

**Etablierung der genetischen Modifikation und
Analyse des RNAi-Systems im Brassicaceen-
befallenden Brandpilz *Thecaphora thlaspeos***

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Kristin Bösch
aus Stade

Düsseldorf, April 2024

aus dem Institut für Mikrobiologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Gedruckt mit der Genehmigung der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Berichtersteller:

1. Prof. Dr. Michael Feldbrügge

2. Prof. Dr. Laura Rose

Tag der mündlichen Prüfung: 29. Oktober 2024

Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere an Eides Statt, dass die Dissertation von mir selbst und ohne unzulässige fremde Hilfe unter Beachtung der „Grundsätze zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf“ erstellt worden ist.

Die Dissertation wurde in ihrer jetzigen oder in einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht. Ich habe zuvor keine erfolglosen Promotionsversuche unternommen.

Ort, Datum

Unterschrift

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht in:

Lesley Plücker*, Kristin Bösch*, Lea Geißl, Philipp Hoffmann, Vera Göhre (2021) Genetic Manipulation of the Brassicaceae Smut Fungus *Thecaphora thlaspeos*. *Journal of Fungi*, 7.

Weitere wissenschaftliche Beiträge:

Kristin Bösch*, Lamprinos Frantzeskakis*, Miroslav Vraneš, Jörg Kämper, Kerstin Schipper, Vera Göhre (2016) Genetic manipulation of the plant pathogen *Ustilago maydis* to study fungal biology and plant microbe interactions. *Journal of Visualized Experiments*, 2016.

*Diese Autoren haben gleichermaßen zur Publikation beigetragen.

Die Untersuchungen zur vorliegenden Arbeit wurden von November 2015 bis Oktober 2019 in Düsseldorf an der Heinrich-Heine-Universität im Institut für Mikrobiologie unter der Betreuung von Herrn Prof. Dr. Michael Feldbrügge durchgeführt.

Zusammenfassung

Für gezielten Pflanzenschutz ist Wissen um die molekularen Abläufe in verschiedenen Pilz-Pflanze-Interaktionen hilfreich. Dabei wird unter anderem das RNAi-System verwendet.

Der Brandpilz *Thecaphora thlaspeos* kann Brassicaceen wie *Arabidopsis thaliana* oder *Arabidopsis hirsuta* sowie unter Laborbedingungen *Arabidopsis thaliana* infizieren und bietet daher interessante Forschungsoptionen. Für diese zukünftige molekulare Erforschung wurden hier Methoden zur genetischen Modifikation von *T. thlaspeos* etabliert. Zudem wurde das RNAi-System dieses Pilzes auf Funktionalität und mögliche biologische Verwendung untersucht.

Für die genetische Modifikation wurden aufgrund der Biologie von *T. thlaspeos* und erfolgreicher Methoden verwandter Pilze haploide Filamente aus Flüssigkultur für die Protoplasten-basierte Transformation gewählt. Hierfür konnten geeignete Zellwand-abbauende Enzyme, Puffer und Stabilisatoren identifiziert und zu einem effizienten Protokoll zur Gewinnung intakter Protoplasten optimiert werden. Basierend auf Parametern für zuverlässige Selektion für verschiedene Antibiotika konnten Resistenz-vermittelnde Plasmide hergestellt und erfolgreich in beide Stämme von *T. thlaspeos* transformiert werden. Analysen zeigten, dass beide Transformanten die Konstrukte langfristig stabil exprimieren.

Die Analysen des RNAi-Systems ergaben, dass *T. thlaspeos* Gene für die Schlüsselkomponenten kodiert, die in Domänenarchitektur und Aminosäureidentität ihren Homologen aus verwandten Brandpilzen mit funktionellem RNAi-System ähneln. Als Alternative zur Deletion von Dicer wurden Methoden vorbereitet, die den Nachweis der Funktionalität entweder durch Expression von sRNA-Vorläufermolekülen von einem zweiten transformierten Konstrukt oder durch extern applizierte sRNAs ermöglichen sollten. Die Sequenzierung von sRNAs aus beiden Wildtypen zeigte, dass sRNAs meistens von rDNA-Loci stammen. Zudem weist die Akkumulation 22-24 nt langer sRNAs von Protein-kodierenden und intergenischen Regionen auf Dicer-abhängig generierte siRNAs und miRNAs und die Anhäufung von 30-32 nt langen sRNAs von prä-mRNA auf Dicer-unabhängig produzierte siRNAs hin. Vorhergesagte endogene Zieltranskripte der sRNAs legen nahe, dass *T. thlaspeos* sein RNAi-System zur Regulation des Zellzyklus und zur Kontrolle von Transposons nutzen könnte. Während der Infektion könnten durch pilzliche sRNAs pflanzliche Zieltranskripte mit Funktionen im Endomembrantransport mittels RNAi reguliert werden, wodurch das pflanzliche Immunsystem beispielsweise in der ROS-Bildung, Zellwandzusammensetzung oder Rezeptor-Recycling und -Faltung beeinträchtigt werden könnte. Durch RNAi-vermittelte Regulation weiterer putativer Zieltranskripte könnte indirekt die Synthese und Sekretion pflanzlicher sRNAs in extrazelluläre Vesikel reduziert werden, was wiederum die sRNA-induzierte Manipulation von der Pflanze im Pathogen reduzieren könnte. Auf diese Weise könnte das RNAi-System zum Infektionserfolg von *T. thlaspeos* beitragen.

Summary

For targeted plant protection knowledge about the molecular processes in different fungus-plant interactions is helpful. For this the RNAi-system is utilized, among others.

The smut fungus *Thecaphora thlaspeos* can infect Brassicaceae species such as *Arabis alpina* or *Arabis hirsuta* and, under laboratory conditions, *Arabidopsis thaliana*, which offers interesting research opportunities. For this future molecular research, methods to genetically modify *T. thlaspeos* were established here. Additionally, the fungal RNAi system was analyzed regarding functionality and possible biological utilization.

For the genetic modification, haploid filaments from liquid culture were chosen for the protoplast-based transformation because of the fungal biology and successful methods used in related fungi. For this purpose, suitable cell wall degrading enzymes, buffers and stabilizers were identified and optimized to result in an efficient protocol for the isolation of intact protoplasts. Based on parameters for reliable selection for different antibiotics, resistance-mediating plasmids were produced and successfully transformed into both strains of *T. thlaspeos*. Analyses proved a stable and long-term expression of the constructs in both strains.

The analysis of the RNAi system showed that *T. thlaspeos* encodes the genes for the key components which are similar in domain architecture and amino acid identity to their homologs in related smut fungi with a functional RNAi system. Alternatively to a Dicer deletion strain, methods were arranged that soon should prove the functionality by expression of precursor molecules from a second transformed construct or by external application of sRNAs. Sequencing of sRNAs from both wildtype strains showed that most sRNAs were derived from rDNA loci. Additionally, an accumulation of 22-24 nt sRNAs from protein-coding and intergenic regions suggests Dicer-dependently generated siRNA and miRNA and an enrichment of 30-32 nt sRNA from pre-mRNA hint at Dicer-independently generated siRNA. Predicted endogenous target transcripts of these sRNAs indicate *T. thlaspeos* could use its RNAi system to control its cell cycle and transposons. During the infection, fungal sRNAs could regulate plant target transcripts with roles in endomembrane transport via RNAi, so the plant immune system might get compromised in ROS generation, cell wall composition or receptor recycling and folding. RNAi-induced regulation of further putative target transcripts might indirectly reduce the synthesis and secretion of plant sRNAs in extracellular vesicles whereby the sRNA-mediated manipulation by the plant in the pathogen could be diminished. This way the RNAi system could contribute to the successful infection of *T. thlaspeos*.

Abkürzungsverzeichnis

° C	Grad Celsius	L	Liter
µg	Mikrogramm	LSU	large subunit, große Ribosomen-Untereinheit
µL	Mikroliter	M	Mol
µM	Mikromol	Mbp	Megabasenpaare
Ago	Argonaute	mg	Milligramm
As	Aminosäure(n)	MIC	minimal inhibitory concentration; minimal Wachstum-erlaubende Konzentration
CDS	coding sequence; kodierende Sequenz	miRNA	mikroRNA-like RNA; mikroRNA-ähnliche RNA
ck-RNAi	cross-kingdom-RNAi; Reiche-übergreifende RNAi	Mio.	Million
CMg	Complete-Medium mit Glucose	miRNA	microRNA, kleine RNA
CRISPR/ Cas	<i>clustered regularly interspaced palindromic repeat/CRISPR associated Protein</i>	mL	Milliliter
C-terminal	Carboxyterminal	mM	Millimol
DIC	differential interference contrast; Differentialinterferenzkontrast	mRNA	messenger RNA; Boten-RNA
DIG	Digoxigenin	mtDNA	mitochondriale DNA
DNA	Desoxyribonukleinsäure	nat	Nourseothricin
dsRNA	Doppelsträngige RNA	ncRNA	non-coding RNA; nicht-kodierende RNA
ER	Endoplasmatisches Retikulum	ng	Nanogramm
et al.	und weitere	NHEJ	Non-homologous end joining; Verbindung nicht-homologer Enden
ETI	effector-triggered immunity; Effektor-induzierte Immunität	nm	Nanometer
ETS	extern transkribierter Spacer	nt	Nukleotid(e)
		N-terminal	Aminoterminal
g	Gramm	OD	Optische Dichte
Gfp	Grün-fluoreszierendes Protein	PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
HIGS	host-induced gene silencing; Wirts-induziertes Gen-Silencing	PAMP	pathogen-associated molecular pattern; Pathogen-assoziierte molekulare Strukturen
hpt	Hygromycin-Phosphotransferase	PCR	Polymerase-Kettenreaktion
Hsp70	Hitzeschock-Protein 70	PIGS	Pathogen-induziertes Gen-Silencing
hyg	Hygromycin	pra1	Paarungspheromonrezeptor a1
ITS	intern transkribierter Spacer	qiRNA	Quelling- oder QDE-2-assoziierte RNAs
kb	Kilobase(n)		

Abkürzungsverzeichnis

rDNA	ribosomale DNA	snRNA	small nuclear RNA; kleine nukleäre RNA
RdRP	RNA-dependent RNA-Polymerase; RNA-abhängige RNA-Polymerase	PTI	pathogen-triggered immunity; Pathogen-ausgelöste Immunität
RNA	Ribonukleinsäure	sRNA	small RNA; kleine RNA
RNAi	RNA-Interferenz	ssRNA	single stranded RNA; einzelsträngige RNA
ROS	reactive oxygen species; Reaktive Sauerstoffspezies	SSU	small subunit, kleine Ribosomen-Untereinheit
rpm	rounds per minute; Umdrehungen pro Minute	STTM	short-tandem-target-mimic; kurzes-tandem-Ziel-Imitat
Rps27	Ribosomales Protein S27	tRNA	Transfer-RNA
rRNA	ribosomale RNA	U	Unit
s	Sekunde(n)	UV	Ultraviolett
S	Svedberg	v/v	Volumenprozent
sgRNA	single guide RNA	VIGS	Virus-induziertes Gen-Silencing
SIGS	Sprüh-induziertes Gen-Silencing	w/v	Gewichtsprozent
siRNA	short interfering RNA; kurze interferierende RNA	wt	Wildtyp
SNARE	<i>soluble N-ethylmaleimide sensitive factor attachment protein receptor</i>	YL	YEPS-light-Medium
snoRNA	small nucleolar RNA; kleine nukleoläre RNA	YMPG	Yeast-Malt-Pepton-Glucose-Medium

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	I
Summary	II
Abkürzungsverzeichnis	III
Inhaltsverzeichnis	V
1. Einleitung	1
1.1. Modellsysteme für die Erforschung von Pilz-Pflanze-Interaktionen.....	1
1.2. Molekulare Pilz-Pflanze-Interaktion	2
1.3. Der Brandpilz <i>T. thlaspeos</i>	3
1.4. Genetische Modifikation	5
1.4.1. Transformationsmethode.....	5
1.4.2. Das Ausgangsmaterial	7
1.4.3. Protoplastierung	8
1.4.4. Transformation	9
1.4.5. Zu transformierende DNA.....	10
1.4.6. Regeneration und Selektion	10
1.4.7. Stammverifizierung.....	11
1.5. RNAi.....	13
1.5.1. Das Funktionsprinzip von RNAi	13
1.5.2. RNAi in Pilzen	16
1.5.3. RNAi während der Infektion in Pflanzen	17
1.5.4. Reiche-übergreifende RNAi (ck-RNAi)	18
1.5.5. Nutzung des RNAi-Systems für die Forschung.....	21
1.6. Zielsetzung dieser Arbeit.....	22
2. Ergebnisse	24
2.1. Etablierung von Protokollen zur genetischen Modifikation	24
2.1.1. Kultivierung	24
2.1.2. Protoplastierung	29
2.1.2.1. Identifikation geeigneter Zellwand-abbauender Enzyme	29
2.1.2.2. Optimierung des Protoplastierungspuffers.....	32
2.1.2.3. Optimierung der Enzymmenge	35
2.1.2.4. Etabliertes Protoplastierungsprotokoll	36
2.1.2.5. Analyse der Qualität von Protoplasten	38
2.1.3. Regeneration von Protoplasten	40
2.1.4. Selektionsmarker	42
2.1.4.1. Hygromycin B.....	42
2.1.4.2. Nourseothricin	45

2.1.5.	Plasmide	47
2.1.5.1.	Hygromycin B.....	47
2.1.5.2.	Nourseothricin.....	50
2.1.5.3.	Deletionskonstrukte.....	51
2.1.6.	Transformation.....	52
2.2.	Untersuchungen des RNAi-Systems in <i>T. thlaspeos</i>	56
2.2.1.	<i>T. thlaspeos</i> besitzt die RNAi-Schlüsselkomponenten.....	56
2.2.2.	Erfassung des sRNA-Inventars	58
2.2.2.1.	Annotation von ncRNAs	61
2.2.2.1.1.	Annotation von rRNAs	62
2.2.2.1.2.	Annotation von tRNAs.....	64
2.2.2.1.3.	Annotation anderer ncRNAs	65
2.2.2.2.	Herstellung von sRNA-Bibliotheken.....	67
2.2.2.3.	Reproduzierbarkeit.....	70
2.2.2.4.	Analyse der Entstehungsregionen von sRNAs	72
2.2.2.5.	Vorhersage potentieller endogener Zieltranskripte von sRNAs.....	76
2.2.2.6.	Vorhersage potentieller Zieltranskripte für HIGS	79
3.	Diskussion.....	83
3.1.	Genetische Modifikation	83
3.1.1.	Effiziente Gewinnung stabiler Protoplasten	84
3.1.2.	Verbesserung der Regeneration.....	85
3.1.3.	Optimierungen zur Steigerung der Transformationseffizienz	87
3.1.3.1.	Einbringen der DNA in die Protoplasten	88
3.1.3.2.	Integration der DNA in das Genom.....	89
3.2.	Das RNAi-System in <i>T. thlaspeos</i>	92
3.2.1.	Bioinformatische Untersuchung der Funktionalität der RNAi-Schlüsselkomponenten	92
3.2.2.	Experimentelle Untersuchung der Funktionalität der RNAi-Schlüsselkomponenten	93
3.2.3.	sRNAs kartieren in <i>T. thlaspeos</i> überwiegend auf rDNA-Loci.....	96
3.2.4.	Herstellung von sRNAs in <i>T. thlaspeos</i>	98
3.2.4.1.	Potentielle siRNAs und miRNAs.....	98
3.2.4.2.	Potentielle Dicer-abhängige und Dicer-unabhängige sRNAs.....	100
3.2.5.	Potentielle endogene Funktionen der sRNAs von <i>T. thlaspeos</i>	101
3.2.5.1.	Zieltranskripte mit bekannter Regulation durch RNAi in anderen Pilzen .	102
3.2.5.2.	Zieltranskripte mit bekannter Regulation durch RNAi in anderen Organismen	104
3.2.5.3.	Zieltranskripte mit Ähnlichkeit zu RNAi-regulierten Prozessen in anderen Organismen	105

3.2.5.4.	Zieltranskripte ohne bekannte Regulation durch RNAi in anderen Organismen	108
3.2.5.5.	Verifikation der sRNA-Funktion im Pilz.....	111
3.2.5.6.	Modell endogener RNAi in <i>T. thlaspeos</i>	112
3.2.6.	Potentielle Funktionen des RNAi-Systems während der Infektion von Pflanzen.	115
3.2.6.1.	Potentielle Regulation des pflanzlichen Endomembrantransports durch PIGS	116
3.2.6.2.	PIGS könnte (in)direkt pflanzliche Immunität, Zellteilung und Embryogenese regulieren	122
3.2.6.3.	PIGS in anderen Pathogen-Pflanze-Interaktionen	127
3.2.6.4.	Optimierungen und weiterführende Experimente.....	129
3.2.6.5.	Modell von ck-RNAi während der Infektion von <i>T. thlaspeos</i> in <i>A. hirsuta</i>	131
3.3.	Ausblick.....	134
4.	Material und Methoden	137
4.1.	Material und Bezugsquellen	137
4.1.1.	Chemikalien, Puffer, Lösungen, Medien, Enzyme und Kits.....	137
4.1.2.	Oligonukleotide	141
4.1.3.	Plasmide	142
4.1.4.	Stämme.....	149
4.1.5.	Zentrifugen.....	151
4.1.6.	Sonstige Materialien.....	151
4.2.	Mikrobiologische, zellbiologische und genetische Methoden	151
4.2.1.	Arbeiten mit <i>E. coli</i>	152
4.2.2.	Arbeiten mit <i>U. maydis</i>	153
4.2.3.	Arbeiten mit <i>T. thlaspeos</i>	154
4.3.	Molekularbiologische Methoden	158
4.3.1.	Isolierung von Nukleinsäuren	158
4.3.2.	Arbeiten mit Nukleinsäuren	160
4.3.3.	Polymerase-Kettenreaktion	162
4.3.4.	Auftrennung und Nachweis von Nukleinsäuren	163
4.3.5.	Sequenzierung.....	165
4.4.	Mikroskopie und Bildbearbeitung.....	166
4.4.1.	Mikroskop-Aufbau und Steuerung	166
4.4.2.	Fluoreszenzmikroskopie.....	166
4.5.	RNA-biochemische Methoden.....	166
4.6.	Bioinformatische Analysen	171
4.6.1.	Bioinformatische Analyse der sRNA-Sequenzierungsdaten	171

4.6.2. Verwendete Programme	174
5. Publikationen.....	176
6. Literaturverzeichnis	178
7. Ergänzende Daten	199
8. Anhang.....	200

1. Einleitung

1.1. Modellsysteme für die Erforschung von Pilz-Pflanze-Interaktionen

Pilze stellen durch anhaltende Infektionen eine Bedrohung für die Nahrungsmittelsicherheit dar (Fisher et al., 2012). Darunter führen Brandpilze zu deutlichen Ertragsverlusten bei Nutzpflanzen wie Mais, Weizen, Gerste oder Kartoffeln (Schirawski et al., 2010, Lanver et al., 2018, van der Linde and Göhre, 2021, Xia et al., 2020, Ali et al., 2014a, Andrade et al., 2004, Kronstad, 1996). Die Ertragsverluste betragen beispielsweise für *Thecaphora solani* bis zu 85 % bei Kartoffeln in der Andenregion und für *Thecaphora frezii* bis zu 51 % bei Erdnüssen (Andrade et al., 2004, Conforto et al., 2013). Um die Mechanismen während der Pilz-Pflanze-Interaktionen zu verstehen und neue Methoden für die Pathogenbekämpfung zu etablieren, ist Wissen um die Infektionsstrategien und involvierte molekularbiologischen Faktoren hilfreich. Die genetische Modifikation ist dabei besonders hilfreich, da sie es ermöglicht, die Funktion einzelner Gene bzw. Proteine zu untersuchen. Obwohl mehrere Brandpilze und ihre Wirtspflanzen genetisch modifiziert werden können, sind molekulare Studien an diesen Pflanzen aufgrund ihrer komplexen Genome aufwendig (Wang et al., 1988, Yadava et al., 2017, Ökmen et al., 2021, Bartlett et al., 2008, Ghareeb et al., 2019, Belide et al., 2017, Bösch et al., 2016, Rabe et al., 2016, Frantzeskakis et al., 2017). Daher werden neue Modellsysteme etabliert. Ein solches Modellsystem besteht aus dem Brandpilz *Ustilago bromivora* und *Brachypodium*-Spezies, die wie Mais zu der Familie der Poaceae gehören (Rabe et al., 2016). Für *U. bromivora* konnte durch die Etablierung der genetischen Modifikation bereits der Lebenszyklus von der Paarung über die Infektion und die Sporidienbildung bis hin zur Bildung neuer Sporidien und der damit verbundenen Segregation bei der Meiose nachvollzogen werden (Rabe et al., 2016). Dies lässt darauf hoffen, dass zur Klärung der molekularen Interaktion bald Studien mit beiden genetisch modifizierten Interaktionspartnern veröffentlicht werden.

Ein weiteres Modellsystem in der Etablierungsphase besteht aus *Thecaphora thlaspeos* und seinen zweikeimblättrigen Wirtspflanzen, zu denen unter anderem die mehrjährige Modellpflanze *Arabis alpina* gehört (Frantzeskakis et al., 2017). Dieser Pilz bietet den enormen Vorteil, dass er unter Laborbedingungen auch *Arabidopsis thaliana* infizieren kann, eine Modellpflanze mit einem übersichtlichen, modifizierbaren Genom und umfangreichem Wissen über dessen Immunsystem (Frantzeskakis et al., 2017). Weitere offene Fragen, zu deren Beantwortung die Forschung an *T. thlaspeos* beitragen könnte, sind Unterschiede in molekularen Aspekten zum Befall von ein- und mehrjährigen Pflanzen sowie von ein- und zweikeimblättrigen Pflanzen (van der Linde and Göhre, 2021, Sharma et al., 2014,

Hemetsberger et al., 2015, Frantzeskakis et al., 2017). Die Etablierung von *T. thlaspeos* als Modellorganismus könnte daher die Erforschung von Brandpilz-Wirtspflanzen-Interaktion beschleunigen und diversifizieren. Tatsächlich wird bereits versucht, Parallelen zwischen dem agronomisch relevanten Brandpilz *T. frezii* und *T. thlaspeos* zu ziehen, da erste Studien bereits Beispiele für Komponenten in der Pilz-Pflanze-Interaktion identifizieren konnten (Arias et al., 2021, Frantzeskakis et al., 2017, Courville et al., 2019).

1.2. Molekulare Pilz-Pflanze-Interaktion

Während der biotrophen Infektion muss das pflanzliche Immunsystem weitestgehend überlistet werden. Das pflanzliche Immunsystem erkennt Mikroben an konservierten Molekülen, sogenannten Pathogen-assoziierten molekularen Strukturen (*pathogen-associated molecular patterns*, PAMPs) wie Chitin oder Flaggelin durch meist in der Plasmamembran lokalisierte Rezeptoren (*pattern recognition receptors*, PRRs) (Nguyen et al., 2021). Die Aktivierung dieser PRRs löst erste unspezifische Abwehrreaktionen aus und wird als Pathogen-ausgelöste Immunität (*pathogen-triggered immunity*, PTI) bezeichnet (Xia et al., 2020). Hierbei kann es sich beispielsweise um apoplastische reaktive Sauerstoffspezies (ROS) handeln, die dem Pathogen schaden können, oder um Callose-Ablagerungen, die die Zellwand verstärken und so die Invasion der Mikrobe stören sollen (Göhre and Robatzek, 2008, Nguyen et al., 2021). Sekretierte Effektoren von Pilzen können zu einer erfolgreichen Infektion führen, indem diese PTI hemmen (Xia et al., 2020). Ein Beispiel ist der Effektor Pep1, der während der Infektion durch *Ustilago maydis* und weiteren Brandpilzen wie *Ustilago hordei* den PAMP-ausgelösten apoplastischen Anstieg von ROS unterdrückt und so das Eindringen in die Epidermis ermöglicht (Zuo et al., 2019, Lanver et al., 2017). Ein weiteres Beispiel ist der Effektor Cce1, der in mehreren Brandpilzen, darunter *U. maydis* und *U. bromivora*, konserviert ist und die Callose-Akkumulation an der Infektionsstelle reduziert und so zum Infektionserfolg beiträgt (Xia et al., 2020). Weiterhin ist die Proteinsequenz von See1 in vielen Brandpilzen konserviert, aber die Funktion dieses Effektors scheint an die Wirtspflanze angepasst zu sein, da er in der *U. maydis*-Mais-Interaktion die pflanzliche Zellteilung stimuliert, das Ortholog aus *U. hordei* den Deletionsphänotyp aus *U. maydis* aber nicht komplementieren konnte (Lanver et al., 2017, Zuo et al., 2019). Pflanzliche Rezeptoren können diese Effektoren wiederum wahrnehmen und Effektor-induzierte Immunität (*effector-triggered immunity*, ETI) auslösen (Xia et al., 2020). Beispielsweise agiert das Resistenzprotein Ruh1 aus Gerste gegen den Effektor UhAVR1 aus *U. hordei*, wodurch es zum Zelltod um die Infektionsstelle kommt, wodurch die Ausbreitung des Pilzes gestoppt werden soll (Montenegro Alonso et al., 2020). Diese Resistenzgene können wiederum durch pilzliche Effektoren antagonisiert werden, sodass ein evolutionärer Wettlauf im Infektionsgeschehen entsteht (Xia et al., 2020).

Neben Protein-Effektoren gibt es auch RNA-Effektoren, auf die in Kapitel 1.5 „RNAi“ näher eingegangen wird. Die kleinen RNAs können von beiden Interaktionspartnern nicht nur zur Regulation der endogenen Genexpression, sondern auch zur Modulation des Infektionsgeschehens genutzt werden (Nicolás and Garre, 2016, Weiberg et al., 2013). Das RNAi-System, in dem sie agieren, ist von besonderem Interesse für die Erforschung der Pilz-Pflanze-Interaktion und für die allgemeine genetische Forschung, da es die Nutzung von Modellsystemen mit und ohne Methoden zur genetischen Modifikation unterstützen kann (Mahanty et al., 2023, Malavia et al., 2020).

1.3. Der Brandpilz *T. thlaspeos*

Brandpilze sind eine nicht monophyletische Gruppe biotropher Pilze, die dunkle Teliosporen in der Pflanze bilden, aber durchaus Unterschiede bei der Kolonisierung zeigen (Arias et al., 2021, van der Linde and Göhre, 2021). So keimen Teliosporen von *T. thlaspeos* im Gegensatz zu allen untersuchten Brandpilzen erst, wenn ein weit verbreitetes, noch unbekanntes Pflanzensignal vorhanden ist (Abbildung 1) (Frantzeskakis et al., 2017). Während sich aus Teliosporen der Gräser infizierenden Brandpilze *U. maydis*, *Sporisorium reilianum* und *U. hordei* haploide Sporidien entwickeln, die mit einem kompatiblen Partner paaren bevor sie ein dikaryotisches, pathogenes Filament bilden, entsteht bei *T. thlaspeos* ein Filament, das direkt die Wirtspflanze infizieren kann (Frantzeskakis et al., 2017, Ghareeb et al., 2019, Ökmen et al., 2021). Andere *Thecaphora*-Spezies wie *Thecaphora solani* keimen ebenfalls als Filamente (Andrade et al., 2004). Die Paarungsgene von *U. maydis* bestehen aus je einem Gen kodierend für das Paarungspheromon *mfa1* bzw. *mfa2* sowie für einen entsprechenden Pheromonrezeptor *pra1* bzw. *pra2*, welche für die Plasmogamie zweier kompatibler Zellen benötigt werden (Vollmeister et al., 2012). Zudem werden in *U. maydis* kompatible Allele der Gene *bW* und *bE* benötigt, um den dimorphischen Wechsel von hefeartigem zu filamentösem Wachstum einzuleiten, welches wiederum die Infektion der Wirtspflanze ermöglicht (Vollmeister et al., 2012). Die beiden derzeit kultivierten *T. thlaspeos*-Isolate LF1 und LF2 besitzen Homologe dieser Gene von *U. maydis* und sind in der Lage zu paaren (Frantzeskakis et al., 2017, Plücker et al., 2021). *T. thlaspeos* infiziert verschiedene Brassicaceae in Europa, darunter *Arabis alpina*, *Arabis hirsuta* und *Arabidopsis lyrata* sowie unter Laborbedingungen *Arabidopsis thaliana* (Frantzeskakis et al., 2017). Damit ist er wie beispielsweise *Melanopsichium pennsylvanicum*, *T. solani* oder *T. frezii* ein Brandpilz, der zweikeimblättrige Pflanzen befällt (Courville et al., 2019, van der Linde and Göhre, 2021). Wie *S. reilianum* und *U. hordei* infiziert *T. thlaspeos* seine Wirtspflanzen systemisch ohne offensichtliche Symptome bis zur Blütenbildung (Ökmen et al., 2018, Schirawski et al., 2010, Frantzeskakis et al., 2017). Dabei wachsen sowohl *T. thlaspeos* als auch *U. hordei* entlang der Leitbündel (Frantzeskakis et al., 2017, Ökmen et al., 2018). In den mehrjährigen Wirtspflanzen wie *A. hirsuta* findet man

T. thlaspeos erst nach der Vernalisierung im Spross und allen anhängenden Organen, bevor er schließlich in den Schoten Teliosporen bildet, die das Saatgut bedecken oder es ersetzen (Frantzeskakis et al., 2017). Darüber hinaus kann *T. thlaspeos* in seiner mehrjährigen Wirtspflanze überwintern (Frantzeskakis et al., 2017).

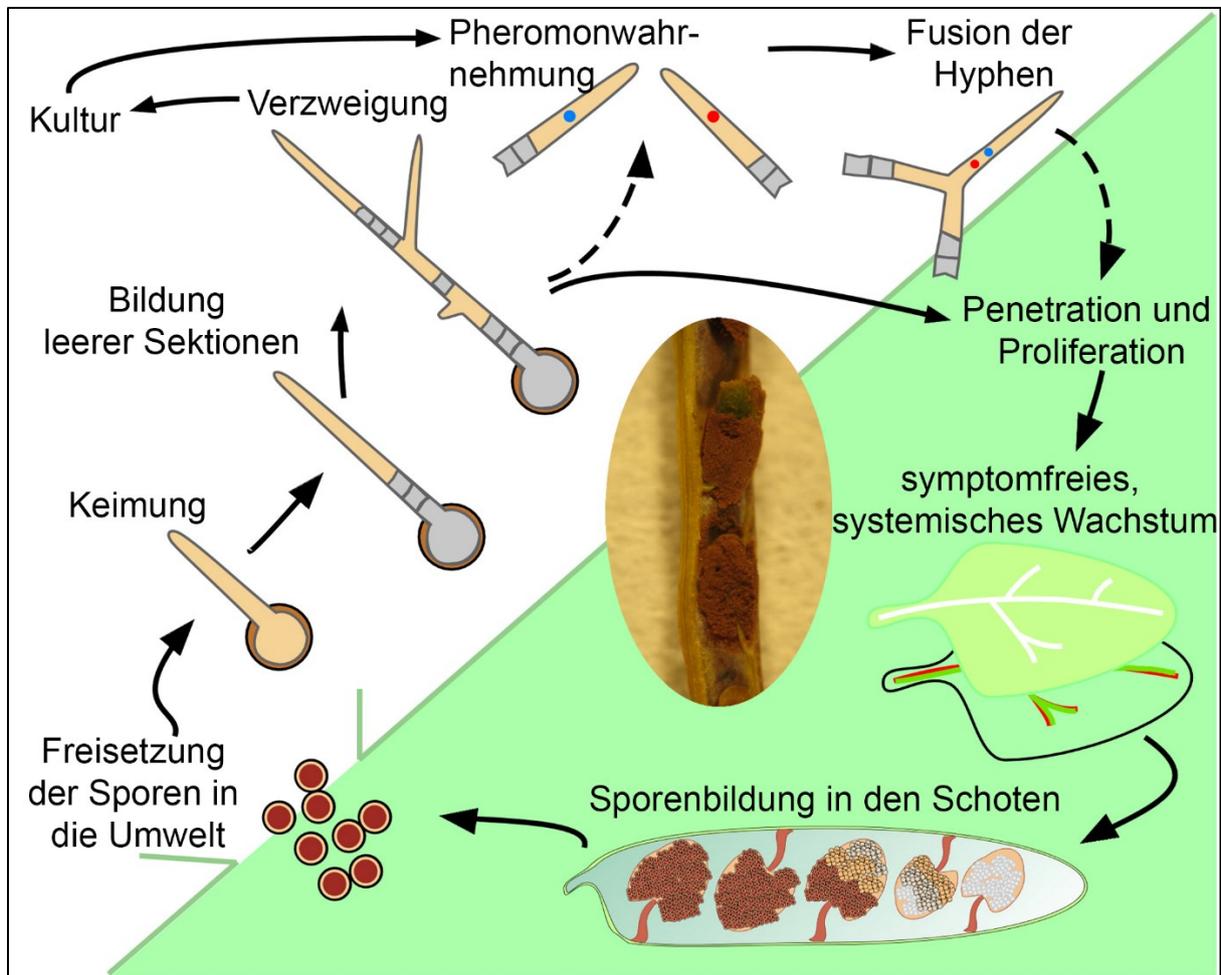


Abbildung 1 Lebenszyklus von *T. thlaspeos*. Teliosporen von *T. thlaspeos* werden aus den Schoten (mittleres Bild) in die Umwelt freigesetzt oder verbreiten sich zusammen mit dem Saatgut. Sie keimen in Anwesenheit eines noch unbekanntes Pflanzensignals filamentös aus. Zunächst werden basal sogenannte leere Sektionen gebildet, bevor die Verzweigung zum Myzel beginnt. Das Myzel kann axenisch kultiviert werden. Filamente aus gekeimten Sporen können direkt die Pflanze infizieren. Alternativ können Isolate verschiedener Paarungstypen sich wahrscheinlich anhand von Pheromonen erkennen, an den Hyphenspitzen fusionieren und anschließend filamentös auswachsen. Aufgrund von Ähnlichkeiten zu anderen Brandpilzen kann dieses vermutlich dikaryotische Filament wahrscheinlich die Wirtspflanze infizieren. Die Infektion erfolgt über die Wurzel oder durch Appressorien-ähnliche Strukturen auf Blättern. *T. thlaspeos* proliferiert systemisch entlang der Leitbündel ohne offensichtliche Symptome hervorzurufen bis die Sporen in den Schoten das Saatgut der Pflanze überziehen oder ersetzen. Die Abbildung wurde modifiziert nach (Frantzeskakis et al., 2017) (Abb. 8).

Zur Etablierung von *T. thlaspeos* als Modellpilz wurde bereits für beide Isolate das Genom sequenziert, assembliert und Protein-kodierende Gene annotiert (Courville et al., 2019). Es ist

vergleichbar zu anderen etablierten Brandpilzen, da es ein kleines Genom von ca. 20,5 Mbp mit 22-24 Chromosomen und einem geringen Anteil an repetitiven DNA-Abschnitten (Repeats) besitzt (Courville et al., 2019). In LF1 wurden 6239 manuell kuratierte Protein-kodierende Gene vorhergesagt (Courville et al., 2019). Die Genome von LF1 und LF2 weisen zwar eine hohe Ähnlichkeit auf, sind aber nicht vollkommen identisch (Courville et al., 2019). Beispielsweise gibt es 11509 Einzelnukleotid-Polymorphismen zwischen den beiden Isolaten (Courville et al., 2019). Das LF1-Genom konnte auf 32 Scaffolds und das LF2-Genom auf 537 meist deutlich kürzeren Scaffolds assembliert werden (Courville et al., 2019). Zudem umfasst die Genannotation für LF2 mit 6504 Genmodellen, die nachträglich nicht manuell kuratiert worden sind, mehr Genmodelle als für LF1 (Courville et al., 2019). Darüber hinaus wurden 31 Genmodelle nicht im jeweils anderen Isolat identifiziert (Courville et al., 2019). Insgesamt ist die Anzahl der annotierten Gene in LF1 vergleichbar zum Pathogen für zweikeimblättrige Pflanzen, *M. pennsylvanicum*, aber etwas geringer als für die sequenzierten Brandpilze, die einkeimblättrige Pflanzen befallen (Courville et al., 2019, Rabe et al., 2016). Unter den vorhergesagten Protein-kodierenden Genen waren verbreitete Effektoren von Brandpilzen wie den Peroxidase-Inhibitor Pep1, aber auch neue Effektoren, deren Signifikanz für den Infektionserfolg durch heterologe Expression in *U. maydis* oder *A. thaliana* bestätigt werden konnte (Courville et al., 2019). Für nähere Untersuchungen wären Deletionsstämme in *T. thlaspeos* wünschenswert.

1.4. Genetische Modifikation

Für die Untersuchung verschiedener Effektoren wären genetisch veränderte Laborstämme hilfreich. Für die Transformation können verschiedene Methoden, unterschiedliches pilzliches Ausgangsmaterial sowie weitere Faktoren wie Selektionsmarker und DNA-Sequenzen gewählt werden (Kawai et al., 2010, Meyer, 2008, Tomico-Cuenca et al., 2021).

Im Rahmen dieser Dissertation wurden die bestehenden Protokolle zur genetischen Modifikation von *U. maydis* als Ausgangspunkt verwendet (Brachmann et al., 2004, Terfrüchte et al., 2014). Insbesondere die Handhabung kritischer Schritte wurde im Rahmen dieser Dissertation in einem Videoformat mit Protokoll publiziert (Bösch et al., 2016). Basierend auf diesen Protokollen von *U. maydis* und unterstützt durch Transformationsprotokolle weiterer Pilze sollte hier die genetische Modifikation von *T. thlaspeos* etabliert werden.

1.4.1. Transformationsmethode

Für Pilze wurden verschiedene Transformationstechniken erfolgreich etabliert. Jedoch ist schwer vorherzusagen, welche Technik für welchen Organismus gut funktioniert, und jede muss individuell angepasst werden (Meyer, 2008).

Für verschiedene Verwandte von *T. thlaspeos* wie *U. maydis*, *S. reilianum* oder *Ustilago bromivora* wurden Protokolle zur Protoplastierung mit anschließender Polyethylenglycol (PEG)-Transformation etabliert (Schulz et al., 1990, Gillissen et al., 1992, Bösch et al., 2016, Ghareeb et al., 2015, Rabe et al., 2016). Diese kostengünstige Methode funktioniert auch bei filamentösen Pilzen wie *Serendipita indica* (früher: *Piriformospora indica*), *Neurospora crassa* oder *Fusarium graminearum* (Osman et al., 2020, Cairns et al., 2016, Li et al., 2017a, Zuccaro et al., 2009). Protoplasten können aus unterschiedlichem Ausgangsmaterial wie Sporen, gekeimten Sporen oder Hyphen durch Zellwand-abbauende Enzyme gewonnen werden (Meyer, 2008, Rivera et al., 2014). Mit Hilfe von PEG und Calciumchlorid wird die DNA in die Protoplasten aufgenommen (Li et al., 2017a). Bei mycelartig wachsenden Pilzen würden zusammenhängende, aber möglicherweise nicht oder unterschiedlich modifizierte Zellabschnitte verbunden bleiben, wodurch ein Austausch von Molekülen durch die Poren der Septen möglich wäre (Kim et al., 2015). Daher stellt die räumliche Trennung der transformierten Protoplasten auf Festmedium einen Vorteil dieser Methode dar. Nachteile dieser aufwendigen Methode sind zum einen die häufig auftretenden multiplen Insertionen der Fremd-DNA und zum anderen die vielen kritischen Schritte, die bei der Etablierung individuell getestet werden müssen (Li et al., 2017a, Meyer, 2008). Außerdem wurde ein Einfluss der Enzym-Charge auf die Transformationsrate berichtet (Meyer, 2008). Bei der *Agrobacterium*-vermittelten Transformation werden die Bakterien mit dem Pilz co-kultiviert (Meyer, 2008). Dabei nutzt *Agrobacterium tumefaciens* die auf dem T-Vektor kodierten Virulenzgene für den Transfer von DNA eines zweiten sogenannten binären Vektors, auf welchem sich das zu transferierende Konstrukt zwischen zwei imperfekten Repeats befindet (Meyer, 2008). Auch bei dieser effizienten Methode kann unterschiedliches Ausgangsmaterial wie Sporen, Hyphen, Fruchtkörper oder Protoplasten verwendet werden (Li et al., 2017a). Zudem kommt es oft zu einer niedrigen Anzahl an Insertionen und es kann zu einer hohen Rate homologer Rekombinationsereignisse kommen (Li et al., 2017a). Diese Methode ist allerdings zeitaufwändig und die Transformationsrate abhängig von vielen Parametern während der Co-Kultivierung wie Verhältnis von Pilz- und Bakterienzellen, Temperatur und Zeit (Meyer, 2008, Wang et al., 2017c).

Bei der Elektroporation wird durch eine angelegte Spannung die Membranpermeabilisierung geändert, wodurch DNA in die Zellen aufgenommen werden kann (Meyer, 2008). Sie wird beispielsweise für *Cryptococcus*-Spezies oder *Fusarium oxysporum* verwendet (Wang, 2021, Liang et al., 2014). Es ist eine einfache, effiziente und günstige Methode, welche mit unterschiedlichem Ausgangsmaterial wie Sporen, Konidien und zum Teil intakten Zellen durchgeführt werden kann (Meyer, 2008, Rivera et al., 2014). Oft ist dafür aber die Generierung von Protoplasten nötig (Rivera et al., 2014). Darüber hinaus muss ein Elektroporationssystem angeschafft werden (Wang, 2021). Auch hier muss eine Vielzahl an

Parametern wie Pufferkomposition, pH-Wert und einige zelluläre und elektrische Parameter optimiert werden (Rivera et al., 2014).

Eine weitere Methode ist die Biolistik. Hierbei werden Partikel, die kleiner als eine Pilzzelle sind, mit DNA beladen und so beschleunigt, dass sie die Pilzzelle passieren und die DNA in der Zelle hinterlassen (Rivera et al., 2014). Dies ist oft eine gute Alternative, wenn Pilze schwer kultivierbar sind oder eine Protoplastierung nicht funktioniert (Li et al., 2017a). Sie ist aber teuer, resultiert oft in einer niedrigen Transformationseffizienz und benötigt spezielle Geräte, um die Partikel mit DNA zu beschichten und sie mit hoher Geschwindigkeit auf die Zellen treffen zu lassen (Rivera et al., 2014, Meyer, 2008). Sie wird zum Beispiel in *Cryptococcus neoformans* verwendet.

Eine einfache, schnelle und sichere Methode, um Zellen genetisch zu verändern, ist die Agitation mit Glasperlen (Rivera et al., 2014). Hierbei werden die Zellen mit Glasperlen, Träger- und Plasmid-DNA schüttelnd inkubiert (Rivera et al., 2014). Die Glasperlen sollen die Zellen beschädigen, sodass sie ohne osmotische Unterstützung nicht mehr anwachsen können (Gietz and Woods, 2001). Dies lässt vermuten, dass die DNA durch die Beschädigung in die Zelle gelangen kann. Das Resultat ist jedoch eine der niedrigsten Transformationseffizienzen (Rivera et al., 2014). Diese Methode wurde beispielsweise für *S. cerevisiae* getestet (Rivera et al., 2014).

Schließlich gibt es die Schockwellen-vermittelte Transformation (Rivera et al., 2014, Li et al., 2017a). Durch Schockwellen kann eine transiente akustische Kavitation erzeugt werden, welche die Membranpermeabilität ändert, woraufhin DNA in die Zellen aufgenommen werden kann (Li et al., 2017a). Es ist eine einfache Methode mit hoher Effizienz, die ohne Protoplastierung auskommt und auch mit Sporen durchgeführt werden kann (Rivera et al., 2014, Li et al., 2017a). Allerdings sind die Anschaffungskosten hoch (Rivera et al., 2014). Diese Methode wurde für *Aspergillus niger* getestet (Li et al., 2017a).

Da die Protoplastierung mit anschließender PEG-Transformation bei verwandten und auch bei anderen filamentösen Pilzen etabliert wurde und aufgrund der Möglichkeit der Vereinzelung der Zellen mit einzelnen Transformationsereignissen, soll diese Methode für *T. thlaspeos* etabliert werden.

1.4.2. Das Ausgangsmaterial

Im nächsten Schritt wurde das zu transformierende Pilzmaterial festgelegt. Es ist grundsätzlich möglich, Sporen und Filamente zu protoplastieren (Meyer, 2008). Es gibt allerdings einige Aspekte, die bei der Wahl des Ausgangsmaterials berücksichtigt werden sollten. Das Ausgangsmaterial für Transformationen sollte idealerweise in großen Mengen verfügbar sein, da die Etablierung viele verschiedene Analysen benötigt. Genetisch identisches Ausgangsmaterial verhindert einerseits genetische Einflüsse auf die Transformationsrate

(Kawai et al., 2010) und ermöglicht andererseits genetisch klar definierte Transformanten. Studien an haploiden Zellen vereinfachen die Herstellung von Nullmutanten im Vergleich zu di- oder polyploiden Zellen (Cui et al., 2020a). Langfristig ist ein sequenziertes Genom von Vorteil, um gezielte Modifikationen planen zu können (Cairns et al., 2016). All diese Aspekte sprechen bei *T. thlaspeos* für die Verwendung von Filamenten, da diese in großen Mengen angezogen werden können, aus genetisch identischen, haploiden Zellen bestehen und ihr Genom bereits sequenziert ist (Frantzeskakis et al., 2017, Courville et al., 2019). Gegen die Verwendung von Filamenten spricht, dass mit diesen bislang im Gegensatz zu Sporen noch keine Infektion nachgewiesen wurde. Möglicherweise müssten die haploiden Filamente aus der Flüssigkultur zuvor paaren (Frantzeskakis et al., 2017). Für diese Analyse wären Paarungspartner hilfreich, die unterschiedliche Fluorophore exprimieren. Diese Argumente legen die Verwendung von Filamenten nahe.

T. thlaspeos ist axenisch in Flüssig- und Festmedium kultivierbar (Frantzeskakis et al., 2017), allerdings war für die Transformation eine einheitliche Qualität und zuverlässiges Wachstumsverhalten nötig. Daher sollten verschiedene Kulturmedien und verschiedene Geliemittel getestet werden. Sobald die entsprechenden Gerätschaften und Stämme verfügbar wurden, sollte darüber hinaus die Kultivierung in niedrigem Kulturvolumen mit Echtzeitverfolgung von Biomasse und Fluoreszenz etabliert werden.

1.4.3. Protoplastierung

Zur Gewinnung von Protoplasten muss die Zellwand enzymatisch oder seltener auch durch physikalische, aber weniger effiziente Methoden degradiert werden (Li et al., 2017a). Die pilzliche Zellwand schützt die Zelle vor physikalischem Stress, bildet ein Gerüst für Zellwand-assoziierte Proteine, die wiederum die Polysaccharid-haltigen Komponenten der Zellwand vor degradierenden Enzymen schützt (Klis et al., 2006). Darüber hinaus formt und stabilisiert die Zellwand und verhindert so durch den Gegendruck das Platzen der Zelle aufgrund meist höherer Osmolarität im Cytoplasma (Klis et al., 2006). Die Zellwand von Pilzen besteht meist aus Chitin, welches aus beta-1,4-glykosidisch verknüpften N-Acetylglucosaminen besteht, einer Schicht aus Glucanen, die meist aus beta-1,3-glykosidisch verknüpfter Glucose besteht, und Glykoproteinen (Langner et al., 2015, Bowman and Free, 2006, Klis et al., 2006). Sie kann in ihrer Zusammensetzung innerhalb einer Spezies während des Lebenszyklus sowie zwischen Spezies variieren (Li et al., 2017a). Deshalb ist eine individuelle Anpassung der Enzyme für die Protoplastierung wichtig. Eine Kombination von Enzymen kann notwendig sein, und scheint neben dem Testen von Protokollen nahe verwandter Pilze eine gute Strategie zu sein (Ghareeb et al., 2015, Bösch et al., 2016, Rabe et al., 2016, de Bekker et al., 2009). Darüber hinaus muss der Protoplastierungspuffer nicht nur die Aktivität der gewählten Enzyme gewährleisten, sondern auch die Protoplasten stabilisieren, da diese sensitiv gegenüber

Osmose sind (Li et al., 2017a). Weiterhin müssen ggf. die optimale Temperatur und Inkubationszeit für Enzyme und Pilzmaterial gefunden werden (Li et al., 2017a). Zu dieser Methode bestanden bereits Publikationen zu *U. maydis*, die während dieser Dissertation in Form eines Videos mit Protokoll, insbesondere mit den kritischen Schritten, aufbereitet und veröffentlicht wurden (Bösch et al., 2016, Brachmann et al., 2004, Terfrüchte et al., 2014). Während der Protoplastierung sind dies hauptsächlich die Vermeidung von osmotischem und mechanischem Stress, aber auch eine ausreichende Inkubationszeit mit den Protoplastierungsenzymen (Bösch et al., 2016).

1.4.4. Transformation

Auch während der Transformation müssen die Protoplasten osmotisch stabilisiert werden (Li et al., 2017a). Die Transformation dient dazu, die Fremd-DNA in die Zelle bzw. den Protoplasten zu bringen. Dazu muss die zunächst extrazellulär vorliegende Fremd-DNA intakt bleiben und durch die Plasmamembran und im Falle der Integration in das Genom schließlich in den Zellkern gelangen. Die Inhibierung von Nukleasen wird bei Transformationen vermutlich durch Zusätze wie Heparin vermittelt, welches aufgrund seiner negativen Ladung möglicherweise mit DNA um deren Bindung konkurriert (Bauchwitz, 1991). Die Mischung aus Protoplasten, DNA und ggf. Heparin wird oft einige Minuten auf Eis inkubiert, damit die DNA sich an die Oberfläche der Protoplasten anlagern kann (Li et al., 2017a, Bösch et al., 2016, Rabe et al., 2016, Yu et al., 2015, Zuccaro et al., 2009). Die Aufnahme der DNA in die Zelle soll durch Calciumchlorid und PEG vermittelt werden (Li et al., 2017a). Dazu soll Calciumchlorid Kanäle in der Plasmamembran öffnen (Li et al., 2017a). Es gibt zwei Theorien, wie die DNA mit Hilfe von PEG in die Zelle gelangt. Zum einen geht man davon aus, dass Protoplasten fusionieren und die DNA dabei aufgenommen wird (Gietz and Woods, 2001). Zum anderen soll PEG die Membranpermeabilität ändern und die Adhäsion zwischen Membran und DNA verbessern, so dass Nukleinsäuren leichter in die Zelle gelangen können (Li et al., 2017a). Außerdem wird vermutet, dass Endocytose an der Aufnahme von DNA beteiligt sein könnte (Kawai et al., 2010). Darüber hinaus soll PEG Einfluss auf das Transkriptom und das Metabolom bei Stressantworten haben (Kawai et al., 2010). Nachdem die DNA möglicherweise über Endocytose in die Zelle aufgenommen wurde, ist unklar wie sie in den Zellkern gelangt (Kawai et al., 2010).

Darüber hinaus sind für den Transformationserfolg einige Faktoren bezüglich der Fremd-DNA und Aspekte zum Einbau der DNA ins Genom relevant, die im nächsten Abschnitt erläutert werden.

1.4.5. Zu transformierende DNA

Nachdem die DNA in die Zelle gelangt ist, kann sie, je nach Möglichkeiten des Organismus und der DNA-Sequenz, entweder extrachromosomal als Plasmid oder Minichromosom erhalten bleiben, zufällig oder gezielt in das Genom integriert oder aber degradiert werden (Arras and Fraser, 2016). Für die Forschung sind insbesondere die Generation von Gendeletionen oder Punktmutationen, die zeitliche oder quantitative Änderung der Genexpression, die Fusionierung eines Gens mit einem Markergen oder auch die Expression heterologer Gene relevant. Um während der Infektionsexperimente keinen Selektionsdruck für den Erhalt der Plasmide aufrecht erhalten zu müssen, soll in dieser Arbeit ein Protokoll für die Integration der DNA in das Genom etabliert werden. Um Fremd-DNA in die genomische DNA zu integrieren, werden die zelleigenen Mechanismen zur Reparatur von Doppelstrangbrüchen, die Verbindung nicht-homologer Enden (*non-homologous end joining*, NHEJ) oder die homologe Rekombination, genutzt (Schuster and Kahmann, 2019). Bei NHEJ werden die beiden Enden ligiert, wobei häufiger Punktmutationen entstehen können (Song et al., 2019). Bei homologer Rekombination wird DNA mit homologen Sequenzen miteinander rekombiniert, sodass die Fremd-DNA schließlich die endogene Sequenz ersetzt (Schuster and Kahmann, 2019). Dies ist ein akkurater Mechanismus, der beispielsweise die Fusion eines endogenen Gens mit einem Markergen ohne Leserasterverschiebung erlaubt (Lai et al., 2010). Je nach experimenteller Fragestellung kann die Fremd-DNA für ein Gen, einen Promotor, einen Terminator, eine Expressionskassette für einen Selektionsmarker für den Zielorganismus, eine Sequenz für den meist bakteriellen Amplifikationsschritt für die Klonierung und ggf. homologe Flanken kodieren (Terfrüchte et al., 2014). Da verschiedene Spezies bestimmte Codons, Dicodons, regulatorische Elemente und Flankenlängen bevorzugen, müssen jeweils geeignete Komponenten gefunden werden (Meyer, 2008). Darüber hinaus finden sich in der Literatur gegensätzliche Aussagen zur Effizienz von linearen oder zirkulären Sequenzen (Gietz and Woods, 2001, Song et al., 2019).

1.4.6. Regeneration und Selektion

Während der Regenerationsphase wird die Zellwand der Protoplasten neu gebildet, weshalb auch hier ein individueller osmotischer Stabilisator nötig ist (Li et al., 2017a). Die Regeneration der Zellwand und die Selektion transformierter Protoplasten sollen möglichst in einem Arbeitsschritt erfolgen, beispielsweise in Form der für *U. maydis* etablierten Zweischicht-Agarplatten, bei denen das Antibiotikum aus der unteren in die obere Schicht diffundieren muss (Bösch et al., 2016).

Da für *T. thlaspeos* derzeit keine Prototrophien bekannt sind, sollen Selektionsmarker für Wachstum-inhibierende Substanzen etabliert werden. Hygromycin B ist eine häufig für die Selektion filamentöser Pilze verwendete Substanz, die neben Nourseothricin, Carboxin und

G418 auch bei *U. maydis* verwendet wird (Wang et al., 2017c, Bösch et al., 2016). Hygromycin B inhibiert die Translation vermutlich durch die Stabilisierung der Peptidyl-tRNA an der ribosomalen Aminoacyl-Stelle (González et al., 1978). Hygromycin B kann jedoch durch eine Phosphotransferase modifiziert werden, sodass Resistenz vermittelt wird (Rao et al., 1983). Nourseothricin inhibiert die Proteinsynthese und kann durch die Nourseothricin N-Acetyltransferase modifiziert werden und so Resistenz vermitteln (Yang et al., 2019). Für die erwähnte Selektion sollte die minimal Wachstum-erlaubende Konzentration (*minimal inhibitory concentration*, MIC) verschiedener Antibiotika bestimmt werden. Da *T. thlaspeos* auf Festmedien mit verschiedenen Geliernmitteln angezogen wird, sollte dies für beide bestimmt werden. Dazu sollten Resistenzgenkassetten mit Promotor und Terminatorsequenzen aus *T. thlaspeos* und einem Codon-optimierten Gen für die Resistenz-vermittelnde Hygromycin-Phosphotransferase hergestellt werden, zu denen es schon Vorarbeiten gab (Thorsten Langner und Merve Öztürk, persönliche Kommunikation).

1.4.7. Stammverifizierung

Um zu überprüfen, ob und ggf. wo die Transformanten das transformierte Konstrukt in das Genom integriert haben, sind einige Untersuchungen nötig. Zunächst sollten die Transformanten auf Selektionsmedium anwachsen und dabei wenn möglich vereinzelt werden (Bösch et al., 2016). Dies gewährleistet genetisch homogenes Ausgangsmaterial und zeigt andauernde Resistenz gegenüber dem verwendeten Selektionsmarker. Im Falle einer zufälligen Insertion kann eine PCR mit einem Primerpaar durchgeführt werden, das ausschließlich im transformierten Konstrukt bindet (Plücker et al., 2021). Nur Kandidaten, deren PCR ein Produkt in erwarteter Länge aufweisen, sollten weiterverwendet werden (Plücker et al., 2021).

Bei Deletionen kann nach der Selektion und Vereinzelung mit einer Multiplex-PCR festgestellt werden, ob das zu deletierende Gen noch vorhanden ist und die transformierte DNA dementsprechend ektopisch inseriert wurde (Bösch et al., 2016). Ein Primerpaar sollte dazu innerhalb des zu deletierenden Gens binden und ein weiteres Primerpaar sollte genomische DNA binden und ein PCR-Produkt ergeben, das länger ist als das des zu deletierenden Gens (Bösch et al., 2016). Das längere PCR-Produkt stellt sicher, dass die PCR unter den gewählten Bedingungen erfolgreich durchführbar war und das kürzere weist den bei einer Deletion unerwünschten DNA-Abschnitt nach. Da für weitere Analysen nur Kandidaten weiterverwendet werden, in deren PCR das zu deletierende Gen nicht nachgewiesen werden konnte, kann die Anzahl der weiter zu testenden Kandidaten oft deutlich reduziert werden (Bösch et al., 2016). In einer zweiten PCR wird überprüft, ob das Konstrukt am gewünschten Locus inseriert wurde. Hierzu werden jeweils für upstream- und downstream Flanke Primer verwendet, von denen einer außerhalb der Flanken und des transformierten Konstrukts und ein zweiter innerhalb der

Plasmid-DNA bindet (Bösch et al., 2016). Schließlich werden die Kandidaten, bei denen in der ersten PCR der Verlust des zu deletierenden Gens und in der zweiten PCR die Insertion des Konstrukts in den gewünschten Locus nachgewiesen werden konnte, in einem Southern Blot getestet (Bösch et al., 2016). Wenn die Sonde im Southern Blot die Flanken des Deletionslocus bindet und sofern die Restriktionsendonuklease, mit der die genomische DNA geschnitten wird, sorgfältig ausgewählt wurde, können Wildtyp und gewünschte Deletionsmutante durch deutlich unterschiedliche Bandenmuster unterschieden werden. Alle zusätzlichen Banden weisen auf zusätzliche Insertionsloci oder unverdaute DNA hin. Letzteres sollte vermieden werden und Kandidaten mit zusätzlichen Banden sollten verworfen werden (Bösch et al., 2016).

1.5. RNAi

1.5.1. Das Funktionsprinzip von RNAi

RNA-Interferenz (RNAi) ist ein in den meisten Eukaryoten konservierter Mechanismus, durch den Gene sequenzspezifisch reguliert werden (Nicolás and Garre, 2016). Die Spezifität wird dabei durch kleine RNAs (*small RNAs*, sRNAs) vermittelt, die aus dsRNAs generiert werden (Abbildung 2) (Nicolás and Garre, 2016, Svoboda, 2020). Klassischerweise besteht RNAi aus dem Schneiden einer längeren dsRNA durch die Endoribonuklease Dicer in doppelsträngige kurze interferierende RNA (*short interfering RNA*, siRNA), dem Beladen eines dieser siRNA-Stränge in Argonaute (Ago), der durch die siRNA sequenzspezifisch vermittelten Basenpaarbindung an RNA und schließlich deren endonukleolytischer Spaltung durch Ago (Svoboda, 2020). Dabei können RNA-abhängige RNA-Polymerasen (RdRPs) an der Generierung der dsRNA beteiligt sein (Svoboda, 2020). Tatsächlich gibt es mehrere Mechanismen, die kleine RNAs von ca. 20-30 nt Länge sowie Dicer und Ago zur Genregulation verwenden, und inzwischen zum Teil auch RNAi genannt werden, wie zum Beispiel transkriptionelles Gen-Silencing, bei dem DNA *de novo* methyliert oder Histone modifiziert werden können (Nicolás and Garre, 2016, Svoboda, 2020, Villalobos-Escobedo et al., 2016). Auch Dicer-unabhängig generierte sRNAs werden mit RNAi assoziiert (Nicolás and Garre, 2016). Darüber hinaus können die an der Prozessierung beteiligten Enzyme sowie die Präsenz von Modifikationen wie Methylierungen in Tieren, Pflanzen und Pilzen variieren (Zhao and Guo, 2022).

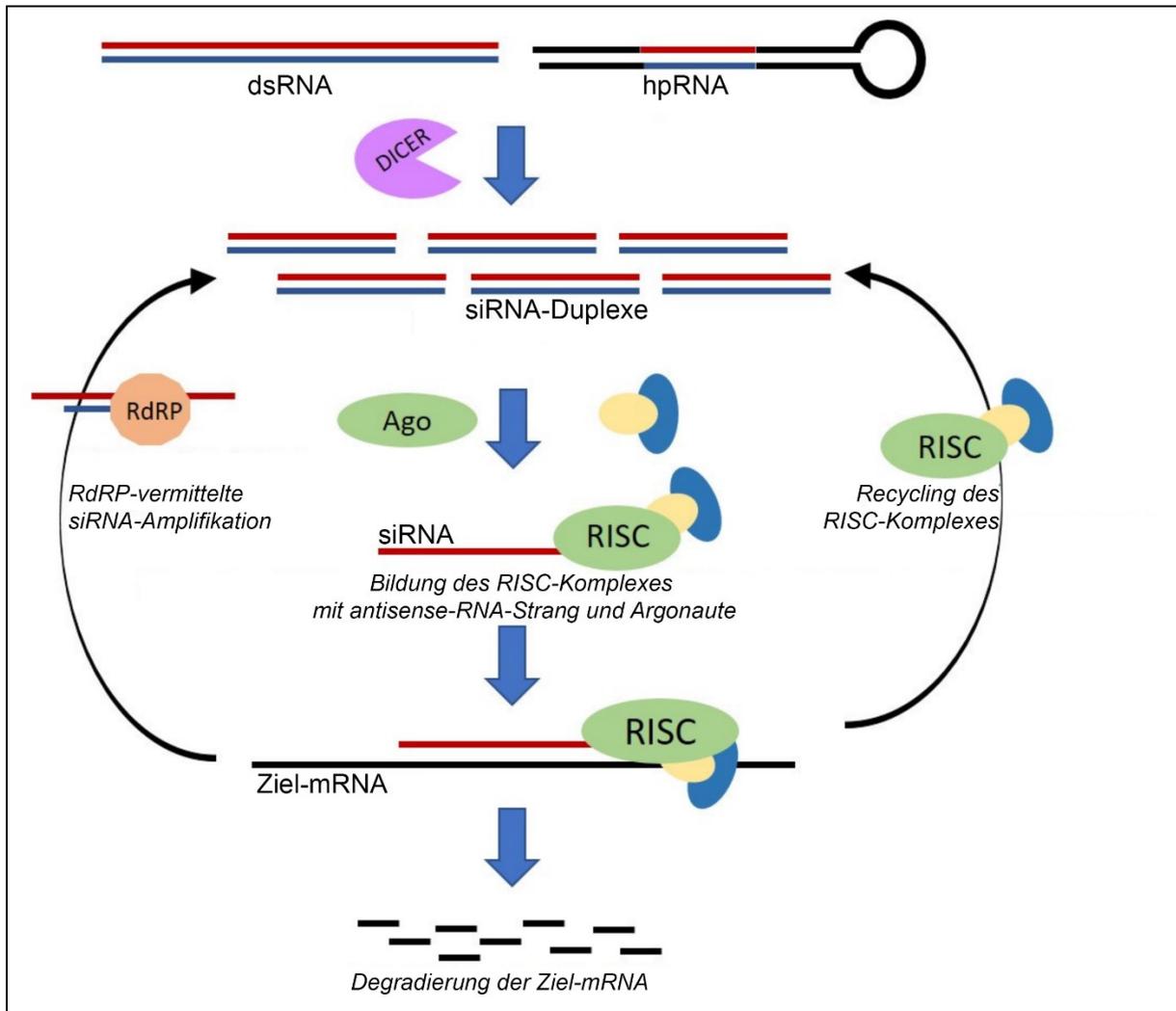


Abbildung 2 RNAi-vermittelte Regulation der Genexpression in Pilzen. Doppelsträngige RNA oder hpRNA wird von Dicer in etwa 21 nt lange siRNA prozessiert. Der Leitstrang der siRNA wird von Ago gebunden und bilden mit weiteren Proteinen den RISC—Komplex. Dieser bindet an eine weitestgehend homologe Ziel-mRNA, wonach diese degradiert wird. Die Komponenten des RISC-Komplexes werden recycelt. In manchen Pilzen bilden RdRPs neue siRNA-Duplexe und erlauben so eine anhaltende Regulation. dsRNA: Doppelsträngige RNA, hpRNA: Haarnadel-RNA (hairpin-RNA), siRNA: kleine interferierende RNA (small interfering RNA), Ago: Argonaute, RISC: RNA-induzierter Silencing-Komplex (RNA-induced silencing complex), RdRP: RNA-abhängige RNA-Polymerase (RNA-dependent RNA polymerase). Abbildung modifiziert nach (Malavia et al., 2020) (Abb. 2).

Zwei Klassen von sRNAs, die für Pilze relevant sind, sind kurze interferierende RNAs (*short interfering RNAs*, siRNAs) und microRNA-ähnliche RNAs (*microRNA-like RNAs*, miRNAs) (Dang et al., 2011, Zhao and Guo, 2022). siRNAs werden durch die Endoribonuklease Dicer aus exogenen RNA-Vorläufermolekülen wie viraler RNA, endogenen repetitiven Sequenzen wie transponierbaren Elementen oder Transkripten, die lange Haarnadelstrukturen bilden können, oder anderen dsRNAs, beispielsweise durch überlappende sense- und antisense-Transkripte, generiert (Dang et al., 2011, Nicolás and Garre, 2016). Dabei kann eine RdRP an der Bildung der dsRNA beteiligt sein (Dang et al., 2011). In Pilzen wurden miRNAs anstelle

von microRNAs (miRNAs) identifiziert. Diese ähneln den in Tieren und Pflanzen vorkommenden miRNAs darin, dass sie von intergenischen miRNA-Genen als ssRNA-Vorläufer generiert werden und Haarnadelstrukturen bilden (Nicolás and Garre, 2016, Torres-Martínez and Ruiz-Vázquez, 2017, Mann et al., 2023). Während die Vorläufer-Transkripte der meisten pflanzlichen und tierischen miRNAs von der RNA-Polymerase II hergestellt werden, eine 5'-Cap-Struktur besitzen und polyadenyliert sind, können miRNAs in Pilzen von der RNA-Polymerase III, wie in *N. crassa*, oder der RNA-Polymerase II, wie in *V. dahliae*, hergestellt werden, und werden nicht zwingend von Dicer prozessiert (Carthew and Sontheimer, 2009, Mann et al., 2023). Darüber hinaus unterscheiden sich siRNAs und miRNAs in weiteren Faktoren. Die Vorläufer-Transkripte von siRNAs stammen von perfekt homologen dsRNAs und werden an nicht exakt definierten Stellen aus diesem geschnitten, während miRNAs aus imperfekten, nicht-kodierenden RNA-Duplexen gebildet werden und an definierten Positionen geschnitten werden (Zhao and Guo, 2022, Carthew and Sontheimer, 2009). Sowohl siRNAs als auch miRNAs können zum Schneiden der RNA oder zu translationaler Repression führen, siRNAs sind darüber hinaus auch an transkriptionellem Gen-Silencing in Spaltheife beteiligt (Carthew and Sontheimer, 2009, Dang et al., 2011).

In *N. crassa* wurde neben dem oben beschriebenen RNAi ein weiterer Mechanismus des Gen-Silencing entdeckt und als Quelling (englisch: unterdrückend) beschrieben, als zusätzliche Kopien eines mit der Farbgebung in Zusammenhang stehenden Gens eingebracht wurden und unerwarteterweise etwa 30 % weiße Pilzkolonien auftraten (Fulci and Macino, 2007). Die Ursache waren vor allem Transgene, die im selben Locus hintereinander angeordnet waren und somit repetitive Sequenzen darstellten (Yang et al., 2015). Doppelstrangbrüche in diesen repetitiven Sequenzen lösen Quelling aus, indem sie zu homologer Rekombination (HR) dieser Sequenzen führen (Yang et al., 2015). Zwischenstufen der HR könnten durch Komponenten des Quellings erkannt werden (Yang et al., 2015). So könnte die DNA-Helikase QDE-3 diese Zwischenstufen in ssDNA entwinden, woraufhin die DNA/RNA-abhängige RNA-Polymerase QDE-1 zunächst ssRNA und daraus dsRNA generiert (Yang et al., 2015). Auf diese Weise wird sichergestellt, dass diese Art von siRNAs, qiRNAs (Quelling- oder QDE-2-assoziierte RNAs), nur von repetitiven Sequenzen, aber nicht von anderen genomischen Loci hergestellt wird (Yang et al., 2015, Gutbrod and Martienssen, 2020). Dadurch wird scheinbar nicht nur die Vervielfältigung von Transposons, sondern auch die Anzahl der rDNA-Kopien kontrolliert (Nicolás and Garre, 2016, Gutbrod and Martienssen, 2020).

Darüber hinaus werden die sRNAs je nach Ursprung und Art des Vorläufermoleküls, der an der weiteren Prozessierung beteiligten Enzyme sowie an der Zusammensetzung des Ago-enthaltenden Komplexes unterschiedlich benannt, sodass es inzwischen zahlreiche Kategorien gibt (Villalobos-Escobedo et al., 2016, Nicolás and Garre, 2016, Nunes et al., 2011b). Obwohl sRNAs bis zu 200 nt lang sein können, sind die für die Genregulation

verwendeten sRNAs mit 20-30 nt meist deutlich kürzer (Nicolás and Garre, 2016, Zanini et al., 2021). Abhängig vom Lebenszyklus wurden aber auch etwas längere sRNAs mit 27-40 nt in Pilzen wie *M. oryzae* oder *Puccinia triticina* identifiziert (Nunes et al., 2011a, Dubey et al., 2019). Zur Vereinfachung werden in dieser Arbeit alle RNAs mit 18-40 nt als sRNAs bezeichnet. Sollten längere sRNAs thematisiert werden, würde explizit darauf hingewiesen.

1.5.2. RNAi in Pilzen

Während das RNAi-System in Spaltheften wie *Schizosaccharomyces pombe* und *Schizosaccharomyces japonicus* Heterochromatin bildet und die Genexpression auf transkriptioneller Ebene reguliert, wird es in filamentösen Pilzen überwiegend auf posttranskriptioneller Ebene verwendet (Dang et al., 2011, Chapman et al., 2022). Darüber hinaus können RNAi-Komponenten über Chromatinmodifikationen Einfluss auf Chromosomensegregation nehmen (Gutbrod and Martienssen, 2020). RNAi wird zur Abwehr von Viren, transponierbaren Elementen, Transgenen und Plasmiden genutzt, welche die Genomintegrität gefährden könnten (Nicolás and Garre, 2016). Zudem stellen rDNA-Loci repetitive Sequenzen dar, welche sRNA für RNAi produzieren können (Villalobos-Escobedo et al., 2016). Es wird spekuliert, dass sie eine Rolle bei Kontrollpunkten des Zellzyklus haben könnten, um ggf. bei DNA-Schäden den Zellzyklus anhalten zu können (Dang et al., 2011). Außerdem sind RNAi-Komponenten an der Aufrechterhaltung repetitiver Loci beteiligt, da der Verlust von Dicer in *S. pombe* zu einer Verringerung der Anzahl der rDNA-Gene führt (Gutbrod and Martienssen, 2020). Interessanterweise können Komponenten von RNAi und DNA-Reparaturmechanismen interagieren und scheinen funktionellen Einfluss aufeinander zu haben, da beispielsweise die Depletion von Ago und Dicer in humanen Zellen zu einer Reduktion der DNA-Reparatur führt (Bhattacharjee et al., 2019).

Zudem sind RNAi-Schlüsselkomponenten an der Regulation von Wachstum, Entwicklung und Physiologie beteiligt (Bhattacharjee et al., 2019, Dang et al., 2011, Nicolás and Garre, 2016). Beispielsweise zeigen in *Mucor circinelloides* und *Trichoderma atroviride* verschiedene Dicer-Deletionsmutanten Defizite im vegetativen Wachstum und bei der Bildung asexueller Sporen (Carreras-Villaseñor et al., 2013, Nicolas et al., 2010). In *F. graminearum* sind die RNAi-Komponenten an der Bildung und Keimung von Konidien und Ascosporen beteiligt (Gaffar et al., 2019). Im Gegensatz dazu konnte bei dem Brandpilz *S. reilianum* bislang kein Phänotyp identifiziert werden (Dissertation (Ghareeb, 2011)). Hier wird Dicer nur in Kultur, nicht aber während der Infektion exprimiert, und die Deletionsmutante zeigte dementsprechend keine Änderung in der Anzahl der Maiskolben pro Pflanze, der Befallsrate, oder -intensität (Dissertation (Ghareeb, 2011)). Bei axenischer Kultivierung glichen Kolonien der Dicer-Deletionsmutante unter UV-, Temperatur-, Zellwand- und osmotischem Stress sowie in Mangelmedium dem des Wildtyps (Dissertation (Ghareeb, 2011)). Allerdings scheint es so, als

wären gelegentlich sehr detaillierte Tests erforderlich, um einen Phänotyp zu identifizieren. So wurde in einem Stamm von *M. oryzae* ein Einfluss von Dicer auf die Konidienbildung identifiziert, in einem anderen Stamm gab es jedoch keine Beteiligung von Dicer an der Keimung der Konidien (Raman et al., 2017, Lee et al., 2022).

1.5.3. RNAi während der Infektion in Pflanzen

Während es in manchen Organismen nur je ein Protein für jede RNAi-Schlüsselkomponente existiert, gibt es in *A. thaliana* vier Dicer-Proteine und zehn AGO-Proteine (Huang et al., 2019). Während DCL1 miRNAs herstellt, ist DCL4 für siRNAs zuständig (Weiberg et al., 2014). Unter den Ago-Proteinen scheint AGO1 eine besondere Rolle bei Infektionen von Pilzen zu spielen, da Mutanten resistenter gegen *B. cinerea* und *V. dahliae* waren (Weiberg et al., 2013). In diesem multizellulären Organismus ist nicht nur die Expression und Abundanz, sondern auch die Lokalisation der sRNA und des Zieltranskripts wichtig für erfolgreiche RNAi (Šečić et al., 2021a). RNAi kann aber nicht nur mit innerhalb einer Zelle produzierten RNAs stattfinden, da sRNAs über Plasmodesmata in die Nachbarzelle und über das Phloem in weiter entfernte Pflanzenteile transportiert werden können (Mahanty et al., 2023). Auch die Beladung von sRNAs in EVs und deren Sekretion ist möglich und für die im folgenden Kapitel thematisierte RNAi zwischen verschiedenen Spezies relevant (Mahanty et al., 2023).

In Pflanzen ist RNAi relevant für Wachstum, Entwicklung, Metabolismus, Genomintegrität und während der Interaktion mit Pathogenen (Mahanty et al., 2023). Dabei regulieren sie die Reprogrammierung der Genexpression und kalibrieren die Feinabstimmung in der pflanzlichen Immunabwehr (Weiberg et al., 2014). Ein Beispiel für die endogene Regulation des Wachstums ist miR396, welche die Zone der Zellproliferation in Blättern von *A. thaliana* reguliert, da sie in sieben von neun Wachstums-regulierenden Faktoren Zielsequenzen besitzt (Rodriguez et al., 2016). Pflanzliche sRNAs können während der Infektion differentiell exprimiert werden (Weiberg et al., 2014). Hier können pflanzliche sRNAs auf verschiedenen Ebenen agieren, um endogene Gene zu regulieren. So kann die Expression pflanzlicher sRNAs durch PAMPs heraufreguliert werden. Ein Beispiel dafür ist miR160a aus *A. thaliana*, welche in Anwesenheit des bakteriellen PAMPs flg22 akkumuliert und zu vermehrter Callose-Ablagerung führt (Li et al., 2010). Während der Infektion von Mikroben sind sRNAs an der Regulation von PTI beteiligt. Beispielsweise wird in *A. thaliana* die miR398 während der Infektion von *M. oryzae* heraufreguliert. Diese reguliert verschiedene Superoxiddismutasen, welche ROS in Wasserstoffperoxid umsetzen können und so zur Resistenz beitragen (Šečić et al., 2021a, Weiberg et al., 2014). Darüber hinaus können pflanzliche sRNAs pflanzliche Resistenzgene regulieren, die die pilzlichen Effektorproteine erkennen und zu ETI führen. Die Infektion von *P. syringae* beispielsweise reduziert die Menge pflanzlicher miR482 in Tomaten (Šečić et al., 2021a). Einige der Zieltranskripte sind solche pflanzlichen Resistenzgene und

werden dementsprechend stärker exprimiert, wodurch die Pflanze resistenter wird (Šečić et al., 2021a). Auch in der Interaktion von Baumwolle und *V. dahliae* wurde die pflanzliche miR482 herunterreguliert (Šečić et al., 2021a). Pflanzliche sRNAs werden aber nicht nur zur Verstärkung der Immunantwort genutzt, sondern können diese auch reprimieren. So werden in Tomate oder Baumwolle sRNAs aus Transkripten verschiedener Resistenzgene gebildet, die deren Expression unter normalen Bedingungen auf einem niedrigen Niveau kontrollieren (Weiberg et al., 2014). Diese Repression wird bei einer Infektion reprimiert, sodass die Resistenzgene verstärkt exprimiert werden und zur pflanzlichen Immunabwehr beitragen können (Weiberg et al., 2014).

1.5.4. Reiche-übergreifende RNAi (ck-RNAi)

Während der Infektion werden die pflanzlichen Immunsystem-Komponenten und Pathogen-Effektoren meist differentiell exprimiert (Huang et al., 2019, Lanver et al., 2018). Auch sRNAs werden während der Infektion in Pilzen und Pflanzen differentiell exprimiert (Huang et al., 2019, Mann et al., 2023). Diese können, wie im vorigen Kapitel erläutert, Funktionen im herstellenden Organismus haben oder aber in den Interaktionspartner transportiert werden, um dessen Genexpression, beispielsweise von Immunitäts- oder Virulenz-relevanten Genen, zu beeinflussen (Ma et al., 2020, Zhao et al., 2021a, Song et al., 2021). Da Interaktionspartner aus zwei biologischen Reichen beteiligt sind, wird dies Reiche-übergreifende RNAi (*cross-kingdom RNAi*, ck-RNAi) genannt (Abbildung 3) (Huang et al., 2019). Darüber hinaus kann dieses Phänomen als Wirts-induziertes Gen-Silencing (*host-induced gene silencing*, HIGS) bezeichnet werden, wenn die sRNA aus der Pflanze stammt, und als Pathogen-induziertes Gen-Silencing (PIGS), wenn die sRNA aus dem Pilz stammt (Kong et al., 2022, Kwon et al., 2020).

Natürliches ck-RNAi findet beispielsweise während der Infektion von *Botrytis cinerea* in *A. thaliana* und *Solanum lycopersicum* statt, während derer der Pilz z. B. die siRNAs Bc-siR3.2 und Bc-siR3.5 produziert, die in der Pflanze die Expression der Immunitäts-relevanten Mitogen-aktivierten Proteinkinasen MPK1 und MPK2 bzw. die Zellwand-assoziierten Kinase WAK herunterregulieren (Weiberg et al., 2013). Auch in *F. oxysporum* wird eine sRNA, *Fol-milR1*, exprimiert, die die mRNA der CBL-interagierenden Proteinkinase SlyFRG4 in Tomaten reguliert, welche unter anderem die ROS-Produktion beeinflusst (Ji et al., 2021). In *F. graminearum* hat Fg-sRNA1 Einfluss auf den Infektionserfolg in Weizen, indem sie die mRNA eines Chitin-Elicitor bindenden Proteins kontrolliert, das möglicherweise an der Wahrnehmung des PAMPs Chitin beteiligt sein könnte (Jian and Liang, 2019). *Puccinia striiformis* nutzt *Pst-milR1*, um eine β -1,3-Glucanase in Weizen zu regulieren, die zur Gruppe der PR2- (*pathogenesis related*; Pathogenitäts-bezogen) Gene zählt, welche mit Immunantworten der Pflanze assoziiert werden (Wang et al., 2017a). Hier hydrolysieren die

Glucanasen das β -Glucan der pilzlichen Zellwand, wodurch PAMPs freigesetzt werden, die systemisch Resistenz in der Pflanze auslösen können (Wang et al., 2017a). Darüber hinaus wurden in der Interaktion von *M. oryzae* und *B. distachyon* auf beiden Seiten mehrere sRNAs mit vorhergesagten mRNAs identifiziert, die während der Infektion differentiell exprimiert werden (Zanini et al., 2021). Da Deletionsstämme für die verschiedenen Dicer und Ago von *M. oryzae* zum Teil reduzierte Virulenz zeigten, vermuten die Autoren, dass ck-RNAi in dieser Pilz-Pflanze-Interaktion eine Rolle spielt (Zanini et al., 2021).

