoten aufweist.

## 4 Material und Methoden

### 4.1 Material und Bezugsquellen

#### 4.1.1 Chemikalien

Alle in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien wurden von den Firmen Ambion, Sigma-Aldrich, Merck, Fluka, Riedel-de Haën, Serva, BioRad, Amersham, Invitrogen, Oxoid, InvivoGen, Peqlab und Carl Roth bezogen; für weitere Einzelheiten siehe (Brachmann *et al.*, 2001a).

#### 4.1.2 Puffer und Lösungen

Standard-Puffer und Lösungen wurden nach Ausubel *et al.*, 1987 und Sambrook *et al.*, 1989 hergestellt. Zur Herstellung der Puffer und Lösungen wurde ausschließlich demineralisiertes Wasser verwendet. Spezielle Puffer und Lösungen sind unter den jeweiligen Methoden aufgeführt.

#### 4.1.3 Enzyme

Tabelle 3: In dieser Arbeit verwendete Enzyme.

Name	Hersteller
Restriktionsenzyme	Thermo Fisher Scientific
T4 DNA Ligase	Thermo Fisher Scientific
FastAP Thermosensitive Alkalische Phosphatase	Thermo Fisher Scientific
Klenow Fragment, LC	Thermo Fisher Scientific
<i>Taq</i> DNA Polymerase	New England Biolabs
Phusion DNA Polymerase	Thermo Fisher Scientific
Phusion DNA Polymerase	eigene Herstellung
Q5 DNA Polymerase	New England Biolabs
Lysozym (aus Hühnerei)	SERVA
Lysing Enzymes aus <i>Trichoderma harzianum</i>	Sigma-Aldrich, L1412

#### 4.1.4 Verwendete Kits

QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) zur Aufreinigung von PCR-Produkten und Plasmiden, QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) zur Aufreinigung von DNA aus Gelfragmenten, TOPO TA Cloning Kit (Invitrogen) zur Klonierung von PCR-Produkten, Gateway BP und LR Clonase II (Invitrogen) zur Klonierung, TurboDNase Kit (Ambion) für die Aufreinigung von RNA für qRT-PCR, MesaGreen qPCR MasterMix for SYBR Assay Kit (Eurogentech) für qRT-PCR,



AMV First Strand cDNA Synthesis Kit (New England Biolabs) oder RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Fisher Scientific) für die Erststrang cDNA-Synthese.

#### 4.1.5 Antikörper

Tabelle 4: In dieser Arbeit verwendete Antikörper.

Bezeichnung	Wirt	Verdünnung	Bezugsquelle
Anti-RFP	Maus	1:1000	ChromoTek, 6G6
Anti-GFP, N-terminal	Kaninchen	1:5000	Sigma-Aldrich, G1544
Anti-HA	Maus	1:5000	Sigma-Aldrich, H9658
Anti-Maus-HRP	Ziege	1:10000	Promega, W402B
Anti-Kaninchen- HRP	Ziege	1:10000	Promega, W401B
Anti-Digoxigenin-AP	Schaf	1:10000	Roche, 11093274910

## 4.2 Kultivierung von Mikroorganismen

Alle verwendeten Medien wurden, wenn nicht anders angegeben, bei 121°C für 20 min autoklaviert. Zur Herstellung der Medien wurde ausschließlich demineralisiertes Wasser verwendet.

### 4.2.1 Medien für die Kultivierung von *E. coli*

Die *E. coli* Stämme wurden entweder als Schüttelkulturen bei 200 Upm oder auf Festmedien unter aeroben Bedingungen bei 37°C kultiviert. Für die Kultivierung von *E. coli* wurden dYT-Flüssigmedium und YT-Festmedium verwendet (Ausubel *et al.*, 1987; Sambrook *et al.*, 1989). Zur Selektion wurden die Antibiotika Ampicillin (100 µg/ml) und Kanamycin (40 µg/ml) eingesetzt. Vor weiteren Arbeiten wurden die bei -80°C gelagerten Glycerinkulturen zuerst auf YT-Festmedien ausgestrichen.

#### YT-Festmedium (Sambrook *et al.*, 1989)

8 g Bacto Trypton  
 5 g Hefeextrakt  
 5 g NaCl  
 15 g Agar  
 mit H<sub>2</sub>O auf 1 l aufgefüllt

#### dYT-Flüssigmedium (Sambrook *et al.*, 1989)

16 g Bacto Trypton  
 10 g Hefeextrakt  
 5 g NaCl  
 mit H<sub>2</sub>O auf 1 l aufgefüllt

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

Die *U. maydis* Stämme wurden in CM- oder YEPS<sub>light</sub>-Flüssigmedium bei 28°C und 180 Upm kultiviert. Als Festmedium wurde CM- oder PD-Festmedium verwendet. Zur Selektion

wurden folgende Antibiotika genutzt: Carboxin (2 µg/ml, Sigma-Aldrich), Hygromycin (200 µg/ml, InvivoGen) oder Nourseothricin (50 µg/ml, Werner BioAgents). Für die Konservierung der Stämme wurde eine Übernachtskultur in YEPS<sub>ligh</sub> mit 50% NSY-Glycerin vermischt und die Zellen bei -80°C gelagert. Die bei -80°C gelagerten Zellen wurden vor weiteren Arbeiten zuerst auf Festmedien ausgestrichen. Zur RNA Isolierung aus Flüssigkultur und für die ER-Stresstests wurde ausschließlich YNB-Medium verwendet.

**CM-Glc-Medium** (Holliday, 1974; Banuett und Herskowitz, 1989)

1,5 g NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>  
 2,5 g „Casamino Acids“  
 0,5 g DNA degr. Free Acid (Sigma, D-3159)  
 1 g Hefeextrakt  
 10 ml Vitamin-Lösung (s.unten)  
 62,5 ml Salz-Lösung (s.unten)  
 1 ml Spurenelement-Lösung (s.unten)  
 20 g Agar (für Platten)  
 mit H<sub>2</sub>O auf 980 ml aufgefüllt  
 mit NaOH den pH-Wert auf 7,0 eingestellt

nach dem Autoklavieren:

20 ml 50% (w/v) Glucose-Lösung  
 (f.c. 1% CM-Glc)

**Salz-Lösung** (Holliday, 1974)

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

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

60 mg H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>  
 140 mg MnCl<sub>2</sub> x 4 H<sub>2</sub>O  
 400 mg ZnCl<sub>2</sub>  
 40 mg NaMoO<sub>4</sub> x 2 H<sub>2</sub>O  
 100 mg FeCl<sub>3</sub> x 6 H<sub>2</sub>O  
 40 mg CuSO<sub>4</sub> x 5 H<sub>2</sub>O  
 mit H<sub>2</sub>O auf 1 l aufgefüllt

**Vitamin-Lösung** (Holliday, 1974)

100 mg Thiamin  
 50 mg Riboflavin

50 mg Pyridoxin  
 200 mg Calciumpantothenat  
 500 mg p-Aminobenzoensäure  
 200 mg Nikotinsäure  
 200 mg Cholinchlorid  
 1000 mg myo-Inositol  
 mit H<sub>2</sub>O auf 1 l aufgefüllt und sterilfiltriert

**5x YNB**

8,5 g Yeast Nitrogen Base (YNB)  
 10,0 g Ammoniumsulfat  
 in 1 l H<sub>2</sub>O lösen, pH-Wert auf 5,6 eingestellt und sterilfiltriert  
 für YNBG: 200 ml 5x YNB mit 760 ml sterilem H<sub>2</sub>O (Flüssigmedium) oder 760 ml autoklaviertem 2% Agar (Festmedium) und 40 ml 50% (w/v) Glucose mischen.  
 für YNBA: 200 ml 5x YNB mit 720 ml sterilem H<sub>2</sub>O (Flüssigmedium) oder 720 ml autoklaviertem 2% Agar (Festmedium) und 80 ml 25% (w/v) Arabinose mischen.

**Potato-Dextrose(PD)-Festmedium**

24 g Kartoffelextrakt-Glucose-Bouillon  
 20 g Agar  
 mit H<sub>2</sub>O auf 1 l aufgefüllt und autoklaviert

**PD-CC-Festmedium (Test auf filamentöses Wachstum)**

24 g Kartoffelextrakt-Glucose-Bouillon  
 20 g Agar  
 8 g Aktivkohle  
 mit H<sub>2</sub>O auf 1 l aufgefüllt und autoklaviert

**YEPS<sub>light</sub>-Medium**

modifiziert nach (Tsukuda *et al.*, 1988)

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

**NSY-Glycerin**

1 g Hefeextrakt  
 5 g Saccharose  
 8 g Nutrient Broth  
 87% (v/v) Glycerin  
 mit H<sub>2</sub>O auf 1 l aufgefüllt

**Regenerationsagar** (Schulz *et al.*, 1990)Top-Agar:

1,5% (w/v) Agar  
 1 M Sorbitol in YEPS<sub>light</sub>-Medium  
 (s. oben)

Bottom-Agar:

1,5% (w/v) Agar  
 1 M Sorbitol in YEPS<sub>light</sub>-Medium  
 (s. oben)

mit entsprechenden Antibiotika:

Hygromycin (400 µg/ml), Carboxin (4 µg/ml),  
 Nourseothricin (100 µg/ml);

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

Die *S. cerevisiae* Stämme wurden standardmäßig in YEPDA- oder SC-Flüssigmedium bei 30°C und 180 Upm inkubiert. Zur Selektion wurden Auxotrophiemarker verwendet.

**5x SC-Medium**

8,5 g Yeast Nitrogen Base  
 10,0 g Ammoniumsulfat  
 20,0 g Glucose  
 je nach Selektionsbedingung „Drop out additive“  
 in 1 l H<sub>2</sub>O gelöst, pH-Wert auf 5,6 eingestellt und  
 sterilfiltriert

Flüssigmedium:

200 ml 5x SC mit 800 ml sterilem H<sub>2</sub>O

Festmedium:

200 ml 5x SC mit 800 ml autoklaviertem 2% Agar

**YEPDA**

10 g Hefeextrakt  
 20 g Bacto Pepton  
 0,003% (w/v) Adeninhemisulfat  
 für Festmedium 15 g Agar zufügen  
 mit H<sub>2</sub>O auf 980 ml aufgefüllt und autoklaviert.

nach dem Autoklavieren:

2% (v/v) 50% Glucose

**4.2.4 Bestimmung der Zelldichte von Kulturen**

Die Zelldichte von Flüssigkulturen wurde photometrisch in einem Ultraspec 3300 pro Photometer (Amershan Pharmacia Biotech) bei 600 nm bestimmt. Um eine lineare Abhängigkeit zu gewährleisten, wurden für die Messung der optischen Dichte (OD<sub>600</sub>) die Zellsuspensionen durch Verdünnung auf einen Wert unterhalb von 1,0 eingestellt. Als Referenzwert wurde die OD<sub>600</sub> des jeweiligen Kulturmediums verwendet. Eine optische Dichte von 1,0 entspricht etwa 1-5 x 10<sup>7</sup> Zellen/ml.

## 4.3 Stämme, Plasmide und Oligonukleotide

### 4.3.1 *E. coli* Stämme

Für fast alle Klonierungen wurde der Stamm Top10 (Invitrogen, Casadaban und Cohen, 1980; Durfee *et al.*, 2008) verwendet, bei dem es sich um ein Derivat des Stammes DH10B mit folgendem Genotyp handelt: F- *mcrA*  $\Delta(mrr\text{-}hsdRMS\text{-}mcrBC)$   $\Phi80lacZ\Delta M15$   $\Delta lacX74$  *recA1 endA1 araD139  $\Delta(ara\ leu)$  7697 *galU galK rpsL nupG*  $\lambda$ -.*

Bei Klonierungen von Plasmiden, welche eine *ccdB*-Kassette enthalten, wurde der Stamm DB 3.1 (Invitrogen) verwendet. Dieser Stamm ist resistent gegenüber dem Genprodukt des *ccdB* Gens, das mit der *E.coli* DNA-Gyrase interferiert (Bernard und Couturier, 1992). Dieser Stamm besitzt folgenden Genotyp: F- *gyrA462 endA1  $\Delta(sr1\text{-}recA)$  *mcrB mrr hsdS20*(rB-, mB-) *supE44 ara-14 galK2 lacY1 proA2 rpsL20*(SmR) *xyl-5*  $\lambda\text{-}leu\ mtl1$ .*

### 4.3.2 *S. cerevisiae* Stämme

Für die Komplementationsanalyse von *HAC1* durch *cib1* wurde der Hefe Stamm RH3351 und als WT Kontrolle der Stamm RH2816 verwendet.

**Tabelle 5: Verwendete und hergestellte *S. cerevisiae* Stämme**

Stamm	Genotyp	Referenz
$\Sigma 1278b$ (RH2816)	<i>MATa, ura3-52, trp1::hisG, his3::hisG::HIS3</i>	Strittmatter et al., 2006
$\Sigma 1278b \Delta HAC1$ (RH3351)	<i>MATa, ura3-52, trp1::hisG, <math>\Delta HAC1::kanMX4</math></i>	Herzog et al., 2013
$\Sigma 1278b \Delta HAC1 cib1$	<i>MATa, ura3-52, trp1::hisG, <math>\Delta HAC1::kanMX4</math> p414MET25:cib1</i>	diese Arbeit
$\Sigma 1278b \Delta HAC1 cib1^s$	<i>MATa, ura3-52, trp1::hisG, <math>\Delta HAC1::kanMX4</math> p414MET25:cib1<sup>s</sup></i>	diese Arbeit

### 4.3.3 *U. maydis* Stämme

Die Stämme in Tabelle 6 dienen in dieser Arbeit als Ausgangs- und/oder Teststämme.

**Tabelle 6: Ausgangsstämme**

Stamm	Genotyp	Resistenz	Referenz
FB1	<i>a1 b1</i>	-	Banuett und Herskowitz, 1989
FB1 $\Delta cib1$ (UKH8)	<i>a1 b1 <math>\Delta cib1</math></i>	Hyg <sup>R</sup>	Heimel et al., 2010a
FB1 $\Delta cib1 P_{crg:cib1^s}$ (UKH222)	<i>a1 b1 <math>\Delta cib1</math> ip'[P<sub>crg</sub>:cib1<sup>s</sup>]ip<sup>s</sup></i>	Hyg <sup>R</sup> , Cbx <sup>R</sup>	Heimel et al., 2013
SG200	<i>a1 mfa2 bE1bW2</i>	Phleo <sup>R</sup>	Kämper et al., 2006
SG200 $\Delta cib1$ (UKH6)	<i>a1 mfa2 bE1bW2 <math>\Delta cib1</math></i>	Phleo <sup>R</sup> , Hyg <sup>R</sup>	Heimel et al., 2010a

Stamm	Genotyp	Resistenz	Referenz
SG200 $\Delta cib1$ $P_{wt:cib1}$ (UKH256)	<i>a1 mfa2 bW2bE1 <math>\Delta cib1</math> mip'[<math>P_{wt:cib1}</math>]jip<sup>s</sup></i>	Phleo <sup>R</sup> , Hyg <sup>R</sup> , Cbx <sup>R</sup>	Heimel et al., 2013
SG200 $\Delta cib1$ $P_{wt:cib1^s}$	<i>a1 mfa2 bW2bE1 <math>\Delta cib1</math> ip'[<math>P_{wt:cib1^s}</math>]jip<sup>s</sup></i>	Phleo <sup>R</sup> , Hyg <sup>R</sup> , Cbx <sup>R</sup>	Heimel et al., 2013
SG200 $\Delta ire1$	<i>a1 mfa2 bE1bW2 <math>\Delta ire1</math></i>	Phleo <sup>R</sup> , Hyg <sup>R</sup>	Heimel et al., 2013
SG200 $\Delta ire1$ $P_{wt:cib1^s}$	<i>a1 mfa2 bW2bE1 <math>\Delta cib1</math> ip'[<math>P_{wt:cib1^s}</math>]jip<sup>s</sup></i>	Phleo <sup>R</sup> , Hyg <sup>R</sup> , Cbx <sup>R</sup>	Heimel et al., 2013
SG200 $\Delta pit2$ $P_{otef:pit2:mcherry}$	<i>a1 mfa2 bW2bE1 <math>\Delta pit2</math> ip'[<math>P_{otef:pit2:mcherry}</math>]jip<sup>s</sup></i>	Hyg <sup>R</sup> , Cbx <sup>R</sup>	Hampel et al., 2016
SG200 $\Delta pit2$ $P_{pit2:pit2:mcherry}$	<i>a1 mfa2 bW2bE1 <math>\Delta pit2</math> ip'[<math>P_{pit2:pit2:mcherry}</math>]jip<sup>s</sup></i>	Phleo <sup>R</sup> , Hyg <sup>R</sup> , Cbx <sup>R</sup>	Doehlemann et al. 2011
SG200 <i>cib1:3xHA</i>	<i>a1 mfa2 bE1bW2 cib1:3xHA</i>	Phleo <sup>R</sup> , Hyg <sup>R</sup>	Hampel et al., 2016
SG200 $P_{wt:cib1^s}$	<i>a1 mfa2 bW2bE1 ip'[<math>P_{wt:cib1^s}</math>]jip<sup>s</sup></i>	Phleo <sup>R</sup> , Cbx <sup>R</sup>	Heimel et al., 2013
SG200 $P_{wt:cib1^{s(x)}}$	<i>a1 mfa2 bW2bE1 mip'[<math>P_{wt:cib1^{s(x)}}</math>]jip<sup>s</sup></i>	Phleo <sup>R</sup> , Cbx <sup>R</sup>	Heimel et al., 2013
AB31 <i>clp1:gfp</i>	<i>a2 P<sub>crp</sub>:bE1/bW2 clp1:gfp</i>	Hyg <sup>R</sup>	Heimel et al., 2013
AB31 <i>clp1:gfp <math>\Delta cib1</math></i> (UKH100)	<i>a2 P<sub>crp</sub>:bW2bE1 clp1:gfp <math>\Delta cib1</math></i>	Hyg <sup>R</sup> , Nat <sup>R</sup>	Heimel et al., 2013
JB1	<i>a1 <math>\Delta b</math></i>	Hyg <sup>R</sup>	Scherer et al., 2006
JB1 $P_{crp:clp1}$	<i>a1 <math>\Delta b</math> ip'[<math>P_{crp:clp1}</math>]jip<sup>s</sup></i>	Hyg <sup>R</sup> , Cbx <sup>R</sup>	Scherer et al., 2006

Die in Tabelle 7 aufgeführten Stämme wurden in dieser Arbeit hergestellt. Wenn nicht anders vermerkt, wurden in allen Stämmen die homologen Rekombinationsereignisse durch Southern-Analyse bestätigt.

**Tabelle 7: In dieser Arbeit hergestellte Stämme**

Nr.	Stamm	Genotyp	Resistenz	Ausgangsstamm
UMH73	JB1 $\Delta cib1$	<i>a1 <math>\Delta b</math> <math>\Delta cib1</math></i>	Hyg <sup>R</sup> , Nat <sup>R</sup>	JB1
UMH83	JB1 $\Delta cib1$ <i>cib1</i> <sup>433</sup> $P_{crp:clp1}$	<i>a1 <math>\Delta b</math> <math>\Delta cib1</math> ip'[<math>P_{wt:cib1^{433}}</math>]jip<sup>s</sup> <math>P_{crp:clp1}</math>jip<sup>s</sup></i>	Hyg <sup>R</sup> , Nat <sup>R</sup> , Cbx <sup>R</sup>	UMH73
UMH85	JB1 $\Delta cib1$ <i>cib1</i> <sup>433</sup>	<i>a1 <math>\Delta b</math> <math>\Delta cib1</math> ip'[<math>P_{wt:cib1^{433}}</math>]jip<sup>s</sup></i>	Hyg <sup>R</sup> , Nat <sup>R</sup> , Cbx <sup>R</sup>	UMH73
UMH87	FB1 $P_{crp:cib1^s}$	<i>a1 b1 ip'[<math>P_{crp:cib1^s}</math>]jip<sup>s</sup></i>	Cbx <sup>R</sup>	FB1
UMH88	FB1 $P_{crp:cib1^{s(x)}}$	<i>a1 b1 mip'[<math>P_{crp:cib1^{s(x)}}</math>]jip<sup>s</sup></i>	Cbx <sup>R</sup>	FB1
UMH90	AB31 <i>clp1:gfp cib1</i> <sup>s</sup>	<i>a2 P<sub>crp</sub>:bE1/bW2 clp1:gfp ip'[<math>P_{wt:cib1^s}</math>]jip<sup>s</sup></i>	Hyg <sup>R</sup> , Cbx <sup>R</sup>	AB31 <i>clp1:gfp</i>
UMH91	AB31 <i>clp1:gfp cib1</i> <sup>s(x)</sup>	<i>a2 P<sub>crp</sub>:bE1/bW2 clp1:gfp mip'[<math>P_{wt:cib1^s}</math>]jip<sup>s</sup></i>	Hyg <sup>R</sup> , Cbx <sup>R</sup>	AB31 <i>clp1:gfp</i>
UMH101	UKH100 $P_{otef:cib1}$	<i>a2 P<sub>crp</sub>:bW2bE1 clp1:gfp <math>\Delta cib1</math></i>	Hyg <sup>R</sup> , Nat <sup>R</sup> , Cbx <sup>R</sup>	UKH100
UMH105	UKH100 $P_{otef:cib1^{mut}}$	<i>a2 P<sub>crp</sub>:bW2bE1 clp1:gfp <math>\Delta cib1</math></i>	Hyg <sup>R</sup> , Nat <sup>R</sup> , Cbx <sup>R</sup>	UKH100
UMH117	UKH6 $P_{otef:cib1^{us(x)}}$	<i>a1 mfa2 bE1bW2 <math>\Delta cib1</math> mip'[<math>P_{otef:cib1^{us(x)}}</math>]jip<sup>s</sup></i>	Hyg <sup>R</sup> , Cbx <sup>R</sup> , Phleo <sup>R</sup>	UKH6
UMH120	UKH6 $P_{otef:cib1^{us}}$	<i>a1 mfa2 bE1bW2 <math>\Delta cib1</math> ip'[<math>P_{otef:cib1^{us}}</math>]jip<sup>s</sup></i>	Hyg <sup>R</sup> , Cbx <sup>R</sup> , Phleo <sup>R</sup>	UKH6
UMH129	SG200 $P_{otef:cib1^{us}}$	<i>a1 mfa2 bE1bW2 ip'[<math>P_{otef:cib1^{us}}</math>]jip<sup>s</sup></i>	Cbx <sup>R</sup> , Phleo <sup>R</sup>	SG200
UMH130	SG200 $P_{otef:Cib1^{us(x)}}$	<i>a1 mfa2 bE1bW2 mip'[<math>P_{otef:cib1^{us}}</math>]jip<sup>s</sup></i>	Cbx <sup>R</sup> , Phleo <sup>R</sup>	SG200

Nr.	Stamm	Genotyp	Resistenz	Ausgangsstamm
UMH148	SG200 $\Delta pit1/2$	<i>a1 mfa2 bE1bW2 <math>\Delta pit1/2</math></i>	Phleo <sup>R</sup> , Hyg <sup>R</sup>	SG200
UMH168	SG200 $\Delta pit1/2$ <i>P<sub>wt</sub>:pit1/2</i>	<i>a1 mfa2 bE1bW2 <math>\Delta pit1/2 ip'</math>[ <i>P<sub>pit1/2</sub>:pit1/2</i>]<i>]<i>ip<sup>s</sup></i></i></i>	Phleo <sup>R</sup> , Hyg <sup>R</sup> , Cbx <sup>R</sup>	UMH148
UMH172	SG200 <i>P<sub>wt</sub>:pit1/2</i>	<i>a1 mfa2 bE1bW2 P<sub>wt</sub>:pit1/2</i>	Phleo <sup>R</sup> , Nat <sup>R</sup>	UMH148
UMH174	SG200 $\Delta dnj1$	<i>a1 mfa2 bW2bE1 <math>\Delta dnj1</math></i>	Phleo <sup>R</sup> , Hyg <sup>R</sup>	SG200
UMH180	SG200 $\Delta pit1/2$	<i>a1 mfa2 bE1bW2 <math>\Delta pit1/2</math></i>	Phleo <sup>R</sup> , Nat <sup>R</sup>	SG200
UMH185	UKH8 <i>P<sub>otef</sub>:Xbp1<sup>FL(x)</sup></i>	<i>a1 b1 <math>\Delta cib1</math> <i>mip'</i>[<i>P<sub>otef</sub>:XBP1<sup>FL</sup></i>]<i>]<i>ip<sup>s</sup></i></i></i>	Hyg <sup>R</sup> , Cbx <sup>R</sup>	UKH8
UMH186	UKH8 <i>P<sub>otef</sub>:Xbp1<sup>FL</sup></i>	<i>a1 b1 <math>\Delta cib1</math> <i>ip'</i>[<i>P<sub>otef</sub>:XBP1<sup>FL</sup></i>]<i>]<i>ip<sup>s</sup></i></i></i>	Hyg <sup>R</sup> , Cbx <sup>R</sup>	UKH8
UMH191	UKH8 <i>P<sub>otef</sub>:Xbp1<sup>us*</sup></i>	<i>a1 b1 <math>\Delta cib1</math> <i>dip'</i>[<i>P<sub>otef</sub>:XBP1<sup>us</sup></i>]<i>]<i>ip<sup>s</sup></i></i></i>	Hyg <sup>R</sup> , Cbx <sup>R</sup>	UKH8
UMH192	UKH8 <i>P<sub>otef</sub>:Xbp1<sup>us</sup></i>	<i>a1 b1 <math>\Delta cib1</math> <i>ip'</i>[<i>P<sub>otef</sub>:XBP1<sup>us</sup></i>]<i>]<i>ip<sup>s</sup></i></i></i>	Hyg <sup>R</sup> , Cbx <sup>R</sup>	UKH8
UMH193	UKH8 <i>P<sub>otef</sub>:Xbp1<sup>us(x)</sup></i>	<i>a1 b1 <math>\Delta cib1</math> <i>mip'</i>[<i>P<sub>otef</sub>:XBP1<sup>us</sup></i>]<i>]<i>ip<sup>s</sup></i></i></i>	Hyg <sup>R</sup> , Cbx <sup>R</sup>	UKH8
UMH238	UKH6 <i>P<sub>otef</sub>:cib1</i>	<i>a1 mfa2 bE1bW2 <math>\Delta cib1</math> <i>ip'</i>[<i>P<sub>otef</sub>:cib1</i>]<i>]<i>ip<sup>s</sup></i></i></i>	Hyg <sup>R</sup> , Cbx <sup>R</sup> , Phleo <sup>R</sup>	UKH6
UMH240	SG200 $\Delta pit2 \Delta cib1$ <i>P<sub>pit2</sub>:pit2:mcherry</i>	<i>a1 mfa2 bW2bE1 <math>\Delta pit2 \Delta cib1</math> <i>ip'</i>[<i>P<sub>pit2</sub>:pit2:mcherry</i>]<i>]<i>ip<sup>s</sup></i></i></i>	Hyg <sup>R</sup> , Nat <sup>R</sup> , Cbx <sup>R</sup> , Phleo <sup>R</sup>	SG200 $\Delta pit2$ <i>P<sub>pit2</sub>:pit2:mcherry</i>
UMH244	SG200 $\Delta pit2 \Delta cib1$ <i>P<sub>otef</sub>:pit2:mcherry</i>	<i>a1 mfa2 bW2bE1 <math>\Delta pit2 \Delta cib1</math> <i>ip'</i>[<i>P<sub>otef</sub>:pit2:mcherry</i>]<i>]<i>ip<sup>s</sup></i></i></i>	Hyg <sup>R</sup> , Nat <sup>R</sup> , Cbx <sup>R</sup> , Phleo <sup>R</sup>	SG200 $\Delta pit2$ <i>P<sub>otef</sub>:pit2:mcherry</i>
UMH254	UKH6 <i>P<sub>dik6</sub>:cib1</i>	<i>a1 mfa2 bE1bW2 <math>\Delta cib1</math> <i>ip'</i>[<i>P<sub>dik6</sub>:cib1</i>]<i>]<i>ip<sup>s</sup></i></i></i>	Hyg <sup>R</sup> , Cbx <sup>R</sup> , Phleo <sup>R</sup>	UKH6
UMH256	SG200 $\Delta 10099$	<i>a1 mfa2 bE1bW2 <math>\Delta 10099</math></i>	Phleo <sup>R</sup> , Hyg <sup>R</sup> , Cbx <sup>R</sup>	SG200
UMH267	SG200 $\Delta pit1/2$ <i>P<sub>wt</sub>:pit1/2</i>	<i>a1 mfa2 bE1bW2 <math>\Delta pit1/2</math> <i>P<sub>pit1/2</sub>:pit1/2</i></i>	Phleo <sup>R</sup>	UMH180
UMH272	SG200 $\Delta pit1/2$ <i>P<sub><math>\Delta</math>UPRE</sub>:pit1/2</i>	<i>a1 mfa2 bE1bW2 <math>\Delta pit1/2</math> <i>P<sub>pit1/2</sub><math>\Delta</math>UPRE:pit1/2</i></i>	Phleo <sup>R</sup>	UMH180
UMH303	SG200 $\Delta 10099$ <i>P<sub>wt</sub>:10099:gfp</i>	<i>a1 mfa2 bE1bW2 <math>\Delta 10099</math> <i>ip'</i>[<i>P<sub>wt</sub>:10099:gfp</i>]<i>]<i>ip<sup>s</sup></i></i></i>	Phleo <sup>R</sup> , Hyg <sup>R</sup> , Cbx <sup>R</sup>	UMH256

#### 4.3.4 Plasmide und Plasmidkonstruktionen

Tabelle 8: Ausgangsplasmide

Name	Beschreibung	Resistenz	Referenz
pCR2.1	Topo Vektor	Kan <sup>R</sup> , Amp <sup>R</sup>	Invitogen
pDONR221	Gateway Donor Vektor	Kan <sup>R</sup> , Cm <sup>R</sup>	Invitogen
p123	Expression von GFP-Fusion unter Kontrolle des <i>otef</i> Promotors	Amp <sup>R</sup> /Cbx <sup>R</sup>	Aichinger, 2003
p123-GW1	Gateway fähige Modifikation des p123 Vektors	Amp <sup>R</sup> , Cbx <sup>R</sup> , Cm <sup>R</sup>	M. Vraneš
p123-BB-GW1	Gateway fähige Modifikation des p123 Vektors (nativer Promotor)	Amp <sup>R</sup> , Cbx <sup>R</sup> , Cm <sup>R</sup>	M. Vraneš
pRU11-(not6476): <i>clp1</i>	<i>clp1</i> unter Kontrolle des <i>crg1</i> Promotors	Amp <sup>R</sup> /Cbx <sup>R</sup>	Heimel et al., 2013
pRU11-(not6476): <i>cib1</i> cDNA	<i>cib1<sup>s</sup></i> unter Kontrolle des <i>crg1</i> Promotors	Amp <sup>R</sup> /Cbx <sup>R</sup>	Heimel et al., 2013
pcib1 <sup>433</sup>	<i>cib1<sup>433</sup></i> unter Kontrolle des nativen Promotors	Amp <sup>R</sup> /Cbx <sup>R</sup>	Heimel et al., 2013
pPcib:cib1 <sup>s</sup>	<i>cib1<sup>s</sup></i> unter Kontrolle des nativen Promotors	Amp <sup>R</sup> /Cbx <sup>R</sup>	Heimel et al., 2013

Name	Beschreibung	Resistenz	Referenz
pCib <sup>FL</sup>	<i>cib1</i> unter Kontrolle des nativen Promotors	Amp <sup>R</sup> /Cbx <sup>R</sup>	Heimel et al., 2013
pBS-hhn	Hygromycin-Resistenzkassette	Amp <sup>R</sup> /Hyg <sup>R</sup>	Kämper, 2004
pUMa262	Nourseothricin-Resistenzkassette	Amp <sup>R</sup> /Nat <sup>R</sup>	Brachmann, 2004
pUMa1441	Hygromycin-Resistenzkassette mit FRT	Amp <sup>R</sup> /Hyg <sup>R</sup>	Khrunyk et al. 2010
pUMa1446	Expression der FLP Recombinase unter Kontrolle des <i>crg1</i> Promotors	Amp <sup>R</sup> /Cbx <sup>R</sup>	Khrunyk et al. 2010
p414MET25	Genexpression unter Kontrolle des MET25 Promotors	Amp <sup>R</sup>	Mumberg, 1994
pLL34	enthält Konstrukt (Hyg <sup>R</sup> mit LB und RB) für die Deletion von <i>dnj1</i>	Amp <sup>R</sup>	Lo Presti et al., 2015a

### In dieser Arbeit hergestellte Plasmide:

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

#### pCR2.1-*cib1*-KO-Hyg<sup>R</sup>/Nat<sup>R</sup>

pCR2.1-Derivat (Invitrogen). Plasmid zur Deletion von *cib1* nach Kämper, 2004. Die flankierenden Bereiche wurden mittels PCR amplifiziert und zusätzlich *Sfi* I Restriktionsschnittstellen eingefügt. Die Fragmente (LB + RB) wurden durch *Sfi* I Schnittstellen an Hyg<sup>R</sup>- (pBS-hhn, Kämper, 2004) oder Nat<sup>R</sup>-Kassette (pUMa262, Brachmann et al., 2004) ligiert und anschließend durch eine TOPO-Reaktion (Invitrogen) in pCR2.1 kloniert.

Verwendung: Deletion von *cib1*

#### p414MET25-*cib1/cib1*<sup>s</sup>

p414MET25-Derivat (Mumberg et al., 1994). Zur Herstellung wurde *cib1* und *cib1*<sup>s</sup> (*cib1* ohne Intron) mit Überhängen für die homologe Rekombination durch eine PCR-Reaktion amplifiziert. Anschließend wurden die entsprechenden Fragmente und das mit *Spe* I linearisierte p414MET25 Plasmid mit Hilfe von homologer Rekombination in Hefe kloniert (Colot et al., 2006). Die Plasmide wurden isoliert, sequenziert und in den Hefestamm RH3351 (Herzog et al., 2013) eingebracht.

Verwendung: Komplementation  $\Delta$ *HAC1*

#### pDONR221-*XBP1*<sup>FL</sup>

pDONR221-Derivat (Invitrogen). Als Ausgangsbasis für die Komplementation diente ein kommerziell erworbener *E. coli* Stamm (Hs MGC 3856898, Thermo Fisher Scientific), der *XBP1* exprimiert. Das Fragment *XBP1* mit Intron (*XBP1*<sup>FL</sup>) wurde mittels PCR

(XBP1\_GW\_NEW\_F und Xbp1S-GW\_r) amplifiziert, und durch eine BP-Reaktion in pDONR221 kloniert.

#### **pDONR221-XBP1<sup>us</sup>**

pDONR221-Derivat (Invitrogen). Als Ausgangsbasis für die Komplementation diente ein kommerziell erworbener *E. coli* Stamm (Hs MGC 3856898, Thermo Fisher Scientific), der *XBP1* exprimiert. Zuerst wurden zwei Fragmente mittels PCR amplifiziert, wobei durch Oligonukleotid-Überhänge Mutationen in der Spleißregion eingefügt wurden (Fragment 1: XBP1\_GW\_NEW\_F und Xbp1\_unspl\_R, Fragment 2: Xbp1\_unspl\_f und Xbp1S-GW\_r). Die Fragmente wurden in einer zweiten PCR-Reaktion fusioniert und mittels BP-Reaktion in pDONR221 kloniert. Das klonierte Fragment besteht aus einer *XBP1* Form, die nicht gespleißt werden kann (*XBP1<sup>us</sup>*).

#### **p123- XBP1<sup>FL</sup>/XBP1<sup>us</sup>**

LR-Reaktionsprodukt (Invitrogen) aus p123-GW1 und pDONR221-XBP1<sup>FL</sup>/XBP1<sup>us</sup>. Enthält *XBP1<sup>FL</sup>/XBP1<sup>us</sup>* unter Kontrolle des *otef* Promotors.

Verwendung: Komplementation von  $\Delta cib1$  durch *XBP1/XBP1<sup>us</sup>*

#### **pDONR221-cib1<sup>us</sup>**

pDONR221-Derivat (Invitrogen). Enthält *cib1* mit Mutationen in der Spleißregion. Die Mutationen wurden in die Primer-Überhänge eingebaut (Fragment 1: Cib1\_start\_attB1 und Cib\_splicemut5r, Fragment 2: Cib\_splicemut3f und Cib1-Term\_attB2) und anschließend die zwei entstandenen Fragmente mittels Fusions-PCR zu einem Fragment zusammengefügt. Das aufgereinigte Fragment wurde mittels BP-Reaktion in pDONR221 kloniert.

#### **p123-P<sub>otef</sub>:cib1<sup>us</sup>**

LR-Reaktionsprodukt (Invitrogen) aus p123-GW1 und pDONR221-P<sub>otef</sub>:cib1<sup>us</sup>. Enthält *cib1<sup>us</sup>* unter Kontrolle des *otef* Promotors.

Verwendung: Untersuchung von *cib1<sup>u</sup>*

#### **pRU11-P<sub>wt</sub>:cib1<sup>433</sup>-P<sub>crg</sub>:clp1**

Als Ausgangsplasmid wurde das Plasmid pRU11-(not6476):*clp1* (Heimel *et al.*, 2013) verwendet, welches durch Einbringen von *clp1* aus pRU-ATG1 (Scherer *et al.*, 2006) in pRU11-(not6476) über *Nde* I/*Not* I Restriktionsschnittstellen erzeugt wurde. Um pRU11-P<sub>wt</sub>:cib1<sup>433</sup>-P<sub>crg</sub>:*clp1* herzustellen, wurde ein Fragment mittels PCR aus dem Plasmid pcib1<sup>433</sup> amplifiziert, welches aus dem *cib1* Promoter, dem *cib1<sup>433</sup>* Allele und dem *cib1* Terminator besteht. Nach einer Zwischenklonierung in pCR2.1-Topo (Invitrogen) wurde das



Fragment über *EcoR* I Restriktionsschnittstellen in das Plasmid pRU11-(not6476):*clp1* eingebracht.

Verwendung: Untersuchung des Einflusses der Cib1-Clp1 Interaktion

#### **pDONR221-*cib1***

pDONR221-Derivat (Invitrogen). Das Plasmid enthält ein Fragment bestehend aus dem *cib1* Gen flankiert von attB-Seiten. Es wurde durch eine PCR amplifiziert (Cib1\_start\_attB1 und Cib1-Term\_attB2) und mittels BP-Reaktion in pDONR221 kloniert.

#### **pDONR221-*cib1*<sup>mut</sup>**

pDONR221-Derivat (Invitrogen). Enthält *cib1* mit Mutationen in der basischen Domäne (Arginin zu Alanin). Die Mutationen wurden in die Oligonukleotid-Überhänge eingebaut und anschließend die zwei entstandenen Fragmente (Fragment 1: Cib1\_start\_attB1 und Cib1\_basic\_mut\_r, Fragment 2: Cib1\_basic\_mut\_f und Cib1-Term\_attB2) mittels Fusions-PCR zu einem Fragment zusammengefügt. Das aufgereinigte Fragment wurde mittels BP-Reaktion in pDONR221 kloniert.

#### **p123-*P<sub>otef</sub>:cib1* (GW)**

LR-Reaktionsprodukt (Invitrogen) aus p123-GW1 und pDONR221-*cib1*. Enthält *cib1* unter Kontrolle des *otef* Promotors.

Verwendung: Untersuchung der Clp1 Stabilität

#### **p123-*P<sub>otef</sub>:cib1*<sup>mut</sup>**

LR-Reaktionsprodukt (Invitrogen) aus p123-GW1 und pDONR221-*cib1*<sup>mut</sup>. Enthält *cib1* mit Mutationen in der basischen Domäne unter Kontrolle des *otef* Promotors.

Verwendung: Untersuchung der Clp1 Stabilität

#### **p123-*P<sub>dik6</sub>:cib1***

p123-Derivat (Aichinger *et al.*, 2003). 1 kb des *dik6* (*UMAG\_04130*) Promotors wurden mittels PCR amplifiziert. Das amplifizierte Fragment besitzt eine *Kpn* I und eine *Bam*HI Restriktionsschnittstelle. Über diese Schnittstellen wurde der *otef* Promotor gegen den *dik6* Promotor im Plasmid p123-*P<sub>otef</sub>:cib1* ausgetauscht.

Verwendung: Komplementation von  $\Delta$ *cib1*

#### **p123-*P<sub>otef</sub>:cib1***

p123-Derivat (Aichinger *et al.*, 2003). Das *cib1* Gen (mit Intron) wurde mittels PCR amplifiziert. Das amplifizierte Fragment besitzt eine *Nco* I und eine *Not* I

Restriktionsschnittstelle. Über einen Restriktionsverdau wurde *gfp* aus dem p123 Vektor herausgeschnitten und das *cib1* Fragment über *Nco I/Not I* eingebaut.

Verwendung: Komplementation von  $\Delta cib1$

### **pCR2.1-*pit1/2*-KO-Hyg<sup>R</sup>/Nat<sup>R</sup>**

pCR2.1-Derivat (Invitrogen). Plasmid zur Deletion von *pit1/2* nach Kämper, 2004. Die flankierenden Bereiche wurden mittels PCR amplifiziert und zusätzlich *Sfi I* Restriktionsschnittstellen eingefügt. Die Fragmente (LB + RB) wurden durch *Sfi I* Schnittstellen an die Hyg<sup>R</sup>-Kassette (pBS-hhn, Kämper, 2004) oder Nat<sup>R</sup>-Kassette (pUMa262, Brachmann *et al.*, 2004) ligiert und anschließend durch eine TOPO-Reaktion (Invitrogen) in pCR2.1 kloniert.

Verwendung: Deletion von *pit1/2*

### **pDONR221-*P<sub>wt</sub>:pit1/2***

pDONR221-Derivat (Invitrogen). Es wurde ein Fragment bestehend aus *pit1*, *pit2* und dem dazugehörigen divergenten Promotor amplifiziert (GW\_pit\_comp\_s und GW\_pit\_comp\_as) und mittels BP-Reaktion in pDONR221 kloniert.

### **p123-*P<sub>wt</sub>:pit1/2***

LR-Reaktionsprodukt (Invitrogen) aus p123-BB-GW1 und pDONR221-*P<sub>wt</sub>:pit1/2*.

Verwendung: Komplementation der  $\Delta pit1/2$  Mutante im *ip* Locus

### **pPit1/2**

pDONR221-Derivat (Invitrogen). Enthält 1 kb der 3'-Region des *pit1* ORF, den 3,8 kb großen *pit1/2* Locus (bestehend aus *pit1*, *pit2* ORFs und dem Promotor) (LB), eine Hyg<sup>R</sup>-Kassette mit FRT-Regionen (Khrunyk *et al.*, 2010) und 1 kb der 3'-Region von *pit2* (RB). Die Fragmente (LB: pitIL\_LB\_s und pitIL\_LB\_as, RB: pit1/2KO\_rb\_s und pitIL\_RB\_as) wurden durch PCR generiert und mit *Sfi I* geschnitten. Anschließend wurden die Fragmente mit einer kompatiblen Hyg<sup>R</sup>-Kassette (mit FRT-Regionen) ligiert und mittels BP-Reaktion (Invitrogen) in pDONR221 kloniert.

Verwendung: Komplementation von  $\Delta pit1/2$  im nativen Locus (ohne Resistenzkassette)

### **pPit1/2 $\Delta$ UPRE**

pDONR221-Derivat (Invitrogen). Herstellung analog zu pPit1/2 mit dem Unterschied, dass durch eine Fusions PCR das UPRE-Element aus der LB entfernt wurde (Fragment 1: pitIL\_LB\_s und pitIL\_Lfus\_as, Fragment 2: pit\_Lfus\_s und pitIL\_LB\_as).

Verwendung: Komplementation von  $\Delta pit1/2$  im nativen Locus (ohne Resistenzkassette)

**pPit1/2-Hyg<sup>R</sup> (ohne FRT-Regionen)**

pDONR221-Derivat (Invitrogen). Herstellung wie pPit1/2 mit dem Unterschied, dass eine Hyg<sup>R</sup>-Kassette verwendet wurde, die kein Entfernen der Resistenzkassette nach Integration ins Genom ermöglicht.

Verwendung: Komplementation von  $\Delta pit1/2$  im nativen Locus

**p123-*P<sub>wt</sub>*:10099-gfp**

p123-Derivat (Aichinger *et al.*, 2003). Das *UMAG\_10099* Gen und 1 kb der Promotorregion wurde mittels PCR amplifiziert. Das amplifizierte Fragment besitzt eine *Nco* I und eine *Hind* III Restriktionsschnittstelle. Über einen Restriktionsverdau (*Nco* I/*Hind* III) wurde das PCR-Fragment in den p123 Vektor eingebaut.

Verwendung: Komplementation von  $\Delta UMAG_10099$

**pCR2.1-10099-KO**

pCR2.1-Derivat (Invitrogen). Plasmid zur Deletion von *UMAG\_10099* nach Kämper, 2004. Die flankierenden Bereiche wurden mittels PCR amplifiziert (LB und RB) und zusätzlich *Sfi* I Restriktionsschnittstellen eingefügt. Die Fragmente wurden durch *Sfi* I Schnittstellen an die Hyg<sup>R</sup>-Kassette (pBS-hhn, Kämper, 2004) ligiert und anschließend durch eine TOPO-Reaktion (Invitrogen) in pCR2.1 kloniert.

Verwendung: Deletion von *UMAG\_10099*

**4.3.5 Oligonukleotide**

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

**Tabelle 9: Verwendete Oligonukleotide in dieser Arbeit**

Name/Anwendung	Sequenz 5'-3'-Richtung
<b>Deletion von <i>cib1</i></b>	
cib1_lba	AGCTTGGACTAGTAAATGGGACCG
cib1_lbi	GTTGGCCATCTAGGCCGAGGAGAAGGGATGCGAAGTG
cib1_rbi	GTTGGCCTGAGTGGCCATGTTGAACACGTGCGTCAGTCC
cib1_rba	ATTATCCCTTCGCCTTCCCCTTC
cib1_nested_f	ACGCCTGAATCGATGCAAAACTG
cib1_nested_r	CAATCTCATTTTCGTGTTCCGCC
<b>Komplementation <math>\Delta HAC1</math></b>	
Cib1-hrec_414_f	AAGCTGGAGCTCCACCGCGGTGGCGGCCGCTCTAGATGACTAGCACCACCACG TCAAC
Cib1-hrec_414_r	GGGTACCGGGCCCCCCTCGAGGTGACGGTATCGTCAAGCGACGATTGAGG CCATCA

Name/Anwendung	Sequenz 5'-3'-Richtung
<b>Komplementation von <math>\Delta cib1</math> durch XBP1</b>	
XBP1_GW_NEW_F	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGATGGTGGTGGTGGCAGCCCAGGCT
Xbp1S-GW_r	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTTTAGTTCATTAATGGCTTCCAGCTT
Xbp1_unspl_R	GACCTGCTGGAGCGGAGCACGCAGACGCAGAGCGGCCGACTCAGCAGACCCG GCCACT
Xbp1_unspl_f	TCGGCCGCTCTGCGTCTGCGTGCTCCGCTCCAGCAGGTCCAGGCCAGTTGTC ACCC
<b>Erzeugung unspleißbares <i>cib1</i></b>	
Cib_splicemut5r	TCGGCGTCTGACGGCACGAGGGAGCGTCCGAGCAGGTGGCCTCGGCGGCG GGCAGACGCACACCTTCATTTGAGGATTGCTGGGCCA
Cib_splicemut3f	TCGTGCCGTGACGGACGCCGAGCTCGAGCAGTCGAGCAGCGCATGCCCTCGC ACTCGCTGCGCGTCTCGCTCGCAAACAAAGTGCCCTCGAA
Cib1_start_attB1	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTATGACTAGCACCACCACGTCAA
Cib1-Term_attB2	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTGACCAAACATACTCGGACCTGTG
RT_ciball_s	TATCGACCTCGACGCCAAAC
RT_ciball_as	ATAGCCCTCGCCACAGATA
<b>Erzeugung pRU11-<i>P<sub>wt</sub>:cib1<sup>433</sup>-P<sub>erg</sub>:clp1</i></b>	
Cib1_433_EcoRI_f	GTTGAATTCGTGCACCATATGGACATATTGTGCG
Cib1_433_rev	ATCGATGAATTCTCATGTTTGACAGC
<b>Mutation der basischen Domäne</b>	
Cib1_basic_mut_f	GCGCAGTACTCGGCCGAGGCCAAGAAGGCATACGTAGAGACCCCTCG
Cib1_basic_mut_r	CTTGGCCTCGGCCGAGTACTGCGCCGAGAGCGCATTGGCGGCCTGCGCAGCT TCGAGACGAGCCTTGCG
Cib1_start_attB1	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTATGACTAGCACCACCACGTCAA
Cib1-Term_attB2	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTGACCAAACATACTCGGACCTGTG
<b>Erzeugung p123-<i>P<sub>dik6</sub>:cib1</i></b>	
Pdik6_kpnI_f	TATAGGTACCGTACGGCGCGTCTAATGATGTT
Pdik6_BamHI_r	TATAGGATCCGTTGCTGGGATCGAATGGCT
<b>Deletion von <i>pit1/2</i></b>	
pit1/2KO_lb_s	CATTGTTCTGCATCATCCACC
pit1/2KO_lb_as	GCAGGCCTGAGTGGCCTCCGTGTAGTCGTGCCTGTGT
pit1/2KO_rb_s	GTTGGCCATCTAGGCCATTTGCAGCTTATTGAAGCTGTGG
pit1/2KO_rb_as	TCAATGGCTTGGTCCAGGGAC
pit1/2KO_nes_s	GCATTCCGCAGAGGCAGACC
pit1/2KO_nes_as	ATCTCAACCGTTCCCGACGAT
<b>Komplementation von <i>pit1/2</i> (<i>ip</i> Locus)</b>	
GW_pit_comp_s	GGGGACAAGTTTGTACAAA AAAAGCAGGCTACGTGTCGTTTCTGAACTCAGCA
GW_pit_comp_as	GGGGACCACTTTGTACAAA GAAAGCTGGGTTTCATGTGCGCGCAGCTTGGACT
<b>Komplementation von <i>pit1/2</i> (nativer Locus)</b>	
pitIL_LB_s	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCCGGTCAATACACTCCACCG
pitIL_LB_as	GCAGGCCTGAGTGGCCGGCTGGATACCACAATCAAACCTTG
pitIL_Lfus_as	ATGGAGCGTCACGATGGTGAAG
pit_Lfus_s	GTACTTACCATCGTGACGCTCCAT
pitIL_RB_as	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTGCGGGCTTCATCTTCGATGTG
<b>ChIP Analyse</b>	
ChIP_cib1_f	CCGCACGTCTGAAATGTTGCT
ChIP_cib1_r	GGTGGTGGATGTAAGATGCCA
ChIP_pit_f	AGGTTGTAGCATGGTTGCACGAT
ChIP_pit_r	GCCGTTGCTCATTGTGCTGAAG

<b>Name/Anwendung</b>	<b>Sequenz 5'-3'-Richtung</b>
ChIP_um05294_f	CACCTGACACAATCACGAATTATG
ChIP_um05294_r	GTCCCGAAGTGCATCAAACAC
<b>qRT-PCR</b>	
RT_actin_f	CATGTACGCCGGTATCTCG
RT_actin_r	CTCGGGAGGAGCAACAATC
RT_cib1_rev	CATCGACGTTGTTTCCGGCCT
RT_cib1_spliced_f	GCCTCCCTGCAGCGGATGC
RT_cib1_unspliced_f	GGCGACCTGCTCTGATGCACC
RT_clp1_f	GTCAGTTCGTTTGCGCCTAC
RT_clp1_R	GCATCGTCTCGTGCAACTTC
RT_eIF2b_f	ATCCCGAACAGCCCAAAC
RT_eIF2b_r	ATCGTCAACCGCAACCAC
RT_um15034_f ( <i>bip1</i> )	AGGCATGGCTCGACGAGAACA
RT_um15034_r ( <i>bip1</i> )	GGTAAATCTTGCGGTGATGGG
RT_um00904_f ( <i>lhs1</i> )	GCTGAAGCAAAGGCCAACTTG
RT_um00904_r ( <i>lhs1</i> )	TTCTTGTCTCGCCTGTTTG
RT_um05352_f ( <i>mpd1</i> )	CTGCGGACTATGCGACTCAGTT
RT_um05352_r ( <i>mpd1</i> )	TGTGCTAGCCACTTTTCGCTTT
RT_um10287_f ( <i>cne1</i> )	CATCGGAGCGATCAAGGAGATG
RT_um10287_r ( <i>cne1</i> )	TGGTGACCTTGACCTTGCTGC
RT_um02729_f ( <i>spp1</i> )	TGGGCTTCACCAAGTCATACACTC
RT_um02729_r ( <i>spp1</i> )	CGCCTGGAAGAAGTGCATCAC
RT_eIF2b_f	ATCCCGAACAGCCCAAAC
RT_eIF2b_r	ATCGTCAACCGCAACCAC
RT_cib1_rev	CATCGACGTTGTTTCCGGCCT
RT_cib1_spliced_f	GCCTCCCTGCAGCGGATGC
Pit1-RT-fw	GCCCAGTCCCAGTCTATC
Pit1-RT-rev	GAAGGGGAGCAGGAGATG
Pit2-RT-fw	CAAGAATCCGCCTGCCAACA
Pit2-RT-rev	AGGATCTGTCCGCATGACC
RT_um00060_f	TGTCGATCATCGTGAGCAGC
RT_um00060_r	GCTAGGTACGCCATGTAGC
RT_um05294_f	CACGCCAGAAGTACTTTGC
RT_um05294_r	TCGCGTCTTCGAATCCGTATAC
RT_um01061_f	GAATCTTGAATTGGTTGGGTTTC
RT_um01061_r	GTCACAGTCTTGCCATCTGATC
RT_um01302_f	GCTATCTAGCTCCGAACGGA
RT_um01302_r	CATCCGCACATGGGATCTTTGA
RT_um01778_f	CAGAGGTCATGGAGGACACGA
RT_um01778_r	ATCCGTTGTCCCTTGCCCTCCA
RT_um01779_f	GGTATGGTGTTCCCTCCGTATTC
RT_um01779_r	CACCTCCAGACCCGCCGT
RT_um01796_f	CTTATCGGCTAATGTCTGGC
RT_um01796_r	CGTAATTCTGCATAAGCATAGGC
RT_um01976_f	CGGTCCGAGGTCTACATC
RT_um01976_r	GACCTTGGTGTAGAGATTCATG

<b>Name/Anwendung</b>	<b>Sequenz 5'-3'-Richtung</b>
RT_um02295_f	TCCGTCAAGGATGGCCAAAC
RT_um02295_r	CTGTTCCGGAAGCTCTGAAGACG
RT_um02535_f	CGCTGATCAACAATATGCGATCA
RT_um02535_r	TATCGGTAGCTGTGTCCTGC
RT_um02756_f	CATGGACATGCTTGGTCTCG
RT_um02756_r	CAAGAGCGGAGTTTGGCAG
RT_um03105_f	CATGAAGTTGTGCAAACAGCTCT
RT_um03105_r	CTAGGATGGCTTGGCGCTT
RT_um03154_f	AACGAGCTGGTACCTCGGA
RT_um03154_r	CACGGTGCGATATTCGCCT
RT_um03313_f	CGAACTATCGGCGGCGATC
RT_um03313_r	GCCACTTTCTGTAGTAGTCGTTT
RT_um04557_f	CACAGGACATCATTACCACGCT
RT_um04557_r	CGGTGTCGGTCTTCAAAGTTG
RT_um04915_f	CATGCTATCAAGGTGAACGGC
RT_um04915_r	AACGGTCAGCGAGTTGGTCT
RT_um05294_f	CACGGCCAGAAGTACTTTGC
RT_um05294_r	TCGCGTCTTCGAATCCGTATAC
RT_um05299_f	CTTCATATGCGATGTCCCTAAG
RT_um05299_r	CGACTCATCTCCTCTCCTTG
RT_um05604_f	GACACCAGCGGCACCTTTA
RT_um05604_r	GAAGTAGGATAATTGGGCGCCA
RT_um11484_f	CGCACGAGTACGCTGAGCT
RT_um11484_r	TCATCAGTCGTTCTGCCTTGC
RT_um11697_f	CTCTGGTGCGCCACTACG
RT_um11697_r	GCAAAGCTCGGATCGGTGAG
RT_um10099_s	AGGTTGAAGATGAGCGCTAGGC
RT_um10099_as	GACTTTGC CGGCATGAGTCC
RT_um00420_f	AATAATGCCGATTCCAAGTCCG
RT_um00420_r	TCGTCTTCTTGACAATGAGCG
RT_um00793_f	GCAAGAGCTTCCGATGGATGTT
RT_um00793_r	GCAGCTAGTCTGGTCTTCCAC
RT_um01750_f	GGTGGTATCAGCGAGCTCA
RT_um01750_r	GGCGCACCATACATTCCCA
RT_um02119_f	AGGCCATCTACAATACTTGGAGC
RT_um02119_r	TCCAGATCTGGATGACTGACGA
RT_um02537_f	CAACTTTTTTCGGTCCGCGC
RT_um02537_r	TTGCGCGGGTTAGGTCCAT
RT_um03314_f	GGTAGGTTGCGCGAGCCA
RT_um03314_r	AACCGTACGCAGCTTGCCG
RT_um03585_f	AGGGAGCTCCTGTCCGAA
RT_um03585_r	TCGTGGAGAGGAAGTAAGGg
RT_um05309_f	ATCCTGAATATCAGCGTCGCTTG
RT_um05309_r	TGAGGATCGAGACCGCCATAT
RT_um06112_f	GCCCTCAAGGACCTTGGC
RT_um06112_r	GAGGCTGGTCAGGCAGC