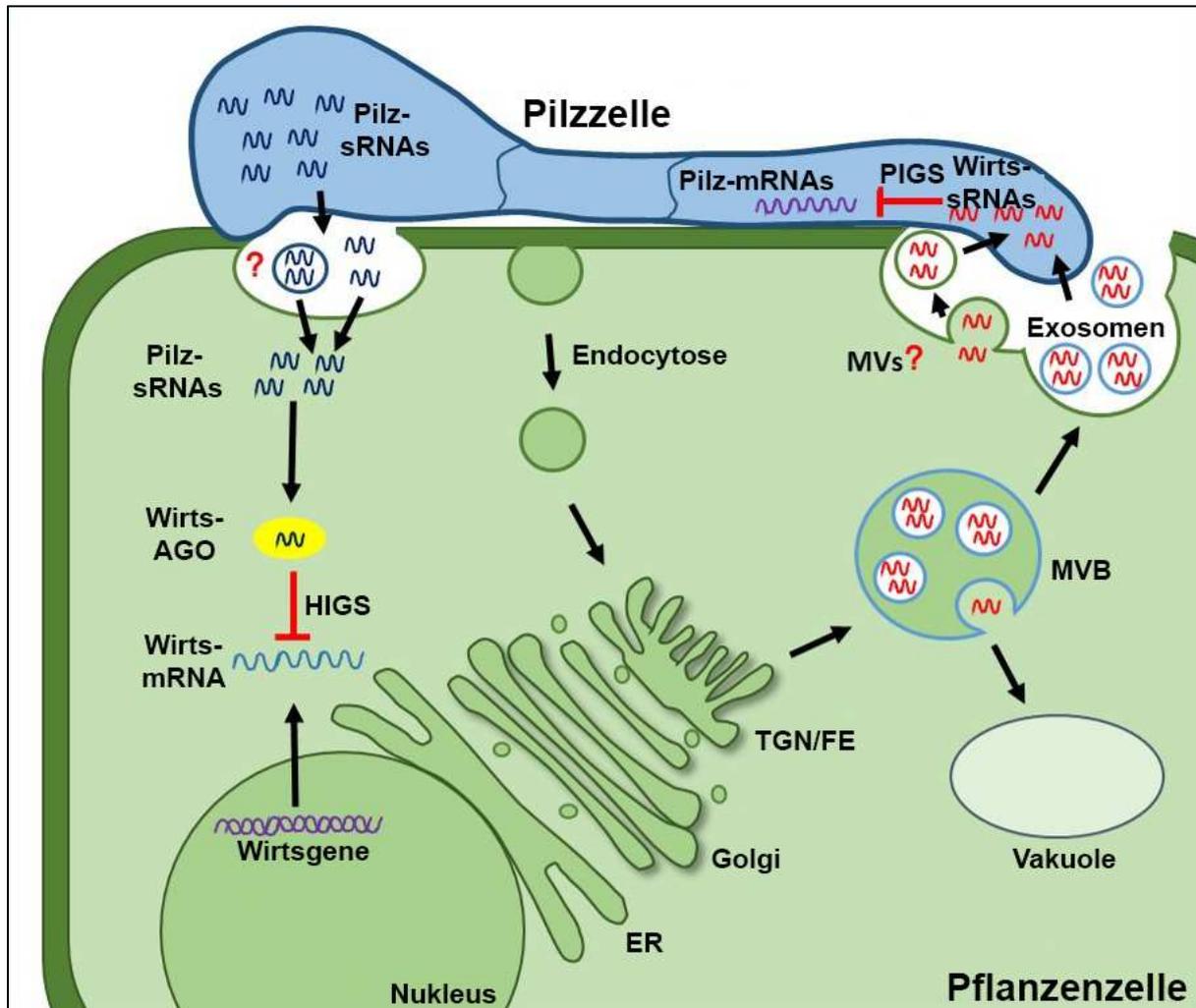


Abbildung 3 Cross-kingdom RNAi (ck-RNAi; Reiche-übergreifende RNAi) zwischen Pilz und Pflanze. Abhängig vom Ursprung der sRNA wird ck-RNAi in HIGS (*host-induced gene silencing*; Wirts-induziertes Gen-Silencing) und PIGS (*pathogen-induced gene silencing*; Pathogen-induziertes Gen-Silencing) unterteilt. Bei PIGS gelangen pilzliche sRNAs über nicht vollständig geklärte Mechanismen in die Pflanzenzelle, in der sie mit dem pflanzlichen AGO interagiert und so die Expression von Wirtsgenen reguliert. Bei HIGS gelangen sRNAs von der Pflanze in den Pilz und regulieren dort die Genexpression. Die sRNAs werden in extrazellulären Vesikeln und möglicherweise über andere Mechanismen in den Pilz transportiert. AGO: Argonaute, ER: Endoplasmatisches Retikulum, TGN/FE: Trans-Golgi-Netzwerk/Frühe Endosomen, MVB: (*multivesicular body*) multivesikuläre Körperchen, MV: Mikrovesikel. Die Abbildung wurde modifiziert nach (Cai et al., 2019) (Abb. 1B).

Die reduzierte Kolonisierung von *A. thaliana* durch die Dicer-Doppelmutante von *B. cinerea* zusammen mit der erhöhten Suszeptibilität der *A. thaliana* Dicer-Mutante und der verringerten Suszeptibilität der *A. thaliana ago1-27*-Mutante legen nahe, dass die sRNAs im Pilz gebildet werden, aber ihre Auswirkungen mit dem pflanzlichen Ago durchführen (Weiberg et al., 2013). Auch der Oomycet *Hyaloperonospora arabidopsidis* produziert sRNAs, die mit dem pflanzlichen Ago coimmunpräzipitieren und deren Zielsequenzen in der Pflanze lokal um den Oomyceten reguliert werden (Dunker et al., 2020).

Auch Pflanzen scheinen sRNAs in Pilze zu transportieren, um über RNAi Gene zu regulieren (Cai et al., 2018). Sowohl Pflanzen als auch Pilze scheinen in der Lage zu sein, RNA aus der Umgebung aufzunehmen und für RNAi zu verwenden (Wang and Dean, 2020). Darüber hinaus scheinen sRNAs gezielt mit Hilfe von RNA-bindenden Proteinen in Vesikel geladen zu werden (He et al., 2021). Die sRNAs werden durch multivesikuläre Körperchen aus der Zelle sekretiert und gelangen so in extrazellulären Vesikeln bzw. Exosomen zum Pilz (Cai et al., 2018). Man geht davon aus, dass die extrazellulären Vesikel durch Endocytose aufgenommen werden könnten, aber wie die sRNAs im Pilz freigesetzt werden, ist bislang unklar (Zhao and Guo, 2022). *A. thaliana* produziert beispielsweise sRNAs, die auf mRNAs des Vesikeltransports von *B. cinerea* abzielen (Cai et al., 2018). Auch *B. distachyon* produziert sRNAs mit Pathogenese-relevanten vorhergesagten Zieltranskripten in *M. oryzae*, wie einem SNARE (*soluble N-ethylmaleimide sensitive factor attachment protein receptor*) -Protein, einem Transkriptionsfaktor und einem Effektor (Zanini et al., 2021). Auch Baumwoll-sRNAs sind komplementär zu für Virulenz nötige *Verticillium dahliae*-mRNAs (Zhang et al., 2016b). Trotz der generellen Konservierung von RNAi und deren Rolle für unter anderem die Genomintegrität gibt es Eukaryoten wie *Saccharomyces cerevisiae* und *U. maydis*, die die Komponenten des RNAi-Systems im Laufe der Evolution verloren haben (Nicolás et al., 2013). Im Genom von *U. maydis* scheinen im Vergleich zu verwandten Pilzen Dicer und Ago von konservierten syntänen Regionen aufgrund von intrachromosomaler Rekombination ausgeschnitten worden zu sein (Laurie et al., 2012). Da in *U. maydis* darüber hinaus keine Homologe für bestimmte andere Mechanismen zur Kontrolle der Genomintegrität gefunden wurden, könnte diese Rolle teilweise durch die effektive homologe Rekombination übernommen worden sein (Laurie et al., 2012, Lax et al., 2020). Vorteile für den Verlust des RNAi-Systems könnte ein Mycovirus, ein sogenannter Killervirus, bieten, welcher unter anderem in *S. cerevisiae* und *U. maydis* vorkommt (Nicolás and Garre, 2016, Nicolás et al., 2013). Dieses Virus ist mit dem RNAi-System inkompatibel, kodiert ein Toxin, welches uninfizierte Zellen abtöten kann, und vermittelt der infizierten Zelle Resistenz gegenüber dem Toxin (Nicolás and Garre, 2016, Allen et al., 2013). Andererseits könnte das Fehlen des RNAi-Systems die Genomplastizität erhöhen, wodurch Pathogene möglicherweise schneller an das ebenfalls evolvierende Immunsystem des Wirtes angepasst werden können (Nicolás and

Garre, 2016). Dies wird für *C. deuterogattii* angenommen (Nicolás and Garre, 2016). Insgesamt bietet ein RNAi-System einem Eukaryoten vielfältige Regulationsmöglichkeiten, dessen Verlust könnte andererseits evolutive Möglichkeiten bieten (Nicolás and Garre, 2016). Falls ck-RNAi in der Interaktion von *T. thlaspeos* mit seinen Wirtspflanzen vorkommt, kann dies zwischen den verschiedenen Wirtspflanzen verglichen werden, um mehr Informationen zu unterschiedlichen Infektionsstrategien in ein- oder mehrjährigen Pflanzen zu erlangen. Auch Unterschiede in der Infektion zwischen ein- und zweikeimblättrigen Pflanzen könnten diesbezüglich nicht nur auf Protein-, sondern auch auf sRNA-Ebene erforscht werden. Dies ist besonders interessant, da zwei agronomisch relevante Brandpilze, *T. frezii* und *T. solani*, mit *T. thlaspeos* verwandt sind und ebenfalls zweikeimblättrige Pflanzen befallen (Frantzeskakis et al., 2017, van der Linde and Göhre, 2021), sodass beispielsweise konservierte Aspekte auf einen Nutzen im Pflanzenschutz getestet werden könnten.

1.5.5. Nutzung des RNAi-Systems für die Forschung

Aufgrund der Regulationsmöglichkeiten von RNAi bieten sich interessante Möglichkeiten für die Forschung (Torres-Martínez and Ruiz-Vázquez, 2017). Durch die Expression eines Vorläufermoleküls in einem transformierbaren Eukaryoten können Gene gezielt gesilenced werden, ohne dass Methoden zur gezielten Gendeletion benötigt werden (Meyer, 2008). Bei externer Applikation von RNAs entfällt bei verschiedenen Eukaryoten die Notwendigkeit der Transformierbarkeit (Meyer, 2008). Da RNAi die Expression in der Regel nicht vollständig unterbindet, eignet es sich zudem zur Untersuchung essentieller Gene (Meyer, 2008). Darüber hinaus können mit RNAi funktionelle Screens durchgeführt werden, bei denen mehrere Gene gleichzeitig stillgelegt werden können (Chen et al., 2020). Dies ist ein Aspekt, der aufgrund der limitierten Anzahl validierter Selektionsmarker für die Transformation besonders interessant wird (Cairns et al., 2016).

ck-RNAi kommt in vielen Pathosystemen vor und kontrolliert die Genexpression von Komponenten des pflanzlichen Immunsystems und von Virulenzgenen der Pathogene und beeinflusst damit den Infektionserfolg (Huang et al., 2019, Kong et al., 2022). Dies ist die Grundlage für verschiedene Methoden zur Pathogenkontrolle, wie HIGS, Virus-induziertes Gen-Silencing (VIGS) oder Sprüh-induziertes Gen-Silencing (SIGS) (Wang and Dean, 2020, Kong et al., 2022, Huang et al., 2019). Für HIGS wird in diesem Fall die Pflanze gentechnisch so modifiziert, dass sie die sRNA(s) herstellt, die zur Genregulation im Pathogen verwendet werden (Kong et al., 2022). Die Nachteile von HIGS sind technische und rechtliche Aspekte, da die Abhängigkeit von Transformationsmethoden für die Pflanze sind nicht immer gegeben ist und gentechnisch modifizierte Organismen nicht in allen Ländern frei kultiviert werden dürfen (Huang et al., 2019). Bei VIGS werden Pflanzen mit modifizierten Viren behandelt, welche die genetischen Informationen für die RNA gegen das Pathogen enthalten (Huang et

al., 2019). Die viralen Expressionsvektoren sind jedoch pathogen für die Pflanze und können zu Krankheitssymptomen führen (Huang et al., 2019, Tiwari et al., 2014). Da RNAs von Pilzen wie *B. cinerea* und *F. graminearum* auch aus der Umgebung aufgenommen werden können, wurde das SIGS entwickelt, um die Kolonisierung durch Pathogene durch externe Applikation von RNAs zu verringern (Wang et al., 2016, Koch et al., 2016). SIGS wird beispielsweise durch die recht kurze Haltbarkeit der applizierten RNA eingeschränkt (Mann et al., 2023). Diese Methoden können beispielsweise im Labor angewendet werden, um die Pilz-Pflanze-Interaktion zu erforschen (Wang et al., 2017a, Jian and Liang, 2019, Werner et al., 2021). Darüber hinaus gibt es Bestrebungen, SIGS für die kommerzielle Landwirtschaft zu etablieren (Cheng et al., 2023).

Voraussetzung für diese Art der Genregulation ist ein funktionierendes RNAi-System (Meyer, 2008). Darüber hinaus ist die transformationsfreie externe Applikation von RNAs auf Aufnahmemechanismen angewiesen, die scheinbar in manchen Pilzen nicht oder unzureichend effektiv vorhanden sind (Qiao et al., 2021, Liu et al., 2021). Zu beachten ist zudem, dass das Silencing bei manchen Genen zu gering ausfallen oder nicht stabil genug sein kann, um Auswirkungen weiter untersuchen zu können (Cairns et al., 2016). Außerdem kann es zu Epimutationen kommen, wodurch beispielsweise Resistenzgene mit Hilfe von sRNAs und verschiedenen RNAi-Komponenten reversibel gesilenced werden können (Calo et al., 2014, Chang et al., 2019). Auch die Homogenität der Repression innerhalb einer Kultur kann variieren (Chen et al., 2020). Da für RNAi keine vollständige Homologie erforderlich ist, kann es darüber hinaus zur Regulation unerwünschter Gene kommen, weshalb sRNAs sorgfältig ausgewählt und zusätzliche Kontrollen durchgeführt werden sollten (Svoboda, 2020).

Insgesamt kann RNAi als eine nützliche Methode in der Forschung für verschiedene Fragestellungen verwendet werden. Daher ist eine Untersuchung des RNAi-Systems von *T. thlaspeos* auch unabhängig von einer möglichen natürlichen Verwendung während der Infektion interessant.

1.6. Zielsetzung dieser Arbeit

Für die Entwicklung neuer Strategien zur Pathogenkontrolle ist mehr Wissen um die molekularen Abläufe in der Pilz-Pflanze-Interaktion nötig. Ziel dieser Arbeit war die Etablierung von Methoden zur genetischen Modifikation und die Evaluation der Funktionalität und Verwendung des RNAi-Systems von *T. thlaspeos*.

Die genetische Modifikation ermöglicht eine Vielzahl an molekularen Studien und sollte mit Hilfe der Transformation von Protoplasten erfolgen, um die durch leere Abschnitte verbundenen Filamente zu trennen und so genetisch homogene Kulturen zu erhalten. Für diese Methode müssen geeignete Zellwand-abbauende Enzyme, Puffer und osmotische

Stabilisatoren identifiziert und optimiert werden. Für die Selektion sollten geeignete Konzentrationen von Antibiotika bestimmt und entsprechende Resistenz-vermittelnde Plasmide hergestellt werden. Auch für die Regeneration und Transformation sollten geeignete Parameter festgestellt werden. Schließlich sollten ein fluoreszierender Stamm durch zufällige Integration ins Genom und Gendeletionsstämme des Paarungspheromonrezeptors *pra1* und/oder von Dicer durch gezielte genomische Integration mittels homologer Rekombination hergestellt werden.

Durch RNAi kann die Genexpression sowohl endogen als auch im Interaktionspartner reguliert werden. Darüber hinaus kann es artifiziell zur gezielten Reduktion der Genexpression genutzt werden. Daher sollte bioinformatisch evaluiert werden, welche klassischen RNAi-Komponenten im Genom von *T. thlaspeos* vorkommen. Für die funktionelle Analyse sollte die Dicer-Deletionsmutante verwendet werden, deren Herstellung vom ersten Teil dieser Arbeit abhängig ist. Alternativ sollte ein sRNA-exprimierender Stamm verwendet werden oder ein System etabliert werden, in dem die Wirkung extern applizierter sRNAs gemessen werden kann. Durch eine sRNA-Sequenzierung mit anschließender Zieltranskript-Vorhersage sowohl für endogene als auch für pflanzliche mRNAs sollte eingeschätzt werden, für welche biologischen Zwecke das RNAi-System verwendet wird.

Die durch beide Projektteile etablierten Methoden und gewonnenen Informationen wird es Folgeprojekten ermöglichen, beispielsweise Unterschiede und Gemeinsamkeiten in der Infektion von ein- und mehrjährigen Pflanzen sowie zwischen Infektionen in ein- und zweikeimblättrigen Pflanzen zu identifizieren. Daraus könnten zukünftig Aspekte für den Pflanzenschutz gegen die agronomisch relevanten Brandpilze *T. frezii* und *T. solani* gewonnen werden.

2. Ergebnisse

2.1. Etablierung von Protokollen zur genetischen Modifikation

2.1.1. Kultivierung

Nach Abwägung der Vor- und Nachteile sowie der Verfügbarkeit wurde beschlossen für die genetische Modifikation von *T. thlaspeos* Zellen aus Flüssigkultur zu verwenden und die PEG-Transformation von Protoplasten zu etablieren. Hierfür wurde sich an dem bewährten und ebenfalls Protoplasten-basierten PEG-Transformationsprotokoll von *U. maydis* orientiert. Dieses Protokoll wurde im Rahmen dieser Dissertation als Video mit einem Protokoll veröffentlicht, das sich auf die Handhabung fokussiert somit als Leitfaden dienen kann (Bösch et al., 2016). Diese Handgriffe und Materialien wurden als Ausgangspunkt für die Etablierung der Methoden zur genetischen Modifikation von *T. thlaspeos* verwendet und um weitere Beispiele anderer Pilze aus der Literatur erweitert.

Um einen geeigneten Erntezeitpunkt für die Protoplastierung festzulegen, wurde das Wachstum von *T. thlaspeos* in Flüssigkultur gemessen (Abbildung 4). Hierzu sollte eine Standardkurve erstellt werden, die Rückschlüsse auf das Wachstum erlaubt. Da bei filamentösen Pilzen oft mehrere Cytoplasma-gefüllte Abschnitte über sogenannte leere Segmente verbunden bleiben, würde eine Bestimmung der Lebendzellzahl durch Kolonie-bildende Einheiten voraussichtlich geringer ausfallen. Die Biomasse ist dagegen einfach messbar, weshalb das Frischgewicht gemessen wurde.

In YL wuchsen beide Stämme bis zum fünften Kultivierungstag exponentiell mit einer Verdopplungszeit von ca. 1,2 Tagen und gingen dann in die stationäre Phase über. Das Wachstum der Kulturen konnte durch eine Zunahme des Frischgewichts bis zum vierten Kultivierungstag nachgewiesen werden, nach dem sie in die stationäre Phase übergingen. Dies entspricht einer Verdopplungszeit von ca. 1,5 Tagen in der exponentiellen Phase. Die OD_{600} korreliert bis etwa 1,5 linear zum Frischgewicht (Abbildung 4C). Daher scheint grundsätzlich eine Kultivierung bis zu einer OD_{600} von etwa 1,5 bzw. vier Kultivierungstagen sinnvoll. Da für Protoplastierungen gerne Material aus der exponentiellen Wachstumsphase verwendet wird (Rabe et al., 2016, Bösch et al., 2016, Zhang et al., 2016a), wurde beschlossen, für *T. thlaspeos* OD_{600} von 0,5-0,8 zu verwenden.

Darüber hinaus wurde für das Wachstum neben dem Saccharose-haltigen YL auch die Glukose-haltigen Vollmedien CM und YMPG getestet (Abbildung 4D). Im Gegensatz zu YL wuchs *T. thlaspeos* in CM und YMPG auch über Tag fünf hinaus weiter an. Die Verdopplungszeit in YMPG war mit 1,1 Tagen etwas schneller als in CM mit 1,2 Tagen. Da die Verdopplungszeit am niedrigsten und die gemessene OD_{600} in YMPG am höchsten war,

erscheint YMPG geeignet für die schnelle Anzucht von *T. thlaspeos*. Allerdings stellt das Präzipitat von YMPG für Anwendungen wie Mikroskopie einen Nachteil dar.

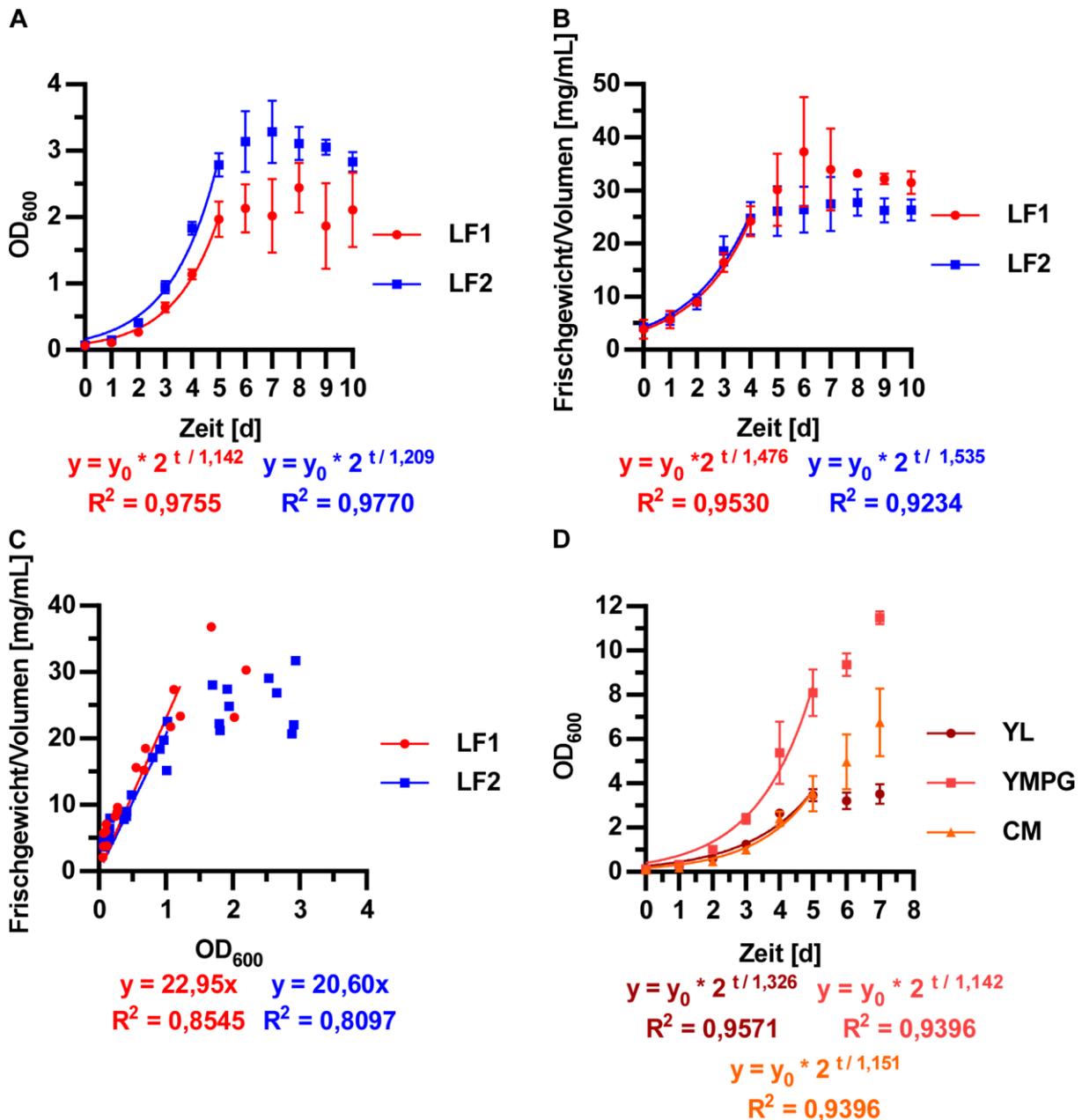


Abbildung 4 Wachstum der *T. thlaspeos*-Stämme LF1 und LF2. Dabei wurden die OD₆₀₀ (A) bzw. das Frischgewicht (B) alle 24 h in YL gemessen. Beide Werte der exponentiellen Wachstumsphase aus (A) und (B) wurden gegeneinander aufgetragen, um linear korrelierende Bereiche als Arbeitsbereiche zu definieren (C). Wegen der Übersichtlichkeit wurden die Fehlerbalken der Daten aus (A) und (B) in (C) nicht gezeigt. Ansonsten sind Mittelwert und Standardabweichung dreier experimenteller Replikate mit mindestens einem biologischen Replikate als Punkte mit Fehlerbalken gezeigt. Die Ergebnisse exponentieller Regressionen (A, B) bis zum Beginn der stationären Phase ist als Linie dargestellt. Für (C) wurden lineare Regressionsanalysen bis zu einer OD₆₀₀ von 1,5, durchgeführt. Wachstum von LF1 in verschiedenen Medien (D). Mittelwert und Standardabweichung von je drei biologischen Replikaten wurden aus dem Mittelwert dreier technischer Replikate berechnet.

Für weitere Optimierungen des Mediums, insbesondere im Hinblick auf weiterführende Studien z.B. für Proteomanalysen oder für die Behandlung mit extrazellulären sRNAs, wäre eine automatisierte Wachstumsanalyse wünschenswert. Dafür wurden Pilotexperimente in einem Mikrobioreaktor vorgenommen, als das Gerät verfügbar wurde.

In einem ersten Experiment konnten die Biomasse sowie die Gfp- und mCherry-Fluoreszenz transgener Stämme, welche im Laufe dieser Arbeit erstellt wurden und später im Kapitel 2.1.6 „Transformation“ beschrieben werden, detektiert werden (Abbildung 5). Vergleichbar zu den manuell erfassten Zelldichten wuchs die in arbiträren Biomasse-Einheiten gemessene Zelldichte auch hier bis zum fünften Kultivierungstag exponentiell an. Auch die Verdopplungszeit in YL ist mit 1,2-1,4 Tagen ebenfalls vergleichbar zur manuellen Messung. Der leichte Unterschied in der Verdopplungszeit zwischen den Stämmen könnte auf eine OD_{600} der Vorkultur zurückzuführen sein, die aufgrund der limitierten Geräteverfügbarkeit für dieses Pilotexperiment verwendet wurde. Die hohe OD_{600} könnte bedeuten, dass mit einem geringeren Anteil lebenden Zellen inokuliert wurde und/oder dass die Zellen physiologisch an den inzwischen niedrigen Nährstoffgehalt der Vorkultur angepasst waren. Beides würde zu einer Verlängerung der lag-Phase führen. Nach Tag fünf sinkt die Zelldichte erst zügig und dann langsamer und scheint schließlich nach dem siebten Kultivierungstag relativ konstant zu sein. Ob die unterschiedliche Entwicklung der Zelldichte zwischen dem fünften und siebten Kultivierungstag an einer Stagnation des Wachstums, einer vermehrten Bildung leerer Segmente, zerborstenen Zellen, natürlichem Zelltod und/oder einer verstärkten Klümpchenbildung liegt, ist derzeit unklar.

Neben der Biomasse konnte auch Fluoreszenz detektiert werden. Für LF1_hpt-gfp korrelierte die Gfp-Fluoreszenz während der exponentiellen Phase mit der Biomasse. Für LF1 wurde kein Gfp-Signal erwartet, da es sich um einen Wildtyp handelt. Tatsächlich sank die Autofluoreszenz von LF1 bis zu Kultivierungstag 4,5 und stieg danach leicht an. Bei der Mikroskopie von *T. thlaspeos* und *U. maydis* entstand der Eindruck, dass die Zellen nach längerer Kultivierungszeit vermehrt Autofluoreszenz im Gfp-Kanal zeigten. Diese Annahmen sowie der leichte Unterschied in der Verdopplungszeit verdeutlichen die Wichtigkeit einer qualitativ guten Vorkultur, die für dieses Pilotexperiment aus Gründen der limitierten Geräte-Verfügbarkeit leider untergeordnet werden musste.

Im Gegensatz zu Gfp konnte für den Wildtyp LF2 im mCherry-Kanal keine Autofluoreszenz beobachtet werden. LF2-hpt-mcherry zeigte während der exponentiellen Phase eine Korrelation zwischen mCherry-Fluoreszenz und Biomasse. Bei detaillierter Betrachtung der Daten fiel eine periodische Schwankung der Messwerte im mCherry-Kanal bei allen Replikaten auf. Dies korrelierte mit der Nutzung eines anderen Hitze- und Luftfeuchte-emittierenden Gerätes in der Nähe des Gerätestandortes.

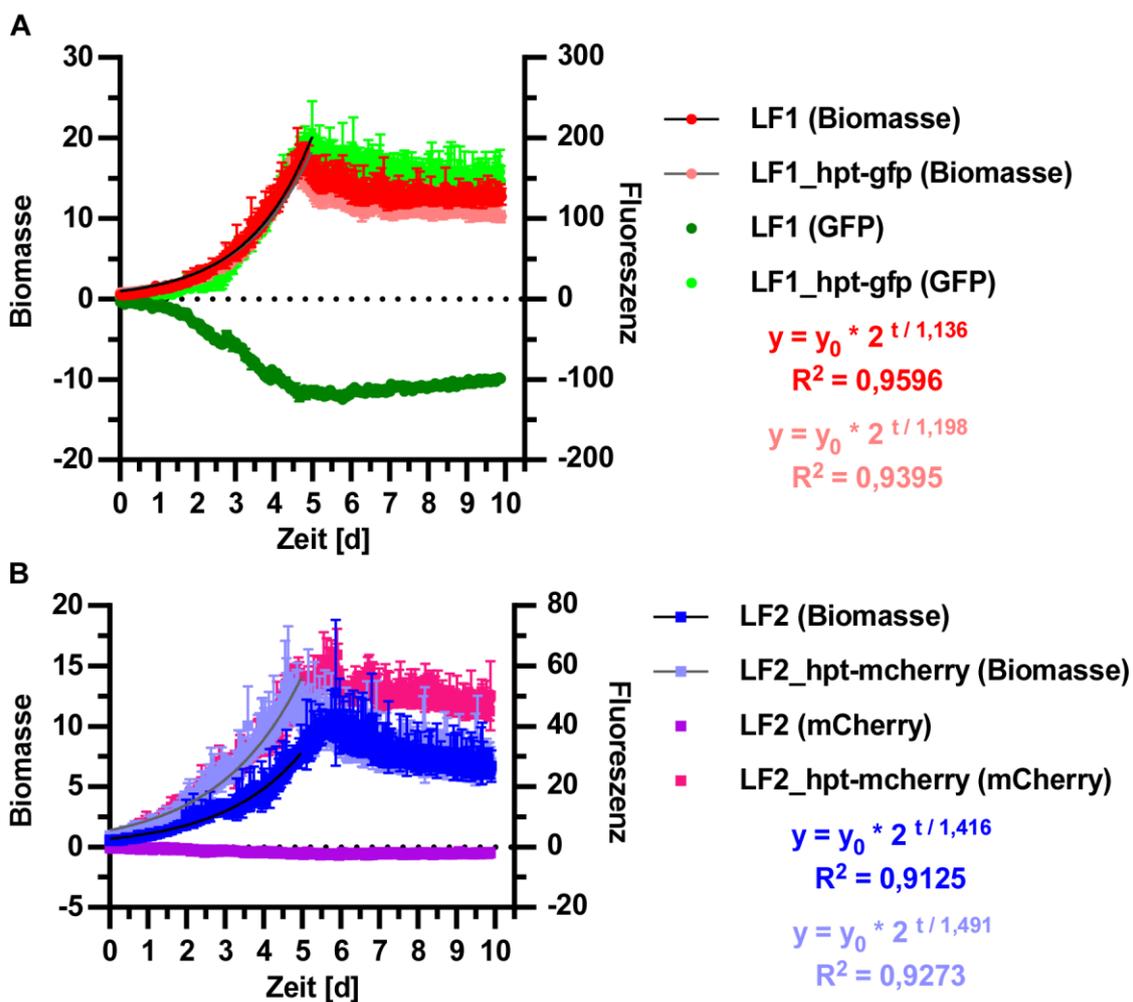


Abbildung 5 Automatisierte Datenerfassung verschiedener Parameter während des Wachstums von *T. thlaspeos*. Während der Kultivierung von A) LF1 und LF1_hpt-gfp sowie B) LF2 und LF2_hpt-gfp in YL im Mikrobioreaktor in Round-Well-Platten bei 1500 μ L Füllvolumen, einer Start-OD₆₀₀ von 0,05, 1000 rpm und einer Gas-permeablen Folie mit verdunstungsreduzierender Schicht wurden Biomasse sowie Gfp- bzw. mCherry-Fluoreszenz alle 30 min erfasst. Dabei betrug der Verstärkungsfaktor (Gain) für die Biomasse 5 und für die Fluoreszenz-Kanäle jeweils 100. Gezeigt sind Mittelwert und Standardabweichung dreier biologischer Replikate. Regressionskurven der Biomasse wurden bis zum Ende der exponentiellen Phase berechnet und sind in schwarz (WT) und grau (Transformant) dargestellt. Gezeigt ist ein Pilotexperiment. Biomasse und Fluoreszenz wurden in arbiträren Einheiten gemessen, die durch den Mikrobioreaktor definiert sind.

Darüber hinaus wurden weitere Parameter für die Kultivierung von *T. thlaspeos* im Mikrobioreaktor getestet (Tabelle 1). In einer anderen Platte, die keine runden, sondern blumenförmige Kavitäten (Flower-Well-Platte) besaß, konnte bei 800 μ L Füllvolumen und einer Schüttelfrequenz von 1000 rpm ein linearer Anstieg der Biomasse beobachtet werden. Bei einer Schüttelfrequenz von 1500 rpm klebten die Zellen an den Wänden der Kavitäten und konnten deshalb nicht detektiert werden. Da in der Round-Well-Platte die übliche exponentielle Wachstumskurve beobachtet werden konnte, wurden die weiteren Parameter in Round-Well-Platten getestet. Bei Verwendung von atmungsaktiven Folien wurde ein Flüssigkeitsverlust

von 20-38 % gemessen. Auch wenn das Gerät aufgrund des ungeeigneten Standorts die Luftfeuchtigkeit nicht ausreichend regulieren konnte, sollte zukünftig eine Folie mit verdunstungsreduzierender Schicht verwendet werden.

Bei der Detektion der Zellen und der Darstellung der Daten werden Verstärkungsfaktoren (Gains) verwendet. Für die Biomasse erreichten die Werte bei einem Gain von 40 ein Maximum, über das hinaus das Gerät keine weitere Zunahme detektieren konnte. Dies konnte entweder durch einen niedrigeren Gain oder durch eine geringere Start-OD₆₀₀ verhindert werden. Bei Gains von 5, 10, 20 und 30 war die Biomasse stets im detektierbaren Bereich. Für die Messung der Gfp-Fluoreszenz wurden die Gains 80 und 100 getestet. Beide erreichen das Maximum nicht und können daher verwendet werden. Dasselbe gilt für einen Gain von 100 für die mCherry-Fluoreszenz. Da der Gain und die Start-OD₆₀₀ das Detektionsmaximum beeinflussen, sollte bei diesen Gains eine Start-OD₆₀₀ von 0,05 verwendet werden.

Bei einem Kulturvolumen von 1500 µL wurde beobachtet, dass Zellen an der Wand der Kavität und der Folie klebten. Diese würden nicht detektiert werden, da das Gerät die Zelldichte von unten misst. Bei einem Kulturvolumen von 1000 µL war dies nicht der Fall.

Außerdem wurde das Wachstumsverhalten unterschiedlich lange inkubierter Vorkulturen gemessen. Dabei zeigte sich, dass eine Subkultivierung alle 2-4 Tage ausreicht, um ein schnelles, exponentielles Wachstum wie in Abbildung 5 zu erreichen.

Tabelle 1 Getestete Parameter zur Kultivierung von *T. thlaspeos* im Mikrobioreaktor. Einige Bedingungen wurden einmalig getestet.

		getestete Parameter	empfohlene Parameter
Gerätestandort		schwankende Temperatur und Luftfeuchte	klimatisiert
Plattentyp		Round-Well-Platte, Flower-Platte	Round-Well-Platte
Folie		atmungsaktiv, verdunstungsreduzierend	verdunstungsreduzierend
Gain	Biomasse	5, 10, 20, 30, 40	5
	Gfp	80, 100	keine Präferenz
	mCherry	100	100
Start-OD₆₀₀		0,025; 0,05	0,05
Kulturvolumen [µL]	Round-Well-Platte	1000, 1200, 1500	1000
Alter der Kultur [Tage]		1-6	2-4

Zusammenfassend wurden für *T. thlaspeos* verschiedene Wachstumsbedingungen untersucht. Für die Kultivierung in Schikanekolben in YL wird eine Kultivierung bis zu einer OD₆₀₀ von 1,5 empfohlen, da hier OD₆₀₀ und Frischgewicht linear korrelieren. Bei einer

Verdopplungszeit von 1,2 Tagen sollte eine Subkultivierung also alle drei bis vier Tage erfolgen. Der Erntezeitpunkt wurde in der frühen exponentiellen Phase bei einer OD₆₀₀ von 0,5-0,8 gewählt. Mit einer Verdopplungszeit von 1,1 Tagen zeigte *T. thlaspeos* in YMPG ein etwas schnelleres Wachstum gegenüber YL und CM. Damit wurden die Grundlagen für zuverlässig planbares Ausgangsmaterial geschaffen. Für eine automatisierte Analyse des Wachstums wurden einflussreiche Aspekte für die Verwendung des Mikrobioreaktors für *T. thlaspeos* identifiziert, wobei neben der Biomasse auch Gfp- und mCherry-Fluoreszenz detektierbar sind. Wichtige Parameter umfassen den Gerätestandort, die Verwendung niedriger Gains für die Biomasse-Detektion, die Qualität der Vorkultur und die Verwendung einer Gas-permeablen Folie mit verdunstungsreduzierender Schicht. Außerdem sollten Round-Well-Platten mit 1000 µL Kulturvolumen gefüllt werden. Anhand dieser essentiellen Vorarbeiten können nun Analysen zur Reproduzierbarkeit der Ergebnisse erfolgen, um beispielsweise Minimalmedien zu optimieren oder Fluoreszenz-basierte Langzeitmessungen, z.B. nach Behandlung mit sRNA, durchzuführen (siehe Kapitel 3.2.2 „Experimentelle Untersuchung der Funktionalität der RNAi-Schlüsselkomponenten“).

2.1.2. Protoplastierung

2.1.2.1. Identifikation geeigneter Zellwand-abbauender Enzyme

Nachdem für *T. thlaspeos* eine Protoplastierung von Filamenten aus Flüssigkultur mit anschließender PEG-Transformation aus oben genannten Gründen aussichtsreich erschien, wurden verschiedene Strategien getestet, um geeignete Zellwand-abbauende Enzyme zu identifizieren. Es wurden Protokolle anderer filamentöser Pilze sowie Protokolle verwandter, aber nicht zwingend filamentös wachsender Pilze getestet. Außerdem wurden Enzyme systematisch kombiniert, um alle Zellwandbestandteile degradieren zu können und gegebenenfalls gezielt bestimmte Enzymmengen dosieren zu können. Die eingesetzten Enzyme waren auf die üblichen Bestandteile der pilzlichen Zellwand, überwiegend Glucan und Chitin, abgestimmt (Bowman and Free, 2006). So besitzt der Enzym-Mix Glucanex unter anderem Beta-1,3-Glucanase-Aktivität, wodurch die Glucan-Schicht abgebaut werden soll, und der Enzym-Mix Yatalase weist vor allem Chitinase-, Chitobiase und Beta-1,3-Glucanase-Aktivität auf, wodurch darüber hinaus die Chitin-Schicht degradiert werden soll (Plücker et al., 2021).

Das Protoplastierungsprotokoll des filamentösen Pilzes *Serendipita indica* (früher: *Piriformospora indica*) sieht eine einstündige Inkubation in Sorbitol-haltigem MES-Puffer mit 20 mg/mL Glucanex bei 37°C vor (Osman et al., 2020, Zuccaro et al., 2009). In einem ersten Experiment mit *T. thlaspeos* konnten wenige Protoplasten beobachtet werden (Tabelle 2), jedoch war dies nicht reproduzierbar. Daraufhin wurden Enzymkonzentration, Inkubationszeit- und -temperatur, oder verschiedene Kombinationen davon getestet. Eine längere

Inkubationszeit in Kombination mit einer höheren Temperatur ergaben wieder wenige Protoplasten.

Da sich verschiedene verwandte Pilze gut protoplastieren lassen, wurden verschiedene dieser Protokolle getestet. Für *U. maydis* wird eine bis zu 20-minütige Inkubation in Sorbitol-haltigem Citrat-Puffer mit 12,5 mg/mL Glucanex verwendet (Bösch et al., 2016). Bei *T. thlaspeos* waren unter diesen Bedingungen keine Protoplasten sichtbar. Auch eine achtfache Enzymkonzentration und eine mehrstündige Inkubation änderten daran nichts (Tabelle 2).

U. bromivora wird in einem MES-Puffer mit Magnesiumsulfat ($MgSO_4$) und einer Enzymkombination aus 10 mg/mL Glucanex und 5 mg/mL Yatalase inkubiert (Rabe et al., 2016). Für *T. thlaspeos* wurde unter diesen Bedingungen beobachtet, dass die leeren Sektionen, die die Cytoplasma-gefüllten Zellen verbinden, aufgelöst wurden. Bei doppelter Enzymkonzentration konnte für erste Versuche eine zufriedenstellende Menge an Protoplasten beobachtet werden (Tabelle 2).

Für den filamentösen Pilz *Aspergillus niger* wurden systematisch verschiedene Enzymkombinationen getestet, um die Zellwand abzubauen und Protoplasten zu erhalten (de Bekker et al., 2009). Dieses Schema wurde auch für *T. thlaspeos* adaptiert. Hier führten 20 mg/mL Glucanex und 0,3 U/mL Chitinase in einem Sorbitol-haltigem Citrat-Puffer nach zwei Stunden Inkubation bei Raumtemperatur zu einer geringen Protoplastenausbeute (Tabelle 2). Da die parallel durchgeführten Versuche nach dem Protokoll von *U. bromivora* eine deutlich bessere Ausbeute ergaben, wurde darauf verzichtet, dieses Protokoll durch zusätzliche Hemicellulase und beta-Glucuronidase zu erweitern.

Zusammenfassend war eine Protoplastierung in Sorbitol-haltigen Puffern mit Glucanex im besten Fall unzureichend. Durch Zugabe von Chitinase konnten in solchen Puffern immerhin wenige Protoplasten beobachtet werden. Erst die Kombination von Glucanex und Yatalase in einem $MgSO_4$ -haltigen Puffer zeigte ausreichend Protoplasten. Nach diesen ersten Ergebnissen war eine erhöhte Chitinase-Aktivität, entweder durch reine Chitinase oder durch Yatalase, notwendig.

Für *T. thlaspeos* wurden zwei Enzymkombinationen in verschiedenen Puffern identifiziert, welche Protoplasten produzierten. Diese sind Glucanex mit Chitinase in Citrat-Puffer mit Sorbitol und Glucanex mit Yatalase in MES-Puffer mit $MgSO_4$. Damit war ein Meilenstein für die Etablierung eines Protoplasten-basierten Transformationsprotokolls erreicht.

Tabelle 2 Getestete Parameter zur Identifikation geeigneter Zellwand-abbauender Enzyme. Die meisten Bedingungen wurden einmalig getestet. Die Strategien wurden angelehnt an Protokolle verwandter Pilze, filamentöser Pilze oder auf den Zellwandaufbau angepassten Enzymmischung. Diese Tabelle wurde modifiziert nach (Plücker et al., 2021) (Tab. S1).

Strategie	Enzyme	Pufferzusammensetzung	Temperatur	Inkubationszeit	Protoplasten	Referenz
Verwandtschaft <i>(U. maydis)</i>	12,5 mg/mL Glucanex	0,02 M Citrat-Puffer + 1 M Sorbitol	RT	2 h	nein	(Bösch et al., 2016)
Verwandtschaft <i>(U. maydis)</i>	100 mg/mL Glucanex	0,02 M Citrat-Puffer + 1 M Sorbitol	RT	2 h	nein, fragmentiertes Cytosol	(Bösch et al., 2016)
Filamentöser Pilz <i>(S. indica)</i>	20 mg/mL Glucanex	0,02 M MES + 0,05 M CaCl ₂ + 1,33 M Sorbitol	RT, 28 °C, 37 °C	Bis zu 5 h	Bei 37 °C konnten vereinzelt Protoplasten beobachtet werden	(Zuccaro et al., 2009)
Filamentöser Pilz <i>(S. indica)</i>	100 mg/mL Glucanex	0,02 M MES + 0,05 M CaCl ₂ + 1,33 M Sorbitol	RT, 28 °C, 37 °C	Bis zu 5 h	Bei 37 °C konnten vereinzelt Protoplasten beobachtet werden	(Zuccaro et al., 2009)
Zellwandaufbau <i>(A. niger)</i>	20 mg/mL Glucanex + 0,015 U/mL Chitinase	0,02 M Citrat-Puffer + 1 M Sorbitol	RT	bis 20 h	nein	(de Bekker et al., 2009)
Zellwandaufbau <i>(A. niger)</i>	20 mg/mL Glucanex + 0,3 U/mL Chitinase	0,02 M Citrat-Puffer + 1 M Sorbitol	RT	2 h	wenige	(de Bekker et al., 2009)
Verwandtschaft <i>(U. bromivora)</i>	10 mg/mL Glucanex + 5 mg/mL Yatalase	0,02 M MES + 1 M MgSO ₄	RT	bis 1,5 h	nein, leere Sektionen entfernt	(Rabe et al., 2016)
Verwandtschaft <i>(U. bromivora)</i>	20 mg/mL Glucanex + 10 mg/mL Yatalase	0,02 M MES + 1 M MgSO ₄	RT	bis 1,5 h	ausreichend	(Rabe et al., 2016)

2.1.2.2. Optimierung des Protoplastierungspuffers

Nachdem zwei für die Protoplastierung von *T. thlaspeos* geeignete Enzymkombinationen gefunden wurden, wurde die effizientere von beiden, Glucanex mit Yatalase, für die Optimierung ausgewählt.

Da Puffer einen Einfluss auf die Enzymaktivität und die Stabilität von Protoplasten haben (Schomburg et al., 2012, Li et al., 2017a), wurde zunächst der Puffer optimiert. Dieser besteht aus zwei Faktoren, dem Puffer und dem osmotischen Stabilisator (Li et al., 2017a). Während der Identifikation Zellwand-abbauender Enzyme wurden bereits einige Protoplastierungspuffer getestet. Ein MES-Puffer mit $MgSO_4$ und ein Citrat-Puffer mit Sorbitol erlaubten die Beobachtung von Protoplasten unter Verwendung verschiedener Enzymkombinationen. Dies deutet darauf hin, dass die Protoplasten in diesen Protoplastierungspuffern stabil waren.

Bei anderen Pilzen kommen oft verschiedene Citrat-Puffer und MES-Puffer mit osmotischen Stabilisatoren wie Sorbitol, $MgSO_4$ oder Saccharose zum Einsatz (Tabelle 3) (Zuccaro et al., 2009, Ghareeb et al., 2015, Rabe et al., 2016, Yu et al., 2015, Bösch et al., 2016). Da in einem Pilotexperiment der Citrat-Puffer mit $MgSO_4$ effizienter erschien als der MES-Puffer mit $MgSO_4$ (Masterarbeit (Plücker, 2017)), wurden darüber hinaus die osmotischen Stabilisatoren in Citrat-Puffer getestet.

Tabelle 3 Übersicht verschiedener Protoplastierungsprotokolle in Pilzen.

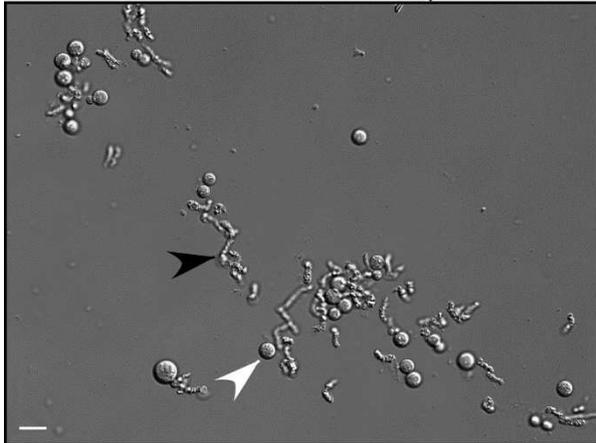
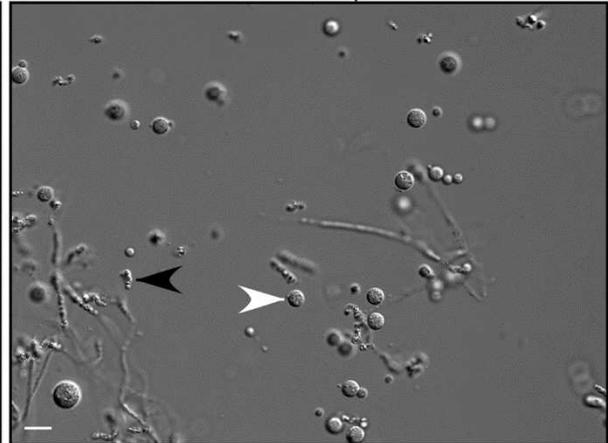
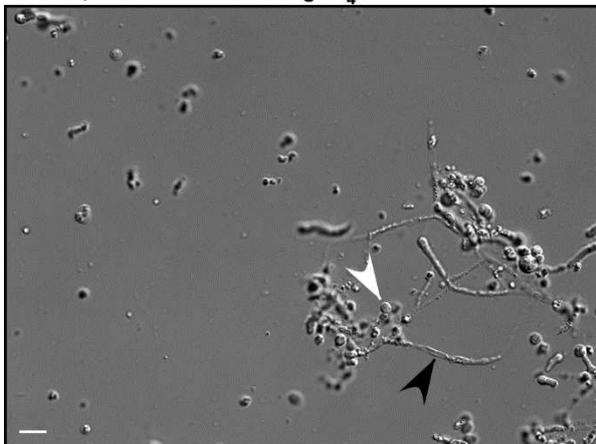
Organismus	Wachstumsform	Protoplastierungspuffer	Enzyme	Referenz
<i>S. indica</i>	Filamente	0,02 M MES + 0,05 M $CaCl_2$ + 1,33 M Sorbitol	20 mg/mL Glucanex	(Zuccaro et al., 2009)
<i>S. reilianum</i>	Hefeform	0,02 M Citrat-Puffer + 1 M Sorbitol	2,5 mg/mL Novozym	(Ghareeb et al., 2015)
<i>U. bromivora</i>	Hefeform	0,02 M MES + 1 M $MgSO_4$	10 mg/mL Glucanex + 5 mg/mL Yatalase	(Rabe et al., 2016)
<i>U. esculenta</i>	Hefeform	0,02 M Citrat-Puffer + 0,4 M Saccharose	15 mg/mL Lywallzyme	(Yu et al., 2015)
<i>U. maydis</i>	Hefeform	0,02 M Citrat-Puffer + 1 M Sorbitol	12,5 mg/mL Glucanex	(Bösch et al., 2016)

In 0,1 M Citrat-Puffer mit 0,01 M EDTA und 1,2 M $MgSO_4$ (*Thecaphora*-Protoplastierungspuffer 1, TPP1) wurden die Zellwände effizient abgebaut, was zu $1,6 \cdot 10^7$ Protoplasten pro mL und einer geringen Menge an Zellresten führte (Abbildung 6). In 0,2 M Citrat-Puffer mit 1,2 M $MgSO_4$ (TPP2) waren mit ca. $2,9 \cdot 10^7$ Protoplasten pro mL deutlich mehr Protoplasten sichtbar und auch die Menge an Zellresten war gering. In 0,02 M MES-Puffer mit 1,2 M $MgSO_4$ (TPP3) wurden mit ca. $6,1 \cdot 10^6$ Protoplasten pro mL deutlich weniger Protoplasten gezählt. Die Menge an Zellresten war hier höher als in den ersten beiden Puffern. In 0,1 M Citrat-Puffer

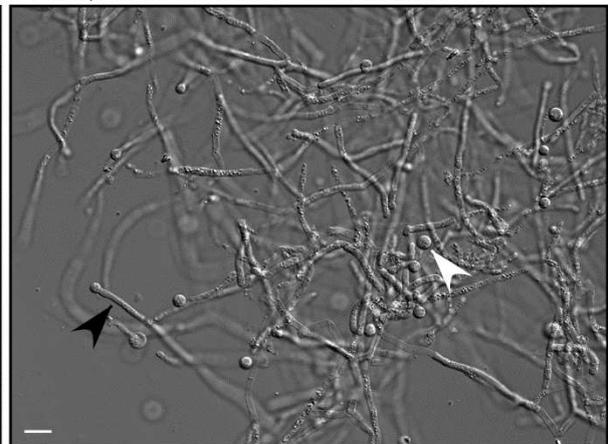
mit 0,01 M EDTA und 1 M Sorbitol (TPP4) und in 0,2 M Citrat-Puffer mit 0,4 M Saccharose (TPP5) war die Anzahl der Protoplasten sehr stark reduziert. Gleichzeitig waren sehr viele Filamente zu sehen. Da der Unterschied zu den ersten drei Puffern so eindeutig schlechter war, wurde hier auf eine Quantifizierung verzichtet. Der Trend zeigt bereits, dass ein etwas höher konzentrierter Citrat-Puffer ohne EDTA und mit MgSO_4 als osmotischem Stabilisator die meisten Protoplasten erzeugt.

Nach Evaluation verschiedener Protoplastierungspuffer wurden in beiden Replikaten in 0,2 M Citrat-Puffer mit 1,2 M MgSO_4 die meisten Protoplasten gezählt. Die Protoplastierungseffizienz war im Vergleich zu den anderen quantifizierten Puffern in beiden Replikaten durchschnittlich 2,7-mal bzw. 4,8-mal höher. Damit konnten ausreichend Protoplasten für Transformationen hergestellt werden.

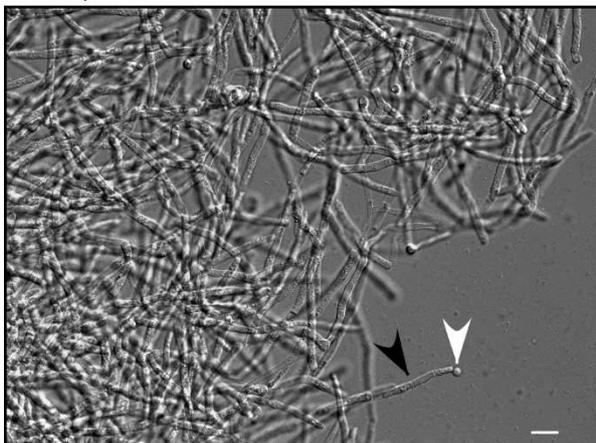
A

TPP1: 0,1 M Citrat-Puffer + EDTA + MgSO₄TPP2: 0,2 M Citrat-Puffer + MgSO₄TPP3: 0,02 M MES-Puffer + MgSO₄

TPP4: 0,1 M Citrat-Puffer + EDTA + Sorbitol



TPP5: 0,02 M Citrat-Puffer + Saccharose



B

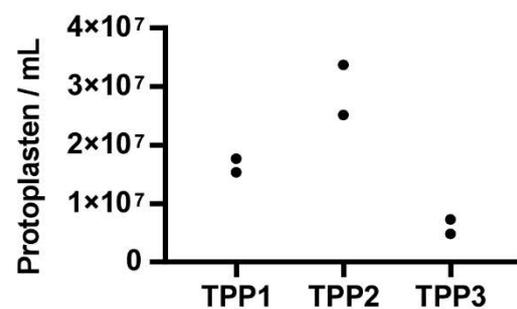


Abbildung 6 Optimierung des Protoplastierungspuffers. *T. thlaspeos* LF1 Filamente wurden in verschiedenen Protoplastierungspuffern (TPP) mit 20 mg/mL Glucanex und 10 mg/mL Yatalase inkubiert (A). Anschließend wurden Protoplastenkonzentrationen der drei sichtbar effizientesten Protoplastierungspuffer ausgezählt (B). Weiße Pfeilköpfe zeigen Protoplasten und schwarze Pfeilköpfe zeigen Zellreste. Größenbalken sind 10 µm lang. Es wurden zwei experimentelle Replikate erstellt. TPP1: 0,1 M Citrat Puffer + 0,01 M EDTA + 1,2 M MgSO₄, TPP2: 0,02 M Citrat Puffer + 1,2 M MgSO₄, TPP3: 0,02 M MES + 1,2 M MgSO₄, TPP4: 0,1 M Citrat Puffer + 0,01M EDTA + 1 M Sorbitol, TPP5: 0,02 M Citrat Puffer + 0,4 M Saccharose.

2.1.2.3. Optimierung der Enzymmenge

Um die Kosten langfristig niedrig zu halten, wurde getestet, ob eines der Enzyme überflüssig ist oder die Enzymmenge reduziert werden kann (Abbildung 7). In TPP1, bestehend aus 0,1 M Citrat-Puffer mit 0,01 M EDTA und 1,2 M $MgSO_4$, waren ohne Enzyme lediglich einige Partikel in den intakten Filamenten sichtbar, jedoch keine Protoplasten. Nach Zugabe von 20 mg/mL Glucanex und 10 mg/mL Yatalase konnten nach 30 Minuten viele runde Protoplasten und einige Zellreste beobachtet werden. Wurde nur Glucanex verwendet, waren fast ausschließlich Filamente mit vielen Partikeln und nur selten Protoplasten zu sehen. Bei Verwendung von Yatalase waren die meisten Filamente noch intakt. Es wurden mehr Protoplasten gebildet als mit Glucanex, aber deutlich weniger als bei Verwendung der Enzymkombination. Daher ist die Verwendung der Enzymkombination aus Glucanex und Yatalase für eine effiziente Protoplastierung der Filamente von *T. thlaspeos* unbedingt erforderlich.

Zudem wurde die Enzymkonzentration überprüft (Kollaboration mit Lesley Plücker). Die Kombination aus 20 mg/mL Glucanex und 10 mg/mL Yatalase resultierte in TPP1 wie gewohnt zu vielen Protoplasten und einigen Zellresten. Bei jeweils halbiertes Enzymkonzentration wurden wieder viele Protoplasten beobachtet. Hier gab es subjektiv betrachtet marginal öfter längere Zellreste. Bei einem Viertel der ursprünglich eingesetzten Enzymmenge waren deutlich weniger Protoplasten und deutlich mehr und größere Zellreste zu sehen.

Grundsätzlich können sowohl die Konzentration als auch die Inkubationsdauer unter Protoplastierungsbedingungen die Protoplastenausbeute und -viabilität beeinflussen (Koukaki et al., 2003). Bei *Aspergillus nidulans* war die Anzahl der Protoplasten bei einer Enzymkonzentration von bis zu 100 mg/mL oder einer Inkubationszeit von 60-90 min maximal und sank jeweils bei höheren oder niedrigeren Werten (Koukaki et al., 2003). Allerdings wurde auch von verringerter Protoplastenviabilität im Zusammenhang mit beiden Faktoren berichtet (Koukaki et al., 2003). Daher könnten diese Faktoren nach der Etablierung geeigneter Bedingungen für die Regeneration weiter optimiert werden.

Für eine effiziente Protoplastierung müssen also 20 mg/mL Glucanex in Kombination mit 10 mg/mL Yatalase eingesetzt werden. Die Protoplastierung war in dem verwendeten Citrat-Puffer mit $MgSO_4$ effizient genug, um Aufreinigungen und erste Transformationen durchzuführen.

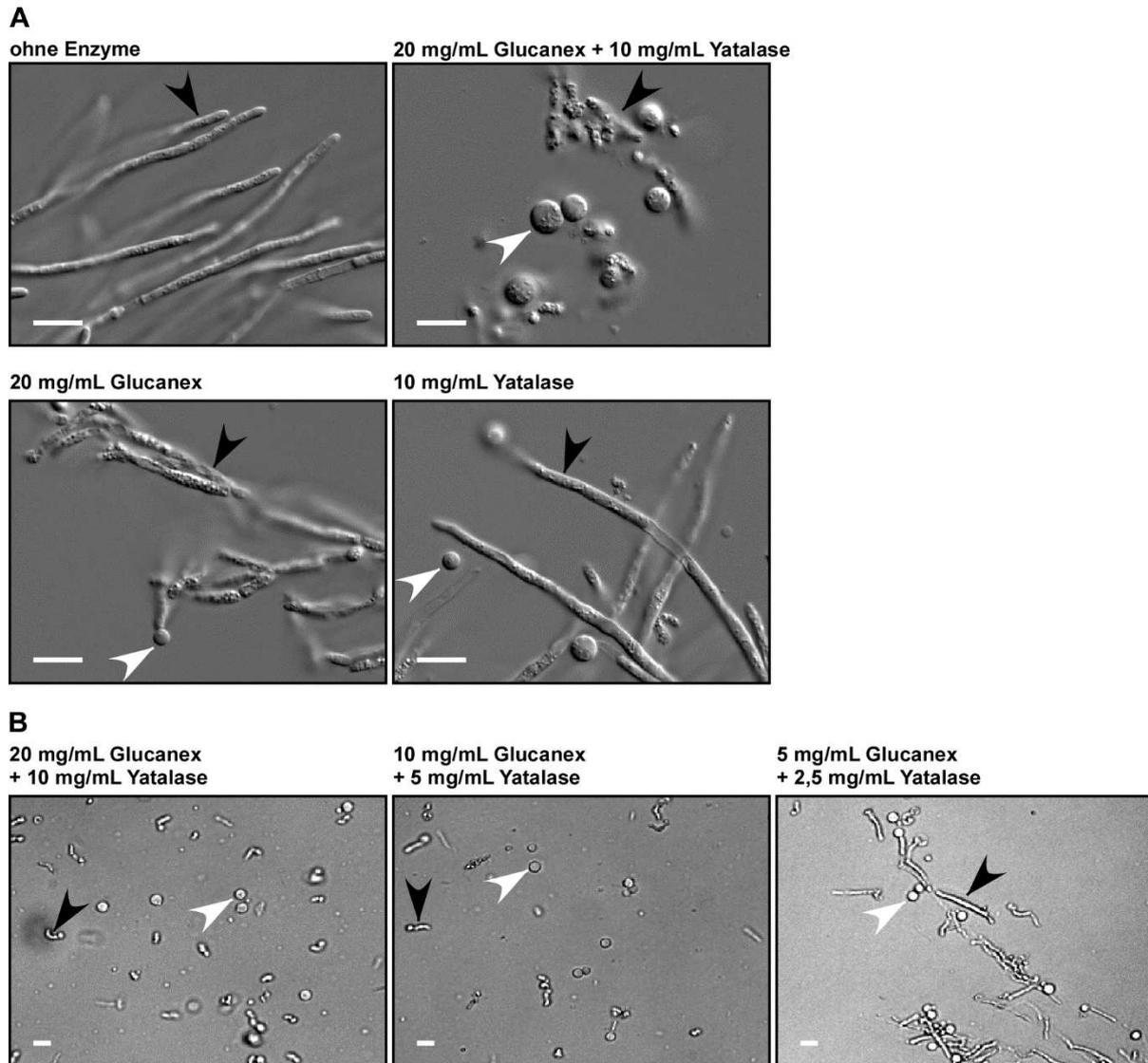


Abbildung 7 Optimierung der Protoplastierungsenzyme. *T. thlaspeos* LF1 Filamente wurden in TPP1 (0,1 M Citrat-Puffer + 0,01 M EDTA + 1,2 M MgSO₄) inkubiert, welches A) verschiedene Enzymkombinationen oder B) unterschiedliche Enzymkonzentrationen enthielt. Weiße Pfeilköpfe zeigen Protoplasten und schwarze Pfeilköpfe zeigen Zellreste. Größenbalken sind 10 µm lang. Die Tests zur Enzymkonzentration wurden in Kollaboration mit Lesley Plücker durchgeführt. Gezeigt ist je eines von drei experimentellen Replikaten. Teil A der Abbildung wurde modifiziert nach (Plücker et al., 2021) (Abb. 3A).

2.1.2.4. Etabliertes Protoplastierungsprotokoll

Um Protoplasten aus *T. thlaspeos* zu gewinnen wurde folgendes Protokoll etabliert (Abbildung 8). Filamente von *T. thlaspeos* wurden in YL auf eine OD₆₀₀ von 0,5-0,8 angezogen. Ein Volumen entsprechend ca. 1,8 g Frischgewicht, also 100-160 mL, wurde abfiltriert und mit TPP1 gewaschen. Die Zellen wurden dann in 9 mL TPP1 mit 20 mg/mL Glucanex und 10 mg/mL Yatalase bei Raumtemperatur inkubiert und dabei zwei- bis dreimal leicht geschwenkt. Nach 30 min wurde der Protoplastierungsfortschritt mikroskopisch überprüft. Die Zellen waren zu diesem Zeitpunkt fast vollständig protoplastiert und nur einige

Zellreste waren zu sehen. Um die Protoplastierung zu stoppen, wurden alle weiteren Schritte auf Eis durchgeführt. Da die Protoplasten in dem MgSO_4 -haltigen Puffer aufschwammen, wurde ein Sammelpuffer auf Grundlage eines Protokolls von *Aspergillus sp.* (Yelton et al., 1984) etabliert, um die Protoplasten in einer Interphase sammeln zu können (Masterarbeit (Plücker, 2017)). Dazu wurde das Volumen mit eiskaltem TPP1 auf 24 mL eingestellt und die Lösung gleichmäßig auf vier 15 mL-Zentrifugenröhrchen aliquotiert. Diese wurden dann vorsichtig mit je 5 mL eiskaltem Sammelpuffer überschichtet. Nach einer Zentrifugation von 15 min bei 5000 rpm und 4 °C in einem Ausschwenkrotor konnte gezeigt werden, dass die Protoplasten sich in der Interphase sammelten, und das Pellet aus Zellresten bestand (Masterarbeit (Plücker, 2017)). Die entnommene Interphase wurde mit einem gleichen Volumen an eiskaltem STC versetzt und für 10 min bei 5000 rpm und 4 °C in einem Ausschwenkrotor zentrifugiert. Das Pellet wurde in 5 mL eiskaltem STC gelöst und unter den gleichen Bedingungen zentrifugiert. Anschließend wurde das Pellet in 800 μL eiskaltem STC gelöst. Hier konnte gezeigt werden, dass die Protoplasten aufgereinigt vorlagen. Eine Quantifizierung ergab durchschnittlich $7,2 \cdot 10^7$ Protoplasten pro g Frischgewicht bei Verwendung von LF1. Eine erste Quantifizierung von LF1_hpt-gfp ergab ähnliche Ergebnisse.

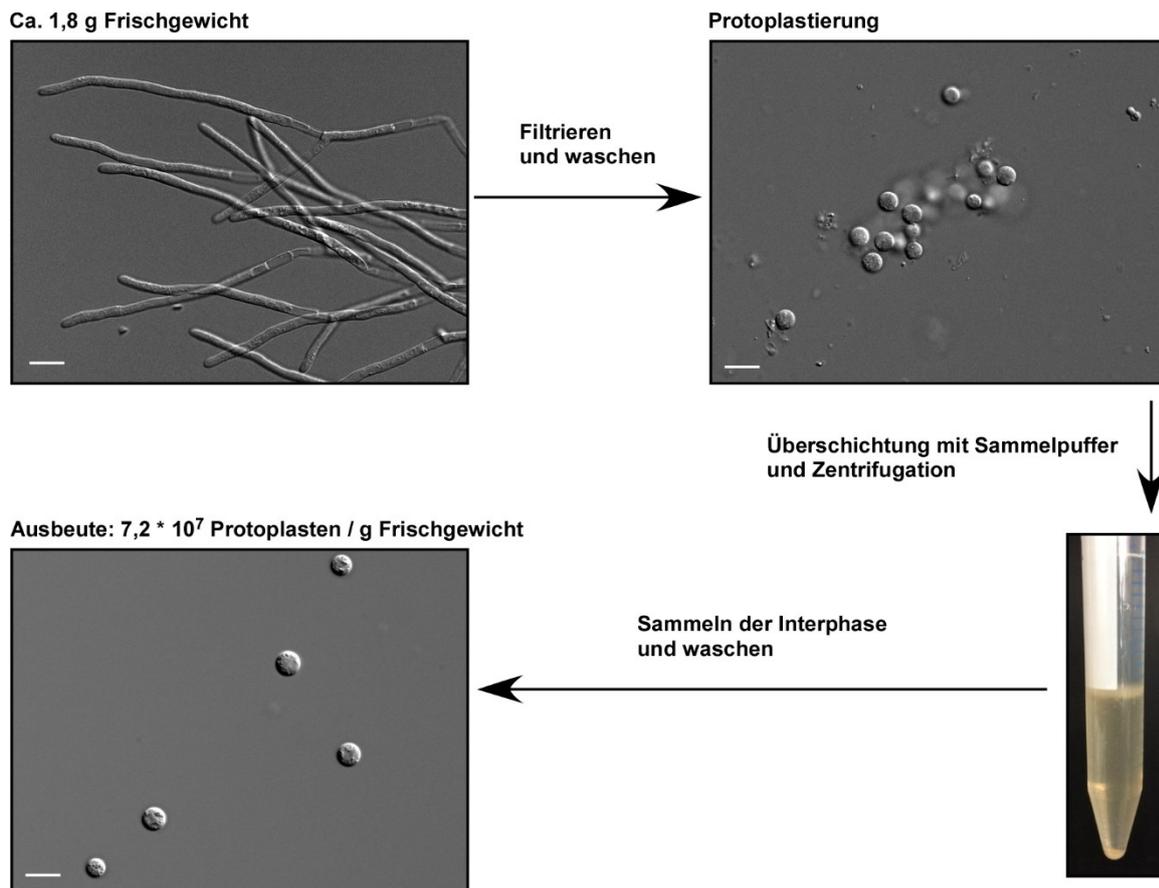


Abbildung 8 Protoplastierungsprotokoll für *T. thlaspeos*. Etwa 1,8 g Frischgewicht einer Flüssigkultur wurden filtriert, mit Protoplastierungspuffer gewaschen und in TPP1 (0,1 M Citrat Puffer + 0,01 M EDTA + 1,2 M $MgSO_4$) mit 20 mg/mL Glucanex und 10 mg/mL Yatalase für ca. 30 min bei RT inkubiert. Nach Überschichtung mit Sammelpuffer (0,1 M Tris/HCl, pH7 + 0,6 M Sorbitol) und Zentrifugation sammelten sich Protoplasten in der Interphase, welche gesammelt und mit STC (0,01 M Tris/HCl, pH7,5 + 0,1 M $CaCl_2$ + 1 M Sorbitol) gewaschen wurden. Aufgereinigte Protoplasten wurden vor der Mikroskopie 1:1 in STC verdünnt. Ausbeute stellt Mittelwert und Standardabweichung aus drei experimentellen Replikaten von LF1 dar. Größenbalken entsprechen 10 μm . In Teilen in Kollaboration mit Lesley Plücker. Die Abbildung wurde modifiziert nach (Plücker et al., 2021) (Abb. 2).

Damit wurde erfolgreich ein Protokoll zur Gewinnung und Aufreinigung von *T. thlaspeos* Protoplasten etabliert, welches Grundlage für die folgende Transformation ist. Um vor diesem arbeits- und zeitintensiven Schritt die Qualität der Protoplasten besser abschätzen zu können, wurden weitere Qualitätsanalysen etabliert.

2.1.2.5. Analyse der Qualität von Protoplasten

Die Qualität der gewonnenen Protoplasten ist ausschlaggebend für deren Regenerationsfähigkeit. Dazu gehört die Integrität der Cytoplasmamembran, welche mit Trypanblau analysiert werden kann. Es dringt durch poröse Membranen und färbt die Zellen bzw. Protoplasten dunkel an (Blachutzik et al., 2012).

Sowohl unbehandelte als auch mit Trypanblau behandelte Protoplasten wurden nicht gefärbt (Abbildung 9 A und C). Eine partielle Lyse der Protoplasten mit Ethanol (Tóth et al., 2014) führte nicht zum Platzen der Protoplasten, es wurden aber viele Partikel im Cytoplasma sichtbar (Abbildung 9B). Erst nach Behandlung mit Ethanol und Trypanblau wurden alle Protoplasten dunkel gefärbt (Abbildung 9D). Darüber hinaus gab es viele Strukturen, die ausschließlich in Proben mit Trypanblau auftraten (Abbildung 9C und D). Diese stammten aus der Trypanblau-Lösung und könnten eventuell zukünftig durch Filtration entfernt werden. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass die meisten Protoplasten intakt sind.

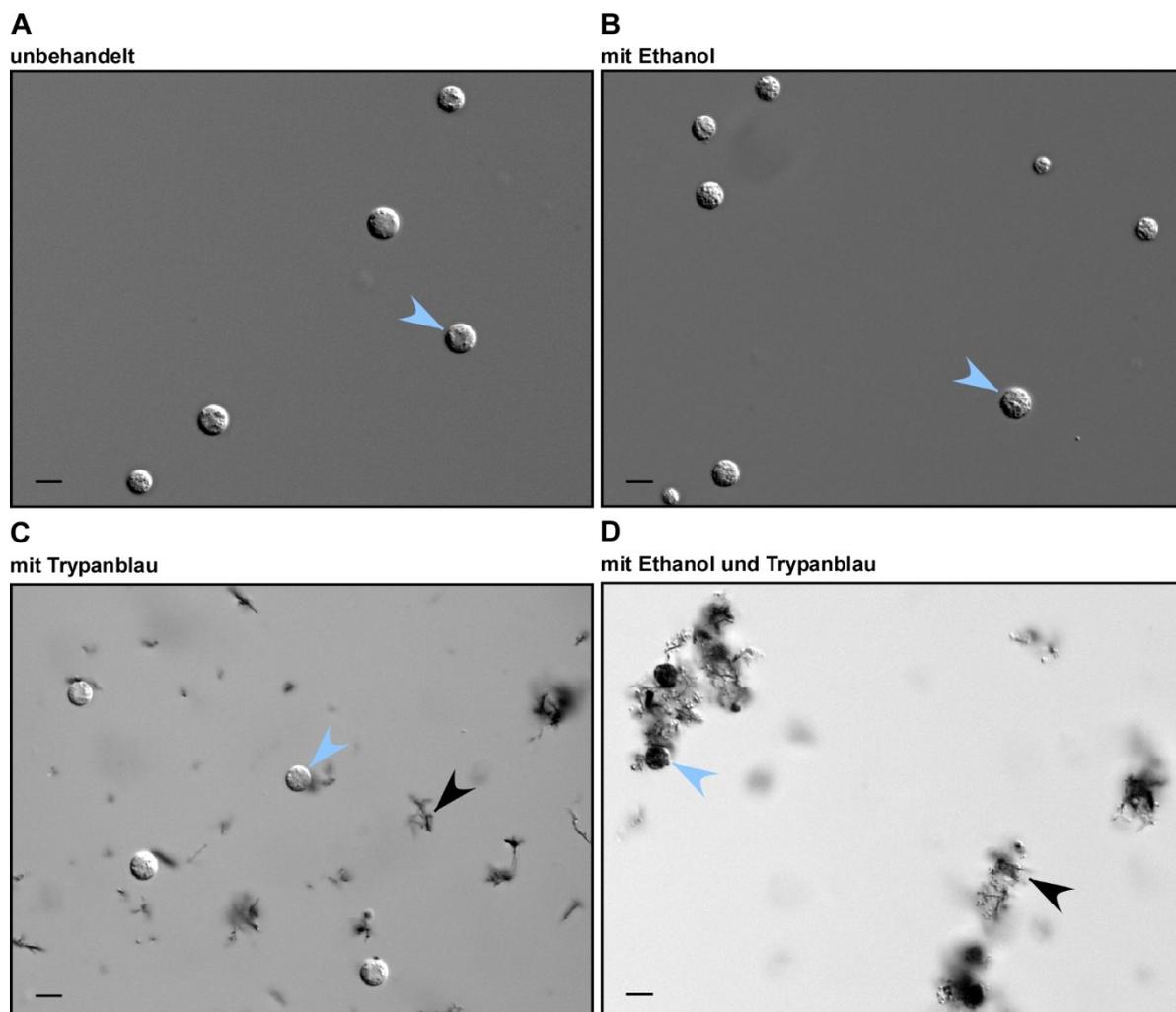


Abbildung 9 Analyse der Protoplasten-Integrität. Aufgereinigte Protoplasten von LF1 wurden 20x verdünnt und anschließend unbehandelt (A), mit Ethanol partiell lysiert (B), mit Trypanblau versetzt (C) oder mit Ethanol partiell lysiert und mit Trypanblau versetzt (D) mikroskopiert. Trypanblau ist nicht-membranpermeabel und indiziert so durch Akkumulation in der Zelle beschädigte Membranen. Hellblaue Pfeilköpfe zeigen Protoplasten. Schwarze Pfeilköpfe zeigen Partikel, die aus der Trypanblau-Lösung stammen. Größenbalken sind 10 µm lang. N= ein Experiment.

Es wurde ein Protokoll zur Analyse der Cytoplasmamembranintegrität von *T. thlaspeos* Protoplasten etabliert, welches zukünftig bei jedem Experiment durchgeführt werden sollte, da diese wichtig für die Regeneration ist. Dass eine erste Analyse intakte Membranen indizierte, war vielversprechend für die Regeneration der Protoplasten.

2.1.3. Regeneration von Protoplasten

Nach einer Transformation sollten Protoplasten möglichst schnell eine Zellwand aufbauen und die Zellteilung beginnen. Da LF1, wie oben gezeigt, in YMPG schnelles und dichtes Wachstum zeigte, wurde dieses Medium für die Regeneration gewählt. Erste Regenerationstests zeigten, dass die Protoplasten deutlich besser auf 1 M Saccharose regenerieren als auf 1 M Sorbitol oder 1 M Glukose (Masterarbeit (Plücker, 2017)).

Zu Beginn dieser Arbeit wurde *T. thlaspeos* auf Medien mit Pflanzenagar oder Phytigel kultiviert. Daher wurden Protoplasten auf Regenerationsmedien mit beiden Geliermitteln ausgebracht, um zu testen, ob eines vorteilhaft ist. Dabei wurde neben dem Wildtyp LF1 auch der später erstellte Transformant LF1_hpt-gfp protoplastiert, auf den im Kapitel 2.1.6 „Transformation“ eingegangen wird. Von sieben Protoplastierungen, die auf Phytigel ausgebracht wurden, regenerierten vier gut, zwei nur gering und eine gar nicht (Tabelle 4). Da für dieses Medium jedoch Hygromycin B nicht zur Selektion verwendet werden kann (siehe Kapitel 2.1.4.1 „Hygromycin B“), ist die weitere Verwendung nicht sinnvoll. Von neun Protoplastierungen, die auf Pflanzenagar ausgebracht wurden, regenerierten drei gut, fünf nur in geringem Maße und einmal gar nicht (Tabelle 4). Die Regeneration schwankt also bei beiden Geliermitteln. Zwischen den Stämmen war kein Unterschied für die Regeneration zu beobachten. Auch die Zelldichte, das Alter der Kultur, die für die Protoplastierung eingesetzte Zellmenge oder die Inkubationszeit korrelierten nicht eindeutig mit der Regenerationseffizienz (Tabelle 4).

Wenn Protoplasten auf YMPG mit 1 M Saccharose und 0,6 % Pflanzenagar regenerierten, wuchsen sie innerhalb von vier bis acht Wochen zu Kolonien aus.

Es konnte gezeigt werden, dass *T. thlaspeos* Protoplasten auf Festmedien mit YMPG mit 1 M Saccharose mit schwankender Rate regenerieren und innerhalb von vier bis acht Wochen Kolonien bilden können. Für die Regeneration ist zu beachten, dass bei Selektion mit Hygromycin B unbedingt Pflanzenagar als Geliermittel verwendet werden sollte.

Tabelle 4 Regeneration nach verschiedenen Protoplastierungsbedingungen. Gezeigte Faktoren beschreiben den verwendeten Stamm, die OD₆₀₀ der Pilzkultur, die Inkubationszeit der Kultur seit dem letzten Subkultivierungsschritt, die für die Protoplastierung eingesetzte Menge an Pilzmaterial, die Inkubationszeit der Protoplastierungsreaktion und die relative Effizienz der Regeneration auf Regenerationsmedium mit verschiedenen Geliermitteln. Die Protoplasten wurden auf YMPG mit 1 M Saccharose und 0,6 % Pflanzenagar oder 1 % Phytigel ausgebracht und für 4-8 Wochen inkubiert. n.d. nicht durchgeführt.

Stamm	OD ₆₀₀	Alter der Kultur [Tage]	Einsatz Pilzmenge (OD ₆₀₀ * Volumen in mL)	Protoplastierungszeit [min]	Regenerationsmedium	
					Mit Pflanzenagar	Mit Phytigel
LF1	0,816	3	81,6	60	n.d.	gut
LF1	0,912	3	80	40	n.d.	gut
LF1	1,168	4	80	40	n.d.	nein
LF1	1,048	4	80	40	n.d.	gering
LF1	0,784	4	74,4	30	gut	gut
LF1	0,596	3	80	30	gut	gut
LF1	1,292	4	64,6	40	gering	gering
LF1	0,936	4	80	30	nein	n.d.
LF1	0,472	3	80	30	gering	n.d.
LF1	0,52	3	80	30	gering	n.d.
LF1_hpt-gfp	1,032	4	80	70	gut	n.d.
LF1_hpt-gfp	0,656	3	80	30	gering	n.d.
LF1_hpt-gfp	0,8	4	80	30	gering	n.d.