<b>Name/Anwendung</b>	<b>Sequenz 5'-3'-Richtung</b>
RT_um06113_f	GGCTACAAGAAGAAGAAGCTGCTT
RT_um06113_r	GCCACTGTGGGTTCTTACCG
RT_um06178_f	GGCCGACTGTAAATTCACAGC
RT_um06178_r	GTGCCACCTGCTTCTTTGC
RT_um06179_f	GACGGCCAAGTGTAGTTTCAC
RT_um06179_r	TGCATCCTGGCACCTCTTG
RT_um00072_f	CTTCTGGGTCGGCAACTAG
RT_um00072_r	CCGAGACTGCCGTTGCAG
RT_um06162_f	CAGCGCCACCACTTCTGG
RT_um06162_r	GCAGCAAGCGAGGCAAAG
RT_um12302_f	TCAAAGTTTCCGACGGTCGC
RT_um12302_r	CTGGCTGAAGCATCTTGAGTTC
RT_12127_f	GGCGTACACTGCCACTTGC
RT_12127_r	CCAACAAAGGAGCTATAGATGGG
RT_um11250_f	GTACTCGTCGAAGACGGAC
RT_um11250_r	GAGGCTTTGCTCTTACCACC
RT_um10555_f	GCTCGAGGCAATCCAGCC
RT_um10555_r	CGACCCTGCAAAGGGAGT
RT_um10418_f	CGTTGCTCTGAACGACGTAG
RT_um10418_r	CAGGTCCTTTGCTGCTGAAG
RT_um06255_f	TCTGGGATTGGTCACTGG
RT_um06255_r	CTGGAATTGGTCCGAACACTG
RT_um00344f	CAGTCGTATCTTGCTCAGCGG
RT_um00344r	GCTGCATCGCCATTGGTTT
RT_um00628f	CGACCCACTCAGTGCCAGAA
RT_um00628r	GAGAGCGCACAACATGAATGGT
RT_um00692f	CATCGGCTGGCTCTGCATCT
RT_um00692r	AGGCGAGCTTGCCTGGTTG
RT_um00795f	CTCCCGCCGGAGTCAAATAT
RT_um00795r	GGCTCGAGATACTGTCTCAAC
RT_um01695f	GGTTCACCTTCCACTCGATCG
RT_um01695r	CATCACCATATTGAGCCAACAGC
RT_um01786f	TGAGGAAAGAGTTCCACACGTTCA
RT_um01786r	CCCTGTCCGTATTGTTGGCAA
RT_um02011f	CCGTCTGTCAAAGCCGATGC
RT_um02011r	GCCAGTAGACGGCATATCCTTCA
RT_um02072f	CCAACATACCAAGATCAAGCAGC
RT_um02072r	CCGAACCGTACACTTTGCTAGC
RT_um02229f	GACAAGATGTGCTGCAAGGC
RT_um02229r	TGGATGGGCCAGGTGACAT
RT_um02230f	AGCTTGCCCGCGAAATGAT
RT_um02230r	GGAGTCAGCTGATAGTTGGCT
RT_um02852f	GCGCTGATAGGAAGAACAACCG
RT_um02852r	AATAGGCTTGGCGATGCGC
RT_um02921f	GGCGCCTACTTTAACACCAAC
RT_um02921r	ATGCGGTGCCGGAGTCTTT

<b>Name/Anwendung</b>	<b>Sequenz 5'-3'-Richtung</b>
RT_um02981f	GTCGCCGCAAATCGCATAA
RT_um02981r	CCATTTTCCACAAGAACCCTGAT
RT_um03748f	CATCGCCAACGGCTTCAAA
RT_um03748r	TGGTTGGCGTTGATTCGTG
RT_um03750f	CTGGTAAAAGCCCAATGGTTGC
RT_um03750r	CCTCTTCGCTTCATCGCATCA
RT_um03822f	GATGAGGTCGCCAACCAGATG
RT_um03822r	TCAGCGACAGCCTGGATGGT
RT_um04033f	TCTCGGCAGTCGATGGGAT
RT_um04033r	TGGGCCAGGGACCATGATA
RT_um04295f	ATCCGACTACTACGCACCAGAC
RT_um04295r	TGGAATGAGGCACCGGTGTAC
RT_um04342f	AGGCGAAGCTGGTTTGGCA
RT_um04342r	GCAGAGCCCATAGCAGCATCA
RT_um05341f	TTATGATCGCTAGAGCTCTCGTGA
RT_um05341r	TTTGAGCTGGTCTACAGGTGCAC
RT_um05927f	AGAGTTTCTGTGGCCACCTGTT
RT_um05927r	TGTGCTGGCTCGATTCCCA
RT_um10031f	AGGAACCTCAAGGACGAAGC
RT_um10031r	TCGCCGGCATAATCGAGAC
RT_um10476f	CGAGCAAACAAGTCATCGCG
RT_um10476r	GTTCCCGAAATCTGCGTGC
RT_um10831f	CTGGGCCACCTTCAATGTCC
RT_um10831r	GCAGATCGTGTGTCTTCCATGC
RT_um11002f	CTCTCTGCGCAGGTGTATGC
RT_um11002r	AGAAGCTCGTGGTGGAAATGCT
RT_um11403f	AGCTGGACGGATAGCGACC
RT_um11403r	TCGTTGGCGTGCTTCTGTG
RT_um11586f	TCTCTACCAGCCACCTCTTGTACC
RT_um11586r	GAAGGTTGCAGACCGACTTGATC
RT_um12175f	CTGATGCCCCGACGTCTAAAG
RT_um12175r	AGCCAGCCGAATGTTTGGG
RT_um12226f	GACAAGGATGGCAACAAGAGACG
RT_um12226r	GCAGCAGAATCTAAATGTGGCACT
RT_um12258f	GCGGTTGGTGGATCTGTT
RT_um12258r	TGGTGCTACCAGACGTGCC
RT_um12281f	CGACACGTGACATATCAACTA
RT_um12281r	CGCAAACGCAGGATTCACG
RT_um12316f	CACGTTCCAATCGCGCAAC
RT_um12316r	TTCCGCGCTCCAAATGGTT
<b>Deletion von <i>UMAG_10099</i></b>	
um10099_lb_s	CGGTCCCCACCGATACATG
um10099_lb_as	GCAGGCCTGAGTGGCCCCTGACGCTTCCAAGGTGAG
um10099_rb_s	GTTGGCCATCTAGGCCATGCGCGATGCTGGATCTGTA
um10099_rb_as	GGCGCTCGTGGAAATGCCTT
um10099_nested_s	GGTCCCCACCGATACATGC



Name/Anwendung	Sequenz 5'-3'-Richtung
um10099_nested_a	CGGAACTTTGTCTCGACTCTTG
<b>Komplementation von UMAG_10099</b>	
um10099_Ncol_r	AAACCATGGCTGCGTTTTGTTCTTGTTACCCTT
um10099_Hind_f	CGAAGCTTCACCGATACATGCAGCTCG
<b>Erzeugung p123-P<sub>otef</sub>:cib1</b>	
cib1_Ncol_f	TTTCCATGGCAACTAGCACCACCACGTCA
cib1_NotI_r	GCGGCCGCTCAAGCGACGATTGAGGCCATCA
<b>Charakterisierung von dnj1</b>	
um05173_LB_f	TCTGGGCTACTTCCTTGCC
um05173_RB_r	AACGCTGGGGTTGACGCG
RT_um05173_f	GCAGGAGAAGATGGCCCAGA
RT_um05173_r	TTACCGTAGCCGCCCTGCT

## 4.4 Mikrobiologische Methoden

### 4.4.1 Transformation von *E. coli*

Zur Herstellung transformationskompetenter Bakterienzellen wurde ein modifiziertes Protokoll nach Hanahan *et al.*, 1991 verwendet. Es wurden 100 ml SOB-Medium mit 1 ml einer frischen TOP10 Übernachtskultur angeimpft und bis zu einer OD<sub>600</sub> ≈ 0,5 bei 37°C und 200 Upm inkubiert. Die Zellen wurden pelletiert (4.000 Upm, 10 min, 4°C), anschließend in einem Drittel des Ausgangsvolumens in eiskaltem CCMB80-Puffer aufgenommen und für 20 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen erneut pelletiert (4.000 Upm, 10 min, 4°C) und in einem Zwölftel des Ausgangsvolumens resuspendiert. Die Zellsuspension wurde in 50 µl Portionen aliquotiert und bei -80°C gelagert.

#### CCMB80-Puffer

10 mM	KOAc pH 7,0
80 mM	CaCl <sub>2</sub> x 2H <sub>2</sub> O
20 mM	MnCl <sub>2</sub> x 4H <sub>2</sub> O
10 mM	MgCl <sub>2</sub> x 6H <sub>2</sub> O
10% (v/v)	Glycerin
in H <sub>2</sub> O; pH 6,4	

#### SOB-Flüssigmedium ohne Magnesium

0,5% (w/v)	Hefeextrakt
2% (w/v)	Trypton/Pepton
10 mM	NaCl
2,5 mM	KCl
in H <sub>2</sub> O	

Zur Transformation wurden die Zellen auf Eis aufgetaut, jeweils 50 µl mit maximal 10 µl Plasmidlösung (1 - 5 ng Plasmid) oder dem Ligationsansatz versetzt und 10 - 15 min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock von 30 - 60 s bei 42°C wurde der Transformationsansatz mit 200 µl dYT-Medium versetzt und 30 min bei 800 Upm und 37°C in einem Wärmeblock inkubiert. Die Inkubation in dYT-Medium bei 37°C wurde nicht bei einer Ampicillin-Resistenz durchgeführt. Anschließend wurde der Transformationsansatz auf YT-Platten mit dem entsprechenden Antibiotikum ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

#### 4.4.2 Transformation von *S. cerevisiae* nach Ito *et al.*, 1983

25 ml YEPDA-Medium wurde mit einigen *S. cerevisiae* Einzelkolonien angeimpft und ü. N. bei 30°C und 180 Upm inkubiert. Diese Vorkultur wurde in 50 ml YEPDA-Medium auf eine  $OD_{600} = 0,2$  verdünnt und weitere 4 - 6 h bei 30°C und 180 Upm bis zu einer  $OD_{600} = 0,4 - 0,6$  inkubiert. Um die Zellen zu ernten, wurde die Kultur in 50 ml Greiner-Röhrchen überführt und in einer Heraeus Biofuge Stratos bei Raumtemperatur abzentrifugiert (3 min, 2.000 Upm). Die Zellen wurden einmal mit 15 ml sterilem H<sub>2</sub>O und anschließend mit 10 ml SORB-Lösung gewaschen. Nach der Pelletierung wurden die kompetenten Zellen in 360 µl SORB-Lösung aufgenommen und mit 40 µl denaturierter (10 min bei 100°C) Lachssperma-DNA (Invitrogen) versetzt. Nach diesem Schritt können die Zellen in 50 µl Aliquots bei -80°C gelagert werden.

Für die Transformation wurden 50 µl der kompetenten Zellen auf Eis aufgetaut, mit Plasmid-DNA (max. 2 µl/10 µl Zellen) versetzt und gemischt. Anschließend wurde das 6-fache Volumen einer sterilen LIT-PEG-Lösung zugefügt, gemischt und der Ansatz für 30 min bei 30°C inkubiert. Nach einem Hitzeschock für 15 min bei 42°C wurden die Zellen in einer Heraeus Biofuge pico abzentrifugiert (3 min bei 2.000 Upm), einmal mit YEPDA-Medium gewaschen und in 100 µl TE-Puffer resuspendiert, bevor der Ansatz auf einer entsprechenden Selektionsplatte ausplattiert wurde.

##### Li/PEG:

50 g PEG-3500  
10 ml Lithium-Acetat-Lösung (100 mM)  
in 100 ml H<sub>2</sub>O, sterilfiltriert

##### SORB:

100 mM LiAc  
10 mM Tris-Cl, pH 8,0  
1 mM Na<sub>2</sub>-EDTA, pH 8,0  
1 M Sorbitol  
in H<sub>2</sub>O

#### 4.4.3 Transformation von *U. maydis*

Dieses Protokoll ist modifiziert nach Schulz *et al.*, 1990 und Gillissen *et al.*, 1992. Von einer auf Platte wachsenden Kultur wurde eine YEPS<sub>light</sub> Flüssigkultur angesetzt und ü. N. bei 28°C geschüttelt. Diese Vorkultur wurde anschließend in 50 ml YEPS<sub>light</sub> auf eine  $OD_{600}$  von 0,2 verdünnt und bei 28°C bis zu einer Zelldichte von  $OD_{600} = 0,8 - 1,0$  geschüttelt. Nach Erreichen des optimalen Zelltiters wurden die Zellen durch Zentrifugieren (3500 Upm, 6 min, 4°C, Heraeus Biofuge Stratos) geerntet, einmal mit 25 ml SCS gewaschen und in 2 ml SCS mit 12,5 mg/ml „Lysing Enzyme“ (L1412, Sigma) resuspendiert. Die in diesem Puffer bei Raumtemperatur ablaufende Protoplastierung kann mikroskopisch verfolgt werden, da die zigarrenförmigen Zellen nach Lyse der Zellwand eine kugelige Form einnehmen. Nach der vollständigen Protoplastierung (5 - 15 min) wurden 10 ml SCS zugegeben und die

Protoplasten durch Zentrifugation bei 2.300 Upm (10min, 4°C, Heraeus Biofuge Stratos) pelletiert. Um das „Lysing Enzyme“ vollständig zu entfernen, wurde dieser Waschgang wiederholt. Anschließend wurde mit 10 ml STC gewaschen, und das Pellet danach in einem Volumen von 0,5 ml eiskaltem STC aufgenommen. Die so behandelten Protoplasten können 3 - 4 h auf Eis oder aliquotiert bei -80°C mehrere Monate aufbewahrt werden.

Zur Transformation wurden 100 µl Protoplasten mit 1 - 10 µl linearisierter Plasmid-DNA (3 - 5 µg) und 1 µl Heparin-Lösung (15 mg/ml) für 10 min auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 500 µl STC/PEG folgte eine weitere Inkubation von 15 min auf Eis. Anschließend wurde der gesamte Transformationsansatz auf einer kurz zuvor mit Top-Agar überschichteten Regenerationsagarplatte ausgestrichen. Nach 4 bis 7 Tagen Inkubation bei 28°C wurden die gewachsenen Kolonien mit Zahnstochern auf antibiotikahaltigen CM-Platten vereinzelt.

#### SCS

##### Lösung 1:

20 mM Na-Citrat  
1 M Sorbitol  
in H<sub>2</sub>O

##### Lösung 2:

20 mM Citronensäure  
1 M Sorbitol  
in H<sub>2</sub>O

Lösung 2 solange zu Lösung 1 geben bis ein pH-Wert von 5,8 erreicht ist und sterilfiltrieren.

#### STC

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

#### STC/40% PEG

90 ml STC  
60 g PEG 4000  
PEG in STC-Puffer lösen und sterilfiltrieren

#### 4.4.4 Test auf filamentöses Wachstum

Eine Übernachtskultur der *U. maydis* Stämme in YEPS<sub>light</sub> Flüssigmedium wurde auf eine OD<sub>600</sub> = 0,2 in YEPS<sub>light</sub> verdünnt bei 28°C und 180 Upm für 4 h inkubiert. Die Zellen wurden geerntet (3.500 Upm für 5 min bei RT) und das Pellet anschließend in YEPS<sub>light</sub> Flüssigmedium so aufgenommen, dass die Zelldichte bei etwa OD<sub>600</sub> = 1,0 lag. Von jedem Ansatz wurden 3,5 µl auf eine PD-CC-Platte getropft. Die Platte wurde für 24 - 48 h bei RT oder 28°C unter Luftabschluss inkubiert.

#### 4.4.5 Infektion von *Zea mays* mit *U. maydis*

Bei der hier verwendeten Methode handelt es sich um eine Spritzinfektion. Die Stämme wurden in YEPS<sub>light</sub> Flüssigmedium bis zu einer OD<sub>600</sub> = 0,8 angezogen und durch Zentrifugation (3.000 Upm, 5 min, RT, Heraeus Biofuge Stratos) geerntet. Anschließend wurden die Zellen in Wasser aufgenommen (OD<sub>600</sub> = 1,0) und ca. 250 µl der entsprechenden Zellsuspension 1 cm über der Erde in das Innere des Blattwirbels von sieben Tage alten

Maispflanzen der Maisvarietät Early Golden Bantam injiziert. Die infizierten Pflanzen wurden für acht Tage in einer Klimakammer (GroBanks CLF Plant Climatics), inkubiert. Die Auswertung erfolgte nach modifizierten Kriterien aus Kämper *et al.*, 2006.

Programm GroBanks:            tagsüber        8:00 - 22:00, 28°C, Lichtstärke 250  $\mu$ mol  
  nachts            22:00 - 8:00, 22°C;

#### 4.4.6 Induktion von ER-Stress in *U. maydis*

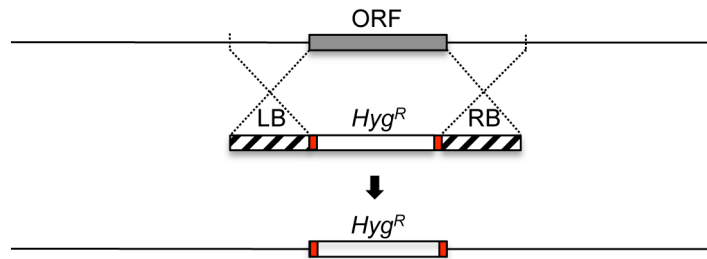
Für die Expressionsstudien wurde eine Übertagkultur in YNB-Flüssigmedium mit den entsprechenden Stämmen angeimpft. Am Abend wurde die Zelldichte der Kulturen so eingestellt, dass die OD<sub>600</sub> am nächsten Tag bei 0,3 liegt. Diese Kulturen wurden zur ER-Stressinduktion mit 3 mM DTT (für 3 h) oder 5  $\mu$ /ml Tunicamycin (für 4 h) behandelt und nach den entsprechenden Inkubationszeiten geerntet.

Zum Test auf das Zellwachstum wurde eine Übernachtkultur in YNB mit den entsprechenden Zellen angeimpft und am nächsten Tag die Zelldichte so eingestellt, dass die OD<sub>600</sub> nach 4 h bei ca. 0,8 liegt. Die Zellen wurden anschließend 5 min bei 3.500 Upm abzentrifugiert und eine 10-fach Verdünnungsreihe beginnend bei OD<sub>600</sub> = 1 hergestellt. 3,5  $\mu$ l dieser Verdünnungsreihe wurden auf das entsprechende YNB-Festmedium (mit/ohne DTT oder Tunicamycin) getropft, und die Platten für zwei Tage bei 28°C inkubiert.

### 4.5 Genetische Methoden

#### 4.5.1 Gendeletion mittels homologer Rekombination

Zur Deletion wurde eine Strategie nach Kämper, 2004 verwendet. Die Strategie beruht darauf, dass durch homologe Rekombination das gewünschte Gen (ORF) durch eine Resistenzkassette ersetzt wird (Abb. 42). Hierzu wurden Konstrukte in *U. maydis* transformiert, die die Resistenzkassette und 1000 bp der homologen Bereiche (LB und RB), die das Gen flankieren, enthalten. Zur Herstellung wurden die homologen Bereiche aus dem Genom mittels PCR amplifiziert und durch Primerüberhänge *Sfi* I Schnittstellen eingefügt. Die Resistenzkassette und flankierende Sequenzen wurden mit *Sfi* I geschnitten und über Nacht bei 16°C ligiert. Das Ligationsprodukt wurde über ein Agarose-Gel isoliert (QIAquick Gel Extraction Kit), durch PCR amplifiziert und entweder direkt in *U. maydis* eingebracht oder durch eine Topo-Klonierung in den Vektor pCR2.1 (Invitrogen) kloniert. Alle verwendeten Kassetten sind in Brachmann *et al.*, 2004 aufgelistet.

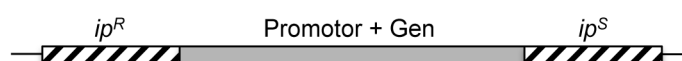


**Abb. 42: Schematische Darstellung der Gendeletion mittels homologer Rekombination.** Das Deletionskonstrukt besteht aus den homologen Bereichen (LB und RB), den *Sfi* I Schnittstellen (rot) und der Resistenzkassette (hier: Hygromycin ( $Hyg^R$ )). Mittels homologer Rekombination wird das Gen (ORF) durch die Resistenzkassette ersetzt.

Eine alternative Methode nach Khrunyk *et al.*, 2010 ermöglicht das Entfernen der Resistenzkassette aus dem Genom. Die Durchführung ist analog zur oben beschriebenen Strategie mit dem Unterschied, dass eine Resistenzkassette flankiert von FRT-Bereichen verwendet wird. Anschließend wird der erzeugte *U. maydis* Stamm mit einem Plasmid (pUMa1446) transformiert, das eine FLP-Rekombinase unter Kontrolle eines Arabinose induzierbaren Promotors exprimiert. Durch einen Wechsel der Kohlenstoffquelle von Glucose zu Arabinose wird die Expression der FLP-Rekombinase induziert und die Resistenzkassette aus dem Genom herausgeschnitten. Ohne Selektion verlieren die Stämme das freireplizierende Plasmid wieder und man erhält einen Stamm mit Integration des gewünschten Konstrukts ohne die Resistenzkassette.

#### 4.5.2 Integration von Konstrukten in den *ip* Locus von *U. maydis*

Die Substitution von Histidin zu Leucin (AS 257) in der Succinatdehydrogenase (Sdh1; *UMAG\_01172*) führt bei *U. maydis* zur einer Resistenz gegenüber dem Antibiotikum Carboxin (Broomfield und Hargreaves, 1992). Dies kann genutzt werden, um Konstrukte gezielt in den *sdh1* Locus (*ip* Locus) zu integrieren. Hierzu wurden Plasmide verwendet, welche die mutierte Variante von *sdh1* ( $ip^R$ ) und das zu untersuchende Gen mit Promotor enthalten. Nach Einbringen des linearisierten Plasmids (meist mit *Ssp* I) in den nativen Locus ( $ip^S$ ) von *U. maydis* erhält man nach Selektion einen Stamm mit der Integration des Konstrukts, das von der mutierten ( $ip^R$ ) und der nativen *sdh1* Variante ( $ip^S$ ) flankiert ist (Abb. 43). Die Integration des Plasmids kann sowohl einfach als auch mehrfach in den *ip* Locus erfolgen und wird mittels Southern-Blot überprüft.



**Abb. 43: Schematische Darstellung der Integration in den *ip* Locus.** Gezeigt ist der *ip* Locus nach Integration eines linearisierten Plasmids. Das Konstrukt (Gen mit Promotor) ist flankiert von der mutierten ( $ip^R$ ) und der nativen *sdh1* Variante ( $ip^S$ ).

## 4.6 Molekularbiologische Standard-Methoden

### 4.6.1 Restriktion und Dephosphorylierung von DNA

Die DNA wurde mit Restriktionsenzymen der Firma Thermo Fisher Scientific nach Herstellerangaben je nach Verwendung zwischen 1 h oder über Nacht geschnitten. Vor der Ligation wurden die Vektorfragmente meist mit der thermosensitiven alkalischen Phosphatase (FastAP, Thermo Fisher Scientific) nach Herstellerangaben dephosphoryliert.

### 4.6.2 Ligation von DNA

Die Ligrationsreaktion wurde für mindestens 1 h bei RT oder über Nacht bei 16°C durchgeführt. Es wurden 1 - 3 µl T4-Ligase (Thermo Fisher Scientific) eingesetzt und das Reaktionsvolumen variierte von 20 - 40 µl. Die gesamte Reaktion wurde anschließend in *E. coli* transformiert und auf das Plasmid selektiert. Alternativ wurde der Ligrationsansatz über eine Gelelektrophorese aufgetrennt und mit dem QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) aufgereinigt (z.B. die Ligation von Gendeletionen).

### 4.6.3 Sequenzierung von DNA

Zur Sequenzierung wurde die DNA mit dem QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) aufgereinigt und die Konzentration am NanoDrop bestimmt. Die DNA wurde entsprechend den Angaben des Sequenzierlabors (GATC Biotech AG, LIGHTrun) verdünnt und die benötigte Menge an Oligonukleotiden hinzugegeben.

### 4.6.4 Agarosegel-Elektrophorese

Die DNA wurde zwischen 90 und 140 V in 0,5x TBE-Gelen (0,8 - 2,0% Agarose) aufgetrennt. Zur Qualitätskontrolle wurde RNA für 15 min bei 140 V in 0,5x TBE-Gelen (0,8% Agarose) aufgetrennt. Zur Detektion wurden 10 µl Ethidiumbromid-Lösung (10 mg/ml) je 100 ml Agarosegel hinzugegeben. Vor dem Auftragen wurden die Proben mit 10x oder 6x Auftragspuffer gemischt. Als Größenstandards dienten der GeneRuler™ DNA Ladder Mix oder GeneRuler™ 1kb DNA Ladder Mix (Thermo Fisher Scientific).

#### 5x TBE-Puffer

440 mM	Tris-Base
440 mM	Borsäure
2,0% (v/v)	0,5 M EDTA pH 8,0
in H <sub>2</sub> O	

#### 10x DNA-Auftragspuffer

0,2% (w/v)	Orange G
50% (w/v)	Saccharose
1 mM	Na <sub>2</sub> -EDTA
in H <sub>2</sub> O	

<b>6x DNA-Auftragspuffer</b>	0,1% (w/v)	Bromphenolblau
50% (w/v) Saccharose	in TE-Puffer	

#### 4.6.5 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Methode ist modifiziert nach (Innis, 1990). Zur Amplifikation der DNA Fragmente wurde die Phusion DNA Polymerase oder für anspruchsvolle Anwendungen die Q5 Polymerase (New England Biolabs) verwendet. Standardmäßig wurden die Reaktionen in einem Volumen von 50 µl mit Hot-Start durchgeführt. Die PCR Reaktion ist gegliedert in eine initiale Denaturierung gefolgt von ca. 30 Zyklen mit Denaturierung, Annealing und Elongation. Am Ende wurde eine finale Elongation von 2 min bzw. 5 min durchgeführt. Die Elongationszeit wurde abhängig von der Größe des erwarteten PCR Produkts und der Polymerase festgelegt. Die Annealing-Temperaturen lagen meist bei 60°C, wurden jedoch bei Bedarf modifiziert. Die Reaktionen erfolgten im Thermocycler T100 von Bio-Rad.

#### PCR Reaktion mit Phusion- bzw. Q5 Polymerase

10 ng	Template-DNA
200 µM	dNTPs
1 µM	Oligonukleotid 1
1 µM	Oligonukleotid 2
1 x	HF-Puffer (Thermo Fisher Scientific) bzw. Q5-Puffer (New England Biolabs)
1 U	Phusion Polymerase bzw. Q5 Polymerase (New England Biolabs)
in H <sub>2</sub> O	

#### Programm Phusion

98°C/∞ - 98°C/30 s - (98°C/10 s - 58-68°C/15 s - 72°C/ x min) x 30 - 72°C/5 min - 12°C/∞

#### Programm Q5

98°C/∞ - 98°C/30 s - (98°C/10 s - 58-68°C/15 s - 72°C/ x min) x 30 - 72°C/2 min - 12°C/∞

#### 4.6.6 Quantitative Echtzeit PCR (qRT-PCR)

##### DNase Behandlung und cDNA Synthese

Für die DNase Behandlung der isolierten Gesamt-RNA wurde das TURBO DNA-free™ Kit (Ambion) verwendet. Die RNA Qualität wurde zuvor mittels Agarosegel-Elektrophorese überprüft und die Konzentration am Nanodrop bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt. Für die Reaktion wurden 4,25 µg RNA, 2,5 µl Puffer und 0,75 µl Turbo DNase eingesetzt. Nach 30 min bei 37°C wurde die Reaktion durch Zugabe von 2,5 µl DNase-Inactivation

Reagenz gestoppt und 5 min bei RT inkubiert. Nach Zentrifugation (10.000 Upm, 2 min) wurde der Überstand abgenommen und für die cDNA Synthese verwendet.