2.1.4. Selektionsmarker

Um die Transformanten nach der Transformation selektieren zu können, werden Selektionsmarker wie z. B. Antibiotika benötigt. Für deren Nutzung muss vorab getestet werden, ab welcher minimal inhibitorischen Konzentration (MIC) diese wirksam gegen den individuellen Organismus in Abhängigkeit des jeweiligen Nährmediums sind. Von besonderem Interesse waren hier Festmedien, die vor allem bei der Regeneration von Protoplasten und nach dem Überstreichen potentieller Transformanten zum Einsatz kommen. Für *T. thlaspeos* wurden dazu bisher als Geliermittel Pflanzenagar oder Phytigel verwendet. Für die Regeneration nach der Transformation wurde YMPG mit 1 M Saccharose mit Pflanzenagar oder Phytigel und für die Anzucht intakter Zellen wurde YL mit Pflanzenagar oder Phytigel verwendet. Die Wahl der Antibiotika fiel auf Hygromycin B und Nourseothricin, weil diese gut für die Selektion von *U. maydis* funktionieren (Bösch et al., 2016). Die gewählten Antibiotika-Konzentrationen stammen aus Pilotexperimenten mit verschiedenen Medien und den für *U. maydis* verwendeten Konzentrationen von 200 µg/mL Hygromycin B bzw. 150 µg/mL Nourseothricin (Bösch et al., 2016).

2.1.4.1. Hygromycin B

Auf YMPG mit 1 M Saccharose und 0,6 % Pflanzenagar ohne Antibiotikum wuchsen die Wildtypen gut an (Abbildung 10A). Sie wuchsen jedoch schon bei Supplementation von 4 µg/mL Hygromycin B wesentlich schlechter und ab 6 µg/mL gar nicht mehr.

Auf YL mit 0,6 % Pflanzenagar wuchsen die Wildtypen lediglich auf Platten ohne Hygromycin B-Supplementation (Abbildung 10B). Bei Zugabe von 6, 10 oder 200 µg/mL Hygromycin B fand kein Wachstum statt.

Auf YMPG mit 1 M Saccharose und 1 % Phytigel wuchsen die Wildtypen auf Medium ohne Hygromycin B (Abbildung 10C). Bei Supplementation von 4 und 6 µg/mL Hygromycin B waren die Wildtypen noch in der Lage geringfügig zu wachsen, bei 10 µg/mL jedoch nicht mehr.

Auf YL mit 1 % Phytigel wuchsen die Wildtypen auf Medium supplementiert mit 0, 4 sowie 6 µg/mL Hygromycin B, etwas weniger stark auf 10 µg/mL Hygromycin B und gar nicht mehr bei 200 µg/mL Hygromycin B (Abbildung 10D).

Von besonderem Vorteil für Hygromycin B waren die später verfügbaren Hygromycin B-resistenten Transformationsstämme LF1_hpt-gfp und LF2_hpt-mcherry (siehe Kapitel 2.1.6 „Transformation“), welche als Kontrolle verwendet werden konnten. Dadurch sollte das Wirkspektrum bei hohen Konzentrationen eingegrenzt werden. Die Transformanten wuchsen auf den verschiedenen Festmedien auf allen getesteten Hygromycin B-Konzentrationen mit Ausnahme von YMPG mit 1 M Saccharose und 1 % Phytigel (Abbildung 10). Hier waren sie in der Lage, auf bis zu 10 µg/mL Hygromycin B Kolonien zu bilden, jedoch war die Reproduzierbarkeit hier nicht gegeben. Da die Ergebnisse der parallel durchgeführten

Experimente auf anderen Medien reproduzierbar waren, kann ausgeschlossen werden, dass dies an der Kultur lag. Da alle Platten parallel gegossen wurden, sollte ein Handhabungsfehler auch dabei ausgeschlossen sein. Man könnte spekulieren, dass der Promotor nicht ausreichend starke Expression des Resistenzgens zulässt. Allerdings ist bekannt, dass die Menge an Hygromycin B abhängig vom osmotischen Stabilisator angepasst werden muss (Curragh et al., 1993, Cullen et al., 1987). Darüber hinaus wurde für die Antibiotika Nourseothricin und Geneticin (G418) ein Einfluss von Phytigel auf die Toxizität berichtet (Jaeger et al., 2015). Die Daten zur MIC zeigen, dass Phytigel ebenfalls einen Einfluss auf die Toxizität von Hygromycin B hat. Da sich die Transformanten nicht zuverlässig auf einer für den Wildtyp wachstums-inhibierenden Konzentration von Hygromycin B vermehren können, kann dieses Regenerationsmedium mit Phytigel für Transformationen mit dem endogenen Hsp70-Promotor für die Expression des Resistenzgens nicht verwendet werden. Aus diesem Grund wurde die Selektionskonzentration für Hygromycin B für die anderen verwendbaren Medien geringfügig über der MIC gewählt (Tabelle 5).

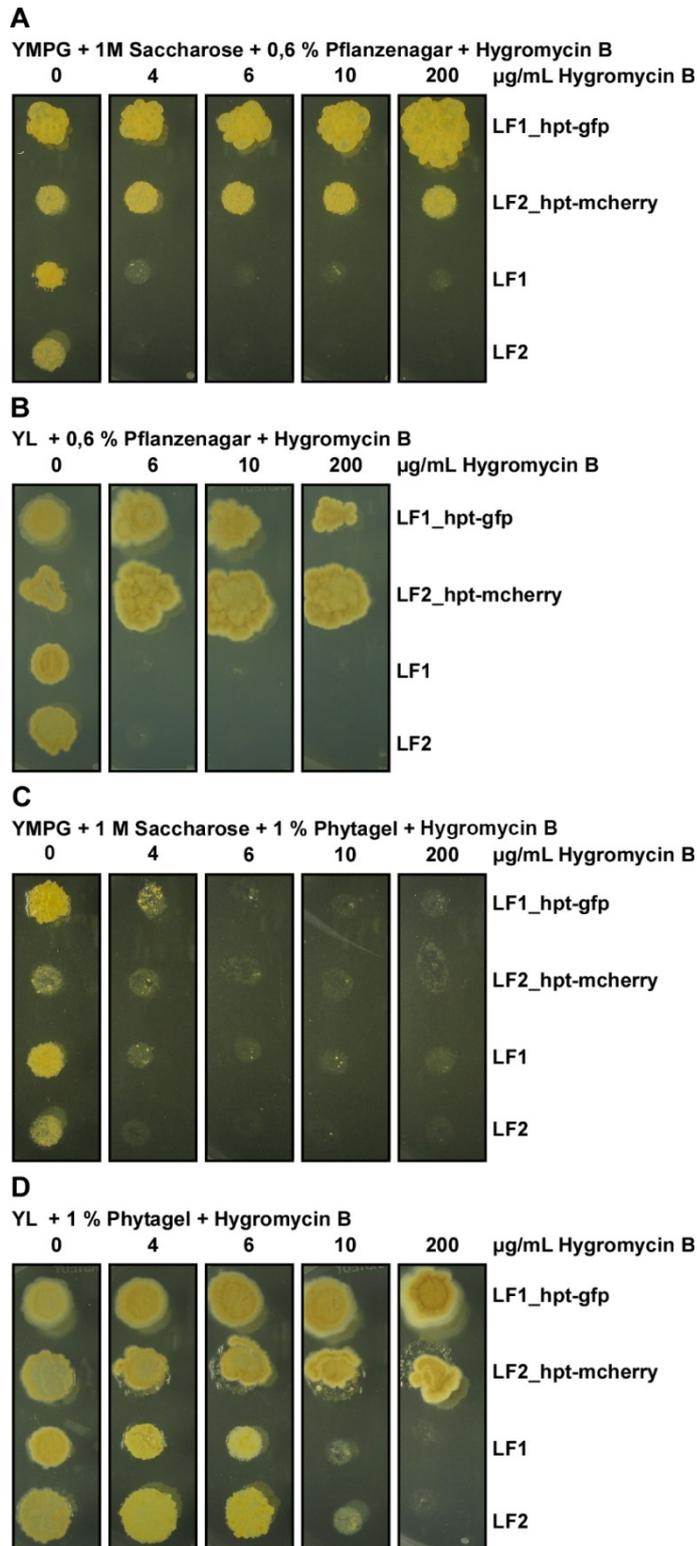


Abbildung 10 Analyse der minimal inhibitorischen Konzentration von Hygromycin B gegen *T. thlaspeos*. Das für die Regeneration von Protoplasten verwendete YMPG mit 1 M Saccharose sowie das für die Kultivierung intakter Zellen verwendete YL wurden in Kombination mit je zwei Gellermitteln, Pflanzenagar und Phytigel, getestet. Durch die Verwendung der Hygromycin B-resistenten Transformanten LF1_hpt-gfp und LF2_hpt-mcherry war eine Eingrenzung des Wirkspektrums zu hohen Konzentrationen möglich. Gezeigt ist eines von drei experimentellen Replikaten. hpt: Hygromycin Phosphotransferase, vermittelt Resistenz gegenüber Hygromycin B.

Die MIC für Hygromycin B wurde in Abhängigkeit von vier Festmedien getestet und daraus Selektionskonzentrationen abgeleitet. Dabei stellte sich heraus, dass YMPG mit 1 M Saccharose und 1 % Phytigel sich nicht für die Selektion mit Hygromycin B eignet. Daher wird generell die Nutzung von Pflanzenagar als Geliemittel empfohlen. Die Selektionskonzentration beträgt 10 µg/mL Hygromycin B, sowohl für das für intakte Zellen verwendete YL mit 0,6 % Pflanzenagar als auch für das für die Regeneration von Protoplasten verwendete YMPG mit 1 M Saccharose mit 0,6 % Pflanzenagar.

Tabelle 5 Minimal inhibitorische Konzentration und Selektionskonzentration von Hygromycin B für *T. thlaspeos* in Abhängigkeit verschiedener Medien und Geliemittel. Getestet wurden das für die Regeneration von Protoplasten verwendete YMPG mit 1 M Saccharose sowie das für die Kultivierung intakter Zellen verwendete YL, jeweils in Kombination mit den Geliemitteln Pflanzenagar und Phytigel. MIC: Minimal inhibitorische Konzentration.

	0,6 % Pflanzenagar		1 % Phytigel	
	MIC	Selektionskonzentration	MIC	Selektionskonzentration
YL	6 µg/mL	10 µg/mL	200 µg/mL	200 µg/mL
YMPG + 1 M Saccharose	6 µg/mL	10 µg/mL	Nicht verwendbar	Nicht verwendbar

2.1.4.2. Nourseothricin

Auf YMPG mit 1 M Saccharose und 0,6 % Pflanzenagar wuchsen die Wildtypen bei 0, 5, 10 und 15 µg/mL Nourseothricin (Abbildung 11A). Bei 20 µg/mL war das Wachstum im Vergleich zum Startzeitpunkt nur sehr gering. Daher liegt die MIC von Nourseothricin in YMPG mit 1 M Saccharose und 0,6 % Pflanzenagar bei 50 µg/mL (Tabelle 6).

Auf YL mit 0,6 % Pflanzenagar wuchsen die Wildtypen ausschließlich auf Platten ohne Nourseothricin (Abbildung 11B). Die MIC und die Selektionskonzentration für Nourseothricin in diesem Festmedium liegt also bei 5 µg/mL (Tabelle 6).

Auf YMPG mit 1 M Saccharose und 1 % Phytigel wuchsen die Wildtypen ohne Supplementation von Nourseothricin sowie bei 5, 10 und 15 µg/mL (Abbildung 11C). Bei 20 µg/mL zeigte sich im Vergleich zum Startzeitpunkt nur sehr marginales Wachstum. Daher betragen die MIC und die Selektionskonzentration von Nourseothricin in YMPG mit 1 M Saccharose und 1 % Phytigel bei 50 µg/mL (Tabelle 6).

Auf YL mit 1 % Phytigel wuchsen die Wildtypen bei 0, 5, 10, 15 und 20 µg/mL Nourseothricin (Abbildung 11D). Daher liegt die MIC und die Selektionskonzentration von Nourseothricin in YMPG mit 1 M Saccharose und 0,6 % Pflanzenagar bei 50 µg/mL (Tabelle 6).

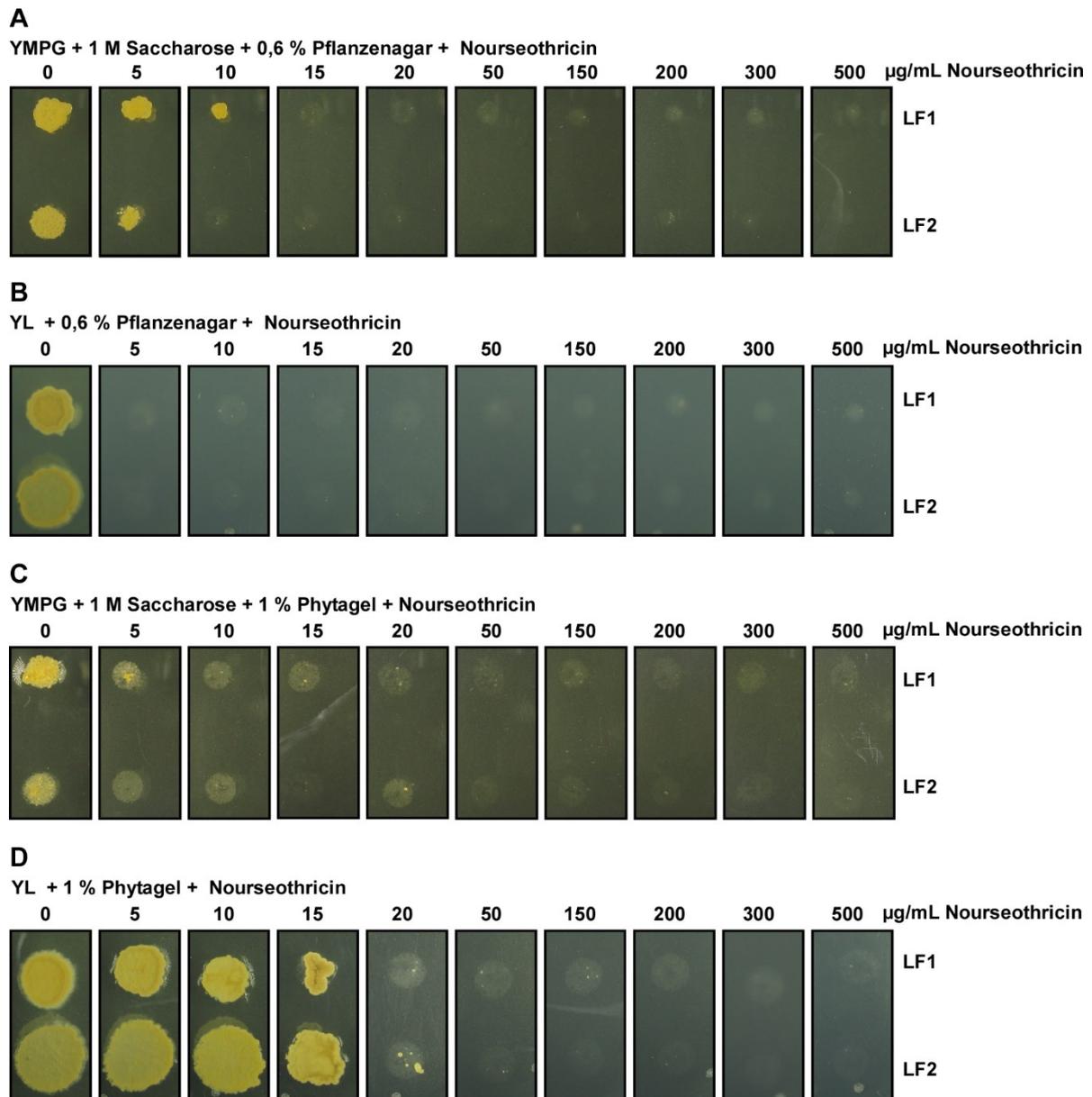


Abbildung 11 Analyse der minimal inhibitorischen Konzentration von Nourseothricin gegen *T. thlaspeos*. Das für die Regeneration von Protoplasten verwendete YMPG mit 1 M Saccharose sowie das für die Kultivierung intakter Zellen verwendete YL wurden in Kombination mit je zwei Geliermitteln, Pflanzenagar und Phytigel, getestet. Gezeigt ist eines von drei experimentellen Replikaten.

Da für Nourseothricin noch keine resistenten Transformanten von *T. thlaspeos* existieren, kann die obere Grenze des Wirkspektrums von Nourseothricin nicht abgeschätzt werden. Daher wird die MIC als Selektionskonzentration empfohlen (Tabelle 6).

Zusammenfassend wurden für Hygromycin B und Nourseothricin die MIC für zwei Medien mit je zwei Geliermitteln bestimmt und daraus Selektionskonzentrationen abgeleitet. Auffällig war eine höhere MIC unter Verwendung von YL mit 1 % Phytigel verglichen mit Pflanzenagar für beide Antibiotika. Außerdem ergab sich für das Regenerationsmedium YMPG mit 1 M Saccharose und 1 % Phytigel mit Hygromycin B kein zuverlässiges Wirkspektrum. Deshalb

wird von der Verwendung von Phytigel für *T. thlaspeos* abgeraten. Eine sehr gute Alternative sind Medien mit Pflanzenagar. Aus den Daten geht hervor, dass für Protoplasten YMPG mit 1 M Saccharose und 0,6 % Pflanzenagar mit 10 µg/mL Hygromycin B oder mit 50 µg/mL Nourseothricin, und für intakte Zellen YL mit 0,6 % Pflanzenagar mit 5 µg/mL Hygromycin B oder mit 10 µg/mL Nourseothricin verwendet werden sollte. Damit wurden Bedingungen etabliert, um *T. thlaspeos* während der Regeneration von Protoplasten und während der Kultivierung intakter Zellen selektionieren zu können.

Tabelle 6 Minimal inhibitorische Konzentration und Selektionskonzentration von Nourseothricin für *T. thlaspeos* in Abhängigkeit verschiedener Medien und Geliertmittel. Getestet wurden das für die Regeneration von Protoplasten verwendete YMPG mit 1 M Saccharose sowie das für die Kultivierung intakter Zellen verwendete YL jeweils in Kombination mit den Geliertmitteln Pflanzenagar und Phytigel. MIC: Minimal inhibitorische Konzentration.

	0,6 % Pflanzenagar		1 % Phytigel	
	MIC	Selektionskonzentration	MIC	Selektionskonzentration
YL	5 µg/mL	5 µg/mL	50 µg/mL	50 µg/mL
YMPG + 1 M Saccharose	50 µg/mL	50 µg/mL	50 µg/mL	50 µg/mL

2.1.5. Plasmide

Um *T. thlaspeos* transformieren zu können, müssen die Transformanten selektiert oder gescreent werden. Wie in Kapitel 2.1.4 „Selektionsmarker“ erläutert, wurde die Selektion gewählt. Dementsprechend wurden Resistenz-vermittelnde Gene mit funktionalen Promotoren und Terminatoren benötigt.

2.1.5.1. Hygromycin B

Zu Beginn dieser Arbeit existierten bereits zwei Plasmide, die Hygromycin B-Resistenz in *U. maydis* vermittelten. Hierzu waren aus *T. thlaspeos* je 1 kb lange Sequenzen up- bzw. downstream des Hitzeschock-Proteins 70 (Hsp70, THTG_01007) bzw. des ribosomalen Proteins S27 (Rps27, THTG_04331) als Promotor bzw. Terminator kloniert worden. Diese waren an ein für *U. maydis* Codon-optimiertes Fusionsgen kloniert, welches für die Hygromycin-Phosphotransferase (Hpt) und das Grün-fluoreszierende Protein (Gfp) kodiert. Diese beiden Plasmide waren funktional in *U. maydis* (Plücker et al., 2021).

U. maydis ist für seine effiziente homologe Rekombination bekannt (Kämper et al., 2006, Terfrüchte et al., 2014). Sollte sie in *T. thlaspeos* ebenfalls effizient sein, könnte aufgrund des Aufbaus dieser Plasmide eine homologe Rekombination im *hsp70*- bzw. *rps27*-Locus nicht ausgeschlossen werden. Dadurch könnten diese Haushaltsgene deletiert werden, was nachteilige Effekte auf die Zellen haben könnte. Um dies zu vermeiden, wurden in dieser Arbeit Promotor und Terminator untereinander vertauscht. Die Funktionalität wurde in *U. maydis* getestet. Die Transformanten beider Konstrukte waren resistent gegenüber Hygromycin B. Die

Gfp-Fluoreszenz wurde mikroskopisch untersucht (Abbildung 12). Als Positivkontrolle diente ein Stamm, in dem *gfp* mit dem konstitutiven Promotor P_{otef} und dem heterologen Terminator T_{nos} in den *ip*-Locus integriert war. Dieser zeigte im Gegensatz zum Wildtyp Fluoreszenz im Gfp-Kanal. Auch beide neu assemblierten Konstrukte waren funktional, da in den jeweiligen Transformanten Gfp-Signal detektiert wurde.

Zusammenfassend wurden zu den bereits bestehenden Plasmiden zwei weitere für die Selektion mit Hygromycin B hergestellt, die nicht zu homologer Rekombination führen sollten und deren Funktionalität in *U. maydis* bestätigt werden konnte.

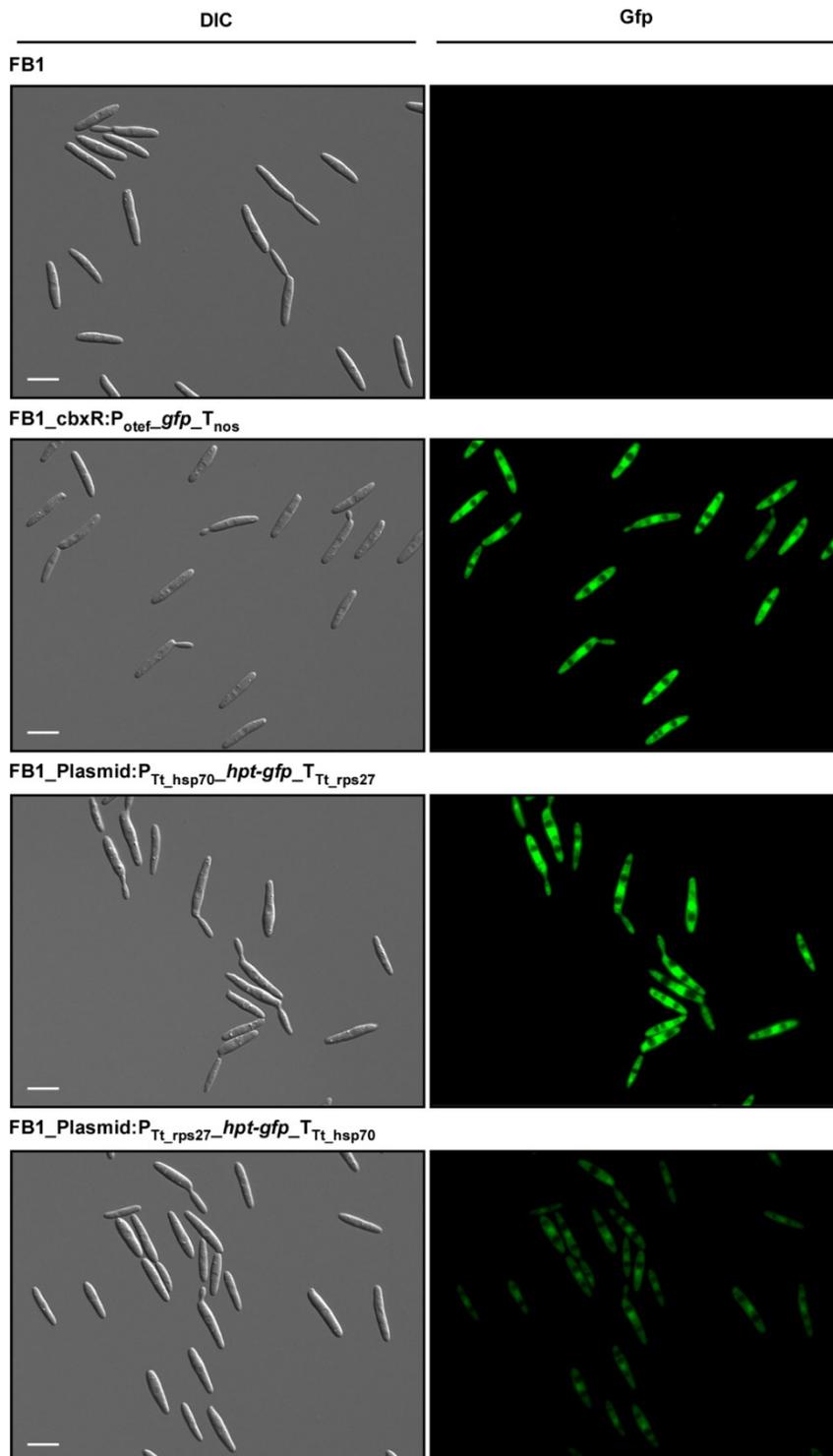


Abbildung 12 Hygromycin B-Gfp-Resistenzkassetten werden funktional in *U. maydis* exprimiert. Hygromycin B-resistente Transformanten von *U. maydis* wurden im DIC und Gfp-Fluoreszenz Kanal mikroskopiert. FB1: WT, FB1_cbxR:P_{otef}-gfp-T_{nos}: *gfp*-Gen mit konstitutivem Promotor und heterologem Terminator für *U. maydis* im *ip*-Locus von FB1 integriert, FB1_Plasmid:PT_{t_hsp70}-hpt-gfp-TT_{t_rps27}: FB1 enthält ein Plasmid welches *T. thlaspeos* Hitzeschock-Protein *hsp70*-Promotor, *hpt-gfp*-Fusionsgen und *T. thlaspeos* ribosomalen *rps27*-Terminator enthält, FB1_Plasmid:PT_{t_rps27}-hpt-gfp-TT_{t_hsp70}: FB1 enthält ein Plasmid welches *T. thlaspeos* ribosomalen *rps27*-Promotor, *hpt-gfp*-Fusionsgen und *T. thlaspeos* Hitzeschock-Protein *hsp70*-Terminator enthält. Hpt: Hygromycin-Phosphotransferase. Größenbalken sind 10 µm lang. Die Abbildung wurde modifiziert nach (Plücker et al., 2021) (Abb. S4).

2.1.5.2. Nourseothricin

Um einen zweiten Selektionsmarker nutzen zu können, sollte ein Nourseothricin-Resistenz vermittelndes Plasmid hergestellt werden. Wie für Hygromycin B wurde auch das Nourseothricin-Resistenz-vermittelnde *nat1*-Gen (Kojic and Holloman, 2000) für *U. maydis* Codon-optimiert (siehe Abbildung 21 im Anhang). Da inzwischen bekannt war, dass die Verwendung von *hsp70*-Promotor und -Terminator im selben Konstrukt in *T. thlaspeos* möglich ist, wurden diese an das Codon-optimierte *nat1Um* kloniert. Zur Überprüfung der Funktionalität wurde das entstandene Plasmid in *U. maydis* transformiert (Kollaboration mit Karolina Vogel). *U. maydis*-Protoplasten des Stamms SG200 konnten nach einer Transformation mit Wasser in Abwesenheit, aber nicht in Anwesenheit von Nourseothricin regenerieren (Abbildung 13). Die Transformation des Nourseothricin-Resistenz vermittelndem Plasmids pNEBUN (Brachmann et al., 2004) führte zu vielen Nourseothricin-resistenten Kolonien. Das klonierte Plasmid ist also nicht funktionell in *U. maydis*. Da Promotor und Terminator in anderen Konstrukten die Expression des jeweiligen Gens erlaubten, war die Codon-Optimierung möglicherweise die Ursache hierfür. Die Expression eines Gens kann durch die Codon-Nutzung beeinflusst werden, da die Ribosomen bei seltenen Codons möglicherweise nicht immer mit Aminoacyl-tRNAs beliefert werden können (Mauro, 2018). Derzeit kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Expression mit dem *hsp70*-Promotor aus *T. thlaspeos* zu zu niedrigen *Nat1Um*-Konzentrationen in *U. maydis* führte. Eine Codon-Optimierung kann auch dazu führen, dass die mRNA-Stabilität verändert und daher weniger Protein gebildet oder der Translationselongationsrhythmus und damit die Proteinfaltung verändert wird (Mauro, 2018). Daher sollte das *nat1*-Gen zukünftig mit anderen Codons verwendet werden und ggf. dessen Expression überprüft werden.

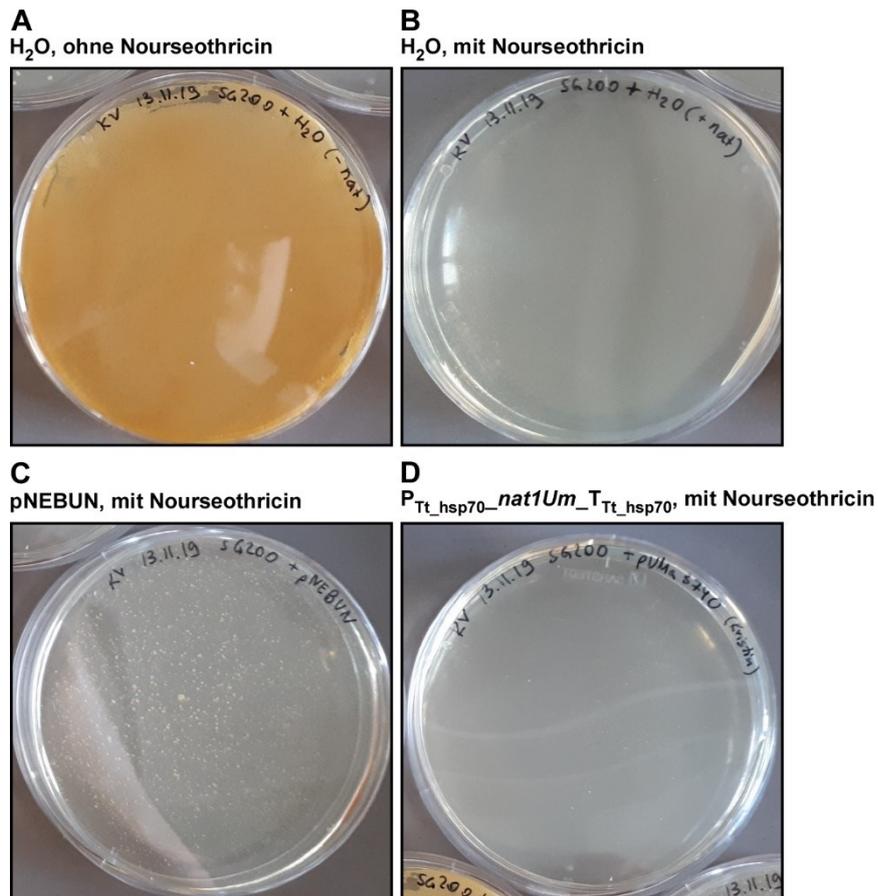


Abbildung 13 Das Codon-optimierte *nat1Um* ist nicht funktional in *U. maydis*. *U. maydis* SG200-Protoplasten wurden als Kontrolle nach Transformation mit Wasser ohne (A) und mit (B) Selektionsdruck durch Nourseothricin auf Regenerationsmedium ausgebracht. SG200-Protoplasten wurden nach Transformation mit dem Nourseothricin-Resistenz vermittelndem Plasmid pNEBUN (C) oder dem *nat1Um*-Plasmid (D) auf Regenerationsmedium mit Nourseothricin ausgebracht. Das *nat1Um*-Plasmid kodiert für das für *U. maydis* Codon-optimierte *nat1Um*, welches zwischen den funktionalen *T. thlaspeos* Hitzeschock Protein *hsp70*-Promotor (P_{Tt_hsp70}) und -Terminator (T_{Tt_hsp70}) kloniert wurde. Kollaboration mit Karolina Vogel.

2.1.5.3. Deletionskonstrukte

Um möglichst umfassende genetische Untersuchungen zu ermöglichen, sollte auch die gezielte Deletion von Genen möglich sein. Für diese Dissertation wurde in Bezug auf RNAi die Deletion von Dicer angestrebt. Da die Deletion von Dicer in anderen Pilzen zu Wachstumsphänotypen führte (Carreras-Villaseñor et al., 2013, Nicolas et al., 2010), sollte die Effizienz von gezielten Gendelektionen an einem Locus ohne solche erfolgen. Die Deletion des Paarungspheromonrezeptor-Gens *pra1* in *U. maydis* war bei Kultivierung ohne Paarungspartner oder synthetischem Pheromon ohne Phänotyp (Bölker et al., 1992), weshalb das Homolog in *T. thlaspeos* hierfür ausgewählt wurde. Für gezielte Deletionen wurden daher Plasmide zur Deletion der Gene des Paarungspheromonrezeptors und Dicers hergestellt. Die Deletionskonstrukte enthielten die $P_{Tt_hsp70_hpt-gfp_T_{Tt_hsp70}}$ -Resistenzkassette flankiert von homologen Regionen up- und downstream des zu deletierenden Gens. Um die Effizienz

verschiedener Flankenlängen für die homologe Rekombination zu untersuchen, wurden für *pra1* vier verschiedene Plasmide mit Flankenlängen von je 250 bp, 500 bp, 1000 bp und 2000 bp hergestellt. Für das Dicer-Deletionskonstrukt betrug die Flankenlänge 1000 bp.

2.1.6. Transformation

Nachdem die Methoden für die Gewinnung und Regeneration von Protoplasten sowie zur Selektion und die dafür notwendigen Plasmide hergestellt waren, konnte die Etablierung eines Transformationsprotokolls beginnen. Dazu wurde zuerst das Protokoll von *U. maydis* getestet, da dieses im Labor etabliert war. Mit diesem Protokoll konnten erfolgreich mehrere Stämme hergestellt werden. Die im Folgenden beschriebenen Transformationen, die initiale Kultivierung unter Selektionsdruck sowie die Stammverifikation der Kandidaten wurden im Rahmen zweier Masterarbeiten begonnen und von Lesley Plücker bzw. Lea Geißl für die gemeinsame Publikation fortgeführt (Masterarbeiten (Plücker, 2017, Geißl, 2020)). Da die funktionelle Charakterisierung der Transformanten bezüglich Resistenz und Fluoreszenz von mir durchgeführt wurde, wird die Stammgenerierung hier aufgegriffen.

Zunächst wurden LF1-Protoplasten mit einer equimolaren Mischung aus fünf linearisierten Plasmiden transformiert, die alle *hpt-gfp* und verschiedene Kombinationen aus Promotoren und Terminatoren kodierten (pUMa 2732, 2790, 2792, 3030 und 3031), um die Chance auf eine erfolgreiche Transformation hoffentlich zu erhöhen (Masterarbeit (Plücker, 2017)). Pro Reaktion wurden ca. $8 \cdot 10^6$ Protoplasten sowie 1 μg DNA pro linearisiertem Plasmid eingesetzt. Die von mir getestete Regenerationszeit wurde hier bestätigt, da nach einem Monat 23 Kolonien angewachsen waren (Masterarbeit (Plücker, 2017)). Von diesen wurden 20 auf Selektivmedium überstrichen und eine davon wuchs an (Masterarbeit (Plücker, 2017)). Im Transformanten konnte nur das Konstrukt mit *hsp70*-Promotor und -Terminator mit PCR nachgewiesen werden (Persönliche Kommunikation, Lesley Plücker), welches in das Genom integriert war (Plücker et al., 2021). Zur Klärung des Insertionslocus wurde von mir genomische DNA extrahiert und das Genom re-sequenziert. Die Auswertung wird in Zusammenhang mit einem anderen Projekt erfolgen. Die funktionelle Analyse des Stammes zeigte, dass LF1_*hpt-gfp* im Gegensatz zu LF1 resistent gegenüber Hygromycin B war (siehe Kapitel 2.1.4 „Selektionsmarker“). Außerdem zeigte der Transformant im Gegensatz zum Wildtyp Gfp-Fluoreszenz (Abbildung 14A). Dies spricht für die funktionelle Expression des *hpt-gfp*-Konstruktes. LF1_*hpt-gfp* zeigte auch nach mehrmonatiger Kultivierung ohne Hygromycin B Gfp-Fluoreszenz und Wachstum in Anwesenheit von Hygromycin B. Daher kann davon ausgegangen werden, dass das Konstrukt längerfristig stabil im Genom verbleibt. Dies ist von Vorteil für die Durchführung von Experimenten mit anderen Stämmen, wie z.B. Paarungsstudien.

Nachdem gezeigt werden konnte, dass der klonierte Promotor und Terminator des Hitzeschockproteins 70 aus *T. thlaspeos* sowie das *hpt-gfp*-Fusionskonstrukt in *T. thlaspeos* funktional waren, konnte die Methode auch von anderen Experimentatoren erfolgreich durchgeführt werden. LF2 konnte mit einem Konstrukt transformiert werden, in dem *gfp* durch *mcherry* ersetzt wurde (Plücker et al., 2021). Auch dieser Transformant zeigte die gewünschte mCherry-Fluoreszenz (Abbildung 14B) und Hygromycin B-Resistenz (Abbildung 10), auch nach mehrmonatiger Kultivierung ohne Antibiotikum.

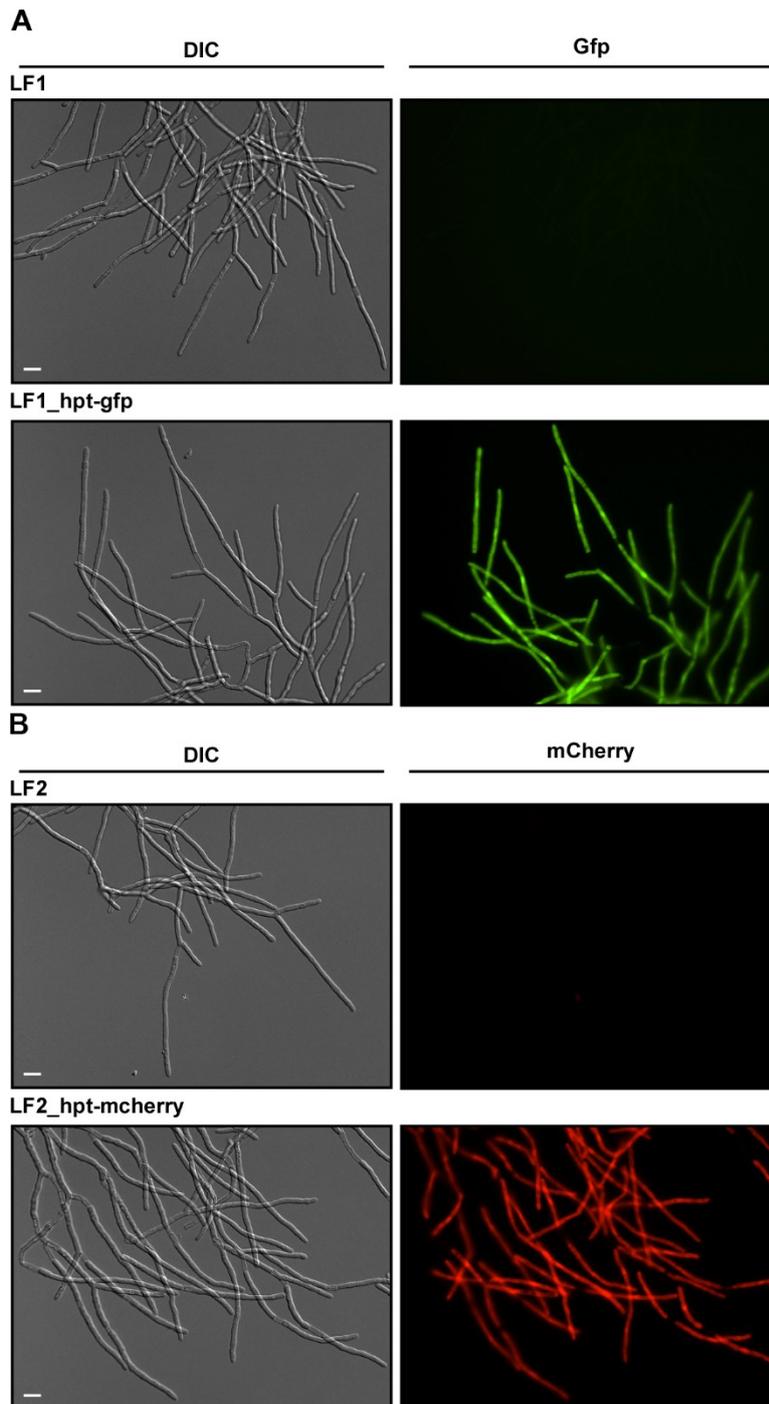


Abbildung 14 *T. thlaspeos* Transformanten exprimieren funktionelle Fusionsproteine. Die Wildtypen LF1 und LF2 und die Transformanten LF1_hpt-gfp und LF2_hpt-mcherry wurden in Flüssigkultur angezogen und im DIC- und Gfp- bzw. mCherry-Kanal mikroskopiert. Pro Fluoreszenzkanal sind die Fluoreszenzabbildungen gleich skaliert. Größenbalken entsprechen 10 μm . *hpt*: Hygromycin Phosphotransferase-Gen, vermittelt Resistenz gegenüber Hygromycin B. Die Transformanten wurden von Lesley Plücker bzw. Lea Geißl hergestellt und molekular analysiert. Die Abbildung wurde modifiziert nach (Plücker et al., 2021) (Abb. 6).

Darüber hinaus wurden Deletionskonstrukte für das Gen des Pheromonrezeptors *pra1* und Dicer transformiert, wobei im Rahmen dieser Arbeit keine Transformanten gewonnen werden

konnten. Nach Beendigung des experimentellen Teils dieser Doktorarbeit konnte eine *pra1*-Deletionsmutante hergestellt werden (Plücker et al., 2021).

Zusammenfassend konnte das Transformationsprotokoll von *U. maydis* auf Protoplasten von *T. thlaspeos* übertragen werden. Das Konstrukt bestehend aus *hpt-gfp* mit Promotor und Terminator des endogenen Hsp70 wurde in das Genom integriert. Die präzisen Analysen von LF1_*hpt-gfp* und LF2_*hpt-mcherry* zeigten eine funktionelle und langfristige Expression der Fusionskonstrukte ohne Selektionsdruck. Die genetische Modifikation von *T. thlaspeos* wurde somit für beide Stämme etabliert, und ein Ziel dieser Arbeit erreicht. Sie ermöglicht das molekulare Studium der Vorgänge in *T. thlaspeos* und in der Pilz-Pflanze-Interaktion.

2.2. Untersuchungen des RNAi-Systems in *T. thlaspeos*

In einem weiteren Teil dieser Arbeit sollte die Funktionalität und Verwendung des RNAi-Systems in *T. thlaspeos* untersucht werden. Neben bioinformatischen Untersuchungen sollten hierzu idealerweise die im ersten Teil etablierte genetische Modifikation sowie eine sRNA-Sequenzierung verwendet werden.

2.2.1. *T. thlaspeos* besitzt die RNAi-Schlüsselkomponenten

Um zu verifizieren, dass *T. thlaspeos* ein RNAi-System besitzt, wurden die Schlüsselkomponenten im Genom identifiziert. Durch lokale BLAST-Analysen (CLC) mit RNAi-Proteinen aus dem Brandpilz *S. reilianum* (Dissertation (Ghareeb, 2011)) konnten in beiden *T. thlaspeos*-Stämmen je ein Gen für Dicer und Argonaute und je zwei Gene für RdRPs identifiziert werden (Abbildung 15). Für eine funktionelle Analyse wurden diese Proteine mit Proteinen verwandter Pilze mit funktionierendem RNAi-System verglichen. Dazu wurden die Domänen und deren Funktion mit dem Programm SMART (Letunic and Bork, 2018) analysiert und verglichen. Dicer aus *T. thlaspeos* war mit 1754 Aminosäuren ähnlich lang wie Dicer aus *U. hordei* und *S. reilianum*. Die vorhergesagten Domänen wurden in allen drei Brandpilzen an ähnlichen Positionen vorhergesagt. Sie umfassen zwei unterschiedliche Helikase-Domänen: DEXDc, eine DNA-Bindedomäne von Helikasen, und HELICc, eine C-terminale Domäne von Helikasen. Zudem besitzen die Proteine eine Dicer-Dimerisierungsdomäne und zwei Ribonuklease III-Domänen. Bei *T. thlaspeos* wurde auch eine 4nha-Domäne vorhergesagt, welche im humanen Dicer im Rahmen struktureller Studien annotiert wurde (Tian et al., 2014). In LF2 wurde TTLF2_01619 nach demselben Verfahren als Dicer identifiziert. Dicer aus LF1 und LF2 wiesen identische Aminosäuresequenzen und Domänen auf. Zu den Basidiomyceten *S. reilianum* und *U. hordei* ist es zu 33 bzw. 31,3 % identisch, während es zu Dicer von *S. pombe* 18,9 % Identität aufweist. Dass diese Proteine die für Dicer charakteristischen Domänen aufweisen, (Ciechanowska et al., 2021) bestätigt, dass beide *T. thlaspeos*-Stämme je ein Gen für Dicer kodieren.

Bei Argonaute sind die Proteinlängen der drei Brandpilze mit 971 bzw. 973 Aminosäuren fast identisch. Die vorhergesagten Domänen wurden in den anderen Pilzen an ähnlichen Positionen identifiziert. Die PAZ- und die Piwi-Domänen wurden in allen drei Pilzen vorhergesagt. In allen drei Brandpilzen wurden zudem die N-terminale-Domäne und zwei unterschiedliche Linker-Domänen, L1 und L2, vorhergesagt. Zusätzlich wurde die Mid-Domäne in *T. thlaspeos* und *S. reilianum* identifiziert. TTLF2_03681 wurde als Argonaute in LF2 identifiziert. Es ist zu Dicer aus LF1 zu 99,8 % identisch und weist dieselben Domänen auf. Letzteres ist zu Argonaute-Proteinen aus den Basidiomyceten *S. reilianum* und *U. hordei* zu 44,3 bzw. 45,5 % identisch, während es zu Argonaute des Ascomyceten *S. pombe* 25,2 % Identität aufweist. Da die für Argonaute charakteristischen Domänen in den hier identifizierten

Proteinen vorkommen (Dutta et al., 2019, Zanini et al., 2021), wurde bestätigt, dass beide *T. thlaspeos*-Stämme je ein Gen für Argonaute enthalten.

Bei der Identifizierung der RNA-abhängigen RNA-Polymerasen wurde das Protein von THTG_02568 als ähnlich zu RdRP-C (sr05666) von *S. reilianum* erkannt. Außerdem wurden die Proteine von THTG_00793, THTG_00794, THTG_00795, und THTG_00796 als ähnlich zu verschiedenen Bereichen von RdRP-B (sr16789) charakterisiert. Daher wurden diese vier nah beieinander annotierten Gene möglicherweise nicht korrekt annotiert und dementsprechend sollte hier das Genmodell überprüft werden. Interpretiert man die bislang als intergenisch betrachteten Bereiche als Introns, so ergeben sich für die RdRPs von *T. thlaspeos* Proteinlängen von 1557 bzw. 1227 Aminosäuren. Damit sind sie ähnlich lang wie die von *U. hordei* und *S. reilianum* mit 1037-1557 Aminosäuren. Für alle RdRPs wurde je eine RdRP-Domäne vorhergesagt. Nur bei RdRP-A (sr12376) von *S. reilianum* scheint eine weitere, kürzere RdRP-Domäne direkt vor derjenigen mit der charakteristischeren Länge zu liegen. TTLF2_00597, TTLF2_00598 und TTLF2_00599 sowie TTLF2_03637 und TTLF2_03638 zeigten jeweils zusammen Ähnlichkeiten zu RdRP-A und –B bzw. RdRP-C von *S. reilianum*. Wie bei LF1 sollten diese Genmodelle überprüft werden. Sollten die bisher als intergenisch annotierten Bereiche zwischen diesen Genen hier den Introns entsprechen, ergäben sich auch hier typische Proteinlängen von 1290 bzw. 1078 Aminosäuren und jeweils eine vorhergesagte RdRP-Domäne. Pro Stamm von *T. thlaspeos* konnten somit zwei Proteine identifiziert werden, die RNA-abhängigen RNA-Polymerasen verwandter Pilze in ihrer Domänenstruktur sehr ähneln. Ihre Genmodelle sollten zukünftig verifiziert werden.

Zusammenfassend wurden in *T. thlaspeos* in beiden Stämmen je ein Dicer, ein Argonaute und zwei RNA-abhängige RNA-Polymerasen identifiziert, deren Proteinlänge und Domänenarchitektur den entsprechenden Proteinen verwandter Brandpilze mit funktionierendem RNAi-System sehr ähnlich sind (Laurie et al., 2008) (Dissertation (Ghareeb, 2011)).

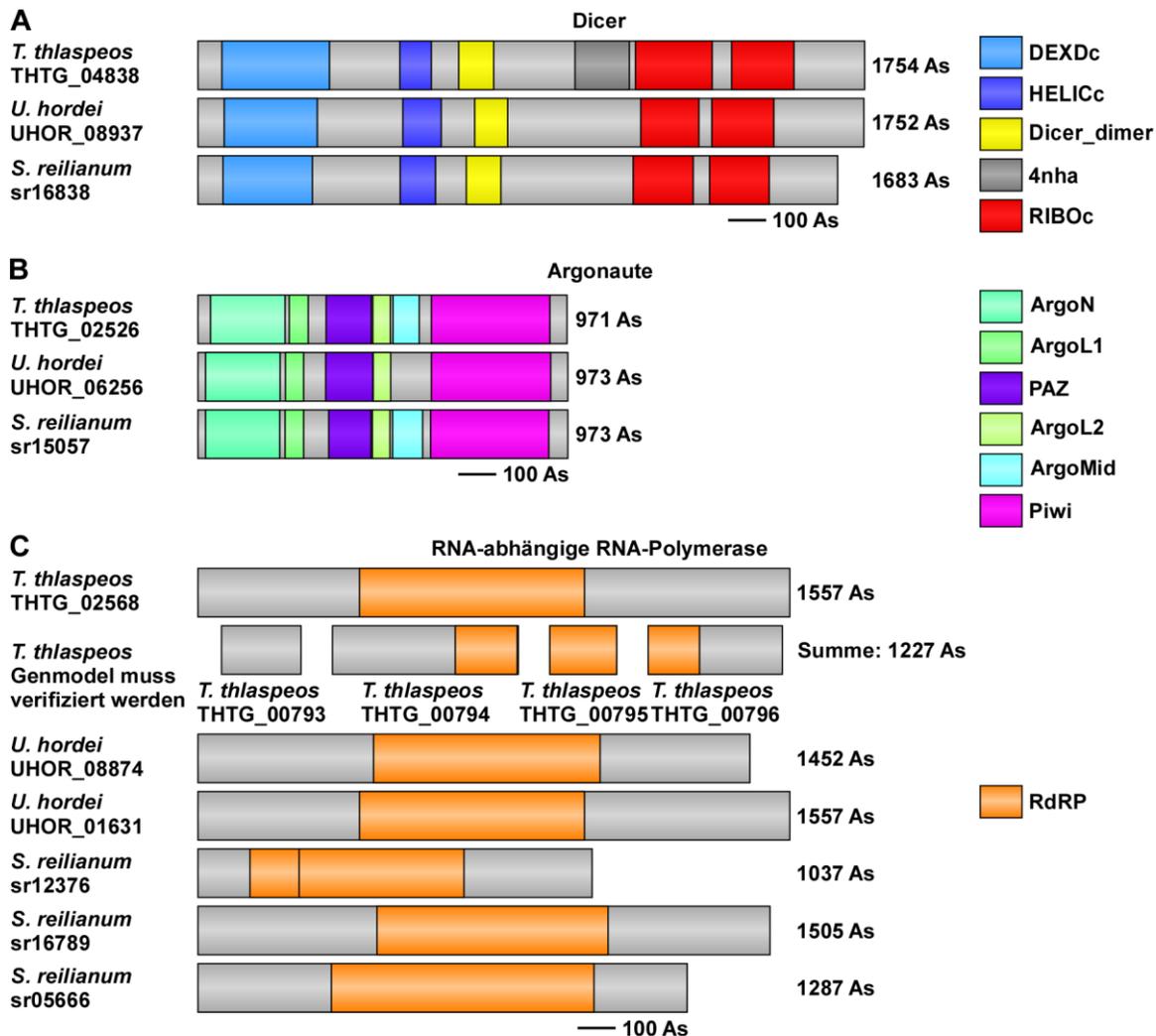


Abbildung 15 Analyse der RNAi-Schlüsselkomponenten. Dicer, Argonaute und RNA-abhängige RNA-Polymerase wurden im *T. thlaspeos* LF1-Genom identifiziert. Domänenstrukturen wurden mit den Proteinen der Brandpilze mit funktionierendem RNAi-System, *U. hordei* und *S. reilianum*, verglichen. DEXDc: DEAD-ähnliche Helikase Überfamilie, HELICc: Helikase Überfamilie C-terminale Domäne, Dicer_dimer: Dimerisierungsdomäne, 4nha: Hydrolase/RNA (gehört zu einem Protein Data Bank-Eintrag, in dem ein Teil des humanen Dicers mit einer siRNA strukturell untersucht wurde (Tian et al., 2014)), RiboC: Ribonuklease III Familie, ArgoN: N-terminale Domäne von Argonaute, ArgoL1: L1-Domäne von Argonaute, PAZ: PAZ-Domäne, ArgoL2: L2-Domäne von Argonaute, ArgoMid: Mid-Domäne von Argonaute, Piwi: Piwi-Domäne, RdRP: RNA-abhängige RNA-Polymerase, As: Aminosäuren.

2.2.2. Erfassung des sRNA-Inventars

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war die Identifikation und Analyse von sRNAs in *T. thlaspeos*. Hierzu waren mehrere Arbeitsschritte notwendig (Abbildung 16). Vorbereitend wurde Gesamt-RNA aus je zwei Replikaten beider Stämme isoliert. Diese diente als Ausgangsmaterial für die Klonierung von sRNA-Bibliotheken (Anleitung durch Arne Weiberg, Antoine Porquier und Florian Dunker an der Ludwig-Maximilians-Universität München). Die vier mit unterschiedlichen Adaptorsequenzen versehenen sRNA-Bibliotheken wurden gemultiplext und sequenziert. Nach der Sequenzierung wurden die Daten vom Kollaborationspartner

anhand der verwendeten Primer-Sequenzen gedemultiplext und verbleibende Primer-Sequenzen entfernt. Die bioinformatische Analyse erfolgte basierend auf bestehenden Arbeitsabläufen (Weiberg et al., 2013, Dunker et al., 2020).

Für die eigene Analyse der Daten wurden Reads und einzigartige Sequenzen unterschieden. Dabei sind Reads die Gesamtheit oder ein Anteil aller identifizierten Sequenzabfolgen. Einzigartige Sequenzen beschreiben definierte Sequenzabfolgen, die sich von anderen einzigartigen Sequenzen in ihrer Sequenzabfolge und/oder ihrer Länge unterscheiden. Bei der Beschreibung von einzigartigen Sequenzen wird außerdem deren Abundanz nicht berücksichtigt.

Um etwaige Kontaminationen auszuschließen, wurden stringent nur solche Sequenzen verwendet, die über die gesamte Länge ohne Fehler oder Lücken zum jeweiligen Genom kartierten. Da eine Dicer-Deletionsmutante als Negativkontrolle noch nicht zur Verfügung stand, sollte die Anzahl der zufällig produzierten Sequenzen, z.B. mRNA-Abbauprodukte, durch Einbeziehen der Reproduzierbarkeit reduziert werden. Um dies im Programm Galaxy zu erreichen, mussten mehrere Umwandlungen und Filterschritte vorgenommen werden. Zuerst wurden die kartierenden Reads in einzigartige Sequenzen und deren Abundanz umgewandelt. Anschließend wurde auf einzigartige Sequenzen, die mindestens einmal in jedem Replikat eines Stammes vorkamen, gefiltert. Einzigartige Sequenzen, welche diese Voraussetzungen erfüllten, mussten im nächsten Filterschritt auch in beiden Replikaten des anderen Stammes vorhanden sein. Zu diesem Schritt sollte erwähnt werden, dass aufgrund der Einzelnukleotid-Polymorphismen zwischen beiden Stämmen (Courville et al., 2019) möglicherweise relevante sRNAs verworfen wurden, die in einem Folgeprojekt näher analysiert werden könnten, indem die hier verworfenen Reads auf Annotationen von SNP-Regionen kartiert werden.

Dieses Vorgehen führte zu einer Liste mit stammübergreifend vorhandenen einzigartigen sRNA-Sequenzen, die stringente Kartierungsbedingungen erfüllten. Da die Abundanz der einzigartigen Sequenzen in den Replikaten variieren konnte und in dieser Datei nicht vorhanden war, wurde diese Information anschließend durch einen Abgleich mit der zu Beginn erstellten Datei der auf das Genom kartierenden einzigartigen Sequenzen und deren Abundanz zurückgeholt. Resultat waren vier Datensets mit Reads, die unter stringenten Bedingungen auf die Genome kartierten und deren einzigartige Sequenzen in allen vier Replikaten vorhanden waren, aber möglicherweise unterschiedlich oft vorlagen.

Diese Daten wurden anschließend verwendet, um mögliche Entstehungsorte der sRNAs zu identifizieren. Dazu wurden die Reads sukzessive und stringent auf Annotationen von rRNAs (Kapitel 2.2.2.1.1 „Vorhersage von rRNA“), tRNAs (Kapitel 2.2.2.1.2 „Vorhersage von tRNA“), prä-mRNAs und anderen ncRNAs (Kapitel 2.2.2.1.3 „Vorhersage anderer ncRNA“) kartiert. Alle verbleibenden Reads kartierten dementsprechend auf unannotierte Bereiche.

Anschließend wurden diese Gruppen charakterisiert. Diese Informationen konnten verwendet werden, um die sRNAs mit anderen sRNA-Studien zu vergleichen.

Um abzuschätzen, wofür *T. thlaspeos* sein RNAi-System nutzen könnte, wurde eine Zieltranskript-Analyse durchgeführt. Dazu wurden einzigartige Sequenzen, die nicht auf rRNAs und tRNAs kartierten, zunächst auf die sRNA-typische Länge von 20-24 nt und anschließend auf ihre normalisierte Abundanz gefiltert. Diese wurden dann für die Zieltranskript-Vorhersage verwendet, welche für Pilz- und Pflanzentranskripte durchgeführt wurde. Schließlich erfolgte eine Funktionsvorhersage der Zielproteine, um die Auswirkungen auf die Genexpression abzuschätzen.

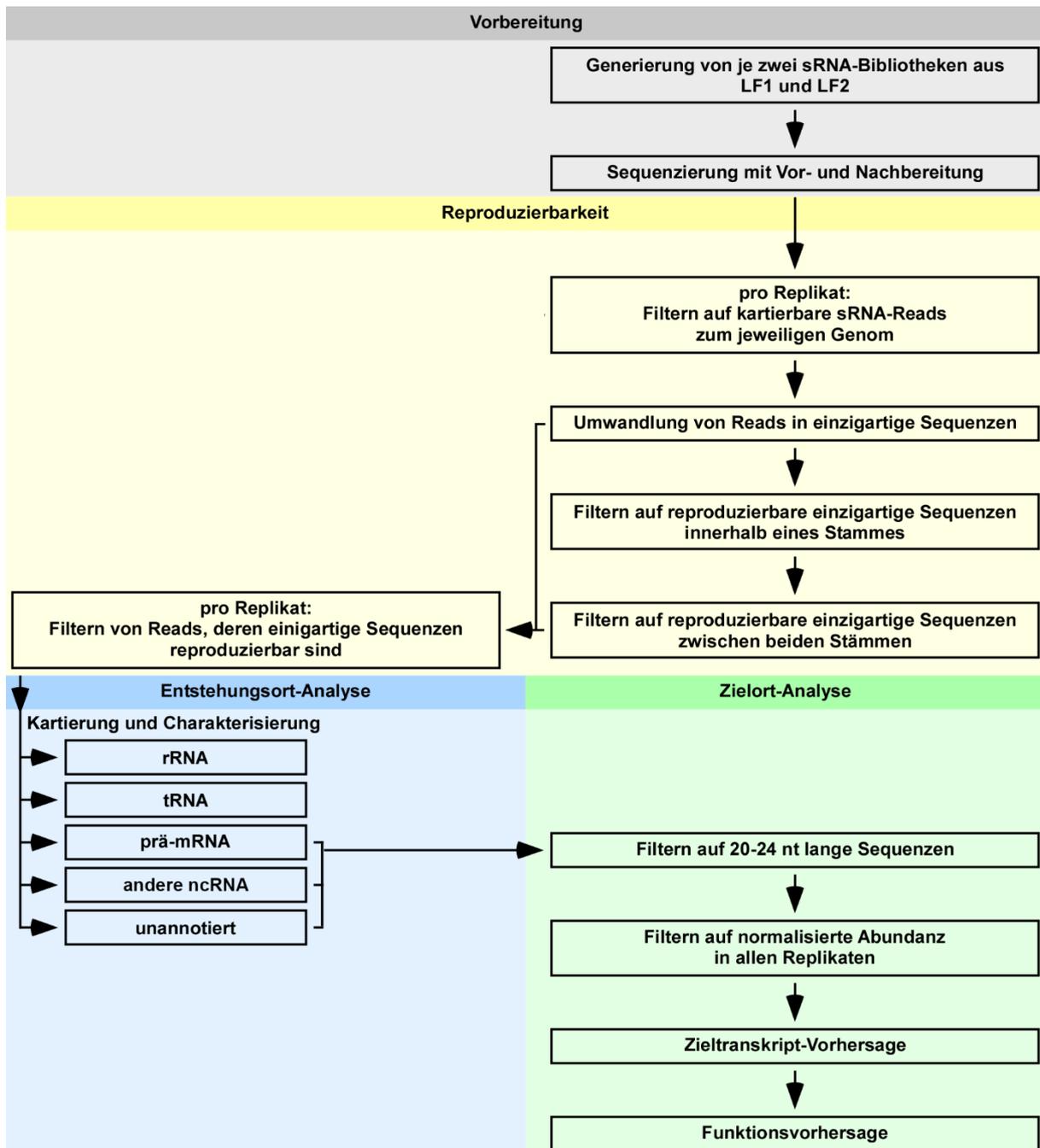


Abbildung 16 Arbeitsschritte für die Sequenzierung und Analyse von sRNA aus *T. thlaspeos*. Die Arbeitsschritte wurden in Vorbereitung, Reproduzierbarkeit der Datensätze, Entstehungsort-Analyse mit Charakterisierung und Zielort-Analyse gruppiert. Reads bezeichnet die Gesamtheit oder einen Anteil aller identifizierten Sequenzabfolgen. Eine einzigartige Sequenz unterscheidet sich von einer anderen einzigartigen Sequenz in ihrer Sequenzabfolge und/oder ihrer Länge.

2.2.2.1. Annotation von ncRNAs

Bei der Sequenzierung von sRNAs werden üblicherweise nicht nur Dicer-abhängige sRNAs, sondern auch Degradationsprodukte verschiedener RNA-Klassen detektiert (Drienenberg et al., 2009). Durch das Herausfiltern dieser verschiedenen RNA-Klassen können mögliche

Entstehungsorte von Dicer-abhängigen sRNAs genauer charakterisiert werden (Drinneberg et al., 2009). Für *T. thlaspeos* existierten die meisten dieser Annotationen zu Beginn dieser Arbeit nicht. Deshalb wurden in dieser Arbeit rRNAs, tRNAs und andere ncRNAs vorhergesagt. Da das Genom von LF2 mit 537 Scaffolds deutlich schlechter assembliert ist als das Genom von LF1 mit 32 Scaffolds (Courville et al., 2019), wurde erwartet, dass Gene, die möglicherweise über Scaffold-Grenzen reichen, nicht annotiert werden könnten. Weil zu erwarten war, dass kleinere Unterschiede in der Annotation bei der späteren Kartierung der Reads, beispielsweise aufgrund ihrer Abundanz, zu deutlichen Unterschieden bei der Kategorisierung führen würden, wurde beschlossen, diese mit den Annotationen von LF1 durchzuführen. Der Vollständigkeit halber wurden die Vorhersagen und Analysen für LF2 dennoch durchgeführt.

2.2.2.1.1. Annotation von rRNAs

Ribosomen bestehen aus zwei Untereinheiten, welche sich aus RNA und Proteinen zusammensetzen (Venema and Tollervey, 1999). Die große Untereinheit, LSU (*large subunit*), wird in Eukaryoten aus 5S, 5.8S und 28S rRNAs gebildet, während die kleine Untereinheit, SSU (*small subunit*), die 18S rRNA enthält (Lagesen et al., 2007). Es wurde erwartet, dass 18S, 5.8S und 28S rRNA-Gene nebeneinander in einem Repeat kodieren (Li et al., 2017b). Weiterhin sind diese Repeats entweder in einem großen oder mehreren Tandem-Arrays auf einem oder wenigen Chromosomen angeordnet, während die 5S rRNA-Gene entweder im Genom verteilt, in eigenständigen Tandem-Arrays oder gekoppelt an andere Tandem-Array-Genfamilien auftreten können (Li et al., 2017b). Die Anzahl an rDNA-Repeats variiert zwischen zwölf und mehreren hundert für die Repeats mit 18S, 5.8S und 28S rRNA-Genen und 50-200 für 5S rRNA-Gene (Li et al., 2017b). In *S. cerevisiae* enthalten die Repeats das 5S rRNA-Gen und sie sind ca. 9 kb groß (Venema and Tollervey, 1999).

Zur Vorhersage von rRNAs in *T. thlaspeos* wurden zwei Programme verwendet. Barnap annotiert die rRNA-Gene als 5S, 5.8S, 18S, und 28S (https://toolshed.g2.bx.psu.edu/repository/view_repository?id=52fc6d4b544460ef), und Infernal annotiert sie als SSU, LSU und 5S rRNA (Nawrocki and Eddy, 2013).

Mit Barnap wurden insgesamt 85 rRNA-Gene in LF1 annotiert (Tabelle 7). Davon waren 50 5S rRNA-Gene, zwölf 5.8S rRNA-Gene, zwölf 18S rRNA-Gene sowie zwölf 28S rRNA-Gene. In LF2 wurden ebenso viele 5S rRNA-Gene annotiert, aber weniger von den in Repeat angeordneten Genen. Dies könnte auf die schlechtere Genomassemblierung von LF2 zurückzuführen sein. Während die 5S rRNA-Gene auf vielen Scaffolds zu finden waren, wurden neben einem einzelnen 18S rRNA-Gen im mitochondrialen Genom die 5.8S, 18S und 28S rRNA-Gene ausschließlich in der üblichen Anordnung nebeneinander auf den Scaffolds 67, 72, 75 und 107 annotiert, weshalb sie im Folgenden als rDNA-Scaffolds bezeichnet

werden. Die einzelnen Repeats waren ca. 10 kb groß. Da rRNA-Sequenzen konserviert sind (Lagesen et al., 2007), konnte als zusätzliche Kontrollmaßnahme die rRNA-Identität durch BLAST-Analyse (NCBI – Nukleotid Blast) überprüft werden. Dabei konnten alle Stichproben jeden Typs verifiziert werden.

Tabelle 7 Vorhersage von rRNA-Genen in *T. thlaspeos* mit Barnap. Angegeben ist die Anzahl der vorhergesagten rRNA-Gene für beide Stämme.

Stamm	LF1	LF2
5S rRNA	50	50
5.8S rRNA	12	1
18S rRNA	12	2
28S rRNA	11	1

Mit Infernal wurden in LF1 51 5S rRNA-Gene auf vielen Scaffolds identifiziert (Tabelle 8). Die eukaryotischen Gene einer 5.8S rRNA, von zwölf SSU und von zwölf LSU rRNAs wurden ausschließlich auf den oben identifizierten rDNA-Scaffolds annotiert. Für LF2 wurden dieselben Gene mit Ausnahme der 5.8S rRNA annotiert. Wie auch bei der Vorhersage mit Barnap traten die in Repeats vorliegenden Annotationen weniger häufig auf. Außerdem wurden in beiden Stämmen eine kleine und eine große ribosomale Untereinheit bakteriellen Ursprungs sowie eine große ribosomale Untereinheit vom archaeellen Typ identifiziert. Alle drei wurden in LF1 auf Scaffold 106 gefunden, welcher hier das mitochondriale Genom repräsentiert (Courville et al., 2019). In LF2 waren sie auf den Scaffolds 70 und 89 annotiert, weshalb diese das mitochondriale Genom von LF2 darstellen könnten. Mit einer Ausnahme konnten alle rRNA-Typen stichprobenartig durch BLAST-Analyse (NCBI – Nukleotid Blast) bestätigt werden. Die Ausnahme bildete die bakterielle SSU im mitochondrialen Genom, welche als mitochondriale Sequenz erkannt wurde.

Tabelle 8 Vorhersage von rRNA-Genen in *T. thlaspeos* mit Infernal. Angegeben ist die Anzahl der vorhergesagten rRNA-Gene für beide Stämme.

Stamm	LF1	LF2
5S rRNA	51	51
5.8S rRNA	1	0
SSU_rRNA_eukarya	12	1
LSU_rRNA_eukarya	12	1
SSU_rRNA_bacteria	1	1
LSU_rRNA_bacteria	1	1
LSU_rRNA_archaea	1	1

Von den vorhergesagten rRNA-Annotationen in LF1 überlappten 74, was etwa 90 % entsprach. Die elf Annotationen, welche mit Infernal nicht überlappend vorhergesagt wurden, beinhalteten ausschließlich 5.8S rRNAs auf den rDNA-Scaffolds. Die 5.8S rRNA-Gene waren in *T. thlaspeos* immer von einem 18S- und/oder 28S rRNA-Gen flankiert. Aufgrund der starken Ähnlichkeit zum Aufbau von rRNA-Repeats (Li et al., 2017b) wird angenommen, dass diese 5.8S rRNAs korrekt annotiert wurden. Die Annotation der LSU-rDNA-Repeats durch Infernal scheint etwas zu kurz ausgefallen zu sein. Von den fünf Annotationen, welche nicht von Barnap vorhergesagt wurden, waren eine eukaryotische SSU und eine eukaryotische LSU an Scaffold-Grenzen. Hier ist vorstellbar, dass eine unvollständige Sequenz die Identifikation durch Barnap verhinderte. Als nicht übereinstimmend identifiziert verbleiben also eine 5S rRNA mitten in einem Scaffold und zwei nicht eukaryotische rRNA-Annotationen auf dem mitochondrialen Scaffold 106.

Die Anzahl der rDNA-Repeats und der 5S rRNA-Gene liegt im unteren zu erwartenden Rahmen (Li et al., 2017b).

Zusammenfassend wurden alle Typen für eukaryotische rRNA-Gene in beiden Stämmen von *T. thlaspeos* identifiziert. Die 18S, 5.8S und 28S rRNA-Gene bildeten in LF1 die erwarteten Repeats, welche sich im Abstand von etwa 10 kb auf vier Scaffolds wiederholten, während die 5S rRNA-Gene verteilt im Genom kodierten. Die Anzahl der rRNA-Gene lag im unteren erwarteten Bereich. Da die Genom Assemblierung von LF2 wesentlich mehr Scaffolds aufweist (Courville et al., 2019), konnten die größeren rDNA-Repeats hier seltener vorhergesagt werden. Es wurden also rRNA-Annotationen für beide Stämme erstellt, welche zu einer vollständigeren Genomannotation von *T. thlaspeos* beitragen. Des Weiteren ermöglicht die Annotation der rRNAs das Filtern der sRNA-Sequenzierungsdaten für diese Dissertation.

2.2.2.1.2. Annotation von tRNAs

Da Dicer-abhängige sRNA-Entstehungsorte oft nicht in tRNA-Genen gesucht werden (Zhou et al., 2012, Lau et al., 2013, Kang et al., 2013, Jiang et al., 2012), wurden tRNA-Gene in *T. thlaspeos* identifiziert, um damit mögliche Degradationsprodukte herausfiltern zu können.

Reife tRNAs haben oft eine Länge von ca. 75-95 nt und bilden eine kleeblattartige Sekundärstruktur aus drei Schleifen und einem Stamm (Goodenbour and Pan, 2006). In allen Domänen des Lebens gibt es tRNA-Gene mit Introns (Schmidt and Matera, 2020). Weitere Charakteristika sind das Anticodon, welches für die Translation komplementär zur mRNA sein sollte, und die für die Aminosäureträger-Funktion wichtige Sequenz CCA an ihrem 3'-Ende, welche in Eukaryoten posttranskriptionell durch CCA-hinzufügende Enzyme angefügt wird (Ardell and Hou, 2016).

Für die Vorhersage wurden die Programme Aragorn (Laslett and Canback, 2004) und Infernal (Nawrocki and Eddy, 2013) verwendet. Mit ersterem wurden 269 tRNA-Gene in LF1 und 250

in LF2 vorhergesagt (Tabelle 9). Darunter waren jeweils Anticodons für alle kanonischen Aminosäuren sowie für Selenocystein und Pyrrolysin sowie ein als Stop annotiertes Anticodon vertreten. Mit Infernal wurden 116 tRNA-Gene für LF1 und 103 für LF2 annotiert. Von diesen Genen wurden in den Stämmen 110 bzw. 98 von beiden Programmen überlappend vorhergesagt. Darunter waren Anticodons für alle kanonischen Aminosäuren außer Cystein, sowie für Pyrrolysin sowie ein als Stop annotiertes Anticodon vertreten. Lediglich tRNA-Gene für Cystein wurden nur von einem Programm vorhergesagt.

Tabelle 9 Vorhersage von tRNA-Genen in *T. thlaspeos*. Angegeben ist die Anzahl der von Aragorn bzw. Infernal vorhergesagten tRNA-Gene für beide Stämme.

Stamm	LF1	LF2
tRNA vorhergesagt	269 / 116	250 / 103
tRNA überlappend vorhergesagt	110	98

In *U. maydis* wurden 111, in *S. reilianum* 118, in *S. cerevisiae* 299, in *S. pombe* 196 und in *B. cinerea* 212 tRNA-Gene identifiziert (Daten aus www.fungidb.org). Damit liegt die Gesamtzahl der in *T. thlaspeos* identifizierten tRNA-Gene im erwarteten Bereich.

In beiden Stämmen wurden tRNA-Gene für alle kanonischen Aminosäuren sowie für Selenocystein und Pyrrolysin und ein als Stop annotiertes Anticodon identifiziert. Letzteres enthielt das Anticodon UUA, welches in *Tetrahymena*, *Paramecium*, *Stylonychia*, *Oxytricha* und *Condylostoma magnum* als Glutamin translatiert wird (Grimm et al., 1998, Swart et al., 2016). Daher scheint *T. thlaspeos* genetisch in der Lage zu sein, jedes der drei Stopp-Codons zu translatieren. Ob die vorhergesagten tRNA-Gene exprimiert werden, wurde in dieser Arbeit nicht geklärt, da der Fokus darauf lag, mögliche tRNA-Degradationsprodukte herauszufiltern. Aus diesem Grund wurden auch tRNA-Gene, die nicht von beiden Programmen überlappend vorhergesagt wurden, für die Filterschritte verwendet.

2.2.2.1.3. Annotation anderer ncRNAs

In sRNA-Sequenzierungsdaten werden Reads anderer ncRNAs ebenfalls nicht weiter berücksichtigt (Zhou et al., 2012, Kang et al., 2013). Daher wurden auch diese mit Infernal (Nawrocki and Eddy, 2013) annotiert, ihre Funktion mit der zugrundeliegenden Rfam-Datenbank (Kalvari et al., 2018) recherchiert und mit Vorhersagen anderer Brandpilze verglichen.

In LF1 wurden 17 und in LF2 16 ncRNAs identifiziert (Tabelle 10). Zwölf bzw. elf davon waren Gruppe-I-Introns. In LF1 wurden alle auf dem mitochondrialen Scaffold 106 und in LF2 wurden sie auf den Scaffolds 70 und 89 annotiert. Diese beiden Scaffolds sind schon bei der Vorhersage der rRNAs dadurch aufgefallen, dass rRNAs bakteriellen und archaeellen

Ursprungs dort annotiert wurden. Da in LF1 nicht-eukaryotische rRNA-Gene nur auf dem mitochondrialen Scaffold annotiert wurden, kann man vermuten, dass die Scaffolds 70 und 89 in LF2 zum mitochondrialen Genom gehören. Die selbstspleißenden Ribozyme kommen unter anderem in rRNA-, tRNA-, und mRNA-Genen in mitochondrialen Genomen von niederen Eukaryoten vor (<https://rfam.org/>). Einträge zu diesem Intron gibt es ebenfalls für die Brandpilze *U. maydis*, *U. hordei* und *S. reilianum* (<https://rfam.org/>).

Weiterhin wurde je ein Gruppe-II-Intron identifiziert, welches ein selbstspleißendes Intron ist, das unter anderem in rRNA-, tRNA-, und mRNA-Genen in Organellen von Pilzen vorkommt (<https://rfam.org/>). Es wurde in LF1 auf dem mitochondrialen Scaffold 106 und in LF2 auf dem möglicherweise mitochondrialen Scaffold 70 annotiert. Ein solches Intron wurde ebenfalls in *U. hordei* und *S. reilianum*, nicht aber in *U. maydis* identifiziert (<https://rfam.org/>).

Außerdem wurde eine U2 spliceosomale RNA identifiziert, welches eine kleine nukleäre RNA (*small nuclear RNA*; snRNA) ist, die eine Komponente des Major Spliceosoms darstellt (<https://rfam.org/>). Sie ist in nahezu allen Eukaryoten vorhanden und wurde auch in *U. maydis*, *U. hordei* und *S. reilianum* identifiziert (<https://rfam.org/>).

Des Weiteren wurde eine U4 spliceosomale RNA identifiziert. Diese eukaryotische snRNA reguliert die Spliceosom-Komponente U6 (<https://rfam.org/>). U4 wurde auch in *U. maydis*, *U. hordei* und *S. reilianum* identifiziert, wohingegen U6 lediglich in *U. hordei* annotiert werden konnte (<https://rfam.org/>).

Zudem wurde eine 5' *ureB*-sRNA annotiert. Diese sRNA lokalisiert am 5'-Ende des *ureB*-Gens und ist antisense zu diesem (<https://rfam.org/>). Eine 5' *ureB*-sRNA wurde ebenfalls in den Brandpilzen *U. maydis*, *U. hordei* und *S. reilianum* gefunden (<https://rfam.org/>).

Schließlich wurde ein TPP-Riboswitch identifiziert, welcher auch als THI-Element bezeichnet wird. Dieses beschreibt eine hochkonservierte RNA-Sekundärstruktur, welche direkt Thiaminpyrophosphat binden und die Genexpression durch vielfältige Mechanismen regulieren kann (<https://rfam.org/>). Ein solcher TPP-Riboswitch wurde weder in *U. maydis*, *U. hordei* noch *S. reilianum* gefunden (<https://rfam.org/>).

Das Beispiel der spliceosomalen RNA U6 veranschaulicht, dass, obwohl sie konserviert sein sollte (Didychuk et al., 2018), nicht alle ncRNAs in allen Spezies identifiziert wurden. Mit Ausnahme des TPP-Riboswitches wurden jedoch alle in *T. thlaspeos* identifizierten ncRNAs auch in anderen Brandpilzen gefunden. Insofern ähneln sich die Vorhersagen für *T. thlaspeos* mit denen der hier betrachteten Brandpilze. Diese Vorhersagen ermöglichen einen weiteren Filterschritt von Sequenzierungsdaten.

Tabelle 10 Vorhersage anderer ncRNA in *T. thlaspeos* mit Infernal. Angegeben ist die Anzahl der vorhergesagten ncRNA-Gene für beide Stämme.

Stamm	LF1	LF2
U2 spliceosomale RNA	1	1
U4 spliceosomale RNA	1	1
5' <i>ureB</i> -sRNA	1	1
Gruppe I katalytisches Intron	12	11
Gruppe II katalytisches Intron	1	1
TPP-Riboswitch (THI-Element)	1	1

Die Vorhersage von rRNA- und tRNA-Genen hat für *T. thlaspeos* zu erwartende Resultate erzielt. Bezüglich der weiteren ncRNAs erscheint die Annotation anhand von Vergleichen zu anderen Brandpilzen zwar nicht vollständig, aber in vertretbarem Umfang zu sein.

2.2.2.2. Herstellung von sRNA-Bibliotheken

Um die sRNAs aus *T. thlaspeos* zu identifizieren, mussten Bibliotheken für die Sequenzierung kloniert werden (Abbildung 17). Zu Beginn wurde die Qualität der RNA mit einem BioAnalyzer unter denaturierenden Bedingungen überprüft. Dazu wurde Gesamt-RNA verwendet, die mit DNaseI behandelt und anschließend aufgereinigt wurde, um co-präzipitierte DNA zu entfernen, die das RNA-Signal überlagern würde. Das Programm identifizierte die ribosomalen 18S und 25S RNA wie erwartet bei etwas unter 2 bzw. 4 kb. Außerdem konnte ein deutliches Signal bei etwa 26 s, also unter 200 nt, detektiert werden, welches aufgrund seiner Länge auf 5S rRNAs, 5.8S rRNAs und tRNAs zurückzuführen ist. Außer diesen deutlichen und erwarteten Signalen ist die Grundlinie sehr flach, was für eine sehr gute Qualität der RNA sprach. Die vom BioAnalyzer berechnete RNA-Integritäts-Nummer (RIN) gibt auf einer Skala von 1-10 die Qualität der RNA von vollständig zerfallen bis vollkommen intakt an. Mit einer RIN von 9,1 wurde die RNA auch vom Programm als fast vollkommen intakt bewertet. Damit ist die mit diesem RNA-Extraktionsprotokoll gewonnene RNA für die Herstellung von sRNA-Bibliotheken geeignet.

Die Klonierung der sRNA-Bibliotheken wurde von mir unter Anleitung von Arne Weiberg, Antoine Porquier und Florian Dunker durchgeführt. Zu Beginn wurden Aliquots der für die Klonierung verwendeten RNA ohne DNaseI-Behandlung auf einem nativen Gel kontrolliert (Abbildung 17C). Die 18S und 28S rRNA-Banden waren deutlich und in guter Signalintensität zueinander zwischen den 1 kb und 3 kb Markern zu erkennen. Kleinere rRNAs und tRNAs waren als weniger intensive und weniger definierte Banden unter 0,5 kb zu sehen. Wie für *T. thlaspeos* typisch, war auch die RNA-Bande oberhalb der 28S rRNA-Bande sichtbar. Alle RNA-Proben waren also intakt und wurden daher für die Klonierung verwendet. Schließlich wurde die RNA auf einem denaturierenden Gel aufgetrennt (Abbildung 17D). Hier waren die

charakteristischen rRNA-Banden im oberen Gelbereich zu sehen, wobei die Banden bei LF2 intensiver erschienen. Unterhalb von 150 bp waren keine diskreten Banden sichtbar. Nur bei LF2 war ein schwacher Schmier zu sehen. Da die Signalstärke bei LF2 insgesamt etwas höher war, wurde bei LF2 wahrscheinlich etwas mehr RNA eingesetzt. Die Bereiche um 18-35 bp wurden ausgeschnitten (Abbildung 17E) und als Ausgangsmaterial für die Klonierung der sRNA-Bibliotheken mittels Kit verwendet, wobei unterschiedliche Adaptersequenzen für jedes der vier Replikate verwendet wurden. Die Insertionslänge der Bibliotheken wurde schließlich verifiziert. Die Bibliotheken wurden aufgereinigt, gemultiplext und extern sequenziert.

Es wurde verifiziert, dass die verwendete RNA-Extraktionsmethode die Isolierung intakter RNA ermöglicht, welches ideale Bedingungen für die Analyse von sRNAs darstellt. Für die Klonierung der sRNA-Bibliotheken wurden 18-35 nt-lange RNAs verwendet. Die anschließende Sequenzierung lieferte die Daten, die im Folgenden analysiert werden.

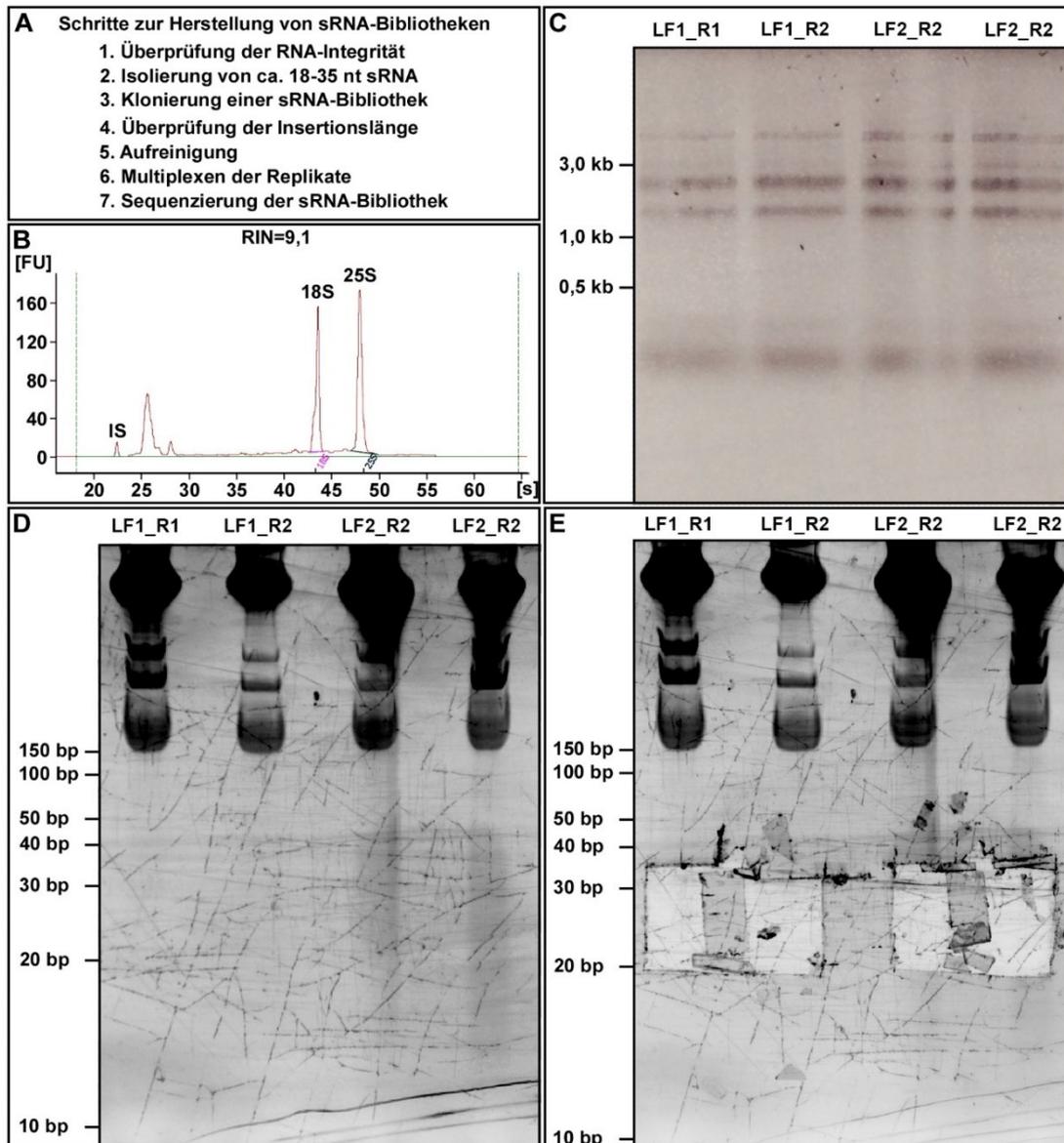


Abbildung 17 Generierung von sRNA-Bibliotheken für die Sequenzierung. A) Schritte zur Generierung von sRNA-Bibliotheken. B) Die Qualität des RNA-Extraktionsprotokolls konnte durch Analyse von Gesamt-RNA von LF1 mit DNaseI-Behandlung und erneuter Aufreinigung mit einem BioAnalyzer nachgewiesen werden. Die DNaseI-Behandlung und die erneute Aufreinigung waren nötig, um verunreinigende DNA zu entfernen, welche im BioAnalyzer das RNA-Auftrennungsmuster überlagern würde. Aufgetragen sind Fluoreszenz-Einheiten [FU] gegen die Migrationszeit [s]. Eine Migrationszeit von 22 s entspricht ca. 25 nt, 28 s entsprechen ca. 200 nt, 33 s entsprechen ca. 500 nt, 38 s entsprechen ca. 1000 nt, 44 s entsprechen ca. 2000 nt und 50 s entsprechen ca. 4000 nt. RIN: RNA-Integritätszahl, rangiert von 0 bis 10 in aufsteigender Qualität. 18S und 25S wurden von der BioAnalyzer Software definiert. IS: Interner Standard; entspricht 25 nt. C) Gesamt-RNA ohne DNaseI-Behandlung wurde auf einem nicht-denaturierenden 1 %-igen Agarosegel elektrophoriert, um zu zeigen, dass die für die Bibliothek verwendeten Aliquots integer sind. D) Gesamt RNA ohne DNaseI-Behandlung wurde auf einem 14 %-igen denaturierenden RNA-PAGE elektrophoriert. E) Anschließend wurden die Regionen zwischen ca. 18-35 nt ausgeschnitten und für die Generierung der RNA-Bibliothek verwendet. Hier war keine DNaseI-Behandlung nötig, da die bei der Bibliothek-Generierung verwendeten RNA-Primer nicht mit DNA-Fragmenten ligieren. C, D und E) _R1 bezeichnet das erste und _R2 das zweite Replikat des jeweiligen Stammes.

2.2.2.3. Reproduzierbarkeit

Nach der Sequenzierung wurden die Daten anhand der verwendeten Primer den jeweiligen Replikaten zugeordnet und die Adaptorsequenzen wurden entfernt (Durchführung durch Arne Weiberg). Für jedes der vier Replikate wurden über $6,1 \cdot 10^7$ Reads sequenziert. Dies entspricht über $3 \cdot 10^6$ einzigartigen Sequenzen. In der Literatur enthalten sRNA-Bibliotheken oft 5-10 Mio. Reads, in selteneren Fällen bis zu 51 Mio. Reads. (Carreras-Villaseñor et al., 2013, Chen et al., 2014, Chen et al., 2015, Kang et al., 2013, Lau et al., 2018, Nicolas et al., 2010). Daher sind die hier erstellten sRNA-Bibliotheken mit über 60 Mio. Reads umfangreich. Hiervon konnten ca. 75 % der Reads bzw. etwa 30 % der einzigartigen Sequenzen unter stringenten Bedingungen auf das jeweilige Genom kartiert werden (Tabelle 11 und Tabelle 12). Bei diesem Filterschritt konnten die verworfenen, nicht kartierenden Reads Fehlpaarungen, Lücken bei der Kartierung oder uneindeutig identifizierte Basen enthalten. Auch Reads, welche zwei bislang nicht assemblierte Scaffolds oder zwei durch Spleißen verbundene Exons überspannen, konnten unter diesen Bedingungen nicht kartiert werden und wurden entsprechend verworfen. Weitere Gründe für nicht vollständig homologe und daher verworfene Reads können beispielsweise posttranskriptionelle Modifikationen, PolyA-Sequenzen oder Adaptor-Kontaminationen sein (Nunes et al., 2011a, Kang et al., 2013). In anderen Studien variiert der Anteil der vollständig auf das jeweilige Genom kartierenden Reads zwischen 14 % und 90 % und für einzigartige Sequenzen zwischen 15 % und 57 % (Carreras-Villaseñor et al., 2013, Chen et al., 2015, Nicolas et al., 2010). Damit sind die hier erreichten etwa 75 % vollständig auf das Genom kartierenden Reads im Vergleich zu anderen Studien ein guter Wert (Carreras-Villaseñor et al., 2013, Dubey et al., 2019, Lee et al., 2022, Zhou et al., 2012).

Tabelle 11 Reproduzierbarkeit der sRNA-Sequenzierung anhand von Reads. Prozentzahlen beziehen sich auf den Ausgangswert. Für die Kartierung auf das Genom mussten Read-Sequenzen über ihre gesamte Länge identisch zur Genomsequenz sein ohne Fehler oder Lücken aufzuweisen. Kontaminationen, Reads mit uneindeutiger Basennennung („N“) oder Reads, welche zwei Exons einer mRNA überspannen, wurden dementsprechend nicht kartiert. „_R1“ bezeichnet das erste Replikate und „_R2“ das zweite Replikate eines Stammes.

Replikate	LF1_R1	LF1_R2	LF2_R1	LF2_R2
Anzahl Reads	69.776.351	61.620.110	65.034.068	63.745.229
auf Genom kartiert	54.422.099 (78,0 %)	46.188.592 (75,0 %)	49.038.072 (75,4 %)	47.648.726 (74,7 %)
reproduzierbar innerhalb eines Stammes	53.459.732 (76,6 %)	45.341.733 (73,6 %)	48.036.885 (73,2 %)	46.660.160 (74,3 %)
reproduzierbar zwischen beiden Stämmen	52.709.647 (75,5 %)	44.729.774 (72,6 %)	46.690.611 (71,8 %)	45.286.678 (71,0 %)

Um zufällige Degradationsprodukte herauszufiltern und dadurch tendenziell RNAi-relevante sRNAs anzureichern, wurde geprüft, ob die sRNAs in allen Replikaten identifiziert werden konnten. Innerhalb desselben Stammes wurden bezogen auf die Bibliothekgröße ca. 74 % der Reads bzw. ca. 8 % der einzigartigen Sequenzen in beiden Replikaten identifiziert. Nicht reproduzierbare Reads innerhalb eines Stammes könnten grundsätzlich aufgrund der Sequenziertiefe oder auf individuelle Abbauprodukte zurückzuführen sein und wurden verworfen. Um sRNAs zu identifizieren, die in *T. thlaspeos* konserviert waren, wurden nur Sequenzen verwendet, die in beiden Stämmen vorhanden waren. Stammübergreifend konnten bezogen auf die Bibliothekgröße ca. 72 % der Reads bzw. etwa 3 % der einzigartigen Sequenzen stammübergreifend in allen Replikaten identifiziert werden. Nicht stammübergreifend reproduzierbare Reads könnten grundsätzlich aufgrund der Sequenziertiefe, aus individuellen Abbauprodukten oder aus unterschiedlichen Genomsequenzen stammen, wie beispielsweise den 31 Genen ohne orthologe Sequenzen im anderen Stamm oder den 11509 Einzelnukleotid-Polymorphismen (Courville et al., 2019). Diese 900.000 einzigartigen und nicht reproduzierbaren Sequenzen machten bis zu 3,7 % der auf das Genom kartierenden Reads aus und waren daher vermutlich wenig abundant, was für zufällige Degradationsprodukte zu erwarten wäre.

Tabelle 12 Reproduzierbarkeit der sRNA-Sequenzierung anhand einzigartiger Sequenzen. Eine einzigartige Sequenz unterscheidet sich von einer anderen einzigartigen Sequenz in ihrer Sequenzabfolge und/oder ihrer Länge. Prozentzahlen beziehen sich auf den Ausgangswert. Für die Kartierung auf das Genom mussten Read-Sequenzen über ihre gesamte Länge identisch zur Genomsequenz sein ohne Fehler oder Lücken aufzuweisen. Kontaminationen, Sequenzen mit uneindeutiger Basennennung („N“) oder Sequenzen, welche zwei Exons einer mRNA überspannen, wurden dementsprechend nicht kartiert. „_R1“ bezeichnet das erste Replikat und „_R2“ das zweite Replikat eines Stammes.

Replikat	LF1_R1	LF1_R2	LF2_R1	LF2_R2
Anzahl einzigartige Sequenzen	3.300.966	3.174.590	4.171.384	4.205.755
auf Genom kartiert	1.112.512 (33,7 %)	1.054.476 (33,2 %)	1.228.902 (29,5 %)	1.224.287 (29,1 %)
reproduzierbar innerhalb eines Stammes	283.704 (8,6 %)	283.704 (8,9 %)	320.625 (7,6 %)	320.625 (8,2 %)
reproduzierbar zwischen beiden Stämmen	126.751 (3,8 %)	126.751 (4,0 %)	126.751 (3,0 %)	126.751 (3,0 %)

Für die weiteren Analysen wurden also mindestens $4,5 \cdot 10^7$ Reads bzw. etwa $1,2 \cdot 10^5$ einzigartige Sequenzen berücksichtigt. Im Vergleich zu anderen Studien sind dies gute bzw. vergleichbare Werte (Carreras-Villaseñor et al., 2013, Dubey et al., 2019, Nunes et al., 2011a).

2.2.2.4. Analyse der Entstehungsregionen von sRNAs

Nachdem der Anteil der nicht Dicer-abhängigen Degradationsprodukte durch Einbeziehen der Reproduzierbarkeit theoretisch verringert wurde, wurden durch Kategorisierung und Charakterisierung weitere Anhaltspunkte für die Funktionalität des RNAi-Systems in *T. thlaspeos* analysiert.

Kategorisiert wurde entsprechend einer Studie an *T. atroviride*, indem die reproduzierbaren Reads subtraktiv auf Annotationen von rRNAs, tRNAs, prä-mRNAs, anderen ncRNAs, Scaffolds, auf denen ausschließlich rRNA annotiert wurden (rDNA-Scaffolds) und dem mitochondrialen Genom kartiert wurden (Tabelle 13) (Carreras-Villaseñor et al., 2013). Reads, welche nicht über ihre gesamte Länge ohne Fehler oder Lücken auf diese Annotationen kartierten, wurden unannotierten Regionen zugeschrieben. Diese Analyse ergab, dass ca. 92 % aller Reads auf rRNA-Annotationen kartierten. Da Reads von rDNA lange nicht näher erforscht und stattdessen verworfen wurden (Lambert et al., 2019, Weiberg et al., 2013, Dubey et al., 2019), wurden sie zunächst nicht in die Analyse aufgenommen, sondern als Folgeprojekt betrachtet. Da es inzwischen mehrere Beispiele für sRNAs aus rDNA mit regulatorischer Funktion in der Genexpression oder Genomintegrität gibt (Lau et al., 2018, Yang et al., 2015, Gutbrod and Martienssen, 2020), sollten diese Reads zukünftig näher analysiert werden. tRNA-Annotationen machten je nach Replikat ca. 7 % der Reads aus. Von den etwa 0,5 % der Reads, die auf prä-mRNA kartierten, entfielen etwa die Hälfte auf Exons und Introns und nur sehr wenige auf untranslatierte Regionen, die hier für alle protein-kodierenden Gene pauschal auf 150 nt festgelegt wurde, weil in *U. maydis* ähnliche Längen berichtet wurden (Doyle et al., 2011). Weitere ncRNAs machten je nach Stamm 0,05-0,14 % der Reads aus. Von den verbleibenden Reads kartierten viele neben rRNA-Annotationen, welche nur den funktionellen Teil der rRNA, aber nicht immer die intern transkribierten Spacer (ITS) und nie die extern oder nicht transkribierten Spacer (ETS oder NTS) beinhalteten. Auf diese bislang unannotierten Bereiche der rDNA-Scaffolds fielen etwa 0,07 % der Reads. Etwa 0,2 % der Reads kartierten auf mitochondriale Sequenzen. Damit verblieben durchschnittlich 0,5 % der Reads auf bislang unannotierte Regionen.

Tabelle 13 Kategorisierung reproduzierbarer Reads. Für die subtraktive Kartierung auf die jeweilige Kategorie mussten Read-Sequenzen über ihre gesamte Länge identisch zur annotierten Sequenz sein ohne Fehler oder Lücken aufzuweisen. Angegeben ist der Anteil an Reads, die einer Kategorie zugeordnet werden konnten in Prozent. Genom und Annotation von LF1 wurden für Reads aller Replikate verwendet. UTR: untranslatierte Regionen.

	LF1_R1	LF1_R2	LF2_R1	LF2_R2
rRNA	89,91	89,95	93,44	93,94
tRNA	8,55	8,33	5,25	4,83
Prä-mRNA	0,50	0,58	0,44	0,47
3'-UTR	0,02	0,02	0,04	0,04
5'-UTR	0,02	0,02	0,01	0,01
Exon	0,21	0,26	0,24	0,26
Intron	0,25	0,27	0,15	0,16
ncRNA	0,14	0,14	0,06	0,05
rDNA-Scaffolds	0,07	0,09	0,07	0,06
mtDNA	0,19	0,20	0,30	0,22
unannotiert	0,63	0,71	0,45	0,42

Indem die reproduzierbaren Reads durch Kartierung in verschiedene Kategorien eingeteilt wurden, konnte gezeigt werden, dass der größte Teil der Reads aus rRNA und tRNA stammt. Die relevanten prä-mRNA-Reads und die besonders interessanten auf unannotierten Regionen kartierenden Reads machten jeweils ca. 0,5 % der Reads aus.

Weil sie Anhaltspunkte für die Funktion von Dicer und Argonaute bieten können, wurden die Reads darüber hinaus bezüglich Länge, GC-Gehalt und 5'-Nukleotid untersucht. Hier zeigten beide Stämme dieselben Eigenschaften, wenn auch quantitativ mit leichten Unterschieden (Abbildung 18). Bei der Herstellung der Bibliotheken wurde vermutlich etwas mehr Gesamt-RNA von LF2 als von LF1 eingesetzt (Abbildung 17D), was die quantitativen Unterschiede erklären könnte.

Insgesamt waren die Reads, welche weder auf rRNA- noch auf tRNA-Annotationen kartierten, zwischen 22 und 32 nt lang, wobei kürzere Sequenzen tendenziell häufiger auftraten (Abbildung 18A). Die wenig abundanten Reads, die auf rDNA-Scaffolds außerhalb der rRNA-Annotationen oder den mitochondrialen Scaffold kartierten, waren mit einer Länge von 21-32 nt wenig definiert. Die geringe Zahl anderer ncRNA-Annotationen könnte der Grund dafür sein, dass die hier kartierenden Reads eine recht definierte Länge von 26-28 nt aufweisen. Interessanterweise zeigten auf prä-mRNA-Annotationen kartierende sRNAs besonders häufig Längen von 22-24 nt sowie 30-32 nt. Schließlich kartierten auf bislang unannotierte Bereiche 21-32 nt lange Reads, wobei 22-25 nt lange Reads grundsätzlich häufiger auftraten. Eine Akkumulation von ca. 20-25 nt langen sRNAs ist für Dicer-Produkte typisch (Svoboda, 2020, Nicolás and Garre, 2016), sodass hier bereits davon ausgegangen werden kann, dass das

hier identifizierte Dicer aus *T. thlaspeos* funktionsfähig sein könnte. Weitere Details zur Herstellung der sRNAs werden in der Diskussion erläutert (Kapitel 3.2.4 „Herstellung von sRNAs in *T. thlaspeos*“).

Der GC-Gehalt der nicht auf rRNA- oder tRNA-Annotationen kartierenden Reads lag zwischen 20 und 80 % (Abbildung 18B). Die Reads von mitochondrialer DNA entsprachen dem durchschnittlichen GC-Gehalt von 30% dieses Scaffolds. Die anderen ncRNAs, die alle auf dem mitochondrialen Scaffold annotiert sind, wiesen mit überwiegend 45 % einen etwas höheren GC-Gehalt auf. Protein-kodierende und intergenische Bereiche produzierten dagegen Reads mit dazu vergleichsweise heterogenem GC-Gehalt von 45-70 %. Der durchschnittliche genomische GC-Gehalt von *T. thlaspeos* beträgt 61 % (Courville et al., 2019). Anhand der mitochondrial kodierten ncRNAs und den weiteren von mtDNA stammenden sRNAs konnte bereits ein gewisser Unterschied im GC-Gehalt gezeigt werden, der im weitaus umfangreicheren Rest des Genoms möglicherweise größer ausfallen könnte. Dementsprechend könnten die Reads möglicherweise von unterschiedlichen Regionen des Genoms stammen.

Ago-Proteine besitzen in Menschen und in *A. thaliana* aufgrund eines speziellen Bereichs in der MID-Domäne eine Belade-Präferenz bezüglich des 5'-Nukleotids (Frank et al., 2012). Tatsächlich sieht man in *A. thaliana* und auch in *M. circinelloides* eine sehr starke Akkumulation von sRNAs mit einem bestimmten 5'-Nukleotid bei Co-Immunpräzipitationen im Vergleich zur sRNA-Sequenzierung von Gesamt-RNA (Mi et al., 2008, Cervantes et al., 2013). Ago oder andere Faktoren können darüber hinaus miRNAs vor Degradation schützen (Ha and Kim, 2014). Daher könnte eine Anhäufung eines 5'-Nukleotids in sRNA-Sequenzierdaten auf eine bevorzugte Beladung in Ago hindeuten. Gleichzeitig gibt es aber auch Beispiele für wenig oder nicht selektiv beladene Agos wie in *M. oryzae* (Nguyen et al., 2018). Auch wenn ein verstärktes Auftreten eines 5'-Nukleotids in sRNA-Sequenzierungsdaten von Gesamt-RNA kein eindeutiger Hinweis auf die Beladung von Ago ist, sollte hier überprüft werden, ob es eine sehr starke Anreicherung gibt, die Anlass für nähere Untersuchungen und/oder Anhaltspunkte für die Auswahl oder Gewichtung der sRNAs für die Zieltranskript-Vorhersage bieten könnte. In *T. thlaspeos* wurde in dieser Doktorarbeit für alle mitochondrial kodierten sRNAs (mtDNA und andere ncRNAs) eine erhöhte Präferenz für Uridin bzw. für Adenosin an der 5'-Position festgestellt (Abbildung 18C), die mit dem niedrigen GC-Gehalt dieses Scaffolds einhergehen könnte. In sRNAs aus prä-mRNAs und aus intergenischen Bereichen wurde nur jeweils eine leichte Präferenz für Cytidin bzw. Cytidin oder Guanosen festgestellt. Auch in *F. oxysporum* wurde eine gleichmäßige Verteilung der vier Nukleotide an der 5'-Position vorgefunden (Chen et al., 2014). Damit gab es zunächst keinen konkreten Anlass, die sRNA-Kandidaten anhand des 5'-Nukleotids vor der Zieltranskript-Vorhersage zu filtern.

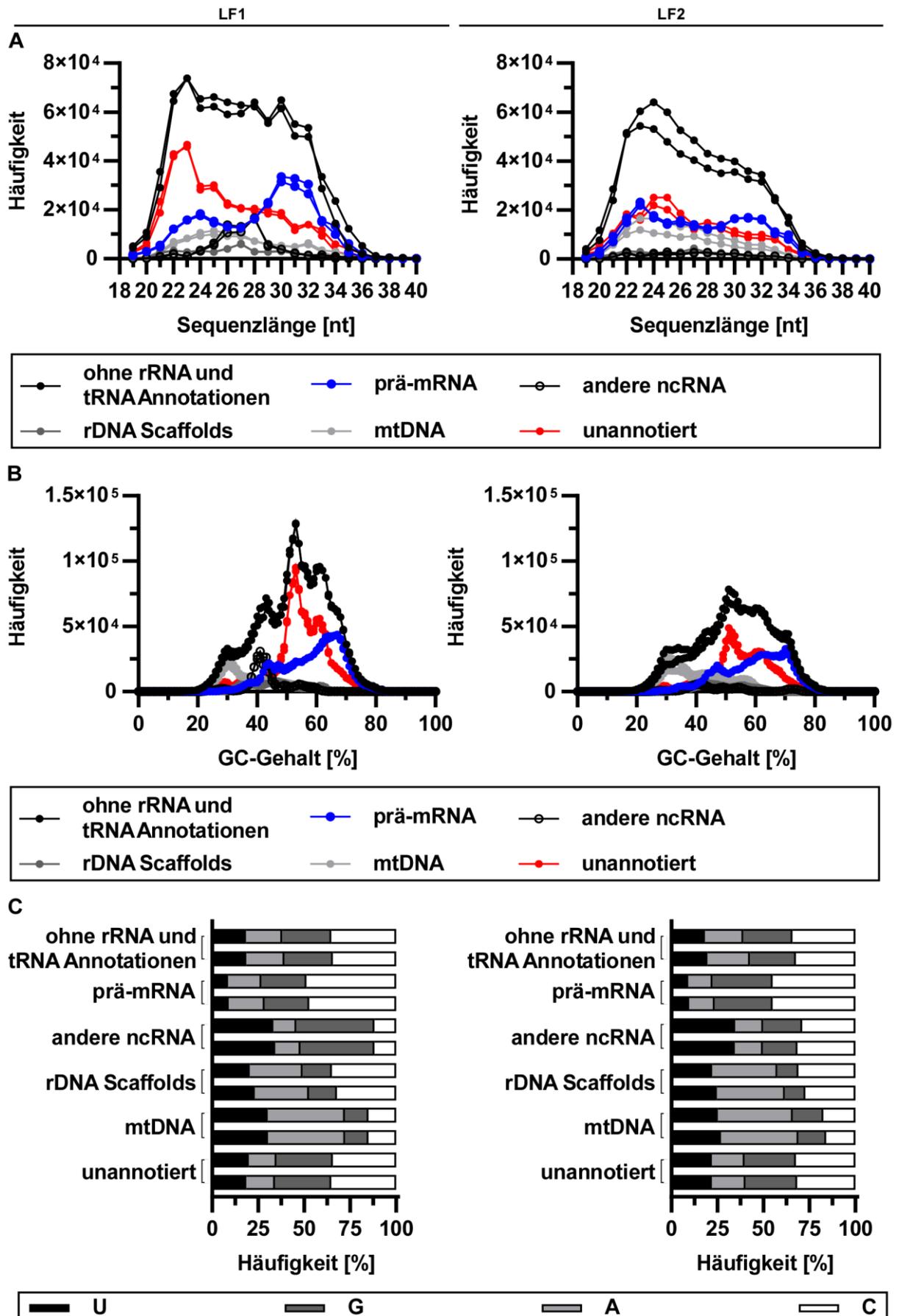


Abbildung 18 Charakterisierung der kartierten Reads. Reproduzierbare Reads wurden sukzessive zu verschiedenen funktionellen Gruppen kartiert und deren Eigenschaften charakterisiert. A) Sequenzlänge, B) GC-Gehalt, C) 5'-Nukleotid. Für A) und B) schwarz: ohne rRNA- und tRNA-Annotationen, blau: prä-mRNA, schwarz/weiß: ncRNA, dunkelgrau: rDNA-Scaffolds, hellgrau: mtDNA, rot: unannotiert; Für C) schwarz: Uridin, dunkelgrau: Guanosin, hellgrau: Adenosin, weiß: Cytidin. LF1: links, LF2: rechts. Auf den Scaffolds 67, 72, 75 und 107 wurden ausschließlich rRNA-Gene annotiert. Daher wurden sie rDNA-Scaffolds benannt. Auf Scaffold 106 waren als einziger ausschließlich rRNA-Annotationen bakteriellen oder archaealen Ursprungs sowie tRNAs vorhergesagt. Er repräsentiert mitochondriale DNA. Gezeigt sind Werte für je zwei experimentelle Replikate pro Stamm.

Zusammenfassend wurden je zwei sRNA-Bibliotheken pro Stamm analysiert. Die meisten Reads stammten von rRNAs. Reads von prä-mRNAs und unannotierten Regionen machten zusammen ein Prozent der Reads aus. In diesen beiden Kategorien finden sich in beiden Stämmen oft 22-24 nt lange Reads, welche durch Dicer prozessiert worden sein könnten. Aus prä-mRNAs gibt es zudem eine Anreicherung von 30-32 nt langen Reads. Schließlich lässt eine geringe Tendenz zu Cytidin oder Guanosin als 5'-Nukleotid in sRNAs von prä-mRNAs und intergenischen Bereichen keinen Hinweis auf deutliche Belade-Präferenz von Ago in *T. thlaspeos* zu.

2.2.2.5. Vorhersage potentieller endogener Zieltranskripte von sRNAs

Um zu analysieren, welche biologischen Funktionen das RNAi-System von *T. thlaspeos* regulieren könnte, wurden für die identifizierten sRNAs aus *T. thlaspeos* endogene Zieltranskripte vorhergesagt und die jeweilige Proteinfunktion ermittelt. Dabei war es möglich, dass eine sRNA mit mehreren mRNAs und eine mRNA mit mehreren sRNAs interagiert.

Für die Zieltranskript-Vorhersage wurden nur solche sRNAs verwendet, die perfekt auf das Genom kartierten, in allen vier Replikaten vorhanden waren, nicht auf rRNA- oder tRNA-Annotationen kartierten, 20-24 nt lang waren und eine normalisierte Abundanz von zwei Reads in jedem der vier Replikate aufwiesen. Dies sollte zum einen folgende Analysen aufgrund der Abundanz der sRNA erleichtern und zum anderen entsprach es üblichen Kriterien (Ma et al., 2020, Chen et al., 2014). Auf diese Weise wurden 97 sRNA-Kandidaten aus *T. thlaspeos* für die Zieltranskript-Vorhersage herausgefiltert (siehe Tabelle 23 im Anhang).

Von den 97 eingesetzten sRNAs wurden für 17 sRNAs insgesamt 19 verschiedene endogene Zieltranskripte mit dem Programm TAPIR vorhergesagt (Tabelle 14) (Bonnet et al., 2010). Darunter sind Transkripte von Genen wie Cytoplasmatischem Dynein schwere Kette 2 (THTG_05648), dem Karyopherin Kap123 (THTG_04410), SAP155 (THTG_04178) und IME4 (THTG_01185). Auch ein Transkript mit Ähnlichkeit zu einer Transposase (THTG_04405) wurde vorhergesagt. Allerdings war hier die Genannotation auffällig, da das annotierte Protein kein Methionin am N-Terminus besaß und nur 126 Aminosäuren ohne vorhergesagte

Domänen aufwies. Daher sollte die Annotation überprüft werden. Weiter wurden Zieltranskripte vorhergesagt, deren Gene für Cytochrom P450 (THTG_03827), ein Protein unbekannter Funktion ohne konservierte Domänen (THTG_03119), VPS73 (THTG_06156), ein Aktin-bündelndes Protein (THTG_04952), eine Flavin-enhaltende Aminoxidasedehydrogenase (THTG_05570) und Utp10 (THTG_06063) kodieren. In der Proteinsequenz eines weiteren putativen Zieltranskriptes mit der Gen-ID THTG_05317 wurden eine GAL4-Domäne und eine pilzliche Transkriptionsfaktor regulatorische mittlere Homologie-Region-Domäne mittels Domänensuche (NCBI – Conserved Domains) identifiziert, welche zumindest eine Zuordnung als wahrscheinlichen Transkriptionsfaktor erlauben. Des Weiteren wurde ein Transkript des Gens THTG_01697 als Ziel von RNAi vorhergesagt, das eine Proteinkinase ohne nähere Funktionsbezeichnung kodiert. Außerdem wurden mRNAs als Ziel endogener RNAi prognostiziert, die für die E3-Ubiquitinligase Hel2 (THTG_03301), eine Adenylatcyclase (THTG_03864), Dynein leicht-intermediäre Kette (THTG_03770), eine Inositolpolyphosphat-Phosphatase (THTG_03611), STI1 (THTG_01782) und ein putatives Nukleoporin (THTG_03252) kodieren.

Die biologische Funktion sowie weitere Analysemöglichkeiten und Vergleiche werden weiter unten (Kapitel 3.2.5 „Potentielle endogene Funktionen der sRNAs von *T. thlaspeos*“) diskutiert.

Tabelle 14 *T. thlaspeos*-sRNAs mit vorhergesagten endogenen Zieltranskripten. Verwendet wurden 20-24 nt lange sRNAs aus axenischer Kultur, welche nicht auf vorhergesagte rRNA- oder tRNA-Annotationen kartierten und eine normalisierte Abundanz von mindestens zwei in jedem Replikat aufwiesen. Die sRNAs sind der Reihenfolge nach ihrer absteigenden Abundanz sortiert. Der Score spiegelt die Anzahl der Basenfehlpaarungen, Lücken und G-U-Paarungen zwischen sRNA und Zieltranskript wider. Diese kommen in validierten sRNAs in der seed-Region (Position 2-12 vom 5'-Ende der sRNA-Sequenz) selten vor, und werden daher stärker gewichtet. Daher repräsentiert ein Score von Null eine perfekte Homologie zwischen sRNA und Zieltranskript und höhere Werte entsprechen weniger Homologie, wobei die genannten Imperfektionen funktional gewichtet wurden.

sRNA	Score	Länge der sRNA [nt]	sRNA-Sequenz (5' → 3')	Gen-ID des vorhergesagten Zieltranskriptes	Ziel-Protein
Tt_sRNA_3	4	21	CCAGUGGAUGAAGA CCGAGCG	THTG_05648	Cytoplasmatisches Dynein schwere Kette 2
Tt_sRNA_4	4,5	22	CCAGUGGAUGAAGA CCGAGCGU	THTG_05648	Cytoplasmatisches Dynein schwere Kette 2
Tt_sRNA_19	4,5	22	CUCGUUGAUGAGCU CUAUAACG	THTG_04410	Kap123
Tt_sRNA_19	3,5	22	CUCGUUGAUGAGCU CUAUAACG	THTG_04178	SAP155

Tt_sRNA _25	1	23	UAGACAGUCUGCUU UUUUUCGGC	THTG_01185	IME4
Tt_sRNA _25	1	23	UAGACAGUCUGCUU UUUUUCGGC	THTG_04405	Verwandt mit Transposase
Tt_sRNA _31	4	23	GAGGCUGGGCUGGU CCGAUGGCA	THTG_03827	Cytochrom P450
Tt_sRNA _37	4	20	CCAGUGGAUGAAGA CCGAGC	THTG_05648	Cytoplasmatisches Dynein schwere Kette 2
Tt_sRNA _45	3,5	24	CCUGCGGUGGACGA GAUCGAUGUG	THTG_03119	unbekannt
Tt_sRNA _48	4	22	CCGGACAAGGACAA AGGGGGCU	THTG_06156	VPS73
Tt_sRNA _50	4,5	22	UGGCCGCUCAGAUC UGAUGGAC	THTG_04952	Aktin-bündelndes Protein
Tt_sRNA _55	4	24	GAGGGGACGUUGGC UGAGCUGGCU	THTG_05570	Flavin-enthaltende Aminoxidasedehydrogenase
Tt_sRNA _55	4,5	24	GAGGGGACGUUGGC UGAGCUGGCU	THTG_06063	Utp10
Tt_sRNA _62	3,5	23	CUGCGGUGGACGAG AUCGAUGUG	THTG_03119	unbekannt
Tt_sRNA _62	4,5	23	CUGCGGUGGACGAG AUCGAUGUG	THTG_05317	unbekannt
Tt_sRNA _63	4,5	22	AUGCGACCGUUUGA ACCUUGGU	THTG_01697	Wahrscheinlich Protein Kinase
Tt_sRNA _70	4,5	23	GUGGCCUAAAGAUCU UUUUGUAGG	THTG_03301	E3-Ubiquitinligase Hel2
Tt_sRNA _71	4,5	21	GGCUGGGCUGGUCC GAUGGCA	THTG_03864	Adenylatcyclase
Tt_sRNA _71	4,5	21	GGCUGGGCUGGUCC GAUGGCA	THTG_03770	Dynein leicht-intermediäre Kette
Tt_sRNA _80	4,5	24	GCUUCGGCGGGGA UCUUGAUGGC	THTG_03611	Inositolpolyphosphat- Phosphatase
Tt_sRNA _89	3	22	CCGUCGGAGCCCUC CCGCCUCU	THTG_01782	ST11
Tt_sRNA _89	4	22	CCGUCGGAGCCCUC CCGCCUCU	THTG_03252	Nukleoporin, putativ
Tt_sRNA _90	2	23	UGCUIUUUUUCGGC CGGAUCCU	THTG_01185	IME4
Tt_sRNA _90	2	23	UGCUIUUUUUCGGC CGGAUCCU	THTG_04405	Verwandt mit Transposase

2.2.2.6. Vorhersage potentieller Zieltranskripte für HIGS

Um eine erste Einschätzung für die mögliche Nutzung des RNAi-Systems während der Infektion zu erhalten, wurde weiterhin das Transkriptom von *A. hirsuta* für eine Zieltranskript-Vorhersage mit TAPIR verwendet (Bonnet et al., 2010, Courville et al., 2019). Von den 97 sRNAs, die für die Zieltranskript-Analyse eingesetzt wurden, wurden für 59 sRNAs interagierende mRNAs aus *A. hirsuta* vorhergesagt, die im Folgenden anhand gängiger Methoden weiter gefiltert wurden. Von diesen 59 pilzlichen sRNAs wiesen 28 eine vollständige Basenpaarung zum vorhergesagten pflanzlichen Zieltranskript auf. Die Quelle dieser sRNAs könnte in sRNA-Sequenzierungsdaten aus infizierten Pflanzen, die für die Verifikation von ck-RNAi notwendig werden, zukünftig nicht zweifelsfrei bestimmt werden. Daher wurden diese sRNAs, ähnlich wie in anderen Studien (Weiberg et al., 2013, Zanini et al., 2018), von weiteren Analysen ausgeschlossen. Von den verbleibenden 31 sRNAs hatten sechs ein vorhergesagtes Zieltranskript im Pilz, weshalb sie, wie auch in anderen Studien (Wang et al., 2017a), vorerst nicht weiter berücksichtigt wurden. Für die verbleibenden 25 sRNAs aus *T. thlaspeos* wurden mRNAs von 26 Genen als Zieltranskripte in *A. hirsuta* vorhergesagt. Um den die Auswirkung von PIGS von *T. thlaspeos* auf *A. hirsuta* zu evaluieren, wurden zu jeder mRNA aus *A. hirsuta* mit Hilfe publizierter Daten (Courville et al., 2019) Homologe in *A. thaliana* identifiziert. So konnte 21 vorhergesagten Zieltranskripten ein Homolog in *A. thaliana* und damit meist auch eine Funktion zugeordnet werden (Tabelle 15). Proteine dieser Zieltranskripte waren die RAB-Geranylgeranyl-Transferase Beta Untereinheit 1 (RGTB1), das F-Box/RNI-ähnliche/FBD-ähnliche Domänen-enthaltende Protein, der Suppressor von MEK1 (SMEK1), das Aktin Cytoskelett-regulatorischer Komplex PAN-ähnliche Protein, die Inositolphosphorylceramid Synthase 3 (IPCS3), das B-Box Domänen Protein 28 (BBX28), das Myosin-M schwere Protein, das BEACH-Domänen Homolog C1 (BchC1), die Caseinkinase II, Alpha Kette 3 (CKA3), das pflanzliche Syntaxin 31 (SYP31), ein multiresistentes Protein, ein putativer Elektronentransporter, Embryo Defekt 1011 (LONO1), die Mannosidase 5 (MNS5), RAB6, eine Anaphase-fördernder Komplex Untereinheit, das Titan-ähnliche, Transthyretin-ähnliche Protein (TTL), ein RNA-bindendes KH Domänen-enthaltendes Protein, Bildet aploide und binukleäre Zellen 1A (FAB1D), die Glycosylhydrolase 9B7 und die Ubiquitin-spezifische Protease 18 (UBP18).

Die Rolle dieser potentiellen Zieltranskripte in der Pilz-Pflanze-Interaktion wird in der Diskussion (Kapitel 3.2.6 „Potentielle Funktionen des RNAi-Systems während der Infektion von Pflanzen“) näher erläutert.

Tabelle 15 *T. thlaspeos*-sRNAs mit vorhergesagten Zieltranskripten in *A. hirsuta*. Verwendet wurden 20-24 nt lange sRNAs aus axenischer Kultur, welche nicht auf vorhergesagte rRNA- oder tRNA-Annotationen kartierten und eine normalisierte Abundanz von mindestens zwei in jedem Replikat aufwiesen. Aufgelistet sind ausschließlich sRNAs, die weder eine vollständige Basenpaarung zu einem potentiellen pflanzlichen Zieltranskript noch ein potentielles pilzliches Zieltranskript besaßen. Aufgeführt sind zudem ausschließlich Zieltranskripte mit einem Homolog in *A. thaliana*. Die sRNAs sind der Reihenfolge nach ihrer absteigenden Abundanz sortiert. Der Score spiegelt die Anzahl der Basenfehlpaarungen, Lücken und G-U-Paarungen zwischen sRNA und Zieltranskript wider. Diese kommen in validierten sRNAs in der seed-Region (Position 2-12 vom 5'-Ende der sRNA-Sequenz) selten vor, und werden daher stärker gewichtet. Daher repräsentiert ein Score von Null eine perfekte Homologie zwischen sRNA und Zieltranskript und höhere Werte entsprechen weniger Homologie, wobei die genannten Imperfektionen funktional gewichtet wurden.

sRNA	Score	Länge der sRNA [nt]	sRNA-Sequenz (5' → 3')	Gen-ID des vorhergesagten <i>A. hirsuta</i> -Zieltranskripts	Gen-ID des <i>A. thaliana</i> -Homologs	Ziel-Protein
Tt_sRNA_12	3	21	UUGUAAAACUU AGCGGUCUCU	TRINITY_ DN20130_ c1_g1	at5g12210	RAB-Geranylgeranyl-Transferase Beta Untereinheit 1 (RGTB1)
Tt_sRNA_12	4	21	UUGUAAAACUU AGCGGUCUCU	TRINITY_ DN26273_ c3_g4	at5g56420	F-Box/RNI-ähnliches/FBD-ähnliches Domänenenthaltende Protein
Tt_sRNA_12	4,5	21	UUGUAAAACUU AGCGGUCUCU	TRINITY_ DN26724_ c0_g1	at3g06670	Suppressor von MEK1 (SMEK1)
Tt_sRNA_15	3,5	24	GUUGAUCCGAA UUUUUCUAUUU CU	TRINITY_ DN24114_ c1_g2	at3g20350	Aktin Cytoskelett-regulatorischer Komplex PAN-ähnliches Protein
Tt_sRNA_16	3	22	UUGUAAAACUU AGCGGUCUCUA	TRINITY_ DN20130_ c1_g1	at5g12210	RAB-Geranylgeranyl-Transferase Beta Untereinheit 1 (RGTB1)
Tt_sRNA_17	2,5	22	UUCCAUUUUUC GCACGGGGAGA	TRINITY_ DN18362_ c1_g2	at2g29525	Inositolphosphorylceramid Synthase 3 (IPCS3)
Tt_sRNA_21	3	23	CGACAUGAUGA ACAAACAAGAU U	TRINITY_ DN17175_ c0_g1	at4g27310	B-Box Domänen Protein 28 (BBX28)
Tt_sRNA_21	4	23	CGACAUGAUGA ACAAACAAGAU U	TRINITY_ DN21051_ c0_g1	at2g37960	Myosin-M schweres Protein

Tt_sRNA _21	4	23	CGACAUGAUGA ACAAACAAGAU U	TRINITY_ DN14188_ c0_g2	at3g60920	BEACH-Domänen Homolog C1 (BchC1)
Tt_sRNA _29	4,5	23	ACUUAGUCGUA UCAUUAUGUCU C	TRINITY_ DN21693_ c1_g3	at2g23080	Caseinkinase II, Alpha Kette 3 (CKA3)
Tt_sRNA _36	4	22	AUCGAUGACAA UAUGGAAUUAU	TRINITY_ DN22075_ c0_g1	at5g05760	Pflanzliches Syntaxin 31 (SYP31)
Tt_sRNA _36	3,5	22	AUCGAUGACAA UAUGGAAUUAU	TRINITY_ DN46784_ c0_g1	at1g58007	Multiresistentes Protein
Tt_sRNA _39	4,5	24	ACUUAGUCGUA UCAUUAUGUCU CU	TRINITY_ DN21693_ c1_g3	at2g23080	Caseinkinase II, Alpha Kette 3 (CKA3)
Tt_sRNA _41	4	24	AUCGAUGACAA UAUGGAAUUAU CG	TRINITY_ DN46784_ c0_g1	at1g58007	Multiresistentes Protein
Tt_sRNA _41	4	24	AUCGAUGACAA UAUGGAAUUAU CG	TRINITY_ DN22075_ c0_g1	at5g05760	Pflanzliches Syntaxin 31 (SYP31)
Tt_sRNA _46	4	21	UUUCGGGCACC CACUCUGAUC	TRINITY_ DN22139_ c0_g1	at5g66600	Elektronentransporter, putativ
Tt_sRNA _46	4	21	UUUCGGGCACC CACUCUGAUC	TRINITY_ DN27470_ c0_g1	at1g55540	Embryo Defekt 1011 (LONO1)
Tt_sRNA _46	3,5	21	UUUCGGGCACC CACUCUGAUC	TRINITY_ DN22139_ c0_g1	at5g66600	Elektronentransporter, putativ
Tt_sRNA _47	4	22	CAGGCUGUGCU GAUGAUUCCA	TRINITY_ DN24238_ c0_g1	at1g27520	Mannosidase 5 (MNS5)
Tt_sRNA _54	3,5	24	UUCCAUUUUUC GCACGGGGAGA UC	TRINITY_ DN27303_ c0_g4	at2g44610	RAB6
Tt_sRNA _82	4	22	AACGUGUUUCU ACUUUCUGAUC	TRINITY_ DN26894_ c0_g1	at1g06590	Anaphase-fördernder Komplex Untereinheit
Tt_sRNA _83	4	22	UAUCUACAUCG GAUUCUGAGGU	TRINITY_ DN25516_ c0_g2	at4g24900	Titan-ähnliches, Transthyretin-ähnliches Protein (TTL)
Tt_sRNA _83	4,5	22	UAUCUACAUCG GAUUCUGAGGU	TRINITY_ DN23441_ c0_g1	at1g14170	RNA-bindendes KH- Domänen-enthaltendes Protein

Tt_sRNA _83	4,5	22	UAUCUACAUCG GAUUCUGAGGU	TRINITY_ DN25482_ c3_g1	at1g34260	Bildet aploide und binukleäre Zellen 1A (FAB1D)
Tt_sRNA _84	3,5	22	CUUAGUCGUU CAUUAUUGUCUC	TRINITY_ DN21693_ c1_g3	at2g23080	Caseinkinase II, Alpha Kette 3 (CKA3)
Tt_sRNA _87	3,5	21	AUCUACAUCGG AUUCUGAGGU	TRINITY_ DN25482_ c3_g1	at1g34260	Bildet aploide und binukleäre Zellen 1A (FAB1D)
Tt_sRNA _87	3,5	21	AUCUACAUCGG AUUCUGAGGU	TRINITY_ DN23169_ c2_g2	at1g75680	Glycosylhydrolase 9B7
Tt_sRNA _88	3	22	UGAUCCGAAU UUUCUAUUUCU	TRINITY_ DN24114_ c1_g2	at3g20350	Aktin Cytoskelett- regulatorischer Komplex PAN-ähnliches Protein
Tt_sRNA _94	4,5	22	ACUAGGACAAA CCGCUAUUGGC	TRINITY_ DN23963_ c0_g1	at4g31670	Ubiquitin-spezifische Protease 18 (UBP18)
Tt_sRNA _96	3,5	23	CUUAGUCGUU CAUUAUUGUCUC U	TRINITY_ DN21693_ c1_g3	at2g23080	Caseinkinase II, Alpha Kette 3 (CKA3)
Tt_sRNA _97	2,5	23	UUGAUCCGAAU UUUUCUAUUUC U	TRINITY_ DN24114_ c1_g2	at3g20350	Aktin Cytoskelett- regulatorischer Komplex PAN-ähnliches Protein

3. Diskussion

3.1. Genetische Modifikation

Für die Entwicklung neuer Pflanzenschutzmaßnahmen ist das Wissen auch um molekulare Interaktionen zwischen Pilz und Pflanze wichtig. Idealerweise können beide Interaktionspartner genetisch modifiziert werden, sodass die Prozesse beiderseitig untersucht werden können. Der Brandpilz *T. thlaspeos* befällt Brassicaceaeen wie *A. hirsuta*, *A. alpina* und unter Laborbedingungen auch *A. thaliana*, sodass auf umfangreiche Ressourcen bezüglich der Pflanzen zurückgegriffen werden kann (Frantzeskakis et al., 2017). Gleichzeitig ist er mit agronomisch relevanten Pathogenen verwandt, sodass *T. thlaspeos* als Modellorganismus etabliert werden soll (Frantzeskakis et al., 2017).

Ein Ziel dieser Arbeit war es, Methoden zur genetischen Modifikation von *T. thlaspeos* zu etablieren. Dazu wurde die Calcium-PEG-Transformationsmethode von Protoplasten gewählt, da diese kostengünstige Methode die räumliche Trennung einzelner Protoplasten erlaubt, für verwandte und/oder filamentöse Pilze gut funktioniert sowie laborintern für *U. maydis* etabliert war.

Ein zuverlässig planbares Wachstum der Pilzkultur war die Grundlage für qualitativ und quantitativ einheitliches Ausgangsmaterial, mit dem Enzyme und Puffer für die zügige Entfernung der pilzlichen Zellwand identifiziert und optimiert werden konnten. Die auch nach der Aufreinigung intakten Protoplasten waren auf festem Regenerationsmedium meist in der Lage, ihre Zellwand neu zu synthetisieren und zu Kolonien heranzuwachsen. Die MIC zweier Selektionsmarker wurde für Festmedien für unterschiedliche Verwendungszwecke, der Kultivierung intakter Zellen und der Regeneration von Protoplasten, identifiziert. Plasmide, die für entsprechende Resistenzmarkergene kodieren, wurden mit endogenen Promotoren und Terminatoren hergestellt und auf ihre Funktionalität überprüft. Schließlich konnten beide Stämme von *T. thlaspeos* erfolgreich transformiert werden, sodass nun zwei Hygromycin B-resistente, unterschiedlich fluoreszierende Stämme zur Verfügung stehen, die langfristig ohne Selektionsdruck kultiviert werden können.

Neben der beschriebenen, auf randomisierte Integration abzielenden genetischen Modifikation sollte für den zweiten Teil dieser Arbeit auch die gezielte Deletion des Dicer-Gens erfolgen. Hierfür wurde ein Konstrukt mit homologen Flanken zum Dicer-Gen aus *T. thlaspeos* und einer der funktionellen Resistenzgenkassetten hergestellt und transformiert ohne anschließend Transformanten zu erhalten. Da die Deletion des Dicer-Gens zu Wachstumsphänotypen oder Letalität führen kann (Carreras-Villaseñor et al., 2013, Chapman et al., 2022), wurden darüber hinaus zum Nachweis der Machbarkeit Plasmide für die Deletion des Pheromonrezeptor-Gens *pra1* hergestellt. Auch hier konnte für keines der Plasmide mit unterschiedlichen homologen Flankenlängen Transformanten gewonnen werden.

Im Folgenden sollen die Aspekte mit allgemeinen Ähnlichkeiten zu anderen Pilzen sowie die Effizienz und Raum für Optimierungen diskutiert werden.

3.1.1. Effiziente Gewinnung stabiler Protoplasten

Da die Zellwandzusammensetzung zwischen Spezies variieren kann (Li et al., 2017a), gibt es bei der Herstellung von Protoplasten keine verlässlichen Vorhersagen, welche Zellwandabbauenden Enzyme sich für welchen Organismus eignen, stattdessen muss individuell getestet werden. So werden für *U. maydis* 12,5 mg/mL Glucanex verwendet, für *U. esculenta* 15 mg/mL Lywallzym und für *U. bromivora* eine Kombination aus 10 mg/mL Glucanex und 5 mg/mL Yatalase (Bösch et al., 2016, Yu et al., 2015, Rabe et al., 2016). Wenn die Produktion eines solchen Enzyms eingestellt wird, kann sich die Suche wiederholen, wie beispielsweise für das viel genutzte Novozym234, welches für *A. niger* inzwischen durch eine Kombination aus Glucanex, Chitinase und β -Glucuronidase ersetzt wurde (de Bekker et al., 2009, Brachmann et al., 2004, Ökmen et al., 2021). Für *T. thlaspeos* war zusätzlich zur Enzymmischung Glucanex weitere Chitinaseaktivität in Form von entweder reiner Chitinase oder der Enzymmischung Yatalase nötig. Hier könnte man spekulieren, dass Zellwände von *T. thlaspeos* möglicherweise einen höheren Anteil an Chitin im Vergleich zu *U. maydis* aufweisen.

Neben den Enzymen hatte der osmotische Stabilisator einen großen Einfluss auf die Protoplastenausbeute, da diese sowohl durch Sorbitol als auch durch Saccharose im Vergleich zu $MgSO_4$ drastisch herabgesetzt wurde. Interessanterweise regenerieren die Protoplasten grundsätzlich auf Regenerationsmedium mit Sorbitol als osmotischem Stabilisator (Masterarbeit (Plücker, 2017)) und sind im Sorbitol-haltigen STC stabil und intakt, was durch Trypanblau-Färbung nachgewiesen werden konnte. Auch bei anderen Spezies waren die Protoplasten in Sorbitol-haltigen Medien stabil und regenerieren hier besser als auf anorganischen osmotischen Stabilisatoren (Arnold and Garrison, 1979, Sietsma and De Boer, 1973). Ausschlaggebend für die geringere Protoplastenausbeute war daher vermutlich die Inhibition von Yatalase durch Sorbitol, denn Glucanex wird mit Sorbitol-haltigen Puffern verwendet (Bösch et al., 2016). Eine Inhibition verschiedener zum Zellwandabbau genutzter Enzyme aus Schnecken durch Sorbitol und z.T. Saccharose wurde bereits festgestellt (Sietsma and De Boer, 1973, Arnold and Garrison, 1979). Darüber hinaus wurden die Protoplasten hier nicht durch Pelletieren, sondern in einer Interphase gesammelt, da sie wegen des $MgSO_4$ im Protoplastierungspuffer aufschwammen. Die beiden Aufreinigungsmethoden könnten mit unterschiedlichen Verlusten einhergehen und sich so auf die finale Protoplastenausbeute auswirken.

Ein genauer Vergleich der Protoplastierungseffizienz ist schwierig, da das Frischgewicht selten hierfür verwendet wird (Lynch et al., 1985, Yu et al., 2015). Für *T. thlaspeos* war dies jedoch

aufgrund des mycelartigen Wachstums ohne zügige Generierung von Sporen notwendig. Das für *T. thlaspeos* etablierte Protokoll ermöglichte eine Ausbeute von $7,2 \cdot 10^7$ Protoplasten pro g Frischgewicht. Bei *U. esculenta* wurden nach der Aufreinigung $15,6 \cdot 10^8$ Protoplasten pro g Frischgewicht erzielt (Yu et al., 2015). Aus *A. niger* konnten pro g Frischgewicht etwa $3,5 \cdot 10^7$ Protoplasten gewonnen werden, sodass das etablierte Protokoll effizienter ist als das eines industriell genutzten Pilzes (de Bekker et al., 2009, Meyer, 2008).

Die für Transformationen eingesetzte Protoplastenanzahl liegt für *Aspergillus oryzae*, *Trichoderma reesei* und *Cordyceps militaris* bei $2 \cdot 10^5$ (Zou et al., 2021). Für *M. grisea* und *S. indica* sind es etwa $5-7 \cdot 10^6$ Protoplasten und für *U. maydis*, *Aspergillus nidulans* und *F. oxysporum* $1-2 \cdot 10^7$ Protoplasten (Balhadère et al., 1999, Zuccaro et al., 2009, Schulz et al., 1990, Koukaki et al., 2003, Liang et al., 2014). Für erfolgreiche Transformationen von *T. thlaspeos* wurden $8 \cdot 10^6$ Protoplasten eingesetzt (Kollaboration mit Lesley Plücker). Mit einer durchschnittlichen Menge an Protoplasten konnten also bereits Transformanten generiert werden.

3.1.2. Verbesserung der Regeneration

Bei schwankenden Regenerationsraten würden Transformationsereignisse nicht unbedingt sichtbar werden. Deshalb sollte zunächst die Regeneration verbessert werden, bevor Parameter der Transformation optimiert werden. Die Regeneration von Protoplasten wird von vielen Faktoren beeinflusst. Charakteristika von Protoplasten, wie die Stabilität, der Anzahl vorhandener Zellkerne oder unvollständig protoplastierte Zellen, können durch Kultivierungs- oder Protoplastierungsbedingungen beeinflusst werden (Fariña et al., 2004, Lou et al., 2019). Die Membranintegrität der Protoplasten wurde hier durch Färbung mit Trypanblau nachgewiesen. Bei filamentösen Pilzen besitzen die Protoplasten nicht immer einen Nukleus, was die berechnete Regenerationsrate reduziert (Fariña et al., 2004). Bei *F. oxysporum* beispielsweise waren abhängig vom verwendeten osmotischen Stabilisator während der Protoplastenisolation etwa 37-50 % der Protoplasten kernlos (Lynch et al., 1985). Zukünftig könnte das hier etablierte Protokoll der Trypanblau-Färbung mit Hoechst oder Propidiumiodid angepasst werden, um so die Zellkerne anzufärben (Zhang et al., 2018). Darüber hinaus kann die berechnete Regenerationsrate höher sein, falls unvollständig protoplastierte Zellen anwachsen. Bei der hier verwendeten Aufreinigungsmethode mit Sammelpuffer sollten sich un- und anprotoplastierte Zellen jedoch im Pellet befinden. Da die Protoplasten nach der Aufreinigung immer mikroskopisch betrachtet wurden und nie un- oder anprotoplastierte Zellen beobachtet wurden, kann davon ausgegangen werden, dass dieses Separationsverfahren für *T. thlaspeos* sehr gut funktioniert. Das Vorhandensein unprotoplastierter Zellen wird beispielsweise durch Ausplattieren auf Regenerationsmedium ohne osmotischen Stabilisator getestet, da Protoplasten unter diesen Bedingungen platzen (Lou et al., 2019, Cheng and

Bélanger, 2000). Die Protoplasten von *T. thlaspeos* zeigten ohne osmotischen Stabilisator jedoch keine Regeneration (Masterarbeit (Plücker, 2017)), sodass davon ausgegangen werden kann, dass bei dem hier etablierten Protoplastierungs- und Aufreinigungsprotokoll keine Zellen verbleiben.

Neben der Protoplastenqualität beeinflussen auch verschiedene Komponenten des Mediums wie Nährstoffe, pH-Wert oder osmotischer Stabilisator die Regeneration (Fariña et al., 2004, Wu and Chou, 2019, Yu et al., 2015). Das verwendete Geliemittel des Regenerationsmediums zeigte keinen offensichtlichen Einfluss auf die Regenerationsrate. Die Regenerationseffizienz von Protoplasten kann abhängig vom verwendeten osmotischen Stabilisator variieren (Zhang et al., 2016a, Yu et al., 2015). Das während der Protoplastierung genutzte $MgSO_4$ war sowohl mit Pflanzenagar als auch mit Phytigel inkompatibel, weshalb andere Substanzen getestet und schließlich Saccharose verwendet wurde. Auch bei Verwendung von Agar und $MgSO_4$ wurde je nach Komposition des Mediums Präzipitat beobachtet (Fariña et al., 2004). Protokolle für die filamentösen Pilze *Antrodia cinnamomea*, *Sclerotium rolfsii* und *Amphichorda guana* verwenden ebenfalls $MgSO_4$ für die Protoplastierung und Saccharose für die Regeneration und erreichen Regenerationsraten zwischen 26 und 71 % (Wu and Chou, 2019, Fariña et al., 2004, Liang et al., 2021). Regenerationsraten von filamentösen Pilzen können durchaus niedrig sein (Fariña et al., 2004). So wurden für *F. oxysporum* Regenerationsraten von 0-6 % berichtet (Lynch et al., 1985). Da die Regenerationseffizienz auch von der verwendeten Konzentration des osmotischen Stabilisators abhängt (Yu et al., 2015), sollte diese zukünftig optimiert werden. Darüber hinaus wird für *Magnaporthe grisea* Saccharose statt Sorbitol in der STC-Lösung verwendet, weil leicht cytotoxische Effekte von Sorbitol beobachtet wurden (Balhadère et al., 1999). Die Trypanblau-Färbung wies auf intakte Protoplasten von *T. thlaspeos* in Sorbitolhaltigem STC hin. Da die Regeneration auf YMPG mit Sorbitol geringer ausfiel als mit Saccharose (Plücker et al., 2021), könnte dies dennoch für *T. thlaspeos* getestet werden. Dazu könnte eine definierte Anzahl Protoplasten auf Regenerationsmedium und nicht-osmotischem Medium ausplattiert und die Kolonien gezählt werden, um die Regenerationsrate zu bestimmen (Lou et al., 2019). Diese könnte ggf. um die Zahl der kernlosen Protoplasten korrigiert werden.

Eine geringere Konzentration des osmotischen Stabilisators in der unteren Schicht des Festmediums soll zudem zu mehr und schneller wachsenden Transformanten führen (Ruiz-Díez, 2002). Auch *A. cinnamomea* wuchs bei niedrigerem osmotischem Druck schneller (Wu and Chou, 2019). Tatsächlich wuchsen intakte Zellen von *T. thlaspeos* stärker auf YMPG ohne Saccharose im Vergleich zum Regenerationsmedium YMPG mit 1 M Saccharose (Plücker et al., 2021), sodass eine geringere Menge an Saccharose bezüglich Regenerationseffizienz und -zeit getestet werden sollte. Protoplasten können auch in Flüssigmedium regenerieren (Fariña

et al., 2004, Patil and Jadhav, 2015). Wenn diese noch vor der ersten Zellteilung auf Festmedium ausplattiert werden, könnte eine räumliche Trennung der Transformanten erzielt und durch den Verzicht auf den osmotischen Stabilisator möglicherweise das Wachstum beschleunigt werden. Für den filamentösen Pilz *Nectria haematococca* wurde dieses Prinzip wahrscheinlich angewendet, denn die Protoplasten wurden nach etwa 20 h in flüssigem auf festes Regenerationsmedium ausgestrichen (Coleman et al., 2011). Ein ähnliches, neu entwickeltes Protokoll für *T. reesei* sieht die Regeneration und initiales Wachstum in Öltropfen in Flüssigmedium vor, bevor diese mittels Fluoreszenz-aktivierter Zell-Sortierung (*fluorescence-activated cell sorting*, FACS) gescreent und schließlich auf Festmedium inkubiert werden (Luu et al., 2022). Diese Methode beschleunigte die Bildung von Kolonien von 7-14 Tagen auf 4-8 Tage (Luu et al., 2022). Gerade für die Herstellung von Mutanten mit möglichen Wachstumsdefiziten, wie bei Dicer-Deletionsmutanten von *T. atroviride* oder *M. circinelloides* (Carreras-Villaseñor et al., 2013, Nicolas et al., 2010) oder Zuckertransporter Hxt1 von *U. maydis* (Schuler et al., 2015), wäre ein insgesamt schnelleres Wachstum hilfreich, weshalb die Konzentration des osmotischen Stabilisators in beiden Mediensichten oder die initiale Regeneration in Flüssigmedium mit anschließender Vereinzelung auf Festmedium ohne osmotischen Stabilisator getestet werden sollte.

3.1.3. Optimierungen zur Steigerung der Transformationseffizienz

Für erfolgreiche Transformationen wurden umgerechnet pro $1 \cdot 10^6$ Protoplasten für *U. maydis* 0,1-0,5 µg DNA, für *F. oxysporum* 0,4-1 µg DNA und für *T. thlaspeos* ca. 0,6 µg DNA verwendet und resultierten in 200, 15-46 bzw. 23 Transformanten (Schulz et al., 1990, Kistler and Benny, 1988) (Kollaboration mit Lesley Plücker). Trotz ähnlicher DNA-Mengen im Vergleich zur Protoplastenanzahl ist die Transformation von *T. thlaspeos* damit weniger effizient.

In dieser Doktorarbeit wurde die eingesetzte Menge an Pilzmaterial meist konstant gehalten, weil oft die Protoplastenausbeute bestimmt werden sollte. Andere Experimentatoren verwendeten für erfolgreiche Transformationen zum Teil nur die Hälfte an Pilzmaterial, wodurch weniger Protoplasten pro Transformationsreaktion zur Verfügung standen (Kollaboration mit Lesley Plücker) (Masterarbeiten (Plücker, 2017, Geißl, 2020)). Man geht davon aus, dass das Verhältnis von eingesetzter DNA-Menge zur Anzahl an Protoplasten maßgeblichen Einfluss auf den Transformationserfolg hat (Kawai et al., 2010, Kistler and Benny, 1988). Daher könnte kurzfristig entweder die Menge an Pilzmaterial für die Protoplastierung verringert oder die Menge an DNA für die Transformation von *T. thlaspeos* erhöht werden. Darüber hinaus könnten zur Maximierung der Effizienz weitere Parameter in Betracht gezogen werden. Ob das veränderte Verhältnis von Pilzmaterial und Enzymen einen Einfluss auf die Protoplastenqualität hat, könnte man zum Beispiel mittels Calcofluor-White-

Färbung von Zellwandmaterial nachweisen (Selitrennikoff and Bloomfield, 1984) und ggf. länger protoplastieren. Darüber hinaus sollten kurzfristig die im vorigen Kapitel diskutierte Regeneration und längerfristig die im Folgenden diskutierten Parameter zum Einbringen der DNA in die Protoplasten und deren Integration ins Genom optimiert werden.

3.1.3.1. Einbringen der DNA in die Protoplasten

Bei der gewählten Transformationsmethode wird die Aufnahme der DNA in die Protoplasten durch Calciumchlorid und PEG vermittelt (Li et al., 2017a). Die Calciumchlorid-Konzentration liegt bei anderen Protokollen bei 10-300 mM (Kawai et al., 2010, Lou et al., 2018, Liang et al., 2014, Brachmann et al., 2004, Rabe et al., 2016, Honda et al., 2019). Auch die Art und Menge des PEGs variiert und sollte deshalb individuell getestet werden (Rabe et al., 2016, Yu et al., 2015, Lou et al., 2018, Brachmann et al., 2004, Liang et al., 2014, Kawai et al., 2010). So konnte eine etwa fünffach erhöhte Anzahl an Transformanten in *Candida glycerinogenes* erzielt werden (Zhang et al., 2016a). Darüber hinaus können unterschiedlich lange Inkubationszeiten und -temperaturen hilfreich sein, um die DNA an und durch die Membran zu geleiten und so den Transformationserfolg positiv zu beeinflussen (Li et al., 2017a, Zhang et al., 2016a). So konnte die Zahl der Transformanten in *C. glycerinogenes* um das bis zu 24-fache erhöht werden (Zhang et al., 2016a).

Um die Membranpermeabilität für Ribonukleoproteinkomplexe für die CRISPR/Cas-Methode (*clustered regularly interspaced palindromic repeat/CRISPR associated protein*) zu erhöhen, wurde Triton X-100 eingesetzt (Liu et al., 2022). Allerdings wurde die Regenerationsfähigkeit der Protoplasten reduziert (Liu et al., 2022), sodass eine Adaption für *T. thlaspeos* erst nach deren Optimierung erwogen werden kann.

Ein weiterer Faktor ist die Stabilität der transformierten DNA. Heparin ist ein negativ geladenes Polysaccharid, das an Enzyme wie Ribonukleasen und Polymerasen binden und deren Aktivität beeinflussen kann (Bauchwitz, 1991). Daher könnte es während der Transformation um DNA-bindende Faktoren konkurrieren (Bauchwitz, 1991). Die Transformation von *E. coli* und *U. maydis* konnte durch Heparin wesentlich verbessert werden (Bauchwitz, 1991).

Die Aufnahme der DNA in die Zelle ist ein Aspekt, der in dieser Arbeit aus Zeitgründen noch nicht optimiert wurde. Da die Optimierung bei den genannten Beispielen zu guten Ergebnissen geführt hat, sollte dies auch für *T. thlaspeos* getestet werden.

Alternativ kann DNA auch durch *Agrobacterium*-vermittelte Transformation oder durch Elektroporation in Protoplasten eingebracht werden (Li et al., 2017a, Rivera et al., 2014). Für *T. reesei* funktionieren beispielsweise sowohl die *Agrobacterium*-vermittelte als auch die PEG-vermittelte Transformation und für *N. crassa* wurde neben der PEG-vermittelten Transformation auch die Elektroporation etabliert (Li et al., 2017a).

3.1.3.2. Integration der DNA in das Genom

Für spätere Infektionsexperimente wäre eine Integration der transformierten DNA in das Genom von *T. thlaspeos* wünschenswert. Nach der Transformation von *T. thlaspeos* wuchsen 23 Kolonien auf Regenerationsmedium an und von den 20 auf neuem Selektionsmedium überstrichenen wuchs eine erneut an (Masterarbeit (Plücker, 2017)). Dies spricht für eine transiente Expression der Resistenzkassette während der Kultivierung auf Regenerationsmedium. In *Cochliobolus heterostrophus* wurde durch einen β -Glucuronidase-Test gezeigt, dass die DNA durch die Transformation zwar effizient aufgenommen, aber in 99 % der Fälle lediglich transient exprimiert und nicht ins Genom integriert wurde (Mönke and Schäfer, 1993). Instabile Expression wurde auch in verschiedenen anderen Pilzen beobachtet (Honda et al., 2019). Da die Transkription in Eukaryoten für gewöhnlich im Zellkern stattfindet, wurde die transformierte DNA wahrscheinlich dorthin transportiert (Honda et al., 2019). Ob sie danach vorübergehend als extrachromosomale DNA transkribiert oder in das Genom integriert und anschließend beispielsweise ausgeschnitten wurde, bleibt offen (Honda et al., 2019). Die Integration der DNA ins Genom kann auf verschiedene Weise erfolgen und unterstützt werden. Die Enden von Doppelstrangbrüchen können durch die zelleigenen Reparaturmechanismen homologe Rekombination oder NHEJ repariert werden (Singh et al., 2022). NHEJ ist in vielen Organismen der vorherrschende Mechanismus und wird während des gesamten Zellzyklus verwendet, während homologe Rekombination insgesamt seltener und in der S- und G2-Zellzyklusphase verwendet wird (Arras and Fraser, 2016, Cairns et al., 2016, Colot et al., 2006, Singh et al., 2022). Bei NHEJ können bei der Fusion beider Stränge Punktmutationen entstehen oder transformierte DNA-Stränge können integriert werden (Jung et al., 2021, Song et al., 2019, Tomico-Cuenca et al., 2021). Bei der homologen Rekombination wird ein DNA-Strang mit komplementären flankierenden Sequenzen zur Zielsequenz verwendet, sodass es zu akkuraten Deletionen oder Austausch kommen kann (Tomico-Cuenca et al., 2021). Dieser Mechanismus sollte für die Generation von Pheromonrezeptor- und Dicer-Deletionsmutanten genutzt werden. Die dafür verwendete Resistenzkassette erwies sich als funktionsfähig. Es wurden 1000 bp lange und vollständig zu den Zielloci homologe Flanken verwendet, weil in verschiedenen Pilzen längere Flanken zu besseren Raten homologer Rekombination führten (Terfrüchte et al., 2014, Meyer, 2008). Mit der derzeitigen Transformationsrate für zufällige Insertion ist nicht zwingend mit Transformanten für die seltener auftretende homologe Rekombination (Singh et al., 2022) zu rechnen. Für eine effektivere Integration der DNA in das Genom können verschiedene Methoden genutzt werden, um mehr Doppelstrangbrüche zu generieren oder die Rate der homologen Rekombination zu erhöhen (Wang, 2021). Bei der Restriktionsenzym-vermittelten Integration (*restriction enzyme-mediated integration*, REMI) wird ein Restriktionsenzym co-transformiert, sodass das linearisierte Plasmid an diesen überhängenden Enden integriert wird (Wang et al., 2017c, Kim et al., 2015). Die verwendeten

Restriktionsenzyme haben meist eine Erkennungssequenz von sechs Basenpaaren, sodass die Insertion nicht an einem gezielten Locus stattfindet (Shi et al., 1995, Kim et al., 2015). In *M. grisea* konnte die Transformationseffizienz mittels REMI um das Zehnfache erhöht werden, wohingegen sie in *U. maydis* unverändert blieb (Shi et al., 1995, Bölker et al., 1995).

Da an Doppelstrangbrüchen die Frequenz homologer Rekombination höher ist, wurden Methoden entwickelt, um diese an gezielten Loci zu induzieren (Schuster and Kahmann, 2019). Eine solche Methode ist das CRISPR/Cas-System (Schuster and Kahmann, 2019, Song et al., 2019). In filamentösen Pilzen wird oft das Cas9-Protein dazu eingesetzt, einen Doppelstrangbruch neben einer durch eine Single Guide RNA (*single guide RNA*; sgRNA) definierten Sequenz im Genom zu erzeugen (Song et al., 2019). Dabei können sowohl das Cas-Protein als auch die sgRNA entweder als präassemblierter Protein-RNA-Komplex in die Zelle geschleust oder von kodierenden Plasmiden bzw. von in das Genom integrierter DNA exprimiert werden (Schuster and Kahmann, 2019). Darüber hinaus können mit CRISPR/Cas mehrere Gene mit einer Transformation mutiert werden (Song et al., 2019). CRISPR/Cas wurde erfolgreich in vielen Pilzen etabliert, darunter *U. maydis* (Wang et al., 2017c). Die Effizienz von CRISPR/Cas ist abhängig von vielen Faktoren, unter anderem von der Menge und Länge der homologen Sequenzen sowie den Eigenschaften des empfangenden Organismus und kann bis zu 100 % betragen (Schuster and Kahmann, 2019, Song et al., 2019, Morio et al., 2020). Mit bis zu fünf unerwünscht veränderten Zielgenen pro sgRNA ist die Spezifität jedoch nicht ideal (Song et al., 2019). Darüber hinaus kann die Expression von Cas9 letal oder toxisch sein, weshalb Charakteristika solcher Stämme überprüft werden sollten (Schuster and Kahmann, 2019, Song et al., 2019).

Abhängig von der Flankenlänge konnten in *U. maydis*, in dem die homologe Rekombination vergleichsweise effizient ist, Transformationsraten von bis zu 59 % für Gendelektionen erreicht werden (Kämper, 2004, Terfrüchte et al., 2014). In verschiedenen filamentösen Pilzen konnte die Erfolgsrate durch Optimierung der Flankenlänge auf bis zu 21 % gesteigert werden (Meyer, 2008). In *N. crassa* konnte eine Inhibition des mit der homologen Rekombination konkurrierenden NHEJ durch Deletion der Proteine Ku70 oder Ku80 die Rate homologer Rekombination auf 100 % verbessern (Arras and Fraser, 2016, Ninomiya et al., 2004). In *C. neoformans* waren diese Mutanten jedoch in der Virulenz betroffen, weshalb Inhibitoren von NHEJ identifiziert wurden, die eine fünffach höhere Rate homologer Rekombination ermöglichen (Arras and Fraser, 2016). Da dies grundsätzlich vielversprechend ist, könnten zukünftig Homologe von Ku70 und Ku80 in *T. thlaspeos* identifiziert werden, um die Machbarkeit zu evaluieren.

Mit dem Gespaltener-Marker-System (*split marker*) kann das Selektionsschema für die homologe Rekombination optimiert werden (Schuster and Kahmann, 2019). Hier werden zwei lineare DNA-Fragmente transformiert, die je eine Flanke und je einen überlappenden Teil des

Resistenzmarkergens kodieren (Kim et al., 2009). Ektopische Insertionen sind weniger wahrscheinlich, da beide verkürzten Teile des Resistenzgens in den gleichen nicht-nativen genomischen Locus inseriert werden müssten, damit ein funktionelles Resistenzgen entsteht (Kim et al., 2009). Mutanten mit ektopischen Insertionen eines der Fragmente können dabei optional gegenselektiert werden (Liang et al., 2014). Bei *C. neoformans* war diese Methode effizienter als die konventionelle Transformation eines einzigen Fragments (Kim et al., 2009). Bei *T. reesei* konnte die Rate um etwa 14 % und bei *Cordyceps militaris* um etwa 11 % erhöht werden (Derntl et al., 2015, Lou et al., 2018).

Von diesen Methoden wäre die Optimierung der Flankenlängen die erste Wahl, da sie ohne Transformation mehrerer Komponenten auskommt, keine weiteren Klonierungsschritte benötigt und diese Informationen für die anderen genannten Methoden wichtig ist.

3.2. Das RNAi-System in *T. thlaspeos*

RNAi wird sowohl endogen in Pilzen und Pflanzen als auch in Form von ck-RNAi in deren Interaktionen genutzt, um den Infektionserfolg zu steuern (Huang et al., 2019). Ziel dieser Arbeit war daher, die Funktion und Verwendung des RNAi-Systems von *T. thlaspeos* zu untersuchen.

3.2.1. Bioinformatische Untersuchung der Funktionalität der RNAi-Schlüsselkomponenten

In Pilzen variiert die Anzahl der Gene für RNAi-Komponenten. Während *S. cerevisiae* und *U. maydis* keine Gene für Dicer, Ago oder RdRP besitzen, sind es bei *S. pombe* je eines und bei *Coprinopsis cinerea* drei Gene für Dicer, acht für Ago und sieben für RdRPs (Laurie et al., 2012). Die beiden Brandpilze *U. hordei* und *S. reilianum* weisen je ein Gen für Dicer und Ago und drei Gene für RdRPs auf (Laurie et al., 2012). Damit ähnelt *T. thlaspeos* mit je einem Gen für Dicer und Ago und zwei für RdRPs diesen beiden Brandpilzen. Die RNAi-Komponenten von *N. crassa* und *F. graminearum* waren zu 29-59 % identisch (Gaffar et al., 2019). Eine Aminosäureidentität der Proteine von *T. thlaspeos* zu denen von *U. hordei* und *S. reilianum* von ca. 33 % für Dicer und ca. 45 % für Ago ist daher ausreichend, um weitere Analysen zu rechtfertigen.

Während gelegentlich RNase III- und PAZ-Domänen als essentiell für Dicer gelten, gibt es auch Berichte, nach denen RNase III- und dsRNA-bindende Domäne essentiell sind oder nur zwei RNase III-Domänen benötigt werden (Choi et al., 2014, Ciechanowska et al., 2021). Die zwei RNase III-Domänen sind in allen drei untersuchten Brandpilzen vorhanden. Darüber hinaus wurden zwei unterschiedliche Helikase-Domänen, die dsRNA entwinden (Ciechanowska et al., 2021), und eine Dicer-Dimerisierungsdomäne identifiziert, die auch in Dicer von *U. hordei* und *S. reilianum* vorkommen. Dicer von *T. thlaspeos* ähnelt damit in Länge, Aufbau und Aminosäureidentität denen der anderen Brandpilze *U. hordei* und *S. reilianum*. In diesen Pilzen wurde gezeigt, dass das RNAi-System funktionsfähig ist (Laurie et al., 2008) (Dissertation (Ghareeb, 2011)). Die gleichen Domänen wurden auch in beiden Dicer-like-Proteinen von *M. oryzae* identifiziert (Zanini et al., 2021). In diesem Pilz konnte gezeigt werden, dass Dcl2 für die Bildung von 19-24 nt langen sRNAs benötigt wird und dass das RNAi-System Gene regulieren kann (Raman et al., 2017, Penn et al., 2015). Daher kann angenommen werden, dass Dicer auch in *T. thlaspeos* funktional sein kann.