Für die cDNA Synthese wurde das AMV First Strand cDNA Synthese Kit (New England Biolabs) oder RevertAid First Strand cDNA Synthese Kit (Thermo Fisher Scientific) nach Herstellerangaben verwendet. Für beide Kits wurden 6 µl der DNase verdauten RNA verwendet. Die Langzeitlagerung der Proben erfolgte bei -80°C. Die qRT-PCR Reaktionen wurden in einer CFX Connect™ von Bio-Rad durchgeführt.

#### qRT-PCR Ansatz

1 µl cDNA  
 5 µl 2x MESA GREEN qPCR Master Mix (Eurogentech)  
 2 µl Primer Mix (je 2 pmol)  
 2 µl Nuklease-freies H<sub>2</sub>O (Ambion)

#### qRT-PCR Programm

95°C/5 min - (98°C/15 s - 62°C/20 s - 72°C/ 40 s) x 37 - Schmelzkurve: 72°C - 95°C

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

Die Isolierung der Plasmid-DNA erfolgte nach Sambrook *et al.*, 1989. 1,5 ml einer *E. coli* Übernachtskultur wurden pelletiert (13.000 Upm, 30 sec, RT, Heraeus Pico 17). Das Zellpellet wurde in 300 µl STET resuspendiert, nach Zugabe von 20 µl Lysozym-Lösung kräftig geschüttelt (4 min im Vibrax VRX (IKA)) und anschließend 1 min bei 95°C in einem Eppendorf-Heizblock inkubiert. Die lysierten Zellen und die denaturierte genomische DNA wurden 15 min bei 13.000 Upm abzentrifugiert (Heraeus Pico 17) und danach mit einem sterilen Zahnstocher aus der wässrigen Lösung entfernt. Die Aufreinigung der Plasmid-DNA erfolgte durch Fällung mit 40 µl 3 M Na-Acetat, pH 5,3 und 400 µl Isopropanol und anschließender Zentrifugation für 15 min bei 13.000 Upm (Heraeus Pico 17). Das Pellet wurde mit 70% Ethanol gewaschen und nach dem Trocknen in 200 µl TE-Puffer mit 20 µg/ml RNase A aufgenommen.

##### STET

50 mM Tris-Cl, pH 8,0  
 50 mM Na<sub>2</sub>-EDTA  
 8% w/v Saccharose  
 5% v/v Triton X-100  
 in H<sub>2</sub>O

##### Lysozym-Lösung

10 mg/ml Lysozym  
 10 mM Tris-Cl, pH 8,0  
 in H<sub>2</sub>O



#### 4.6.8 Isolierung von genomischer DNA aus *U. maydis*

Es werden Einzelkolonien in 2,5 ml YEPS<sub>light</sub>-Flüssigmedium angeimpft und ü. N. schüttelnd inkubiert. Die Kulturen werden anschließend in ein 2 ml Reaktionsgefäß, indem Glasperlen vorgelegt wurden, umgefüllt und bei 13.000 Upm 1 min zentrifugiert. Das Pellet wird in 500 µl Ustilago-Lysispuffer, verdünnt mit 1xTE (50:50), 10 min auf dem Vibrax VRX (IKA) bei 1400 - 1800 Upm resuspendiert. Danach werden die Proben 15 min bei 65°C und anschließend 5 min auf Eis inkubiert. Durch die Zugabe von 150 µl 8M Kaliumacetat werden Proteine ausgesalzt und mit Zelltrümmern abzentrifugiert. Die Lösung wird durch Invertieren (8 - 10-mal) gemischt und bei 14.000 Upm 15 min zentrifugiert.

Der Überstand wird in ein neues Reaktionsgefäß überführt, wo zuvor 300 µl Isopropanol vorgelegt wurden. Die Lösung wird gut gemischt und 15 min bei 13.000 Upm zentrifugiert. Das Pellet wird einmal mit 500 - 1000 µl 70% Ethanol gewaschen und ca. 5 min bei RT getrocknet. Zum Lösen des Pellets werden 50 µl TE/RNase (TE-Puffer mit 20 µg/ml RNase A) hinzugegeben und die Proben ca. 20 min unter Schütteln bei 50°C inkubiert.

##### Ustilago-Lysispuffer

50 mM Tris-Cl, pH 7,5

50 mM Na<sub>2</sub>-EDTA

1% (w/v) SDS

in H<sub>2</sub>O

#### 4.6.9 Handhabung von Nukleinsäuren

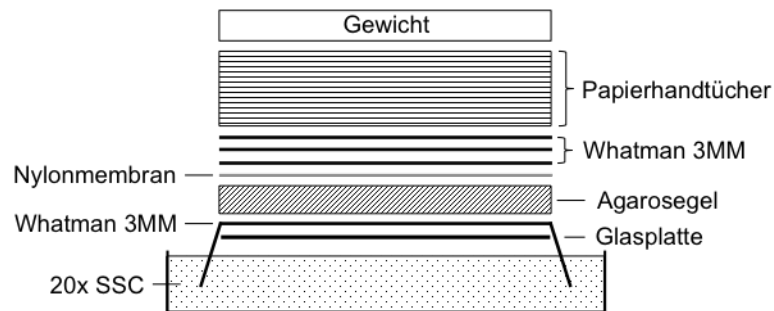
Die Konzentration von Nukleinsäuren wurde photometrisch bestimmt. Bei einer Wellenlänge von 260 nm und einer Schichtdicke von 1 cm entspricht ein Absorptionswert von 1,0 einer Konzentration von etwa 50 µg/ml doppelsträngiger DNA und 33 µg/ml einzelsträngiger DNA. Die Reinheit der Nukleinsäuren wurde durch den Quotient aus den optischen Dichten bei den Wellenlängen 260 nm und 280 nm bestimmt. Dieser Quotient sollte für reine DNA bei ca. 1,8 liegen. Alle Messungen erfolgten in einem Nanodrop-ND1000-Spektralphotometer.

#### 4.6.10 Auftrennung und Nachweis von Nukleinsäuren (Southern Blot)

Die mit Restriktionsenzymen verdaute genomische DNA wird in einem 0,8 %-igem Agarosegel aufgetrennt (2,5 h, 90 V). Der Transfer auf eine Nylonmembran (Roti<sup>®</sup>-Nylon plus, Carl Roth) erfolgte durch Kapillar-Blot. Hierbei wird die Transferlösung (20x SSC-Puffer) aus einem Pufferreservoir über Kapillarkräfte durch das Gel hindurch in einen auf dem Gel platzierten Stapel Papierhandtücher gesaugt. Die DNA-Fragmente werden durch den Pufferstrom aus dem Gel eluiert und binden an die darüber liegende, positiv geladene

Nylonmembran. Ein gleichmäßig verteiltes Gewicht auf dem Papierstapel garantiert eine dichte Verbindung zwischen den jeweiligen Lagen des Transfersystems. Vor dem Transfer wurde das Agarosegel 20 min in 0,25 M HCl inkubiert, um einen Teil der Purine abzuspalten. So wird der Transfer großer DNA-Fragmente erleichtert. Anschließend wurde das Gel erst 20 min in DENAT-Lösung, dann weitere 20 min in RENAT-Lösung gewaschen.

### Aufbau des Kapillar-Blots:



Der Kapillar-Blot erfolgte über Nacht. Anschließend wurde die Membran bei Raumtemperatur getrocknet, und die DNA durch Ultraviolettstrahlung (UV-Tisch für 1 min) auf der Membran fixiert.

### Digoxigenin markierte Sonde

Für die Herstellung der Sonde wurden 6,6  $\mu\text{l}$  (DNA Menge max. 1,5  $\mu\text{g}$ ) der amplifizierten flankierenden Bereiche (LB+RB) des zu untersuchenden Gens für 10 min bei 99°C denaturiert. Nach dem Abkühlen auf Eis wurden folgende Komponenten hinzugegeben:

- 1  $\mu\text{l}$  10x Labelling Puffer (Random Primer 6 (NEB, S1230S) in 10x Puffer für Klenow Fragment
- 1  $\mu\text{l}$  10x BSA
- 1  $\mu\text{l}$  10x DIG-dNTP-Mix (1 mM dATP, dCTP, dGTP, 0,65 mM dTTP und 0,35 mM DIG-dUTP)
- 0,5  $\mu\text{l}$  Klenow Fragment (Thermo Scientific)

Diese Reaktion wurde für 1 h oder ü. N. bei 37°C inkubiert und anschließend für den spezifischen Nachweis immobilisierter Nukleinsäuren verwendet.

### Spezifischer Nachweis immobilisierter Nukleinsäuren

Die kationische, verstärkte Nylon-Membran wurde zur Absättigung der unspezifischen Bindungsstellen mit Hybridisierungspuffer für 20 min bei 65°C präinkubiert. Währenddessen wurde die Sonde in 15 ml Southern-Hybridisierungspuffer gegeben und für 5 - 10 min bei 95°C denaturiert. Die Hybridisierung erfolgte bei 65°C ü. N. im Hybridisierungsofen und unterlag stringenten Bedingungen, da nur komplementäre, homologe Sonden eingesetzt wurden. Auf die Hybridisierung folgten mehrere Waschschriffe für jeweils 15 min bei 65°C mit je 20 ml 2x SSPE, 1x SSPE, 0,1x SSPE und für 5 min mit DIG-Waschpuffer bei Raumtemperatur. Nach diesen Waschschriffen wurde für 30 min eine Blockierungsreaktion mit dem DIG2 Puffer durchgeführt, um eine unspezifische Bindung des anti-DIG-Antikörpers an die Membran zu vermeiden. Erst dann wurde die Membran für 1 h mit 10 ml Anti-Digoxigenin-AP Antikörperlösung (1:10000 in DIG2) inkubiert. Die Membran wurde daraufhin zweimal mit je 50 ml DIG-Waschpuffer für 15 min gewaschen und anschließend mit 40 ml DIG3 Puffer für 5 min äquiliibriert. Nach 5 minütiger Inkubation mit 10 ml CDP-Star®-Lösung (1:500 in DIG3, New England Biolabs,) konnte das Fluoreszenzsignal dann mit Hilfe eines Chemilumineszenz-Imaging-Systems (Peqlab) detektiert werden. Die Belichtungszeit betrug zwischen 10 s und 15 min.

#### 20x SSC-Puffer

3 M NaCl  
300 mM Natriumcitrat  
in H<sub>2</sub>O; pH-Wert 7,4

#### Hybridisierungspuffer

50 mM Na-Phosphat-Puffer, pH 7,0  
50 mM PIPES  
100 mM NaCl  
1 mM Na<sub>2</sub>-EDTA  
5% (w/v) SDS  
in H<sub>2</sub>O

#### 20x SSPE-Puffer

3 M NaCl  
227 mM Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> x H<sub>2</sub>O  
20 mM Na<sub>2</sub>-EDTA x 2 H<sub>2</sub>O  
in H<sub>2</sub>O; pH-Wert 7,4

#### DIG1

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

#### DIG2

5% (w/v) Magermilchpulver  
in DIG1 (s.o.)

#### DIG3

0,1 M Maleinsäure  
0,1 M NaCl  
0,05 M MgCl<sub>2</sub>  
in H<sub>2</sub>O; pH-Wert 9,5

#### DIG-Waschpuffer

0,3% (v/v) Tween-20 in DIG 1 (s.o.)

#### 4.6.11 RNA-Isolierung nach der Trizol-Methode

Diese Methode orientiert sich am Protokoll des Herstellers Invitrogen und wurde zur Präparation von Gesamt-RNA aus *U. maydis* Flüssigkulturen oder infizierten Maisblättern verwendet.

- A) Aus *U. maydis* Flüssigkultur: 15 ml der Zellkultur wurden pelletiert (3.500 Upm, 5 min, RT), der Überstand wird verworfen und das Pellet in flüssigem Stickstoff schockgefroren (ggf. Aufbewahrung bei -80°C).
- B) Aus infizierten Maisblättern: Ein Stück des 3. Blattes (ca. 2 cm ober- und unterhalb der Penetrationsstelle) wird abgeschnitten und umgehend in flüssigem Stickstoff schockgefroren (ggf. Aufbewahrung bei -80°C). Das Blattmaterial wird im Mörser mit flüssigem Stickstoff zerkleinert (ggf. Aufbewahrung bei -80°C).

Auf das tiefgefrorene Zellpellet oder das Pflanzenmaterial werden 1 ml Trizol pipetiert und in 2 ml Reaktionsgefäße, in die zuvor ca. 0,3 g Glasperlen vorgelegt wurden, überführt. Dieser Ansatz wird auf dem Vibrax VRX (IKA) geschüttelt (2.000 Upm, 8 min) und anschließend 5 min bei RT inkubiert. Nach Zugabe von 200 µl Chloroform werden die Proben kurz gemischt (Vortex-Schüttler) und für 2 - 3 min bei RT inkubiert. Der klare Überstand nach der Zentrifugation (13.000 Upm, 10 min) wird abgenommen, und in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß mit 500 µl Isopropanol gemischt, 10 min bei RT inkubiert und erneut zentrifugiert (13.000 Upm, 15 min). Der Überstand wird abgenommen und das Pellet mit 750 µl Ethanol (70%) gewaschen (13.000 Upm, 5 min). Das RNA-Pellet wird getrocknet und in 50 - 100 µl H<sub>2</sub>O (RNase frei) bei 55°C für 10 min gelöst. Zur Qualitätskontrolle wurde 1 µl der RNA in einem Agarosegel aufgetrennt (siehe 4.6.4).

### 4.7 Biochemische Methoden

#### 4.7.1 Isolierung von denaturierten Proteinen aus *U. maydis*

Die *U. maydis* Zellen wurden in CM-Flüssigmedium angezogen und 10 ml der Kultur abzentrifugiert (3.500 Upm, 5 min). Das Pellet wurde in Thorner-Puffer aufgenommen (100 µl je 4 OD<sub>600</sub>) und 5 min bei 95°C gekocht. Anschließend wurden 0,3 g Glasperlen hinzugeben und die Proben auf einem Vibrax VRX (IKA) geschüttelt (2.000 Upm, 5 min). Nach erneutem Kochen bei 95°C für 5 min wurden die Zellen abzentrifugiert (13.000 Upm, 1 min) und 5 - 30 µl des Überstands für eine SDS-Gelelektrophorese eingesetzt. Die Lagerung der Proben erfolgte bei -20°C.

**Thorner-Puffer**

8 M	Harnstoff
5% (w/v)	SDS
0.1 mM	Na <sub>2</sub> -EDTA
0.01% (w/v)	Bromphenolblau
50 mM	Dithiothreitol (kurz vor Verwendung)
in 100 mM Tris-HCl, pH 6,8	

**4.7.2 Isolierung von nativen Proteinen aus *U. maydis***

Zur Herstellung von Proteinextrakten wurden 10 ml einer CM-Flüssigkultur abzentrifugiert (3.500 Upm, 5 min, 4°C), das Pellet mit eiskaltem TBS-Puffer gewaschen und erneut zentrifugiert. Anschließend wird das Pellet in 500 µl TBS-Puffer mit 5 µl 10 % Triton X-100 und 5 µl Protease Inhibitor (cOmplete, Roche) aufgenommen und die Suspension in ein 2 ml Reaktionsgefäß, in dem Glasperlen vorgelegt wurden, überführt. Die Proben wurden in Flüssigstickstoff schockgefroren und können bei -80°C gelagert werden. Der Aufschluss der Zellen erfolgt 30 min bei 4°C auf dem Vibrax VRX (IKA). Zuletzt wurden die Proben zentrifugiert (13.000 Upm, 10 min, 4°C) und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die Langzeitlagerung der Proben erfolgt bei -80°C. Nach Bestimmung der Proteinkonzentration am Nanodrop ND-1000 wurden die Proben mit H<sub>2</sub>O und SDS-Probenpuffer auf die gewünschte Konzentration eingestellt und können für eine SDS-Gelelektrophorese verwendet werden.

**TBS-Puffer**

50 mM	Tris/HCl pH 7,5
150 mM	NaCl

**4.7.3 Isolierung von Proteinen aus dem Kulturüberstand nach Lo Presti *et al.*, 2015a**

Die zu untersuchenden Stämme wurden morgens in CM-Flüssigmedium angeimpft und bei 28°C schüttelnd inkubiert. Am Abend wurden die Kulturen so eingestellt, dass die Zelldichte am nächsten Tag eine OD<sub>600</sub> von 0,3 hat. Anschließend wurde die UPR mit 3 mM DTT induziert und die Kulturen weitere 4 h inkubiert.

Die Pelletfraktion wurde durch Zentrifugation (3.500 Upm, 5 min, 4°C) aus 10 ml Kultur gewonnen. Das Pellet wurde im zur Zelldichte entsprechenden Volumen in 1x SDS Probenpuffer aufgenommen, Glasperlen hinzugegeben und auf dem Vibrax VRX (IKA) homogenisiert. Danach wurden die Proben für 10 min bei 95°C gekocht und der Überstand nach Zentrifugation für die SDS-Gelelektrophorese verwendet.

Die Proteine aus dem Kulturüberstand wurden durch Trichloressigsäure (TCA) Präzipitation gewonnen. Hierfür wurden 40 ml Kultur abzentrifugiert (2.500 Upm, 10 min, 4°C), der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und nochmal zentrifugiert. Dieser Überstand (40 ml) wurde mit 10 ml 100%-iger TCA versetzt und bei 4°C geschüttelt. Anschließend wurden die Proben abzentrifugiert (8.500 Upm, 4°C), das Pellet in eiskaltem Aceton resuspendiert und in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt. Das Pellet wurde viermal mit eiskaltem Aceton gewaschen und 5 min bei 95°C getrocknet, Zum Lösen wurde das Pellet in 60 µl SDS-Probenpuffer aufgenommen und weitere 5 min bei 95°C inkubiert.

#### 4.7.4 SDS-Gelelektrophorese von Proteinen

Es wurde die Methode der diskontinuierlichen SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) angewendet (Laemmli, 1970). Dafür wurde eine Mini Protean II Apparatur (Biorad) benutzt. Die Auftrennung erfolgte bei 100 V bis die Auftragspufferbande das Ende des Trenngels erreicht hatte. Zur Detektion der Proteinbanden wurden die Gele nach der Auftrennung für 30 min in Coomassie-Färbelösung gefärbt, 1 min fixiert (Fixierer) und anschließend in Entfärbe-Lösung entfärbt, bis die Banden gut sichtbar waren.

Als Größenstandard für die Proteingele wurde ein PageRuler Prestained Protein Ladder (10 - 170 kDa) von Thermo Scientific verwendet.

##### Sammelgel

125 mM	Tris-Cl, pH 6,8
4 % (w/v)	Acrylamid-Mix
0,1 % (w/v)	SDS
0,05 % (w/v)	Ammoniumpersulfat
0,1 % (v/v)	TEMED

##### Trenngel

375 mM	Tris-Cl, pH 8,8
8-12 %	Acrylamid-Mix
0,1 % (w/v)	SDS
0,05 % (w/v)	Ammoniumpersulfat
0,1 % (v/v)	TEMED

##### Ladepuffer

62,5 mM	Tris, pH 6,8
2%	Glycerin
10%	β-Mercaptoethanol
5%	Bromphenolblau
0,001%	SDS

##### Proteingel-Laufpuffer

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

##### Fixierer

40 % (v/v)	Ethanol
10 % (v/v)	Essigsäure
in H <sub>2</sub> O	

##### Entfärbe-Lösung

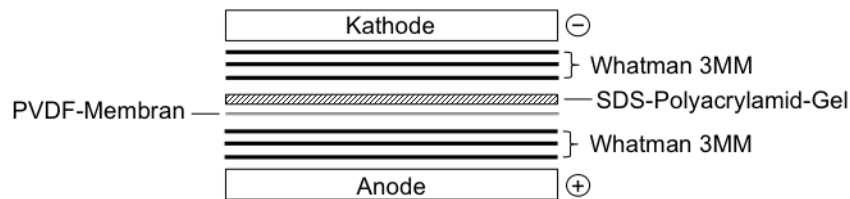
20 % (v/v)	Ethanol
10 % (v/v)	Essigsäure
in H <sub>2</sub> O	

##### Coomassie-Färbelösung

0,1 % (w/v)	SERVA Blau R (SERVA)
45 % (v/v)	Ethanol
10 % (v/v)	Essigsäure
in H <sub>2</sub> O	

#### 4.7.5 Transfer und Nachweis von Proteinen (Western-Blot)

Zum Transfer der Proteine aus SDS-Polyacrylamid-Gelen auf eine PVDF-Membran (Amersham Hybond P 0,45 PVDF, GE Healthcare) wurde ein Semi-Dry Elektroblogger (PeqLab) verwendet. Die Membran wurde in Methanol 1 min aktiviert und anschließend wie auch das SDS-Polyacrylamid-Gel in Western Transferpuffer äquilibriert. Der Blot wurde wie folgt aufgebaut:



Der Blot der Proteine wurde für 2 h bei 75 mA pro SDS-Gel durchgeführt. Anschließend wurde die Membran für 30 min in Blockierlösung geschüttelt, um unspezifische Bindungen des Antikörpers zu verhindern. Die Inkubation des primären Antikörpers erfolgte über Nacht bei 4°C. Am nächsten Tag wurde die Membran dreimal 10 min mit TBST gewaschen und mit dem sekundären Antikörper 1-2 h bei RT inkubiert. Im Anschluss wurde die Membran dreimal für 10 min mit TBST, und zuletzt einmal für 5 min mit TBS, gewaschen. Zur Entwicklung wurde die Membran mit 1 ml Luminata™ Crescendo Western HRP Substrate (Millipore) inkubiert. Die Signale wurden mit einem Chemilumineszenz-Imaging-System (PeqLab) detektiert und mit ImageJ ausgewertet.

##### TBST

0,1 % (v/v) Tween 20 in TBS

##### Western Transferpuffer

192 mM Glycin

15% (v/v) Methanol

in 25 mM Tris-HCl, pH 10,4

##### Blockierlösung

5% (w/v) Magermilchpulver  
in TBST

##### Antikörperlösung

3% (w/v) Magermilchpulver

in TBST mit entsprechender Verdünnung des  
Antikörpers

#### 4.7.6 Quantitative Chromatin Immunpräzipitation (qChIP) nach Heimel *et al.*, 2010b

50 ml einer *U. maydis* CM-Flüssigkultur (in dieser Arbeit: SG200 *cib1:3xHA*) wurden bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,6 - 0,8 bei 28°C geschüttelt und mit 3 mM DTT (Endkonzentration) versetzt, um die UPR zu induzieren. Nach 3 h wurden die Zellen mit Formaldehyd (Endkonzentration: 1%) für 15 min bei RT fixiert und die Reaktion durch die Zugabe von

2,5 M Glycin (Endkonzentration: 125 mM) gestoppt. Die Zellen wurden abzentrifugiert (3.500 Upm, 5 min, 4°C), dreimal mit TBS (Zusammensetzung siehe 4.7.2) gewaschen und in 1,5 ml FA-Lysis Puffer resuspendiert. Die Zellsuspension wird in flüssigem Stickstoff schockgefroren und in einer Zelmühle (Retsch MM200, 25 Hz, 5 min) aufgeschlossen. Das Zelllysate wird bei 4°C zentrifugiert (14.000 Upm, 15 min) und das Pellet in 1 ml FA-Lysis Puffer aufgenommen. Das isolierte Chromatin wird in einem Covaris S200 auf eine DNA Fragmentgröße von 300 - 500 bp fragmentiert. Nach Zentrifugation (14.000 Upm, 15 min, 4°C) wird der Überstand (Chromatin-Lösung) in ein neues Reaktionsgefäß überführt und kann bei -20°C gelagert werden.

Für die Immunopräzipitation werden 400 µl Chromatin-Lösung und 30 µl monoklonale Anti-HA-Agarose (clone HA-7, Sigma-Aldrich) über Nacht bei 4°C auf einem Drehrad inkubiert. 30 µl der Chromatin-Lösung wurde zuvor als Input-Kontrolle abgenommen. Anschließend wurden die Agarosekügelchen zweimal mit 500 µl FA-Lysis Puffer, zweimal mit 500 µl FA-Lysis (high salt) Puffer, zweimal mit 500 µl ChIP-Waschpuffer und einmal mit 500 µl TE (Tris-EDTA pH 7,5) gewaschen. Der Protein-DNA Komplex wurde zweimal eluiert: einmal mit 100 µl ChIP-Elutionspuffer für 15 min bei 65°C und einmal mit 150 µl TE 0.67% SDS für 10 min bei 65°C. Die eluierten Proben wurden über Nacht bei 65°C inkubiert, um die Vernetzung aufzuheben. Danach wurde RNase A (0,8 mg/ml) hinzugegeben und die Proben für 30 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde eine Proteinase K (0,6 mg/ml) Behandlung für 2 h bei 37°C durchgeführt. Die DNA wurde mit Hilfe eines kommerziell erhältlichen Kits (PCR Purification Kit, Qiagen) isoliert und die so gewonnene DNA mittels qPCR (BioRAD CFX connect PCR cycler) analysiert. Hierzu wurden 1 µl der CHIP-Probe bzw. 1 µl einer 1/100 Verdünnung der Input-Probe eingesetzt. Die Normalisierung erfolgte durch die Input-Kontrolle und die relative Anreicherung wurde, wie in <https://www.thermofisher.com/de/de/home/life-science/epigenetics-noncoding-rnaresearch/chromatin-remodeling/chromatin-immunoprecipitation-chip/chip-analysis.html> beschrieben, berechnet.

#### FA-Lysis Puffer

50 mM	HEPES-KOH pH 7,5
150 mM	NaCl
1 mM	EDTA
1%	Triton-X-100
0,1% (w/v)	Natriumdesoxycholat
0,10%	SDS
in H <sub>2</sub> O	

#### FA-Lysis (high salt) Puffer

50 mM	HEPES-KOH; pH 7,5
500 mM	NaCl

1 mM	EDTA
1%	Triton-X-100
0,1% (w/v)	Natriumdesoxycholat
0,10%	SDS
in H <sub>2</sub> O und vor der Verwendung Protease Inhibitor (cOmplete, Roche) hinzugeben	

#### TE

10 mM	Tris-Base
1 mM	EDTA
in H <sub>2</sub> O lösen und mit HCl auf pH 7,5 einstellen	



**ChIP-Waschpuffer**

10 mM	Tris-Cl, pH 7,5
250 mM	LiCl
1 mM	EDTA
0,5 %	Nonidet P40
0,5 %	Natriumdesoxycholat
in H <sub>2</sub> O	

**1 M HEPES-KOH pH 7,5**

1 M	HEPES
in H <sub>2</sub> O lösen und mit KOH auf pH 7,5 einstellen	

**ChIP-Elutionspuffer**

50mM	Tris-Cl, pH 7,5
1 mM	EDTA
1%	SDS
in H <sub>2</sub> O	

## 4.8 Bioinformatik und Sequenzanalyse

### 4.8.1 Sequenzierung von DNA

Die Sequenzierung von DNA erfolgte durch das Unternehmen GATC Biotech AG in Konstanz.

### 4.8.2 Sequenz- und Strukturanalyse

Folgende Programme wurden verwendet:

**ApE** von M. Wayne Davis zur Sequenzanalyse, virtuellen Klonierung und Bearbeitung von Plasmid- und genomischen Sequenzen, Primerdesign, Alignments von DNA und Proteinen.  
**mfold** (Zuker, 2003) (<http://www.bioinfo.rpi.edu/applications/mfold/>) zur Bestimmung von Sekundärstrukturen in qPCR-Amplifikaten und mRNAs.

**UniProt** (Universal Protein Resource) (<http://www.uniprot.org>) ist eine Datenbank von Proteinsequenzen der unterschiedlichsten Organismen.

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

**BLAST** (Altschul *et al.*, 1990; States und Gish, 1994; Altschul *et al.*, 1997) zur Identifikation ähnlicher Proteine oder DNA-Sequenzen in den öffentlichen Datenbanken.

### 4.8.3 *In silico* Vorhersage von UPREs (unfolded protein response elements)

Hierzu wurde eine UPRE1 und UPRE2 Position-Gewicht-Matrix (PWM) gemäß der Verteilungsmatrix aus Fordyce *et al.*, 2012 erstellt. Das UPRE-Motiv im Promotor der Gene wurde als positiv gewertet, wenn der PWM-Score größer als 85% ist. Die Promotorbereiche wurden als 1 kb Region stromauf des vorhergesagten Translationsstarts definiert und als Grundlage diente die MIPS *Ustilago maydis* Data Base (MUMDB; [mips.helmholtz-muenchen.de/genre/proj/ustilago](http://mips.helmholtz-muenchen.de/genre/proj/ustilago)). Zur weiteren Auswertung wurden die identifizierten Kandidaten mit einer Microarray-Analyse (K. Heimel, pers. Mitteilung) und einer Liste von Genen mit vorhergesagten sekretierten und nicht enzymatischen Funktion (Mueller *et al.*, 2008) bioinformatisch verglichen.

## 5 Literatur

- Acosta-Alvear, D., Zhou, Y., Blais, A., Tsikitis, M., Lents, N.H., Arias, C., Lennon, C.J., Kluger, Y., und Dynlacht, B.D.** (2007). XBP1 controls diverse cell type- and condition-specific transcriptional regulatory networks. *Mol Cell* **27**, 53-66.
- Aichinger, C., Hansson, K., Eichhorn, H., Lessing, F., Mannhaupt, G., Mewes, W., und Kahmann, R.** (2003). Identification of plant-regulated genes in *Ustilago maydis* by enhancer-trapping mutagenesis. *Mol Genet Genomics* **270**, 303-314.
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., und Lipman, D.J.** (1990). Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* **215**, 403-410.
- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schäffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., und Lipman, D.J.** (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* **25**, 3389-3402.
- Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidmann, J.G., und Smith, J.A.** (1987). *Current protocols in molecular biology*.
- Banks, G.R., Shelton, P.A., Kanuga, N., Holden, D.W., und Spanos, A.** (1993). The *Ustilago maydis nar1* gene encoding nitrate reductase activity: sequence and transcriptional regulation. *Gene* **131**, 69-78.
- Banuett, F.** (1992). *Ustilago maydis*, the delightful blight. *Trends Genet* **8**, 174-180.
- Banuett, F.** (1995). Genetics of *Ustilago maydis*, a fungal pathogen that induces tumors in maize. *Annu Rev Genet* **29**, 179-208.
- Banuett, F., und Herskowitz, I.** (1989). Different *a* alleles of *Ustilago maydis* are necessary for maintenance of filamentous growth but not for meiosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**, 5878-5882.
- Banuett, F., und Herskowitz, I.** (1994). Morphological Transitions in the Life Cycle of *Ustilago maydis* and Their Genetic Control by the *a* and *b* Loci. *Experimental Mycology* **18**, 247-266.
- Banuett, F., und Herskowitz, I.** (1996). Discrete developmental stages during teliospore formation in the corn smut fungus, *Ustilago maydis*. *Development* **122**, 2965-2976.
- Basse, C.W., Stumpferl, S., und Kahmann, R.** (2000). Characterization of a *Ustilago maydis* gene specifically induced during the biotrophic phase: evidence for negative as well as positive regulation. *Mol Cell Biol* **20**, 329-339.
- Basse, C.W., Kolb, S., und Kahmann, R.** (2002). A maize-specifically expressed gene cluster in *Ustilago maydis*. *Mol Microbiol* **43**, 75-93.
- Baumann, S., Zander, S., Weidtkamp-Peters, S., und Feldbrügge, M.** (2016). Live cell imaging of septin dynamics in *Ustilago maydis*. *Methods Cell Biol* **136**, 143-159.
- Bernard, P., und Couturier, M.** (1992). Cell killing by the F plasmid CcdB protein involves poisoning of DNA-topoisomerase II complexes. *J Mol Biol* **226**, 735-745.
- Bertolotti, A., Zhang, Y., Hendershot, L.M., Harding, H.P., und Ron, D.** (2000). Dynamic interaction of BiP and ER stress transducers in the unfolded-protein response. *Nat Cell Biol* **2**, 326-332.

- Bielska, E., Higuchi, Y., Schuster, M., Steinberg, N., Kilaru, S., Talbot, N.J., und Steinberg, G.** (2014). Long-distance endosome trafficking drives fungal effector production during plant infection. *Nat Commun* **5**, 5097.
- Böhmer, C., Ripp, C., und Bölker, M.** (2009). The germinal centre kinase Don3 triggers the dynamic rearrangement of higher-order septin structures during cytokinesis in *Ustilago maydis*. *Mol Microbiol* **74**, 1484-1496.
- Bölker, M., Urban, M., und Kahmann, R.** (1992). The *a* mating type locus of *U. maydis* specifies cell signaling components. *Cell* **68**, 441-450.
- Bölker, M., Genin, S., Lehmler, C., und Kahmann, R.** (1995a). Genetic regulation of mating and dimorphism in *Ustilago maydis*. *Canadian Journal of Botany* **73**, 320-325.
- Bölker, M., Böhnert, H.U., Braun, K.H., Görl, J., und Kahmann, R.** (1995b). Tagging pathogenicity genes in *Ustilago maydis* by restriction enzyme-mediated integration (REMI). *Mol Gen Genet* **248**, 547-552.
- Borgese, N., Francolini, M., und Snapp, E.** (2006). Endoplasmic reticulum architecture: structures in flux. *Curr Opin Cell Biol* **18**, 358-364.
- Bottin, A., Kämper, J., und Kahmann, R.** (1996). Isolation of a carbon source-regulated gene from *Ustilago maydis*. *Mol Gen Genet* **253**, 342-352.
- Brachmann, A.** (2001b). Die frühe Infektionsphase von *Ustilago maydis*: Genregulation durch das bW/bE-Heterodimer.
- Brachmann, A., Weinzierl, G., Kämper, J., und Kahmann, R.** (2001a). Identification of genes in the bW/bE regulatory cascade in *Ustilago maydis*. *Mol Microbiol* **42**, 1047-1063.
- Brachmann, A., Schirawski, J., Müller, P., und Kahmann, R.** (2003). An unusual MAP kinase is required for efficient penetration of the plant surface by *Ustilago maydis*. *EMBO J* **22**, 2199-2210.
- Brachmann, A., König, J., Julius, C., und Feldbrügge, M.** (2004). A reverse genetic approach for generating gene replacement mutants in *Ustilago maydis*. *Mol Genet Genomics* **272**, 216-226.
- Brefort, T., Doehlemann, G., Mendoza-Mendoza, A., Reissmann, S., Djamei, A., und Kahmann, R.** (2009). *Ustilago maydis* as a Pathogen. *Annu Rev Phytopathol* **47**, 423-445.
- Brefort, T., Tanaka, S., Neidig, N., Doehlemann, G., Vincon, V., und Kahmann, R.** (2014). Characterization of the largest effector gene cluster of *Ustilago maydis*. *PLoS Pathog* **10**, e1003866.
- Broomfield, P.L., und Hargreaves, J.A.** (1992). A single amino-acid change in the iron-sulphur protein subunit of succinate dehydrogenase confers resistance to carboxin in *Ustilago maydis*. *Curr Genet* **22**, 117-121.
- Buchberger, A., Bukau, B., und Sommer, T.** (2010). Protein quality control in the cytosol and the endoplasmic reticulum: brothers in arms. *Mol Cell* **40**, 238-252.
- Byrd, A.E., und Brewer, J.W.** (2012). Intricately Regulated: A Cellular Toolbox for Fine-Tuning XBP1 Expression and Activity. *Cells* **1**, 738-753.

- Calfon, M., Zeng, H., Urano, F., Till, J.H., Hubbard, S.R., Harding, H.P., Clark, S.G., and Ron, D.** (2002). IRE1 couples endoplasmic reticulum load to secretory capacity by processing the *XBP-1* mRNA. *Nature* **415**, 92-96.
- Carla Fama, M., Raden, D., Zacchi, N., Lemos, D.R., Robinson, A.S., und Silberstein, S.** (2007). The *Saccharomyces cerevisiae* YFR041C/ERJ5 gene encoding a type I membrane protein with a J domain is required to preserve the folding capacity of the endoplasmic reticulum. *Biochim Biophys Acta* **1773**, 232-242.
- Casadaban, M.J., und Cohen, S.N.** (1980). Analysis of gene control signals by DNA fusion and cloning in *Escherichia coli*. *J Mol Biol* **138**, 179-207.
- Casso, D.J., Liu, S., Biehs, B., und Kornberg, T.B.** (2012). Expression and characterization of *Drosophila signal peptide peptidase-like (sppL)*, a gene that encodes an intramembrane protease. *PLoS One* **7**, e33827.
- Castanheira, S., und Perez-Martin, J.** (2015). Appressorium formation in the corn smut fungus *Ustilago maydis* requires a G2 cell cycle arrest. *Plant Signal Behav* **10**, e1001227.
- Chen, H., und Qi, L.** (2010). SUMO modification regulates the transcriptional activity of XBP1. *Biochem J* **429**, 95-102.
- Cheon, S.A., Jung, K.W., Chen, Y.L., Heitman, J., Bahn, Y.S., und Kang, H.A.** (2011). Unique evolution of the UPR pathway with a novel bZIP transcription factor, Hxl1, for controlling pathogenicity of *Cryptococcus neoformans*. *PLoS Pathog* **7**, e1002177.
- Christensen, J.J.** (1963). Corn smut induced by *Ustilago maydis*. *Amer Phytopathol Soc Monogr* **2**.
- Chujo, T., und Scott, B.** (2014). Histone H3K9 and H3K27 methylation regulates fungal alkaloid biosynthesis in a fungal endophyte-plant symbiosis. *Mol Microbiol* **92**, 413-434.
- Colot, H.V., Park, G., Turner, G.E., Ringelberg, C., Crew, C.M., Litvinkova, L., Weiss, R.L., Borkovich, K.A., und Dunlap, J.C.** (2006). A high-throughput gene knockout procedure for *Neurospora* reveals functions for multiple transcription factors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 10352-10357.
- Cox, J.S., und Walter, P.** (1996). A novel mechanism for regulating activity of a transcription factor that controls the unfolded protein response. *Cell* **87**, 391-404.
- Cox, J.S., Shamu, C.E., und Walter, P.** (1993). Transcriptional induction of genes encoding endoplasmic reticulum resident proteins requires a transmembrane protein kinase. *Cell* **73**, 1197-1206.
- Cox, J.S., Chapman, R.E., und Walter, P.** (1997). The unfolded protein response coordinates the production of endoplasmic reticulum protein and endoplasmic reticulum membrane. *Mol Biol Cell* **8**, 1805-1814.
- Craven, R.A., Egerton, M., und Stirling, C.J.** (1996). A novel Hsp70 of the yeast ER lumen is required for the efficient translocation of a number of protein precursors. *EMBO J* **15**, 2640-2650.

- Credle, J.J., Finer-Moore, J.S., Papa, F.R., Stroud, R.M., und Walter, P.** (2005). On the mechanism of sensing unfolded protein in the endoplasmic reticulum. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 18773-18784.
- Day, P.R., Anagnostakis, S.L., und Puhalla, J.E.** (1971). Pathogenicity resulting from mutation at the *b* locus of *Ustilago maydis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **68**, 533-535.
- de Jonge, R., Bolton, M.D., und Thomma, B.P.** (2011). How filamentous pathogens co-opt plants: the ins and outs of fungal effectors. *Curr Opin Plant Biol* **14**, 400-406.
- Dean, R., Van Kan, J.A., Pretorius, Z.A., Hammond-Kosack, K.E., Di Pietro, A., Spanu, P.D., Rudd, J.J., Dickman, M., Kahmann, R., Ellis, J., und Foster, G.D.** (2012). The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Mol Plant Pathol* **13**, 414-430.
- Deising, H.B., Werner, S., und Wernitz, M.** (2000). The role of fungal appressoria in plant infection. *Microbes Infect* **2**, 1631-1641.
- Djamei, A., Schipper, K., Rabe, F., Ghosh, A., Vincon, V., Kahnt, J., Osorio, S., Tohge, T., Fernie, A.R., Feussner, I., Feussner, K., Meinicke, P., Stierhof, Y.D., Schwarz, H., Macek, B., Mann, M., und Kahmann, R.** (2011). Metabolic priming by a secreted fungal effector. *Nature* **478**, 395-398.
- Doebley, J.** (1992). Mapping the genes that made maize. *Trends Genet* **8**, 302-307.
- Doehlemann, G., Reissmann, S., Assmann, D., Fleckenstein, M., und Kahmann, R.** (2011). Two linked genes encoding a secreted effector and a membrane protein are essential for *Ustilago maydis*-induced tumour formation. *Mol Microbiol* **81**, 751-766.
- Doehlemann, G., van der Linde, K., Assmann, D., Schwammbach, D., Hof, A., Mohanty, A., Jackson, D., und Kahmann, R.** (2009). Pep1, a secreted effector protein of *Ustilago maydis*, is required for successful invasion of plant cells. *PLoS Pathog* **5**, e1000290.
- Durfee, T., Nelson, R., Baldwin, S., Plunkett, G., 3rd, Burland, V., Mau, B., Petrosino, J.F., Qin, X., Muzny, D.M., Ayele, M., Gibbs, R.A., Csorgo, B., Posfai, G., Weinstock, G.M., und Blattner, F.R.** (2008). The complete genome sequence of *Escherichia coli* DH10B: insights into the biology of a laboratory workhorse. *J Bacteriol* **190**, 2597-2606.
- Ellenberger, T., Fass, D., Arnaud, M., und Harrison, S.C.** (1994). Crystal structure of transcription factor E47: E-box recognition by a basic region helix-loop-helix dimer. *Genes Dev* **8**, 970-980.
- Ellgaard, L., und Helenius, A.** (2003). Quality control in the endoplasmic reticulum. *Nat Rev Mol Cell Biol* **4**, 181-191.
- Farid, A., Malinovsky, F.G., Veit, C., Schoberer, J., Zipfel, C., und Strasser, R.** (2013). Specialized roles of the conserved subunit OST3/6 of the oligosaccharyltransferase complex in innate immunity and tolerance to abiotic stresses. *Plant Physiol* **162**, 24-38.
- Fassio, A., und Sitia, R.** (2002). Formation, isomerisation and reduction of disulphide bonds during protein quality control in the endoplasmic reticulum. *Histochem Cell Biol* **117**, 151-157.

- Feng, X., Krishnan, K., Richie, D.L., Amanianda, V., Hartl, L., Grahl, N., Powers-Fletcher, M.V., Zhang, M., Fuller, K.K., Nierman, W.C., Lu, L.J., Latge, J.P., Woollett, L., Newman, S.L., Cramer, R.A., Jr., Rhodes, J.C., und Askew, D.S.** (2011). HacA-independent functions of the ER stress sensor IreA synergize with the canonical UPR to influence virulence traits in *Aspergillus fumigatus*. *PLoS Pathog* **7**, e1002330.
- Flor-Parra, I., Vranes, M., Kämper, J., und Perez-Martin, J.** (2006). Biz1, a zinc finger protein required for plant invasion by *Ustilago maydis*, regulates the levels of a mitotic cyclin. *Plant Cell* **18**, 2369-2387.
- Fordyce, P.M., Pincus, D., Kimmig, P., Nelson, C.S., El-Samad, H., Walter, P., und DeRisi, J.L.** (2012). Basic leucine zipper transcription factor Hac1 binds DNA in two distinct modes as revealed by microfluidic analyses. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**, E3084-3093.
- Garcia-Muse, T., Steinberg, G., und Perez-Martin, J.** (2003). Pheromone-induced G2 arrest in the phytopathogenic fungus *Ustilago maydis*. *Eukaryot Cell* **2**, 494-500.
- Gardner, B.M., und Walter, P.** (2011). Unfolded proteins are Ire1-activating ligands that directly induce the unfolded protein response. *Science* **333**, 1891-1894.
- Gillissen, B., Bergemann, J., Sandmann, C., Schroeer, B., Bölker, M., und Kahmann, R.** (1992). A two-component regulatory system for self/non-self recognition in *Ustilago maydis*. *Cell* **68**, 647-657.
- Giraldo, M.C., und Valent, B.** (2013). Filamentous plant pathogen effectors in action. *Nat Rev Microbiol* **11**, 800-814.
- Göhre, V., Vollmeister, E., Bölker, M., und Feldbrügge, M.** (2012). Microtubule-dependent membrane dynamics in *Ustilago maydis*: Trafficking and function of Rab5a-positive endosomes. *Commun Integr Biol* **5**, 485-490.
- Gonzalez, T.N., Sidrauski, C., Dörfler, S., und Walter, P.** (1999). Mechanism of non-spliceosomal mRNA splicing in the unfolded protein response pathway. *EMBO J* **18**, 3119-3132.
- Hanahan, D., Jessee, J., und Bloom, F.R.** (1991). Plasmid transformation of *Escherichia coli* and other bacteria. *Methods Enzymol* **204**, 63-113.
- Harbut, M.B., Patel, B.A., Yeung, B.K., McNamara, C.W., Bright, A.T., Ballard, J., Supek, F., Golde, T.E., Winzeler, E.A., Diagana, T.T., und Greenbaum, D.C.** (2012). Targeting the ERAD pathway via inhibition of signal peptide peptidase for antiparasitic therapeutic design. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**, 21486-21491.
- Harding, H.P., Zhang, Y., und Ron, D.** (1999). Protein translation and folding are coupled by an endoplasmic-reticulum-resident kinase. *Nature* **397**, 271-274.
- Harding, H.P., Zhang, Y., Zeng, H., Novoa, I., Lu, P.D., Calton, M., Sadri, N., Yun, C., Popko, B., Paules, R., Stojdl, D.F., Bell, J.C., Hettmann, T., Leiden, J.M., und Ron, D.** (2003). An integrated stress response regulates amino acid metabolism and resistance to oxidative stress. *Mol Cell* **11**, 619-633.
- Hartmann, H.A., Kahmann, R., und Bölker, M.** (1996). The pheromone response factor coordinates filamentous growth and pathogenicity in *Ustilago maydis*. *EMBO J* **15**, 1632-1641.

- Haze, K., Yoshida, H., Yanagi, H., Yura, T., und Mori, K.** (1999). Mammalian transcription factor ATF6 is synthesized as a transmembrane protein and activated by proteolysis in response to endoplasmic reticulum stress. *Mol Biol Cell* **10**, 3787-3799.
- Heimel, K.** (2015). Unfolded protein response in filamentous fungi-implications in biotechnology. *Appl Microbiol Biotechnol* **99**, 121-132.
- Heimel, K., Scherer, M., Schuler, D., und Kämper, J.** (2010a). The *Ustilago maydis* Clp1 protein orchestrates pheromone and b-dependent signaling pathways to coordinate the cell cycle and pathogenic development. *Plant Cell* **22**, 2908-2922.
- Heimel, K., Freitag, J., Hampel, M., Ast, J., Bölder, M., und Kämper, J.** (2013). Crosstalk between the unfolded protein response and pathways that regulate pathogenic development in *Ustilago maydis*. *Plant Cell* **25**, 4262-4277.
- Heimel, K., Scherer, M., Vranes, M., Wahl, R., Pothiratana, C., Schuler, D., Vincon, V., Finkernagel, F., Flor-Parra, I., und Kämper, J.** (2010b). The transcription factor Rbf1 is the master regulator for b-mating type controlled pathogenic development in *Ustilago maydis*. *PLoS Pathog* **6**, e1001035.
- Hemetsberger, C., Herrberger, C., Zechmann, B., Hillmer, M., und Doehlemann, G.** (2012). The *Ustilago maydis* effector Pep1 suppresses plant immunity by inhibition of host peroxidase activity. *PLoS Pathog* **8**, e1002684.
- Herzog, B., Popova, B., Jakobshagen, A., Shahpasandzadeh, H., und Braus, G.H.** (2013). Mutual cross talk between the regulators Hac1 of the unfolded protein response and Gcn4 of the general amino acid control of *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot Cell* **12**, 1142-1154.
- Hetz, C.** (2012). The unfolded protein response: controlling cell fate decisions under ER stress and beyond. *Nat Rev Mol Cell Biol* **13**, 89-102.
- Holliday, R.** (1964). The Induction of Mitotic Recombination by Mitomycin C in *Ustilago* and *Saccharomyces*. *Genetics* **50**, 323-335.
- Holliday, R.** (1974). *Ustilago maydis*. R.C. King (Ed.), *Handbook of Genetics*, Vol. 1, Plenum Publishing, New York, 575–595.
- Holliday, R.** (2004). Early studies on recombination and DNA repair in *Ustilago maydis*. *DNA Repair (Amst)* **3**, 671-682.
- Hooks, K.B., und Griffiths-Jones, S.** (2011). Conserved RNA structures in the non-canonical Hac1/Xbp1 intron. *RNA Biol* **8**, 552-556.
- Hurst, H.C.** (1995). Transcription factors 1: bZIP proteins. *Protein Profile* **2**, 101-168.
- Hurtley, S.M., Bole, D.G., Hoover-Litty, H., Helenius, A., und Copeland, C.S.** (1989). Interactions of misfolded influenza virus hemagglutinin with binding protein (BiP). *J Cell Biol* **108**, 2117-2126.
- Innis, M.A.** (1990). *PCR protocols: a guide to methods and applications*. (Academic Press).
- Ito, H., Fukuda, Y., Murata, K., und Kimura, A.** (1983). Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. *J Bacteriol* **153**, 163-168.

- Iwakoshi, N.N., Lee, A.H., und Glimcher, L.H. (2003a). The X-box binding protein-1 transcription factor is required for plasma cell differentiation and the unfolded protein response. *Immunol Rev* **194**, 29-38.
- Iwakoshi, N.N., Lee, A.H., Vallabhajosyula, P., Otipoby, K.L., Rajewsky, K., und Glimcher, L.H. (2003b). Plasma cell differentiation and the unfolded protein response intersect at the transcription factor XBP-1. *Nat Immunol* **4**, 321-329.
- Joubert, A., Simoneau, P., Campion, C., Bataille-Simoneau, N., Iacomi-Vasilescu, B., Poupard, P., Francois, J.M., Georgeault, S., Sellier, E., und Guillemette, T. (2011). Impact of the unfolded protein response on the pathogenicity of the necrotrophic fungus *Alternaria brassicicola*. *Mol Microbiol* **79**, 1305-1324.
- Kaffarnik, F., Müller, P., Leibundgut, M., Kahmann, R., und Feldbrügge, M. (2003). PKA and MAPK phosphorylation of Prf1 allows promoter discrimination in *Ustilago maydis*. *EMBO J* **22**, 5817-5826.
- Kahmann, R., und Kämper, J. (2004). *Ustilago maydis*: how its biology relates to pathogenic development. *New phytologist* **164**, 31-42.
- Kämper, J. (2004). A PCR-based system for highly efficient generation of gene replacement mutants in *Ustilago maydis*. *Mol Genet Genomics* **271**, 103-110.
- Kämper, J., Reichmann, M., Romeis, T., Bölker, M., und Kahmann, R. (1995). Multiallelic recognition: nonself-dependent dimerization of the bE and bW homeodomain proteins in *Ustilago maydis*. *Cell* **81**, 73-83.
- Kämper, J., Kahmann, R., Bölker, M., Ma, L.J., Brefort, T., Saville, B.J., Banuett, F., Kronstad, J.W., Gold, S.E., Müller, O., Perlin, M.H., Wösten, H.A., de Vries, R., Ruiz-Herrera, J., Reynaga-Pena, C.G., Snetselaar, K., McCann, M., Perez-Martin, J., Feldbrügge, M., Basse, C.W., Steinberg, G., Ibeas, J.I., Holloman, W., Guzman, P., Farman, M., Stajich, J.E., Sentandreu, R., Gonzalez-Prieto, J.M., Kennell, J.C., Molina, L., Schirawski, J., Mendoza-Mendoza, A., Greilinger, D., Münch, K., Rössel, N., Scherer, M., Vranes, M., Ladendorf, O., Vincon, V., Fuchs, U., Sandroock, B., Meng, S., Ho, E.C., Cahill, M.J., Boyce, K.J., Klose, J., Klosterman, S.J., Deelstra, H.J., Ortiz-Castellanos, L., Li, W., Sanchez-Alonso, P., Schreier, P.H., Häuser-Hahn, I., Vaupel, M., Koopmann, E., Friedrich, G., Voss, H., Schluter, T., Margolis, J., Platt, D., Swimmer, C., Gnrirke, A., Chen, F., Vysotskaia, V., Mannhaupt, G., Güldener, U., Münsterkötter, M., Haase, D., Oesterheld, M., Mewes, H.W., Mauceli, E.W., DeCaprio, D., Wade, C.M., Butler, J., Young, S., Jaffe, D.B., Calvo, S., Nusbaum, C., Galagan, J., und Birren, B.W. (2006). Insights from the genome of the biotrophic fungal plant pathogen *Ustilago maydis*. *Nature* **444**, 97-101.
- Karaoglu, D., Kelleher, D.J., und Gilmore, R. (1995). Functional characterization of Ost3p. Loss of the 34-kD subunit of the *Saccharomyces cerevisiae* oligosaccharyltransferase results in biased underglycosylation of acceptor substrates. *J Cell Biol* **130**, 567-577.
- Keon, J.P., White, G.A., und Hargreaves, J.A. (1991). Isolation, characterization and sequence of a gene conferring resistance to the systemic fungicide carboxin from the maize smut pathogen, *Ustilago maydis*. *Curr Genet* **19**, 475-481.
- Khrunyk, Y., Münch, K., Schipper, K., Lupas, A.N., und Kahmann, R. (2010). The use of FLP-mediated recombination for the functional analysis of an effector gene family in the biotrophic smut fungus *Ustilago maydis*. *New Phytol* **187**, 957-968.



- Kimata, Y., Ishiwata-Kimata, Y., Yamada, S., und Kohno, K.** (2006). Yeast unfolded protein response pathway regulates expression of genes for anti-oxidative stress and for cell surface proteins. *Genes Cells* **11**, 59-69.
- Kimata, Y., Ishiwata-Kimata, Y., Ito, T., Hirata, A., Suzuki, T., Oikawa, D., Takeuchi, M., und Kohno, K.** (2007). Two regulatory steps of ER-stress sensor Ire1 involving its cluster formation and interaction with unfolded proteins. *J Cell Biol* **179**, 75-86.
- Kimmig, P., Diaz, M., Zheng, J., Williams, C.C., Lang, A., Aragon, T., Li, H., und Walter, P.** (2012). The unfolded protein response in fission yeast modulates stability of select mRNAs to maintain protein homeostasis. *Elife* **1**, e00048.
- Kleemann, J., Rincon-Rivera, L.J., Takahara, H., Neumann, U., Ver Loren van Themaat, E., van der Does, H.C., Hacquard, S., Stüber, K., Will, I., Schmalenbach, W., Schmelzer, E., und O'Connell, R.J.** (2012). Sequential delivery of host-induced virulence effectors by appressoria and intracellular hyphae of the phytopathogen *Colletotrichum higginsianum*. *PLoS Pathog* **8**, e1002643.
- Knauer, R., und Lehle, L.** (1994). The N-oligosaccharyltransferase complex from yeast. *FEBS Lett* **344**, 83-86.
- Kokame, K., Kato, H., und Miyata, T.** (2001). Identification of ERSE-II, a new cis-acting element responsible for the ATF6-dependent mammalian unfolded protein response. *J Biol Chem* **276**, 9199-9205.
- Korenykh, A.V., Egea, P.F., Korostelev, A.A., Finer-Moore, J., Zhang, C., Shokat, K.M., Stroud, R.M., und Walter, P.** (2009). The unfolded protein response signals through high-order assembly of Ire1. *Nature* **457**, 687-693.
- Kozutsumi, Y., Segal, M., Normington, K., Gething, M.J., und Sambrook, J.** (1988). The presence of malformed proteins in the endoplasmic reticulum signals the induction of glucose-regulated proteins. *Nature* **332**, 462-464.
- Kratochvilova, K., Moran, L., Padourova, S., Stejskal, S., Tesarova, L., Simara, P., Hampl, A., Koutna, I., und Vanhara, P.** (2016). The role of the endoplasmic reticulum stress in stemness, pluripotency and development. *Eur J Cell Biol* **95**, 115-123.
- Krishnan, K., und Askew, D.S.** (2014). The fungal UPR: a regulatory hub for virulence traits in the mold pathogen *Aspergillus fumigatus*. *Virulence* **5**, 334-340.
- Kronstad, J.W., und Leong, S.A.** (1990). The *b* mating-type locus of *Ustilago maydis* contains variable and constant regions. *Genes Dev* **4**, 1384-1395.
- Laemmli, U.K.** (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Lamb, C., und Dixon, R.A.** (1997). The Oxidative Burst in Plant Disease Resistance. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **48**, 251-275.
- Lanver, D., Berndt, P., Tollot, M., Naik, V., Vranes, M., Warmann, T., Münch, K., Rössel, N., und Kahmann, R.** (2014). Plant surface cues prime *Ustilago maydis* for biotrophic development. *PLoS Pathog* **10**, e1004272.