Typisch für Ago ist eine Piwi- und eine PAZ-Domäne (Dutta et al., 2019, Zanini et al., 2021). Des Weiteren werden oft eine Mid-, eine N- und zwei Linker-Domänen identifiziert (Claycomb, 2014). Die N-terminale Domäne wird für das Laden und Entwinden von dsRNA benötigt (Daugaard and Hansen, 2017). Das 5'-Ende der sRNA wird in der Mid-Domäne positioniert, die auch das präferierte 5'-Nukleotid der sRNA definiert (Claycomb, 2014). Hier könnten

zukünftig nähere Analysen durchgeführt werden, um die in Kapitel 3.2.5 „Potentielle endogene Funktionen der sRNAs von *T. thlaspeos*“ diskutierten Zieltranskript-Vorhersagen weitergehend bewerten zu können. Das 3'-Ende der sRNA wird in der PAZ-Domäne platziert (Claycomb, 2014). Die Piwi-Domäne vermittelt die endonukleolytische Aktivität (Daugaard and Hansen, 2017). In allen drei Ago-Proteinen von *M. oryzae* und in Ago von *U. hordei* wurden N-terminale-, Linker1-, PAZ-, Linker2- und Piwi-Domänen identifiziert (Zanini et al., 2021). In Ago von *T. thlaspeos* und *S. reilianum* wurde darüber hinaus zusätzlich die Mid-Domäne vorhergesagt. Die RNAi-Systeme aus *M. oryzae*, *U. hordei* und *S. reilianum* sind funktionsfähig (Penn et al., 2015, Laurie et al., 2008) (Dissertation (Ghareeb, 2011)). Da Ago von *T. thlaspeos* diesen ähnelt, könnte es ebenfalls funktional sein.

RdRPs besitzen üblicherweise eine RdRP-Domäne (Silvestri et al., 2020, Carreras-Villaseñor et al., 2013). Die beiden in *T. thlaspeos* identifizierten RdRPs ähneln in Länge und Domänen nicht nur den RdRPs von *U. hordei* und *S. reilianum*, sondern auch Rdr1 von *T. atroviride* (Carreras-Villaseñor et al., 2013). RdRP2 von *M. oryzae* besitzt ebenfalls eine RdRP-Domäne und spielt eine Rolle in der sRNA-Biogenese (Raman et al., 2017, Silvestri et al., 2020). In *Aspergillus nidulans* hingegen konnte keiner der beiden RdRPs eine Rolle in der dsRNA-abhängigen Genregulation nachgewiesen werden (Chang et al., 2012). Daher scheint eine Funktion dieser beiden Gene nicht einfach aus den vorhandenen Domänen ableitbar zu sein und wird zukünftig experimentell nachgewiesen werden müssen.

Insgesamt wurden für *T. thlaspeos* ein Gen für Dicer-, eines für Ago- und zwei für RdRPs vorhergesagt, welche aufgrund ihrer Ähnlichkeit in Proteinsequenz und -domänen zu denen anderer Spezies funktionell sein könnten.

3.2.2. Experimentelle Untersuchung der Funktionalität der RNAi-Schlüsselkomponenten

Nach der bioinformatischen Identifizierung von RNAi-Komponenten mit Ähnlichkeit zu funktionellen RNAi-Systemen in *T. thlaspeos* sollte gezeigt werden, dass das RNAi-System auch in *T. thlaspeos* funktioniert.

Dazu wurde zunächst die Strategie der Gendeletionen gewählt (Kapitel 2.1.6 Transformation). In einem Dicer-Deletionsstamm sollten keine Dicer-abhängigen sRNAs hergestellt werden. Damit würde sich dieser Stamm als Negativkontrolle für sRNA-Sequenzierungsexperimente ideal eignen, da so Dicer-abhängige sRNAs identifiziert und davon regulierte Prozesse abgeleitet werden könnten. Ein weiterer Hinweis auf die Funktionalität von RNAi kann ein Phänotyp von Gendeletionsmutanten sein. So führte die Deletion von *dcr2* und *rdr3* in *T. atroviride* zu einer deutlich reduzierten Konidienproduktion (Carreras-Villaseñor et al., 2013). Darüber hinaus zeigte die *dcr2*-Mutante vermindertes Wachstum (Carreras-Villaseñor et al., 2013). Eine Dicer-Doppelmutante in *Penicillium marneffe* wies Sporulations- und

Pigmentierungsdefekte auf (Lau et al., 2013). Die *dcl2*-Mutante in *M. circinelloides* zeigte eine reduzierte Bildung asexueller Sporen, und die *dcl1*-Mutante Defizite im vegetativen Wachstum und in der hyphalen Morphologie (Nicolas et al., 2010). In *F. graminearum* zeigten alle getesteten Mutanten von RNAi-Komponenten in bestimmten Medien reduziertes Wachstum und die meisten davon produzierten weniger Konidien (Gaffar et al., 2019). In *M. oryzae* hingegen zeigten alle Mutanten reduzierte Konidienbildung und nur wenige einen Wachstumsphänotyp (Raman et al., 2017). Sollte bei der Deletion der identifizierten RNAi-Schlüsselkomponenten in *T. thlaspeos* ein Phänotyp auftreten, wäre dies ein Hinweis auf die Funktionalität des RNAi-Systems. Allerdings konnte in der Dicer-Deletionsmutante aus *S. reilianum* auf Voll- oder Mangelmedium, unter UV-, Temperatur-, Zellwand- oder osmotischem Stress kein Phänotyp identifiziert werden, obwohl das RNAi-System funktioniert (Dissertation (Ghareeb, 2011)). Das Fehlen eines Phänotyps würde dementsprechend nicht auf ein dysfunktionales RNAi-System hindeuten.

Darüber hinaus wäre eine Dicer-Deletionsmutante in Infektionsexperimenten zum Nachweis der Funktion von Dicer-abhängigen sRNAs hilfreich. Um diese herstellen zu können, muss *T. thlaspeos* transformierbar sein und homologe Rekombination im gewünschten Locus stattfinden. Die Transformation wurde in dieser Arbeit etabliert. Jedoch war die Transformationseffizienz gering, sodass mit keinem der fünf Konstrukte Deletionsstämme hergestellt werden konnten. In Versuchen, die nach dem experimentellen Teil dieser Doktorarbeit durchgeführt wurden, konnte das Paarungsgen *pra1* im Stamm LF1 deletiert werden (Plücker et al., 2021). In zukünftigen Gendelektionsversuchen sollte beachtet werden, dass Dicer-Deletionsmutanten unter anderem Wachstumsphänotypen aufweisen oder essentiell sein können (Carreras-Villaseñor et al., 2013, Nicolas et al., 2010, Chapman et al., 2022). In diesen Fällen wären ein insgesamt verkürzter Regenerationszeitraum und im Falle der Letalität einer Dicer-Deletion induzierbare oder reprimierbare Promotoren wünschenswert. Als zweite Strategie, um die Funktionalität des RNAi-Systems zu demonstrieren, wurde ein Knockdown bestimmter Zielgene angestrebt. Ohne endogene Zieltranskripte zu kennen, eignen sich mRNAs von heterolog exprimierten Fluoreszenzproteinen oder von Genen, von denen bekannt ist, dass sie gut sichtbare Phänotypen aufweisen, wie Paarungsgene, Gene, die an der Pigmentbildung beteiligt sind, oder solche, die die Fungizid-Resistenz beeinflussen (Chen et al., 2015, Laurie et al., 2008) (Dissertation (Ghareeb, 2011)). Aufgrund des relativ langsamen Wachstumsverhaltens und aufgrund des übersichtlichen Forschungsstandes zu *T. thlaspeos* erschien ein Knockdown eines Fluoreszenzgen-Transkripts die beste Strategie. Dementsprechend sollte im Stamm LF1-hpt-gfp das *hpt-gfp*-Transkript durch sRNAs herunterreguliert werden, die aus einem *gfp*-sRNA-Vorläufer von Dicer generiert werden sollten. Ein erfolgreicher Knockdown wäre dann an einer reduzierten Gfp-Fluoreszenz, Hygromycin B-Resistenz und Transkript-Abundanz deutlich geworden. Da LF1_hpt-gfp bereits

resistent gegenüber Hygromycin B war, wurde ein weiterer Selektionsmarker für die Transformation benötigt. Die MIC von Nourseothricin wurde ermittelt und ein Konstrukt mit einem für *U. maydis* Codon-optimiertem Resistenzgen getestet (Kapitel 2.1.5.2 Nourseothricin). Da das Codon-optimierte *nat1Um* keine Nourseothricin-Resistenz in *U. maydis* vermittelte und auch keine Transformanten in *T. thlaspeos* ergab, könnte das Protein dysfunktional oder die Expression zu schwach sein. Dementsprechend konnten die oben beschriebenen weiteren Schritte im Rahmen dieser Doktorarbeit nicht durchgeführt werden. Zukünftig könnte man die Codon-Nutzung von *nat1* überarbeiten.

Als dritte Strategie zum Nachweis der Funktionalität wurde die Behandlung mit extrazellulären sRNAs oder dsRNAs gewählt. Diese RNAs werden zum Beispiel durch Clathrin-vermittelte Endocytose in die Zelle aufgenommen, ggf. von Dicer zu sRNAs prozessiert und dienen der Genregulation (Wang et al., 2016, Wytinck et al., 2020). Erfolgreich demonstriert wurde dies bereits in *B. cinerea*, *F. graminearum* und *F. oxysporum*, in denen die Genexpression um etwa 80-90 % reduziert werden konnte (Wang et al., 2016, Koch et al., 2016, Ouyang et al., 2023). Auch *Sclerotinia sclerotiorum*, *Rhizoctonia solani*, *A. niger* und *V. dahliae* sind in der Lage, extrazelluläre RNA aufzunehmen (Qiao et al., 2021). In manchen Pathogenen wie *Zymoseptoria tritici*, *Phytophthora infestans* oder *Colletotrichum gloeosporioides* wurde allerdings nur begrenzt oder gar keine extrazelluläre RNA aufgenommen (Kettles et al., 2019, Qiao et al., 2021). In *T. thlaspeos* sollte die Funktionalität des RNAi-Systems durch Regulation der RNA eines Gfp-Fluoreszenzproteins nachgewiesen werden. Eine reduzierte Fluoreszenzintensität aufgrund geringerer Proteinmenge oder einer reduzierten mRNA-Menge könnte dabei durch punktuelle Messungen erfolgen. Kontinuierliche Messungen, wie beispielsweise im Mikrobioreaktor durchführbar, bieten den Vorteil einer besseren zeitlichen Auflösung bei kleinem Kulturvolumen und damit einer geringen benötigten Menge an extern applizierten RNAs. Es konnte gezeigt werden, dass *T. thlaspeos* im Mikrobioreaktor kultiviert und die Fluoreszenz von Gfp- und mCherry-Fusionsproteinen detektiert werden konnte, aber dennoch Optimierungsbedarf bestand, der die Etablierungsphase verlängert und daher die Messungen mit extrazellulärer RNA im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr ermöglicht haben (Kapitel 2.1.1 Kultivierung). Grundsätzlich könnte auch die Wahl des Zieltranskriptes überdacht werden, da für den Nachweis der Funktionalität eine Einzelzeitpunkt-Analyse ausreicht. Denkbar wäre ein Knockdown der Succinat-Dehydrogenase, welche in *Colletotrichum abscissum* zu einem morphologischen Phänotyp führte (Goulin et al., 2022). Auch für *Austropuccinia psidii* und *Coleosporium plumeriae* wurden extern dsRNA gegen Tubulin, Translationelongationsfaktor 1- α oder ribosomale 28S-RNA appliziert und die Wirkung auf unter anderem Keimung und Keimschläuche quantitativ oder mikroskopisch analysiert (Degnan et al., 2022).

Eine weitere Möglichkeit, die Funktionalität der RNAi-Komponenten zu demonstrieren, wäre deren heterologe Expression beispielsweise in *S. cerevisiae* (Drinneberg et al., 2009) oder eventuell die Nutzung von Inhibitoren (Ciechanowska et al., 2021). Die drei oben genannten Methoden wären aber vorzuziehen, da ihre Etablierung langfristig strategische Vorteile für die Forschung an und mit *T. thlaspeos* bietet.

Da sRNAs nicht unbedingt von Dicer produziert werden müssen, um eine Funktion in RNAi zu erfüllen (Nicolás and Garre, 2016), die Profile der Wildtyp-sRNAs mit denen anderer Pilze verglichen werden können und um die Arbeitsabläufe laborintern zu etablieren, wurden die sRNAs der beiden wildtypischen Isolate analysiert. Vergleicht man die sRNA-Längenprofile von Spezies mit und ohne RNAi-Komponenten, so fällt auf, dass in der RNAi-losen *S. cerevisiae* kürzere Sequenzen mit ca. 17-18 nt deutlich abundanter sind als in RNAi-kompetenten Spezies, welche überwiegend ca. 21-23 nt lange sRNAs produzieren (Drinneberg et al., 2009). Diesbezüglich ähnelt das Längenprofil von *T. thlaspeos* eher dem der RNAi-kompetenten Spezies, was tendenziell für die Funktionalität spricht.

Bis jetzt konnte die Funktionalität des RNAi-Systems noch nicht experimentell bestätigt werden. Mit zunehmender Erfahrung, beispielsweise in der Codon-Nutzung und mit einer für Deletionen optimierten genetischen Manipulation, sollte dies jedoch in der Zukunft möglich sein. Insbesondere die Applikation extrazellulärer RNAs sollte den Nachweis zeitnah erlauben.

3.2.3. sRNAs kartieren in *T. thlaspeos* überwiegend auf rDNA-Loci

Die Sequenzierung des sRNA-Inventars ergab umfangreiche Reads für jedes Replikat. Diese konnten durch Kartierung möglichen Entstehungsorten zugeordnet werden. Etwa 90 % der Reads kartierten auf rDNA, während dieser Anteil in anderen Pilzen wie *S. sclerotiorum* oder *T. atroviride* 24-79 % ausmacht (Zhou et al., 2012, Carreras-Villaseñor et al., 2013). Da es mehrere rRNA-Gene im Genom gibt und deren Sequenz meist konserviert ist (Li et al., 2017b), ist anzunehmen, dass diese Sequenzen sehr abundant sind. Auf rDNA kartierende Reads wurden lange aus RNA-Sequenzierungsdaten ausgeschlossen und werden erst seit relativ kurzer Zeit analysiert (Lambert et al., 2019). Es gibt aber schon einige Hinweise, dass solche sRNAs Funktionen haben können. In *N. crassa* können qiRNAs, wie in der Einleitung (Kapitel 1.5.1 „Das Funktionsprinzip von RNAi“) näher erläutert, genutzt werden, um die Anzahl der rDNA-Kopien aufrechtzuerhalten (Gutbrod and Martienssen, 2020). Darüber hinaus stammen miRNAs zwar überwiegend von miRNA-Genen, können aber auch nicht-kanonisch unter anderem von rRNAs, tRNAs und sn- und snoRNAs (*small nuclear/nucleolar RNA*; kleine nukleäre/nukleoläre RNA) durch nicht gänzlich aufgeklärte Mechanismen generiert werden (McCool et al., 2020). Beispielsweise gibt es in *Drosophila*-Spezies miRNA-Gene, die im ITS1 von rDNA kodiert sind, in AGO1 geladen werden und die Expression von Reporterkonstrukten regulieren können (Chak et al., 2015). Beim Basidiomyceten *C. cinerea* wurden fünf miRNAs

in rRNAs vorhergesagt (Lau et al., 2018). Die näher untersuchte hiervon stammt von einem 28S rDNA-Locus, wird im Primordium stärker exprimiert als im Mycel und hat 15 vorhergesagte und differentiell exprimierte Zieltranskripte, darunter ein Paarungspheromon und Cytochrom P450 (Lau et al., 2018). Außerdem wurde ein Homolog im Basidiomyceten *Laccaria bicolor* identifiziert (Lau et al., 2018). Darüber hinaus wurden in *N. crassa* 49 % der mit dem Ago-Homolog QDE-2 assoziierten sRNAs rDNA zugeordnet (Lee et al., 2010). Auch in *V. dahliae* werden sRNAs von rRNAs gebildet und zum Teil scheinbar selektiv in die Pflanze transportiert oder in das pflanzliche Ago geladen (Zhang et al., 2022a). Zudem wurden in Gerste während der Infektion mit *Blumeria hordei* vermehrt auf 28S-rDNA kartierende sRNAs identifiziert (Kusch et al., 2023). In *M. oryzae* wurde eine Anreicherung rDNA-kartierender sRNAs in endogenen Agos beobachtet (Nguyen et al., 2018). Während qiRNAs sowohl von transkribierten als auch von nicht-transkribierten Regionen der rDNA in ähnlichen Mengen in sense- und antisense-Orientierung hergestellt wurden, wurden diese srRNAs (*small rDNA-derived RNAs*; kleine von rDNA stammende RNAs) in sense-Orientierung von 5'- und 3'-Enden reifer rRNAs und deren internen Sequenzen hergestellt, die möglicherweise Haarnadelstrukturen bilden (Nguyen et al., 2018). Anders als qiRNAs, welche eine Rolle in der DSB-Reparatur haben, deuten erste Analysen der srRNAs auf eine Rolle im Zellzyklus oder Glukose-Metabolismus, aber nicht bei der rRNA-Produktion hin (Nguyen et al., 2018). In anderen Spezies werden auf rDNA-kartierende Reads also bereits mit RNAi assoziiert. Da in *T. thlaspeos* verhältnismäßig viele davon identifiziert wurden, sollten in einem Folgeprojekt näher analysiert werden.

Eine Studie fand darüber hinaus einen Zusammenhang zwischen RNAi-Schlüsselkomponenten und Ribosomen. In *Aspergillus fumigatus* wurden in Konidien von Dicer- und RdRP-Deletionsmutanten im Vergleich zum Wildtyp weniger mRNAs detektiert, die in der Ribosomen-Biosynthese involviert sind (Kelani et al., 2023). Leider wurde die durchgeführte sRNA-Sequenzierung noch nicht im Hinblick auf rDNA-kartierende Reads analysiert. Eine andere Studie, in der 20-70 nt lange RNAs aus Mycel untersucht wurden, lässt aber vermuten, dass etwa 59 % der Reads auf rDNA kartieren könnten (Jöchl et al., 2009). Es wäre also interessant zu erforschen, ob die rDNA-kartierenden Reads mittels RNAi in die Regulation der Ribosomen-Biogenese involviert sind, und ob es hier Parallelen zu *T. thlaspeos* gibt. Interaktionen zwischen den RNAi-Komponenten und (prä-)rRNA, mRNA und ggf. sRNA könnten durch Dicer- oder Ago-Coimmunpräzipitationen mit anschließender RNA-Sequenzierung nachgewiesen werden. Inwieweit die prä-rRNA prozessiert wurde, lässt sich in Deletionsmutanten und dem Wildtyp mittels Northern Blot ermitteln. Mit diesen Methoden konnte die Beteiligung von Utp10 und Kap123 an der rRNA-Prozessierung gezeigt werden (Faktorová et al., 2018, Dez et al., 2007, Sydorsky et al., 2003). Interessanterweise wurden in dieser Doktorarbeit die mRNAs von Utp10 und Kap123 als Zieltranskripte für RNAi in

T. thlaspeos vorhergesagt. In *S. cerevisiae* ist Utp10 als Komponente des SSU (*small-subunit*)-Prozessoms am Schneiden der prä-rRNA beteiligt und dessen Depletion führt zu einem deutlichen Wachstumsphänotyp (Dez et al., 2007). In *S. cerevisiae* transportiert das Karyopherin Kap123 ribosomale Proteine in den Nukleus und trug zu einer geringfügig reduzierten 40S-Biogenese bei (Ptak et al., 2009, Sydorskyy et al., 2003). Hier beeinträchtigte eine Deletion das Zellwachstum nicht sehr deutlich (Sydorskyy et al., 2003). Die potentielle Regulation der rRNA-Prozessierung durch RNAi könnte zu vermehrtem, möglicherweise Zellzyklus-reguliertem (siehe Diskussion von Utp10 und Kap123 in den Kapiteln 3.2.5.1 „Zieltranskripte ohne bekannte Regulation durch RNAi in anderen Organismen“ und 3.2.5.2 „Zieltranskripte mit Ähnlichkeit zu RNAi-regulierten Prozessen in anderen Organismen“), Abbau von rRNA führen, wodurch möglicherweise mehr sRNAs aus rRNAs entstehen. Das könnte zu der hohen Rate an rDNA-kartierenden Reads beigetragen haben.

Die genannten Beispiele zeigen, dass andere Pilze ebenfalls auf rDNA kartierende sRNAs bilden und diese möglicherweise verschiedene Prozesse regulieren könnten. Daher sollten diese sehr abundanten Reads in *T. thlaspeos* zukünftig näher untersucht werden.

3.2.4. Herstellung von sRNAs in *T. thlaspeos*

3.2.4.1. Potentielle siRNAs und miRNAs

Die Analyse der Entstehungsregionen von sRNAs in Pilzen kann auf unterschiedliche Weise durchgeführt werden. Den hier verglichenen ist gemeinsam, dass die Sequenzen aus dem Wildtyp stammen und nicht auf Dicer-abhängige sRNAs gefiltert wurden (Carreras-Villaseñor et al., 2013, Lau et al., 2018, Zhou et al., 2012, Son et al., 2017, Nunes et al., 2011a). In einigen Aspekten variiert die Vorgehensweise in der Literatur. Ein wichtiger Aspekt ist die Anzahl der erlaubten Basenfehlpaarungen bei der Kartierung. Generell wird empfohlen, keine Fehlpaarungen zuzulassen, um die sRNAs eindeutig dem herstellenden Organismus zuordnen zu können, was besonders bei Infektionsdatensätzen wichtig ist (Zanini et al., 2018). Aufgrund posttranskriptioneller Modifikationen und RNA-Editierung können RNAs jedoch eventuell nicht perfekt kartieren, weshalb es sinnvoll sein kann, Fehlpaarungen zuzulassen (Nunes et al., 2011a). Ein weiterer Aspekt ist, ob pro sRNA nur ein oder mehrere kartierende Loci gelistet werden, sofern dies zutrifft. Dies kann beeinflussen, zu welchem herstellenden Locus eine sRNA zugeordnet wird. In dieser Doktorarbeit wurde hierzu die Vorgehensweise der Arbeit zu *T. atroviride* imitiert, in der sRNAs in solchen Fällen nur einer Kategorie zugeordnet wurden, und zwar zuerst den nicht-kodierenden RNAs wie rRNAs oder tRNAs, danach den Protein-kodierenden Sequenzen und schließlich den intergenischen Bereichen (Carreras-Villaseñor et al., 2013). Nach einer ersten manuellen Sichtung der Kartierung wurde zudem beschlossen, rDNA-Scaffolds und mitochondriale DNA gesondert zu betrachten.

Zusammenfassend sind die Vergleiche zum Entstehungsort der sRNAs aus verschiedener Literatur aufgrund dieser Unterschiede relativ zu sehen.

Die Analyse des Entstehungsortes von sRNAs kartierte zunächst hohe Anteile auf rDNA, weshalb weniger für andere Regionen verbleiben. Auch der Anteil an tRNA-kartierenden Reads ist mit fünf bis acht Prozent in *T. thlaspeos* höher als in anderen Pilzen wie *T. atroviride* mit unter zwei Prozent (Carreras-Villaseñor et al., 2013). So kartieren in *T. thlaspeos* 0,5 % der Reads auf prä-mRNA. Der Anteil an von Protein-kodierenden Genen stammender sRNAs kann variieren und liegt in *T. atroviride* bei etwa zwei Prozent, in *C. cinerea* bei etwa 24 %, in *F. graminearum* bei etwa 30 % und in *S. sclerotiorum* etwa 40 % (Carreras-Villaseñor et al., 2013, Lau et al., 2018, Son et al., 2017, Zhou et al., 2012). Dabei sind in *T. thlaspeos* gleich viele Reads auf Exons und Introns und deutlich weniger auf UTRs zurückzuführen. Dies steht im Gegensatz zu *S. sclerotiorum*, *F. graminearum* und *M. oryzae*, bei denen deutlich mehr sRNAs von Exons als von Introns stammen (Zhou et al., 2012, Nunes et al., 2011a, Son et al., 2017). Ein ähnlich großer Anteil wie auf prä-mRNAs kartiert auf unannotierte Regionen. Dies ist vergleichbar mit *F. graminearum*, wo 30 % der Reads auf Protein-kodierende Gene und 27 % auf unannotierte Bereiche kartieren (Son et al., 2017). In *S. sclerotiorum* und in *C. cinerea* wurden mit 40 % bzw. 24 % der Reads von CDS und 32 % bzw. 37% von unannotierten Regionen ebenfalls relativ balancierte Verhältnisse zwischen CDS und unannotierten Regionen gefunden, im Gegensatz zu *T. atroviride* wo mit 2 % CDS kartierenden Reads und 16 % von intergenischen Regionen vielfach mehr intergenische sRNAs vorkommen (Carreras-Villaseñor et al., 2013, Zhou et al., 2012, Lau et al., 2018). Die Anteile an Reads von verschiedenen Entstehungsorten kann also zwischen Spezies variieren. Der Entstehungsort der sRNAs kann Aufschluss über ihre Biogenese geben. So stammen siRNAs zum Beispiel von Protein-kodierenden Transkripten (Dang et al., 2011, Nicolás and Garre, 2016). Daher könnte es sich bei den hier identifizierten sRNAs aus Exons um siRNAs handeln. Um dies zu untersuchen, sollte überprüft werden, ob es an den potentiellen herstellenden Loci zur Transkription von invertierten Repeats oder zu konvergenter Transkription kommen kann, da so dsRNAs und daraus wiederum siRNAs entstehen können (Nicolás and Garre, 2016, Dang et al., 2011, Carthew and Sontheimer, 2009). In *M. circinelloides* gibt es beispielsweise exonische siRNAs, die Dicer-abhängig generiert werden und die Expression des Gens regulieren, von dem sie hergestellt wurden (Nicolás et al., 2015). Da die Länge der UTRs für diese Arbeit pauschal geschätzt wurde, sollten hier zusätzlich Transkriptomdaten hinzugezogen werden. Diese potentiellen siRNA-Sequenzen sollten zudem auf das Genom kartiert werden und alle möglichen Entstehungsorte betrachtet werden. Hierbei sollten siRNAs aufgrund des impräzisen Ausschneidens aus dem Vorläufer-Transkript ein eher diffuses Muster bei der Kartierung zeigen (Carthew and Sontheimer, 2009, Svoboda, 2020). Da siRNAs oft das Transkript regulieren, aus dem sie hergestellt wurden

(Carthew and Sontheimer, 2009), sollten diese Gene auf ihre Funktion hin untersucht werden. Es ist aber auch möglich, dass siRNAs andere mRNAs regulieren (Carthew and Sontheimer, 2009), weshalb sie hier mit in die Zieltranskript-Vorhersage integriert wurden. Beispielsweise haben in *B. cinerea* siRNAs von LTR-Retrotransposons eine nachgewiesene Rolle in PIGS (Weiberg et al., 2013). Analog wäre auch in *T. thlaspeos* denkbar, dass siRNAs eine Rolle in PIGS übernehmen könnten. Darüber hinaus gelten siRNAs als adaptiv, da ihre Regulation und die ihres Zieltranskriptes zusammenhängen und sie so weniger Selektionsdruck ausgesetzt sein sollten (Carthew and Sontheimer, 2009). Dies könnte die Adaption an die sich ständig evolvierende pflanzliche Immunität gewährleisten.

Da miRNAs von nicht-kodierenden, intergenischen Bereichen stammen (Zhao and Guo, 2022, Torres-Martínez and Ruiz-Vázquez, 2017), könnten die intergenisch kartierenden sRNAs miRNAs sein. Um dies zu überprüfen, sollte zunächst eine miRNA-Vorhersage durchgeführt werden. Nach Beendigung des praktischen Teils dieser Doktorarbeit wurden anhand der hier geleisteten sRNA-Sequenzierung 23 miRNAs in *T. thlaspeos* vorhergesagt (Masterarbeit (Kraege, 2021)). Von diesen vorhergesagten miRNAs waren 16 zu kurz oder nicht abundant genug, um in dieser Arbeit als Kandidaten-sRNAs behandelt zu werden. Die verbleibenden sieben vorhergesagten miRNAs hatten keine Ähnlichkeit mit den in dieser Arbeit verwendeten sRNAs. Aufgrund der unterschiedlichen Kriterien könnten diese womöglich von tRNAs stammen. Grundsätzlich könnte *T. thlaspeos* also miRNAs produzieren.

3.2.4.2. Potentielle Dicer-abhängige und Dicer-unabhängige sRNAs

Mehr Aufschluss über die Herstellung der potentiellen siRNAs und miRNAs gibt meist eine detailliertere Betrachtung der Charakteristika innerhalb der Kategorien. In *T. thlaspeos* wurde zunächst insgesamt keine klare Präferenz für bestimmte sRNA-Längen beobachtet. In einigen Pilzen gibt es eine klare Präferenz für kürzere sRNAs bis ca. 25 nt, wie beispielsweise *T. atroviride*, *C. cinerea*, *M. oryzae* oder *S. sclerotiorum* (Carreras-Villaseñor et al., 2013, Lau et al., 2018, Nunes et al., 2011a, Zhou et al., 2012). In *F. oxysporum* und *S. indica* gibt es darüber hinaus vermehrt Reads um ca. 29 nt Länge (Chen et al., 2014, Šečić et al., 2021b). In *F. graminearum* ergaben Studien eine klare Präferenz für kürzere Reads bei der Entwicklung von Ascosporen, während in einem anderen Stamm und auf einem anderen Nährmedium im Mycel überwiegend 27-28 nt lange, aber auch 22-24 nt lange sRNAs identifiziert wurden, wobei erstere ähnlich abundant in der Dicer-Mutante sind (Son et al., 2017, Chen et al., 2015) und daher möglicherweise nicht von Dicer produziert werden. Derartige Präferenzen werden bei *T. thlaspeos* sichtbar, wenn man sRNAs von ausschließlich intergenischen Regionen oder prä-mRNAs betrachtet. Während erstere vorwiegend 22-24 nt lang sind, zeigen letztere sowohl eine Akkumulation von 22-24 nt als auch von 30-32 nt langen Reads. In *S. indica* dominieren mit 26 nt und 29-30 nt ebenfalls zwei Längen von sRNA (Šečić

et al., 2021b). Auch in *T. atroviride* gibt es zwei Längen von sRNAs, intergenische mit überwiegend 24 nt und von CDS mit überwiegend 21 nt (Carreras-Villaseñor et al., 2013).

Da in intergenischen Bereichen sRNAs mit einer Länge von 22-24 nt und in prä-mRNAs sowohl 22-24 nt als auch 30-32 nt lange sRNAs akkumulieren, könnten in *T. thlaspeos* grundsätzlich zwei verschiedene Entstehungsprozesse für sRNAs vorliegen. Da Dicer typischerweise sRNAs mit einer Länge von 20-25 nt produziert (Nicolás and Garre, 2016, Svoboda, 2020), und in dieser Arbeit ein nach bioinformatischen Aspekten funktionierendes Dicer identifiziert wurde, könnten die 22-24 nt langen potentiellen miRNAs und siRNAs durch Dicer prozessiert worden sein. Die Beteiligung von Dicer könnte durch eine sRNA-Sequenzierung einer Dicer-Deletionsmutante verifiziert werden.

Da auch 30-32 nt lange, potentielle siRNAs aus prä-mRNA akkumulieren, was nicht der typischen Länge von Dicer-Produkten entspricht (Svoboda, 2020, Nicolás and Garre, 2016), könnte es in *T. thlaspeos* einen zweiten, Dicer-unabhängigen Syntheseprozess geben. In einer sRNA-Sequenzierung einer Dicer-Deletionsmutante sollten diese potentiellen siRNAs weiterhin vorhanden sein. In anderen Pilzen wurden beteiligte Komponenten identifiziert, indem Proteine mit RNase III-Funktion identifiziert und verifiziert wurden (Lee et al., 2010, Drinnenberg et al., 2009, Cánovas-Márquez et al., 2021, Lee et al., 2022). Beispielsweise können in *N. crassa* disiRNAs (*dicer-independent siRNAs*; Dicer-unabhängige siRNAs) von Loci mit überlappenden sense- und antisense-Transkripten Dicer-unabhängig generiert werden (Lee et al., 2010). An der Bildung dieser disiRNAs ist die Exonuklease ERI-1 beteiligt, die ssRNA an einem G-reichen Motiv erkennt (Dang et al., 2016). In *M. oryzae* gibt es ebenfalls Dicer-unabhängige und ERI-1-abhängige sRNAs (Lee et al., 2022). Mit derselben Strategie wurde MRPL3 als sRNA-prozessierend in *N. crassa* identifiziert (Lee et al., 2010). Außerdem kann die Funktion von Dicer in *M. circinelloides* in einem nicht-kanonischen RNAi-Weg durch ein RNase III-Enzym, R3B2, ersetzt werden (Cánovas-Márquez et al., 2021). In *S. castellii*, in dem kein Protein mit klassischen Dicer-Domänen identifiziert wurde, ersetzt das RNase III-Enzym DCR1 die Dicer-Funktion (Drinnenberg et al., 2009). Um auszuschließen, dass es sich bei den 30-32 nt langen, potentiellen siRNAs um andere Degradationsprodukte handelt, sollten die für die Synthese in Frage kommenden Gene anschließend deletiert und das Vorhandensein der sRNA mittels Northern Blot oder sRNA-Sequenzierung überprüft werden.

3.2.5. Potentielle endogene Funktionen der sRNAs von *T. thlaspeos*

Um mögliche endogene Funktionen des RNAi-Systems in *T. thlaspeos* zu identifizieren, wurde eine Zieltranskript-Vorhersage durchgeführt. Von den 97 eingesetzten sRNAs wurden 17 einem Zieltranskript zugeordnet. Insgesamt wurden 19 Zieltranskripte vorhergesagt. Im Vergleich dazu wurden in *T. reesei* für 12, in *P. marneffeii* für 14 und in *F. graminearum* für zehn vorhergesagte miRNAs Zieltranskripte prognostiziert (Kang et al., 2013, Lau et al., 2013,

Chen et al., 2015). Darüber hinaus wurden in *T. atroviride* von 754 *dcr2*-abhängig generierten sRNAs neun zugeordnete mRNAs als reguliert identifiziert (Carreras-Villaseñor et al., 2013). In anderen Pilzen wurden daher ähnlich viele sRNAs mit möglichen endogenen Funktionen identifiziert.

Die Funktionen der Proteine dieser möglichen Zieltranskripte in *T. thlaspeos* sind bei einigen unbekannt oder eher undefiniert, bei anderen finden sich Bezüge zum Zellzyklus oder transponierbaren Elementen. Für viele der Zieltranskripte ist eine Regulation durch RNAi für Homologe anderer Spezies nicht bekannt. Von einigen werden jedoch homologe Gene in anderen Organismen wie Ratten oder anderen Pilzen durch RNAi reguliert. In den folgenden Unterkapiteln werden die einzelnen Zieltranskripte diskutiert und schließlich auf ihre weitere Erforschung eingegangen.

3.2.5.1. Zieltranskripte mit bekannter Regulation durch RNAi in anderen Pilzen

In *T. thlaspeos* wurden Zieltranskripte vorhergesagt, die auch in anderen Pilzen als endogene RNAi-Ziele identifiziert wurden. Dazu zählen Cytochrom P450 (THTG_03827) und eine potentielle Transposase (THTG_04405).

Tt_sRNA_31 soll mit der Cytochrom P450-RNA interagieren. Cytochrom P450 ist an verschiedenen Reaktionen im pilzlichen Primär- und Sekundärmetabolismus und Detoxifizierungsschritten beteiligt (Lau et al., 2013). In *P. marneffe* wurde die RNA einer Benzoat-4-Monooxygenase Cytochrom P450 als Zieltranskript vorhergesagt und deren Regulation mit Hilfe eines Knockdowns des miRNA-Gens nachgewiesen (Lau et al., 2013). In *M. circinelloides* werden sRNAs Dicer-abhängig vom Cytochrom P450-Locus gebildet (Nicolas et al., 2010). Die Cytochrom P450-RNA wurde darüber hinaus als Zieltranskript in *T. reesei* und *C. cinerea* vorhergesagt (Kang et al., 2013, Lau et al., 2018). Die sRNA-Sequenzen von *T. reesei*, *P. marneffe* und *T. thlaspeos* zeigen keine Ähnlichkeit zueinander und keine von ihnen weist ein Uridin als 5'-Nukleotid auf (Lau et al., 2013, Kang et al., 2013). Obwohl die meisten sRNAs in *P. marneffe* ein Uridin als 5'-Nukleotid aufweisen, ist dies scheinbar kein zwingendes Kriterium für die Funktion (Lau et al., 2013). Darüber hinaus zeigten Analysen, dass die sRNAs in Pilzen kaum oder nur in nahen Verwandten konserviert sind (Zhou et al., 2012, Lee et al., 2010). Aufgrund der Vorhersagen für *T. thlaspeos* und mehrere andere Pilze scheint es durchaus möglich, dass die Expression von Cytochrom P450 in *T. thlaspeos* durch RNAi reguliert wird.

Ein weiteres potentielles Zieltranskript soll von Tt_sRNA_25 und Tt_sRNA_90 inhibiert werden. Dieses kodiert eine putative Transposase. Bei dieser fiel bei der Genannotation auf, dass das erste Codon nicht für Methionin kodiert, weshalb die Annotation überprüft werden sollte. Transposasen sind Bestandteil von DNA-Transposons, welche aus dem Gen für die

Transposase und invertierten terminalen Wiederholungen bestehen (Levin and Moran, 2011). Die Transposase kann transponierbare Elemente an oder in der Nähe der invertierten terminalen Wiederholungen schneiden und die DNA an anderer Stelle wieder in das Genom integrieren (Levin and Moran, 2011). Transponierbare Elemente umfassen DNA-Transposons und Retrotransposons (Levin and Moran, 2011). Letztere verwenden einen Zwischenschritt aus RNA bevor eine Integrase die revers transkribierte DNA in das Genom integriert (Levin and Moran, 2011). Beide Klassen existieren als autonome und nicht-autonome Elemente, wobei letztere die Komponenten der autonomen Elemente für ihre Transposition nutzen (Gebert and Rosenkranz, 2015). Daher sollte die Genannotation auch auf die Möglichkeit solcher nicht-autonomen Transposons untersucht werden. Die Transposition von transponierbaren Elementen kann zu Mutationen führen und die Genexpression beeinflussen (Gebert and Rosenkranz, 2015). Sie stellen zudem Loci für ektopische Rekombination dar, die zu Genduplikationen, -deletionen oder großer Reorganisation führen können (Gebert and Rosenkranz, 2015). Daher stellen sie eine Gefahr für die Genomintegrität dar und werden von verschiedenen Mechanismen wie RNAi kontrolliert (Levin and Moran, 2011, Gebert and Rosenkranz, 2015). So stammten 21 % der Dicer-abhängig sRNA-produzierenden Loci in *M. circinelloides* von transponierbaren Elementen oder Wiederholungssequenzen (Nicolas et al., 2010). In *Rhizophagus irregularis* gingen sogar 49 % der sRNA-exprimierenden Loci auf transponierbare Elemente zurück (Dallaire et al., 2021). Die Beteiligung der RNAi-Komponenten wurde in verschiedenen Pilzen nachgewiesen. Beispielsweise ist in *C. neoformans* eine RNA-abhängige RNA-Polymerase an der Regulation von Transposons und Retrotransposons beteiligt (Janbon et al., 2010). In *N. crassa* wird ein Retrotransposon Dicer- und Argonaute-abhängig reprimiert (Nolan et al., 2005). Darüber hinaus wurden in *P. marneffei* transponierbare Elemente als Ziel von miRNAs vorhergesagt (Lau et al., 2013). In *Puccinia striiformis* wird wahrscheinlich ein Transposase-Transkript anhand einer entsprechenden sRNA geschnitten (Mueth and Hulbert, 2022). Zudem werden in *S. japonicus* transponierbare Elemente unter anderem durch posttranskriptionelle Genregulierung via RNAi unterdrückt (Chapman et al., 2022). In *T. thlaspeos* wurden verschiedene transponierbare Elemente vorhergesagt (Courville et al., 2019). Da diese transponierbaren Elemente jedoch nicht alle als Protein-kodierende Gene gelistet werden, wurden sie nicht automatisch in die Charakterisierung der sRNAs und in die Zieltranskript-Vorhersage integriert. Zukünftig könnten repetitive Sequenzen und transponierbare Elemente als Quelle und Ziele von sRNAs in *T. thlaspeos* analysiert werden. So könnten eventuell weitere potentielle Ziele von RNAi gegen transponierbare Elemente in *T. thlaspeos* identifiziert werden. Da in vielen anderen Organismen transponierbare Elemente durch RNAi reguliert werden (Chapman et al., 2022), könnte dies auch in *T. thlaspeos* der Fall sein.

3.2.5.2. Zieltranskripte mit bekannter Regulation durch RNAi in anderen Organismen

Insgesamt konnten für zwei der vorhergesagten Zieltranskripte Homologe in anderen, nicht pilzlichen Organismen gefunden werden. Dies waren IME4 (THTG_01185) und eine Adenylatcyclase (THTG_03864).

IME4, in Säugetieren METTL3 genannt, modifiziert RNAs mit N⁶-methyladenosin (m⁶A) (Hongay et al., 2006, Yadav and Rajasekharan, 2018). Dessen RNA soll in *T. thlaspeos* durch Tt_sRNA_25 und Tt_sRNA_90 reguliert werden. In *S. cerevisiae* wird sie für den Eintritt diploider Zellen in die Meiose benötigt, während ihre Expression in Reis zum Verbleib im mitotischen Zyklus führt (Hongay et al., 2006, Zhou et al., 2021). In Eukaryoten ist m⁶A die häufigste RNA-Modifikation und beeinflusst deren Stabilität, Translation, alternatives Spleißen und Transport (Zhao et al., 2021b). Zudem ist METTL3 an der Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen durch homologe Rekombination beteiligt (Zhang et al., 2020). In der RNAi-losen Hefe und in Reis wird die IME4-Expression durch transkriptionelle Interferenz reguliert (Laurie et al., 2008, Hongay et al., 2006, Zhou et al., 2021). Ob transkriptionelle Interferenz am *ime4*-Locus in *T. thlaspeos* stattfindet, ist derzeit unklar. Falls sowohl sense- als auch antisense-Transkripte gebildet werden, könnten diese hybridisieren und von den RNAi-Komponenten zu natürlichen antisense Transkript-entstammenden siRNAs (nat-siRNAs) prozessiert werden (Nicolás and Garre, 2016). Die Ergebnisse dieser Arbeit legen eine Regulation mittels RNAi nahe. In humanen Zellen wird die RNA von METTL3 ebenfalls durch miRNAs reguliert (Zhao et al., 2021b). Hier führte ein Knockdown zu deutlich verringerter Zellproliferation (Cui et al., 2020b). Neben den in Kapitel 3.2.5.5 „Verifikation der sRNA-Funktion im Pilz“ diskutierten allgemeinen molekularbiologischen Methoden zum Nachweis der Regulation durch RNAi, kann die m⁶A-Modifizierung der RNA durch Antikörper quantifiziert werden (Zhong et al., 2020). Außerdem könnten modifizierte RNAs co-immunpräzipitiert und anschließend sequenziert werden (Zhong et al., 2020), um beeinflusste Prozesse zu identifizieren. Zusammenfassend könnte *T. thlaspeos* also mittels RNAi die Modifikation von RNAs beeinflussen, welches z. B. den Eintritt in die Meiose verhindern könnte. Da die sRNAs aus haploiden Zellen isoliert wurden, erscheint dies biologisch sinnvoll.

Für Tt_sRNA_71 wurde das Transkript einer Adenylatcyclase als Ziel vorhergesagt. Adenylatcyclasen generieren cyclisches Adenosinmonophosphat (cAMP), welches an diversen Prozesse beteiligt ist (Zou et al., 2010). In *S. cerevisiae* wird die Adenylatcyclase für das Durchschreiten des G1-Checkpoints benötigt und die Mutante verweilt länger in der G1-Phase (Aye et al., 2004). Zudem führte eine Disruption des Gens für die Adenylatcyclase, *cyr1*, in *S. cerevisiae* zu verringerter Transposition des Retrovirus-ähnlichen Elements Ty3 (Aye et al., 2004). Adenylatcyclasen sind darüber hinaus Bestandteil von Signalwegen zur Paarung in *S. pombe*, *C. neoformans* und *U. maydis* (D'Souza and Heitman, 2001). Die Adenylatcyclase-

Mutante in *B. cinerea* zeigte vermindertes Wachstum des Mycels, Sporulation und Virulenz (Schumacher et al., 2008). Bei *Candida auris* wies eine *cyr1*-Mutante verlangsamtes Wachstum, eine reduzierte Thermotoleranz, geringere Stressresistenz und Defekte im Hydroxyurea-induzierten hyphalen Wachstum, nicht aber in der Virulenz auf (Kim et al., 2021). Bei *U. maydis* zeigte die *uac1*-Mutante konstitutiv filamentöses Wachstum (Gold et al., 1994). In *Candida albicans* wird die Adenylatcyclase Cyr1 bei der Induktion des hyphalen Wachstums aktiviert, dabei wird dessen Produktivität gesteigert, wenn es in einem Komplex mit Cap1 und G-Aktin vorliegt (Zou et al., 2010). Zusammenfassend hat die Adenylatcyclase unter anderem Funktionen im Zellzyklus und in der Morphologie. In Ratten wird ihre Expression von einer unter Wirbeltieren konservierten miRNA reguliert (Li et al., 2021). Daher wäre es auch denkbar, dass ihre Expression in *T. thlaspeos* durch RNAi herunterreguliert wird, und so den Zellzyklus oder die Morphologie beeinflusst.

3.2.5.3. Zieltranskripte mit Ähnlichkeit zu RNAi-regulierten Prozessen in anderen Organismen

Für einige der vorhergesagten Zieltranskripte konnte eine Funktion mehr oder weniger genau zugeordnet werden. Eine Regulation ist bei ihnen nicht bekannt, jedoch werden ähnliche Prozesse von RNAi reguliert.

Tt_sRNA_62 soll ein solches putatives Zieltranskript (THTG_05317) regulieren. Es kodiert Domänen, die auf eine Funktion als Transkriptionsfaktor schließen lassen. Welche Gene dieser reguliert bleibt jedoch offen. Das vorhergesagte Zieltranskript für Tt_sRNA_63 stammt vom Gen THTG_01697 und kodiert für eine Proteinkinase, dessen Substrat aber unbekannt ist. Bei diesen potentiellen Zieltranskripten ist aufgrund der mangelnden Definition der Funktion ein Abgleich zu einer Regulation mittels RNAi in anderen Organismen schwierig. Grundsätzlich wurden beide Funktionen aber als Zieltranskripte in anderen Organismen gefunden, z.B. Transkriptionsfaktoren in *T. reesei*, *P. marneffe* und *C. cinerea* (Kang et al., 2013, Lau et al., 2013, Lau et al., 2018) und Proteinkinasen in *M. circinelloides* und *P. marneffe* (Nicolas et al., 2010, Lau et al., 2013).

Ein weiteres mögliches Zieltranskript (THTG_03611) kodiert für eine Inositolpolyphosphat-Phosphatase und wird voraussichtlich von Tt_sRNA_80 gesilenced. Es gibt verschiedene Inositolpolyphosphate und dementsprechend verschiedene Inositolpolyphosphat-Phosphatasen (Mutlu and Kumar, 2019). Daher ist hier eine exakte Definition der Funktion und Regulation schwierig. Grundsätzlich sind Inositolpolyphosphate beispielsweise an der Regulation von Phosphat-Detektion, Glykolyse, Ribosomen-Biosynthese, Telomerlänge, Dynein-abhängigem Transport oder Aminosäure-Signalwegen beteiligt (Mutlu and Kumar, 2019). In *T. reesei* wurden die RNA einer Phosphatidylinositol-4-Phosphat 5-Kinase und in *P. marneffe* die RNA der Phosphatidylinositolkinase Tel1 als Zieltranskripte einer miRNA

vorhergesagt (Kang et al., 2013, Lau et al., 2013). Zudem werden sRNAs vom Locus der Multiplen Inositol-Polyphosphat Phosphatase in *M. circinelloides* produziert (Nicolas et al., 2010). In *Puccinia striiformis* wurde ein Phosphatidylinositol-3-Kinase-Transkript möglicherweise von einer endogenen sRNA geschnitten (Mueth and Hulbert, 2022). Dementsprechend könnte *T. thlaspeos* die Inositolpolyphosphat-assoziierten Prozesse wie Glykolyse oder Ribosomen-Biosynthese indirekt über die Regulation einer Inositolpolyphosphat-Phosphatase regulieren.

Zudem wurde als Ziel von Tt_sRNA_55 die RNA einer Flavin-enthaltenden Aminoxidasedehydrogenase (THTG_05570) als Zieltranskript vermutet. Aminoxidasen und -dehydrogenasen können aus primären Aminen Kohlenstoff-, Energie- oder Stickstoffquellen generieren (Hacisalihoglu et al., 1997). Da die Zellen mitten in der Wachstumsphase geerntet wurden, könnte man spekulieren, dass genügend Nährstoffe im Medium vorhanden waren, und dieses Protein daher nicht in größeren Mengen benötigt wurde. In *T. reesei* wurde eine Flavin-enthaltende Monooxygenase als Zieltranskript einer miRNA vorhergesagt (Kang et al., 2013). *T. thlaspeos* könnte also die Nutzung von Nährstoffquellen zum Teil über RNAi regulieren.

Ein weiteres potentiell Zieltranskript (THTG_03252), hier von Tt_sRNA_89, kodiert ein putatives Nukleoporin. Etwa 30 verschiedene Nukleoporine bilden die Kernporen, welche den Transport größerer Moleküle durch die Kernmembran kontrollieren (Kutay et al., 2021). Sowohl bei offener wie auch bei geschlossener Mitose wird zumindest ein Teil der Kernporen zu Beginn der Mitose abgebaut (Kutay et al., 2021). Dabei werden viele Nukleoporine phosphoryliert und am Ende der Mitose wieder reassembliert (Kutay et al., 2021). Gleichzeitig variiert die Abundanz verschiedener Nukleoporine im Verlauf des Zellzyklusses (Chakraborty et al., 2008, Vishnoi et al., 2020). Die Expression von Nukleoporin 62 wird in menschlichen Zellen von miR-27a* reguliert (Chari et al., 2020). In *C. elegans* wurden sRNAs identifiziert, die RdRP-abhängig von Nukleoporin-mRNAs generiert wurden (Maniar and Fire, 2011). Und auch in *P. marneffeii* wurde ein Nukleoporin, Nup107, als Zieltranskript einer miRNA vorhergesagt (Lau et al., 2013). Daher erscheint es möglich, dass *T. thlaspeos* diese Nukleoporin-RNA Zellzyklus-abhängig reguliert.

Aktin wird in Zellen zu komplexeren Strukturen wie Aktin-Bündeln angeordnet (Castaneda et al., 2021). Diese werden dynamisch reguliert und haben Funktionen in der Zellteilung und der strukturellen Unterstützung der Plasmamembran (Castaneda et al., 2021). Da nicht genau bekannt ist, für welche Art von Aktin-bündelndem Protein das potentielle Zieltranskript für Tt_sRNA_50, THTG_04952, kodiert, müssten detailliertere Vergleiche zur exakten Identifizierung durchgeführt werden, um anschließend die Regulierung dieses Gens besser einordnen zu können. Transkripte von mit Aktin interagierenden Proteinen wurden in anderen Pilzen als Ziel von miRNAs vorhergesagt, darunter eine Aktin kortikaler Flecken Komponente (*actin cortical patch component*) in *P. marneffeii* sowie Aktin und ein Aktin-bindendes Protein

vom Aktinin-Typ in *T. reesei* und Aktin in *C. cinerea* (Lau et al., 2013, Kang et al., 2013, Lau et al., 2018). *T. thlaspeos* könnte durch die Regulation der RNA dieses Aktin-bündelnden Proteins beispielsweise die Zellteilung beeinflussen.

Dynein ist ein Motorprotein, das sich auf Mikrotubuli retrograd in Richtung deren Minus-Pol, also dem Mikrotubuli organisierenden Zentrum, oft in der Nähe des Zellkerns, bewegt und für die Zellteilung wichtig ist (Reck-Peterson et al., 2018). Membranen, RNAs, Proteine und Viren können Dynein-abhängig transportiert werden (Reck-Peterson et al., 2018). Dyneinkomplexe bestehen aus zwei schweren Ketten, zwei intermediären-Ketten, zwei leicht-intermediären Ketten und sechs leichten Ketten (Reck-Peterson et al., 2018). In dieser Arbeit wurden sowohl die mRNAs der schweren (THTG_05648) als auch der leicht-intermediären Kette (THTG_03770) von Dynein als Ziel endogener RNAi vorhergesagt, wobei die RNAs der schweren Kette mit Tt_sRNA_3, Tt_sRNA_4 und Tt_sRNA_37 und die der leicht intermediären Kette mit Tt_sRNA_71 interagieren soll. In *S. cerevisiae* wiesen Dynein-Mutanten Defekte bei der Positionierung des mitotischen Spindelapparates auf (Gillies et al., 2022). In *A. nidulans* traten in Mutanten der schweren Dynein-Kette Defekte bei der Bewegung des Nukleus auf (Suelmann and Fischer, 2000). Bei *C. cinerea* wurde ein für Dynactin kodierende mRNA als Zieltranskript vorhergesagt (Lau et al., 2018). Dynactin ist ein Cofaktor für die aktive Bewegung von Dynein (Gillies et al., 2022). In *P. marneffei* wurde als Ziel einer miRNA eine RNA vorhergesagt, welche für ein Protein der Kinesin-Familie kodiert (Lau et al., 2013). Kinesin vermittelt den anterograden Transport entlang der Mikrotubuli (Baumann et al., 2012). Ein Cofaktor und ein anderer Mikrotubuli-Motor wurden also in anderen Pilzen bereits mit RNAi in Verbindung gebracht. *T. thlaspeos* könnte also die Dynein-Expression mittels RNAi feinabstimmen.

Des Weiteren wurde für Tt_sRNA_55 eine für Utp10 kodierende mRNA als Zieltranskript (THTG_06063) vorhergesagt. Utp10 ist Teil des SSU (*small-subunit*)-Prozessoms, welches die 35S prä-rRNA an definierten Stellen um die 18S rRNA schneidet (Dez et al., 2007). Zudem assoziiert Utp10 in *S. cerevisiae* mit möglicherweise defekten Prä-Ribosomen (Dez et al., 2007). Damit ist Utp10 wichtig für die Synthese der kleinen ribosomalen Untereinheit. Eine Depletion von Utp10 führte bei *S. cerevisiae* zu vermindertem bzw. unterbliebenem Wachstum, denn die Zellen verharrten in der G1-Phase (Dez et al., 2007, Bernstein and Baserga, 2004). Die Biosynthese von Ribosomen und Utp10 wird in *S. cerevisiae* Zellzyklus-abhängig reguliert (Oliva et al., 2005). Da *S. cerevisiae* kein RNAi-System besitzt (Laurie et al., 2008), scheint diese Regulation auch ohne RNAi möglich zu sein. Ob dies in *T. thlaspeos* der Fall ist, kann besser abgeschätzt werden, sobald sRNA-Sequenzierungen einer Dicer-Mutante oder einer Ago-Co-Immunitätspräzipitation ausgewertet wurden. RNAs eines weiteren Interaktors des SSU-Prozessoms, Utp14, sowie eines Protein, das an der Assemblierung und dem Export der großen ribosomalen Untereinheit involviert ist, wurden als Zieltranskripte in

T. reesei vorhergesagt (Kang et al., 2013, Black et al., 2018). Darüber hinaus wurden in *T. reesei* drei und in *P. marneffeii* sieben Transkripte von ribosomalen Proteinen als Ziele von miRNAs vorhergesagt und in *M. circinelloides* wurden drei Loci als sRNA-produzierend identifiziert (Nicolas et al., 2010, Kang et al., 2013, Lau et al., 2013). Darüber hinaus wurden in *C. cinerea* besonders viele Zieltranskripte Prozessen zur Translation, ribosomalen Struktur und Biogenese zugeordnet (Lau et al., 2018). Möglicherweise reguliert *T. thlaspeos* die Ribosomen-Biosynthese über die *utp10*-RNA.

In diesem Abschnitt konnten neben Zielen, die in diversen Prozessen eine Rolle spielen könnten, wie RNAs eines Transkriptionsfaktors, einer Proteinkinase und einer Flavinenenthaltende Aminoxidasedehydrogenase, auch Ziele identifiziert werden, die unter anderem in Ribosomen-Biosynthese, Dynein-abhängigem Transport und in der Zellteilung fungieren, wie RNAs einer Inositolpolyphosphat-Phosphatase, von Utp10, eines Nukleoporins, eines Aktin-bündelnden Proteins sowie der leicht-intermediären und die schweren Kette von Dynein. Zwar konnten in anderen Organismen keine identischen Zieltranskripte identifiziert werden, doch wurden ähnliche Prozesse mit RNAi in Verbindung gebracht.

3.2.5.4. Zieltranskripte ohne bekannte Regulation durch RNAi in anderen Organismen

Ein Grund für eine unbekannt Regulation eines Gens kann eine fehlende Funktionszuordnung oder Untersuchung sein. So konnte dem für die sRNAs Tt_sRNA_45 und Tt_sRNA_62 vorhergesagten Zieltranskript (THTG_03119) weder durch BLAST-Suche (NCBI – Protein Blast) noch durch Vorhersage von Domänen (NCBI – Conserved Domains) eine Funktion zugeordnet werden. Dementsprechend liegen auch keine Informationen zu dessen Regulation vor.

Ein weiteres vorhergesagtes Zieltranskript (THTG_06156) wurde als Ziel von Tt_sRNA_48 vorhergesagt. Es kodiert für Vacuolar Protein Sorting 73 (VPS73). VPS73 ist ein mitochondriales Protein unbekannter Funktion, welches an der vakuolären Proteinsortierung involviert ist (González et al., 2006). In *S. cerevisiae* konnte die Überexpression von VPS73 in einer *ptc1*-Mutante sowie in einer *grx3 grx4 slt2*-Mutante die Fragmentierung der Vakuole weitestgehend retten und verbesserte die erhöhte Sensitivität dieser Mutanten gegenüber verschiedenen Zellwand-schädigenden Substanzen, Calcium oder alkalischem pH (González et al., 2006, Pujol-Carrion et al., 2013). In der *grx3 grx4 slt2*-Mutante wurde durch Überexpression zudem die abnormale Organisation des Aktin-Cytoskeletts gerettet (Pujol-Carrion et al., 2013). Die Vakuole fragmentiert während des Zellzyklus und bei Stress (Stauffer and Powers, 2017). Da wenig über VPS73 bekannt ist, ist auch dessen Regulation nicht erforscht. Eine Herunterregulierung der *vps73*-mRNA via RNAi in *T. thlaspeos* könnte für die Zellteilung nötig sein, oder eine Stressantwort darstellen. Letzteres ist jedoch

unwahrscheinlich, da die Zellen in der exponentiellen Wachstumsphase geerntet wurden und morphologisch unauffällig aussahen. Dies könnte überprüft werden, indem Vakuolen in Zellen untersucht werden, die aus verschiedenen Wachstumsphasen und ggf. aus Medien mit unterschiedlichem Nährstoffgehalt stammen oder welche unterschiedlichem osmotischen Druck oder anderen Stressfaktoren ausgesetzt waren (Stauffer and Powers, 2017). Gegebenenfalls könnte hier zusätzlich die DNA angefärbt und die Zelllänge gemessen werden, um die Zellzyklusphase der einzelnen beobachteten Zellen besser nachvollziehen zu können.

Des Weiteren wurde für Tt_sRNA_19 die mRNA von SAP155 als Zieltranskript (THTG_04178) prognostiziert. SAP155 ist eine regulatorische Untereinheit, die zusammen mit der katalytischen Untereinheit SIT4 eine Holo-Phosphatase bildet (Han et al., 2019). SIT4 reguliert in *C. albicans* Zellwachstum, Morphogenese und Virulenz (Han et al., 2019). In *C. albicans* zeigte SAP155 in allen getesteten Parametern keinen Unterschied zum Wildtyp, und fungierte funktionell redundant zum zweiten getesteten SIT4-regulatorischen Protein SAP190 (Han et al., 2019). In *S. cerevisiae* zeigten *sap155*-Mutanten einen leichten Wachstumsphänotyp (Luke et al., 1996). Auch hier wurde eine teilweise aber nicht vollständige Redundanz der SAP155-Funktion zu anderen SAP-Proteinen nachgewiesen (Luke et al., 1996). Man geht davon aus, dass die SAP-Proteine darin involviert sind, den Nährstoffgehalt in die SIT4-abhängige Expression von Cyclinen für den Start der S-Phase zu integrieren (Luke et al., 1996). Durch RNAi gegen die *sap155*-mRNA könnte *T. thlaspeos* möglicherweise seinen Zellzyklus regulieren.

Außerdem wurde die *kap123*-mRNA als Zieltranskript (THTG_04410) von Tt_sRNA_19 vorhergesagt. Karyopherine ermöglichen den Transport von Makromolekülen durch die Kernporen (Ptak et al., 2009). Das Karyopherin Kap123p importiert ribosomale Proteine, Signalerkennungspartikel-Proteine, Histone, einen Histon-Acetyltransferase-Komplex und die HO-Endonuklease in den Zellkern (Ptak et al., 2009). In *S. cerevisiae* wurde in Kap123p-defizienten Zellen eine geringfügig reduzierte 40S Biogenese festgestellt (Sydorskyy et al., 2003). Die Aufgaben von Kap123 im nukleären Import können weitestgehend von anderen Karyopherinen kompensiert werden und Auswirkungen auf das Wachstum sind gering (Sydorskyy et al., 2003). In Kombination mit einem an der 60S-Ribosomen-Biogenese beteiligten Protein zeigten sich jedoch deutliche Wachstumsdefizite (Sydorskyy et al., 2003). Zudem wies eine *kap123*-Mutante Defekte bei Mikrotubuli-Stabilität und/oder -Assemblierung sowie bei in der Spindelstruktur und -dynamik sowie bei der Positionierung des Nukleus während der Mitose auf (Ptak et al., 2009). Des Weiteren wurden erhöhte Aktin-Level, eine erhöhte Resistenz gegenüber dem Aktin-Polymerisierungs-Inhibitor Latrunculin B, eine veränderte Zellmorphologie und eine geringere Zellintegrität festgestellt (Martínez-Bono et al., 2009). In *U. maydis* ist Kap123 für den nukleären Import des Mitose-induzierenden Cdc25

notwendig und mutierte Varianten von Kap123 waren in der Paarungseffizienz und im Zellzyklusarrest beeinträchtigt (Bardetti et al., 2019). In *S. pombe* werden *kap123* und viele Gene für die Biosynthese von Ribosomen Zellzyklus-abhängig in einer Phase vor dem Größenwachstum und vermehrter Proteinsynthese exprimiert (Oliva et al., 2005). Dementsprechend könnte eine Regulierung der *kap123*-mRNA in *T. thlaspeos* durch RNAi die Mitose und möglicherweise in geringem Maße die Ribosomen-Biogenese beeinträchtigen.

Die mRNAs von Kap123 und SAP155 werden voraussichtlich von derselben sRNA reguliert. Beide Proteine haben unterschiedliche, den Zellzyklus indirekt beeinflussende Aufgaben, aber auch jeweils weitestgehend funktional redundante Proteine (Sydorskyy et al., 2003, Han et al., 2019), die aber nicht als RNAi-Zieltranskripte vorhergesagt wurden. Eine Co-Regulation der *kap123*- und *sap155*-mRNAs zur Beeinflussung des Zellzyklus über verschiedene Signalwege ist daher theoretisch möglich, aber erscheint aufgrund der jeweils redundant agierenden Proteine eher unwahrscheinlich. Da die *kap123*-Mutante bei zusätzlicher Deletion eines für die Ribosomen-Biogenese relevanten Gens so deutliche Phänotypen aufwies (Sydorskyy et al., 2003), könnte die parallele Regulation ähnlicher Gene den Einfluss auf die Ribosomen-Biosynthese verstärken. Ein solches Gen könnte *utp10* sein, welches in dieser Doktorarbeit ebenfalls als Zieltranskript vorhergesagt und am Ende des vorigen Kapitels diskutiert wurde. Tt_sRNA_70 reguliert laut Vorhersage die RNA der E3-Ubiquitinligase Hel2 (THTG_03301). Bei blockierten Ribosomen (*ribosome stalling*), hervorgerufen beispielsweise durch spezifische nicht-optimale Codonpaare, oxidativem Stress, tRNA- oder Aminosäuremangel, ubiquitiniert Hel2 die kleine ribosomale Untereinheit (Ikeuchi et al., 2019). Diese Ubiquitinierung ist notwendig für die folgende Qualitätskontrolle durch Ribosom-assoziierte Qualitätskontrolle (RQC) oder No-Go Decay (NGD), bei denen die ribosomalen Untereinheiten getrennt und das entstehende Protein bzw. die mRNA degradiert wird (Ikeuchi et al., 2019, Winz et al., 2019). Daher könnte ein Hel2-Defizit vermutlich zu längerem Verbleib der Ribosomen auf der mRNA führen. Die generelle Proteinexpression kann im Verlauf des Zellzyklus variieren (Oliva et al., 2005). Grundsätzlich ist vorstellbar, dass Hel2 zu Zeitpunkten im Zellzyklus, in denen die Proteinbiosynthese nicht maximal stattfindet, nicht so stark exprimiert werden muss. Eine weitere Hypothese wäre die Sequestrierung von Ribosomen und entstehenden Proteinen, um diese nach einem transienten Translationsstopp schnell verfügbar zu machen. Eine Herunterregulierung der Hel2-Expression in *T. thlaspeos* könnte dementsprechend zur möglicherweise Zellzyklus-abhängigen Reduzierung der Proteinbiosynthese beitragen, indem Ribosomen auf mRNAs sequestriert werden. Andererseits könnte *T. thlaspeos* die Hel2-Expression auch durch RNAi an die Zellzyklus-abhängig reduzierte Proteinbiosynthese anpassen.

Ein weiteres vorhergesagtes Zieltranskript (THTG_01782) soll von Tt_sRNA_89 reguliert werden. Es kodiert für ein Co-Chaperon, das in *S. cerevisiae* STI1 und in Säugetieren Hop

genannt wird. (Bhattacharya and Picard, 2021). Hop interagiert mit den Hitzeschock-Proteinen Hsp70 und Hsp90, aber auch mit anderen Proteinen. (Bhattacharya and Picard, 2021). Es fördert die Assemblierung des Proteasoms, die Proteindegradierung und verlangsamt die Proteinfaltung des Hsp70-Hsp90-Komplexes, weshalb eine regulatorische Funktion für die Proteostasis angenommen wird (Bhattacharya and Picard, 2021). Darüber hinaus sind die Zellzyklus-spezifische Phosphorylierung von Hop durch Cdk1 und die Verlangsamung der G1-Phase bei Deletion oder Knockdown von Hop in humanen Krebszellen Anlass zur Spekulation, dass Hop Zellzyklus-spezifische Aufgaben haben könnte (Bhattacharya and Picard, 2021). Möglicherweise könnte die Expression aber an Schwankungen der generellen Proteinexpression während des Zellzyklus angepasst sein, denn diese oszilliert beispielsweise in *S. pombe* (Oliva et al., 2005). Eine möglicherweise Zellzyklus-abhängige Herunterregulation der STI1-Expression durch RNAi in *T. thlaspeos* könnte daher die Proteinbiosynthese beeinflussen.

In diesem Unterkapitel konnten fünf von sechs Zieltranskripten, welche für VPS73, SAP155, Kap123, Hel2 bzw. STI1 kodieren, eine möglicherweise Zellzyklus-abhängig regulierte Funktion zugeordnet werden. Jedoch ist über deren Regulation durch RNAi in anderen Organismen bislang nichts bekannt.

Insgesamt wurden viele Zieltranskripte vorhergesagt, die Zellzyklus-abhängig reguliert werden oder diesen beeinflussen. Darunter waren Transkripte, die in verschiedenen Phasen des Zellzyklus reguliert werden. Da die Kultur aus asynchronisierten Zellen bestand, war dies zu erwarten. Darüber hinaus wurden RNAs von Cytochrom P450 und einer putativen Transposase als Zieltranskripte prognostiziert. Damit sind in *T. thlaspeos* im Vergleich zu anderen Pilzen, wie *T. reesei*, *P. marneffeii*, *C. cinerea* oder *M. circinelloides*, ähnliche Prozesse Quelle oder Ziel von RNAi (Kang et al., 2013, Lau et al., 2013, Lau et al., 2018, Nicolas et al., 2010).

3.2.5.5. Verifikation der sRNA-Funktion im Pilz

Für die Auswahl der zu verifizierenden vorhergesagten Zieltranskripte werden gerne sRNAs mit Uridin als 5'-Nukleotid ausgewählt, da dies bei etwa 80% der in *N. crassa* mit dem Ago-Homolog Qde2 assoziierten sRNAs der Fall war (Lee et al., 2010). Es können aber auch besonders abundante sRNAs dafür ausgesucht werden (Lau et al., 2013). Wenn man als Kriterium die Abundanz der sRNA verwendet, so wären Tt_sRNA_3 und Tt_sRNA_4, welche sich durch ein zusätzliches Nukleotid von ersterem unterscheidet, die bevorzugt zu untersuchenden sRNAs. Beiden wurde die schwere Kette des cytoplasmatischen Dyneins als Zieltranskript vorhergesagt. Wenn man als Kriterium das Uridin als 5'-Nukleotid verwendet, wäre Tt_sRNA_25 die abundanteste sRNA. Ihre putativen Zieltranskripte, IME4 und eine

putative Transposase, werden in anderen Organismen durch RNAi reguliert (Zhao et al., 2021b, Chapman et al., 2022). Tt_sRNA_25 weist zudem zu ihrem vorhergesagten Zieltranskript hohe Komplementarität auf, wodurch das Schneiden der mRNA als wahrscheinlich gilt (Wu et al., 2008, Pillai et al., 2004). Darüber hinaus werden transponierbare Elemente in vielen verschiedenen Pilzen aus verschiedenen Abteilungen wie Glomeromycota (*R. irregularis*), Mucoromycota (*M. circinelloides*), Basidiomycota (*C. neoformans*) und Ascomycota (*N. crassa*, *P. marneffeii*, *S. japonicus*) wahrscheinlich oder nachweislich durch RNAi reguliert (Dallaire et al., 2021, Nicolas et al., 2010, Janbon et al., 2010, Nolan et al., 2005, Lau et al., 2013, Chapman et al., 2022). Aus diesen Gründen sollte Tt_sRNA_25 für weitere Untersuchungen ausgewählt werden. Zunächst sollte durch eine sRNA-Sequenzierung einer Dicer-Mutante festgestellt werden, ob die sRNA durch die kanonische RNAi-Komponente oder durch andere Degradationsmechanismen generiert wird. Allerdings ist Dicer in Pilzen wie *M. circinelloides* und *T. atroviride* wichtig für das Wachstum oder in *S. japonicus* und *C. albicans* sogar essentiell (Chapman et al., 2022, Bernstein Douglas et al., 2012, Carreras-Villaseñor et al., 2013, Nicolas et al., 2010). In diesem Fall könnte das sRNA-produzierende Gen deletiert oder dessen Promotor durch einen induzierbaren ausgetauscht werden oder ein kurzes-tandem-Ziel-Imitat (*short-tandem-target-mimic*, STTM) exprimiert werden, welches sRNAs bindet (Dunker et al., 2020, Bernstein Douglas et al., 2012). In der Dicer-Mutante oder dem STTM-exprimierenden Stamm müssten die Zieltranskripte heraufreguliert sein, was mittels mRNA-Sequenzierung, quantitativer RT-PCR oder Northern Blot gezeigt werden könnte (Carreras-Villaseñor et al., 2013, Chen et al., 2015, Nicolas et al., 2010). Durch eine sRNA-Sequenzierung einer Ago-Co-Immünpräzipitation kann die Beteiligung der RNAi-Komponente Argonaute an der Regulierung nachgewiesen werden (Lee et al., 2010). Anhand einer Fusion einer mutierten Zielsequenz an eine Reportergensequenz kann eine sequenzspezifische Regulierung gezeigt werden (Wang et al., 2017b). Durch Degradom-Sequenzierung oder 5'-RACE-PCR könnte das Schneiden der mRNA belegt werden (Chen et al., 2014, Son et al., 2017, Dunker et al., 2020, Werner et al., 2021). Sollte die mRNA nicht geschnitten werden, müsste zunächst das Protein-Level z.B. mittels Western-Blot oder Reportergen-basierten Methoden überprüft werden, um anschließend die translationale Inhibierung beispielsweise mit Hilfe von Antikörpern und Sonden nachzuweisen (Kobayashi and Singer, 2022, Weiberg et al., 2013). Um die Funktion der sRNAs zu beweisen, bedarf es zum Teil Experimente, deren Grundlagen im Transformationsteil dieser Dissertation etabliert wurden.

3.2.5.6. Modell endogener RNAi in *T. thlaspeos*

Anhand der in dieser Dissertation erarbeiteten Ergebnisse wurde ein Modell für endogenes RNAi in *T. thlaspeos* erstellt. Danach werden wahrscheinlich zum einen Dicer-abhängige

miRNAs gebildet und zum anderen siRNAs sowohl Dicer-abhängig als auch Dicer-unabhängig produziert. Die in dieser Arbeit identifizierten putativ Dicer-abhängigen siRNAs und miRNAs aus *T. thlaspeos* sollen endogene Zieltranskripte mit Bezug zum Zellzyklus, Proteinhomeostase, Transportprozessen, Metabolismus und transponierbaren Elementen regulieren (Abbildung 19).

Von den Zielen mit Bezug zum Zellzyklus ist einer der vielversprechendsten Kandidaten für weitere Untersuchungen, IME4, an der Regulation der Meiose beteiligt (Hongay et al., 2006). Für das Durchschreiten des G1-Checkpoints ist in *S. cerevisiae* die Adenylatcyclase notwendig (Aye et al., 2004), sodass bei Regulation dieser mRNA durch RNAi zu einem verlangsamten Wachstum von *T. thlaspeos* führen könnte. Darüber könnte SAP155 möglicherweise den Nährstoffgehalt in die Produktion von Cyclinen integrieren, welche den Zellzyklus regulieren (Luke et al., 1996). Auch Aktin-Bündel und Dynein haben Transportaufgaben im Zellzyklus (Castaneda et al., 2021, Reck-Peterson et al., 2018), sodass sich RNAi gegen deren mRNAs ebenfalls negativ auf das Wachstum auswirken könnte.

Während des Zellzyklus werden viele Gene differentiell exprimiert, darunter in *S. pombe* beispielsweise solche für Ribosomen-Biogenese (Oliva et al., 2005). In Konidien von *A. fumigatus* scheint es zudem einen Zusammenhang zwischen Dicer und der Ribosomen-Biogenese zu geben (Kelani et al., 2023). In *T. thlaspeos* könnte die Produktion der 18S rRNA durch die Regulation von Utp10 durch RNAi reduziert werden, wodurch weniger Ribosomen hergestellt werden könnten. Da Hel2 das Lösen der Untereinheiten bei blockierten Ribosomen mitinitiiert (Ikeuchi et al., 2019), könnten bei Hel2-Defizit aufgrund von RNAi möglicherweise Ribosomen auf der mRNA verbleiben, wodurch weitere Ribosomen sequestriert und die Translation weiter beeinträchtigt werden könnte. Zudem werden entstehende fehlgefaltete Proteine möglicherweise weniger effizient degradiert, da die RNA von STI1 ein weiteres putatives Ziel von endogenem RNAi ist und das Protein zur Funktion des Proteasoms beiträgt (Bhattacharya and Picard, 2021). Darüber hinaus ist es auch denkbar, dass die Expression von Hel2 und STI1 an die Zellzyklus-abhängig regulierte Proteinbiosynthese angepasst wird. Daher könnte *T. thlaspeos* das RNAi-System nutzen, um die Translationsmaschinerie Zellzyklus-abhängig anzupassen. Darüber hinaus könnte *T. thlaspeos* Import- und Exportwege für ribosomale Proteine und andere Moleküle in den Nukleus durch Beeinflussung des Nukleoporins und Kap123 beeinträchtigen, wodurch die Ribosomenassemblierung möglicherweise beeinträchtigt werden könnte. Dies könnte weiter durch die Regulierung von Utp10 unterstützt werden. Auffällig ist in diesem Zusammenhang eine deutliche Akkumulation von 90 % sRNAs von rDNA in *T. thlaspeos*. In Pilzen wurden etwa 24-79 % rDNA-kartierende sRNAs identifiziert (Zhou et al., 2012, Carreras-Villaseñor et al., 2013). In *N. crassa* stammten etwa 49 % der aus dem Ago-Protein QDE-2 co-immunpräzipitierten sRNAs von rDNA (Lee et al., 2010). In *M. oryzae* werden darüber hinaus rDNA-kartierende sRNAs bevorzugt in Ago

geladen (Nguyen et al., 2018). Inzwischen wird die Rolle dieser sRNAs erforscht. Sollte es sich hierbei um srRNAs handeln, könnten sie in *T. thlaspeos*, wie für Säugetiere vermutet, den Zellzyklus oder den Glukose-Metabolismus regulieren (Nguyen et al., 2018).

Neben diesen Zieltranskripten mit Bezug zum Zellzyklus wurden in dieser Dissertation weitere Zieltranskripte vorhergesagt, die mit Metabolismus und TEs in Zusammenhang stehen (Abbildung 19). Die RNA der Flavin-enthaltenden Aminoxidasedehydrogenase könnte Ziel von endogenem RNAi sein, weil in der exponentiellen Wachstumsphase, in der die Zellen geerntet wurden, keine primären Amine als Nährstoffquelle verwendet werden müssen. Zudem soll Cytochrom P450, welches an Primär- und Sekundärmetabolismus beteiligt ist (Lau et al., 2013), laut Vorhersage Ziel von endogenem RNAi sein. Da eine möglicherweise für eine Transposase kodierende RNA mit hier identifizierten sRNAs interagieren soll, könnte darüber hinaus die Genomintegrität von *T. thlaspeos* durch RNAi stabilisiert werden.

Da die meisten vorhergesagten Zieltranskripte eine Funktion in der Regulation des Zellzyklus besitzen oder Zellzyklus-abhängig exprimiert werden, könnte *T. thlaspeos* sein RNAi-System zur Regulation des Zellzyklus verwenden. Dies ist interessant, da ähnliche Prozesse in einigen Pilzen wie *P. marneffeii*, *T. reesei* oder *C. cinerea* als Ziel von RNAi vorhergesagt wurden (Lau et al., 2013, Lau et al., 2018, Kang et al., 2013). Darüber hinaus wurden zwei weitere RNAi-Ziele in *T. thlaspeos* vorhergesagt, die RNAs einer putativen Transposase und von Cytochrom P450, welche nachgewiesene Ziele von RNAi in Pilzen wie *N. crassa* und *P. marneffeii* sind (Nolan et al., 2005, Lau et al., 2013). Daher ist es wahrscheinlich, dass *T. thlaspeos* RNAi ebenfalls zur Kontrolle der Genomintegrität sowie für Primär- und Sekundärmetabolismus und Detoxifizierungsschritte verwendet.