- Laurie, J.D., Ali, S., Linning, R., Mannhaupt, G., Wong, P., Güldener, U., Münsterkotter, M., Moore, R., Kahmann, R., Bakkeren, G., und Schirawski, J.** (2012). Genome comparison of barley and maize smut fungi reveals targeted loss of RNA silencing components and species-specific presence of transposable elements. *Plant Cell* **24**, 1733-1745.
- Lee, A.H., Iwakoshi, N.N., Anderson, K.C., und Glimcher, L.H.** (2003). Proteasome inhibitors disrupt the unfolded protein response in myeloma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 9946-9951.
- Lee, K., Tirasophon, W., Shen, X., Michalak, M., Prywes, R., Okada, T., Yoshida, H., Mori, K., und Kaufman, R.J.** (2002). IRE1-mediated unconventional mRNA splicing and S2P-mediated ATF6 cleavage merge to regulate XBP1 in signaling the unfolded protein response. *Genes Dev* **16**, 452-466.
- Li, X., Chen, H., Oh, S.S., und Chishti, A.H.** (2008). A Presenilin-like protease associated with *Plasmodium falciparum* micronemes is involved in erythrocyte invasion. *Mol Biochem Parasitol* **158**, 22-31.
- Lo Presti, L., Lopez Diaz, C., Turra, D., Di Pietro, A., Hampel, M., Heimel, K., und Kahmann, R.** (2015a). A conserved co-chaperone is required for virulence in fungal plant pathogens. *New Phytol* **209**, 1135-1148.
- Lo Presti, L., Lanver, D., Schweizer, G., Tanaka, S., Liang, L., Tollot, M., Zuccaro, A., Reissmann, S., und Kahmann, R.** (2015b). Fungal effectors and plant susceptibility. *Annu Rev Plant Biol* **66**, 513-545.
- Ma, Y., Brewer, J.W., Diehl, J.A., und Hendershot, L.M.** (2002). Two distinct stress signaling pathways converge upon the CHOP promoter during the mammalian unfolded protein response. *J Mol Biol* **318**, 1351-1365.
- Mahlert, M., Vogler, C., Stelter, K., Hause, G., und Basse, C.W.** (2009). The a2 mating-type-locus gene *Iga2* of *Ustilago maydis* interferes with mitochondrial dynamics and fusion, partially in dependence on a Dnm1-like fission component. *J Cell Sci* **122**, 2402-2412.
- Martinez, I.M., und Chrispeels, M.J.** (2003). Genomic analysis of the unfolded protein response in *Arabidopsis* shows its connection to important cellular processes. *Plant Cell* **15**, 561-576.
- Mendoza-Mendoza, A., Berndt, P., Djamei, A., Weise, C., Linne, U., Marahiel, M., Vranes, M., Kämper, J., und Kahmann, R.** (2009). Physical-chemical plant-derived signals induce differentiation in *Ustilago maydis*. *Mol Microbiol* **71**, 895-911.
- Miyazaki, T., Nakayama, H., Nagayoshi, Y., Kakeya, H., und Kohno, S.** (2013). Dissection of Ire1 functions reveals stress response mechanisms uniquely evolved in *Candida glabrata*. *PLoS Pathog* **9**, e1003160.
- Molinari, M., Eriksson, K.K., Calanca, V., Galli, C., Cresswell, P., Michalak, M., und Helenius, A.** (2004). Contrasting functions of calreticulin and calnexin in glycoprotein folding and ER quality control. *Mol Cell* **13**, 125-135.
- Mori, K.** (2009). Signalling pathways in the unfolded protein response: development from yeast to mammals. *J Biochem* **146**, 743-750.

- Mori, K., Kawahara, T., Yoshida, H., Yanagi, H., und Yura, T.** (1996). Signalling from endoplasmic reticulum to nucleus: transcription factor with a basic-leucine zipper motif is required for the unfolded protein-response pathway. *Genes Cells* **1**, 803-817.
- Mori, K., Ogawa, N., Kawahara, T., Yanagi, H., und Yura, T.** (1998). Palindrome with spacer of one nucleotide is characteristic of the cis-acting unfolded protein response element in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **273**, 9912-9920.
- Mori, K., Sant, A., Kohno, K., Normington, K., Gething, M.J., und Sambrook, J.F.** (1992). A 22 bp cis-acting element is necessary and sufficient for the induction of the yeast *KAR2* (BiP) gene by unfolded proteins. *EMBO J* **11**, 2583-2593.
- Mueller, A.N., Ziemann, S., Treitschke, S., Assmann, D., und Doehlemann, G.** (2013). Compatibility in the *Ustilago maydis*-maize interaction requires inhibition of host cysteine proteases by the fungal effector Pit2. *PLoS Pathog* **9**, e1003177.
- Mueller, O., Kahmann, R., Aguilar, G., Trejo-Aguilar, B., Wu, A., und de Vries, R.P.** (2008). The secretome of the maize pathogen *Ustilago maydis*. *Fungal Genet Biol* **45** Suppl 1, S63-70.
- Mulder, H.J., und Nikolaev, I.** (2009). HacA-dependent transcriptional switch releases *hacA* mRNA from a translational block upon endoplasmic reticulum stress. *Eukaryot Cell* **8**, 665-675.
- Mulder, H.J., Saloheimo, M., Penttila, M., und Madrid, S.M.** (2004). The transcription factor HACA mediates the unfolded protein response in *Aspergillus niger*, and up-regulates its own transcription. *Mol Genet Genomics* **271**, 130-140.
- Mumberg, D., Müller, R., und Funk, M.** (1994). Regulatable promoters of *Saccharomyces cerevisiae*: comparison of transcriptional activity and their use for heterologous expression. *Nucleic Acids Res* **22**, 5767-5768.
- Murray, J.I., Whitfield, M.L., Trinklein, N.D., Myers, R.M., Brown, P.O., und Botstein, D.** (2004). Diverse and specific gene expression responses to stresses in cultured human cells. *Mol Biol Cell* **15**, 2361-2374.
- Niwa, M., Patil, C.K., DeRisi, J., und Walter, P.** (2005). Genome-scale approaches for discovering novel nonconventional splicing substrates of the Ire1 nuclease. *Genome Biol* **6**, R3.
- Normington, K., Kohno, K., Kozutsumi, Y., Gething, M.J., und Sambrook, J.** (1989). *S. cerevisiae* Encodes an Essential Protein Homologous in Sequence and Function to Mammalian Bip. *Cell* **57**, 1223-1236.
- O'Connell, R.J., Thon, M.R., Hacquard, S., Amyotte, S.G., Kleemann, J., Torres, M.F., Damm, U., Buiate, E.A., Epstein, L., Alkan, N., Altmüller, J., Alvarado-Balderrama, L., Bauser, C.A., Becker, C., Birren, B.W., Chen, Z., Choi, J., Crouch, J.A., Duvick, J.P., Farman, M.A., Gan, P., Heiman, D., Henrissat, B., Howard, R.J., Kabbage, M., Koch, C., Kracher, B., Kubo, Y., Law, A.D., Lebrun, M.H., Lee, Y.H., Miyara, I., Moore, N., Neumann, U., Nordström, K., Panaccione, D.G., Panstruga, R., Place, M., Proctor, R.H., Prusky, D., Rech, G., Reinhardt, R., Rollins, J.A., Rounsley, S., Schardl, C.L., Schwartz, D.C., Shenoy, N., Shirasu, K., Sikhakolli, U.R., Stüber, K., Sukno, S.A., Sweigard, J.A., Takano, Y., Takahara, H., Trail, F., van der Does, H.C., Voll, L.M., Will, I., Young, S., Zeng, Q., Zhang, J., Zhou, S., Dickman, M.B., Schulze-Lefert, P., Ver Loren van Themaat, E., Ma, L.J., und Vaillancourt, L.J.** (2012). Lifestyle transitions in plant pathogenic

- Colletotrichum* fungi deciphered by genome and transcriptome analyses. *Nat Genet* **44**, 1060-1065.
- Ogawa, N., und Mori, K.** (2004). Autoregulation of the *HAC1* gene is required for sustained activation of the yeast unfolded protein response. *Genes Cells* **9**, 95-104.
- Okmen, B., und Doehlemann, G.** (2014). Inside plant: biotrophic strategies to modulate host immunity and metabolism. *Curr Opin Plant Biol* **20**, 19-25.
- Oyadomari, S., und Mori, M.** (2004). Roles of CHOP/GADD153 in endoplasmic reticulum stress. *Cell Death Differ* **11**, 381-389.
- Perez-Martin, J., Bardetti, P., Castanheira, S., de la Torre, A., und Tenorio-Gomez, M.** (2016). Virulence-specific cell cycle and morphogenesis connections in pathogenic fungi. *Semin Cell Dev Biol* **57**, 93-99.
- Pieterse, C.M., Van der Does, D., Zamioudis, C., Leon-Reyes, A., und Van Wees, S.C.** (2012). Hormonal modulation of plant immunity. *Annu Rev Cell Dev Biol* **28**, 489-521.
- Qiu, X.B., Shao, Y.M., Miao, S., und Wang, L.** (2006). The diversity of the DnaJ/Hsp40 family, the crucial partners for Hsp70 chaperones. *Cell Mol Life Sci* **63**, 2560-2570.
- Redkar, A., Hoser, R., Schilling, L., Zechmann, B., Krzymowska, M., Walbot, V., und Doehlemann, G.** (2015). A Secreted Effector Protein of *Ustilago maydis* Guides Maize Leaf Cells to Form Tumors. *Plant Cell* **27**, 1332-1351.
- Reichmann, M., Jamnischek, A., Weinzierl, G., Ladendorf, O., Huber, S., Kahmann, R., und Kämper, J.** (2002). The histone deacetylase Hda1 from *Ustilago maydis* is essential for teliospore development. *Mol Microbiol* **46**, 1169-1182.
- Richie, D.L., Feng, X., Krishnan, K., und Askew, D.S.** (2011). Secretion stress and antifungal resistance: an Achilles' heel of *Aspergillus fumigatus*? *Med Mycol* **49 Suppl 1**, S101-106.
- Richie, D.L., Hartl, L., Amanianda, V., Winters, M.S., Fuller, K.K., Miley, M.D., White, S., McCarthy, J.W., Latge, J.P., Feldmesser, M., Rhodes, J.C., und Askew, D.S.** (2009). A role for the unfolded protein response (UPR) in virulence and antifungal susceptibility in *Aspergillus fumigatus*. *PLoS Pathog* **5**, e1000258.
- Romeis, T., Kämper, J., und Kahmann, R.** (1997). Single-chain fusions of two unrelated homeodomain proteins trigger pathogenicity in *Ustilago maydis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 1230-1234.
- Ron, D., und Walter, P.** (2007). Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**, 519-529.
- Rose, M.D., Misra, L.M., und Vogel, J.P.** (1989). KAR2, a karyogamy gene, is the yeast homolog of the mammalian BiP/GRP78 gene. *Cell* **57**, 1211-1221.
- Rubio, C., Pincus, D., Korennykh, A., Schuck, S., El-Samad, H., und Walter, P.** (2011). Homeostatic adaptation to endoplasmic reticulum stress depends on Ire1 kinase activity. *J Cell Biol* **193**, 171-184.
- Ruegsegger, U., Leber, J.H., und Walter, P.** (2001). Block of *HAC1* mRNA translation by long-range base pairing is released by cytoplasmic splicing upon induction of the unfolded protein response. *Cell* **107**, 103-114.

- Saloheimo, M., Valkonen, M., und Penttilä, M.** (2003). Activation mechanisms of the HAC1-mediated unfolded protein response in filamentous fungi. *Mol Microbiol* **47**, 1149-1161.
- Sambrook, J., Frisch, E.F., und Maniatis, T.** (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. (Cold Spring Harbor Laboratory Press).
- Sano, R., und Reed, J.C.** (2013). ER stress-induced cell death mechanisms. *Biochim Biophys Acta* **1833**, 3460-3470.
- Scherer, M., Heimel, K., Starke, V., und Kämper, J.** (2006). The Clp1 protein is required for clamp formation and pathogenic development of *Ustilago maydis*. *Plant Cell* **18**, 2388-2401.
- Schirawski, J., Böhnert, H.U., Steinberg, G., Snetselaar, K., Adamikowa, L., und Kahmann, R.** (2005). Endoplasmic reticulum glucosidase II is required for pathogenicity of *Ustilago maydis*. *Plant Cell* **17**, 3532-3543.
- Schirawski, J., Mannhaupt, G., Münch, K., Brefort, T., Schipper, K., Doehlemann, G., Di Stasio, M., Rössel, N., Mendoza-Mendoza, A., Pester, D., Müller, O., Winterberg, B., Meyer, E., Ghareeb, H., Wollenberg, T., Münsterkötter, M., Wong, P., Walter, M., Stukenbrock, E., Güldener, U., und Kahmann, R.** (2010). Pathogenicity determinants in smut fungi revealed by genome comparison. *Science* **330**, 1546-1548.
- Schlesinger, R., Kahmann, R., und Kämper, J.** (1997). The homeodomains of the heterodimeric bE and bW proteins of *Ustilago maydis* are both critical for function. *Mol Gen Genet* **254**, 514-519.
- Schröder, M.** (2008). Endoplasmic reticulum stress responses. *Cell Mol Life Sci* **65**, 862-894.
- Schröder, M., und Kaufman, R.J.** (2005). The mammalian unfolded protein response. *Annu Rev Biochem* **74**, 739-789.
- Schröder, M., Chang, J.S., und Kaufman, R.J.** (2000). The unfolded protein response represses nitrogen-starvation induced developmental differentiation in yeast. *Genes Dev* **14**, 2962-2975.
- Schuck, S., Prinz, W.A., Thorn, K.S., Voss, C., und Walter, P.** (2009). Membrane expansion alleviates endoplasmic reticulum stress independently of the unfolded protein response. *J Cell Biol* **187**, 525-536.
- Schultz, J., Milpetz, F., Bork, P., und Ponting, C.P.** (1998). SMART, a simple modular architecture research tool: identification of signaling domains. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 5857-5864.
- Schulz, B., Banuett, F., Dahl, M., Schlesinger, R., Schäfer, W., Martin, T., Herskowitz, I., und Kahmann, R.** (1990). The *b* alleles of *U. maydis*, whose combinations program pathogenic development, code for polypeptides containing a homeodomain-related motif. *Cell* **60**, 295-306.
- Sidrauski, C., und Walter, P.** (1997). The transmembrane kinase Ire1p is a site-specific endonuclease that initiates mRNA splicing in the unfolded protein response. *Cell* **90**, 1031-1039.

- Sidrauski, C., Cox, J.S., und Walter, P.** (1996). tRNA ligase is required for regulated mRNA splicing in the unfolded protein response. *Cell* **87**, 405-413.
- Siebert, S.** (2014). Identifizierung und Charakterisierung von Cib1<sup>u</sup>-interagierenden Proteinen in dem Basidiomyceten *U. maydis*.
- Silberstein, S., und Gilmore, R.** (1996). Biochemistry, molecular biology, and genetics of the oligosaccharyltransferase. *FASEB J* **10**, 849-858.
- Skibbe, D.S., Doehlemann, G., Fernandes, J., und Walbot, V.** (2010). Maize tumors caused by *Ustilago maydis* require organ-specific genes in host and pathogen. *Science* **328**, 89-92.
- Snetselaar, K.M., und Mims, C.W.** (1992). Sporidial fusion and infection of maize seedlings by the smut fungus *Ustilago maydis*. *Mycologia* **84**, 193-203.
- Snetselaar, K.M., und Mims, C.W.** (1993). Infection of Maize Stigmas by *Ustilago maydis*: Light and Electron Microscopy. *Phytopathology* **83**.
- Snetselaar, K.M., Bölker, M., und Kahmann, R.** (1996). *Ustilago maydis* Mating Hyphae Orient Their Growth toward Pheromone Sources. *Fungal Genet Biol* **20**, 299-312.
- Soyer, J.L., El Ghalid, M., Glaser, N., Ollivier, B., Linglin, J., Grandaubert, J., Balesdent, M.H., Connolly, L.R., Freitag, M., Rouxel, T., und Fudal, I.** (2014). Epigenetic control of effector gene expression in the plant pathogenic fungus *Leptosphaeria maculans*. *PLoS Genet* **10**, e1004227.
- Spellig, T., Bottin, A., und Kahmann, R.** (1996). Green fluorescent protein (GFP) as a new vital marker in the phytopathogenic fungus *Ustilago maydis*. *Mol Gen Genet* **252**, 503-509.
- Spellig, T., Bölker, M., Lottspeich, F., Frank, R.W., und Kahmann, R.** (1994). Pheromones trigger filamentous growth in *Ustilago maydis*. *EMBO J* **13**, 1620-1627.
- States, D.J., und Gish, W.** (1994). Combined use of sequence similarity and codon bias for coding region identification. *J Comput Biol* **1**, 39-50.
- Steinberg, G., und Perez-Martin, J.** (2008). *Ustilago maydis*, a new fungal model system for cell biology. *Trends Cell Biol* **18**, 61-67.
- Stergiopoulos, I., und de Wit, P.J.** (2009). Fungal effector proteins. *Annu Rev Phytopathol* **47**, 233-263.
- Strittmatter, A.W., Fischer, C., Kleinschmidt, M., und Braus, G.H.** (2006). *FLO11* mediated filamentous growth of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* depends on the expression of the ribosomal *RPS26* genes. *Mol Genet Genomics* **276**, 113-125.
- Tachikawa, H., Takeuchi, Y., Funahashi, W., Miura, T., Gao, X.D., Fujimoto, D., Mizunaga, T., und Onodera, K.** (1995). Isolation and characterization of a yeast gene, *MPD1*, the overexpression of which suppresses inviability caused by protein disulfide isomerase depletion. *FEBS Lett* **369**, 212-216.
- Tada, R., Latge, J.P., und Amanianda, V.** (2013). Undressing the fungal cell wall/cell membrane-the antifungal drug targets. *Curr Pharm Des* **19**, 3738-3747.

- Tanaka, S., Brefort, T., Neidig, N., Djamei, A., Kahnt, J., Vermerris, W., Koenig, S., Feussner, K., Feussner, I., und Kahmann, R.** (2014). A secreted *Ustilago maydis* effector promotes virulence by targeting anthocyanin biosynthesis in maize. *Elife* **3**, e01355.
- Tang, W., Ru, Y., Hong, L., Zhu, Q., Zuo, R., Guo, X., Wang, J., Zhang, H., Zheng, X., Wang, P., und Zhang, Z.** (2015). System-wide characterization of bZIP transcription factor proteins involved in infection-related morphogenesis of *Magnaporthe oryzae*. *Environ Microbiol* **17**, 1377-1396.
- Tirosh, B., Iwakoshi, N.N., Glimcher, L.H., und Ploegh, H.L.** (2006). Rapid turnover of unspliced Xbp-1 as a factor that modulates the unfolded protein response. *J Biol Chem* **281**, 5852-5860.
- Travers, K.J., Patil, C.K., und Weissman, J.S.** (2001). Functional genomic approaches to understanding molecular chaperones and stress responses. *Adv Protein Chem* **59**, 345-390.
- Travers, K.J., Patil, C.K., Wodicka, L., Lockhart, D.J., Weissman, J.S., und Walter, P.** (2000). Functional and genomic analyses reveal an essential coordination between the unfolded protein response and ER-associated degradation. *Cell* **101**, 249-258.
- Treutlein, M.** (2007). Funktionelle Charakterisierung des Rum1-Proteins aus dem phytopathogenen Pilz *Ustilago maydis*. (Philipps-Universität Marburg).
- Tsukuda, T., Carleton, S., Fotheringham, S., und Holloman, W.K.** (1988). Isolation and characterization of an autonomously replicating sequence from *Ustilago maydis*. *Mol Cell Biol* **8**, 3703-3709.
- Urban, M., Kahmann, R., und Bölker, M.** (1996a). The biallelic *a* mating type locus of *Ustilago maydis*: remnants of an additional pheromone gene indicate evolution from a multiallelic ancestor. *Mol Gen Genet* **250**, 414-420.
- Urban, M., Kahmann, R., und Bölker, M.** (1996b). Identification of the pheromone response element in *Ustilago maydis*. *Mol Gen Genet* **251**, 31-37.
- Venkatesh, S., und Workman, J.L.** (2015). Histone exchange, chromatin structure and the regulation of transcription. *Nat Rev Mol Cell Biol* **16**, 178-189.
- Vlot, A.C., Dempsey, D.A., und Klessig, D.F.** (2009). Salicylic Acid, a multifaceted hormone to combat disease. *Annu Rev Phytopathol* **47**, 177-206.
- Wahl, R., Zahiri, A., und Kämper, J.** (2010). The *Ustilago maydis* *b* mating type locus controls hyphal proliferation and expression of secreted virulence factors in planta. *Mol Microbiol* **75**, 208-220.
- Walter, P., und Ron, D.** (2011). The unfolded protein response: from stress pathway to homeostatic regulation. *Science* **334**, 1081-1086.
- Wang, F.M., Chen, Y.J., und Ouyang, H.J.** (2011). Regulation of unfolded protein response modulator XBP1s by acetylation and deacetylation. *Biochem J* **433**, 245-252.
- Westrate, L.M., Lee, J.E., Prinz, W.A., und Voeltz, G.K.** (2015). Form follows function: the importance of endoplasmic reticulum shape. *Annu Rev Biochem* **84**, 791-811.

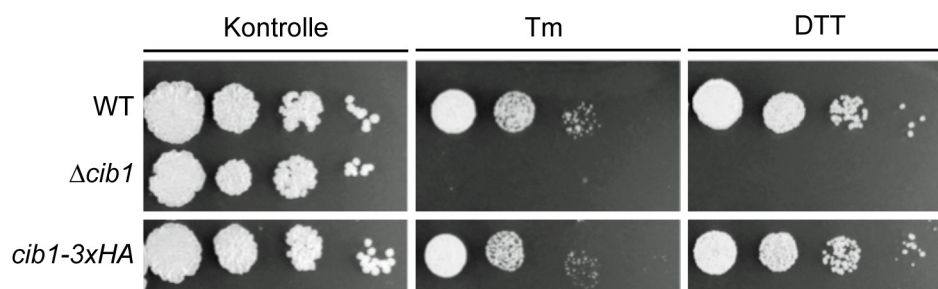
- Wimalasena, T.T., Enjalbert, B., Guillemette, T., Plumridge, A., Budge, S., Yin, Z., Brown, A.J., und Archer, D.B.** (2008). Impact of the unfolded protein response upon genome-wide expression patterns, and the role of Hac1 in the polarized growth, of *Candida albicans*. *Fungal Genet Biol* **45**, 1235-1247.
- Wu, J., und Kaufman, R.J.** (2006). From acute ER stress to physiological roles of the Unfolded Protein Response. *Cell Death Differ* **13**, 374-384.
- Yamamoto, K., Yoshida, H., Kokame, K., Kaufman, R.J., und Mori, K.** (2004). Differential contributions of ATF6 and XBP1 to the activation of endoplasmic reticulum stress-responsive cis-acting elements ERSE, UPRE and ERSE-II. *J Biochem* **136**, 343-350.
- Yamamoto, K., Sato, T., Matsui, T., Sato, M., Okada, T., Yoshida, H., Harada, A., und Mori, K.** (2007). Transcriptional induction of mammalian ER quality control proteins is mediated by single or combined action of ATF6alpha and XBP1. *Dev Cell* **13**, 365-376.
- Yanagitani, K., Kimata, Y., Kadokura, H., und Kohno, K.** (2011). Translational pausing ensures membrane targeting and cytoplasmic splicing of *XBP1u* mRNA. *Science* **331**, 586-589.
- Yi, M., Chi, M.H., Khang, C.H., Park, S.Y., Kang, S., Valent, B., und Lee, Y.H.** (2009). The ER chaperone LHS1 is involved in asexual development and rice infection by the blast fungus *Magnaporthe oryzae*. *Plant Cell* **21**, 681-695.
- Yoshida, H., Uemura, A., und Mori, K.** (2009). pXBP1(U), a negative regulator of the unfolded protein response activator pXBP1(S), targets ATF6 but not ATF4 in proteasome-mediated degradation. *Cell Struct Funct* **34**, 1-10.
- Yoshida, H., Oku, M., Suzuki, M., und Mori, K.** (2006). pXBP1(U) encoded in XBP1 pre-mRNA negatively regulates unfolded protein response activator pXBP1(S) in mammalian ER stress response. *J Cell Biol* **172**, 565-575.
- Yoshida, H., Haze, K., Yanagi, H., Yura, T., und Mori, K.** (1998). Identification of the cis-acting endoplasmic reticulum stress response element responsible for transcriptional induction of mammalian glucose-regulated proteins. Involvement of basic leucine zipper transcription factors. *J Biol Chem* **273**, 33741-33749.
- Yoshida, H., Matsui, T., Yamamoto, A., Okada, T., und Mori, K.** (2001). *XBP1* mRNA is induced by ATF6 and spliced by IRE1 in response to ER stress to produce a highly active transcription factor. *Cell* **107**, 881-891.
- Zarnack, K., Eichhorn, H., Kahmann, R., und Feldbrügge, M.** (2008). Pheromone-regulated target genes respond differentially to MAPK phosphorylation of transcription factor Prf1. *Mol Microbiol* **69**, 1041-1053.
- Zipfel, C.** (2009). Early molecular events in PAMP-triggered immunity. *Curr Opin Plant Biol* **12**, 414-420.
- Zuker, M.** (2003). Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Res* **31**, 3406-3415.



## 6 Anhang

### 6.1 ER-Stressresistenz von SG200 *cib1-3xHA*

Für die qChIP-Analyse wurde der bereits hergestellte Stamm SG200 *cib1-3xHA* (K. Heibel, pers. Mitteilung) verwendet. Dieser Stamm exprimiert ein Cib1-3xHA Fusionsprotein unter Kontrolle des endogenen Promotors im nativen Locus. Um zu testen, ob das Fusionsprotein funktionell ist, wurde die ER-Stressresistenz getestet. Die Deletion von *cib1* führt zu einer drastischen Reduktion der ER-Stressresistenz. Der WT (SG200) und der Stamm *cib1-3xHA* zeigen keine Unterschiede der ER-Stressresistenz (Abb. 44), wodurch die vollständige Funktionalität des Fusionsproteins bestätigt wurde.



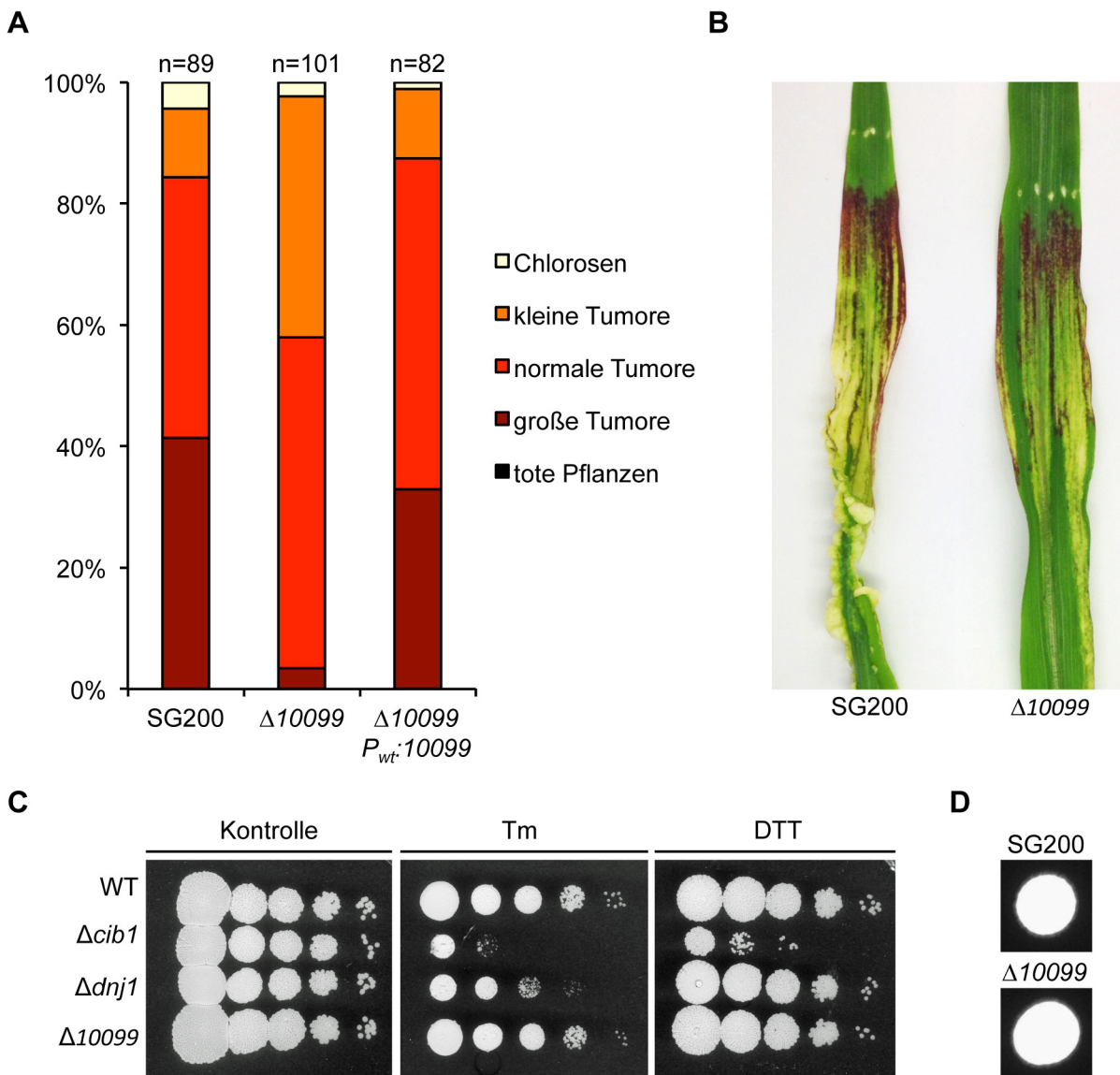
**Abb. 44: Die ER-Stressresistenz von SG200 *cib1-3xHA*.** 10-fach Verdünnungsreihen des *U. maydis* Stammes SG200 (WT) und Derivate wurden auf YNB Festmedium mit Glucose als Kohlenstoffquelle getropft. Der Stamm SG200 *cib1-3xHA* exprimiert ein Cib1 Fusionsprotein unter Kontrolle des endogenen Promotors im nativen Locus. Zur ER-Stressinduktion wurden 2 mM DTT oder 2 µg/ml Tunicamycin (Tm) verwendet. Die Platten wurden 48 h bei 28°C inkubiert.