Aufgrund der putativen Zieltranskripte kann über einen zu erwartenden Phänotyp der Dicer-Deletionsmutante spekuliert werden. Die verschiedenen vorhergesagten Zieltranskripte mit Zellzyklus-Bezug lassen grundsätzlich einen Wachstumsphänotyp in einer Dicer-Deletionsmutante von *T. thlaspeos* vermuten. Es ist jedoch noch offen, ob sich die quantitative Regulation in Kombination mit der Bedeutung dieser Gene im Wachstumsverhalten bemerkbar machen. Aufgrund der potentiellen Regulation von Cytochrom P450 könnte man analog zu *V. dahliae* zwar keinen Phänotyp im hyphalen Wachstum, aber erhöhte Sensitivität gegenüber Wasserstoffperoxid vermuten (Zhang et al., 2022b). Wenn *T. thlaspeos* das RNAi-System und insbesondere Dicer zur Kontrolle von Transposons verwendet, könnte dessen Deletion zur vermehrten Transposition von TEs führen. Dies kann wiederum zur Disruption funktioneller Gene, veränderter Genexpression, abweichendem Spleißen oder über Rekombinationsereignisse zu Genduplikationen, -deletionen oder größeren Rearrangements des Genoms führen (Gebert and Rosenkranz, 2015). Hier können theoretisch eine Vielzahl an Phänotypen entstehen. Zusammenfassend könnte eine Dicer-Deletionsmutante in

T. thlaspeos möglicherweise Defizite im hyphalen Wachstum unter Standard- und Stressbedingungen zeigen.

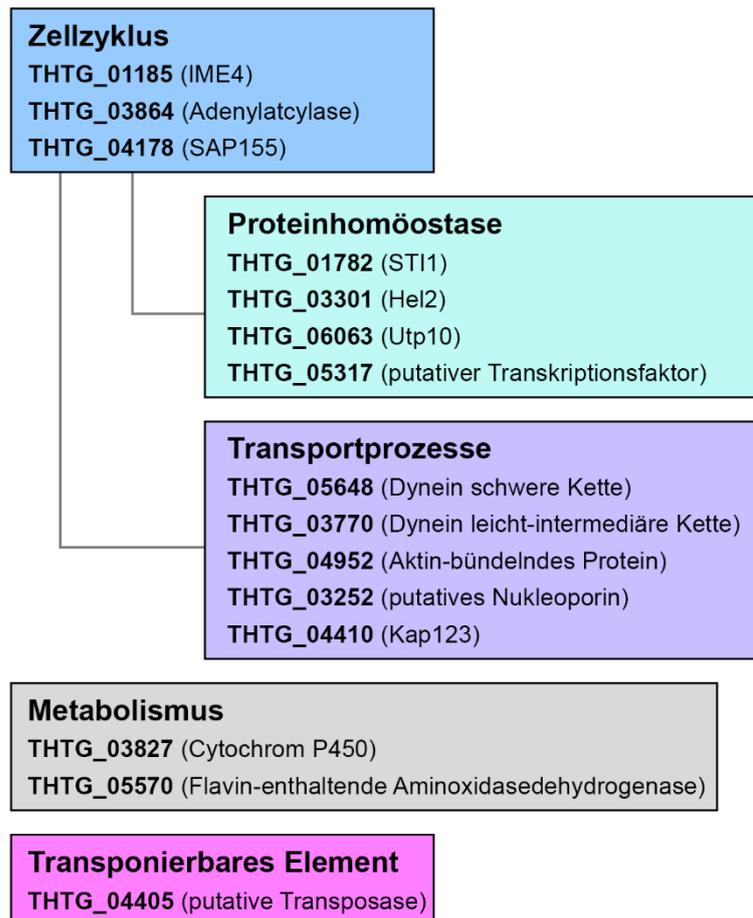


Abbildung 19 *T. thlaspeos* sRNAs könnten verschiedene endogene Prozesse regulieren. Zu diesen gehören der Zellzyklus, der wiederum wechselseitig mit Proteinhomöostase und Transportprozessen einhergeht, sowie Metabolismus und einem putativen Transponierbaren Element. Angegeben sind die Gen-IDs der vorhergesagten Zieltranskripte sowie der Name von homologen Proteinen.

3.2.6. Potentielle Funktionen des RNAi-Systems während der Infektion von Pflanzen

Um eine mögliche Nutzung des RNAi-Systems von *T. thlaspeos* während der Infektion näher zu evaluieren, wurde eine Zieltranskript-Vorhersage mit sRNAs aus der oben beschriebenen axenischen Pilzkultur und mRNAs aus *A. hirsuta* durchgeführt. Um sich auf sRNAs für PIGS zu konzentrieren, wurden von den 97 eingesetzten pilzlichen sRNAs solche ausgeschlossen, die ein vorhergesagtes Zieltranskript im Pilz oder eine vollständige Basenpaarung zu einem vorhergesagten pflanzlichen Zieltranskript aufwiesen. Dadurch wurden 25 pilzliche sRNAs herausgefiltert, die voraussichtlich mit mRNAs von 25 Genen aus *A. hirsuta* interagieren, aber auch deren Degradationsprodukte sein könnten. Um den sRNAs eine biologische Funktion

zuordnen zu können, mussten Homologe aus *A. thaliana* hinzugezogen werden, da für die Transkripte aus *A. hirsuta* keine funktionelle Annotation zur Verfügung stand. Für 21 der 25 vorhergesagten Zieltranskripte aus *A. hirsuta* konnten Homologe in *A. thaliana* identifiziert und damit meist eine Funktion zugeordnet werden. Interessanterweise waren acht der 21 vorhergesagten Zieltranskripte mit dem Endomembrantransport assoziiert, drei weitere putative Zieltranskripte hatten indirekt Einfluss auf die pflanzliche Immunität, weitere drei standen im Zusammenhang mit der pflanzlichen Zellteilung und zwei mit der Embryogenese. Schließlich gab es fünf vorhergesagte Zieltranskripte, deren Funktion nicht näher definiert werden konnte. Dies waren die Homologe des F-Box/RNI-ähnliche/FBD-ähnliche Domänen-enthaltenden Proteins (TRINITY_DN26273_c3_g4), des multiresistenten Proteins (TRINITY_DN46784_c0_g1), eines putativen Elektronentransporters (TRINITY_DN22139_c0_g1), des RNA-bindenden KH-Domänen-enthaltenden Proteins (TRINITY_DN23441_c0_g1) und die Ubiquitin-spezifische Protease 18 (TRINITY_DN23963_c0_g1). In den folgenden Kapiteln werden vorhergesagte Zieltranskripte mit eindeutiger Funktionszuordnung erläutert.

Von besonderem Interesse sind dabei sRNAs, die 21 nt lang sind und ein Uridin als 5'-Nukleotid besitzen, da dies auf viele der sRNAs zutrifft, die nachgewiesenermaßen sRNA-Effektoren während PIGS sind (Weiberg et al., 2013, Dunker et al., 2020, Wang et al., 2017b, Wang et al., 2017a, Ji et al., 2021).

3.2.6.1. Potentielle Regulation des pflanzlichen Endomembrantransports durch PIGS

Unter den vorhergesagten Zieltranskripten wiesen 38 % eine Assoziation zum Endomembrantransport auf. Das pflanzliche Endomembransystem vermittelt die Aufnahme extrazellulärer Substanzen, den Transport zu intrazellulären Lokalisationen und die Sekretion (Ruano and Scheuring, 2020). Für den Membrantransport werden zunächst Vesikel von der Donor-Membran abgeschnürt, transportiert, an die Zielmembran angebunden und schließlich mit ihr fusioniert (Gu et al., 2017). Die für diese Schritte vorhergesagten Zieltranskripte kodieren für das Aktin Cytoskelett-regulatorischer Komplex PAN-ähnliche Protein, das Myosin-M schwere Protein, die Inositolphosphorylceramid Synthase 3 (IPCS3), Bildet aploide und binukleäre Zellen 1A (FAB1D), das pflanzliche Syntaxin 31 (SYP31), das BEACH-Domänen Homolog C1 (BchC1), die RAB-Geranylgeranyl-Transferase Beta Untereinheit 1 (RGTB1) und RAB6.

Die pilzlichen sRNAs Tt_sRNA_15, Tt_sRNA_88 und Tt_sRNA_97 besitzen die gleiche Sequenz, variieren aber in ihrer Länge und sollen die mRNA des Aktin-Cytoskelett-regulatorischen Komplex PAN-ähnlichen Proteins (TRINITY_DN24114_c1_g2) regulieren. Zudem soll Tt_sRNA_21 das Transkript des Myosin-M schweren Proteins

(TRINITY_DN21051_c0_g1) beeinflussen. Aktin ist an der Bewegung von Organellen, der Zellteilung, dem Transport und der Endocytose beteiligt (Li and Day, 2019). Beispielsweise wird durch verschiedene PAMPs das Aktin-Cytoskelett der Pflanze verdichtet (Porter and Day, 2016). Aktin und dessen Motorprotein Myosin sind zudem involviert an der Endocytose des Rezeptors eines bakteriellen PAMPs, Flagellin sensing 2 (FLS2) (Porter and Day, 2016, Li and Day, 2019). Des Weiteren benötigt der ETI-assoziierte Rezeptor Cf-4 in Tomaten die Aktin-Cytoskelett-abhängige Clathrin-vermittelte Endocytose für die Immunreaktionen gegen den Pilz *Cladosporium fulvum* (Li and Day, 2019). So könnte *T. thlaspeos* durch RNAi die Proteinlevel von Aktin-organisierenden Proteinen und Myosin reduzieren und so der Erkennung durch die pflanzliche Immunabwehr entgehen und Immunreaktionen reduzieren. Tt_sRNA_17 reguliert laut Vorhersage die mRNA von IPCS3 (TRINITY_DN18362_c1_g2), eine am Golgi-Apparat lokalisierte Inositolphosphorylceramidsynthase, welche Ceramid zu Inositolphosphorylceramid (IPC) umsetzt, welches wiederum zu Glycosylinositolphosphorylceramid (GIPC) umgewandelt wird (Mamode Cassim et al., 2020). IPCS sind am programmierten Zelltod, normalem Wachstum und Reproduktion in *A. thaliana* und an Reaktionen auf abiotischen Stress in *Oryza sativa* involviert (Pinneh et al., 2019a, Pinneh et al., 2019b). Eine *ipcs2*-Mutante in *A. thaliana* zeigte Ceramid-Akkumulation (Berkey et al., 2012). Daher scheint es nicht abwegig, dass in einem *ipcs3*-Knockdown erhöhte Ceramid- und niedrigere IPC- und GIPC-Werte vorliegen könnten. Möglicherweise spielen Ceramide, IPCs oder GIPCs eine Rolle bei der Lokalisation des Resistenzproteins RPW8.2 in *A. thaliana* (Berkey et al., 2012). Zudem sind GIPCs im Vergleich zu anderen Ceramiden deutlich in extrazellulären Vesikeln angereichert und wichtig für deren Bildung (Liu et al., 2020a). So wurde bei *A. thaliana* in *tet8*-Mutanten, welche weniger extrazelluläre Vesikel sekretieren, deutlich reduzierte GIPC-Level in Blättern, aber nicht in extrazellulären Vesikeln identifiziert (Liu et al., 2020a). Die Bildung extrazellulärer Vesikel konnte jedoch durch Zugabe von GIPC stark erhöht werden (Liu et al., 2020a). In extrazellulären Vesikeln werden sRNAs, RNA-bindende Proteine, Phytoalexine, Phenole oder ROS, welche eine Rolle in der Infektion spielen, von der Pflanze in den Pilz transportiert (Cai et al., 2018, He et al., 2021, Ruano and Scheuring, 2020). Durch das Herunterregulieren der *ipcs3*-mRNA durch *T. thlaspeos* könnte das Zellwachstum, die Reproduktion, abiotische Stressantworten und der programmierte Zelltod in Wirtszellen von *A. hirsuta* beeinflusst werden. Zudem könnte eventuell eine Fehllokalisierung pflanzlicher Resistenzproteine die Immunabwehr der Pflanze verringern und möglicherweise eine reduzierte Produktion von extrazellulären Vesikeln zu vermindertem HIGS führen.

Für Tt_sRNA_83 und Tt_sRNA_87 wurde das Transkript von *fab1d* (TRINITY_DN25482_c3_g1) als potentiell Ziel für ck-RNAi von *T. thlaspeos* vorhergesagt. FAB1D ist eine von vier putativen Phosphatidylinositol-3-Phosphat 5-Kinasen in *A. thaliana*

(Serrazina et al., 2014). Phosphatidylinositol-3-Phosphat 5-Kinasen generieren Phosphatidylinositol-3,5-bisphosphat, welches an der Regulierung des Endomembrantransports beteiligt ist (Serrazina et al., 2014). Tatsächlich wurde in Pollenschläuchen von *fab1d*-Mutanten neben einer reduzierten Endocytose auch eine geringere ROS-Bildung gemessen (Serrazina et al., 2014). ROS werden bei der PTI zur Pathogenabwehr gebildet (Ruano and Scheuring, 2020). Je nachdem, welche Art von ROS hier beeinflusst wird, gibt es verschiedene Methoden, die zum Nachweis angewendet werden können (Akter et al., 2021). Durch ck-RNAi gegen die *fab1d*-mRNA könnte *T. thlaspeos* die Endocytose der Wirtszellen reduzieren und damit seine Anwesenheit möglicherweise durch fehlende Rezeptor-Internalisierung, wie oben für FLS2 und Cf-4 erwähnt (Porter and Day, 2016, Li and Day, 2019), wegen verringerter PAMP-Endocytose maskieren sowie Immunreaktionen wie ROS-Bildung vermindern.

Das für Tt_sRNA_36 und Tt_sRNA_41 vorhergesagte Zieltranskript kodiert für das pflanzliche Syntaxin 31 (SYP31; TRINITY_DN22075_c0_g1), ein im Golgi lokalisiertes SNARE (Rui et al., 2021). SNAREs sind Proteine, die an der Fusion von Vesikeln mit ihrer Zielmembran beteiligt sind (Rui et al., 2021). Man vermutet, dass SYP31 eine Rolle im ER-Golgi-Transport spielt (Rui et al., 2021). Zusammen mit SYP32 und COG3 ist es Bestandteil des COG-Komplexes, einem Vesikel-anbindenden Komplex am Golgi-Apparat (Rui et al., 2021). In *A. thaliana* zeigte eine *syp31 syp32*-Doppelmutante in Pollen einen gestörten retrograden und anterograden Transport (Rui et al., 2021). Dies wurde als Grund für die abnormalen Callose-Anhäufungen postuliert (Rui et al., 2021). Callose kann durch Anilin-Blau-Färbung visualisiert werden (Shi et al., 2020, Kohari et al., 2020). In der Sojabohne führte ein Knockdown des SYP31-Homologs Gm-SYP38 zu erhöhtem Parasitismus des Nematoden *Heterodera glycines* (Pant et al., 2014). Daher könnte *T. thlaspeos* möglicherweise durch PIGS gegen die *syp31*-mRNA den pflanzlichen ER-Golgi-Transport stören und dadurch womöglich Abwehrmechanismen wie Callose-Ablagerungen reduzieren, wodurch eine Kolonisation des Wirtes erleichtert werden würde.

Außerdem wurde die *bchc1*-mRNA (TRINITY_DN14188_c0_g2) als möglicher Interaktionspartner von Tt_sRNA_21 vorhergesagt. BchC1 enthält eine BEACH-Domäne, welche wahrscheinlich an Vorgängen wie der Vesikelfusion oder -spaltung beteiligt ist (Teh et al., 2015). In *A. thaliana* könnte BchC1 als negativer Regulator des Membrantransports zur Vakuole und der Immunität fungieren (Teh et al., 2015). Dies erscheint zunächst kontraproduktiv für die Pathogenität. Laut Arabidopsis-Datenbank (<https://www.arabidopsis.org/>) wird *bchc1* spezifisch in Pollenschlauchzellen exprimiert. Bei einer Infektion junger Pflanzen, wie sie bei der angenommenen vertikalen Infektion der Fall wäre, wäre dieses Zieltranskript dementsprechend in der Pflanze nicht vorhanden (Frantzeskakis et al., 2017). In *Verticillium dahliae* konnten zum Beispiel die sRNAs miR159

und miR166 nur aus infizierter Pflanze, aber nicht in axenischer Kultur identifiziert werden (Zhao et al., 2021a). Tt_sRNA_21 reprimiert laut Vorhersage neben der *bchc1*-mRNA auch die mRNAs von BBX28, welches eine Rolle in der Photomorphogenese spielt (Liu et al., 2020b), von dem Myosin-M schweren Protein, welches an Transportprozessen beteiligt ist (Porter and Day, 2016), und einer mRNA, die kein Homolog in *A. thaliana* aufweist. Es wurde bereits gezeigt, dass eine sRNA mehrere Zieltranskripte reprimieren kann (Šečić et al., 2021a). Somit wäre es möglich, dass Tt_sRNA_21 in axenischer Kultur produziert wird, um in Vorbereitung auf die baldige Infektion BBX28 und/oder Myosin zu reprimieren. Obwohl die mRNA von *bchc1* als Zieltranskript einer sRNA aus *T. thlaspeos* vorhergesagt wurde, überlappt seine zeitliche Expression womöglich nicht mit der eventuell dynamischen Expression der sRNA. Dennoch kann nicht ausgeschlossen werden, dass Tt_sRNA_21, mit der *bchc1*-mRNA interagiert, sobald sie exprimiert wurde, und so vesikuläre Prozesse reguliert.

Tt_sRNA_12 ist die abundanteste 21 nt lange sRNA mit Uridin als 5'-Nukleotid, für die eine Interaktion mit Transkripten vorhergesagt wurde, denen eine Funktion zugeordnet werden konnte. In anderen Studien konnte gezeigt werden, dass sRNAs mit diesen Charakteristika pflanzliche mRNAs im Rahmen von PIGS regulieren (Weiberg et al., 2013, Dunker et al., 2020). Daher ist Tt_sRNA_12 die für weitere Analysen präferierte sRNA aus *T. thlaspeos*. Deshalb ist eines der putativen Zieltranskripte, welches die RAB-Geranylgeranyl-Transferase Beta Untereinheit 1 (RGTB1; TRINITY_DN20130_c1_g1) kodiert, besonders interessant. Ihre mRNA wird laut Vorhersage von Tt_sRNA_12 und Tt_sRNA_16 reguliert. Dieses Protein prenyliert RAB-Proteine durch Anfügen von Geranylgeranylgruppen, sodass diese an Membranen verankert werden können (Gutkowska et al., 2015). *rgtb1*-Mutanten aus *A. thaliana* zeigten verringertes Wachstum bei Anzucht im Licht (Hála et al., 2010). Auch im Dunkeln war der Unterschied zum Wildtyp in der Hypokotyllänge deutlich (Hála et al., 2010). Zudem wies diese Mutante eine verlangsamte Exo- und Endocytose auf (Hála et al., 2010, Gutkowska et al., 2015). Als Konsequenz der verlangsamten Exocytose wird eine veränderte Zellwandzusammensetzung in *rgtb1*-Mutanten vermutet (Hála et al., 2010). Des Weiteren könnte eine reduzierte RGTB1-Menge zu einer Beeinträchtigung seiner Zielproteine, den RAB-GTPasen, führen. Tatsächlich betrug die Geranylgeranylierungsaktivität in *rgtb1*-Mutanten nur 25 % und es lag ein höherer Anteil an nicht membrangebundenem RAB-A2a vor (Hála et al., 2010). RAB-GTPasen sind Regulatoren des intrazellulären Vesikeltransports (Hála et al., 2010). Beispielsweise sind in Pflanzen RAB5/RABF2-GTPasen am sekretorischen Transport von multivesikulären Endosomen (MVEs) zur Plasmamembran oder am endocytischen und vakuolären Transport beteiligt (Minamino and Ueda, 2019). MVEs können mit der Plasmamembran fusionieren, und extrazelluläre Vesikel freisetzen (Veziroglu and Mias, 2020), welche wiederum sRNAs in den Pilz transportieren können (Cai et al., 2018). RABA1 ist am

Transport von neu synthetisiertem Immunrezeptor FLS2 zur Plasmamembran beteiligt (Minamino and Ueda, 2019). Liganden-gebundenes FLS2 wird internalisiert und in MVE, möglicherweise RABA6-abhängig, zur Vakuole transportiert (Minamino and Ueda, 2019). Eine weitere RAB-GTPase, RABA4b, ist an der polarisierten Sekretion von Zellwandkomponenten in Wurzelhaarzellen beteiligt (Minamino and Ueda, 2019). Des Weiteren können pflanzliche mRNAs intrazellulär RAB5-abhängig transportiert werden (Zhang et al., 2022c). Aufgrund der genannten Beispiele könnte *T. thlaspeos* durch PIGS gegen die *rgtb1*-mRNA die pflanzliche Exo- und Endocytose verlangsamen und so Zellwandmodifikationen beeinflussen. Indirekt könnte durch fehlende Geranylgeranylgruppen an pflanzlichen RAB-Proteinen der intrazelluläre Vesikeltransport beeinträchtigt werden, wodurch Immunrezeptoren und Zellwandkomponenten fehllokalisieren könnten. Außerdem könnte durch eine verminderte Freisetzung extrazellulärer Vesikel HIGS reduziert werden, was einen positiven Einfluss auf die Kolonisierung der Pflanze haben dürfte. Interessanterweise beeinflussen auch andere phytopathogene Pilze durch Hemmung von Transportprozessen HIGS ihrer Wirtspflanzen. So sekretiert *V. dahliae* das Protein VdSSR1 in den pflanzlichen Nukleus, um den nukleären Export pflanzlicher AGO1-miRNA-Komplexe zu verringern (Zhu et al., 2022). Die stärker exprimierten Isoformen von *rgtb1* zeigten eine nicht signifikante Herunterregulierung in infizierten, zehn Wochen alten *A. hirsuta* (Courville et al., 2019). Diese könnte zukünftig mit anderen Methoden wie einer quantitativen RT-PCR überprüft werden (Ji et al., 2021). Auch eine lokale Regulierung um die Infektionsstelle ist denkbar und beispielsweise mit einem Csy4/GUS-Reportersystem nachweisbar (Dunker et al., 2020). Ein Einfluss auf die Regulation des Endomembrantransports um die Infektionsstelle könnte mit FM4-64 für Endocytose oder pflanzlichen Markerlinien wie secGFP für die Sekretion, ARA6 für die äußere Membran von multivesikulären Körperchen oder TET8 für extrazelluläre Vesikel visualisiert und quantifiziert werden (Hála et al., 2010, Cai et al., 2018). Darüber hinaus sind weitere Methoden notwendig, um den Beitrag der sRNA in der Infektion nachzuweisen. Da diese für alle in dieser Arbeit identifizierten sRNAs durchgeführt werden könnten, werden sie in Kapitel 3.2.6.4 „Optimierungen und weiterführende Experimente“ diskutiert, um Wiederholungen zu vermeiden.

Für Tt_sRNA_54 wurde die *rab6*-mRNA (TRINITY_DN27303_c0_g4) als Zieltranskript vorhergesagt, welche eine RAB-GTPase kodiert. Da RAB6 aus *A. hirsuta* als Homolog von RAB6 aus *A. thaliana* und dieses wiederum als Homolog von *S. cerevisiae* Ypt6 und dieses wiederum als Homolog von RAB-6 aus *C. elegans* identifiziert wurde (Courville et al., 2019, He et al., 2018) (<https://www.yeastgenome.org/>), könnten sie dieselben Funktionen haben. RAB-6 lokalisiert im Golgi-Apparat und ist am Transport zwischen Endosom und Golgi, Golgi und Plasmamembran, Golgi und ER sowie intra-Golgi beteiligt (Michaud et al., 2021, He et al., 2018). In *A. thaliana* ist RAB6 am Transport der Cellulose Synthase 6 zur Plasmamembran

beteiligt (He et al., 2018). Eine *rab6*-Mutante blieb insgesamt kleiner und wies eine reduzierte Exocytose dieser Cellulose Synthase, eine verringerte Endocytose, einen niedrigeren Cellulose-Gehalt und eine veränderte Golgi-Morphologie auf (He et al., 2018). Zudem zeigte sie bei Wachstum in Dunkelheit kurze und instabile Hypokotyle (He et al., 2018). Bei *C. elegans* führte ein artifizieller Knockdown von RAB-6.2 ebenfalls zu verlangsamtem Wachstum (Straud et al., 2013). Auch die Mutation eines mit RAB-6.2 interagierenden RAB-GAPs, EAT-17, führte zu diesem Phänotyp (Straud et al., 2013). Zudem legten Knockdowns von RAB-6.1, RAB-6.2, RAB-2 und RAB-14 eine Beteiligung an miRNA-Funktionen nahe (Michaud et al., 2021). Auch das vermutlich hauptsächlich für RAB-6.1 und RAB-6.2 zuständige RAB-GAP TBC-11 scheint RNAi zu beeinflussen und unterstützt unter anderem die Lokalisation und miRNA-Beladung des Argonate ALG-1 (Michaud et al., 2021). Darüber hinaus wird verschiedenen Golgi-assoziierten Proteinen einen Einfluss auf RNAi zugeschrieben (Michaud et al., 2021). Pflanzen steuern diverse endogene Prozesse durch RNAi, unter anderem Entwicklung, Wachstum und Immunität (Song et al., 2021). Wenn *T. thlaspeos* durch PIGS gegen das pflanzliche RAB6 indirekt pflanzliche RNAi-Funktionen beeinträchtigen sollte, könnte man theoretisch deutliche Phänotypen erwarten. Tatsächlich sind bis zur Bildung des Saatguts keine offensichtlichen Phänotypen in den Wirtspflanzen von *T. thlaspeos* vorhanden (Frantzeskakis et al., 2017). Möglicherweise ist die Regulation nicht stark und/oder nur lokal, sodass es zu einem sehr milden Phänotyp kommen könnte, der ohne Messung nicht detektiert wurde. Daher könnte man zukünftig die Größe einzelner infizierter Pflanzenteile messen und Transportprozesse durch fluoreszierend markierte Proteine untersuchen (He et al., 2018). Dementsprechend könnte *T. thlaspeos* durch PIGS gegen die *rab6*-mRNA der Pflanze den Endomembrantransport negativ beeinflussen, wodurch indirekt die Verstärkung der Zellwand, das Wachstum und möglicherweise RNAi-Funktionen reduziert werden könnten. Dies dürfte die Kolonisierung von *A. hirsuta* vereinfachen.

Zusammenfassend könnte *T. thlaspeos* durch Herunterregulieren dieser am Endomembrantransport beteiligten Komponenten indirekt die Internalisierung von PAMP-Rezeptoren, die Sekretion von Zellwandkomponenten, die Produktion von ROS und möglicherweise RNAi-Funktionen reduzieren und so die pflanzliche Immunabwehr schwächen. Zudem könnte der Pilz durch die Reduktion der pflanzlichen Sekretion von MVE und Exocytose die Produktion von pflanzlichen extrazellulären Vesikeln reduzieren und so die Menge der erfolgreich in den Pilz translozierten pflanzlichen Effektoren reduzieren. Außerdem könnte eine Störung des pflanzlichen intrazellulären Transports die Lokalisation verschiedenster Proteine verändern. All diese Aspekte dürften zu einer erfolgreichen Kolonisierung von *A. hirsuta* beitragen.

3.2.6.2. PIGS könnte (in)direkt pflanzliche Immunität, Zellteilung und Embryogenese regulieren

Neben den oben diskutierten potentiellen pflanzlichen Zieltranskripten mit Bezug zum Endomembrantransport wurden weitere mit Funktionen in der Embryogenese, der Zellteilung und mit Relevanz für die Immunität vorhergesagt. Zunächst soll erläutert werden, wie *T. thlaspeos* durch putatives PIGS gegen die Transkripte von MNS5, SMEK1 und einer Glycosylhydrolase indirekt Auswirkung auf die Immunität der Pflanze erzielen könnte.

Tt_sRNA_47 soll mit der *mns5*-mRNA (TRINITY_DN24238_c0_g1) interagieren. Mns5 ist eine Klasse I α -Mannosidase, welche zum Beispiel an der Markierung für den Abbau des fehlgefalteten membranverankerten Brassinosteroid-insensitiv 1 (BR1) -Rezeptors über Glycan-abhängige ER-assoziierte Degradierung (ERAD), aber nicht an der N-Glycan-Prozessierung korrekt gefalteter Glykoproteine für die Sekretion beteiligt ist (Hüttner et al., 2014). Es könnte also zu einer erhöhten Protein-Fehlfaltung bestimmter Glykoproteine während der Infektion von *T. thlaspeos* kommen. Eine Reduktion des *bri1*-mRNA-Levels in Gerste führte zu erhöhter Pathogenität von *Fusarium culmorum* (Ali et al., 2014b). Daher könnte man bei erfolgreicher Infektion von *T. thlaspeos* durch PIGS gegen die *mns5*-mRNA ebenfalls eine erhöhte Pathogenität erwarten.

Tt_sRNA_12 interagiert laut Vorhersage neben den Transkripten der oben erwähnten RGTB1 und dem F-Box/RNI-ähnlichen/FBD-ähnliche Domänen-enthaltenden Protein auch mit der mRNA von SMEK1 (TRINITY_DN26724_c0_g1). Wie oben erwähnt, ist sie die präferierte sRNA aus *T. thlaspeos* für nähere Analysen. SMEK1, auch PSY2L genannt, ist eine regulatorische Untereinheit in einem Protein Phosphatase 4 -Komplex (Kataya et al., 2017, Su et al., 2017). In *A. thaliana* reguliert SMEK1 auf zwei Wegen die Dephosphorylierung von HYL1 und stabilisiert so diesen wichtigen Kofaktor der miRNA-Biogenese (Su et al., 2017). HYL1 ist zudem möglicherweise Teil eines Signalintegratornetzwerkes, das die miRNA-Synthese mit Lichtsignalwegen verbindet (Jung et al., 2022). *smek1*-Mutanten waren deutlich kleiner, besaßen eine reduzierte miRNA-Akkumulation und zeigten unter anderem erhöhte Transkript-Mengen von Genen, die bei der Reparatur von DNA-Schäden und Zellzyklus-Arrest eine Rolle spielen (Su et al., 2017, Kataya et al., 2017). *hyl1*-Mutanten waren bei Anzucht im Licht kleiner und wiesen zudem ein kürzeres Hypokotyl bei Anzucht in Dunkelheit auf (Jia et al., 2021, Sacnun et al., 2020). Da Pflanzen endogene miRNAs verwenden, um sowohl ihre Immunabwehr als auch pathogene Gene zu regulieren (Šečić et al., 2021a, Zhao et al., 2021a), könnte man theoretisch eine erhöhte Suszeptibilität gegenüber Pathogenen in *smek1*-Mutanten erwarten. Proteine, die an der sRNA-Biogenese beteiligt sind, werden auch in anderen Pathosystemen von Effektoren beeinträchtigt. *Phytophthora sojae* zum Beispiel sekretiert das Effektor-Protein PSR2, welches mit DRB4 interagiert und so die Biogenese sekundärer siRNAs in *A. thaliana* hemmt (Hou et al., 2019). Darüber hinaus wird spekuliert,

dass einige der betroffenen pflanzlichen sRNAs eine Rolle in HIGS spielen (Hou et al., 2019). *Phytophthora*-Spezies sekretieren einen Protein-Effektor, PSR1, der mit dem pflanzlichen PINP1 interagiert und so zu einer reduzierten Menge pflanzlicher sRNAs führt (Qiao et al., 2015). Um eine Funktion für Tt_sRNA_12 während der Infektion nachzuweisen, könnten neben den in Kapitel 3.2.6.4 „Optimierungen und weiterführende Experimente“ aufgeführten allgemeinen Experimenten die Menge an sRNAs und die Menge sowie der Phosphorylierungsstatus von HYL1 während der Infektion von Wildtyp, Dicer- oder Tt_sRNA_12-Deletionsstämmen von *T. thlaspeos* analysiert werden. Durch ck-RNAi gegen *smek1*-mRNA könnte *T. thlaspeos* möglicherweise die pflanzliche miRNA-Synthese reduzieren. Dadurch könnten sowohl die in der Pflanze durch endogene RNAi gesteuerten Immunreaktionen reduziert werden als auch die Menge der an den Pilz gesendeten HIGS-sRNAs reduziert werden.

Eine weitere sRNA aus *T. thlaspeos*, Tt_sRNA_87, soll mit der RNA der Glycosylhydrolase 9B7 (TRINITY_DN23169_c2_g2) interagieren. Es handelt sich um eine Endo-1,4- β -glucanase, die ein Signalpeptid und eine GH9-Domäne besitzt (Urbanowicz et al., 2007). Endo-1,4- β -glucanasen hydrolysieren die β -1,4-glycosidischen Bindungen von Cellulose und anderen Polysacchariden der Pflanzenzellwand (Urbanowicz et al., 2007). Gleichzeitige antisense-Expression der Endo-1,4- β -Glucanasen Cel1 und Cel2 in Tomaten führte zu erhöhter Callose-Ablagerung und erhöhter Resistenz gegenüber *B. cinerea*, aber auch zu mehr Proliferation von *Pseudomonas syringae* (Flors et al., 2007). Endo-1,4- β -Glucanasen können also die Pathogenität auf unterschiedliche Weise beeinflussen. Die pflanzliche Zellwand ist eine der ersten Barrieren für Pathogene (Nguyen et al., 2021). Es gibt mehrere Effektoren, die in Zellwandmodifikationen eingreifen (Xia et al., 2020). Daher wäre es zu erwarten, dass auch *T. thlaspeos* dazu in der Lage ist, und die Zieltranskript-Vorhersage legt nahe, dass dieser Pilz dies durch PIGS erreichen könnte.

Durch die in diesem Abschnitt erläuterten putativen sRNA-Zieltranskript-Interaktionen könnte *T. thlaspeos* die Reduktion pflanzlicher sRNAs für endogene Prozesse und HIGS, eine Fehlfaltung pflanzlicher Protein-Effektoren, eine Fehlfaltung von pflanzlichen Immunitäts-relevanten Rezeptoren sowie eine Veränderung der Zellwand bewirken und damit den Infektionserfolg erhöhen.

Des Weiteren wurden für sechs pilzliche sRNAs pflanzliche Zieltranskripte vorhergesagt, deren Proteine die Zellteilung beeinflussen, wie APC5, eine Caseinkinase und BBX28.

Tt_sRNA_82 soll laut Vorhersage das *A. hirsuta*-Transkript TRINITY_DN26894_c0_g1 silencen, welches als Homolog von At1g06590 in *A. thaliana* identifiziert wurde. At1g06590 scheint fehlerhaft annotiert worden zu sein und soll einer neuen Annotation nach eine Untereinheit eines Anaphase-fördernden Komplexes oder Cyclosomes namens APC5 sein

(Capron et al., 2003). Hierbei handelt es sich um eine Ubiquitin-Protein-Ligase E3, welche besonders in der Mitose eine Rolle spielt (Capron et al., 2003).

Tt_sRNA_29, Tt_sRNA_39, Tt_sRNA_84 und Tt_sRNA_96 silencen möglicherweise die mRNA der katalytischen Untereinheit der Serin/Threonin-Phosphotransferase Caseinkinase 2, Alpha Kette 3 (CKA3; TRINITY_DN21693_c1_g3). Sie ist an der Zellteilung, der Genomstabilität und der Chromatinstruktur beteiligt (Moreno-Romero et al., 2008, Moreno-Romero et al., 2012). Die Caseinkinase 2 phosphoryliert HY5, einen positiven Regulator der Photomorphogenese (Moreno-Romero et al., 2008). Photomorphogenese beschreibt die Bildung eines kurzen Hypokotyls und ausgebreiteter Kotyledonen in Licht, während Skotomorphogenese, auch Etiolierung genannt, das verstärkte Wachstum des Hypokotyls, geschlossene Kotyledonen und die Bildung eines apikalen Hakens in Dunkelheit beschreibt (Song et al., 2020). Eine Mutante der Caseinkinase 2 in *A. thaliana* zeigte bei Anzucht im Licht ein etwas kürzeres Hypokotyl und kleine Kotyledonen, ein deutlicherer Unterschied war jedoch bei Anzucht in Dunkelheit sichtbar (Moreno-Romero et al., 2008). Da eine konstitutive Aktivierung des Licht-Signalweges ausgeschlossen wurde, wird davon ausgegangen, dass der Phänotyp auf Fehler während der Zellexpansion zurückzuführen ist (Moreno-Romero et al., 2008). In verschiedenen Spezies reguliert RNAi den Zellzyklus, unter anderem in *A. thaliana* (Ong and Torres, 2019, Bhattacharjee et al., 2019, Trolet et al., 2019). Pathogene können die Zellteilung des Wirts beeinflussen, z.B. stimuliert der See1 Protein-Effektor aus *U. maydis* die Zellteilung in Mais (van der Linde and Göhre, 2021). Da andere Pathogene die pflanzliche Zellteilung beeinflussen und RNAi in Pflanzen ein endogener Mechanismus zur Regulierung dieses Prozesses ist, liegt es nahe, dass Pathogene wie *T. thlaspeos* die pflanzliche Zellteilung über ck-RNAi regulieren könnten.

BBX28 (TRINITY_DN17175_c0_g1) ist ebenfalls ein Regulator der Photomorphogenese (Liu et al., 2020b). Dessen mRNA wird laut Vorhersage von Tt_sRNA_21 gesilenced. Eine *bbx28*-Mutante blühte unter Langtag-Bedingungen früher (Liu et al., 2020b). *T. thlaspeos* könnte also womöglich über ck-RNAi Einfluss auf den Blütezeitpunkt nehmen. Allerdings ist BBX28 ein negativer Regulator der Photomorphogenese, der im Dunkeln degradiert wird (Song et al., 2020) und sollte daher bei Anzucht in Dunkelheit theoretisch keinen Wachstumsphänotyp aufweisen.

Ein Wachstums-Phänotyp wurde auch in Mutanten von *rab6*, *rgtb1*, und *smek1* in *A. thaliana* beobachtet (He et al., 2018, Hála et al., 2010, Kataya et al., 2017). Die Isoformen dieser Gene, die in gesunden *A. hirsuta*-Pflanzen exprimiert werden, wurden während der Infektion von *T. thlaspeos* in einem nicht signifikanten Maß herunterreguliert (Courville et al., 2019). Diese Ergebnisse könnten beispielsweise mit quantitativer PCR überprüft werden. Da bei mit *T. thlaspeos* infizierten Pflanzen bislang keine offensichtlichen makroskopischen Phänotypen unter Standard-Wachstumsbedingungen beobachtet wurden (Courville et al., 2019), würde

man hier einen milden Phänotyp erwarten. Möglicherweise könnte der Unterschied zu gesunden Pflanzen unter Bedingungen verdeutlicht werden, in denen der Wildtyp das Wachstum enorm steigert. Eine solche Bedingung wäre beispielsweise das Wachstum im Dunkeln, denn während der Skotomorphogenese wird u.a. ein längeres Hypokotyl gebildet (Song et al., 2020). Unter diesen Bedingungen zeigten auch Mutanten der Caseinkinase 2, *rab6*, *rgtb1* und des SMEK1-regulierten *hyl1* kurze Hypokotyle (Su et al., 2017, Moreno-Romero et al., 2008, He et al., 2018, Hála et al., 2010, Sacnun et al., 2020). Ein solches Wachstums-Defizit könnte relativ einfach experimentell überprüft werden, indem die Hypokotyllänge und ggf. die Zelllänge von in Dunkelheit angezogenen gesunden und infizierten Pflanzen gemessen werden (Hála et al., 2010, Moreno-Romero et al., 2008). Dabei empfiehlt sich auch eine längere Anzucht in Dunkelheit, um gegebenenfalls noch deutlichere Unterschiede im Wachstum beobachten zu können, wie die Bildung echter Blätter wie es bei der *rgtb1*-Mutante der Fall war (Hála et al., 2010). Außerdem sollte dabei auf fragile Hypokotyle wie in der *rab6*-Mutante geachtet werden (He et al., 2018).

Schließlich wurden zwei Zieltranskripte vorhergesagt, deren Proteine an der Embryogenese beteiligt sind. Tt_sRNA_83 interagiert laut Vorhersage mit der RNA des Titan-ähnlichen, Transthyretin-ähnlichen Proteins (TTL; TRINITY_DN25516_c0_g2). Dieses wird in *A. thaliana* überwiegend in sich schnell teilenden Zellen exprimiert und reguliert wahrscheinlich die Mitose im Endosperm und die Embryoentwicklung (Lu et al., 2012). Darüber hinaus soll die mRNA von Embryo Defekt 1011 (auch LONO1 oder LNO1 genannt; TRINITY_DN27470_c0_g1) von Tt_sRNA_46 durch PIGS reguliert werden. LONO1 ist Bestandteil des nukleären Kernkomplexes und vermutlich durch Kontrolle des mRNA-Transports für Embryogenese und Viabilität des Saatguts in *A. thaliana* essentiell (Braud et al., 2012). Die pflanzliche Embryogenese wird beispielsweise durch sRNAs reguliert (Rodrigues and Miguel, 2017). Tt_sRNA_46 besitzt mit 21 nt Länge, Uridin als 5'-Nukleotid und vorhergesagten Zieltranskripten in *A. hirsuta* ebenfalls die wichtigen Kriterien, weshalb sie für weitere Untersuchungen erwogen werden sollte. Die erste, abundantere solche sRNA, Tt_sRNA_12, soll unter anderem die *rgtb1*- und *smek1*-RNA regulieren, welche bereits oben diskutiert wurden. Interessanterweise führten die Defekte im vesikulären Transport in den *rgtb1*-Mutanten in *A. thaliana* zu weniger Saatgut pro Schote, verformten Embryos und einer veränderten Samenschale (Rojek et al., 2021). Die Abbildungen lassen zudem eine insgesamt geringere, aber leider nicht quantifizierte Schotenlänge vermuten (Rojek et al., 2021). Bei *smek1*-Mutanten wurde zudem eine reduzierte Fertilität berichtet (Su et al., 2017). Die Sporen von *T. thlaspeos* ersetzen teilweise das Saatgut in infizierten Pflanzen (Frantzeskakis et al., 2017). Da RNAi die Proteinexpression reduziert, in einigen Fällen um schätzungsweise 30-60 % (Weiberg et al., 2013, Wang et al., 2017b), könnte man quantitative Abweichungen dieses Phänotyps durchaus erwarten. Die Zahl, Form und Schleimschicht-Bildung der

Saatkörner sind einfach zu überprüfende Phänotypen. Diese sollten durch molekulare Analysen ergänzt werden, die in Kapitel 3.2.6.4 „Optimierungen und weiterführende Experimente“ erläutert werden. Insgesamt könnte *T. thlaspeos* durch ck-RNAi gegen die mRNAs von *tll*, *lono1* und *rgtb1* die Embryogenese negativ beeinflussen.

Zusammenfassend konnten zu den identifizierten sRNA-Sequenzen aus axenischer Kultur diverse Zieltranskripte in *A. hirsuta* vorhergesagt werden, die darauf hindeuten, dass *T. thlaspeos* PIGS nutzen könnte, um vor allem den pflanzlichen Endomembrantransport, aber auch Immunitäts-relevante Prozesse sowie Zellteilung und Embryogenese zu manipulieren.

3.2.6.3. PIGS in anderen Pathogen-Pflanze-Interaktionen

Bislang wurden nur in wenigen Pilz-Pflanze-Interaktionen vorhergesagte Zieltranskripte pilzlicher sRNA-Effektoren verifiziert. *B. cinerea* beispielsweise produziert sRNAs, die die Immunabwehr in *A. thaliana* und *Solanum lycopersicum* supprimieren, wie die Mitogen-aktivierten Protein Kinasen MPK1 und MPK2, sowie die Zellwand-assoziierte Kinase WAK (Weiberg et al., 2013). Außerdem werden in *A. thaliana* mRNAs des immunitäts-relevanten Transkriptionsfaktors WRKY7 und der Leucin-reichen Rezeptor-Kinase Fei2 von *B. cinerea* sRNAs reguliert (Wang et al., 2017b). Des Weiteren inhibiert *Puccinia striiformis* die Expression einer Immunitäts-relevanten beta-1,3-Glucanase aus Weizen über PIGS (Wang et al., 2017a). Auch *Fusarium graminearum* hemmt die Expression eines Chitin-Elicitor-bindenden Proteins aus Weizen mit einer seiner sRNAs (Jian and Liang, 2019). Ein weiteres Beispiel ist *Fusarium oxysporum*, welcher die mRNA-Menge der Kinase Frg4 in Tomaten über ck-RNAi reguliert, sodass die Pflanze wahrscheinlich wegen gestörter ROS-Regulation suszeptibler ist (Ji et al., 2021). Auch der Oomycet *H. arabidopsidis* nutzt PIGS, um lokal um die Infektionsstelle herum die RNAs der in pflanzliche Stressantworten eingebundenen Kinase Wnk2 und der in Immunität involvierten Protease Aed3 zu supprimieren (Dunker et al., 2020). Es wurde gezeigt, dass die sRNAs aus dem Pathogen mit AGO1 aus *A. thaliana* interagieren (Weiberg et al., 2013, Dunker et al., 2020).

In weiteren Pathosystemen wurden sRNAs identifiziert und ihre Zieltranskripte vorhergesagt, deren Regulation durch RNAi jedoch nicht verifiziert. In *B. distachyon* werden laut Vorhersage mRNAs von Resistenzgenen und Transkriptionsfaktoren durch sRNAs von *M. oryzae* reguliert (Zanini et al., 2021). Außerdem wurden hier mRNAs kodierend für RNA-Helikasen als Zieltranskripte vorhergesagt (Zanini et al., 2021), von denen unklar ist, ob sie für selektive Beladung extrazellulärer Vesikel mit sRNAs (He et al., 2021) beteiligt sind. Außerdem wird angenommen, dass sRNAs von *Verticillium dahliae* mit diversen Zieltranskripten in *A. thaliana* interagieren (Wang et al., 2016). Diese kodieren unter anderem ein Aktin-bindendes Protein, ein Zellzyklus-reguliertes Mikrotubuli-assoziiertes Protein und ein SNARE-ähnliches Superfamily-Protein (Wang et al., 2016). Interessanterweise wurde für eine sRNA aus *B. cinerea* vorhergesagt, mit einer für Clathrin kodierenden mRNA aus *A. thaliana* zu interagieren (Weiberg et al., 2013). In Tomaten ist Clathrin-vermittelte Endocytose des Immunrezeptors Cf-4 beispielsweise an der Abwehr von Pilzen beteiligt (Li and Day, 2019). Daher ist es möglich, dass auch andere Pilze das Endomembransystem ihrer Wirtspflanzen durch sRNAs manipulieren. Wissenswert ist zudem, dass in entgegengesetzter Richtung für HIGS aus *A. thaliana* mehrere sRNAs verifiziert wurden, deren vorhergesagte Zieltranskripte in *B. cinerea* am Vesikeltransport beteiligt sind (Cai et al., 2018). Hier wurden die mRNAs von Vacuolar sorting protein 51 (Vps51), von Dynactin 1 (Dctn1), welches an Kinesin II und Dynein bindet und den Vesikeltransport koordiniert, und von der Phosphoinositid-Phosphatase Sac1,

die den sekretorischen Membrantransport reguliert, als Zieltranskripte verifiziert (Cai et al., 2018). Weitere vorhergesagte Zieltranskripte mit dem GO-Term Vesikeltransport waren eine Polyphosphoinositid-Phosphatase, ein hypothetisches Protein ähnlich eines GTPase-aktivierenden Proteins, das ER-assoziierte Ubiquitin-Fusion-Degradierungs-Protein Ufd1 und ein hypothetisches Protein ähnlich eines integralen Membranproteins (Cai et al., 2018). Auch *Blumeria graminis* könnte mit sRNAs pflanzliche Transportsysteme während der Infektion beeinträchtigen (Mahanty et al., 2023). Es scheint, als könnten möglicherweise sowohl Pathogen als auch Wirt das Endomembransystem des jeweiligen Interaktionspartners mit sRNAs beeinflussen. Darüber hinaus ist die Modifikation des pflanzlichen Endomembrantransports durch Protein-Effektoren eine häufig vorkommende Infektionsstrategie von Mikroben. So war das Pflanzen-Interaktom von putativen Effektoren aus *Phytophthora infestans* mit Proteinen des Vesikeltransports angereichert (Petre et al., 2021). Zum Beispiel beeinflusst der Effektor PexRD54 den Vesikeltransport-Regulator Rab8a seiner Wirtspflanze (Pandey et al., 2021). Der Effektor PexRD31 führte in *N. benthamiana* zu einer Anreicherung von PIP3-positiven Vesikeln und damit zu einer Änderung des endosomalen Transports in der biotrophen Phase der Infektion (Petre et al., 2021). Des Weiteren vermittelt der Effektor HopM1 aus *Pseudomonas syringae* in *A. thaliana* den Abbau des ARF-GEFs MIN7, welcher die Vesikelbildung kontrolliert (Machado Wood et al., 2021). Obwohl *Fusarium graminearum* kein HopM1-Homolog besitzt, scheint auch dieser Pilz MIN7 über bislang unbekannte Mechanismen zu regulieren (Machado Wood et al., 2021). Zudem könnte das pflanzliche Endomembransystem möglicherweise durch den Transfer pilzlicher mRNAs modifiziert werden (Kwon et al., 2021). So wurden in extrazellulären Vesikeln von *U. maydis*, welcher kein RNAi-System besitzt, mRNAs identifiziert, deren GO-Termini unter anderem für den Vesikel-vermittelten Transport und die Organisation von Aktin-Filamenten überrepräsentiert waren (Laurie et al., 2012, Kwon et al., 2021). Diese Beispiele zeigen, dass das pflanzliche Endomembransystem eine relevante Komponente ist, die vom Pathogen reguliert wird. Daher macht es Sinn, dass *T. thlaspeos* sein RNAi-System nutzen würde, um dieses zu sabotieren.

Es gibt allerdings auch Pilze, die ihr RNAi-System während der Infektion möglicherweise nicht verwenden. Ein Beispiel ist *Z. tritici*, denn hier wurden das Dicer-Gen und zwei der AGO-Gene in der Infektion herunterreguliert und deren Deletion zeigte keinen Infektionsphänotyp (Ma et al., 2020, Kettles et al., 2019). Außerdem konnte kein spezifisches Schneiden der vorhergesagten Zieltranskripte nachgewiesen werden und weder Virus-vermitteltes HIGS noch extrazellulär applizierte RNAs konnten die Genexpression im Pilz regulieren (Ma et al., 2020, Kettles et al., 2019). Allerdings wurde ein geringerer Infektionserfolg von *ago1*-Mutanten bei der Infektion einer anderen Kulturvarietät von Weizen festgestellt (Habig et al., 2021). Auch der biotrophe Pilz *Erysiphe cruciferarum* und der Oomycet *Albugo laibachii* nutzen ck-RNAi

möglicherweise nicht, da *ago1*-Mutanten in *A. thaliana* keine erhöhte Resistenz aufwiesen (Dunker et al., 2020). Daher ist die Verifizierung der vorhergesagten Zieltranskripte wichtig.

3.2.6.4. Optimierungen und weiterführende Experimente

Um die Funktion der in dieser Doktorarbeit identifizierten sRNAs während der Infektion zu verifizieren, sind zuvor einige Schritte notwendig, um einen Kandidaten auszuwählen. Wie in anderen Studien wurden hier sRNAs mit einer Länge von 21-24 nt (Zanini et al., 2018) und vollständiger Homologie zum Genom des Pilzes gewählt, die aber nicht rRNA oder tRNA repräsentieren (Weiberg et al., 2013, Dunker et al., 2020, Jian and Liang, 2019, Wang et al., 2017a). Zukünftig könnten mit umfangreicheren Annotationen oder durch BLAST (NCBI – Nucleotide Blast) auch snRNA und snoRNA ausgeschlossen werden (Weiberg et al., 2013, Dunker et al., 2020, Jian and Liang, 2019, Wang et al., 2017a). Dies würde zwar die Sequenzieretiefe, einen weiteren wichtigen Faktor, nicht erhöhen, aber den Fokus auf sRNAs aus Regionen legen, in denen auch in anderen Pathogen-Pflanze-Interaktionen sRNAs für PIGS identifiziert wurden (Zanini et al., 2018, Weiberg et al., 2013, Jian and Liang, 2019). Diese werden aber von Reads, die auf rRNA- und tRNA-Genen kartieren, überlagert. Zudem ist aufgrund der Biomasse in einem Infektionsdatensatz ein wesentlich größerer Anteil an Reads von der Pflanze zu erwarten, beispielsweise betrug der Anteil an sRNA-Reads von *B. cinerea* 0,25-12,7 % und bei *S. indica* 2,13 % (Weiberg et al., 2013, Šečić et al., 2021b). Bei der mRNA-Sequenzierung infizierter Pflanzen betrug der Anteil der *T. thlaspeos*-Reads 0,18-0,28 % (Courville et al., 2019). Sollte dieses Verhältnis bei sRNA-Sequenzierungen ähnlich sein und davon weit über 90 % der Pilz-Reads rRNA zugeordnet werden, so würden vermutlich extrem wenige Reads auf die RNAi-relevanten sRNAs entfallen. Man sollte überlegen, ob eine Ergänzung des Protokolls um eine rRNA-Depletion (Fowler et al., 2018) oder alternativ eine AGO-Co-Immunitätspräzipitation (Weiberg et al., 2013) sinnvoll wären. Denn möglicherweise wäre man nur dann in der Lage, die gerne als Auswahlkriterium verwendete Präsenz oder Akkumulation der sRNA während der Infektion nachzuweisen (Jian and Liang, 2019, Wang et al., 2017a).

Als ein weiteres Auswahlkriterium für sRNA-Kandidaten wird die Herunterregulierung einer potentiell interagierenden mRNA verwendet (Dunker et al., 2020, Jian and Liang, 2019, Wang et al., 2017a). Solche Infektions-Datensätze konnten bislang für *T. thlaspeos* nicht erhoben werden, da eine Infektionsmethode mit haploider Pilzkultur bislang nicht etabliert wurde. Infektionen mit Sporen aus Umwelt-Proben sind für die ersten Untersuchungen aufgrund der zu erwartenden erhöhten biologischen Diversität nicht so ideal wie genetisch einheitliche, haploide Kulturen, könnten aber für die Zukunft erwogen werden. Bei Infektionsexperimenten sollte außerdem beachtet werden, dass von *A. hirsuta* mangels sequenzierten Genoms nicht alle sRNAs eindeutig zugeordnet werden könnten und bislang nicht nachgewiesen werden

konnte, dass *T. thlaspeos* seinen Lebenszyklus in *A. thaliana* vollenden kann. Darüber hinaus erscheint für den Nachweis der sRNA-Funktion die Herunterregulierung der mRNA als möglicherweise hilfreiches, jedoch nicht zwingend notwendiges Kriterium, da eine Regulation durch ck-RNAi auch lokal um die Infektionsstelle herum erfolgen und durch eine Heraufregulierung in entfernteren Pflanzenteilen maskiert werden könnte, das mRNA-Level durch ck-RNAi konstant bleiben könnte, weil es einer endogenen Heraufregulierung entgegenwirkt, oder die mRNA nicht geschnitten, sondern translational inhibiert wird (Zanini et al., 2021). Aus diesen Gründen wurde eine Herunterregulation der mRNA vorerst nicht als Filterkriterium zur Identifizierung von sRNA-Kandidaten verwendet.

Für alle in dieser Doktorarbeit identifizierten sRNAs aus *T. thlaspeos* könnten folgende Methoden verwendet werden, um deren Beitrag zur Infektion nachzuweisen. Für die Verifikation dieser potentiellen ck-RNAi müsste zunächst die Präsenz dieser sRNA in der Infektion nachgewiesen werden. Dies könnte mittels sRNA-Sequenzierung, Northern Blot oder Adaptor-basierter Reverse-Transkriptions-PCR (RT-PCR) erfolgen (Weiberg et al., 2013, Wang et al., 2017b). Ein Nachweis der Regulation der mRNA könnte durch Degradom-Sequenzierung, RACE-PCR oder ein Reportersystem erfolgen (Ma et al., 2020, Wang et al., 2017a, Dunker et al., 2020, Dalakouras et al., 2023). Sollte die mRNA nicht geschnitten werden, könnte ein Nachweis einer geringeren Proteinmenge mittels Western Blot und der Nachweis der Interaktion von mRNA und AGO über Co-Immunpräzipitation mit anschließender RNA-Sequenzierung oder RT-PCR über die etablierten Methoden nötig werden (Zanini et al., 2021, Weiberg et al., 2013). Eine Sequenz-spezifische Regulierung kann anschließend mit einer an einen Marker fusionierten mutierten Zielsequenz nachgewiesen werden (Jian and Liang, 2019). Die Beteiligung der kanonischen RNAi-Komponenten am Infektionserfolg könnte durch eine niedrigere Pathogenität eines Dicer-Deletionsstammes des Pilzes und eine erhöhte Resistenz einer *ago*-mutierten Pflanze demonstriert werden (Weiberg et al., 2013). Eine Argonaute-Co-Immunpräzipitation mit anschließender sRNA-Sequenzierung oder Adaptor-basierter RT-PCR könnte nachweisen, dass die sRNA tatsächlich mit der RNAi-Komponente assoziiert (Ji et al., 2021, Weiberg et al., 2013). Die Auswirkung der sRNA auf den Infektionserfolg und involvierte Signalwege könnte schließlich ermittelt werden, indem Pflanzen mit einem Pilz infiziert werden, der die sRNA überexprimiert oder in dem die sRNA deletiert bzw. durch eine Dicer-Deletion oder ein STTM weniger abundant ist (Weiberg et al., 2013, Dunker et al., 2020). Falls *T. thlaspeos* PIGS zur lokalen Regulation nutzt, könnte diese durch ein Csy4/GUS-Reportersystem nachgewiesen werden (Dunker et al., 2020).

3.2.6.5. Modell von ck-RNAi während der Infektion von *T. thlaspeos* in *A. hirsuta*

Zu den in dieser Arbeit identifizierten sRNAs aus *T. thlaspeos* wurden potentielle Zieltranskripte in *A. hirsuta* vorhergesagt, die einen Einfluss auf den Endomembrantransport, die Zellteilung, die Embryogenese und indirekt auf die pflanzliche Immunität haben. So könnte *T. thlaspeos* während einer Infektion von *A. hirsuta* in der Pflanze die Endocytose durch ck-RNAi gegen die pflanzlichen *rab6*-, *rgtb1*- und *fab1d*-mRNAs negativ beeinflussen (Abbildung 20). Weitere RAB-Proteine könnten wegen ihrer Fehllokalisierung aufgrund eines *rgtb1*-Knockdowns fehllokalisieren und die Endocytose zusätzlich mindern. Durch eine reduzierte Endocytose könnte *T. thlaspeos* einen wichtigen Schritt von PTI- oder ETI-Signalwegen durch plasmamembranständige Rezeptoren reduzieren und so Immunreaktionen wie ROS-Bildung der Pflanze verringern. Diverse pflanzliche Endomembrantransport-Prozesse könnten bei einer Infektion von *T. thlaspeos* durch PIGS gegen die mRNAs des Aktin-Cytoskelett-regulatorischen Komplex PAN-ähnlichen Proteins und des Myosin-M schweren Proteins weniger effizient ablaufen, da sowohl Aktin als auch Myosin für den Transport von Organellen benötigt werden (Li and Day, 2019). Des Weiteren könnte der Transport zwischen ER und Golgi-Apparat während der Infektion durch Herunterregulierung der *syp31*-mRNA gestört werden. Der Transport zwischen ER und Golgi, Intra-Golgi und vom Golgi-Apparat zur Plasmamembran könnte von *T. thlaspeos* durch PIGS gegen die *rab6*-mRNA und die *rgtb1*-mRNA negativ beeinflusst werden. Durch die Regulierung dieser Transportprozesse könnte *T. thlaspeos* die Zusammensetzung der pflanzlichen Zellwand zu seinen Gunsten beeinflussen. Eine mögliche Reduzierung des vielgenutzten sekretorischen ER-Golgi-Plasmamembran-Transportweges, komplementiert durch eine Herunterregulation der Qualitätskontrolle von Proteinen im ER durch die *mns5*-mRNA, könnte zu einer Reduktion korrekt gefalteter und lokalisierter Immunrezeptoren und weiterer Infektions-relevanter Proteine und damit zu einem Vorteil für *T. thlaspeos* führen. Schließlich könnte die Sekretion pflanzlicher extrazellulärer Vesikel aus multivesikulären Körperchen von *T. thlaspeos* indirekt durch ck-RNAi gegen die *rgtb1*-mRNA, welche verschiedene RAB-Proteine reguliert (Hála et al., 2010), verringert werden. Zudem könnte dieser Prozess möglicherweise indirekt durch ck-RNAi gegen die *ipcs3*-mRNA reduziert werden, da das kodierte Enzym eine Vorstufe für GIPCs herstellt, welche die Sekretion von sRNA-enthaltenden extrazellulären Vesikeln zu fördern scheinen (Mamode Cassim et al., 2020, Liu et al., 2020a). Da sRNA-enthaltende extrazelluläre Vesikel aus Pflanzen höchstwahrscheinlich aus multivesikulären Körperchen sekretiert werden (Cai et al., 2018), könnte *T. thlaspeos* durch Verminderung dieses Transportweges HIGS reduzieren. Dies könnte weiter durch die Herunterregulierung der *smek1*-mRNA verstärkt werden, da diese indirekt die pflanzliche miRNA-Biosynthese unterstützt (Su et al., 2017). Insgesamt könnte *T. thlaspeos* durch Regulation des pflanzlichen

Endomembrantransports durch PIGS indirekt das pflanzliche Immunsystem überlisten, indem PTI-, ETI- und HIGS-Komponenten fehllokalisieren.

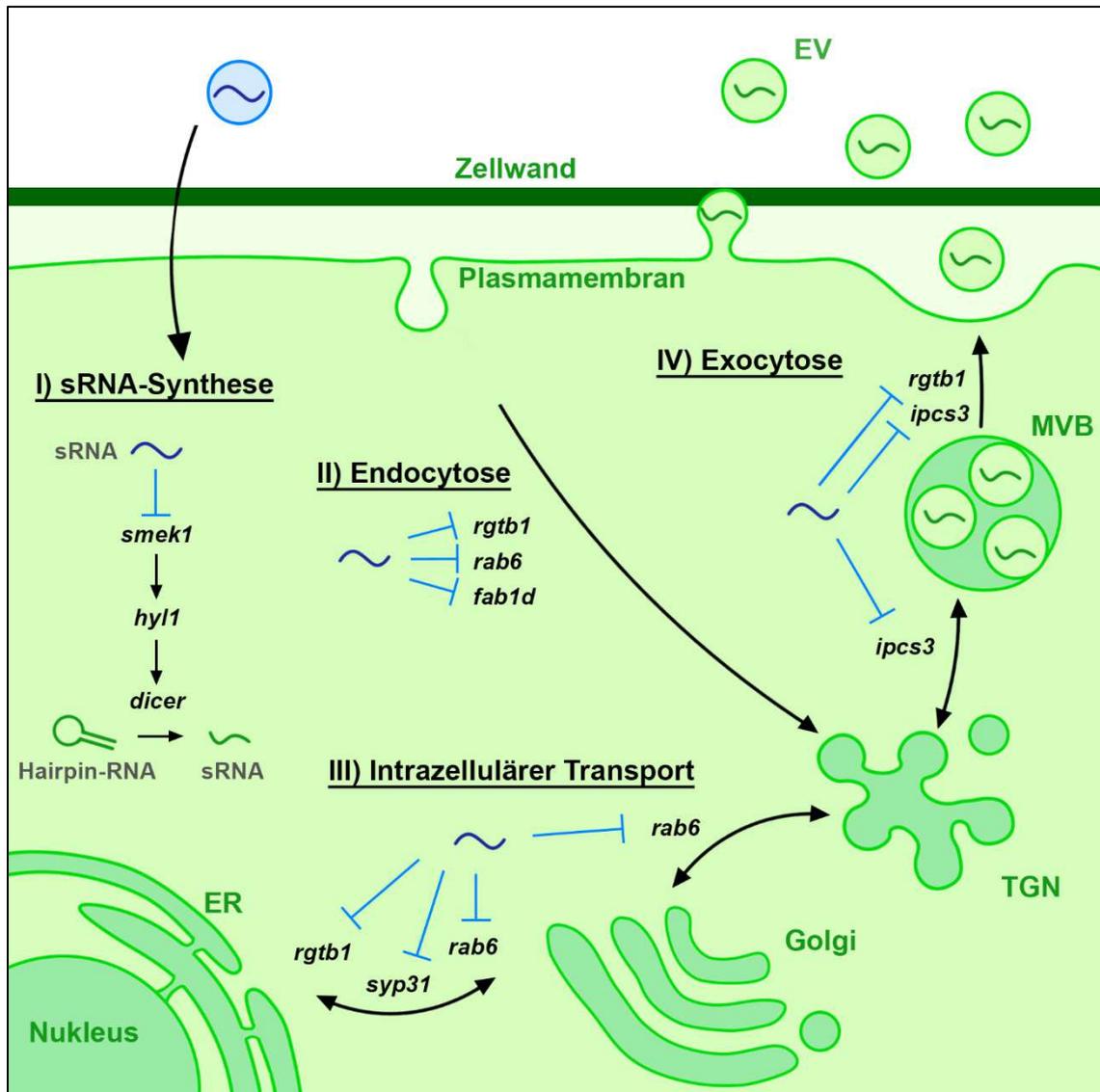


Abbildung 20 *T. thlaspeos* sRNAs könnten Transportprozesse und sRNA-Synthese in *A. hirsuta* beeinträchtigen. *T. thlaspeos* sRNAs (dunkelblau) gelangen möglicherweise in extrazellulären Vesikeln vom Pilz (hellblau) in die Pflanzenzelle und interagieren dort möglicherweise durch PIGS mit pflanzlichen mRNAs (hellblaue Pfeile). Dadurch könnten während der Infektion verschiedene Prozesse der Pflanze wie sRNA-Synthese, Endocytose, intrazellulärem Transport und Exocytose beeinträchtigt werden. Dargestellt sind Prozesse, in denen die jeweiligen Deletionsmutanten Phänotypen zeigten. Bei den putativen Zieltranskripten in *A. hirsuta* sind die Namen der Homologe aus *A. thaliana* angegeben. EV: Extrazelluläre Vesikel (pilzlichen Ursprungs in blau und pflanzlichen Ursprungs in grün), ER: Endoplasmatisches Retikulum, TGN: Trans-Golgi-Netzwerk, MVB: (multivesicular body) multivesikuläre Körperchen.

Des Weiteren sind durch ck-RNAi gegen die *ttl*- und *lono1*-mRNAs auf die Embryogenese und gegen die *cka3*- und *apc5*-mRNAs Auswirkungen auf die Zellteilung möglich. Auch *rgtb1*-

rab6- und *smek1*-Mutanten in *A. thaliana* zeigten Wachstumsphänotypen (Hála et al., 2010, He et al., 2018, Kataya et al., 2017). Da auch diese mRNAs als Zieltranskripte in der Interaktion von *T. thlaspeos* mit *A. hirsuta* vorhergesagt wurden, es aber keine offensichtlichen Phänotypen während der Infektion gibt (Frantzeskakis et al., 2017), könnte es (in)direkt zu einem sehr geringen, ggf. lokal ausgeprägten Wachstums-Phänotyp der Pflanze kommen, der wahrscheinlich nur durch detaillierte Messungen beobachtet werden kann.

3.3. Ausblick

In dieser Dissertation konnten Methoden für die genetische Modifikation von *T. thlaspeos* erfolgreich etabliert werden. Zudem konnte gezeigt werden, dass dieser Brandpilz ein RNAi-System besitzt und in axenischer Kultur sRNAs produziert, die typische Charakteristika von Dicer-Produkten aufweisen. Die identifizierten sRNAs regulieren endogen voraussichtlich RNAs mit diversen Zellzyklus-abhängigen Funktionen sowie bekannte Zieltranskripte aus anderen Pilzen wie Cytochrom P450 und eine putative Transposase (Lau et al., 2013, Chapman et al., 2022). In *A. hirsuta* wurden für die pilzlichen sRNAs pflanzliche Zieltranskripte mit Funktionen vorwiegend im pflanzlichen Endomembrantransport, aber auch in der Zellteilung, der Embryogenese und indirekt am pflanzlichen Immunsystem beteiligte Faktoren, vorhergesagt. Die hier etablierten Methoden zur genetischen Modifikation von *T. thlaspeos* werden zukünftig zur Verifizierung dieser potentiellen RNA-Effektoren, aber auch weiterer Protein-Effektoren beitragen. So kann das Verständnis von Interaktionen zwischen Pilzen und ihren Wirtspflanzen weiter ausgebaut werden.

Um die Effizienz der hier etablierten genetische Modifikation zu erhöhen, kann kurzfristig mehr DNA transformiert werden. Mittelfristig sollte die Regenerationsrate verbessert und eventuell der Regenerationszeitraum beschleunigt werden. Hierfür könnte die Konzentration des osmotischen Stabilisators im Regenerationsmedium angepasst werden oder auf eine initiale Regeneration in Flüssigmedium mit anschließender Kultivierung auf Medium ohne Osmotikum zurückgegriffen werden. Um eine möglichst hohe Effizienz zu erreichen, könnte darüber hinaus das Einbringen der DNA in die Protoplasten und die gezielte Integration der DNA in das Genom beispielsweise zur Gendeletion verbessert werden. Zum einen sollten dazu die Konzentrationen von CaCl_2 , PEG und Heparin, die Art des PEG sowie die Inkubationszeiten und -temperaturen angepasst und zum anderen die Flankenlängen, Inhibition des NHEJ-Komplexes durch Ku70 oder Ku80 oder die Etablierung des CRISPR/Cas-Systems erwogen werden. Für komplexere Fragestellungen sind zudem weitere Selektionsmarker bzw. Resistenz-vermittelnde Gene nötig.

Um die Funktionalität des RNAi-Systems zu beweisen, bedarf es beispielsweise einer sRNA-Sequenzierung einer Dicer-Deletionsmutante, der Expression oder der externen Applikation von sRNAs oder deren Vorläufermolekül. Die hier geleisteten Etablierungsarbeiten zu jedem dieser Schritte, nämlich der Etablierung der genetischen Modifikation, verschiedener Selektionsmarker und automatisierte Kultivierung mit simultaner Messung von Biomasse und Fluoreszenz, sollten einen zügigen Nachweis erlauben. Für die detaillierte Verifikation der vielversprechendsten sRNAs von endogenem sowie ck-RNAi können mittels Argonaute-Co-Immunpräzipitation mit anschließender sRNA-Sequenzierung, Degradom-Sequenzierung und einer Fusion einer mutierten Zielsequenz an eine Reportergensequenz die Beteiligung von Ago und der sRNA, das Schneiden der mRNA und die Sequenzspezifität gezeigt werden. Für

den Nachweis von ck-RNAi sind im Wesentlichen dieselben Schritte mit infiziertem Material und den jeweiligen Kontrollen nötig. Hier sollte bei der bioinformatischen Analyse auf eine eindeutige Zuordnung zu einem der Organismen geachtet werden. Zudem könnte eine Depletion der abundanten sRNAs, die von rRNAs stammen könnten, nötig sein, um eine ausreichende Sequenziertiefe für pilzliche sRNAs während der Infektion zu erreichen.

Die biologische Funktion der identifizierten pilzlichen sRNAs lässt sich mit auf die Funktion des jeweiligen Zieltranskriptes zugeschnitten Experimenten nachweisen. Für endogene RNAi in *T. thlaspeos* wurde Tt_sRNA_25 für weitere Untersuchungen ausgewählt, weshalb eine putative Transposase und die RNA-Methyltransferase IME4 im Fokus biologischer Untersuchungen stehen sollten. Nach einer Analyse der Genannotation der putativen Transposase kann deren mögliche Aktivität eventuell bereits eingeschätzt werden. Falls die Transposase-Aktivität in *T. thlaspeos* durch RNAi kontrolliert wird, könnte sie in einer Dicer- oder Ago-Deletionsmutante höher sein. Dies könnte mit Southern Blots nachgewiesen werden. Genomweit könnten weitere transponierbare Elemente identifiziert und für die Zieltranskript-Vorhersage genutzt werden. Dies könnte Aufschluss darüber geben, inwieweit RNAi in *T. thlaspeos* transponierbare Elemente kontrolliert und so die Genomintegrität schützt. Die durch das Protein des zweiten putativen endogenen Ziels, der *ime4*-mRNA, vermittelte RNA-Modifizierung kann mit Hilfe von Antikörpern quantifiziert werden. Für die Untersuchung einer möglichen Rolle bei der Meiose müsste *ime4* deletiert oder die Expression mittels extrazellulärer RNA herunterreguliert werden. Weitergehend könnten modifizierte RNAs co-immunpräzipitiert und anschließend sequenziert werden, um beeinflusste Prozesse identifizieren zu können.

Die Bedeutung der pilzlichen sRNAs könnte durch Infektion einer pflanzlichen *ago1*-Mutante verdeutlicht werden. Die Ago1-regulierten pflanzlichen mRNAs sollten hier nicht differentiell exprimiert werden, was mittels qRT-PCR überprüft werden könnte. Da einige der vorhergesagten Zieltranskripte Funktionen im oder Auswirkungen auf das Wachstum haben, könnte möglicherweise ein Unterschied in der Zelllänge oder Organgröße bei infizierten Pflanzen unter Bedingungen gemessen werden, unter denen wildtypische, gesunde Pflanzen ihr Wachstum steigern, wie beispielsweise die Anzucht in Dunkelheit. Hier wäre nicht nur ein Unterschied zwischen gesunden und infizierten Pflanzen, sondern auch lokale Effekte sowie das Verhältnis in Ago-Mutanten interessant.

Für PIGS wurde Tt_sRNA_12 für weitere Untersuchungen ausgewählt, welche neben der Expression des F-Box/RNI-ähnlichen/FBD-ähnlichen Domänen-enthaltenden Proteins unbekannter Funktion die RNAs von RGTB1 und SMEK1 regulieren soll. Der Endomembrantransport, an dem RGTB1 und andere vorhergesagte PIGS-Ziele beteiligt sind, kann zunächst mit Fusionsproteinen quantifiziert werden. Auch Farbstoffe können genutzt werden, um beispielsweise die Endocytose zu beobachten. Darüber hinaus könnten auch

Fracht-Proteine und -RNAs markiert sowie deren Transport und Funktion quantifiziert werden. So würden die Auswirkungen auf direkt betroffene Transportprozesse und auf indirekt beeinflusste Aspekte wie beispielsweise die pflanzliche Immunität deutlich. Für SMEK1 sollte die Menge und Phosphorylierung des Substrats HYL1 sowie die Menge an sRNAs während der Infektion mit dem Wildtyp und einer Deletionsmutante der sRNA bestimmt werden. Sollte die Menge der pflanzlichen sRNAs durch Tt_sRNA_12 reduziert werden, wäre eine Sequenzierung von sRNAs aus pflanzlichen extrazellulären Vesikeln interessant, um zu überprüfen, ob HIGS davon ebenfalls betroffen ist. Dies könnte die Infektion der Wirtspflanze vereinfachen.

Da *T. thlaspeos* ein Brandpilz ist, der verschiedene Brassicaceae-Spezies infizieren kann (Frantzeskakis et al., 2017), stellt sich weitergehend die Frage, ob der Pilz für jede Pflanze ein individuell abgestimmtes Portfolio an sRNA- und/oder Proteineffektoren exprimiert oder ob er ein Set exprimiert, das mit konservierten Zielen in den Wirtspflanzen interagiert. Neben Expressionsstudien könnten hier zunächst Zieltranskript-Vorhersagen und Sequenzvergleiche für weitere Wirtspflanzen von *T. thlaspeos* durchgeführt werden.

Diese Studien könnten dazu beitragen, das Effektor-Repertoire von *T. thlaspeos* besonders auf RNA-Ebene besser zu verstehen und mit Modellsystemen zu vergleichen, um Pilz-Pflanze-Interaktionen umfassend zu verstehen.

4. Material und Methoden

4.1. Material und Bezugsquellen

4.1.1. Chemikalien, Puffer, Lösungen, Medien, Enzyme und Kits

Chemikalien

Alle in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien wurden, sofern nicht anders vermerkt, in p.a.-Qualität von folgenden Herstellern bezogen: Ambion, Amersham, Applichem GmbH, BioRad, Biozym Scientific GmbH, Boehringer, Carl Roth, Difco, Duchefa Biochemicals, Fermentas, Finnzymes, Fisher BioReagents, Fluka Analytical, GE Healthcare, Gerbu, Invitrogen (Life Technologies), Merck, Promega, Riedel-de Haën, Roche, Serva, Sigma-Aldrich, Thermo Fisher Scientific, VWR Chemicals.

Puffer und Lösungen

Alle verwendeten standardisierten Puffer und Lösungen wurden, sofern nicht anders vermerkt, nach Sambrook und Ausubel (Ausubel et al., 1987, Sambrook et al., 1989) hergestellt. Die Herstellung von speziellen Puffern und Lösungen werden bei den jeweiligen Methoden beschrieben. Eine Sterilisation mittels Filtration ist bei den zutreffenden Puffern und Lösungen vermerkt.

Medien

Die verwendeten Medien wurden nach deren Herstellung durch fünfminütiges Autoklavieren bei 121 °C sterilisiert.

Verwendete Medien für die Kultivierung von *E. coli*

Die Zugabe von Antibiotika erfolgte unter sterilen Bedingungen nach dem Autoklavieren und Abkühlen auf ca. 60 °C. Dabei wurde Ampicillin in einer Konzentration von 100 µg/mL, Kanamycin in einer Konzentration von 50 µg/mL und Gentamicin in einer Konzentration von 50 µg/mL eingesetzt.

dYT-Flüssigmedium

(Sambrook et al., 1989)

1,6 % (w/v) Bacto Trypton

1,0 % (w/v) Hefeextrakt

0,5 % (w/v) NaCl

In H₂O_{bid.}

YT-Festmedium

(Sambrook et al., 1989)

0,8 % (w/v) Bacto Trypton

0,5 % (w/v) Hefeextrakt

0,5 % (w/v) NaCl

2,0 % (w/v) Bacto Agar

In H₂O_{bid.}

Verwendete Medien für die Kultivierung von *U. maydis*

YEPS light (YL)

Modifiziert nach (Tsukuda et al., 1988)

1,0 % (w/v) Hefeextrakt

0,4 % (w/v) Bacto Pepton

0,4 % (w/v) Saccharose

In H₂O_{bid.}

CMg

(Holliday, 1974)

0,25 % (w/v) Casaminosäuren

0,1 % (w/v) Hefeextrakt

1,0 % (w/v) Vitaminlösung

6,25 % (w/v) Salzlösung

0,05 % (w/v) DNA, degradiert

0,15 % (w/v) NH₄NO₃

2 % (w/v) Bacto Agar (nur für Festmedium)

In H₂O_{bid.}

mit NaOH auf pH 7,0 einstellen

nach dem Autoklavieren und Abkühlen sterilfiltrierte

Glukoselösung zu einer Endkonzentration von 1 %

(w/v) hinzugeben

Vitaminlösung

(Holliday, 1974)

0,0001 % (w/v) Thiamin

0,00002 % (w/v) Calciumpanthothenat

0,00005 % (w/v) p-Aminobenzoessäure

0,00002 % (w/v) Nikotinsäure

0,00002 % (w/v) Cholinchlorid

0,00004 % (w/v) myo-Inositol

0,00005 % (w/v) Folsäure

In H₂O_{bid.}

sterilfiltrieren

Salzlösung

(Holliday, 1974)

1,6 % (w/v) KH₂PO₄

4 % (w/v) Na₂SO₄

0,8 % (w/v) KCl

0,4 % (w/v) MgSO₄ x 7 H₂O

0,132 % (w/v) CaCl₂ x 2 H₂O

0,8 % (v/v) Spurenelement-Lösung

In H₂O_{bid.}

sterilfiltrieren

Spurenelement-Lösung

(Holliday, 1974)

0,00006 % (w/v) H₃BO₃

0,00014 % (w/v) MnCl₂ x 4 H₂O

0,0004 % (w/v) ZnCl₂

0,00004 % (w/v) NaMoO₄ x 2 H₂O

0,0001 % (w/v) FeCl₃ x 6 H₂O

0,00004 % (w/v) CuSO₄ x 5 H₂O

In H₂O_{bid.}

sterilfiltrieren

Regenerationsagar (light)

(Schulz et al., 1990)

18,22 % (w/v) Sorbitol

1,0 % (w/v) Hefeextrakt

0,4 % (w/v) Bacto Pepton

0,4 % (w/v) Saccharose

1,5 % (w/v) Agar

In H₂O_{bid.}

Für die Regeneration von Protoplasten wurde das

Medium in zwei Schichten gegossen, wobei das

Antibiotikum nur in die untere Schicht eingebracht

wurde.

Verwendete Medien für die Kultivierung von *T. thlaspeos*YMPG

Modifiziert nach (Shepherd et al., 2010) und
(Masterarbeit (Plücker, 2017))

0,3 % (w/v) Hefeextrakt

0,3 % (w/v) Malzextrakt

0,5 % (w/v) Bacto Pepton

1,0 % (w/v) Glucose

0,6 % (w/v) Pflanzenagar (nur für Festmedium)

In H₂O_{bid.}

NSY-Glycerin (zum Einfrieren von Kulturen)

0,8 % (w/v) Nutrient Broth

0,1 % (w/v) Hefeextrakt

0,5 % (w/v) Saccharose

80 % (v/v) 87 % Glycerin

In H₂O_{bid.}

YMPG-Regenerationsmedium

0,3 % (w/v) Hefeextrakt

0,3 % (w/v) Malzextrakt

0,5 % (w/v) Bacto Pepton

1,0 % (w/v) Glucose

1 M Saccharose

0,6 % (w/v) Pflanzenagar oder 1 % (w/v) Phytigel

In H₂O_{bid.}

Außerdem wurden für die Kultivierung von *T. thlaspeos* YEPS light und CMg verwendet. Diese sind identisch zu den für *U. maydis* verwendeten Medien mit Ausnahme des Geliemittels. Hier wurde für Festmedien statt Bacto Agar 0,6 % (w/v) Pflanzenagar oder 1 % (w/v) Phytigel verwendet.

Antibiotika

Antibiotika wurden nach dem Autoklavieren und Abkühlen der Medien auf ca. 60 °C unter sterilen Bedingungen hinzugefügt.