### 6.2 Die Gendeletion des Erj5p Homologs in *U. maydis*

Erj5p gehört zu der Hsp40/DnaJ Proteinfamilie, welche die Aktivität von Hsp70 Chaperonen regulieren und für die Aufrechterhaltung der Proteinfaltungskapazität im ER in *S. cerevisiae* benötigt werden. Die Deletion von *ERJ5* in *S. cerevisiae* beeinträchtigt die Proteinfaltungskapazität, was eine erhöhte Sensitivität gegenüber ER-Stress induzierenden Substanzen zur Folge hat (Qiu *et al.*, 2006; Carla Fama *et al.*, 2007).

Neben dem bereits charakterisierten *dnj1* (Lo Presti *et al.*, 2015a) konnte mit dem *ERJ5* Ortholog (*UMAG\_10099*) ein weiteres Gen in *U. maydis* identifiziert werden, das ebenfalls für ein DnaJ Co-Chaperon kodiert. In der bioinformatischen Analyse konnte in beiden Genen ein UPRE identifiziert werden, was auf eine direkte Regulation durch Cib1 hindeuten könnte (siehe 2.7.1 Tabelle 1). Im Gegensatz zu  $\Delta dnj1$  hat die Deletion von *UMAG\_10099* keinen Einfluss auf die ER-Stressresistenz (Abb. 45C). Übereinstimmend mit *dnj1* wird *UMAG\_10099* für eine vollständige Virulenz von *U. maydis* benötigt (Abb. 45A und B). Im Infektionsexperiment ist bei der  $\Delta UMAG_10099$  ( $\Delta 10099$ ) Mutante eine reduzierte Anzahl an großen Tumoren im Vergleich zum WT zu erkennen. Dieser Phänotyp kann durch die

Expression von *UMAG\_10099-gfp* unter dem nativen Promotor vollständig komplementiert werden (Abb. 45A).



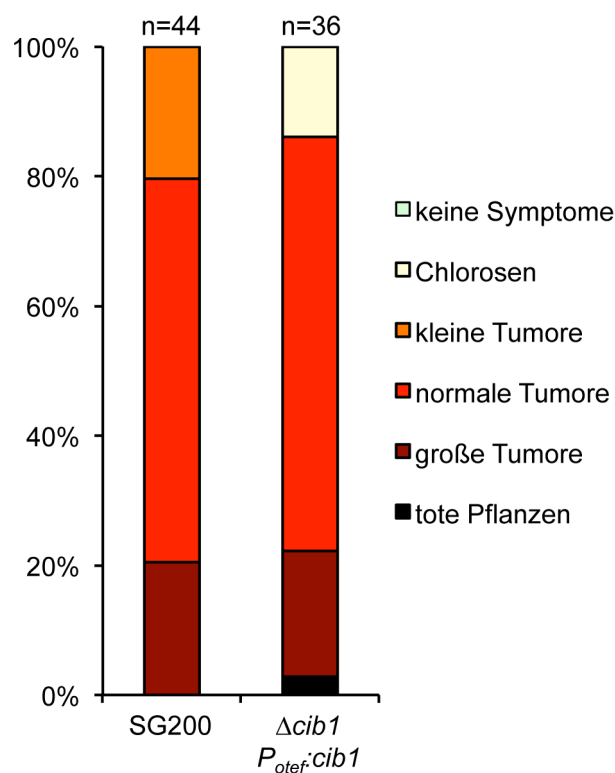
**Abb. 45: Analyse der Deletion von *UMAG\_10099* in *U. maydis*.** Zur Analyse wurde der Stamm SG200 (WT), die Deletionsstämme  $\Delta cib1$ ,  $\Delta dnj1$  und  $\Delta UMAG_10099$  ( $\Delta 10099$ ) verwendet. Für die Komplementation der  $\Delta UMAG_10099$  Mutante wurde *UMAG\_10099-gfp* unter dem nativen Promotor in den *ip* Locus integriert ( $\Delta 10099 P_{wt:10099}$ ). **(A)** Die Bonitur der Krankheitssymptome acht Tage nach Infektion. n gibt die Anzahl der untersuchten Pflanzen an. Der Deletionsstamm ( $\Delta 10099$ ) zeigt eine reduzierte Virulenz welche durch die Expression von *UMAG\_10099-gfp* unter dem nativen Promotor ( $\Delta 10099 P_{wt:10099}$ ) wiederhergestellt werden kann. **(B)** Visueller Vergleich der Krankheitssymptome zwischen WT und der  $\Delta UMAG_10099$  Mutante acht Tage nach Infektion. **(C)** ER-Stresstest der  $\Delta UMAG_10099$  Mutante. 10-fach Verdünnungsreihen des *U. maydis* Stammes SG200 (WT) und Derivate wurden auf YNB Festmedium mit Glucose als Kohlenstoffquelle getropft. Zur ER-Stress Induktion wurden 1 mM DTT oder 1,5  $\mu\text{g/ml}$  Tunicamycin (Tm) verwendet. Die Platten wurden 48 h bei 28°C inkubiert. **(D)** Zum Test auf filamentöses Wachstum wurde der WT (SG200) und die  $\Delta UMAG_10099$  Mutante auf PD-Festmedium mit Aktivkohle getropft und die Platten wurden 48 h bei 28°C inkubiert.

Um auszuschließen, dass die verminderte Virulenz auf ein reduziertes filamentöses Wachstum zurückzuführen ist, wurden die Stämme SG200 und  $\Delta 10099$  auf aktivkohlehaltiges Festmedium getropft. Durch die hydrophobe Oberfläche wird die

Filamentbildung induziert. Der WT und die  $\Delta 10099$  Mutante zeigten keine Veränderungen in der Bildung von Filamenten (Abb. 45D). Folglich wurde mit UMAG\_10099 ein weiteres Co-Chaperon identifiziert, welches für die vollständige Virulenz benötigt wird. Im Gegensatz zu *dnj1* hat die Deletion von *UMAG\_10099* jedoch keinen Einfluss auf die ER-Stressresistenz.

### 6.3 Komplementation der $\Delta cib1$ Mutante durch konstitutive Expression von *cib1*

Die  $\Delta cib1$  Mutante wurde durch die Integration von *cib1* unter dem konstitutiven *otef* Promotor in den *ip* Locus komplementiert. Die Stämme SG200 (WT) und der Komplementationsstamm ( $\Delta cib1 P_{otef:cib1}$ ) wurden in sieben Tage alte Maiskeimlinge inokuliert. Die Bonitur acht Tage nach der Infektion ergab eine vollständige Wiederherstellung der Virulenz (Abb. 46). Dies zeigt, dass die konstitutive Expression von *cib1* ausreichend ist, um den Phänotyp der  $\Delta cib1$  zu komplementieren.



**Abb. 46: Die konstitutive Expression von *cib1* komplementiert die Virulenz der  $\Delta cib1$  Mutante vollständig.** Die Virulenzanalyse der Stämme SG200 (WT) und der Komplementation ( $\Delta cib1 P_{otef:cib1}$ ). Für die Komplementation der  $\Delta cib1$  Mutante wurde *cib1* unter Kontrolle des *otef* Promotors in den *ip* Locus eingebracht. Die Bonitur der Krankheitssymptome erfolgte acht Tage nach Infektion. n gibt die Anzahl der untersuchten Pflanzen an.

## 6.4 Bioinformatische Analyse der UPRE im Genom von *U. maydis*

Tabelle 10: Übersicht der UPR regulierten Gene mit einem UPRE Score >0,85

Gen <sup>a</sup>	Beschreibung	Position <sup>b</sup>	Sequenz des UPRE <sup>c</sup>	UPRE Score	Motiv 1/2
UMAG_00039	konserviertes hypothetisches Protein	-136	cgacacgtaa	0,906	2
UMAG_00084	hypothetisches Protein	-57	AACCACGTTA	0,899	2
UMAG_00154	ähnlich zu Para-Nitrobenzylesterase	-925	aaacacgtcg	0,861	2
UMAG_00196	vermutlich FUN34	-839	caacgtgtcg	0,889	2
UMAG_00372	vermutlich SPF1	-367	cgacacgtga	0,870	2
UMAG_00481	ähnlich zu Sec11	-266	tgacacgttg	0,983	2
UMAG_00609	konserviertes hypothetisches Protein	-522	gaacgtggca	0,901	2
UMAG_00610	konserviertes hypothetisches Protein	-465	tgacgtgttc	0,859	2
UMAG_00768	vermutlich Coatomer gamma-2 Untereinheit	-320	TTACACGTTG	0,869	2
UMAG_00904	vermutlich Lhs1	-268	ggacacgtag	0,961	2
UMAG_01055	hypothetisches Protein	-623	tgacacgtga	0,963	2
UMAG_01141	Diaphanous ähnlich zu Formin	-483	ggacacgtca	0,898	2
UMAG_01229	konserviertes hypothetisches Protein	-185	ttacgtgtca	1,000	2
UMAG_01231	ähnlich zu Dolichyl-phosphate beta-glucosyltransferase	-98	ACACGTGTCT	0,925	2
UMAG_01232	ähnlich zu LAP3	-47	agacacgtgc	0,903	2
UMAG_01374	Pit1	-875	cgacgtggca	0,865	2
UMAG_01375	Pit2	-949	TGCCACGTCCG	0,865	2
UMAG_01540	ähnlich zu Fmo1	-121	acacgtggct	0,878	2
UMAG_01624	vermutlich SEC23	-491	CTACGTGTTG	0,855	2
UMAG_01628	konserviertes hypothetisches Protein	-183	GGACACGTCCG	0,885	2
UMAG_01637	vermutlich YKT6	-738	ttacgtgtat	0,873	2
UMAG_01861	ähnlich zu Alkoholdehydrogenase	-140	CAACGTGTCA	0,983	2
UMAG_01874	konserviertes hypothetisches Protein	-943	AAACACGTCCG	0,861	2
UMAG_01988	ähnlich zu Oxidoreductase	-738	CAACGTGTCCG	0,889	2
UMAG_02005	konserviertes hypothetisches Protein	-360	gaacacgtca	0,859	2
UMAG_02081	„endoplasmic reticulum calcium transporter“	-237	tgacacgtat	0,973	2
UMAG_02089	ähnlich zu bimA	-344	taacacgtca	0,886	2
UMAG_02198	konserviertes hypothetisches Protein	-69	CGACGTGGCT	0,853	2
UMAG_02225	konserviertes hypothetisches Protein	-481	gaacgtgtct	0,936	2
UMAG_02308	hypothetisches Protein	-885	ccacgtgtcg	0,857	2
UMAG_02498	ähnlich zu delta-6 Fettsäuresaturase	-199	tgacacgttg	0,983	2

Gen <sup>a</sup>	Beschreibung	Position <sup>b</sup>	Sequenz des UPRE <sup>c</sup>	UPRE Score	Motiv 1/2
UMAG_02546	ähnlich zu Sec62	-629	AGACGTGTCA	0,897	2
UMAG_02595	ähnlich zu Phosphatidylinositol Phosphat Phosphatase	-257	GAACACGTGA	0,899	2
UMAG_02727	vermutlich Lysozym	-614	GGACACGTTG	0,957	2
UMAG_02729	ähnlich zu Signal-Peptide-Peptidase (Spp1)	-150	TGACACGTCG	0,911	2
UMAG_02736	ähnlich zu Sec16	-971	GACCACGTTA	0,885	2
UMAG_02833	ähnlich zu SEC66	-383	tgacacgtgt	0,937	2
UMAG_02944	konserviertes hypothetisches Protein	-247	TTACACGTTA	0,881	2
UMAG_02945	vermeintliches Protein	-696	tcacgtgtca	0,963	2
UMAG_03001	vermeintliches Protein	-424	TGACACGTTG	0,983	2
UMAG_03010	konserviertes hypothetisches Protein	-446	gaacacgtgg	0,886	2
UMAG_03023	ähnlich zu Ribonuclease Trv	-346	caacgtgtca	0,983	2
UMAG_03067	ähnlich zu CDC33 - Translationsinitiationfaktor eIF4E	-953	TGACGTGTTC	0,859	2
UMAG_03068	ähnlich zu NADPH2:quinone Reduktase	-766	gaacgtgtca	0,948	2
UMAG_03083	konserviertes hypothetisches Protein	-960	ggccacgttt	0,897	2
UMAG_03158	ähnlich zu enoyl-CoA Hydratase	-817	GGACACGTTC	0,921	2
UMAG_03229	konserviertes hypothetisches Protein	-286	taacgtgtaa	0,881	2
UMAG_03265	hypothetisches Protein	-550	ttacgtggct	0,941	2
UMAG_03266	konserviertes hypothetisches Protein	-335	AGCCACGTAA	0,941	2
UMAG_03294	hypothetisches Protein	-462	AACCACGTTT	0,872	2
UMAG_03353	ähnlich zu Ataxin-3	-792	GGCCACGTTG	0,910	2
UMAG_03355	ähnlich zu ERV25	-456	AGACACGTGA	0,951	2
UMAG_03656	hypothetisches Protein	-801	TAACACGTTG	0,945	2
UMAG_04000	DNA-bindendes Protein Ncp1	-887	taacacgtaa	0,962	2
UMAG_04166	ähnlich zu SHE9	-213	TAACACGTGA	0,925	2
UMAG_04173	ähnlich zu COP1	-416	AGACACGTCT	0,885	2
UMAG_04198	ähnlich zu OST3	-910	aaacgtggcc	0,897	2
UMAG_04220	vermutlich ARO7	-834	CGCCACGTAA	0,860	2
UMAG_04238	konserviertes hypothetisches Protein	-311	ggccacgtta	0,923	2
UMAG_04461	vermutlich PMR1	-675	TGACACGTTG	0,983	2
UMAG_04578	konserviertes hypothetisches Protein	-236	ggccacgtga	0,891	2
UMAG_04720	vermeintliches Protein	-517	acacgtgttt	0,886	2
UMAG_05059	probable 5-aminolevulinic acid synthase	-168	TGCCACGTCT	0,851	2
UMAG_05118	vermeintliches Protein	-35	CGACACGTTG	0,889	2

Gen <sup>a</sup>	Beschreibung	Position <sup>b</sup>	Sequenz des UPRE <sup>c</sup>	UPRE Score	Motiv 1/2
UMAG_05173	Dnj1	-494	tcacgtgggt	0,866	2
UMAG_05216	ähnlich zu IKS1	-348	tgacacgtga	0,963	2
UMAG_05219	ähnlich zu Ero1	-358	AGACACGTAT	0,961	2
UMAG_05282	ähnlich zu VPS60	-177	gtacgtgtca	0,952	2
UMAG_05299	konserviertes hypothetisches Ustilago-spezifisches Protein	-150	GGACACGTAT	0,947	2
UMAG_05526	konserviertes hypothetisches Protein	-151	ttacgtgtca	1,000	2
UMAG_05527	konserviertes hypothetisches Protein	-546	TGACACGTAA	1,000	2
UMAG_05953	vermeintliches Protein	-238	AGCCACGTAT	0,915	2
UMAG_06071	ähnlich zu Para-nitrobenzylesterase	-605	aaccacgtgg	0,853	2
UMAG_06089	konserviertes hypothetisches Protein	-259	tgacacgtga	0,963	2
UMAG_06140	ähnlich zu einem Protein des programmierten Zelltod	-66	AAACGTGTCT	0,957	2
UMAG_06405	ähnlich zu AMME (syndrome candidate gene 1 protein)	-937	agacacgttg	0,971	2
UMAG_10040	hypothetisches Protein	-255	TTACGTGGCT	0,941	2
UMAG_10099	ähnlich zu Erj5	-145	AGCCACGTTG	0,925	2
UMAG_10102	ähnlich zu SLY1 protein	-227	TAACACGTAT	0,935	2
UMAG_10156	vermutlich Proteindisulfidomerase (PDI)	-300	tgccacgtcg	0,865	2
UMAG_10424	ähnlich zu PTM1	-68	CTACGTGTCT	0,975	2
UMAG_10615	vermutlich VPS21	-721	acacgtggca	0,890	2
UMAG_10657	konserviertes hypothetisches Protein	-372	TCACGTGTCTG	0,870	2
UMAG_10837	konserviertes hypothetisches Protein	-271	aaacgtggca	0,923	2
UMAG_10856	ähnlich zu YHC3	-240	TGCCACGTTC	0,901	2
UMAG_10875	konserviertes hypothetisches Protein	-162	GACCACGTAT	0,862	2
UMAG_10944	ähnlich zu „protein phosphatase methylesterase 1“	-253	TAACGTGTAA	0,881	2
UMAG_11027	vermutlich SEC22	-276	aaacacgtgc	0,865	2
UMAG_11028	ähnlich zu WHI2	-501	GCACGTGTTT	0,865	2
UMAG_11056	konserviertes hypothetisches Protein	-821	CAACGTGTCTG	0,889	2
UMAG_11276	konserviertes hypothetisches Protein	-405	tgacgtgtta	0,886	2
UMAG_11289	konserviertes hypothetisches Protein	-944	tgacacgtgt	0,937	2
UMAG_11309	ähnlich zu Coatomer epsilon Untereinheit	-979	aaacgtggta	0,885	2
UMAG_11439	ähnlich zu GLO3	-396	CGACGTGTCT	0,899	2
UMAG_11474	ähnlich zu Tumor Suszeptibilitäts-gen 101	-152	CAACGTGGCA	0,937	2
UMAG_11494	ähnlich zu SHP1	-115	ttacgtgtcg	0,906	2
UMAG_11513	konserviertes hypothetisches Protein	-271	CTACGTGTCT	0,975	2

Gen <sup>a</sup>	Beschreibung	Position <sup>b</sup>	Sequenz des UPRE <sup>c</sup>	UPRE Score	Motiv 1/2
UMAG_11594	konserviertes hypothetisches Protein	-404	CCACGTGTCT	0,938	2
UMAG_11782	Cib1	-369	TGCCACGTCTG	0,865	2
UMAG_11997	vermutlich ZPR1	-575	TCACGTGGCA	0,917	2
UMAG_12062	vermutlich ERD2	-549	ctacgtggcc	0,914	2
UMAG_12108	„probable syntaxin, vesicular transport protein“	-862	agacacgtgc	0,903	2
UMAG_12127	hypothetisches Protein	-979	TGACACGTCA	0,924	2
UMAG_12175	konserviertes hypothetisches Protein	-249	tgacgtgtct	0,912	2
UMAG_12185	konserviertes hypothetisches Protein	-459	aaacacgtgt	0,886	2
UMAG_12210	ähnlich zu HUT1	-164	tgacgtggca	0,878	2
UMAG_12230	vermeintliches Protein	-190	gaacgtgtcg	0,854	2
UMAG_12291	konserviertes hypothetisches Protein	-621	tcacgtgtcg	0,870	2
UMAG_15013	ähnlich zu COP9 Signalosom-Komplex Untereinheit 1	-273	taacacgtag	0,949	2
UMAG_15034	vermutlich Bip1	-152	tgacgtgttc	0,859	2
UMAG_15060	konserviertes hypothetisches Protein	-597	TTACGTGTTA	0,962	2
UMAG_15085	ähnlich zu Peptid-n4- (n-acetyl- beta -glucosaminy) Asparagin Amidase	-138	tgacgtgttc	0,859	2

<sup>a</sup> Nummer gemäß MUMDB

<sup>b</sup> relativ zu (A) des ersten ATG in der mRNA

<sup>c</sup> Großbuchstaben: Gene auf dem Watson Strang, Kleinbuchstaben: Gene auf dem Crick Strang

<sup>d</sup> UPR Regulation ist definiert als: >2-fach erhöhte Expression nach DTT und TM Behandlung und >2-fach gegen  $\Delta$ cib1-Kontrolle

Tabelle 11: Übersicht möglicher Effektorgene mit einem UPRE Score &gt;0,85

Gen <sup>a</sup>	Beschreibung	Position <sup>b</sup>	Sequenz des UPRE <sup>c</sup>	UPRE Score	Motiv 1/2	UPR Regulation <sup>d</sup>
UMAG_00060	konserviertes hypothetisches Ustilago-spezifisches Protein	-673	TGCCACCTTGTC A	0,863	1	NEIN
UMAG_00072	konserviertes hypothetisches Protein	-588	GGACACGTGC	0,889	2	NEIN
UMAG_00344	vermeintliches Protein	-546	gtacgtgtcg	0,858	2	NEIN
UMAG_00420	konserviertes hypothetisches Protein	-811	GAACGTGGCA	0,901	2	NEIN
UMAG_00628	vermeintliches Protein	-831	tcacgtggct	0,905	2	NEIN
UMAG_00692	konserviertes hypothetisches Protein	-922	atacgtgta	0,889	2	NEIN
UMAG_00793	konserviertes hypothetisches Ustilago-spezifisches Protein	-917	CAACGTGGTA	0,898	2	NEIN
UMAG_00795	hypothetisches Protein	-843	taacgtgtcc	0,970	2	NEIN
UMAG_01061	hypothetisches Protein	-519	CAACGTGTTA	0,945	2	NEIN
UMAG_01302	konserviertes hypothetisches Ustilago-spezifisches Protein	-893	AACCACGTTC	0,851	2	NEIN
UMAG_01375	Pit2-sekretierter Cysteinprotease-Inhibitor	-949	TGCCACGTGC	0,865	2	JA
UMAG_01695	hypothetisches Protein	-901	agacacgttc	0,936	2	NEIN
UMAG_01750	konserviertes hypothetisches Protein	-614	TAACACGTGA	0,925	2	NEIN
UMAG_01778	vermeintliches Protein	-626	TGACACGTTT	0,969	2	NEIN
UMAG_01779	hypothetisches Protein	-516	AGACACGTGC	0,903	2	NEIN
UMAG_01786	vermeintliches Protein	-564	ctacgtgta	0,902	2	NEIN
UMAG_01796	„effector family protein“ Eff1-1	-899	AAACGTGTAA	0,855	2	NEIN
UMAG_01976	vermeintliches Protein	-701	GGCCACGTTT	0,897	2	NEIN
UMAG_01987	Pep1-sekretierter Peroxidase-Inhibitor	-824	cgacacgttg	0,889	2	NEIN
UMAG_02011	vermeintliches Protein	-357	tgccacgttt	0,923	2	NEIN
UMAG_02072	konserviertes hypothetisches Protein	-740	aaacgtggct	0,911	2	NEIN
UMAG_02119	hypothetisches Protein	-483	TCACGTGGCT	0,905	2	NEIN
UMAG_02229	konserviertes hypothetisches Ustilago-spezifisches Protein	-343	agacacgtga	0,951	2	NEIN
UMAG_02230	konserviertes hypothetisches Ustilago-spezifisches Protein	-449	aaacacgtcg	0,861	2	NEIN
UMAG_02295	konserviertes hypothetisches Ustilago-spezifisches Protein	-671	TGACACGTAC	0,952	2	NEIN
UMAG_02535	konserviertes hypothetisches Ustilago-spezifisches Protein	-231	CCACGTGTCA	0,951	2	NEIN
UMAG_02537	konserviertes hypothetisches Ustilago-spezifisches Protein	-568	TAACACGTGC	0,877	2	NEIN
UMAG_02756	hypothetisches Protein	-837	TACCACGTAC	0,867	2	NEIN
UMAG_02852	konserviertes hypothetisches Ustilago-spezifisches Protein	-791	caacgtgtca	0,983	2	NEIN
UMAG_02921	konserviertes hypothetisches Protein	-20	taacgtgttt	0,945	2	NEIN
UMAG_02981	konserviertes hypothetisches Protein	-172	gtacgtgtcc	0,925	2	NEIN
UMAG_03105	hypothetisches Protein	-982	CAACGTGTAT	0,856	2	NEIN



Gen <sup>a</sup>	Beschreibung	Position <sup>b</sup>	Sequenz des UPRE <sup>c</sup>	UPRE Score	Motiv 1/2	UPR Regulation <sup>d</sup>
UMAG_03154	hypothetisches Protein	-492	ATACGTGGTT	0,876	2	NEIN
UMAG_03313	„effector family protein“ Eff1-3	-224	CAACGTGTCTG	0,889	2	NEIN
UMAG_03314	„effector family protein“ Eff1-4	-324	GAACACGTGC	0,850	2	NEIN
UMAG_03585	konserviertes hypothetisches Protein	-502	AAACACGTCA	0,873	2	NEIN
UMAG_03748	konserviertes hypothetisches Ustilago-spezifisches Protein	-994	tgacgtgttt	0,873	2	NEIN
UMAG_03750	konserviertes hypothetisches Ustilago-spezifisches Protein	-940	ctacgtgttg	0,855	2	NEIN
UMAG_03822	vermeintliches Protein	-794	taacgtgtga	0,858	2	NEIN
UMAG_04033	hypothetisches Protein	-608	ggccacgttt	0,897	2	NEIN
UMAG_04259	konserviertes hypothetisches Protein	-218	caacgtggct	0,925	2	NEIN
UMAG_04342	vermeintliches Protein	-311	atacgtggct	0,915	2	NEIN
UMAG_04557	konserviertes hypothetisches Protein	-431	CAACGTGTTC	0,918	2	NEIN
UMAG_04915	„probable Major allergen Mal f 1 precursor“	-903	AAACGTGGTT	0,872	2	NEIN
UMAG_05294	Tin1-1	-765	TGCCACGTGT	0,890	2	JA
UMAG_05299	konserviertes hypothetisches Ustilago-spezifisches Protein	-150	GGACACGTAT	0,947	2	NEIN
UMAG_05302	Tin2	-156	TGCCGTGGCA	0,708	2	NEIN
UMAG_05309	konserviertes hypothetisches Ustilago-spezifisches Protein	-363	AGACGTGGCA	0,851	2	NEIN
UMAG_05341	hypothetisches Protein	-552	gtacacgtaa	0,859	2	NEIN
UMAG_05604	vermeintliches Protein	-76	GAACGTGTCC	0,921	2	NEIN
UMAG_05731	Chorismat-Mutase-cmu1	-836	TCACACGTTG	0,845	2	NEIN
UMAG_05927	konserviertes hypothetisches Ustilago-spezifisches Protein	-340	tgacacgtga	0,963	2	NEIN
UMAG_06112	hypothetisches Protein	-603	TAACGTGGTT	0,899	2	NEIN
UMAG_06113	hypothetisches Protein	-299	TACCACGTTC	0,862	2	NEIN
UMAG_06162	konserviertes hypothetisches Protein	-270	TAACACGTTG	0,944	2	NEIN
UMAG_06178	Mig2-1	-910	CCACGTGTTC	0,885	2	NEIN
UMAG_06179	Mig2-2	-454	TCACGTGTCT	0,951	2	NEIN
UMAG_06255	hypothetisches Protein	-832	GGACACGTCA	0,897	2	NEIN
UMAG_10031	verwandt mit DC-8	-866	agacacgtga	0,951	2	NEIN
UMAG_10418	hypothetisches Protein	-657	CAACGTGTCA	0,983	2	NEIN
UMAG_10476	hypothetisches Protein	-824	caacgtgttt	0,932	2	NEIN
UMAG_10555	konserviertes hypothetisches Protein	-288	CGACGTGTCA	0,911	2	NEIN
UMAG_10831	konserviertes hypothetisches Protein	-966	gcacgtgtca	0,915	2	NEIN
UMAG_11002	konserviertes hypothetisches Ustilago-spezifisches Protein	-653	aaacacgtag	0,937	2	NEIN
UMAG_11250	Mig2-3	-535	TCACGTGGCA	0,917	2	NEIN

Gen <sup>a</sup>	Beschreibung	Position <sup>b</sup>	Sequenz des UPRE <sup>c</sup>	UPRE Score	Motiv 1/2	UPR Regulation <sup>d</sup>
UMAG_11403	konserviertes hypothetisches Protein	-170	tgccacgttc	0,901	2	NEIN
UMAG_11484	hypothetisches Protein	-329	AAACGTGTAA	0,855	2	NEIN
UMAG_11586	vermeintliches Protein	-500	agccacgtgc	0,857	2	NEIN
UMAG_11697	konserviertes hypothetisches Protein	-355	TCACGTGTTA	0,925	2	NEIN
UMAG_12127	hypothetisches Protein	-979	TGACACGTCA	0,924	2	NEIN
UMAG_12175	konserviertes hypothetisches Ustilago-spezifisches Protein	-249	tgacgtgtct	0,912	2	NEIN
UMAG_12226	vermeintliches Protein	-67	cgacacgttc	0,854	2	NEIN
UMAG_12258	hypothetisches Protein	-476	gaacgtgttt	0,897	2	NEIN
UMAG_12281	vermeintliches Protein	-271	gaccacgttg	0,872	2	NEIN
UMAG_12302	konserviertes hypothetisches Ustilago-spezifisches Protein	-804	GGACACGTAC	0,925	2	NEIN
UMAG_12316	konserviertes hypothetisches Protein	-778	aaacacgtcg	0,860	2	NEIN

<sup>a</sup> Nummer gemäß MUMDB

<sup>b</sup> relativ zu (A) des ersten ATG in der mRNA

<sup>c</sup> Großbuchstaben: Gene auf dem Watson Strang, Kleinbuchstaben: Gene auf dem Crick Strang

<sup>d</sup> UPR Regulation ist definiert als: >2-fach erhöhte Expression nach DTT und TM Behandlung und >2-fach gegen  $\Delta cib1$ -Kontrolle

## 6.5 qRT-PCR basierender Screen zur Untersuchung der UPR abhängigen Expression der UPRE Kandidatengene

Um zu überprüfen, ob die 74 bioinformatisch vorhergesagten Effektoren mit einer möglichen Cib1 Bindestelle (siehe 2.7.1) UPR abhängig reguliert sind, wurde ein qRT-PCR basierter Screen durchgeführt.