Für die Selektion für *E. coli*

Antibiotikum	Konzentration	Medium
Ampicillin	100 µg/mL	YT, dYT
Kanamycin	50 µg/mL	YT, dYT
Gentamicin	50 µg/mL	YT, dYT

Für die Selektion von *U. maydis*

Antibiotikum	CMg, YL	Regenerationsagar
Hygromycin B	200 µg/mL	400 µg/mL
Nourseothricin	150 µg/mL	300 µg/mL

Für die Selektion von *T. thlaspeos*

Antibiotikum	YL (Flüssigmedium oder Festmedium mit 0,6 % Pflanzenagar)	YMPG + 1 M Saccharose + 0,6 % Pflanzenagar
Hygromycin B	10 µg/mL	10 µg/mL
Nourseothricin	5 µg/mL	50 µg/mL

Enzyme

Enzym	Bezugsquelle
Alkalische Phosphatase	Roche
Lysozym	Merck
Glucanex	Sigma-Aldrich
Yatalase	Takara Bio
Phusion DNA-Polymerase	NEB
Taq-Polymerase	Laborpräparation
Restriktionsendonukleasen	NEB
Ribonuklease A	Boehringer
T4-DNA-Ligase	Roche
Quick Ligase	NEB
DNase I	Roche

Größenstandards für die Gelelektrophorese

Bezeichnung	Hersteller
λ <i>Pst</i> I: Mit dem Restriktionsenzym <i>Pst</i> I geschnittene genomische DNA des Phagen λ	λ genomische DNA von Thermo Scientific
Generuler 1 kb DNA Ladder	Fermentas/ThermoScientific
Generruler 50 bp DNA Ladder	Fermentas/ThermoScientific
O'RangeRuler 10 bp	Thermo Fisher
2-Log DNA Ladder	NEB

Kits

Alle in dieser Arbeit verwendeten Kits wurden nach Herstellerangaben verwendet.

Name	Verwendungszweck	Hersteller
Monarch DNA Gel Extraction Kit	Gelextraktion von DNA-Fragmenten	NEB
Monarch PCR & DNA Cleanup Kit	Aufreinigung von PCR-Produkten	NEB
NucleoSpin Plasmid Kit	Plasmidpräparation aus <i>E. coli</i>	Machery-Nagel
Plasmid Midi Kit (100)	Plasmidpräparation aus <i>E. coli</i>	Qiagen
PCR-DIG-Labeling Kit	Herstellung von Digoxigenin-markierten DNA-Sonden	Roche
SureClean	Aufreinigung von PCR-Produkten und Restriktionsansätzen	Bioline
Zero Blunt TOPO PCR Klonierungskit (450245)	Zwischenklonierung von PCR-Fragmenten	Thermo Fisher
NEBNext Multiplex Small RNA Library Prep Set for Illumina (Set 1)	Herstellung von sRNA-Bibliotheken	NEB

4.1.2. Oligonukleotide

Die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide wurden bei der Firma Metabion GmbH synthetisiert. Alle für die Klonierung von Plasmiden verwendeten Oligonukleotide sind in der nachfolgenden Tabelle aufgelistet.

Tabelle 16 Liste aller in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide für die Klonierung von Plasmiden.

Name	Nukleotidsequenz (5' zu 3')
DD832	CTCGCTCTTCGGCCATGAAGAAGCCCAAGCTCACCG
DD833	GCTCTTCCAGGCCTTACTTGTAGAGCTCGTCCATGC
UM103	ACTGCTCTTCAGTGAATATTCAAGGCCCGATCTCTGGGCGCATG
UM104	ATAGCTCTTCAGGCATCGCTGGAGCCTAATGACAC
UM105	ATTGCTCTTCACCTACCTGTGCGCCGGGTCGTGAC
UM106	ATAGCTCTTCGGAAGAACTGATCGGCGGTCGTC
UM107	ATAGCTCTTCGTTCCAGGACGAGGAGGGTGCGTAG
UM108	AGCGCTCTTCAGACAATATCCCTTTGACTTCGCAGATGCCGTAC
UM221	CGGGCTCTTCAGGCTCTTGATGTGATGACTGTTTTG
UM222	GCCGCTCTTCACCTTTGTCTCTTTTATCAGCACAC
UM223	AGCGCTCTTCAGACAATATTCGTCCATCGCTACGTACCTG
UM224	ATCGCTCTTCAGACAATATTAACCGTCGAGCCGGATGCCAAG
UM225	ACTGCTCTTCAGTGAATATTTGCGGCGGCTGACGACGGTG
UM226	GCCGCTCTTCAGACAATATTAGGGCTTGTCTTGCTTTGCG
UM227	ACTGCTCTTCAGTGAATATTCGAAGGTGTTTCGACTCCCCAGGC
UM228	GGCGCTCTTCAGACAATATTGACTTAACAAGTTTTTGAGGCTCACGTCCCC
UM229	GCCGCTCTTCAGTGAATATTCGCGTGCCTCGTTCATTAC
UM42	ATAGCTCTTCACCTAAGGCCTGGGAATCGCTGCTAC
UM43	ATAGCTCTTCAGACGGCCACTCAGGCCTATCTAGGACGGACGTTGAC
UP827	ATAGCTCTTCAGTGGGCCTAGATGGCCGTGCGGCTCCCGAATTTTATC
UP828	ATAGCTCTTCAGGCGGCCGATGGGCTATGTGAGTG
UP834	ATAGCTCTTCAGTGGGCCTAGATGGCCGTGCGGAGGAAGGCAAGAGATG
UP835	ATAGCTCTTCAGGCGGCCCTTGAAGTGCGGCTGTG
UP836	ATAGCTCTTCACCTCCTATGGCGGCCTCGGCCATC
UP837	ATAGCTCTTCAGACGGCCACTCAGGCCCGTCGGCAACACCATACTGACC
UP895	ACAGGCCTATATGGCCAGTTCATCTGCACCACCGGCAAGC
UP896	ATAGGCCACTCAGGCCTTGATGCCGTTCTTCTGCTTG
UP897	ATAGGCCATATAGGCCAGTTCATCTGCACCACCGGCAAGC
UP898	AATGGCCTAGATGGCCTTGATGCCGTTCTTCTGCTTG
UP899	ACTGGCCTATATGGCCGTGAGCAGCAGTCGTGTCTCTCCCTTC
UP900	ATAGGCCATATAGGCCCTGTGAGTGAGGGTGGTGCAAGGGAAC

4.1.3. Plasmide

In den beiden nachfolgenden Tabellen werden alle in dieser Arbeit verwendeten Plasmide gelistet, die zu Beginn dieser Arbeit zur Verfügung standen und für die Klonierung von Plasmiden oder der Stammgeneration genutzt wurden, und die im Rahmen dieser Arbeit erstellt wurden. Alle Klonierungsschritte wurden durch Restriktionsanalysen überprüft und PCR-Amplifikate nach erfolgreicher Klonierung sequenziert.

Tabelle 17 Liste der in dieser Arbeit verwendeten Plasmide. AmpR Ampicillin-Resistenz, KanR Kanamycin-Resistenz, GentR Gentamicin-Resistenz, ZeoR Zeocin-Resistenz, natR Nourseothricin-Resistenz.

Bezeichnung		Beschreibung	Verwendungs-zweck	Resis-tenz <i>E. coli</i>	Resis-tenz Pilz	Referenz
pUC57_AmpR_SapI_dest	pUMa 2074	Vektorrückgrat für die Golden-Gate-Klonierung. Es enthält ein <i>lacZ</i> -Gen mit zwei <i>SapI</i> -Schnittstellen. Dieses Plasmid ist ein Derivat des kommerziell erwerblichen pUC57-Plasmides.	Vorläufer für pUMa3740	AmpR	-	(Müntjes, 2013)
SapI-storage vector_hygR	pUMa 2242	Lagerplasmid für die Golden-Gate-Klonierung. Es kodiert eine von <i>SapI</i> - und <i>SfiI</i> -Schnittstellen flankierte Hygromycin-Resistenzkassette.	Vorläufer für pUMa3741	GentR	-	(Müntjes, 2013)
TtPhsp70_hpt-gfp_TtThsp70	pUMa 2790	Plasmid zur zufälligen Integration in ein Genom. Kodiert ein Fusions-Gen für die Hygromycin-Phosphotransferase (<i>hpt</i>) fusioniert an <i>gfp</i> . Diese Gene sind für <i>U. maydis</i> Codon-optimiert. Expression wird gesteuert von dem <i>hsp70</i> (THTG_01007) -Promotor und - Terminator aus <i>T. thlaspeos</i> .	Etablierung der Transformation von <i>T. thlaspeos</i>	AmpR	-	(Plücker et al., 2021)
TtPrps27_hpt-gfp_TtTrps27	pUMa 2792	Plasmid zur zufälligen Integration in ein Genom. Kodiert ein Fusions-Gen für die Hygromycin-Phosphotransferase (<i>hpt</i>) fusioniert an <i>gfp</i> . Diese Gene sind für <i>U. maydis</i> Codon-optimiert. Expression wird gesteuert von dem <i>rps27</i> (THTG_04331) -Promotor und - Terminator aus <i>T. thlaspeos</i> .	Etablierung der Transformation von <i>T. thlaspeos</i>	AmpR	-	(Plücker et al., 2021)
pNEBUN	pUMa 419	Plasmid enthält eine Nourseothricin-Resistenzkassette bestehend aus dem <i>gap1</i> -Promotor, dem <i>nat1</i> -Gen und dem <i>cyc1</i> -Terminator aus <i>S. cerevisiae</i> . Enthält außerdem eine Sequenz	Transformation in <i>U. maydis</i>	AmpR	NatR	(Weinzierl, 2001)

		zur autonomen Replikation in <i>U. maydis</i> .				
pCR-Blunt II-TOPO		Kommerziell erworbenes Vektorrückgrad zur Klonierung von PCR-Produkten. Enthält das <i>ccdB</i> -Gen zur direkten Auswahl positiver Transformanten.	Klonierungen von Komponenten für Resistenzkassetten für <i>T. thlaspeos</i>	KanR, ZeoR	ZeoR	Thermo Fisher #450245

Tabelle 18 Liste der in dieser Arbeit hergestellten Plasmide. AmpR Ampicillin-Resistenz, KanR Kanamycin-Resistenz, GentR Gentamicin-Resistenz, ZeoR Zeocin-Resistenz, HygR Hygromycin-Resistenz, natR Nourseothricin-Resistenz.

Bezeichnung		Beschreibung	Verwendungszweck	Resistenz <i>E. coli</i>	Resistenz Pilz	Referenz
TtPhsp70_hpt-gfp_TtTrps27	pUMa 3030	Plasmid zur zufälligen Integration in ein Genom. Kodiert ein Fusions-Gen für die Hygromycin-Phosphotransferase (<i>hpt</i>) fusioniert an <i>gfp</i> . Diese Gene sind für <i>U. maydis</i> Codon-optimiert. Expression wird gesteuert von dem <i>hsp70</i> (THTG_01007) -Promotor und <i>rps27</i> (THTG_04331) - Terminator aus <i>T. thlaspeos</i> .	Etablierung der Transformation von <i>T. thlaspeos</i>	AmpR	HygR	diese Arbeit, In Kollaboration mit Janice Darenberg, (Plücker et al., 2021)
TtPrps27_hpt-gfp_TtThsp70	pUMa 3031	Plasmid zur zufälligen Integration in ein Genom. Kodiert ein Fusions-Gen für die Hygromycin-Phosphotransferase (<i>hpt</i>) fusioniert an <i>gfp</i> . Diese Gene sind für <i>U. maydis</i> Codon-optimiert. Expression wird gesteuert von dem <i>rps27</i> (THTG_04331) -Promotor und <i>hsp70</i> (THTG_01007) - Terminator aus <i>T. thlaspeos</i> .	Etablierung der Transformation von <i>T. thlaspeos</i>	AmpR	HygR	diese Arbeit, In Kollaboration mit Janice Darenberg, (Plücker et al., 2021)
TtPhsp70_hpt-gfp	pUMa 3623	Lagerplasmid für die Hygromycin-Resistenzkassette	Vorläufer für pUMa3776	AmpR	HygR	diese Arbeit

TtThsp70 dest		für <i>T. thlaspeos</i> . Kodiert ein für <i>U. maydis</i> Codon-optimiertes Fusionsgen für die Hygromycin-Phosphotransferase (<i>hpt</i>) und <i>gfp</i> , dessen Expression durch den <i>hsp70</i> (THTG_01007) - Promotor und -Terminator aus <i>T. thlaspeos</i> kontrolliert wird. Diese Resistenzkassette wird von <i>SfiI</i> -Schnittstellen flankiert.				
TtPhsp70_ Sapl_ component	pUMa 3635	Lagerplasmid für die Golden-Gate-Klonierung. Enthält den Promotor des <i>hsp70</i> -Gens (THTG_01007) aus <i>T. thlaspeos</i> flankiert von <i>Sapl</i> -Schnittstellen.	Vorläufer für pUMa3740 und pUMa3623	KanR, ZeoR	ZeoR	diese Arbeit
TtThsp70_ Sapl_ component	pUMa 3636	Lagerplasmid für die Golden-Gate-Klonierung. Enthält den Terminator des <i>hsp70</i> -Gens (THTG_01007) aus <i>T. thlaspeos</i> flankiert von <i>Sapl</i> -Schnittstellen.	Vorläufer für pUMa3740 und pUMa3623	KanR, ZeoR	ZeoR	diese Arbeit
TtPrps27_ Sapl_ component	pUMa 3637	Lagerplasmid für die Golden-Gate-Klonierung. Enthält den Promotor des <i>rps27</i> -Gens (THTG_04331) aus <i>T. thlaspeos</i> flankiert von <i>Sapl</i> -Schnittstellen.	Vorläufer für pUMa3742	KanR, ZeoR	ZeoR	diese Arbeit
TtTrps27_ Sapl_ component	pUMa 3638	Lagerplasmid für die Golden-Gate-Klonierung. Enthält den Terminator des <i>rps27</i> -Gens (THTG_04331) aus <i>T. thlaspeos</i> flankiert von <i>Sapl</i> -Schnittstellen.	Vorläufer für pUMa3742	KanR, ZeoR	ZeoR	diese Arbeit
nat1Um_ Sapl_ component	pUMa 3662	Lagerplasmid für die Golden-Gate-Klonierung. Kommerziell erworbenes Plasmid von der Firma IDT. Enthält ein für <i>U. maydis</i> Codon-optimierte Nourseothricin N-Acetyltransferase. Enthält keine <i>BsaI</i> -Schnittstellen. Enthält C-terminal eine <i>NcoI</i> -Schnittstelle zur Fusion an ein weiteres Gen. Flankiert von <i>Sapl</i> -Schnittstellen.	Vorläufer für pUMa3740	KanR	-	diese Arbeit
TtPhsp70_ nat1Um _TtThsp70	pUMa 3740	Plasmid zur zufälligen Integration in ein Genom. Kodiert eine für <i>U. maydis</i>	Etablierung der nat1Um-Resistenz-	AmpR	NatR	diese Arbeit

		Codon-optimierte Nourseothricin N-Acetyltransferase. Die Expression wird gesteuert von dem <i>hsp70</i> (THTG_01007) - Promotor und -Terminator aus <i>T. thlaspeos</i> .	kassette in <i>T. thlaspeos</i>			
gfp-silence_ SapI_ component	pUMa 3741	Lagerplasmid für die Golden-Gate-Klonierung. Kodiert ein 365 bp Fragment von <i>gfp</i> , gefolgt von dem Intron des <i>bW1</i> -Gens aus <i>T. thlaspeos</i> , wiederum gefolgt von einem 365 bp-Fragment von <i>gfp</i> in antisense-Orientierung. Dieses Konstrukt ist flankiert von SapI-Schnittstellen.	Vorläufer für pUMa3742	GentR	-	diese Arbeit
TtPrps27_ GFP-silence_ TtTrps27	pUMa 3742	Lagerplasmid, welches ein 365 bp Fragment von <i>gfp</i> , gefolgt von dem Intron des <i>bW1</i> -Gens aus <i>T. thlaspeos</i> , wiederum gefolgt von einem 365 bp-Fragment von <i>gfp</i> in antisense-Orientierung enthält. Die Expression dieses Konstruktes wird kontrolliert von dem <i>rps27</i> (THTG_04331) -Promotor und Terminator aus <i>T. thlaspeos</i> .	Vorläufer für pUMa3743	AmpR	-	diese Arbeit
TtPrps27_ GFP-silence_ TtTrps27_ nat1Um	pUMa 3743	Plasmid zur zufälligen Integration in ein Genom. Kodiert ein Konstrukt zum silencen von <i>gfp</i> und eine Nourseothricin-Resistenzkassette. Erstere besteht aus einem 365 bp Fragment von <i>gfp</i> , gefolgt von dem Intron des <i>bW1</i> -Gens aus <i>T. thlaspeos</i> , wiederum gefolgt von einem 365 bp-Fragment von <i>gfp</i> in antisense-Orientierung. Die Expression dieses Konstruktes wird kontrolliert von dem <i>rps27</i> (THTG_04331) - Promotor und Terminator aus <i>T. thlaspeos</i> . Die Nourseothricin-	Stammherstellung in <i>T. thlaspeos</i>	AmpR	NatR	diese Arbeit

		Resistenzkassette besteht aus dem für <i>U. maydis</i> Codon-optimierten <i>nat1Um</i> unter der Kontrolle des <i>hsp70</i> (THTG_01007) -Promotors und Terminators von <i>T. thlaspeos</i> .				
hpt-gfp_Sapl_component	pUMa 3770	Lagerplasmid für die Golden-Gate-Klonierung. Enthält ein für <i>U. maydis</i> Codon-optimiertes Fusionsgen für die Hygromycin-Phosphotransferase (<i>hpt</i>) und <i>gfp</i> , welches von <i>Sapl</i> -Schnittstellen flankiert ist.	Vorläufer für pUMa3623	KanR, ZeoR	ZeoR	diese Arbeit
TtPhsp70_hpt-gfp_TtThsp70_Sapl_stor	pUMa 3776	Lagerplasmid für die Golden-Gate-Klonierung. Enthält ein für <i>U. maydis</i> Codon-optimiertes Fusionsgen für die Hygromycin-Phosphotransferase (<i>hpt</i>) und <i>gfp</i> , dessen Expression durch den <i>hsp70</i> (THTG_01007) - Promotor und -Terminator aus <i>T. thlaspeos</i> kontrolliert wird. Diese Resistenzkassette wird von <i>SfiI</i> - und <i>Sapl</i> -Schnittstellen flankiert.	Vorläufer für pUMa3777	GentR	HygR	diese Arbeit
dicerΔ_hpt-gfp	pUMa 3777	Plasmid zur Deletion von Dicer (THTG_04838) in <i>T. thlaspeos</i> mittels homologer Rekombination. Besteht aus dem für <i>U. maydis</i> Codon-optimierten Fusionsgen für die Hygromycin-Phosphotransferase (<i>hpt</i>) und <i>gfp</i> , dessen Expression durch den <i>hsp70</i> (THTG_01007) - Promotor und -Terminator aus <i>T. thlaspeos</i> kontrolliert wird. Diese Resistenzkassette wird flankiert von 1 kb langen homologen Flanken zum Dicer-Lokus in <i>T. thlaspeos</i> .	Stammherstellung in <i>T. thlaspeos</i>	AmpR	HygR	diese Arbeit
gfp-antisense	pUMa 3811	Lagerplasmid für ein Fragment des für <i>U. maydis</i> Codon-optimierten <i>gfp</i> -Gens in antisense-Orientierung. Das	Vorläufer für pUMa3741	KanR, ZeoR	ZeoR	diese Arbeit, In Kollaboration mit

		Fragment ist flankiert von <i>SfiI</i> -Schnittstellen.				Dominik Bozek
gfp-sense	pUMa 3812	Lagerplasmid für ein Fragment des für <i>U. maydis</i> Codon-optimierten <i>gfp</i> -Gens in sense-Orientierung. Das Fragment ist flankiert von <i>SfiI</i> -Schnittstellen.	Vorläufer für pUMa3741	KanR, ZeoR	ZeoR	diese Arbeit, In Kollaboration mit Dominik Bozek
TtbW1-Intron	pUMa 3813	Lagerplasmid für das Intron des <i>bW1</i> -Gens aus <i>T. thlaspeos</i> . Das Fragment ist flankiert von <i>SfiI</i> -Schnittstellen.	Vorläufer für pUMa3741	KanR, ZeoR	ZeoR	diese Arbeit, In Kollaboration mit Dominik Bozek
pra1Δ_hpt-gfp_250bp	pUMa 3884	Plasmid zur Deletion von <i>pra1</i> in <i>T. thlaspeos</i> mittels homologer Rekombination. Besteht aus dem für <i>U. maydis</i> Codon-optimierten Fusionsgen für die Hygromycin-Phosphotransferase (<i>hpt</i>) und <i>gfp</i> , dessen Expression durch den <i>hsp70</i> (THTG_01007) - Promotor und -Terminator aus <i>T. thlaspeos</i> kontrolliert wird. Diese Resistenzkassette wird flankiert von 250 bp langen homologen Flanken zum <i>pra1</i> -Lokus in <i>T. thlaspeos</i> .	Stammherstellung in <i>T. thlaspeos</i>	AmpR	HygR	diese Arbeit
pra1Δ_hpt-gfp_500bp	pUMa 3885	Plasmid zur Deletion von <i>pra1</i> in <i>T. thlaspeos</i> mittels homologer Rekombination. Besteht aus dem für <i>U. maydis</i> Codon-optimierten Fusionsgen für die Hygromycin-Phosphotransferase (<i>hpt</i>) und <i>gfp</i> , dessen Expression durch den <i>hsp70</i> (THTG_01007) - Promotor und -Terminator aus <i>T. thlaspeos</i> kontrolliert wird. Diese Resistenzkassette wird flankiert von 500 bp langen homologen Flanken zum <i>pra1</i> -Lokus in <i>T. thlaspeos</i> .	Stammherstellung in <i>T. thlaspeos</i>	AmpR	HygR	diese Arbeit

pra1Δ_hpt-gfp_1kb	pUMa 3886	Plasmid zur Deletion von <i>pra1</i> in <i>T. thlaspeos</i> mittels homologer Rekombination. Besteht aus dem für <i>U. maydis</i> Codon-optimierten Fusionsgen für die Hygromycin-Phosphotransferase (<i>hpt</i>) und <i>gfp</i> , dessen Expression durch den <i>hsp70</i> (THTG_01007) - Promotor und -Terminator aus <i>T. thlaspeos</i> kontrolliert wird. Diese Resistenzkassette wird flankiert von 1 kb langen homologen Flanken zum <i>pra1</i> -Lokus in <i>T. thlaspeos</i> .	Stammherstellung in <i>T. thlaspeos</i>	AmpR	HygR	diese Arbeit
pra1Δ_hpt-gfp_2kb	pUMa 3887	Plasmid zur Deletion von <i>pra1</i> in <i>T. thlaspeos</i> mittels homologer Rekombination. Besteht aus dem für <i>U. maydis</i> Codon-optimierten Fusionsgen für die Hygromycin-Phosphotransferase (<i>hpt</i>) und <i>gfp</i> , dessen Expression durch den <i>hsp70</i> (THTG_01007) - Promotor und -Terminator aus <i>T. thlaspeos</i> kontrolliert wird. Diese Resistenzkassette wird flankiert von 2 kb langen homologen Flanken zum <i>pra1</i> -Lokus in <i>T. thlaspeos</i> .	Stammherstellung in <i>T. thlaspeos</i>	AmpR	HygR	diese Arbeit

4.1.4. Stämme

E. coli

Für alle Klonierungen wurde der *E. coli* Stamm TOP10 (Invitrogen) verwendet. Dieser Stamm besitzt folgenden Genotyp: *F-mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80lacZΔM15 ΔlacX74 nupG recA1 araD139 Δ(ara-leu)7697 galE15 galK16 rpsL(StrR) endA1 λ-*.

U. maydis

Die nachfolgend gelisteten *U. maydis*-Stämme wurden in dieser Arbeit verwendet (Tabelle 19) oder hergestellt (Tabelle 20).

Tabelle 19 In dieser Arbeit verwendete *U. maydis*-Stämme. PhleoR Phleomycin-Resistenz, CbxR Carboxin-Resistenz.

Stamm	Genotyp	Stammnummer (UMa)	Resistenz	Referenz
SG200	a1:mfa2, bE1, bW2	67	PhleoR	(Kämper et al., 2006)
FB1	a1 b1	51	-	(Banuett and Herskowitz, 1989)
FB1_cbxR:Potef_gfp_Tnos	a1 b1; Potef_gfp_Tnos_cbxR	3	CbxR	(Weinzierl, 2001)

Tabelle 20 In dieser Arbeit hergestellte *U. maydis*-Stämme. hygR Hygromycin-Resistenz.

Stamm	Genotyp	Resistenz	Ausgangsstamm	Integriertes Plasmid
FB1_Plasmid:TtPhsp70_hpt-gfp_TtTrps27	a1 b1; TtPhsp70_hpt-gfp_TtTrps27	hygR	FB1	pUMa3030
FB1_Plasmid:TtPrps27_hpt-gfp_TtThsp70	a1 b1; TtPrps27_hpt-gfp_TtThsp70	hygR	FB1	pUMa3031

T. thlaspeos

Die nachfolgend gelisteten *T. thlaspeos*-Stämme wurden in dieser Arbeit verwendet (Tabelle 21).

Tabelle 21 In dieser Arbeit verwendete *T. thlaspeos*-Stämme. HygR Hygromycin-Resistenz.

Stamm	Genotyp	Stammnummer (UMa)	Resistenz	Referenz
LF1	a1 b1	2019		(Frantzeskakis et al., 2017)
LF2	a2 b2	2020		(Frantzeskakis et al., 2017)
LF1_hpt-gfp	a1 b1; TtPhsp70_hpt-gfp_TtThsp70	2478	HygR	(Plücker et al., 2021)
LF2_hpt-cherry	a2 b2; TtPhsp70_hpt-mcherry_TtThsp70	2750	HygR	(Plücker et al., 2021)

4.1.5. Zentrifugen

Die in den einzelnen Methoden angegebenen Umdrehungszahlen beziehen sich auf folgende Zentrifugen. Für Reaktionsgefäße mit 1,5 mL oder 2 mL wurde eine Heraeus Pico 17 Tischzentrifuge (Thermo Scientific) verwendet. Für die Isolierung von Protoplasten aus *U. maydis* wurde eine Heraeus Biofuge Stratos (Rotor #3341, Thermo Scientific) eingesetzt. Für die Isolierung von Protoplasten aus *T. thlaspeos* wurde eine Hettich Rotina 380R (Rotor #1754, Thermo Scientific) verwendet.

4.1.6. Sonstige Materialien

Pflanzenagar (Duchefa Biochemie, Haarlem, Niederlande)

Phytigel (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland)

4.2. Mikrobiologische, zellbiologische und genetische Methoden

Alle Arbeiten mit Mikroorganismen wurden unter sterilen Bedingungen und unter Einhaltung des Gentechnikgesetzes (Sicherheitsstufe 1) durchgeführt. Der während der Arbeit anfallende mikrobiologische Abfall wurde vor der Entsorgung rückautoklaviert.

4.2.1. Arbeiten mit *E. coli*

Kultivierung von *E. coli*

E. coli wurde entweder auf YT-Festmedium oder in dYT-Flüssigmedium mit dem zum Plasmid passenden Antibiotikum unter aeroben Bedingungen bei 37 °C über Nacht kultiviert. Flüssigkulturen wurden dabei in Reagenzgläsern auf einem Drehrad bei 200 rpm geschüttelt.

Bestimmung der Zelldichte von Flüssigkulturen

Die Zelldichte von Flüssigkulturen wurde als optische Dichte (OD) bei einer Wellenlänge von 600 nm in einem Spektralphotometer (Novospec II Photometer, Pharmacia Biotech) gemessen. Als Leerprobe wurde steriles Anzuchtmedium verwendet. Um korrekte Messwerte zu erhalten, wurden die Proben ggf. so weit mit sterilen Anzuchtmedium verdünnt, dass sich die gemessene optische Dichte im linearen Messbereich zwischen $OD_{600} = 0,2-0,5$ befand. Eine OD_{600} von 1,0 entspricht etwa 10^9 Zellen.

Herstellung chemisch kompetenter Zellen

Chemisch kompetente *E. coli*-Zellen wurden mit der Rubidiumchlorid-Methode hergestellt (modifiziert nach (Cohen et al., 1972)). Hierzu wurden 100 mL dYT-Medium mit 10 mM $MgCl_2$ und 10 mM $MgSO_4$ versetzt, mit 1 mL einer TOP10 Übernachtskultur inokuliert und bei 37 °C schüttelnd bis zum Erreichen einer OD_{600} von 0,5 inkubiert. Anschließend wurden die Zellen durch Zentrifugation (3000 rpm, 15 min, 4 °C) geerntet, das Zellpellet in 33 mL eiskalter RF1-Lösung resuspendiert und für 30-60 min auf Eis inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation (3000 rpm, 15 min, 4 °C) wurde das Zellpellet in 5 mL RF2-Lösung resuspendiert und für 15 min auf Eis inkubiert. Schließlich wurden Aliquots zu je 50 μ L in 1,5 mL Reaktionsgefäße transferiert, diese in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

RF1-Lösung

100 mM RbCl

50 mM $MnCl_2 \times 4 H_2O$

30 mM KAc

10 mM $CaCl_2 \times 2 H_2O$

15% (v/v) Glycerin in H_2O_{bid} .

Mit Essigsäure auf pH 5,8 einstellen und sterilfiltrieren

RF2-Lösung

10 mM MOPS

10 mM RbCl

75 mM $CaCl_2 \times 2 H_2O$

15% (v/v) Glycerin in H_2O_{bid} .

Mit NaOH auf pH 5,8 einstellen und sterilfiltrieren

Transformation von *E. coli*

Für die Transformation wurden Aliquots der bei -80°C gelagerten chemisch kompetenten Zellen für 10 min auf Eis aufgetaut und mit folgender Menge Plasmid-DNA oder Ligationsansatz versetzt:

Retrafo	1 µL DNA
TOPO-Klonierung	5 µL DNA
Ligation	10 µL DNA
Bsal-Ligation	2 µL DNA

Anschließend wurde der Transformationsansatz für 30 min auf Eis inkubiert. Nach einem 45-sekündigen Hitzeschock bei 42 °C wurden 250 µL dYT-Flüssigmedium zugegeben. Nach 30 min schüttelnder Inkubation bei 37 °C wurden die Zellen auf selektivem YT-Festmedium ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

4.2.2. Arbeiten mit *U. maydis*

Kultivierung

Stämme von *U. maydis* wurden aus bei -80 °C gelagerten Glycerinkulturen auf CMg-Festmedium, ggf. mit passendem Antibiotikum, ausgestrichen und bei 28 °C inkubiert. Bis zu ihrer Verwendung wurden die Kulturen auf Festmedium bis zu vier Wochen bei 4 °C gelagert. Diese wurden zur Inokulation von YL-Flüssigmedium genutzt, welche über Nacht bei 28 °C auf einem Drehrad bei 200 rpm inkubierten. Von diesen wurde eine Hauptkultur in CMg- oder YL-Flüssigmedium angesetzt, welche über Nacht bei 28 °C bei 200 rpm schüttelnd inkubiert wurde. Dabei betrug das Volumen der Kultur maximal ein Fünftel des nominalen Volumens verwendeten Schikanekolbens.

Bestimmung der Zelldichte von *U. maydis*

Die Zelldichte von *U. maydis* wurde auf dieselbe Art bestimmt wie die für *E. coli*. Eine OD₆₀₀ von 1,0 entspricht etwa $1-5 \cdot 10^7$ Zellen.

Herstellung von Protoplasten von *U. maydis*

Für die Herstellung von Protoplasten aus *U. maydis* wurde ein modifiziertes Protokoll nach (Gillissen et al., 1992, Schulz et al., 1990, Bösch et al., 2016) verwendet. Dazu wurde eine Hauptkultur in 50 mL YL-Flüssigmedium mit einer Vorkultur inokuliert und über Nacht schüttelnd bei 200 rpm bei 28 °C inkubiert. Bei einer OD₆₀₀ von 0,6-1,0 wurde die Kultur für 5 min bei 3000 rpm abzentrifugiert, das Zellpellet mit 20 mL SCS-Puffer resuspendiert und erneut für 5 min bei 3000 rpm zentrifugiert. Anschließend wurde das Pellet in 2 mL Protoplastierungslösung (12,5 mg/mL Glucanex in SCS-Puffer, sterilfiltriert; Glucanex wird als Trichoderma Lysing Enzymes (L1412) von Sigma Aldrich vertrieben) resuspendiert und für 5-20 min bei RT inkubiert bis etwa 70 % der Zellen mikroskopisch sichtbar protoplastiert waren. Dann wurden die Zellen vorsichtig mit 10 mL eiskaltem SCS-Puffer versetzt und für 5 min bei 2400 rpm bei 4 °C zentrifugiert. Dieser Waschschrift wurde weitere zwei Mal durchgeführt. Anschließend wurde das Pellet in 10 mL eiskaltem STC-Puffer resuspendiert, erneut für 5 min

bei 2400 rpm und 4 °C zentrifugiert und schließlich in 1 mL eiskaltem STC gelöst. Die Protoplasten wurden zu je 100 µL in vorgekühlte 2 mL Reaktionsgefäße aliquotiert. Bis zur Verwendung wurden die Protoplasten bei -80 °C gelagert.

SCS-Puffer

20 mM Na-Citrat (pH 5,8)
1 M Sorbitol
in H₂O_{bid.}

STC-Puffer

50 % (v/v) 2 M Sorbitol
1,0 % (v/v) 1 M Tris/HCl (pH 7,5)
10 % (v/v) 1 M CaCl₂
In H₂O_{bid.}

Transformation von *U. maydis*

Die Transformation wurde durchgeführt nach Bösch et al. (Bösch et al., 2016). Bei -80 °C gelagerte Protoplasten von *U. maydis* wurden auf Eis aufgetaut, mit 1 µL Heparinlösung und 1 µg DNA versetzt und 10 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden 500 µL STC/PEG hinzugefügt und durch vorsichtiges Invertieren gemischt. Nach 15 min auf Eis wurden die transformierten Protoplasten auf Regenerationsmedium ausgestrichen. Dieses besteht aus zwei gleich dicken Schichten, wobei nur in der unteren Schicht Antibiotikum zugesetzt wurde. Diese Platten wurden stets kurz vor dem Ausbringen der Protoplasten hergestellt. Die Inkubation erfolgte bei 28 °C für 5-10 Tage, bis Kolonien sichtbar wurden. Anschließend wurden die Kolonien auf CMg-Festmedium mit entsprechendem Antibiotikum vereinzelt.

Heparinlösung

15 mg/mL Heparin
in H₂O_{bid.}
sterilfiltriert

STC/PEG

60 % (v/v) STC-Puffer
40 % (w/v) PEG 4000

4.2.3. Arbeiten mit *T. thlaspeos*

Kultivierung

Zur Kultivierung von *T. thlaspeos* wurden ca. 1,2 mL einer Kryokultur in 10-20 mL YL-Flüssigmedium in einem Schikanekolben inokuliert und bei 18-20 °C schüttelnd bei 200 rpm inkubiert. Bei der Kultivierung betrug das Volumen der Kultur maximal ein Fünftel des nominalen Volumens verwendeten Schikanekolbens. Die restlichen 500 µL der Kryokultur wurden auf YL-Festmedium mit Phytigel oder Pflanzenagar ausgebracht, mit Nescofilm versiegelt und bei 18-20 °C inkubiert, bis sie sichtbar angewachsen waren. Die erste Subkultivierung in Flüssigmedium erfolgte meist 4-10 Tage später, wenn die Kultur sichtbar dichter erschien. Weitere Subkultivierungen wurden alle 3-4 Tage durchgeführt, indem die Kultur auf eine OD₆₀₀ von 0,05 in neuem YL-Flüssigmedium inokuliert wurde. Auf diese Weise wurden die Kulturen etwa sechs Monate weiter subkultiviert, dann wurden neue Kulturen aus Kryokulturen angeimpft. Kryokulturen wurden aus exponentiell wachsenden Kulturen

hergestellt, indem die Kultur 1:1 mit NSY-Glycerin gemischt und sofort bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gefroren wurde. Für die Messung einer Wachstumskurve wurde die Kultur auf eine $\text{OD}_{600} = 0,05$ eingestellt und über 10 Tage täglich die OD_{600} und das Frischgewicht gemessen. Dazu wurden 10 mL der Kultur durch einen CellStrainer (40 μm , VWR, Darmstadt, Deutschland) gefiltert, restliches Medium am CellStrainer von unten abpipettiert und gewogen. Anschließend wurden die Werte gegen die Zeit und gegeneinander aufgetragen.

Die Kultivierung von Hygromycin-resistenten Transformanten erfolgte für einige Monate nach demselben Prinzip in YL-Flüssigmedium mit 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Hygromycin B.

Bestimmung der Zelldichte

Die Zelldichte wurde bei *T. thlaspeos* auf dieselbe Weise bestimmt wie für *E. coli* und *U. maydis*. Aufgrund des mycelartigen Wachstums von *T. thlaspeos* wurde in dieser Arbeit nicht die Zellzahl pro Volumen, sondern das Frischgewicht bestimmt. Das Frischgewicht von exponentiell wachsenden *T. thlaspeos*-Kulturen beträgt pro mL in YL etwa das 22-fache der OD_{600} .

Bestimmung der MIC von Antibiotika für *T. thlaspeos*

Für die Kultivierung wurden exponentiell wachsende Kulturen in CellStrainer (40 μm , VWR, Darmstadt, Deutschland) abfiltriert und in sterilem YL-Flüssigmedium auf eine OD_{600} von 3 bzw. 1 eingestellt. Hiervon wurden 10 μL auf YL-Festmedien und auf YMPG-Regenerationsmedium, jeweils mit 0,6 % Pflanzenagar oder 1 % Phytigel, getropft. Nach kurzem Antrocknen wurden die Platten mit Nescofilm versiegelt und bei $18\text{-}20\text{ }^{\circ}\text{C}$ für 8 Wochen inkubiert. Die Platten wurden mit einer stationär angebrachten Canon PowerShot A650 IS-Kamera (Canon Deutschland GmbH, Krefeld, Deutschland) fotografiert.

Kultivierung im Mikrobioreaktor

Für die Kultivierung von bis zu 48 parallelen Kulturen in kleinem Volumen mit *online*-Erfassung von Wachstum und Fluoreszenz wurde der BioLector I (m2p Labs, Baesweiler, Deutschland) verwendet. Hierzu wurden exponentiell wachsende Kulturen in sterilem YL-Flüssigmedium auf eine OD_{600} von 0,05 in Round-Well-Platten (m2p Labs, Baesweiler, Deutschland) oder Flower-Platten (m2p Labs, Baesweiler, Deutschland) mit einer Folie mit verdunstungsreduzierender Schicht (F-GPR48-10, m2p Labs, Baesweiler, Deutschland) oder atmungsaktiver Folie (Z721573, Sigma) in 1000 μL Füllvolumen eingestellt, sofern nicht anders vermerkt. Die Inkubation erfolgte im BioLector I bei $20\text{ }^{\circ}\text{C}$, aktivierter Humiditätskontrolle (85 %) und über 10 Tage schüttelnd für Round-Well-Platten bei 1000 rpm und Flower-Platten bei 1500 rpm. Es wurden immer drei technische Replikate inokuliert und das entsprechende Kulturmedium als Leerprobe als einzelnes technisches Replikat mitgeführt. Die Messung erfolgte alle 30 min

unter Verwendung folgender Filtersets: Biomasse $\lambda_{\text{Ex}} = 620 \text{ nm}$ / $\lambda_{\text{Em}} = 620 \text{ nm}$, GFP $\lambda_{\text{Ex}} = 488 \text{ nm}$ / $\lambda_{\text{Em}} = 520 \text{ nm}$, mCherry $\lambda_{\text{Ex}} = 580 \text{ nm}$ / $\lambda_{\text{Em}} = 610 \text{ nm}$. Die Gains betragen für den Biomasse-Channel 5, für den GFP-Channel 80 und für den mCherry-Channel 100, sofern nicht anders vermerkt. Bei der Datenauswertung wurde der Wert der Biomasse der Leerprobe von der der Probe subtrahiert und gegen die Zeit in einem Graphen dargestellt. Für die Verarbeitung und Auswertung der Daten wurde die Computerapplikation BioLecton sowie Prism verwendet.

Etablierung der Protoplastierungsbedingungen

Für die Identifikation geeigneter Zellwandabbauender Enzyme wurden die Protokolle von anderen Pilzen (Bösch et al., 2016, Zuccaro et al., 2009, de Bekker et al., 2009, Rabe et al., 2016) zunächst mit *T. thlaspeos* getestet. Dazu wurden Zellen aus Kulturen im CellStrainer (40 μm , VWR, Darmstadt, Deutschland) oder Miracloth aufgefangen, in Protoplastierlösung gewaschen und in der jeweiligen Enzymlösung resuspendiert. Die Inkubation erfolgte wie individuell angegeben. Der Protoplastierungserfolg und -fortschritt wurde mikroskopisch beobachtet.

Für die Quantifizierung der Protoplastenzahl in den verschiedenen Protoplastierungspuffern sowie für die Tests zur idealen Enzymkonzentration und -kombination wurde stets dasselbe Verhältnis von Zellen zu Enzymmenge eingesetzt (0,352 g Frischgewicht und 1,8 mL Enzymlösung) und die Zellen 30 min bei RT inkubiert. Die Quantifizierung der Protoplastenzahl erfolgte mit einer Neubauer-Zählkammer (Kammertiefe 0,01 mm). Die Tests zur idealen Enzymkonzentration und -kombination wurden mikroskopisch ausgewertet.

TPP1

0,1 M Citrat-Puffer
0,01 M EDTA
1,2 M MgSO_4
In $\text{H}_2\text{O}_{\text{bid}}$.

TPP2

0,02 M Citrat-Puffer
1,2 M MgSO_4
In $\text{H}_2\text{O}_{\text{bid}}$.

TPP3

0,02 M MES
1,2 M MgSO_4
In $\text{H}_2\text{O}_{\text{bid}}$.

TPP4

0,1 M Citrat-Puffer
0,01 M EDTA
1 M Sorbitol
In $\text{H}_2\text{O}_{\text{bid}}$.

TPP5

0,02 M Citrat-Puffer
0,4 M Saccharose
In $\text{H}_2\text{O}_{\text{bid}}$.

Herstellung von Protoplasten aus *T. thlaspeos*

Zur Herstellung von Protoplasten aus *T. thlaspeos* wurden exponentiell wachsende Zellen aus 3-4 Tage alten Kulturen in YL verwendet ($OD_{600} = 0,5-0,8$). Ein Volumen, das 1,8 g Frischgewicht entspricht wurde mit einem CellStrainer (40 μ m, VWR, Darmstadt, Deutschland) abfiltriert und mit 20 mL TPP1 gewaschen. Mit einem sterilen Spatel wurden die Zellen aus dem CellStrainer in ein 50 mL-Reaktionsgefäß mit 9 mL Protoplastierlösung (20 mg/mL Glucanex (Trichoderma Lysing Enzymes (L1412), Sigma Aldrich) mit 10 mg/mL Yatalase (Takara Bio, Kusatsu, Japan) in TPP1, sterilfiltriert) überführt und alle 10 min vorsichtig geschwenkt. Nach 30 min waren die Zellen fast vollständig protoplastiert und nur wenige Zellreste zu sehen. Ab diesem Zeitpunkt wurden alle Schritte mit gekühlten Puffern und auf Eis durchgeführt. Nach Zugabe von 15 mL TPP1 wurden Aliquots zu je 6 mL in 15 mL-Reaktionsgefäße überführt, vorsichtig mit 5 mL kaltem Sammelpuffer überschichtet und diese in einem Ausschwenkrotor für 15 min bei 5000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Die Protoplasten waren nun in der Interphase angereichert und wurden in ein 50 mL-Reaktionsgefäß überführt und mit demselben Volumen STC versetzt. Anschließend wurden die Protoplasten für 10 min bei 5000 rpm und 4 °C in einem Ausschwenkrotor zentrifugiert, in 5 mL STC gelöst und erneut für 10 min bei 5000 rpm und 4 °C in einem Ausschwenkrotor zentrifugiert. Schließlich wurden die Protoplasten in 800 μ L STC gelöst und sofort für die Transformation verwendet.

TPP1

0,1 M Citrat-Puffer, pH 5,8

0,01 M EDTA

1,2 M $MgSO_4$

In $H_2O_{bid.}$

Sammelpuffer

0,1 M Tris/HCl, pH7

0,6 M Sorbitol

In $H_2O_{bid.}$

STC

50 % (v/v) 2 M Sorbitol

1,0 % (v/v) 1 M Tris/HCl (pH 7,5)

10 % (v/v) 1 M $CaCl_2$

In $H_2O_{bid.}$

Transformation von *T. thlaspeos*

Die Transformation der Protoplasten von *T. thlaspeos* erfolgte direkt nach deren Herstellung und entspricht weitestgehend dem Protokoll von *U. maydis* (Gillissen et al., 1992, Schulz et al., 1990, Bösch et al., 2016). Pro Transformationsreaktion wurden 100 μ L der Protoplastenlösung verwendet. Sie wurde mit 1 μ L Heparin und 10 μ g linearisierter und aufgereinigter DNA (in maximal 10 μ L $H_2O_{bid.}$) oder $H_2O_{bid.}$ versetzt, vorsichtig gemischt und 10 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden 500 μ L STC/PEG hinzugegeben, das

Reaktionsgefäß vorsichtig invertiert und für 15 min auf Eis inkubiert. Schließlich wurden die transformierten Protoplasten auf YMPG-Regenerationsmedium mit 0,6 % Pflanzenagar ausgebracht. Dieses bestand aus zwei gleich dicken Schichten, wobei nur in der unteren Schicht Antibiotikum zugesetzt wurde. Diese Platten wurden stets kurz vor dem Ausbringen der Protoplasten hergestellt. Die Protoplasten wurden bei 18-20 °C inkubiert. Die Platten waren nach zwei Tagen getrocknet und wurden mit Nescofilm versiegelt. Nach 4-8 Wochen Inkubation waren die Protoplasten zu Kolonien angewachsen. Um ggf. langsamer wachsende Transformanten erhalten zu können, wurden die Platten auch darüber hinaus für einige Wochen inkubiert und beobachtet.

Um zu bestimmen, welches Geliertmittel für die Regeneration besser geeignet ist, wurden mit Wasser transformierte Protoplasten zudem auf YMPG-Regenerationsmedium mit 1 % Phytigel ohne Antibiotikum ausgebracht und genauso inkubiert.

Heparinlösung
15 mg/mL Heparin
in H₂O_{bid.}
sterilfiltriert

STC/PEG
60% (v/v) STC-Puffer
40% (w/v) PEG 4000

Trypanblau-Färbung von *T. thlaspeos* Protoplasten

Um bei Protoplasten eine intakte Membran nachzuweisen, wurde die Trypanblau-Färbung modifiziert nach Ludidi et al. und Blachutzik et al. (Ludidi et al., 2004, Blachutzik et al., 2012). Hierzu wurde eine 20 %-ige (w/v) Trypanblau-Lösung in STC hergestellt. In einem 1,5 mL-Reaktionsgefäß wurden 2,5 µL aufgereinigte Protoplasten in STC mit 2,5 µL der Trypanblau-Lösung und 5 µL STC oder 5 µL reinem Ethanol vorsichtig gemischt und für 10 min auf Eis inkubiert. Die Protoplasten wurden anschließend mikroskopiert.

4.3. Molekularbiologische Methoden

Die hier aufgeführten molekularbiologischen Standardmethoden wurden modifiziert nach Ausubel et al. und Sambrook et al. (Ausubel et al., 1987, Sambrook et al., 1989).

4.3.1. Isolierung von Nukleinsäuren

Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Die Isolierung erfolgte nach der modifizierten Methode der „kochenden Lyse“ nach Sambrook et al. (Sambrook et al., 1989). Dazu wurde eine Übernachtskultur von *E. coli* in selektivem Medium bei 37 °C auf einem Drehrad bei 200 rpm angezogen und 1,75 mL durch Zentrifugation bei 13.000 rpm für 2 min bei RT geerntet. Das Zellpellet wurde in 200 µL STET resuspendiert, mit 20 µL Lysozymlösung versetzt und für eine Minute bei 95 °C inkubiert.

Anschließend wurde die Suspension 15 min bei 13.000 rpm zentrifugiert. Das entstandene Zellpellet wurde mit Hilfe eines Zahnstochers entfernt. Die verbleibende Lösung wurde mit 20 µL 3 M Natriumacetat (pH 5,3) und 500 µL Isopropanol zur Fällung der DNA versetzt und mehrfach invertiert. Nach der Zentrifugation für 10 min bei 13.000 rpm wurde das DNA-Pellet mit 200 µL 70 % Ethanol gewaschen und für 10 min bei 37 °C getrocknet. Schließlich wurde es in 100 µL TE/RNase A gelöst. Die so gewonnene DNA wurde bei -20 °C gelagert.

STET

50 mM Tris-HCl, pH 8,0
 50 mM Na₂-EDTA
 8 % (w/v) Saccharose
 5 % (w/v) Triton X-100
 In H₂O_{bid.}
 autoklavieren

Lysozymlösung

10 mg/mL Lysozym
 10 mM Tris/HCl, pH 8
 In H₂O_{bid.}

TE/RNase A

10 mM Tris-HCl, pH 7,9
 1 mM Na₂-EDTA
 20 µg/mL RNase A
 In H₂O_{bid.}

Präparation von genomischer DNA aus *U. maydis*

Für die Isolierung genomischer DNA aus *U. maydis* wurde die Phenol-freie Methode nach Bösch et al. (Bösch et al., 2016) verwendet. Hierzu wurde eine 5 mL Kultur bei 28 °C auf einem Drehrad bei 200 rpm für etwa 24 h angezogen. In einem 2 mL Reaktionsgefäß wurden etwa 200 µL Glasperlen und 2 mL der Vorkultur für 2 min bei 13.000 rpm zentrifugiert. Das Zellpellet wurde mit 500 µL Usti-Lysispuffer 2 versetzt und für 15 min schüttelnd auf einem Vibrax (IKA Werke) bei 1000 rpm inkubiert. Die Probe wurde dann für 20 min bei 65 °C und anschließend für 5 min auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 100 µL 8 M Kaliumacetat zur Proteinpräzipitation wurde die Probe etwa 10-mal invertiert und für 15 min bei 13.000 rpm zentrifugiert. Von dem entstandenen Überstand wurden 500 µL in ein neues 1,5 mL Reaktionsgefäß mit 400 µL Isopropanol überführt. Nach 10-maligem invertieren folgte eine Zentrifugation für 15 min bei 13.000 rpm. Das Pellet wurde mit 200 µL 70 % Ethanol gewaschen und nach Zentrifugation für 5 min bei 13.000 rpm für 5 min bei 50 °C getrocknet. Schließlich wurde das Pellet in 50 µL TE/RNase A bei 50 °C für 10-15 min bei 400 rpm gelöst. Die so gewonnene genomische DNA wurde bei -20 °C gelagert.

Usti-Lysispuffer 1

10 mM Tris-HCl, pH 8
 100 mM NaCl
 1 % (w/v) SDS
 2 % (w/v) Triton x-100
 5 mM EDTA
 in H₂O_{bid.}

Usti-Lysispuffer 2

50 % (v/v) Usti-Lysispuffer 1
 50 % TE-Puffer 1

TE-Puffer 1

10 mM Tris-HCl, pH 7,9
 1 mM Na₂-EDTA
 in H₂O_{bid.}

Präparation von genomischer DNA aus *T. thlaspeos*

Für die Isolation genomischer DNA aus *T. thlaspeos* wurden Kulturen in YL aus der exponentiellen Wachstumsphase verwendet. Etwa 10 mL der Kultur wurde durch einen CellStrainer (40µm, VWR, Darmstadt, Deutschland) gefiltert, die Zellen in ein 2 mL Reaktionsgefäß mit etwa 200 µL Glasperlen überführt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Der Zellaufschluss wurde in einer Schwingmühle (MM400, Retsch, Haan, Deutschland) bei einer Frequenz von 30 Hz für 5 min durchgeführt. Dieser Vorgang wurde insgesamt drei Mal durchgeführt, wobei die Proben sowie deren Halterung vor jedem Durchgang in flüssigem Stickstoff gekühlt wurden. Anschließend folgte in der Regel das oben beschriebene Phenol-freie Protokoll für die Isolation genomischer DNA aus *U. maydis*. Die so gewonnene genomische DNA wurde bei -20 °C gelagert.

Für die Sequenzierung genomischer DNA der Transformanten LF1_hpt-gfp und LF2_hpt-mcherry wurde, wie für die Sequenzierung der Ausgangsstämme (Courville et al., 2019), ein Phenol-basiertes Protokoll (Bösch et al., 2016) verwendet. Hierzu wurde nach dem Zellaufschluss in der Schwingmühle 500 µL Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) und 500 µL Usti-Lysispuffer 1 (siehe „Präparation von genomischer DNA aus *U. maydis*“) hinzugegeben und für 6 min auf einem Vibrax (IKA Werke) schüttelnd bei 1000 rpm inkubiert. Nach einer Zentrifugation für 15 min bei 13.000 rpm wurden 400 µL der oberen, wässrigen Phase in ein neues 1,5 mL Reaktionsgefäß mit 1 mL 100 % Ethanol überführt. Die Probe wurde dreimal invertiert und dann für 5 min bei 13.000 rpm zentrifugiert. Das DNA-Pellet wurde mit 200 µL 70 % Ethanol gewaschen und für 5 min bei 13.000 rpm zentrifugiert. Schließlich wurde es in 50 µL TE/RNase für 10 min bei 50 °C schüttelnd bei 400 rpm gelöst. Die so gewonnene genomische DNA wurde bei -20 °C gelagert.

4.3.2. Arbeiten mit Nukleinsäuren

Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentration von Nukleinsäuren wurde mit einem NanoDrop ND-2000c Spektrophotometer (Thermo Scientific) anhand der Absorption bei einer Wellenlänge von 260 nm gemessen. Zuvor erfolgte die Messung der Leerprobe mit dem jeweiligen Lösungspuffer. Es wurde immer 1 µL der Probe für die Messung eingesetzt. Auch die Reinheit der Probe konnte anhand des Quotienten der gemessenen Absorption bei 260 nm und 280 nm errechnet werden.

Restriktionsendonukleolytische Reaktionen

Für präparative und analytische Zwecke wurden Restriktionsenzyme von NEB (New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main, Deutschland) verwendet. Die eingesetzte DNA-Menge, Enzyme und Gesamtvolumen richteten sich nach dem Verwendungszweck. Die

Inkubationstemperatur richtete sich nach den Herstellerangaben für das verwendete Enzym. Die Inkubationszeit wurde für den jeweiligen Verwendungszweck angepasst.

	Analytische Reaktion	Präparative Reaktion	Reaktion für Transformationsfragmente	Reaktion für Southern-Analyse
Plasmid-DNA	0,5-2 µL	5-20 µL	40 µL	20 µL
NEB-Puffer (10x)	2 µL	5 µL	10 µL	3 µL
Restriktionsenzym	0,5-1 U	1-2 U	3-6 U	1-3 U
H₂O_{bid.}	ad 20 µL	ad 50 µL	ad 100 µL	ad 30 µL
Inkubationszeit	1-2 h	4-6 h	Über Nacht	Über Nacht

Dephosphorylierung von linearer DNA

Um die Ligation restringierter DNA-Fragmente zu verhindern, konnten deren 5'-Enden phosphoryliert werden. Dazu wurde nach abgeschlossener Restriktion folgende Komponenten hinzugefügt:

20 µl Restriktionsansatz
 5 µl Reaktionspuffer (10x)
 3 U Alkalische Phosphatase
 ad 50 µl in H₂O_{bid.}

Die Inkubation erfolgte für 30 min bei 37 °C. Anschließend wurde der gesamte Ansatz elektrophoretisch in einem Agarosegel aufgetrennt und die entsprechenden Banden extrahiert.

Ligation von Nukleinsäurefragmenten

Nukleinsäurefragmente wurden mit einer T4-Ligase (Roche) ligiert. Das Verhältnis zwischen dem Resistenz-kodierenden Fragment und dem Insert betrug bei zwei Fragmenten 1:3 und bei mehreren Fragmenten 1:1.

Ligationsansatz

X µL DNA-Fragmente
 2 µL Puffer (10x)
 1 µL T4-DNA-Ligase
 ad 20 µL H₂O_{bid.}
 Inkubation: über Nacht, 16 °C

(Quick) Ligationsansatz

X µL DNA-Fragmente
 10 µL Puffer (2x)
 1 µL Quick-Ligase
 ad 20 µL H₂O_{bid.}
 Inkubation: 15 min, RT

Golden-Gate-Klonierung

Die Golden-Gate-Klonierung (Terfrüchte et al., 2014) ist eine Methode, in der Restriktion und Ligation von Nukleinsäuren in einem Arbeitsschritt durchgeführt werden können, da die Erkennungs- und Schnittsequenzen der verwendeten Restriktionsendonukleasen (hier BsaI oder SapI, NEB) nicht überlappen. So entstehen nach der Restriktion variable sticky ends. Die Position von Erkennungs- und Schnittsequenzen wird so gewählt, dass die

Erkennungssequenz nach der Restriktion nicht in den zu ligierenden Fragmenten vorliegt. Dies ermöglicht die Ligation der gewünschten Fragmente in der gewünschten Orientierung aus einem oder mehreren sog. Lagerplasmiden und/oder beispielsweise PCR-Produkten.

<u>Reaktionsansatz</u>	<u>Thermocycler-Programm</u>	<u>Zyklen</u>
75 ng je Plasmid	37 °C / 2min	50
40 ng DNA-Fragmente	16 °C / 5 min	50
0,75 µL T4-DNA-Ligase	37 °C / 25 min	1
0,5 µL Bsal-HF oder SapI-HF	50 °C / 5 min	1
1,5 µL NEB-Puffer (10x)	80 °C / 5 min	1
ad 15 µL mit H ₂ O _{bid} .	16 °C	∞

4.3.3. Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wurde modifiziert nach Innis et al. (Innis et al., 1990) durchgeführt. Für die Amplifizierung von DNA-Fragmenten für die Klonierung wurde mit der Phusion Polymerase von NEB gearbeitet. Für diagnostische PCRs wurde eine selbst hergestellte Phusion Polymerase verwendet, welche im Vergleich zur kommerziellen Version weniger effizient ist. Für die PCR wurden die Thermocycler PTC110 / 200 (MJ Research, St. Bruno, Quebec, Kanada) oder der Labcycler (SensoQuest GmbH, Göttingen, Deutschland) verwendet.

<u>Reaktionsansatz</u>	<u>Thermocycler-Programm</u>	
10-100 ng Matrizen-DNA	Initiale Denaturierung	98 °C / 1 min
0,5 µL dNTPs (25 mM)	Amplifikation	35 Zyklen
0,5 µL Oligonukleotide (je 100 µM)	Denaturierung	98 °C / 10 s
0,5 µL Phusion Polymerase	Hybridisierung	65 °C / 20 s
5 µL Phusion HF-Puffer (10x)	Elongation (30 s / 1 kb)	72 °C / X
ad 50 µL mit H ₂ O _{bid} .	Endelongation	72 °C / 8 min

Für die Amplifikation von Sequenzen von *T. thlaspeos* wurde der GC-Puffer von NEB und längere Denaturierungszeiträume gewählt:

<u>Reaktionsansatz</u>	<u>Thermocycler-Programm</u>	
10-100 ng Matrizen-DNA	Initiale Denaturierung	98 °C / 2 min
0,5 µL dNTPs (25 mM)	Amplifikation	35 Zyklen
0,5 µL Oligonukleotide (je 100 µM)	Denaturierung	98 °C / 20 s
0,5 µL Phusion Polymerase	Hybridisierung	65 °C / 20 s
10 µL Phusion GC-Puffer (5x)	Elongation (30 s / 1 kb)	72 °C / X
ad 50 µL mit H ₂ O _{bid} .	Endelongation	72 °C / 8 min

4.3.4. Auftrennung und Nachweis von Nukleinsäuren

Auftrennung von Nukleinsäuren durch Gelelektrophorese

Durch die Gelelektrophorese konnten Nukleinsäure-Fragmente ihrer Größe nach aufgetrennt werden. Hierfür wurde das TAE-Puffersystem genutzt. Agarosegele wurden mit TAE-Puffer je nach Größe der Nukleinsäure-Fragmente in einer Konzentration von 0,8-2 % angesetzt, aufgekocht und auf 55-60 °C abgekühlt. Anschließend wurde Ethidiumbromid zu einer Endkonzentration von 1 µg/mL hinzugegeben. In einem Gelschlitten mit Kamm für die Taschen wurde das Gel in Form gegossen. Nach 30 min konnte das Gel verwendet werden. Hierfür wurde es in eine Laufkammer mit 1x TAE-Puffer überführt. Die Nukleinsäuren wurden mit Auftragspuffer gemischt und in die Taschen pipettiert. Dauer und Stromspannung der Gelelektrophorese wurden je nach Größe der erwarteten Fragmente angepasst. Der Fortschritt der Gelelektrophorese konnte anhand der Lauffront des Auftragspuffers nachverfolgt werden.

TAE-Laufpuffer (50x)

2 M Tris-Acetat 30 %
100 mM Na₂-EDTA
in H₂O_{bid.}

Auftragspuffer

30 % (v/v) Glycerin
0,4 % (w/v) Bromphenolblau
ad 20 µL H₂O_{bid.}

Präparation von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Nach einer Gelelektrophorese konnten die DNA-Fragmente aus dem Gel ausgeschnitten werden. Hierzu wurden die mit Ethidiumbromid gefärbten DNA-Fragmente auf einem UV-Tisch (TCP-20.LM, Vilber Lourmat Deutschland GmbH, Eberhardzell, Deutschland) visualisiert und das gewünschte mit einem Skalpell ausgeschnitten werden. Anschließend konnte die DNA mit dem Monarch DNA Gel Extraction Kit extrahiert werden.

Transfer von DNA-Fragmenten auf eine Nylonmembran (Southern-Blot)

Zum Transfer von DNA auf eine Nylonmembran wurde ein modifiziertes Protokoll nach Southern verwendet (Southern, 1975). Nach der Restriktionsendonukleolyse genomischer DNA wurden die entstandenen DNA-Fragmente mittels Gelelektrophorese ihrer Größe nach aufgetrennt. Anschließend wurde das Agarosegel je 20 min in 0,25 M HCl, DENAT- und RENAT-Lösung vorsichtig schwenkend inkubiert. Der Transfer auf eine Nylonmembran (Hybond-N+, GE Healthcare Life Sciences) erfolgte mittels Kapillar-Blot, welcher folgendermaßen aufgebaut wurde: Auf einen Behälter mit Transfer-Lösung (20x SSC) wurde eine Glasplatte gelegt. Auf diese Glasplatte wurde ein Whatman-Papier gelegt, dessen Enden in die Transfer-Lösung darunter reichten. Auf diese Salzbrücke wurde das Agarosegel platziert, auf welches wiederum die passend zugeschnittene Nylonmembran und zwei passend zugeschnittene Whatman-Papiere gelegt wurden. Zuletzt wurde ein

Stapel Papiertücher und ein Gewicht aufgelegt. Dabei wurde darauf geachtet, dass eine gleichmäßige Belastung vorliegt und die Transfer-Lösung nicht direkt von der Salzbrücke in die Papiertücher gelangen kann. Die Transfer-Lösung wurde durch Kapillarkräfte aus dem Behälter über die Salzbrücke, das Agarosegel, die Membran und die Whatman-Papiere in die Papiertücher gesogen, wodurch die DNA-Fragmente aus dem Agarosegel auf die Nylonmembran übertragen wurden. Der Kapillar-Blot erfolgte über Nacht oder, wenn die Papiertücher alle 15-30 min gewechselt wurden, für 4h. Anschließend wurden die DNA-Fragmente auf der Nylonmembran durch UV-Bestrahlung (120 mJ/cm^2) in einer UV-Kammer (BLX-254; Vilber Lourmat) fixiert.

<u>20x SSC</u>	<u>DENAT-Lösung</u>	<u>RENAT-Lösung</u>
3 M NaCl	1,5 M NaCl	1,5 M NaCl
300 mM Na-Citrat x 2 H ₂ O	400 mM NaOH	282 mM Tris-HCl
in H ₂ O _{bid.}	in H ₂ O _{bid.}	218 mM Tris
Mit HCl auf pH 7,0 einstellen		in H ₂ O _{bid.}

Spezifischer Nachweis immobilisierter Nukleinsäuren (Southern-Analyse)

Zum Nachweis gewünschter DNA-Fragmente wurden genspezifische Sonden hergestellt. Diese wurden durch den Einbau von Digoxigenin-11-dUTP (DIG) während der PCR markiert, welche eine spätere Detektion mittels Chemilumineszenz ermöglicht. Die Markierung erfolgte analog zu den beschriebenen PCR-Reaktionen. Die Nylonmembran mit den fixierten DNA-Fragmenten wurde zunächst mit 20 mL Southern-Hybridisierungspuffer für 30 min bei 65 °C in einer Hybridisierungsröhre drehend inkubiert. die DIG-markierte Sonde wurde in 15-20 mL Southern-Hybridisierungspuffer aufgenommen und für 10 min bei 99 °C aufgeköcht. Der Hybridisierungspuffer auf der Membran wurde durch den mit der DIG-markierten Sonde ersetzt und über Nacht bei 65 °C drehend inkubiert. Dann wurde die Membran für je 15 min bei 65 °C drehend mit den Southern-Waschpuffern I, II, und III gewaschen. Anschließend wurde die Membran für 5 min bei RT mit DIG-Waschpuffer gewaschen und für 30 min bei RT mit DIG2-Puffer blockiert. Daraufhin wurde die Membran mit einer DIG2-Antikörperlösung (Anti-Digoxigenin-AB Fab-Fragmente, Roche 1:10.000 in DIG2-Puffer) für 30-60 min drehend bei RT inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit DIG-Waschpuffer für 15 min drehend bei RT wurde die Membran für 5 min drehend bei RT mit DIG3 äquilibriert. Die Membran wurde schließlich in einer Plastikfolie für 5 min bei RT mit einer Chemilumineszenzlösung (CDP-Star, Roche, 1:100 in DIG3) inkubiert. Das Chemilumineszenzsignal wurde mit dem Aufnahmesystem ImageQuant LAS 4000 (GE Healthcare Life Sciences) detektiert.

20x SSPE
 3 M NaCl
 200 mM Na₂HPO₄
 20 mM Na₂-EDTA
 in H₂O_{bid.}
 pH- Wert 7,4

Southern-Waschpuffer I
 2x 20x SSPE
 0,1 % SDS (10 %)
 in H₂O_{bid.}

DIG1
 100 mM Maleinsäure
 150 mM NaCl
 in H₂O_{bid.}
 pH-Wert 7,5

Denhardt-Lösung
 2 % (v/v) 20BSA Fraktion V
 (Sigma A-9647)
 2 % (v/v) Ficoll
 52 % (v/v) PVP (Sigma PVP-360)
 in H₂O_{bid.}

Southern-Waschpuffer II
 1x 20x SSPE
 0,1 % SDS (10 %)
 in H₂O_{bid.}

DIG2
 1 % (w/v) Magermilchpulver in
 DIG1

Southern-Hybridisierungspuffer
 26 % (v/v) 20x SSPE
 5 % (v/v) Denhardt-Lösung
 5 % (v/v) (SDS 10%)
 in H₂O_{bid.}

Southern-Waschpuffer III
 0,1x 20x SSPE
 0,1 % SDS (10 %)
 in H₂O_{bid.}

DIG3
 100 mM Tris-HCl
 100 mM CaCl₂
 in H₂O_{bid.}
 pH-Wert 9,5

DIG-Waschpuffer
 0,3 % Tweem-20 in DIG1

4.3.5. Sequenzierung

Die Sequenzierungen wurden meist durch die Firma Eurofins Genomics (Eurofins MWG GmbH, Ebersberg, Deutschland) durchgeführt. Die Ergebnisse wurden mit den Programm Clone Manager 9 ausgewertet. Vor dem Einsenden wurde die DNA aufgereinigt.

Sequenzierungsansatz

15 µL aufgereinigte Plasmid-DNA (50-10 ng/µL)
 2 µL Oligonukleotid (10 µM)

Bei nicht zeitkritischen Sequenzierungen wurde der Sequenzierservice der Ludwig-Maximilians-Universität München genutzt. Die Sequenzierung erfolgte nach der BigDye v3.1-Methode. Die Ergebnisse wurden mit den Programm Clone Manager 9 ausgewertet. Vor dem Einsenden wurde die DNA aufgereinigt.

Sequenzierungsansatz

250 ng Plasmid-DNA
 3,2 pmol Oligonukleotid
 ad 7 µL mit 10 mM Tris/HCl, pH 8,5

4.4. Mikroskopie und Bildbearbeitung

4.4.1. Mikroskop-Aufbau und Steuerung

Für mikroskopische Analysen wurde das Zeiss (Oberkochen, Deutschland) Axio Imager M1 System von Visitron Systems verwendet. Es war mit einer Spot-Pursuit CCD-Kamera (charge-coupled device; Diagnostic Instruments, Sterling Heights, MI, USA) und Plan Neofluar Objektivlinsen (40x und 100x, numerische Apertur [NA] 1,3; 63x, NA 1,25) ausgestattet und wurde mit dem Programm MetaMorph (Version 7, Molecular Devices, Sunnyvale USA) gesteuert.

4.4.2. Fluoreszenzmikroskopie

Für fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen wurden die Fluoreszenzproteine mit einer HXP Halogen-Metalldampflampe (LEj, Jena) angeregt. Dabei wurden folgende Filtersätze von Chroma, Bellow Falls, VT, USA verwendet:

- Gfp: ET470/40BP, ET495LP, ET525/50BP
- mCherry: ET560/40BP, ET585LP, ET630/75BP

4.5. RNA-biochemische Methoden

Vorbereitungen für die Herstellung von sRNA-Bibliotheken

Isolierung von RNA

Zur Isolierung von Gesamt-RNA aus *T. thlaspeos* wurde die Methode des Herstellers von TriReagent (T9424, Sigma) modifiziert. *T. thlaspeos* wurde in 50-100 mL YL für 3-4 Tage bei 18-20 °C schüttelnd bei 200 rpm bis zu einer OD₆₀₀ von 0,8-1,1 in Schikanekolben angezogen. Dabei wurde darauf geachtet, dass das Füllvolumen maximal ein Fünftel des nominalen Volumens des Schikanekolbens betrug. Ein Frischgewicht, das 0,22 g entsprach, also etwa 10 mL, wurde mit einem CellStrainer (40µm, VWR, Darmstadt, Deutschland) geerntet, mit mindestens 15 mL H₂O_{bid.} gewaschen, in ein 2 mL Reaktionsgefäß mit etwa 200 µL Glasperlen und 3 Metallkugeln (Durchmesser 2 mm) überführt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Für jedes der vier experimentellen Replikate wurden die Zellen wenige Tage bis zur RNA-Isolation bei -80 °C gelagert.

Der Zellaufschluss wurde in einer Schwingmühle bei 30 Hz für 1 min durchgeführt. Dieser Prozess wurde insgesamt fünf Mal durchgeführt, wobei die Proben und die Halterung vor jedem Durchlauf in flüssigem Stickstoff gekühlt wurden. Anschließend wurde 1 mL TriReagent (T9424, Sigma) hinzugefügt und die Probe sehr kurz bei 65 °C inkubiert, um ein Einfrieren der Flüssigkeit zu verhindern. Sofort danach wurde die Probe gevortext, um den Inhalt zu mischen. Nach 5 min Inkubation bei RT wurden 200 µL Chloroform hinzugefügt und weitere 15 min bei RT inkubiert. Die Phasentrennung erfolgte durch Zentrifugation für 15 min bei 13.000 rpm bei

4°C. Von der oberen Phase wurden 500 µL in ein neues 1,5 mL Reaktionsgefäß mit 500 µL Isopropanol überführt. Nach mehrfachem Invertieren wurden die Nukleinsäuren für 15 min bei -20 °C präzipitiert. Anschließend wurden die Proben für 15 min bei 13.000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 1 mL 75 % Ethanol gewaschen und für 5 min bei 13.000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Der Waschschrift wurde ein weiteres Mal durchgeführt, das Pellet dann für 90 s bei 37 °C getrocknet und schließlich in 20 µL RNase-freiem H₂O gelöst. Bis zur weiteren Verwendung wurde die Probe bei -80 °C gelagert. Für die Herstellung von sRNA-Bibliotheken wurde auf die nachfolgend beschriebene DNase I-Behandlung und Re-extraktion von RNA verzichtet.

Degradation von DNA

Die Degradation von DNA wurde durchgeführt, um die Qualität der RNA ohne DNA, und damit das Isolationsprotokoll für RNA, beurteilen zu können. Sie wurde nach Herstellerangaben durchgeführt.

10 µg Nukleinsäuren
1 µL DNase I (2 U, RNase-frei, M0303, NEB)
10 µL DNase I-Reaktionspuffer (10x)
ad 100 µL H₂O_{bid}.

Die Probe wurde 10 min bei 37 °C inkubiert. Sofort im Anschluss wurde sie auf Eis gekühlt, sofort mit 1 µL 0,5 M EDTA versetzt und für 10 min bei 75 °C inkubiert.

Re-Extraktion nach DNA-Degradation

Im Anschluss an die DNase I-Behandlung wurde die RNA re-extrahiert, um deren Qualität beurteilen zu können. Hierzu wurde ein modifiziertes Protokoll nach Heera et al. (Heera et al., 2015) verwendet. wurde die Probe mit 400 µL RNase-freiem H₂O versetzt und in ein neues 2 mL Reaktionsgefäß überführt. Nach Zugabe von kaltem (4 °C) 500 µL saurem Phenol (pH 4,3) wurde die Probe gemischt und für 10 min bei 13.000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Von der wässrigen Phase wurden 450 µL in ein neues 1,5 mL Reaktionsgefäß überführt, mit 500 µL Chloroform gemischt und für 10 min bei 13.000 rpm bei 4 °C zentrifugiert. Von der wässrigen Phase wurden 400 µL in ein neues 1,5 mL Reaktionsgefäß mit 50 µL 3 M Natriumacetat und 1 mL eiskaltem 100 % Ethanol überführt und mehrfach invertiert. Die RNA wurde über Nacht bei -20 °C präzipitiert. Nach Zentrifugation für 30 min bei 13.000 rpm und 4 °C wurde das Pellet zweimal mit 1 mL eiskaltem 80 % Ethanol gewaschen und dabei 5 min bei 13.000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Das Pellet wurde schließlich für 90 sec bei 37 °C getrocknet und in 10 µL RNase-freiem H₂O gelöst. Bis zur weiteren Verwendung wurde die RNA bei -80 °C gelagert.

Bestimmung der RNA-Qualität

Um die Qualität der isolierten RNA zu bestimmen, wurde die DNase I-behandelte und re-extrahierte RNA zum einen durch Gelelektrophorese (siehe oben) und zum anderen mit dem BioAnalyzer (Agilent, Santa Clara, USA) untersucht. Dazu wurde ein RNA 6000 Nano-Chip und -Reagenzien sowie der Plant RNA Nano Assay verwendet.

Urea-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Urea-PAGE)

Vor der Herstellung der sRNA-Bibliotheken wurden die extrahierten Nukleinsäuren mittels denaturierender Urea-PAGE (Weiberg et al., 2013, Dunker et al., 2020) der Größe nach aufgetrennt und die gewünschten Längen ausgeschnitten. Hierzu wurden die Nukleinsäuren für jedes Replikat unabhängig voneinander extrahiert und pro Replikat zwei Proben gepoolt. Von den gepoolten Proben wurden 20 µL mit zweifach konzentriertem RNA-Ladepuffer für 5 min bei 95 °C inkubiert und auf einem denaturierenden 14 %-igem Urea-PAGE mit O'RangeRuler 10 bp (SM1313, Thermo Fisher) für 3,5 h bei 150 V aufgetrennt. Anschließend wurde das Gel zur Visualisierung der Nukleinsäuren mit Ethidiumbromid gefärbt.

Urea-PAGE-Gel

16,8 g (w/v) Urea

18,67 mL 30 % Polyacrylamid

400 µL (v/v) TAE (50x)

150 µL (v/v) APS

15 µL (v/v) TEMED

Ad 40 mL mit H₂O_{bid}.

Gelelution von RNA

Für jedes der vier Replikate anhand des Größenmarkers die Region entsprechend der 18-35 nt langen Fragmente ausgeschnitten und in 2 mL Reaktionsgefäße überführt. Die Nukleinsäuren wurden mit 600 µL 0,3 M NaCl für ca. 20 h bei 4 °C schwenkend aus dem Gel eluiert. Nach Zentrifugation für 10 min bei 14.000g und 4 °C wurden 100 µL des Überstandes in ein neues 1,5 mL Reaktionsgefäß überführt. Zur Maximierung des Ertrages wurde der restliche Überstand in dem 2 mL Reaktionsgefäß in ein weiteres 1,5 mL Reaktionsgefäß überführt, welches erneut bei denselben Bedingungen zentrifugiert wurde, um eventuell vorhandene Gel-Reste zu pelletieren. Anschließend wurde der Überstand mit dem zuvor geernteten Überstand vereint. Anschließend wurde ein Zehntel des Volumens an 3 M Natriumacetat, 1 µL GlycoBlue und das 2,5-fache Volumen 96 % Ethanol hinzugefügt, gemischt und über Nacht bei -20 °C inkubiert. Nach Zentrifugation für ca. 1h und 45 min bei 21.000g bei 4 °C wurden die Nukleinsäuren in 6,5 µL RNase-freiem H₂O resuspendiert.

Herstellung von sRNA-Bibliotheken

Die sRNA-Bibliotheken wurden mit dem NEBNext Multiplex Small RNA Library Prep Set for Illumina (Set 1) (E7300, NEB) bis zur Synthese der cDNA nach Herstellerangaben hergestellt. Danach wurden in Anlehnung an das Herstellerprotokoll wie unten angegeben verfahren.

Nach Herstellung der cDNA wurde eine Test-PCR durchgeführt, um sicherzustellen, dass die Anzahl der Zyklen angemessen ist. Index-Primer und SR-Primer stammten dabei aus dem genannten Kit.

<u>Reaktionsansatz</u>	<u>Thermocycler-Programm</u>	
5 µL cDNA	Initiale Denaturierung	94 °C / 30 s
0,4 µL dNTPs	Amplifikation	13 Zyklen
0,5 µL Index-Primer	Denaturierung	94 °C / 15 s
0,5 µL SR-Primer	Hybridisierung	62 °C / 30 s
0,2 µL Taq-Polymerase	Elongation	70 °C / 15 s
4 µL Puffer (5x)	Endelongation	70 °C / 5 min
10,5 µL H ₂ O _{bid.}		

Dabei wurde für jedes Replikat ein anderer Index-Primer des Kits verwendet, wodurch ein multiplexen vor der Sequenzierung ermöglicht wird.

Tabelle 22 Verwendete Index-Primer für die verschiedenen Replikate für die sRNA-Bibliotheken.

Oligonukleotid Name	Sequenz (5'-3')	Verwendet für
Index-Primer 2	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATACATCGGTGACTGGAGTTCAGACG TGTGCTCTTCCGATCT	LF1_R1
Index-Primer 4	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATTGGTCAGTGACTGGAGTTCAGACG TGTGCTCTTCCGATCT	LF1_R2
Index-Primer 6	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATATTGGCGTGACTGGAGTTCAGACG TGTGCTCTTCCGATCT	LF2_R1
Index-Primer 12	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATTACAAGGTGACTGGAGTTCAGACG TGTGCTCTTCCGATCT	LF2_R2

Die Test-PCR wurde in einem 2 %-igen Agarosegel elektro-phoriert und die DNA mit Ethidiumbromid visualisiert. Aufgrund der Test-PCR wurde für die PCR-Amplifikation entgegen dem Herstellerprotokoll nur 35 µL der cDNA und dementsprechend 10 µL H₂O_{bid.} eingesetzt. Außerdem wurden 12 Zyklen gewählt. Für diese PCR wurden die Materialien des Kits verwendet:

Reaktionsansatz

50 µL LongAmp Taq 2X Master Mix
 2,5 µL SR-Primer
 2,5 µL Index-Primer
 35 µL cDNA
 ad 100 µL mit H₂O_{bid.}

Thermocycler-Programm

Initiale Denaturierung	94 °C / 30 s
Amplifikation	12 Zyklen
Denaturierung	94 °C / 15 s
Hybridisierung	62 °C / 30 s
Elongation	70 °C / 15 s
Endelongation	70 °C / 5 min

Abweichend vom Herstellerprotokoll wurde die PCR folgendermaßen aufgereinigt:

Ein Zehntel Volumen 3 M Natriumacetat, 1 µL GlycoBlue und das 2,5-fache Volumen 96 % Ethanol wurden mit dem PCR-Ansatz gemischt und bei -80 °C für 40 min inkubiert. Nach Zentrifugation für 20 min bei 21.000g und 4 °C wurde das Pellet mit 80 % Ethanol gewaschen und für 5 min bei 21.000g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde vollständig entfernt, das Pellet für 3 min bei 37 °C getrocknet und schließlich in 20 µL H₂O_{bid.} gelöst.

Anschließend wurde die cDNA mittels PAGE visualisiert und Größen-selektioniert:

Auf einem 6 %-igen Polyacrylamid-Gel wurden die Proben für 70 min bei 120 V elektrophoriert und mit Ethidiumbromid visualisiert.