Tabelle 12: qRT-PCR basierter Screen

Gennummer (MUMAG_DB)	Genname/ Behandlung	x-fache Expression kein Stress vs Stress		x-fache Expression unter ER-Stress	
		WT vs DTT/Tm	Regulation (>2-fach)	WT vs $\Delta$ cib1	Regulation (> 2-fach)
<b>UMAG_15034</b>	<b>bip1</b>	Kontrolle	JA		JA
	DTT	20,18		28,83	
	Tm	14,26		6,51	
<b>UMAG_00060</b>			NEIN		NEIN
	DTT	1,177		0,743	
	Tm	1,031		1,044	
<b>UMAG_00072</b>			NEIN		NEIN
	DTT	0,197		0,418	
	Tm	0,656		0,282	
<b>UMAG_00344</b>			NEIN		NEIN
	DTT	0,447		0,749	
	Tm	0,525		0,753	
<b>UMAG_00420</b>			NEIN		NEIN
	DTT	0,629		1,748	
	Tm	1,442		3,056	
<b>UMAG_00628</b>			NEIN		NEIN
	DTT	4,539		0,825	
	Tm	0,582		0,771	
<b>UMAG_00692</b>			NEIN		NEIN
	DTT	0,820		0,688	
	Tm	1,221		0,462	
<b>UMAG_00793</b>			NEIN		NEIN
	DTT	0,425		0,625	
	Tm	0,213		0,213	
<b>UMAG_00795</b>			NEIN		NEIN
	DTT	6,822		0,723	
	Tm	0,614		0,384	
<b>UMAG_01061</b>			NEIN		NEIN
	DTT	0,624		0,531	
	Tm	0,813		0,295	
<b>UMAG_01302</b>			NEIN		NEIN
	DTT	20,151		0,309	
	Tm	1,024		0,106	
<b>UMAG_01375</b>	<b>pit2</b>		JA		JA
	DTT	21,119		3,072	
	Tm	5,56		12,524	
<b>UMAG_01695</b>			NEIN		NEIN
	DTT	1,706		0,674	
	Tm	0,251		1,076	
<b>UMAG_01750</b>			JA		NEIN
	DTT	3,073		1,144	
	Tm	3,376		3,183	
<b>UMAG_01778</b>			NEIN		NEIN
	DTT	4,219		0,986	
	Tm	1,634		1,276	
<b>UMAG_01779</b>			NEIN		NEIN
	DTT	9,808		0,652	
	Tm	0,346		16,938	
<b>UMAG_01786</b>			NEIN		NEIN
	DTT	0,246		0,681	
	Tm	0,346		0,504	
<b>UMAG_01796</b>			NEIN		NEIN
	DTT	2,156		0,954	
	Tm	1,229		0,32	

Gennummer (MUMAG_DB)	Genname/ Behandlung	x-fache Expression kein Stress vs Stress		x-fache Expression unter ER-Stress	
		WT vs DTT/Tm	Regulation (>2-fach)	WT vs $\Delta$ cib1	Regulation (> 2-fach)
UMAG_01976			NEIN		NEIN
	DTT	2,677		1,723	
	Tm	0,586		0,932	
UMAG_01987	pep1		NEIN		JA
	DTT	5,599		3,997	
	Tm	1,835		3,400	
UMAG_02011			NEIN		NEIN
	DTT	0,513		0,881	
	Tm	0,633		2,269	
UMAG_02072			NEIN		NEIN
	DTT	0,688		1,214	
	Tm	0,727		1,357	
UMAG_02119			NEIN		NEIN
	DTT	1,366		0,508	
	Tm	1,220		1,151	
UMAG_02229			NEIN		NEIN
	DTT	2,923		0,607	
	Tm	0,486		0,427	
UMAG_02230			NEIN		NEIN
	DTT	2,12		0,674	
	Tm	0,636		0,598	
UMAG_02295			NEIN		NEIN
	DTT	14,211		0,504	
	Tm	1,503		0,318	
UMAG_02535			JA		NEIN
	DTT	6,250		0,686	
	Tm	2,148		3,098	
UMAG_02537			NEIN		NEIN
	DTT	0,060		0,543	
	Tm	0,015		0,065	
UMAG_02756			NEIN		NEIN
	DTT	1,377		0,802	
	Tm	1,526		0,965	
UMAG_02852			NEIN		NEIN
	DTT	0,318		1,047	
	Tm	0,136		2,857	
UMAG_02921			NEIN		NEIN
	DTT	0,698		0,769	
	Tm	0,559		0,658	
UMAG_02981			NEIN		JA
	DTT	0,192		4,243	
	Tm	0,402		3,685	
UMAG_03105			NEIN		NEIN
	DTT	2,518		0,708	
	Tm	1,750		0,620	
UMAG_03154			JA		NEIN
	DTT	6,433		0,878	
	Tm	2,842		0,157	
UMAG_03313			NEIN		NEIN
	DTT	13,945		6,528	
	Tm	1,735		1,368	
UMAG_03314			NEIN		NEIN
	DTT	0,046		0,776	
	Tm	0,024		0,426	
UMAG_03585			JA		NEIN
	DTT	3,222		0,777	
	Tm	2,222		0,654	
UMAG_03748			NEIN		NEIN
	DTT	7,224		1,296	
	Tm	0,682		1,177	
UMAG_03750			JA		NEIN
	DTT	8,334		1,071	
	Tm	2,013		0,149	
UMAG_03822			NEIN		NEIN
	DTT	0,205		0,414	
	Tm	0,791		0,562	
UMAG_04033			NEIN		NEIN
	DTT	5,163		0,737	
	Tm	0,702		0,586	

Gennummer (MUMAG_DB)	Genname/ Behandlung	x-fache Expression kein Stress vs Stress		x-fache Expression unter ER-Stress	
		WT vs DTT/Tm	Regulation (>2-fach)	WT vs $\Delta$ cib1	Regulation (> 2-fach)
UMAG_04259			NEIN		NEIN
	DTT	0,655		0,815	
	Tm	0,855		0,975	
UMAG_04342			NEIN		NEIN
	DTT	0,953		0,580	
	Tm	0,336		1,276	
UMAG_04557			NEIN		NEIN
	DTT	0,358		0,833	
	Tm	0,238		0,193	
UMAG_04915			NEIN		NEIN
	DTT	1,705		0,546	
	Tm	0,580		0,690	
UMAG_05294	<i>tin1-1</i>		JA		JA
	DTT	53,505		56,399	
	Tm	59,067		14,704	
UMAG_05299			NEIN		NEIN
	DTT	4,601		0,982	
	Tm	0,663		0,960	
UMAG_05302	<i>tin2</i>		NEIN		NEIN
	DTT	0,317		0,681	
	Tm	0,603		0,730	
UMAG_05309			NEIN		NEIN
	DTT	3,227		0,409	
	Tm	0,590		0,691	
UMAG_05341			NEIN		NEIN
	DTT	0,409		0,634	
	Tm	0,773		0,163	
UMAG_05604			JA		NEIN
	DTT	3,955		0,319	
	Tm	10,134		0,425	
UMAG_05731	<i>cmu1</i>		NEIN		NEIN
	DTT	1,058		0,305	
	Tm	0,582		0,309	
UMAG_05927			NEIN		NEIN
	DTT	1,841		0,522	
	Tm	0,409		0,469	
UMAG_06112	<i>rsp1</i>		NEIN		NEIN
	DTT	0,071		0,601	
	Tm	0,070		0,398	
UMAG_06113			NEIN		NEIN
	DTT	1,502		0,271	
	Tm	0,497		0,318	
UMAG_06162			NEIN		NEIN
	DTT	0,672		0,630	
	Tm	1,764		0,394	
UMAG_06178	<i>mig2_1</i>		NEIN		NEIN
	DTT	7,113		1,012	
	Tm	0,767		1,153	
UMAG_06179	<i>mig2_2</i>		NEIN		JA
	DTT	21,291		2,616	
	Tm	1,338		2,483	
UMAG_06255			NEIN		NEIN
	DTT	2,694		2,488	
	Tm	0,636		0,197	
UMAG_10031			NEIN		NEIN
	DTT	0,177		0,354	
	Tm	0,482		0,617	
UMAG_10418			NEIN		NEIN
	DTT	28,011		0,933	
	Tm	0,679		0,827	
UMAG_10476			NEIN		NEIN
	DTT	0,714		0,954	
	Tm	1,114		1,611	
UMAG_10555			NEIN		NEIN
	DTT	8,441		2,184	
	Tm	0,875		1,215	
UMAG_10831			NEIN		NEIN
	DTT	0,831		1,154	
	Tm	0,551		1,128	

Gennummer (MUMAG_DB)	Genname/ Behandlung	x-fache Expression kein Stress vs Stress		x-fache Expression unter ER-Stress	
		WT vs DTT/Tm	Regulation (>2-fach)	WT vs $\Delta cib1$	Regulation (> 2-fach)
UMAG_11002			JA		NEIN
	DTT	9,003		11,320	
	Tm	3,822		1,647	
UMAG_11250	<i>mig2_3</i>		NEIN		NEIN
	DTT	3,152		1,093	
	Tm	1,705		0,082	
UMAG_11403			NEIN		NEIN
	DTT	1,447		0,474	
	Tm	1,313		0,564	
UMAG_11484			NEIN		NEIN
	DTT	3,242		1,974	
	Tm	1,878		2,697	
UMAG_11586			NEIN		NEIN
	DTT	0,540		1,020	
	Tm	0,463		1,552	
UMAG_11697			NEIN		NEIN
	DTT	2,889		0,508	
	Tm	0,57		0,425	
UMAG_12127			NEIN		NEIN
	DTT	0,750		1,413	
	Tm	0,352		1,401	
UMAG_12175			NEIN		NEIN
	DTT	0,953		1,008	
	Tm	0,589		0,782	
UMAG_12226			NEIN		NEIN
	DTT	0,780		1,070	
	Tm	0,744		1,315	
UMAG_12258			NEIN		NEIN
	DTT	7,445		0,569	
	Tm	0,440		0,343	
UMAG_12281			NEIN		NEIN
	DTT	6,425		1,175	
	Tm	0,765		0,499	
UMAG_12302			NEIN		NEIN
	DTT	2,143		0,921	
	Tm	1,041		1,681	
UMAG_12316			NEIN		NEIN
	DTT	0,801		0,436	
	Tm	0,190		0,051	

## Abbildungsverzeichnis

<b>Abb. 1:</b> Schema der Aktivierung des UPR-Signalwegs über IRE1 in höheren Eukaryoten .....	3
<b>Abb. 2:</b> Maiskolben infiziert mit <i>Ustilago maydis</i> und mikroskopische Aufnahmen der Sporidien wie auch der Hyphen innerhalb der Maispflanze .....	6
<b>Abb. 3:</b> Schematische Darstellung des Lebenszyklus von <i>U. maydis</i> .....	8
<b>Abb. 4:</b> Schematische Darstellung des <i>a1</i> - und <i>a2</i> -Locus .....	9
<b>Abb. 5:</b> Schematische Darstellung des <i>b</i> -Locus .....	10
<b>Abb. 6:</b> Model der Cib1 Interaktion mit der b-vermittelten Regulationskaskade .....	12
<b>Abb. 7:</b> Lokalisierung der charakterisierten Effektor Proteine <i>in planta</i> .....	14
<b>Abb. 8:</b> Überblick der Spleißregionen der <i>HAC1</i> Homologe .....	18
<b>Abb. 9:</b> Komplementation des zentralen UPR-Regulators <i>HAC1</i> durch <i>cib1</i> in <i>S. cerevisiae</i> .....	19
<b>Abb. 10:</b> Komplementation der $\Delta$ <i>cib1</i> Mutante durch <i>XBP1</i> aus <i>H. sapiens</i> .....	20
<b>Abb. 11:</b> Die Genexpression von <i>cib1<sup>s</sup></i> , <i>cib1<sup>u</sup></i> und <i>bip1</i> in den Stämmen SG200 und Derivaten unter ER-Stress .....	22
<b>Abb. 12:</b> Die Expression von weiteren UPR-Zielgenen in den Stämmen SG200 und Derivaten als Antwort auf ER-Stress .....	23
<b>Abb. 13:</b> Die <i>dnj1</i> Expression wird UPR abhängig induziert und die $\Delta$ <i>dnj1</i> Mutante zeigt eine erhöhte basale UPR-Zielgenexpression .....	24
<b>Abb. 14:</b> Struktur des <i>cib1</i> Gens und der translatierten Proteine .....	26
<b>Abb. 15:</b> Dosisabhängige Inhibition des Zellwachstums durch die Überexpression von <i>cib1<sup>s</sup></i> .....	28
<b>Abb. 16:</b> Die Mutationen in den Spleißregionen verhindern das unkonventionelle Spleißen der <i>cib1</i> mRNA .....	29
<b>Abb. 17:</b> Der dosisabhängige Einfluss von <i>cib1<sup>us</sup></i> auf die ER-Stressresistenz und die Induktion von UPR-Zielgenen im WT Hintergrund .....	31
<b>Abb. 18:</b> Die Expression von <i>cib1<sup>us</sup></i> kann die ER-Stressresistenz der $\Delta$ <i>cib1</i> Mutanten teilweise wiederherstellen .....	32
<b>Abb. 19:</b> Humanes XBP1 <sup>u</sup> kann die ER-Stressresistenz der $\Delta$ <i>cib1</i> Mutante teilweise wiederherstellen .....	33
<b>Abb. 20:</b> Schematische Übersicht von Hac1p und Homologen .....	34
<b>Abb. 21:</b> Die Überexpression von <i>clp1</i> führt zu einer erhöhten ER-Stressresistenz in Abhängigkeit von der Cib1-Clp1 Interaktion .....	35
<b>Abb. 22:</b> Differenzielle Reduktion der UPR- Zielgenexpression durch <i>clp1</i> .....	37
<b>Abb. 23:</b> Erhöhte Proteinlevel von Clp1 durch die Hyperaktivierung der UPR .....	38

<b>Abb. 24:</b> Die Mutation des basischen Bereichs der bZIP Domäne führt zu reduzierter ER-Stressresistenz, die Clp1 Stabilität ist jedoch nicht beeinflusst .....	39
<b>Abb. 25:</b> Untersuchung der UPR-Zielgenexpression während der biotrophen Entwicklung.....	41
<b>Abb. 26:</b> Die Expression von <i>cib1</i> in der frühen Phase der pathogenen Entwicklung ist für die Komplementation der $\Delta$ <i>cib1</i> Mutante nicht ausreichend.....	42
<b>Abb. 27:</b> Die Identifizierung von UPR regulierten Genen mit vorhergesagten UPREs .....	44
<b>Abb. 28:</b> qChIP Analyse der Cib1 Bindestelle im <i>cib1</i> Promotor.....	46
<b>Abb. 29:</b> Identifizierung von Effektorgenen mit vorhergesagten UPREs.....	48
<b>Abb. 30:</b> Die UPR abhängige Regulation der Gene <i>pit1</i> , <i>pit2</i> und <i>tin1-1</i> .....	50
<b>Abb. 31:</b> Die ER-Stressresistenz der $\Delta$ <i>pit1/2</i> Mutante .....	51
<b>Abb. 32:</b> Cib1 bindet an das UPRE in den Promotoren von <i>pit1/2</i> und <i>tin1-1</i> .....	52
<b>Abb. 33:</b> Stark erhöhte basale Expression von <i>pit1</i> und <i>pit2</i> bei der Komplementation der $\Delta$ <i>pit1/2</i> Mutante.....	53
<b>Abb. 34:</b> Das UPRE-Motiv ist für die UPR abhängige Expression von <i>pit1</i> und <i>pit2</i> notwendig .....	55
<b>Abb. 35:</b> Die Deletion des UPRE-Motivs hat eine reduzierte Expression von <i>pit1</i> und <i>pit2</i> in der frühen pathogenen Entwicklung zur Folge .....	56
<b>Abb. 36:</b> Die Deletion des UPRE-Motivs im <i>pit1/2</i> Promotor führt zu einer reduzierten Virulenz.....	57
<b>Abb. 37:</b> Die Sekretion vom Pit2-mCherry wird durch ER-Stress Cib1 abhängig stark induziert .....	58
<b>Abb. 38:</b> Modell der XBP1 <sup>u</sup> Rolle in der ER-Stress Antwort in höheren Eukaryoten.....	63
<b>Abb. 39:</b> Modell der Cib1 <sup>u</sup> und Cib1 Interaktion und die Auswirkungen auf die UPR-Aktivität .....	64
<b>Abb. 40:</b> Modell zum Einfluss der <i>clp1</i> Expression auf die Hyperaktivierung der UPR.....	68
<b>Abb. 41:</b> Modell der Verknüpfung der UPR mit der pathogenen Entwicklung in <i>U. maydis</i> .....	76
<b>Abb. 42:</b> Schematische Darstellung der Gendeletion mittels homologer Rekombination ....	99
<b>Abb. 43:</b> Schematische Darstellung der Integration in den <i>ip</i> Locus.....	99
<b>Abb. 44:</b> Die ER-Stressresistenz von SG200 <i>cib1-3xHA</i> .....	127
<b>Abb. 45:</b> Analyse der Deletion von <i>UMAG_10099</i> in <i>U. maydis</i> .....	128
<b>Abb. 46:</b> Die konstitutive Expression von <i>cib1</i> komplementiert die Virulenz der $\Delta$ <i>cib1</i> Mutante vollständig .....	129



## Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 1:</b> Funktionelle Einordnung der UPR regulierten Gene mit vorhergesagten UPREs aus <i>U. maydis</i> .....	45
<b>Tabelle 2:</b> Auszug aus dem qRT-PCR basierenden Screen .....	49
<b>Tabelle 3:</b> In dieser Arbeit verwendete Enzyme .....	78
<b>Tabelle 4:</b> In dieser Arbeit verwendete Antikörper.....	79
<b>Tabelle 5:</b> Verwendete und hergestellte <i>S. cerevisiae</i> Stämme .....	82
<b>Tabelle 6:</b> Ausgangsstämme .....	82
<b>Tabelle 7:</b> In dieser Arbeit hergestellte Stämme.....	83
<b>Tabelle 8:</b> Ausgangsplasmide .....	84
<b>Tabelle 9:</b> Verwendete Oligonukleotide in dieser Arbeit.....	89
<b>Tabelle 10:</b> Übersicht der UPR regulierten Gene mit einem UPRE Score >0,85 .....	130
<b>Tabelle 11:</b> Übersicht möglicher Effektorgene mit einem UPRE Score >0,85.....	134
<b>Tabelle 12:</b> qRT-PCR basierter Screen .....	137

## Abkürzungen

Abb.	Abbildung	mCherry	Rot fluoreszierendes Protein
Amp	Ampicillin		
AS	Aminosäure(n)	min	Minute(n)
bp	Basenpaar(e)	mRNA	„messenger-RNA“
BSA	Rinderserumalbumin	N-terminal	aminoterminal
bzw.	beziehungsweise	N-Terminus	Aminoterminus
C-terminal	carboxyterminal	μ	micro
C-Terminus	Carboxyterminus	Nat	Nourseothricin
ca.	Circa	nm	Nanometer
Cbx	Carboxin	nt	Nukleotide
DAI	Tage nach der Infektion	OD <sub>600</sub>	Optische Dichte bei 600 nm
DIG	Digoxigenin	ORF	„open reading frame“
DNA	Desoxyribonukleinsäure	PCR	„polymerase chain reaction“
DNase	Desoxyribonuklease	PEG	Polyethylenglycol
dNTP	Desoxynukleosidtri- phosphat	PVDF	Polyvinylidenfluorid
DTT	Dithiothreitol	pers.	persönlich(e)
EDTA	Ethylendiamintetraessig- säure	Phleo	Phleomycin
ER	endoplasmatisches Retikulum	PKA	Proteinkinase A
<i>et al.</i>	und andere	qRT-PCR	quantitative „real-time“ PCR
EtOH	Ethanol	R	Resistenz
f.c.	finale Konzentration	RNA	Ribonukleinsäure
g	Gramm	RT	Raumtemperatur
GFP	Grün fluoreszierendes Protein	SDS	Natriumdodecylsulfat
GTP	Guanosintriphosphat	sec	Sekunde
h	Stunde	TE	Tris-Cl + Na <sub>2</sub> -EDTA
HRP	Meerrettich-Peroxidase	Tm	Tunicamycin
Hyg	Hygromycin	U	Unit (Enzymaktivitätseinheit)
Kan	Kanamycin	ü. N.	über Nacht
kb	Kilobasenpaar	Upm	Umdrehungen pro Minute
kDa	Kilodalton = 1000 Dalton	UTR	„untranslated region“
l	Liter	UV	ultraviolettes Licht
M	molar	V	Volt
		WT	Wildtyp
		z.B.	zum Beispiel
		Δ	Deletion

## Lebenslauf

### Persönliche Daten

Name	Martin Hampel
Geburtsdatum	05.03.1985
Geburtsort	Stuttgart
Staatsangehörigkeit	deutsch

### Wissenschaftlicher Werdegang

Seit Jun 2012	Promotion in der Gruppe von Jun. Prof. Dr. Kai Heimel mit dem Titel „Analyse der UPR vermittelten Stressantwort und ihrer Funktion während der biotrophen Entwicklung von <i>Ustilago maydis</i> “ am Institut für Mikrobiologie und Genetik der Georg-August-Universität Göttingen
Okt 2009 - Mär 2012	Studium der Biologie am Karlsruher Institut für Technologie, Abschluss Master of Science Masterarbeit am Institut für Angewandte Biowissenschaften mit dem Titel „Funktionelle Charakterisierung der Plp1- und Plp3-Effektoren aus <i>Ustilago maydis</i> “
Sep 2005 - Okt 2008	Studium der Molekularen Zellbiologie an der Ruprechts-Karls-Universität Heidelberg, Abschluss Bachelor of Science Bachelorarbeit am Zentrum für Molekulare Biologie mit dem Titel „Ist2 Sortierungssignal in tierischen Zellen“

### Zivildienst

Okt 2004 - Jun 2005	Hausmeistertätigkeit und Gästebetreuung an der Landesakademie für Jugendbildung in Weil der Stadt
---------------------	---

### Berufsausbildung

Sep 2001 - Jun 2004	Ausbildung zum Staatlich geprüften Chemisch-technischen Assistenten
---------------------	---

### Schulischer Werdegang

Sep 2001 - Jun 2004	Naturwissenschaftlich-technisches Gymnasium Fachrichtung Chemie in Stuttgart mit Erwerb der Allgemeine Hochschulreife
Sep 1995 - Jul 2001	Mittlere Reife an der Realschule Weil der Stadt
Aug 1993 - Jul 1995	Grundschule an der Würmtalschule in Weil der Stadt
Aug 1991 - Jun 1993	Grundschule an der Albert-Schweitzer-Schule in Fellbach

## Posterpräsentationen

**Hampel, M.**, Finkernagel, F., Doehlemann, G. und HeimeI, K. "Regulation of Secreted Virulence Factors by the Unfolded Protein Response" 28th Fungal Genetics Conference 17. - 22. März, 2015, Pacific Grove, USA.

**Hampel, M.**, HeimeI, K., Freitag, J., Bölker, M. und Kämper, J. "Control of Fungal Development by Targeted Activation of the Unfolded Protein Response" XI International Fungal Biology Conference 29.09. - 3.10, 2013, Karlsruhe.

## Danksagung

Zunächst möchte ich Kai Heibel für die Möglichkeit danken, meine Doktorarbeit in seiner neu entstandenen Arbeitsgruppe anfertigen zu können. Ohne seine immerwährende Unterstützung und guten Ideen wäre meine Arbeit in dieser Form nicht zustande gekommen. Der gemeinsame Aufbau eines neuen Labors in Göttingen war am Anfang nicht leicht, aber mit vereinten Kräften entstand ein gut funktionierendes Labor.

Herrn Prof. Gerhard Braus danke ich als Mitglied des Betreuungsausschusses für seine Unterstützung und die kontroverse Diskussion meiner Ergebnisse. Bei Herrn Prof. Rolf Daniel, Frau Prof. Stefanie Pöggeler, Herrn PD Dr. Michael Hoppert und Herrn Dr. Oliver Valerius möchte ich mich für die freundliche Übernahme der Gutachten bedanken.

Ich danke Mareike und Lara für die Mithilfe im Labor und die tolle Arbeitsatmosphäre. Auch wenn meine Unordnung euch das ein oder andere Mal verzweifeln ließ, hatten wir immer viel Spaß.

Mein Dank gilt auch Domenica und Niko. Ihr habt die ein oder andere Schwachstelle in der Laborroutine aufgedeckt und mit dazu beigetragen, dass eine Weiterentwicklung unserer Arbeitsgruppe stattgefunden hat. Bei euch sind die vielversprechenden Projekte in guten Händen. Ebenfalls erwähnen möchte ich meine Bachelorstudenten Verena und Debby, die in der Anfangszeit wieder Leben ins Labor gebracht haben.

Ein Dankeschön auch an alle Mitarbeiter des Instituts für Mikrobiologie und Genetik für die Unterstützung der „Neuankömmlinge aus Karlsruhe“ und für die Möglichkeit, die vorhandene Infrastruktur zu nutzen. Besonderer Dank gilt meinem Mitstreiter Karl, der mir Göttingen durch eine Kneipentour näher gebracht und das Leben außerhalb des Labors bereichert hat. Mein größter Dank geht an meine Eltern und meinen Bruder, die mich immer unterstützt, mir jedoch auch die nötige Freiheit gelassen haben. Ihr habt mitgefiebert, mitgelitten und mir immer den Rücken gestärkt.

Lara, ohne diese Arbeit hätte ich dich wohl nie kennen gelernt. Vielen Dank für die schöne Zeit und auch für das Korrekturlesen dieses „literarischen Werks“. Ich freue mich auf unsere gemeinsame Zukunft und auf all das, was noch vor uns liegt!