PAGE-Gel

2 mL (v/v) 30 % Polyacrylamid
 100 µL (v/v) TAE (50x)
 100 µL (v/v) APS
 4 µL (v/v) TEMED
 ad 10 mL mit H₂O_{bid.}

Die Region entsprechend 140-150 bp wurde mit einem Skalpell ausgeschnitten und die cDNA folgendermaßen eluiert:

In einem 1,5 mL Reaktionsgefäß wurde das Gelstück mit 300 µL DNA-Elutionspuffer des Kits versetzt, für 2 h bei RT drehend inkubiert und anschließend für 10 min bei 14.000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues 1,5 mL Reaktionsgefäß überführt. Zur Maximierung des Ertrages wurde verbleibende Flüssigkeit nahe des Gelpellets in ein weiteres 1,5 mL Reaktionsgefäß überführt, unter denselben Bedingungen zentrifugiert, und der Überstand mit dem zuvor geernteten Überstand vereint. Die cDNA wurde durch Zugabe von einem Zehntel Volumen 3 M Natriumacetat, 1 µL GlycoBlue und dem 2,5-fachen Volumen 96 % Ethanol über Nacht bei -20 °C präzipitiert. Nach Zentrifugation für 20 min bei 21.000 g und 4°C wurde mit 80 % Ethanol gewaschen, für 5 min bei 21.000 g und 4 °C zentrifugiert und der Überstand entfernt. Das Pellet wurde für 3 min bei 37 °C getrocknet und in 20 µL H₂O_{bid.} gelöst.

Die so Größen-selektionierte cDNA wurde ein weiteres Mal über ein Polyacrylamid-Gel Größen-selektioniert und eluiert. Schließlich wurden die vier Replikate für die Sequenzierung gepoolt.

4.6. Bioinformatische Analysen

4.6.1. Bioinformatische Analyse der sRNA-Sequenzierungsdaten

Das Demultiplexen, trimmen der Adaptorsequenzen sowie eine erste Einschätzung zur Qualität wurden von Arne Weiberg (Ludwig-Maximilians-Universität München) durchgeführt. Die weiteren im folgenden beschriebenen Analysen wurden mit der lokalen Version von Galaxy (Community, 2022) durchgeführt und folgten grundsätzlich der Vorgehensweise anderer Studien (Weiberg et al., 2013, Dunker et al., 2020).

Genomweite Kartierung der Reads

Für jedes Replikat wurden die erhaltenen Reads mit Bowtie (-v alignment mode, no mismatches, report one alignment per read) gegen das Genom von LF1 oder LF2 (Courville et al., 2019) kartiert. Um aus der resultierenden SAM-Datei nur die kartierten herauszufiltern, wurde das Programm Filter Data (column 5 = 255) verwendet.

Reproduzierbarkeit

Um reproduzierbare Reads zu finden, wurden die Replikate in mehreren Schritten folgendermaßen untereinander abgeglichen:

Schritt1: Umwandlung von Reads in einzigartige Sequenzen

Aus Gründen der Programm-Kompatibilität wurden die SAM-Dateien mit SamToFastq (Reverse bases and qualities of reads with negative strand flag set before writing them to fastq) in Fastq-Dateien umgewandelt und mit FastqToTabular in eine Tabelle umgewandelt. Mit GroupData (group by column 2, count distinct on column 1) wurde die Abundanz jeder einzigartigen Sequenz pro Replikat gezählt. Es entstand für jedes Replikat eine Datei, in der jede einzigartige Sequenz und ihre Abundanz gelistet waren.

Schritt 2: Filtern auf reproduzierbare einzigartige Sequenzen innerhalb eines Stammes

Für jeden Stamm wurden mit CompareTwoDatasets (compare dataset 1 using column 1 against dataset 2 and column 1 to find matching rows of 1st dataset) unter Verwendung der im vorigen Schritt generierten Dateien einzigartige Sequenzen, die innerhalb eines Stammes reproduzierbar waren, in eine neue Datei geschrieben. Es entstand eine Datei, in der die einzigartigen und innerhalb eines Stammes reproduzierbaren Sequenzen, aber nicht ihre jeweilige Abundanz gelistet waren.

Schritt 3: Filtern auf reproduzierbare einzigartige Sequenzen zwischen beiden Stämmen

Die innerhalb der Stämme reproduzierbaren einzigartigen Sequenzen wurden mit CompareTwoDatasets (compare dataset 1 using column 1 against dataset 2 and column 1 to find matching rows of 1st dataset) verglichen, um eine Tabelle mit einzigartigen Sequenzen zu erhalten, die in allen vier Replikaten reproduzierbar waren.

Schritt 4: Filtern von Reads, deren einzigartige Sequenzen reproduzierbar sind

Da die Abundanz derselben einzigartigen Sequenz in verschiedenen Replikaten unterschiedlich groß sein kann, wurden diese Tabelle mit der Tabelle, die alle einzigartigen Sequenzen eines einzelnen Replikats enthält (FastqToTabular Output-Datei aus Schritt 1) mit CompareTwoDatasets (compare dataset 1 using column 2 against dataset 2 and column 1 to find matching rows of 1st dataset) abgeglichen, um den in allen Replikaten reproduzierbaren einzigartigen Sequenzen die Abundanzen des jeweiligen Replikats zuzuweisen.

Für die Programm-Kompatibilität für die weiteren Analysen wurden die Tabellen mit TabularToFastq (identifier column 1, sequence column 2, quality column 3) und anschließend mit FastqGroomer (input FASTQ quality scores type Sanger & Illumina 1.8+) in Fastq-Dateien konvertiert.

Entstehungsort-Analyse

Zur Analyse des Entstehungsortes der sRNAs wurden reproduzierbare Reads der vier Datensets nacheinander mit Bowtie (-v alignment mode, no mismatches, report one alignment per read, write all reads that could not be aligned to a file) den Annotationen von rRNAs, tRNAs, prä-mRNAs und ncRNAs von LF1 zugeordnet. Zur Annotation von prä-mRNAs wurden die bestehenden Annotationen von mRNAs (Courville et al., 2019) um 150 nt up- und downstream erweitert. Darüber hinaus wurden anschließend Reads auf die rDNA-Scaffolds und den mitochondrialen Scaffold kartiert. Um doppelte Zuordnung zu vermeiden, wurden bei dieser Analyse bereits zugeordnete Reads nicht erneut verwendet. Alle Reads, die diesen Kategorien nicht zugeordnet werden konnten, wurden als intergenisch betrachtet. Reads, die prä-mRNAs zugeordnet werden konnten, wurden weiterhin Annotationen von 5'-untranslatierten Regionen, Exons und 3'- untranslatierten Regionen zugeordnet. Alle anderen Reads wurden als intronisch angesehen.

Um verschiedene Eigenschaften auszuwerten, wurden die SAM-Dateien mit SamToFastq (Reverse bases and qualities of reads with negative strand flag set before writing them to fastq) in Fastq-Dateien umgewandelt und mit FastQC analysiert.

Zielort-Analyse

Zur Vorhersage des Zielortes der sRNAs wurden Reads, die nicht rRNAs oder tRNAs zugeordnet wurden, mit den Programmen Filter Data (20-24 nt Länge) und Collapse sequences in eine neue Fasta-Datei geschrieben. Die Abundanz jeder einzigartigen Sequenz wurde in jedem Replikat auf die Anzahl dem Genom zugeordneter Reads pro Million Reads in der Bibliothek normalisiert. Es wurden nur solche Reads berücksichtigt, deren einzigartige Sequenz mit einer normalisierten Readanzahl von mindestens zwei in jedem einzelnen Replikat vorhanden waren. Dies ergab eine Liste von 97 einzigartigen sRNA-Sequenzen. Mit diesen sRNA-Sequenzen wurde mit der lokalen Version von TAPIR (score = 4,5, mfe-ratio = 0,7) (Bonnet et al., 2010) eine Zielvorhersage gegen Transkripte beider *T. thlaspeos*-Stämme und gegen Transkripte der Wirtspflanze *A. hirsuta* (CDS mit 150 nt up- und downstream, modifiziert von (Courville et al., 2019)) durchgeführt. Für sRNAs aus *T. thlaspeos* wurden nur solche berücksichtigt, deren pilzliche Kandidaten-Zieltranskripte Homologe in beiden Stämmen vorwiesen. Von den sRNA-Kandidaten für PIGS wurden nur solche berücksichtigt, die keine vollständig Basenpaarung (score \neq 0) zum vorhergesagten pflanzlichen Zieltranskript und kein vorhergesagtes endogenes Zieltranskript aufwiesen. Für die Funktionsvorhersage wurde von allen verbleibenden Zieltranskript-Kandidaten im Pilz mit der entsprechenden Proteinsequenz eine Funktionsvorhersage mit Hilfe von Protein BLAST und NCBI Conserved Domain Search durchgeführt. Bei vorhergesagten Zieltranskripten in *A. hirsuta*, welche ein Homolog in *A. thaliana* aufwiesen, wurden Informationen von TAIR (<https://www.arabidopsis.org/>) hinzugezogen und bei geringen Informationen ebenfalls auf Protein BLAST und NCBI Conserved Domain Search zurückgegriffen.

4.6.2. Verwendete Programme

Verwendete Programme in Galaxy

Die folgenden Programme wurden in Galaxy mit den Parametern wie oben bei den jeweils beschriebenen Schritten verwendet.

- **Bowtie** (Version 1.2.0;
https://toolshed.g2.bx.psu.edu/repository?repository_id=a64e850da82e25fe&changeset_revision=b46e7d48076a; (Langmead et al., 2009))
- **Filter Data** (Version 1.1.0;
https://toolshed.g2.bx.psu.edu/view/devteam/fastq_filter/81a9090d6df3)
- **SamToFastq** (Version 2.18.2.1;
<https://toolshed.g2.bx.psu.edu/view/devteam/picard/585027e65f3b>)
- **FastqToTabular** (Version 1.1.1;
https://toolshed.g2.bx.psu.edu/view/devteam/fastq_to_tabular/4b347702c4aa;
(Blankenberg et al., 2010))
- **GroupData** (Version 2.1.1)
- **CompareTwoDatasets** (Version 1.0.2)
- **TabularToFastq** (Version 1.1.1;
https://toolshed.g2.bx.psu.edu/view/devteam/tabular_to_fastq/2dcfbbf9071a;
(Blankenberg et al., 2010))
- **FastqGroomer** (Version 1.1.1;
https://toolshed.g2.bx.psu.edu/view/devteam/fastq_groomer/47e5dbc3e790;
(Blankenberg et al., 2010))
- **FastQC** (Version 0.72;
<https://toolshed.g2.bx.psu.edu/view/devteam/fastqc/5ec9f6bceae>)
- **Collapse sequences** (Version 1.0.1;
https://toolshed.g2.bx.psu.edu/view/devteam/fastx_collapser/7ce1891db6f5)

Zur Vorhersage von rRNA- bzw. tRNA-Annotationen wurden in Galaxy ebenfalls verwendet:

- **Aragorn** (Revision 2; Search for tRNA genes with introns in anticodon loop;
https://toolshed.g2.bx.psu.edu/view/bgruening/trna_prediction/358f58401cd6; (Laslett and Canback, 2004))
- **Barrnap** (Revision 0; Kingdom Eukaryote;
<https://toolshed.g2.bx.psu.edu/view/iuc/barrnap/8fd427007e93>)

Computerprogramme

- TAPIR (Bonnet et al., 2010)
- Infernal (Nawrocki and Eddy, 2013)
- CLC Genomics Workbench (Qiagen, Venlo, Niederlande)
- Clonemanager 9 (Scientific and Educational Software, Cary, NC, USA)
- Canvas 12 und 15 (ACD Systems Seattle, WA, USA)
- Photoshop Version 22.5.9 (Adobe, San Jose, California, USA)
- Prism 8 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA)
- Microsoft Office 365 (Redmond, WA, USA)
- MetaMorph (Version 7, Molecular Devices)
- EndNote 20 (Clarivate, Philadelphia, PA, USA)
- BioLecture (Version 2.4.5, m2p-Labs, Baesweiler, Deutschland)

Webbasierte Programme

- PEDANT <http://pedant.helmholtz-muenchen.de/>
- EnsemblFungi: *Ustilago maydis* https://fungi.ensembl.org/Ustilago_maydis/Info/Index
- FungiDB www.fungidb.org (Amos et al., 2022)
- NCBI - Protein Blast <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE=Proteins>
- NCBI - Nucleotide Blast
[https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&BLAST_SPEC=GeoBlast
&PAGE_TYPE=BlastSearch](https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&BLAST_SPEC=GeoBlast&PAGE_TYPE=BlastSearch)
- NCBI - Conserved Domains <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>
(Marchler-Bauer et al., 2017)
- Simple Modular Architecture Research Tool (SMART) <http://smart.embl-heidelberg.de/>
(Letunic and Bork, 2018)
- RFAM <https://rfam.org/> (Kalvari et al., 2018)
- Codon-Optimierung <http://dicodon-optimization.appspot.com>
- The Arabidopsis Information Resource (TAIR) <https://www.arabidopsis.org/>
- The Saccharomyces Genome Database (SGD) <https://www.yeastgenome.org/>

5. Publikationen

Teile dieser Dissertation wurden in folgender Publikation veröffentlicht:

Lesley Plücker*, Kristin Bösch*, Lea Geißl, Philipp Hoffmann, Vera Göhre (2021) Genetic Manipulation of the Brassicaceae Smut Fungus *Thecaphora thlaspeos*. Journal of Fungi, 7.

*Diese Autoren haben gleichermaßen zur Publikation beigetragen.

Folgende Aspekte wurden dabei von mir beigetragen:

- Alle Vorarbeiten, die zu einem zuverlässigen, reproduzierbaren und homogenen Wachstumsverhalten von *T. thlaspeos* führten
- Wachstumskurven in verschiedenen Medien, die zur Auswahl des Erntezeitpunktes dienten; Verfahren zur Handhabung der filamentösen Kulturen von *T. thlaspeos*
- Auswahl und Analyse verschiedener zu testender Zellwand-abbauender Enzyme, Protoplastierungspuffer, Inkubationszeiten und -temperaturen; Aus diesen Daten wurde Tabelle S1 zusammenfasst.
- Ideen, Recherche sowie alle Vorarbeiten zur Optimierung des osmotischen Stabilisators sowie der Pufferkomponente im Protoplastierungspuffer (Abbildung 1 und Tabelle 1)
- Aufnahmen der einzelnen Protoplastierungs-Zwischenschritte (Abbildung 2)
- Experimente zur Optimierung der Enzymkombination für die Protoplastierung (Abbildung 3A)
- Untersuchungen der Enzymkonzentration (in Kollaboration mit Lesley Plücker; Abbildung 3B).
- Auswahl der zu testenden osmotischen Stabilisatoren für die Regeneration sowie Kontrollbedingungen; Tests mit verschiedenen Geliermitteln
- Alle Vorarbeiten zur Sensitivität gegenüber Antibiotika (Abbildung S2)
- Anleitung zur Herstellung der Plasmide pUMa3030 und pUMa3031; Herstellung von pUMa3886 (Tabelle S2); Transformation von pUMa3030 und pUMa3031 in *U. maydis*; Die Hälfte der mikroskopischen Aufnahmen aus Abbildung S4
- Mikroskopische Aufnahmen der Transformanten (Abbildung 6); Untersuchungen zur Hygromycin-Resistenz beider Transformanten
- Alle von mir bereitgestellten Aufnahmen wurden initial von mir bearbeitet
- Organisation von kollaborativen Aufgaben sowie das Fortschrittsmonitoring und die Anleitung aller Experimente während der Etablierungsphase der Protoplastierung, Protoplastenaufreinigung, Regeneration und Transformation von *T. thlaspeos*
- Mit dem hier beschriebenen Beitrag habe ich zum Protokoll S2 der Publikation beigetragen

Während dieser Dissertation wurde die Protoplasten-basierte Transformation und Stammverifikation von *U. maydis* aus bestehenden publizierten Daten als Protokoll mit Video publiziert in:

Kristin Bösch*, Lamprinos Frantzeskakis*, Miroslav Vraneš, Jörg Kämper, Kerstin Schipper, Vera Göhre (2016) Genetic manipulation of the plant pathogen *Ustilago maydis* to study fungal biology and plant microbe interactions. *Journal of Visualized Experiments*, 2016.

*Diese Autoren haben gleichermaßen zur Publikation beigetragen.

Folgende Aspekte wurden dabei von mir beigetragen:

- Bilder und Video zur Veranschaulichung des Protoplastierungsfortschritts (Abbildung 2 und eingebettet in Video)
- Bilder kontaminierter Kulturen von *U. maydis* (eingebettet in Video)
- Vorbereitung und Assistenz beim Filmen
- Erstellung der Materialliste

6. Literaturverzeichnis

- AKTER, S., KHAN, M. S., SMITH, E. N. & FLASHMAN, E. 2021. Measuring ROS and redox markers in plant cells. *RSC Chemical Biology*, 2, 1384-1401.
- ALI, S., LAURIE, J. D., LINNING, R., CERVANTES-CHÁVEZ, J. A., GAUDET, D. & BAKKEREN, G. 2014a. An Immunity-Triggering Effector from the Barley Smut Fungus *Ustilago hordei* Resides in an Ustilaginaceae-Specific Cluster Bearing Signs of Transposable Element-Assisted Evolution. *PLOS Pathogens*, 10, e1004223.
- ALI, S. S., GUNUPURU, L. R., KUMAR, G. B. S., KHAN, M., SCOFIELD, S., NICHOLSON, P. & DOOHAN, F. M. 2014b. Plant disease resistance is augmented in uzu barley lines modified in the brassinosteroid receptor BRI1. *BMC Plant Biology*, 14, 227.
- ALLEN, A., ISLAMOVIC, E., KAUR, J., GOLD, S., SHAH, D. & SMITH, T. J. 2013. The virally encoded killer proteins from *Ustilago maydis*. *Fungal Biology Reviews*, 26, 166-173.
- AMOS, B., AURRECOECHEA, C., BARBA, M., BARRETO, A., BASENKO, EVELINA Y., BAŽANT, W., BELNAP, R., BLEVINS, A. S., BÖHME, U., BRESTELLI, J., BRUNK, B. P., CADDICK, M., CALLAN, D., CAMPBELL, L., CHRISTENSEN, MIKKEL B., CHRISTOPHIDES, GEORGE K., CROUCH, K., DAVIS, K., DEBARRY, J., DOHERTY, R., DUAN, Y., DUNN, M., FALKE, D., FISHER, S., FLICEK, P., FOX, B., GAJRIA, B., GIRALDO-CALDERÓN, G. I., HARB, O. S., HARPER, E., HERTZ-FOWLER, C., HICKMAN, MARK J., HOWINGTON, C., HU, S., HUMPHREY, J., IODICE, J., JONES, A., JUDKINS, J., KELLY, S. A., KISSINGER, J. C., KWON, D. K., LAMOUREUX, K., LAWSON, D., LI, W., LIES, K., LODHA, D., LONG, J., MACCALLUM, R. M., MASLEN, G., MCDOWELL, M. A., NABRZYSKI, J., ROOS, D. S., RUND, S. S. C., SCHULMAN, STEPHANIE W., SHANMUGASUNDRAM, A., SITNIK, V., SPRUILL, D., STARNES, D., STOECKERT, CHRISTIAN J., JR., TOMKO, S. S., WANG, H., WARRENFELTZ, S., WIECK, R., WILKINSON, P. A., XU, L. & ZHENG, J. 2022. VEuPathDB: the eukaryotic pathogen, vector and host bioinformatics resource center. *Nucleic Acids Research*, 50, D898-D911.
- ANDRADE, O., MUÑOZ, G., GALDAMES, R., DURÁN, P. & HONORATO, R. 2004. Characterization, In Vitro Culture, and Molecular Analysis of *Thecaphora solani*, the Causal Agent of Potato Smut. *Phytopathology*, 94, 875-882.
- ARDELL, D. H. & HOU, Y.-M. 2016. Initiator tRNA genes template the 3' CCA end at high frequencies in bacteria. *BMC genomics*, 17, 1003-1003.
- ARIAS, S. L., MARY, V. S., VELEZ, P. A., RODRIGUEZ, M. G., OTAIZA-GONZÁLEZ, S. N. & THEUMER, M. G. 2021. Where Does the Peanut Smut Pathogen, *Thecaphora frezii*, Fit in the Spectrum of Smut Diseases? *Plant Disease*, 105, 2268-2280.
- ARNOLD, W. N. & GARRISON, R. G. 1979. Isolation and characterization of protoplasts from *Saccharomyces rouxii*. *Journal of bacteriology*, 137, 1386-1394.
- ARRAS, S. D. M. & FRASER, J. A. 2016. Chemical Inhibitors of Non-Homologous End Joining Increase Targeted Construct Integration in *Cryptococcus neoformans*. *PloS one*, 11, e0163049-e0163049.
- AUSUBEL, F. M., BRENT, R., E., K. R., MOORE, D. D., A., S. J., G., S. J. & STRUHL, K. 1987. *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Inc., USA.
- AYE, M., IRWIN, B., BELIAKOVA-BETHELL, N., CHEN, E., GARRUS, J. & SANDMEYER, S. 2004. Host Factors That Affect Ty3 Retrotransposition in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 168, 1159-1176.
- BALHADÈRE, P. V., FOSTER, A. J. & TALBOT, N. J. 1999. Identification of Pathogenicity Mutants of the Rice Blast Fungus *Magnaporthe grisea* by Insertional Mutagenesis. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 12, 129-142.
- BANUETT, F. & HERSKOWITZ, I. 1989. Different alleles of *Ustilago maydis* are necessary for maintenance of filamentous growth but not for meiosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 86, 5878-5882.
- BARDETTI, P., CASTANHEIRA, S. M., VALERIUS, O., BRAUS, G. H. & PÉREZ-MARTÍN, J. 2019. Cytoplasmic retention and degradation of a mitotic inducer enable plant infection by a pathogenic fungus. *eLife*, 8, e48943.

- BARTLETT, J. G., ALVES, S. C., SMEDLEY, M., SNAPE, J. W. & HARWOOD, W. A. 2008. High-throughput Agrobacterium-mediated barley transformation. *Plant Methods*, 4, 22.
- BAUCHWITZ, R. P. 1991. Heparin-mediated transformation of Escherichia coli with Ustilago maydis DNA. *Biotechniques*, 10, 710-8.
- BAUMANN, S., POHLMANN, T., JUNGBLUTH, M., BRACHMANN, A. & FELDBRÜGGE, M. 2012. Kinesin-3 and dynein mediate microtubule-dependent co-transport of mRNPs and endosomes. *Journal of Cell Science*, 125, 2740-2752.
- BELIDE, S., VANHERCKE, T., PETRIE, J. R. & SINGH, S. P. 2017. Robust genetic transformation of sorghum (Sorghum bicolor L.) using differentiating embryogenic callus induced from immature embryos. *Plant Methods*, 13, 109.
- BERKEY, R., BENDIGERI, D. & XIAO, S. 2012. Sphingolipids and Plant Defense/Disease: The "Death" Connection and Beyond. *Frontiers in Plant Science*, 3.
- BERNSTEIN DOUGLAS, A., VYAS VALMIK, K., WEINBERG DAVID, E., DRINNENBERG INES, A., BARTEL DAVID, P. & FINK GERALD, R. 2012. Candida albicans Dicer (CaDcr1) is required for efficient ribosomal and spliceosomal RNA maturation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109, 523-528.
- BERNSTEIN, K. A. & BASERGA, S. J. 2004. The Small Subunit Processome Is Required for Cell Cycle Progression at G1. *Molecular Biology of the Cell*, 15, 5038-5046.
- BHATTACHARJEE, S., ROCHE, B. & MARTIENSSEN, R. A. 2019. RNA-induced initiation of transcriptional silencing (RITS) complex structure and function. *RNA Biology*, 16, 1133-1146.
- BHATTACHARYA, K. & PICARD, D. 2021. The Hsp70–Hsp90 go-between Hop/Stip1/Sti1 is a proteostatic switch and may be a drug target in cancer and neurodegeneration. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 78, 7257-7273.
- BLACHUTZIK, J. O., DEMIR, F., KREUZER, I., HEDRICH, R. & HARMS, G. S. 2012. Methods of staining and visualization of sphingolipid enriched and non-enriched plasma membrane regions of Arabidopsis thaliana with fluorescent dyes and lipid analogues. *Plant Methods*, 8, 28.
- BLACK, J. J., WANG, Z., GOERING, L. M. & JOHNSON, A. W. 2018. Utp14 interaction with the small subunit processome. *RNA*, 24, 1214-1228.
- BLANKENBERG, D., GORDON, A., VON KUSTER, G., CORAOR, N., TAYLOR, J., NEKRUTENKO, A. & THE GALAXY, T. 2010. Manipulation of FASTQ data with Galaxy. *Bioinformatics*, 26, 1783-1785.
- BÖLKER, M., BÖHNERT, H. U., BRAUN, K. H., GÖRL, J. & KAHMANN, R. 1995. Tagging pathogenicity genes in Ustilago maydis by restriction enzyme-mediated integration (REMI). *Molecular and General Genetics MGG*, 248, 547.
- BÖLKER, M., URBAN, M. & KAHMANN, R. 1992. The a mating type locus of U. maydis specifies cell signaling components. *Cell*, 68, 441-450.
- BONNET, E., HE, Y., BILLIAU, K. & VAN DE PEER, Y. 2010. TAPIR, a web server for the prediction of plant microRNA targets, including target mimics. *Bioinformatics*, 26, 1566-1568.
- BÖSCH, K., FRANTZESKAKIS, L., VRANEŠ, M., KÄMPER, J., SCHIPPER, K. & GÖHRE, V. 2016. Genetic manipulation of the plant pathogen Ustilago maydis to study fungal biology and plant microbe interactions. *Journal of Visualized Experiments*, 2016.
- BOWMAN, S. M. & FREE, S. J. 2006. The structure and synthesis of the fungal cell wall. *BioEssays*, 28, 799-808.
- BRACHMANN, A., KÖNIG, J., JULIUS, C. & FELDBRÜGGE, M. 2004. A reverse genetic approach for generating gene replacement mutants in Ustilago maydis. *Molecular Genetics and Genomics*, 272, 216-226.
- BRAUD, C., ZHENG, W. & XIAO, W. 2012. LONO1 Encoding a Nucleoporin Is Required for Embryogenesis and Seed Viability in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 160, 823-836.
- CAI, Q., HE, B., WEIBERG, A., BUCK, A. H. & JIN, H. 2019. Small RNAs and extracellular vesicles: New mechanisms of cross-species communication and innovative tools for disease control. *PLOS Pathogens*, 15, e1008090.

- CAI, Q., QIAO, L., WANG, M., HE, B., LIN, F.-M., PALMQUIST, J., HUANG, S.-D. & JIN, H. 2018. Plants send small RNAs in extracellular vesicles to fungal pathogen to silence virulence genes. *Science*, 360, 1126.
- CAIRNS, T. C., STUDHOLME, D. J., TALBOT, N. J. & HAYNES, K. 2016. New and Improved Techniques for the Study of Pathogenic Fungi. *Trends in Microbiology*, 24, 35-50.
- CALO, S., SHERTZ-WALL, C., LEE, S. C., BASTIDAS, R. J., NICOLÁS, F. E., GRANER, J. A., MIECZKOWSKI, P., TORRES-MARTÍNEZ, S., RUIZ-VÁZQUEZ, R. M., CARDENAS, M. E. & HEITMAN, J. 2014. Antifungal drug resistance evoked via RNAi-dependent epimutations. *Nature*, 513, 555-558.
- CÁNOVAS-MÁRQUEZ, J. T., FALK, S., NICOLÁS, F. E., PADMANABHAN, S., ZAPATA-PÉREZ, R., SÁNCHEZ-FERRER, Á., NAVARRO, E. & GARRE, V. 2021. A ribonuclease III involved in virulence of Mucorales fungi has evolved to cut exclusively single-stranded RNA. *Nucleic Acids Research*, 49, 5294-5307.
- CAPRON, A., ÖKRÉSZ, L. & GENSHIK, P. 2003. First glance at the plant APC/C, a highly conserved ubiquitin-protein ligase. *Trends in Plant Science*, 8, 83-89.
- CARRERAS-VILLASEÑOR, N., ESQUIVEL-NARANJO, E. U., VILLALOBOS-ESCOBEDO, J. M., ABREU-GOODGER, C. & HERRERA-ESTRELLA, A. 2013. The RNAi machinery regulates growth and development in the filamentous fungus *Trichoderma atroviride*. *Molecular Microbiology*, 89, 96-112.
- CARTHEW, R. W. & SONTHEIMER, E. J. 2009. Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell*, 136, 642-655.
- CASTANEDA, N., PARK, J. & KANG, E. H. 2021. Regulation of Actin Bundle Mechanics and Structure by Intracellular Environmental Factors. *Frontiers in Physics*, 9.
- CERVANTES, M., VILA, A., NICOLÁS, F. E., MOXON, S., DE HARO, J. P., DALMAY, T., TORRES-MARTÍNEZ, S. & RUIZ-VÁZQUEZ, R. M. 2013. A Single Argonaute Gene Participates in Exogenous and Endogenous RNAi and Controls Cellular Functions in the Basal Fungus *Mucor circinelloides*. *PLOS ONE*, 8, e69283.
- CHAK, L.-L., MOHAMMED, J., LAI, E. C., TUCKER-KELLOGG, G. & OKAMURA, K. 2015. A deeply conserved, noncanonical miRNA hosted by ribosomal DNA. *RNA*, 21, 375-384.
- CHAKRABORTY, P., WANG, Y., WEI, J.-H., VAN DEURSEN, J., YU, H., MALUREANU, L., DASSO, M., FORBES, D. J., LEVY, D. E., SEEMANN, J. & FONTOURA, B. M. A. 2008. Nucleoporin Levels Regulate Cell Cycle Progression and Phase-Specific Gene Expression. *Developmental Cell*, 15, 657-667.
- CHANG, S.-S., ZHANG, Z. & LIU, Y. 2012. RNA interference pathways in fungi: mechanisms and functions. *Annual review of microbiology*, 66, 305-323.
- CHANG, Z., BILLMYRE, R. B., LEE, S. C. & HEITMAN, J. 2019. Broad antifungal resistance mediated by RNAi-dependent epimutation in the basal human fungal pathogen *Mucor circinelloides*. *PLOS Genetics*, 15, e1007957.
- CHAPMAN, E., TAGLINI, F. & BAYNE, E. H. 2022. Separable roles for RNAi in regulation of transposable elements and viability in the fission yeast *Schizosaccharomyces japonicus*. *PLOS Genetics*, 18, e1010100.
- CHARI, N. S., IVAN, C., LE, X., LI, J., MIJITI, A., PATEL, A. A., OSMAN, A. A., PETERSON, C. B., WILLIAMS, M. D., PICKERING, C. R., CAULIN, C., MYERS, J. N., CALIN, G. A. & LAI, S. Y. 2020. Disruption of TP63-miR-27a* Feedback Loop by Mutant TP53 in Head and Neck Cancer. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, 112, 266-277.
- CHEN, R., JIANG, N., JIANG, Q., SUN, X., WANG, Y., ZHANG, H. & HU, Z. 2014. Exploring MicroRNA-Like Small RNAs in the Filamentous Fungus *Fusarium oxysporum*. *PLOS ONE*, 9, e104956.
- CHEN, Y., GAO, Q., HUANG, M., LIU, Y., LIU, Z., LIU, X. & MA, Z. 2015. Characterization of RNA silencing components in the plant pathogenic fungus *Fusarium graminearum*. *Scientific Reports*, 5, 12500.
- CHEN, Y., GUO, E., ZHANG, J. & SI, T. 2020. Advances in RNAi-Assisted Strain Engineering in *Saccharomyces cerevisiae*. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 8.
- CHENG, A. P., KWON, S., ADESHARA, T., GÖHRE, V., FELDBRÜGGE, M. & WEIBERG, A. 2023. Extracellular RNAs released by plant-associated fungi: from fundamental

- mechanisms to biotechnological applications. *Appl Microbiol Biotechnol*, 107, 5935-5945.
- CHENG, Y. & BÉLANGER, R. R. 2000. Protoplast preparation and regeneration from spores of the biocontrol fungus *Pseudozyma flocculosa*. *FEMS Microbiology Letters*, 190, 287-291.
- CHOI, J., KIM, K. T., JEON, J., WU, J., SONG, H., ASIEGBU, F. O. & LEE, Y. H. 2014. FunRNA: A fungi-centered genomics platform for genes encoding key components of RNAi. *BMC Genomics*, 15.
- CIECHANOWSKA, K., POKORNOWSKA, M. & KURZYŃSKA-KOKORNIAK, A. 2021. Genetic Insight into the Domain Structure and Functions of Dicer-Type Ribonucleases. *International Journal of Molecular Sciences*, 22.
- CLAYCOMB, JULIE M. 2014. Ancient Endo-siRNA Pathways Reveal New Tricks. *Current Biology*, 24, R703-R715.
- COHEN, S. N., CHANG, A. C. & HSU, L. 1972. Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 69, 2110-4.
- COLEMAN, J. J., WHITE, G. J., RODRIGUEZ-CARRES, M. & VANETTEN, H. D. 2011. An ABC Transporter and a Cytochrome P450 of *Nectria haematococca* MPVI Are Virulence Factors on Pea and Are the Major Tolerance Mechanisms to the Phytoalexin Pisatin. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 24, 368-376.
- COLOT, H. V., PARK, G., TURNER, G. E., RINGELBERG, C., CREW, C. M., LITVINKOVA, L., WEISS, R. L., BORKOVICH, K. A. & DUNLAP, J. C. 2006. A high-throughput gene knockout procedure for *Neurospora* reveals functions for multiple transcription factors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103, 10352-10357.
- COMMUNITY, T. G. 2022. The Galaxy platform for accessible, reproducible and collaborative biomedical analyses: 2022 update. *Nucleic Acids Research*, 50, W345-W351.
- CONFORTO, C., CAZÓN, I., FERNÁNDEZ, F. D., MARINELLI, A., ODDINO, C. & RAGO, A. M. 2013. Molecular sequence data of *Thecaphora frezii* affecting peanut crops in Argentina. *European Journal of Plant Pathology*, 137, 663-666.
- COURVILLE, K. J., FRANTZESKAKIS, L., GUL, S., HAEGER, N., KELLNER, R., HEßLER, N., DAY, B., USADEL, B., GUPTA, Y. K., VAN ESSE, H. P., BRACHMANN, A., KEMEN, E., FELDBRÜGGE, M. & GÖHRE, V. 2019. Smut infection of perennial hosts: the genome and the transcriptome of the Brassicaceae smut fungus *Thecaphora thlaspeos* reveal functionally conserved and novel effectors. *New Phytologist*, 222, 1474-1492.
- CUI, T., LI, Z., ZHOU, Q. & LI, W. 2020a. Current advances in haploid stem cells. *Protein & Cell*, 11, 23-33.
- CUI, X., WANG, Z., LI, J., ZHU, J., REN, Z., ZHANG, D., ZHAO, W., FAN, Y., ZHANG, D. & SUN, R. 2020b. Cross talk between RNA N6-methyladenosine methyltransferase-like 3 and miR-186 regulates hepatoblastoma progression through Wnt/ β -catenin signalling pathway. *Cell Proliferation*, 53, e12768.
- CULLEN, D., LEONG, S. A., WILSON, L. J. & HENNER, D. J. 1987. Transformation of *Aspergillus nidulans* with the hygromycin-resistance gene, hph. *Gene*, 57, 21-26.
- CURRAGH, H. J., MOOIBROEK, H., WESSELS, J. G. H., MARCHANT, R. & MULLAN, E. 1993. Protoplast formation and DNA-mediated transformation of *Fusarium culmorum* to hygromycin B resistance. *Mycological Research*, 97, 313-317.
- D'SOUZA, C. A. & HEITMAN, J. 2001. Conserved cAMP signaling cascades regulate fungal development and virulence. *FEMS Microbiology Reviews*, 25, 349-364.
- DALAKOURAS, A., KATSAOUNI, A., AVRAMIDOU, M., DADAMI, E., TSIOURI, O., VASILEIADIS, S., MAKRIS, A., GEORGOPOULOU, M. E. & PAPADOPOULOU, K. K. 2023. A beneficial fungal root endophyte triggers systemic RNA silencing and DNA methylation of a host reporter gene. *RNA Biology*, 20, 20-30.
- DALLAIRE, A., MANLEY, B. F., WILKENS, M., BISTA, I., QUAN, C., EVANGELISTI, E., BRADSHAW, C. R., RAMAKRISHNA, N. B., SCHORNACK, S., BUTTER, F., PASZKOWSKI, U. & MISKA, E. A. 2021. Transcriptional activity and epigenetic

- regulation of transposable elements in the symbiotic fungus *Rhizophagus irregularis*. *Genome Research*, 31, 2290-2302.
- DANG, Y., CHENG, J., SUN, X., ZHOU, Z. & LIU, Y. 2016. Antisense transcription licenses nascent transcripts to mediate transcriptional gene silencing. *Genes & Development*, 30, 2417-2432.
- DANG, Y., YANG, Q., XUE, Z. & LIU, Y. 2011. RNA interference in fungi: Pathways, functions, and applications. *Eukaryotic Cell*, 10, 1148-1155.
- DAUGAARD, I. & HANSEN, T. B. 2017. Biogenesis and Function of Ago-Associated RNAs. *Trends in Genetics*, 33, 208-219.
- DE BEKKER, C., WIEBENGA, A., AGUILAR, G. & WÖSTEN, H. A. B. 2009. An enzyme cocktail for efficient protoplast formation in *Aspergillus niger*. *Journal of Microbiological Methods*, 76, 305-306.
- DEGNAN, R. M., MCTAGGART, A. R., SHUEY, L. S., PAME, L. J. S., SMITH, G. R., GARDINER, D. M., NOCK, V., SOFFE, R., SALE, S., GARRILL, A., CARROLL, B. J., MITTER, N. & SAWYER, A. 2022. Exogenous double-stranded RNA inhibits the infection physiology of rust fungi to reduce symptoms in planta. *Molecular Plant Pathology*, n/a.
- DERNTL, C., KIESENHOFER, D. P., MACH, R. L. & MACH-AIGNER, A. R. 2015. Novel Strategies for Genomic Manipulation of *Trichoderma reesei* with the Purpose of Strain Engineering. *Applied and Environmental Microbiology*, 81, 6314-6323.
- DEZ, C., DLAKIĆ, M. & TOLLERVEY, D. 2007. Roles of the HEAT repeat proteins Utp10 and Utp20 in 40S ribosome maturation. *RNA*, 13, 1516-1527.
- DIDYCHUK, A. L., BUTCHER, S. E. & BROW, D. A. 2018. The life of U6 small nuclear RNA, from cradle to grave. *RNA* 24, 437-460.
- DOYLE, C. E., DONALDSON, M. E., MORRISON, E. N. & SAVILLE, B. J. 2011. *Ustilago maydis* transcript features identified through full-length cDNA analysis. *Molecular Genetics and Genomics*, 286, 143.
- DRINNENBERG, I. A., WEINBERG, D. E., XIE, K. T., MOWER, J. P., WOLFE, K. H., FINK, G. R. & BARTEL, D. P. 2009. RNAi in Budding Yeast. *Science*, 326, 544-550.
- DUBEY, H., KIRAN, K., JASWAL, R., JAIN, P., KAYASTHA, A. M., BHARDWAJ, S. C., MONDAL, T. K. & SHARMA, T. R. 2019. Discovery and profiling of small RNAs from *Puccinia triticina* by deep sequencing and identification of their potential targets in wheat. *Functional & Integrative Genomics*, 19, 391-407.
- DUNKER, F., TRUTZENBERG, A., ROTHENPIELER, J. S., KUHN, S., PRÖLS, R., SCHREIBER, T., TISSIER, A., KEMEN, A., KEMEN, E., HÜCKELHOVEN, R. & WEIBERG, A. 2020. Oomycete small RNAs bind to the plant RNA-induced silencing complex for virulence. *eLife*, 9, e56096.
- DUTTA, S., JHA, S. K., PRABHU, K. V., KUMAR, M. & MUKHOPADHYAY, K. 2019. Leaf rust (*Puccinia triticina*) mediated RNAi in wheat (*Triticum aestivum* L.) prompting host susceptibility. *Functional & Integrative Genomics*, 19, 437-452.
- FAKTOROVÁ, D., BÄR, A., HASHIMI, H., MCKENNEY, K., HORÁK, A., SCHNAUFER, A., RUBIO, M. A. T., ALFONZO, J. D. & LUKEŠ, J. 2018. TbUTP10, a protein involved in early stages of pre-18S rRNA processing in *Trypanosoma brucei*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 225, 84-93.
- FARIÑA, J. I., MOLINA, O. E. & FIGUEROA, L. I. C. 2004. Formation and regeneration of protoplasts in *Sclerotium rolfsii* ATCC 201126. *Journal of Applied Microbiology*, 96, 254-262.
- FISHER, M. C., HENK, D. A., BRIGGS, C. J., BROWNSTEIN, J. S., MADOFF, L. C., MCCRAW, S. L. & GURR, S. J. 2012. Emerging fungal threats to animal, plant and ecosystem health. *Nature*, 484, 186-194.
- FLORS, V., LEYVA, M. D. L. O., VICEDO, B., FINITI, I., REAL, M. D., GARCÍA-AGUSTÍN, P., BENNETT, A. B. & GONZÁLEZ-BOSCH, C. 2007. Absence of the endo- β -1,4-glucanases Cel1 and Cel2 reduces susceptibility to *Botrytis cinerea* in tomato. *The Plant Journal*, 52, 1027-1040.

- FOWLER, E. K., MOHORIANU, I., SMITH, D. T., DALMAY, T. & CHAPMAN, T. 2018. Small RNA populations revealed by blocking rRNA fragments in *Drosophila melanogaster* reproductive tissues. *PLOS ONE*, 13, e0191966.
- FRANK, F., HAUVER, J., SONENBERG, N. & NAGAR, B. 2012. Arabidopsis Argonaute MID domains use their nucleotide specificity loop to sort small RNAs. *The EMBO Journal*, 31, 3588-3595-3595.
- FRANTZESKAKIS, L., COURVILLE, K. J., PLÜCKER, L., KELLNER, R., KRUSE, J., BRACHMANN, A., FELDBRÜGGE, M. & GÖHRE, V. 2017. The plant-dependent life cycle of *Thecaphora thlaspeos*: A smut fungus adapted to Brassicaceae. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 30, 271-282.
- FULCI, V. & MACINO, G. 2007. Quelling: post-transcriptional gene silencing guided by small RNAs in *Neurospora crassa*. *Current Opinion in Microbiology*, 10, 199-203.
- GAFFAR, F. Y., IMANI, J., KARLOVSKY, P., KOCH, A. & KOGEL, K.-H. 2019. Different Components of the RNA Interference Machinery Are Required for Conidiation, Ascosporeogenesis, Virulence, Deoxynivalenol Production, and Fungal Inhibition by Exogenous Double-Stranded RNA in the Head Blight Pathogen *Fusarium graminearum*. *Frontiers in Microbiology*, 10.
- GEBERT, D. & ROSENKRANZ, D. 2015. RNA-based regulation of transposon expression. *WIREs RNA*, 6, 687-708.
- GEIßL, L. 2020. *Charakterisierung des Paarungsprozesses und seine Rolle für die Pilzinfektion in dem Brassicaceenbrandpilz Thecaphora thlaspeos*. unveröffentlichte Masterarbeit, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, Deutschland.
- GHAREEB, H. 2011. *Molecular Dissection of Maize-Sporisorium reilianum Interactions: Host Developmental Changes and Pathogen Effectors*. Dissertation, Philipps-Universität Marburg, Deutschland.
- GHAREEB, H., DRECHSLER, F., LÖFKE, C., TEICHMANN, T. & SCHIRAWSKI, J. 2015. SUPPRESSOR OF APICAL DOMINANCE1 of *Sporisorium reilianum* modulates inflorescence branching architecture in maize and arabidopsis. *Plant Physiology*, 169, 2789-2804.
- GHAREEB, H., ZHAO, Y. & SCHIRAWSKI, J. 2019. *Sporisorium reilianum* possesses a pool of effector proteins that modulate virulence on maize. *Molecular Plant Pathology*, 20, 124-136.
- GIETZ, R. D. & WOODS, R. A. 2001. Genetic Transformation of Yeast. *BioTechniques*, 30, 816-831.
- GILLIES, J. P., REIMER, J. M., KARASMANIS, E. P., LAHIRI, I., HTET, Z. M., LESCHZINER, A. E. & RECK-PETERSON, S. L. 2022. Structural basis for cytoplasmic dynein-1 regulation by Lis1. *eLife*, 11, e71229.
- GILLISSEN, B., BERGEMANN, J., SANDMANN, C., SCHROEER, B., BÖLKER, M. & KAHMANN, R. 1992. A two-component regulatory system for self/non-self recognition in *Ustilago maydis*. *Cell*, 68, 647-57.
- GÖHRE, V. & ROBATZEK, S. 2008. Breaking the barriers: Microbial effector molecules subvert plant immunity. *Annual Review of Phytopathology*.
- GOLD, S., DUNCAN, G., BARRETT, K. & KRONSTAD, J. 1994. cAMP regulates morphogenesis in the fungal pathogen *Ustilago maydis*. *Genes & Development*, 8, 2805-2816.
- GONZÁLEZ, A., JIMÉNEZ, A., VÁZQUEZ, D., DAVIES, J. E. & SCHINDLER, D. 1978. Studies on the mode of action of hygromycin B, an inhibitor of translocation in eukaryotes. *BBA Section Nucleic Acids And Protein Synthesis*, 521, 459-469.
- GONZÁLEZ, A., RUIZ, A., SERRANO, R., ARIÑO, J. & CASAMAYOR, A. 2006. Transcriptional Profiling of the Protein Phosphatase 2C Family in Yeast Provides Insights into the Unique Functional Roles of Ptc1. *Journal of Biological Chemistry*, 281, 35057-35069.
- GOODENBOUR, J. M. & PAN, T. 2006. Diversity of tRNA genes in eukaryotes. *Nucleic acids research*, 34, 6137-6146.

- GOULIN, E. H., DE LIMA, T. A., DOS SANTOS, P. J. C. & MACHADO, M. A. 2022. RNAi-induced silencing of the succinate dehydrogenase subunits gene in *Colletotrichum abscissum*, the causal agent of postbloom fruit drop (PFD) in citrus. *Microbiological Research*, 260, 126938.
- GRIMM, M., JUNKER, V., BEIER, H., BRÜNEN-NIEWELER, C. & HECKMANN, K. 1998. The hypotrichous ciliate *Euplotes octocarinatus* has only one type of tRNACys with GCA anticodon encoded on a single macronuclear DNA molecule. *Nucleic Acids Research*, 26, 4557-4565.
- GU, Y., ZAVALIEV, R. & DONG, X. 2017. Membrane Trafficking in Plant Immunity. *Molecular Plant*, 10, 1026-1034.
- GUTBROD, M. J. & MARTIENSSEN, R. A. 2020. Conserved chromosomal functions of RNA interference. *Nature Reviews Genetics*, 21, 311-331.
- GUTKOWSKA, M., WNUK, M., NOWAKOWSKA, J., LICHOCKA, M., STRONKOWSKI, M. M. & SWIEZEWSKA, E. 2015. Rab geranylgeranyl transferase β subunit is essential for male fertility and tip growth in *Arabidopsis*. *J Exp Bot*, 66, 213-24.
- HA, M. & KIM, V. N. 2014. Regulation of microRNA biogenesis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 15, 509-524.
- HABIG, M., SCHOTANUS, K., HUFNAGEL, K., HAPPEL, P. & STUKENBROCK, E. H. 2021. Ago1 Affects the Virulence of the Fungal Plant Pathogen *Zymoseptoria tritici*. *Genes (Basel)*, 12.
- HACISALIHOGU, A., JONGEJAN, J. A. & DUINE, J. A. 1997. Distribution of amine oxidases and amine dehydrogenases in bacteria grown on primary amines and characterization of the amine oxidase from *Klebsiella oxytoca*. *Microbiology*, 143, 505-512.
- HÁLA, M., SOUKUPOVÁ, H., SYNEK, L. & ZÁRSKÝ, V. 2010. *Arabidopsis* RAB geranylgeranyl transferase beta-subunit mutant is constitutively photomorphogenic, and has shoot growth and gravitropic defects. *Plant J*, 62, 615-27.
- HAN, Q., PAN, C., WANG, Y., ZHAO, L., WANG, Y. & SANG, J. 2019. PP2A-Like Protein Phosphatase (Sit4) Regulatory Subunits, Sap155 and Sap190, Regulate *Candida albicans*' Cell Growth, Morphogenesis, and Virulence. *Frontiers in Microbiology*, 10.
- HE, B., CAI, Q., QIAO, L., HUANG, C.-Y., WANG, S., MIAO, W., HA, T., WANG, Y. & JIN, H. 2021. RNA-binding proteins contribute to small RNA loading in plant extracellular vesicles. *Nature Plants*, 7, 342-352.
- HE, M., LAN, M., ZHANG, B., ZHOU, Y., WANG, Y., ZHU, L., YUAN, M. & FU, Y. 2018. Rab-H1b is essential for trafficking of cellulose synthase and for hypocotyl growth in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Integrative Plant Biology*, 60, 1051-1069.
- HEERA, R., SIVACHANDRAN, P., CHINNI, S. V., MASON, J., CROFT, L., RAVICHANDRAN, M. & SU YIN, L. 2015. Efficient extraction of small and large RNAs in bacteria for excellent total RNA sequencing and comprehensive transcriptome analysis. *BMC Research Notes*, 8, 754.
- HEMETSBERGER, C., MUELLER, A. N., MATEI, A., HERRBERGER, C., HENSEL, G., KUMLEHN, J., MISHRA, B., SHARMA, R., THINES, M., HÜCKELHOVEN, R. & DOEHLEMANN, G. 2015. The fungal core effector Pep1 is conserved across smuts of dicots and monocots. *New Phytologist*, 206, 1116-1126.
- HOLLIDAY, R. 1974. *Handbook of genetics*, New York: Plenum Press.
- HONDA, Y., TANIGAWA, E., TSUKIHARA, T., NGUYEN, D. X., KAWABE, H., SAKATOKU, N., WATARI, J., SATO, H., YANO, S., TACHIKI, T., IRIE, T., WATANABE, T. & WATANABE, T. 2019. Stable and transient transformation, and a promoter assay in the selective lignin-degrading fungus, *Ceriporiopsis subvermispora*. *AMB Express*, 9, 92.
- HONGAY, C. F., GRISAFI, P. L., GALITSKI, T. & FINK, G. R. 2006. Antisense Transcription Controls Cell Fate in *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell*, 127, 735-745.
- HOU, Y., ZHAI, Y., FENG, L., KARIMI, H. Z., RUTTER, B. D., ZENG, L., CHOI, D. S., ZHANG, B., GU, W., CHEN, X., YE, W., INNES, R. W., ZHAI, J. & MA, W. 2019. A *Phytophthora* Effector Suppresses Trans-Kingdom RNAi to Promote Disease Susceptibility. *Cell Host & Microbe*, 25, 153-165.e5.

- HUANG, C.-Y., WANG, H., HU, P., HAMBY, R. & JIN, H. 2019. Small RNAs - Big Players in Plant-Microbe Interactions. *Cell Host & Microbe*, 26, 173-182.
- HÜTTNER, S., VEIT, C., VAVRA, U., SCHOBENER, J., LIEBMINGER, E., MARESCH, D., GRASS, J., ALTMANN, F., MACH, L. & STRASSER, R. 2014. Arabidopsis Class I α -Mannosidases MNS4 and MNS5 Are Involved in Endoplasmic Reticulum-Associated Degradation of Misfolded Glycoproteins. *The Plant Cell*, 26, 1712-1728.
- IKEUCHI, K., IZAWA, T. & INADA, T. 2019. Recent Progress on the Molecular Mechanism of Quality Controls Induced by Ribosome Stalling. *Frontiers in Genetics*, 9.
- INNIS, M. A., GELFAND, D. H., SNINKSY, J. J. & WHITE, T. J. 1990. *PCR Protocols: a guide to methods and amplifications*, San Diego, USA: Academic press.
- JAEGER, P. A., MCELFFRESH, C., WONG, L. R. & IDEKER, T. 2015. Beyond Agar: Gel Substrates with Improved Optical Clarity and Drug Efficiency and Reduced Autofluorescence for Microbial Growth Experiments. *Applied and Environmental Microbiology*, 81, 5639.
- JANBON, G., MAENG, S., YANG, D.-H., KO, Y.-J., JUNG, K.-W., MOYRAND, F., FLOYD, A., HEITMAN, J. & BAHN, Y.-S. 2010. Characterizing the role of RNA silencing components in *Cryptococcus neoformans*. *Fungal Genetics and Biology*, 47, 1070-1080.
- JI, H. M., MAO, H. Y., LI, S. J., FENG, T., ZHANG, Z. Y., CHENG, L., LUO, S. J., BORKOVICH, K. A. & OUYANG, S. Q. 2021. Fol-milR1, a pathogenicity factor of *Fusarium oxysporum*, confers tomato wilt disease resistance by impairing host immune responses. *New Phytologist*, 232, 705-718.
- JIA, H., AADLAND, K., KOLACZKOWSKI, O. & KOLACZKOWSKI, B. 2021. Direct Molecular Evidence for an Ancient, Conserved Developmental Toolkit Controlling Posttranscriptional Gene Regulation in Land Plants. *Molecular Biology and Evolution*, 38, 4765-4777.
- JIAN, J. & LIANG, X. 2019. One Small RNA of *Fusarium graminearum* Targets and Silences CEB1P Gene in Common Wheat. *Microorganisms*, 7, 425.
- JIANG, N., YANG, Y., JANBON, G., PAN, J. & ZHU, X. 2012. Identification and Functional Demonstration of miRNAs in the Fungus *Cryptococcus neoformans*. *PLOS ONE*, 7, e52734.
- JÖCHL, C., LOH, E., PLONER, A., HAAS, H. & HÜTTENHOFER, A. 2009. Development-dependent scavenging of nucleic acids in the filamentous fungus *Aspergillus fumigatus*. *RNA Biology*, 6, 179-186.
- JUNG, H. J., CHOI, S. W., BOO, K.-H., KIM, J.-E., OH, Y. K., HAN, M. K., RYU, M. Y., LEE, C. W., MØLLER, C., SHAH, P., KIM, G. M., YANG, W., CHO, S. K. & YANG, S. W. 2022. HYL1-CLEAVAGE SUBTILASE 1 (HCS1) suppresses miRNA biogenesis in response to light-to-dark transition. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 119, e2116757119.
- JUNG, K. W., JUNG, J. H. & PARK, H. Y. 2021. Functional Roles of Homologous Recombination and Non-Homologous End Joining in DNA Damage Response and Microevolution in *Cryptococcus neoformans*. *Journal of Fungi*, 7.
- KALVARI, I., NAWROCKI, E. P., ARGASINSKA, J., QUINONES-OLVERA, N., FINN, R. D., BATEMAN, A. & PETROV, A. I. 2018. Non-Coding RNA Analysis Using the Rfam Database. *Current protocols in bioinformatics*, 62, e51-e51.
- KÄMPER, J. 2004. A PCR-based system for highly efficient generation of gene replacement mutants in *Ustilago maydis*. *Molecular Genetics and Genomics*, 271, 103-110.
- KÄMPER, J., KAHMANN, R., BÖLKER, M., MA, L. J., BREFORT, T., SAVILLE, B. J., BANUETT, F., KRONSTAD, J. W., GOLD, S. E., MÜLLER, O., PERLIN, M. H., WÖSTEN, H. A. B., DE VRIES, R., RUIZ-HERRERA, J., REYNAGA-PEÑA, C. G., SNETSELAAR, K., MCCANN, M., PÉREZ-MARTÍN, J., FELDBRÜGGE, M., BASSE, C. W., STEINBERG, G., IBEAS, J. I., HOLLOMAN, W., GUZMAN, P., FARMAN, M., STAJICH, J. E., SENTANDREU, R., GONZÁLEZ-PRIETO, J. M., KENNEL, J. C., MOLINA, L., SCHIRAWSKI, J., MENDOZA-MENDOZA, A., GREILINGER, D., MÜNCH, K., RÖSSEL, N., SCHERER, M., VRANĚS, M., LADENDORF, O., VINCON,

- V., FUCHS, U., SANDROCK, B., MENG, S., HO, E. C. H., CAHILL, M. J., BOYCE, K. J., KLOSE, J., KLOSTERMAN, S. J., DEELSTRA, H. J., ORTIZ-CASTELLANOS, L., LI, W., SANCHEZ-ALONSO, P., SCHREIER, P. H., HÄUSER-HAHN, I., VAUPEL, M., KOOPMANN, E., FRIEDRICH, G., VOSS, H., SCHLÜTER, T., MARGOLIS, J., PLATT, D., SWIMMER, C., GNIRKE, A., CHEN, F., VYSOTSKAIA, V., MANNHAUPT, G., GÜLDENER, U., MÜNSTERKÖTTER, M., HAASE, D., OESTERHELD, M., MEWES, H. W., MAUCELI, E. W., DECAPRIO, D., WADE, C. M., BUTLER, J., YOUNG, S., JAFFE, D. B., CALVO, S., NUSBAUM, C., GALAGAN, J. & BIRREN, B. W. 2006. Insights from the genome of the biotrophic fungal plant pathogen *Ustilago maydis*. *Nature*, 444, 97-101.
- KANG, K., ZHONG, J., JIANG, L., LIU, G., GOU, C. Y., WU, Q., WANG, Y., LUO, J. & GOU, D. 2013. Identification of microRNA-Like RNAs in the Filamentous Fungus *Trichoderma reesei* by Solexa Sequencing. *PLOS ONE*, 8, e76288.
- KATAYA, A. R. A., CREIGHTON, M. T., NAPITUPULU, T. P., SÆTRE, C., HEIDARI, B., RUOFF, P. & LILLO, C. 2017. PLATINUM SENSITIVE 2 LIKE impacts growth, root morphology, seed set, and stress responses. *PLOS ONE*, 12, e0180478.
- KAWAI, S., HASHIMOTO, W. & MURATA, K. 2010. Transformation of *Saccharomyces cerevisiae* and other fungi: methods and possible underlying mechanism. *Bioengineered bugs*, 1, 395-403.
- KELANI, A. A., BRUCH, A., RIVIECCIO, F., VISSER, C., KRÜGER, T., WEAVER, D., PAN, X., SCHÄUBLE, S., PANAGIOTOU, G., KNIEMEYER, O., BROMLEY, M. J., BOWYER, P., BARBER, A. E., BRAKHAGE, A. A. & BLANGO, M. G. 2023. Disruption of the *Aspergillus fumigatus* RNA interference machinery alters the conidial transcriptome. *RNA*, 29, 1033-1050.
- KETTLES, G. J., HOFINGER, B. J., HU, P., BAYON, C., RUDD, J. J., BALMER, D., COURBOT, M., HAMMOND-KOSACK, K. E., SCALLIET, G. & KANYUKA, K. 2019. sRNA Profiling Combined With Gene Function Analysis Reveals a Lack of Evidence for Cross-Kingdom RNAi in the Wheat – *Zymoseptoria tritici* Pathosystem. *Frontiers in Plant Science*, 10.
- KIM, J.-S., LEE, K.-T., LEE MYUNG, H., CHEONG, E. & BAHN, Y.-S. 2021. Adenylyl Cyclase and Protein Kinase A Play Redundant and Distinct Roles in Growth, Differentiation, Antifungal Drug Resistance, and Pathogenicity of *Candida auris*. *mBio*, 12, e02729-21.
- KIM, M. S., KIM, S.-Y., YOON, J. K., LEE, Y.-W. & BAHN, Y.-S. 2009. An efficient gene-disruption method in *Cryptococcus neoformans* by double-joint PCR with NAT-split markers. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 390, 983-988.
- KIM, S., HA, B.-S. & RO, H.-S. 2015. Current technologies and related issues for mushroom transformation. *Mycobiology*, 43, 1-8.
- KISTLER, H. C. & BENNY, U. K. 1988. Genetic transformation of the fungal plant wilt pathogen, *Fusarium oxysporum*. *Current Genetics*, 13, 145-149.
- KLIS, F. M., BOORSMA, A. & DE GROOT, P. W. J. 2006. Cell wall construction in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 23, 185-202.
- KOBAYASHI, H. & SINGER, R. H. 2022. Single-molecule imaging of microRNA-mediated gene silencing in cells. *Nature Communications*, 13, 1435.
- KOCH, A., BIEDENKOPF, D., FURCH, A., WEBER, L., ROSSBACH, O., ABDELLATEF, E., LINICUS, L., JOHANNSMIEIER, J., JELONEK, L., GOESMANN, A., CARDOZA, V., MCMILLAN, J., MENTZEL, T. & KOGEL, K.-H. 2016. An RNAi-Based Control of *Fusarium graminearum* Infections Through Spraying of Long dsRNAs Involves a Plant Passage and Is Controlled by the Fungal Silencing Machinery. *PLoS pathogens*, 12, e1005901-e1005901.
- KOHARI, M., SHIBUYA, N. & KAKU, H. 2020. Simultaneous visualization of callose deposition and plasma membrane for live-cell imaging in plants. *Plant Cell Reports*, 39, 1517-1523.
- KOJIC, M. & HOLLOMAN, W. K. 2000. Shuttle vectors for genetic manipulations in *Ustilago maydis*. *Canadian Journal of Microbiology*, 46, 333-338.

- KONG, X., YANG, M., LE, B. H., HE, W. & HOU, Y. 2022. The master role of siRNAs in plant immunity. *Molecular Plant Pathology*, 23, 1565-1574.
- KOUKAKI, M., GIANNOUTSOU, E., KARAGOUNI, A. & DIALLINAS, G. 2003. A novel improved method for *Aspergillus nidulans* transformation. *Journal of Microbiological Methods*, 55, 687-695.
- KRAEGE, A. 2021. *Regulation pflanzlicher Genexpression: Ziele des kernlokalisiertem Thecaphora thlaspeos Effektor tue1 und die Vorhersage von in Cross-Kingdom-RNAi involvierten sRNAs*. unveröffentlichte Masterarbeit, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, Deutschland.
- KRONSTAD, J. W. 1996. Pathogenesis and Sexual Development of the Smut Fungi. In: STACEY, G. & KEEN, N. T. (eds.) *Plant-Microbe Interactions*. Boston, MA: Springer US.
- KUSCH, S., SINGH, M., THIERON, H., SPANU, P. D. & PANSTRUGA, R. 2023. Site-specific analysis reveals candidate cross-kingdom small RNAs, tRNA and rRNA fragments, and signs of fungal RNA phasing in the barley–powdery mildew interaction. *Molecular Plant Pathology*, 24, 570-587.
- KUTAY, U., JÜHLEN, R. & ANTONIN, W. 2021. Mitotic disassembly and reassembly of nuclear pore complexes. *Trends in Cell Biology*, 31, 1019-1033.
- KWON, S., RUPP, O., BRACHMANN, A., BLUM, C. F., KRAEGE, A., GOESMANN, A. & FELDBRÜGGE, M. 2021. mRNA Inventory of Extracellular Vesicles from *Ustilago maydis*. *Journal of Fungi*, 7.
- KWON, S., TISSERANT, C., TULINSKI, M., WEIBERG, A. & FELDBRÜGGE, M. 2020. Inside-out: from endosomes to extracellular vesicles in fungal RNA transport. *Fungal Biology Reviews*, 34, 89-99.
- LAGESEN, K., HALLIN, P., RØDLAND, E. A., STÆRFELDT, H.-H., ROGNES, T. & USSERY, D. W. 2007. RNAmmer: consistent and rapid annotation of ribosomal RNA genes. *Nucleic Acids Research*, 35, 3100-3108.
- LAI, J., NG, S. K., LIU, F. F., PATKAR, R. N., LU, Y., CHAN, J. R., SURESH, A., NAQVI, N. & JEDD, G. 2010. Marker fusion tagging, a new method for production of chromosomally encoded fusion proteins. *Eukaryotic Cell*, 9, 827-830.
- LAMBERT, M., BENMOUSSA, A. & PROVOST, P. 2019. Small Non-Coding RNAs Derived from Eukaryotic Ribosomal RNA. *Non-Coding RNA*, 5.
- LANGMEAD, B., TRAPNELL, C., POP, M. & SALZBERG, S. L. 2009. Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome. *Genome Biology*, 10, R25.
- LANGNER, T., ÖZTÜRK, M., HARTMANN, S., CORD-LANDWEHR, S., MOERSCHBACHER, B., WALTON, J. D. & GÖHREA, V. 2015. Chitinases are essential for cell separation in *Ustilago maydis*. *Eukaryotic Cell*, 14, 846-857.
- LANVER, D., MÜLLER, A. N., HAPPEL, P., SCHWEIZER, G., HAAS, F. B., FRANITZA, M., PELLEGRIN, C., REISSMANN, S., ALTMÜLLER, J., RENSING, S. A. & KAHMANN, R. 2018. The Biotrophic Development of *Ustilago maydis* Studied by RNA-Seq Analysis. *Plant Cell*, 30, 300-323.
- LANVER, D., TOLLOT, M., SCHWEIZER, G., LO PRESTI, L., REISSMANN, S., MA, L.-S., SCHUSTER, M., TANAKA, S., LIANG, L., LUDWIG, N. & KAHMANN, R. 2017. *Ustilago maydis* effectors and their impact on virulence. *Nature Reviews Microbiology*, 15, 409-421.
- LASLETT, D. & CANBACK, B. 2004. ARAGORN, a program to detect tRNA genes and tmRNA genes in nucleotide sequences. *Nucleic acids research*, 32, 11-16.
- LAU, A. Y. T., CHENG, X., CHENG, C. K., NONG, W., CHEUNG, M. K., CHAN, R. H.-F., HUI, J. H. L. & KWAN, H. S. 2018. Discovery of microRNA-like RNAs during early fruiting body development in the model mushroom *Coprinopsis cinerea*. *PLOS ONE*, 13, e0198234.
- LAU, S. K. P., CHOW, W.-N., WONG, A. Y. P., YEUNG, J. M. Y., BAO, J., ZHANG, N., LOK, S., WOO, P. C. Y. & YUEN, K.-Y. 2013. Identification of MicroRNA-Like RNAs in

- Mycelial and Yeast Phases of the Thermal Dimorphic Fungus *Penicillium marneffei*. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 7, e2398.
- LAURIE, J. D., ALI, S., LINNING, R., MANNHAUPT, G., WONG, P., GÜLDENER, U., MÜNSTERKÖTTER, M., MOORE, R., KAHMANN, R., BAKKEREN, G. & 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.
- LAURIE, J. D., LINNING, R. & BAKKEREN, G. 2008. Hallmarks of RNA silencing are found in the smut fungus *Ustilago hordei* but not in its close relative *Ustilago maydis*. *Current Genetics*, 53, 49-58.
- LAX, C., TAHIRI, G., PATIÑO-MEDINA, J. A., CÁNOVAS-MÁRQUEZ, J. T., PÉREZ-RUIZ, J. A., OSORIO-CONCEPCIÓN, M., NAVARRO, E. & CALO, S. 2020. The Evolutionary Significance of RNAi in the Fungal Kingdom. *International Journal of Molecular Sciences*, 21.
- LEE, H.-C., LI, L., GU, W., XUE, Z., CROSTHWAITE, S. K., PERTSEMLIDIS, A., LEWIS, Z. A., FREITAG, M., SELKER, E. U., MELLO, C. C. & LIU, Y. 2010. Diverse Pathways Generate MicroRNA-like RNAs and Dicer-Independent Small Interfering RNAs in Fungi. *Molecular Cell*, 38, 803-814.
- LEE, H., CHOI, G., LIM, Y.-J. & LEE, Y.-H. 2022. Comparative profiling of canonical and non-canonical small RNAs in the rice blast fungus, *Magnaporthe oryzae*. *Frontiers in Microbiology*, 13.
- LETUNIC, I. & BORK, P. 2018. 20 years of the SMART protein domain annotation resource. *Nucleic Acids Research*, 46, D493-D496.
- LEVIN, H. L. & MORAN, J. V. 2011. Dynamic interactions between transposable elements and their hosts. *Nature Reviews Genetics*, 12, 615-627.
- LI, D., TANG, Y., LIN, J. & CAI, W. 2017a. Methods for genetic transformation of filamentous fungi. *Microbial cell factories*, 16, 168-168.
- LI, P. & DAY, B. 2019. Battlefield Cytoskeleton: Turning the Tide on Plant Immunity. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 32, 25-34.
- LI, X., WANG, S., YANG, X. & CHU, H. 2021. miR-142-3p targets AC9 to regulate sciatic nerve injury-induced neuropathic pain by regulating the cAMP/AMPK signalling pathway. *International Journal of Molecular Medicine*, 47, 561-572.
- LI, Y., YANG, R.-H., JIANG, L., HU, X.-D., WU, Z.-J. & YAO, Y.-J. 2017b. rRNA Pseudogenes in Filamentous Ascomycetes as Revealed by Genome Data. *G3 (Bethesda, Md.)*, 7, 2695-2703.
- LI, Y., ZHANG, Q., ZHANG, J., WU, L., QI, Y. & ZHOU, J.-M. 2010. Identification of MicroRNAs Involved in Pathogen-Associated Molecular Pattern-Triggered Plant Innate Immunity. *Plant Physiology*, 152, 2222-2231.
- LIANG, L., LI, J., CHENG, L., LING, J., LUO, Z., BAI, M. & XIE, B. 2014. A high efficiency gene disruption strategy using a positive–negative split selection marker and electroporation for *Fusarium oxysporum*. *Microbiological Research*, 169, 835-843.
- LIANG, M., LI, W., QI, L., CHEN, G., CAI, L. & YIN, W.-B. 2021. Establishment of a Genetic Transformation System in Guanophilic Fungus *Amphichorda guana*. *Journal of Fungi* [Online], 7.
- LIU, G., KANG, G., WANG, S., HUANG, Y. & CAI, Q. 2021. Extracellular Vesicles: Emerging Players in Plant Defense Against Pathogens. *Frontiers in Plant Science*, 12.
- LIU, J., CUI, H., WANG, R., XU, Z., YU, H., SONG, C., LU, H., LI, Q., XING, D., TAN, Q., SUN, W., ZOU, G. & SHANG, X. 2022. A Simple and Efficient CRISPR/Cas9 System Using a Ribonucleoprotein Method for *Flammulina filiformis*. *Journal of Fungi* [Online], 8.
- LIU, N.-J., WANG, N., BAO, J.-J., ZHU, H.-X., WANG, L.-J. & CHEN, X.-Y. 2020a. Lipidomic Analysis Reveals the Importance of GIPCs in Arabidopsis Leaf Extracellular Vesicles. *Molecular Plant*, 13, 1523-1532.
- LIU, Y., LIN, G., YIN, C. & FANG, Y. 2020b. B-box transcription factor 28 regulates flowering by interacting with constans. *Scientific Reports*, 10, 17789.

- LOU, H.-W., YE, Z.-W., YU, Y.-H., LIN, J.-F., GUO, L.-Q., CHEN, B.-X., TANG, H.-B., WEI, T., CHEN, L.-T. & YUN, F. 2019. The efficient genetic transformation of *Cordyceps militaris* by using mononuclear protoplasts. *Scientia Horticulturae*, 243, 307-313.
- LOU, H., YE, Z., YUN, F., LIN, J., GUO, L., CHEN, B. & MU, Z. 2018. Targeted Gene Deletion in *Cordyceps militaris* Using the Split-Marker Approach. *Molecular Biotechnology*, 60, 380-385.
- LU, X., LI, Y., SU, Y., LIANG, Q., MENG, H., LI, S., SHEN, S., FAN, Y. & ZHANG, C. 2012. An Arabidopsis gene encoding a C2H2-domain protein with alternatively spliced transcripts is essential for endosperm development. *Journal of Experimental Botany*, 63, 5935-5944.
- LUDIDI, N., MORSE, M., SAYED, M., WHERRETT, T., SHABALA, S. & GEHRING, C. 2004. A Recombinant Plant Natriuretic Peptide Causes Rapid and Spatially Differentiated K⁺, Na⁺ and H⁺ Flux Changes in Arabidopsis thaliana Roots. *Plant and Cell Physiology*, 45, 1093-1098.
- LUKE, M. M., DELLA SETA, F., DI COMO, C. J., SUGIMOTO, H., KOBAYASHI, R. & ARNDT, K. T. 1996. The SAP, a new family of proteins, associate and function positively with the SIT4 phosphatase. *Molecular and Cellular Biology*, 16, 2744-2755.
- LUU, X. C., SHIDA, Y., SUZUKI, Y., SATO, N., NAKUMURA, A. & OGASAWARA, W. 2022. A novel high-throughput approach for transforming filamentous fungi employing a droplet-based microfluidic platform. *New Biotechnology*, 72, 149-158.
- LYNCH, P. T., COLLIN, H. A. & ISAAC, S. 1985. Isolation and regeneration of protoplasts from *Fusarium tricinctum* and *F. oxysporum*. *Transactions of the British Mycological Society*, 85, 135-140.
- MA, X., WIEDMER, J. & PALMA-GUERRERO, J. 2020. Small RNA Bidirectional Crosstalk During the Interaction Between Wheat and *Zymoseptoria tritici*. *Frontiers in Plant Science*, 10, 1669.
- MACHADO WOOD, A. K., PANWAR, V., GRIMWADE-MANN, M., ASHFIELD, T., HAMMOND-KOSACK, K. E. & KANYUKA, K. 2021. The vesicular trafficking system component MIN7 is required for minimizing *Fusarium graminearum* infection. *Journal of Experimental Botany*, 72, 5010-5023.
- MAHANTY, B., MISHRA, R. & JOSHI, R. K. 2023. Cross-kingdom small RNA communication between plants and fungal phytopathogens-recent updates and prospects for future agriculture. *RNA Biology*, 20, 109-119.
- MALAVIA, D., GOW, N. A. R. & USHER, J. 2020. Advances in Molecular Tools and In Vivo Models for the Study of Human Fungal Pathogenesis. *Microorganisms* [Online], 8.
- MAMODE CASSIM, A., GRISON, M., ITO, Y., SIMON-PLAS, F., MONGRAND, S. & BOUTTÉ, Y. 2020. Sphingolipids in plants: a guidebook on their function in membrane architecture, cellular processes, and environmental or developmental responses. *FEBS Letters*, 594, 3719-3738.
- MANIAR, JAY M. & FIRE, ANDREW Z. 2011. EGO-1, a *C. elegans* RdRP, Modulates Gene Expression via Production of mRNA-Templated Short Antisense RNAs. *Current Biology*, 21, 449-459.
- MANN, C. W. G., SAWYER, A., GARDINER, D. M., MITTER, N., CARROLL, B. J. & EAMENS, A. L. 2023. RNA-Based Control of Fungal Pathogens in Plants. *International Journal of Molecular Sciences* [Online], 24.
- MARCHLER-BAUER, A., BO, Y., HAN, L., HE, J., LANCZYCKI, C. J., LU, S., CHITSAZ, F., DERBYSHIRE, M. K., GEER, R. C., GONZALES, N. R., GWADZ, M., HURWITZ, D. I., LU, F., MARCHLER, G. H., SONG, J. S., THANKI, N., WANG, Z., YAMASHITA, R. A., ZHANG, D., ZHENG, C., GEER, L. Y. & BRYANT, S. H. 2017. CDD/SPARCLE: functional classification of proteins via subfamily domain architectures. *Nucleic Acids Res*, 45, D200-d203.
- MARTÍNEZ-BONO, B., QUILIS, I., ZALVE, E. & IGUAL, J. C. 2009. Yeast karyopherins Kap123 and Kap95 are related to the function of the cell integrity pathway. *FEMS Yeast Research*, 10, 28-37.

- MAURO, V. P. 2018. Codon Optimization in the Production of Recombinant Biotherapeutics: Potential Risks and Considerations. *BioDrugs*, 32, 69-81.
- MCCOOL, M. A., BRYANT, C. J. & BASERGA, S. J. 2020. MicroRNAs and long non-coding RNAs as novel regulators of ribosome biogenesis. *Biochemical Society Transactions*, 48, 595-612.
- MEYER, V. 2008. Genetic engineering of filamentous fungi - Progress, obstacles and future trends. *Biotechnology Advances*, 26, 177-185.
- MI, S., CAI, T., HU, Y., CHEN, Y., HODGES, E., NI, F., WU, L., LI, S., ZHOU, H., LONG, C., CHEN, S., HANNON, G. J. & QI, Y. 2008. Sorting of Small RNAs into Arabidopsis Argonaute Complexes Is Directed by the 5' Terminal Nucleotide. *Cell*, 133, 116-127.
- MICHAUD, P., SHAH, V. N., ADJIBADE, P., HOULE, F., QUÉVILLON HUBERDEAU, M., RIOUX, R., LAVOIE-OUELLET, C., GU, W., MAZROUI, R. & SIMARD, M. J. 2021. The RabGAP TBC-11 controls Argonaute localization for proper microRNA function in *C. elegans*. *PLOS Genetics*, 17, e1009511.
- MINAMINO, N. & UEDA, T. 2019. RAB GTPases and their effectors in plant endosomal transport. *Current Opinion in Plant Biology*, 52, 61-68.
- MÖNKE, E. & SCHÄFER, W. 1993. Transient and stable gene expression in the fungal maize pathogen *Cochliobolus heterostrophus* after transformation with the β -glucuronidase (GUS) gene. *Molecular and General Genetics MGG*, 241, 73-80.
- MONTENEGRO ALONSO, A. P., ALI, S., SONG, X., LINNING, R. & BAKKEREN, G. 2020. UhAVR1, an HR-Triggering Avirulence Effector of *Ustilago hordei*, Is Secreted via the ER-Golgi Pathway, Localizes to the Cytosol of Barley Cells during in Planta-Expression, and Contributes to Virulence Early in Infection. *Journal of Fungi* [Online], 6.
- MORENO-ROMERO, J., ARMENGOT, L., MAR MARQUÈS-BUENO, M., BRITT, A. & CARMEN MARTÍNEZ, M. 2012. CK2-defective Arabidopsis plants exhibit enhanced double-strand break repair rates and reduced survival after exposure to ionizing radiation. *Plant J*, 71, 627-38.
- MORENO-ROMERO, J., ESPUNYA, M. C., PLATARA, M., ARIÑO, J. & MARTÍNEZ, M. C. 2008. A role for protein kinase CK2 in plant development: evidence obtained using a dominant-negative mutant. *Plant J*, 55, 118-30.
- MORIO, F., LOMBARDI, L. & BUTLER, G. 2020. The CRISPR toolbox in medical mycology: State of the art and perspectives. *PLoS Pathogens*, 16, e1008201.
- MUETH, N. A. & HULBERT, S. H. 2022. Small RNAs target native and cross-kingdom transcripts on both sides of the wheat stripe rust interaction. *Genomics*, 114, 110526.
- MÜNTJES, K. 2013. *Charakterisierung eines EMP70 verwandten Transmembranproteins im Modellorganismus Ustilago maydis*. Bachelorarbeit, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, Deutschland.
- MUTLU, N. & KUMAR, A. 2019. Messengers for morphogenesis: inositol polyphosphate signaling and yeast pseudohyphal growth. *Current Genetics*, 65, 119-125.
- NAWROCKI, E. P. & EDDY, S. R. 2013. Infernal 1.1: 100-fold faster RNA homology searches. *Bioinformatics*, 29, 2933-2935.
- NGUYEN, Q.-M., ISWANTO, A. B., SON, G. H. & KIM, S. H. 2021. Recent Advances in Effector-Triggered Immunity in Plants: New Pieces in the Puzzle Create a Different Paradigm. *International Journal of Molecular Sciences*, 22.
- NGUYEN, Q., IRITANI, A., OHKITA, S., VU, B. V., YOKOYA, K., MATSUBARA, A., IKEDA, K.-I., SUZUKI, N. & NAKAYASHIKI, H. 2018. A fungal Argonaute interferes with RNA interference. *Nucleic Acids Research*, 46, 2495-2508.
- NICOLÁS, F. E. & GARRE, V. 2016. RNA Interference in Fungi: Retention and Loss. *Microbiology Spectrum*, 4, 4.6.12.
- NICOLAS, F. E., MOXON, S., DE HARO, J. P., CALO, S., GRIGORIEV, I. V., TORRES-MARTÍNEZ, S., MOULTON, V., RUIZ-VÁZQUEZ, R. M. & DALMAY, T. 2010. Endogenous short RNAs generated by Dicer 2 and RNA-dependent RNA polymerase 1 regulate mRNAs in the basal fungus *Mucor circinelloides*. *Nucleic Acids Research*, 38, 5535-5541.

- NICOLÁS, F. E., TORRES-MARTÍNEZ, S. & RUIZ-VÁZQUEZ, R. M. 2013. Loss and Retention of RNA Interference in Fungi and Parasites. *PLoS Pathogens*, 9.
- NICOLÁS, F. E., VILA, A., MOXON, S., CASCALES, M. D., TORRES-MARTÍNEZ, S., RUIZ-VÁZQUEZ, R. M. & GARRE, V. 2015. The RNAi machinery controls distinct responses to environmental signals in the basal fungus *Mucor circinelloides*. *BMC Genomics*, 16, 237.
- NINOMIYA, Y., SUZUKI, K., ISHII, C. & INOUE, H. 2004. Highly efficient gene replacements in *Neurospora* strains deficient for nonhomologous end-joining. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101, 12248-12253.
- NOLAN, T., BRACCINI, L., AZZALIN, G., DE TONI, A., MACINO, G. & COGONI, C. 2005. The post-transcriptional gene silencing machinery functions independently of DNA methylation to repress a LINE1-like retrotransposon in *Neurospora crassa*. *Nucleic Acids Research*, 33, 1564-1573.
- NUNES, C. C., GOWDA, M., SAILSBERY, J., XUE, M., CHEN, F., BROWN, D. E., OH, Y., MITCHELL, T. K. & DEAN, R. A. 2011a. Diverse and tissue-enriched small RNAs in the plant pathogenic fungus, *Magnaporthe oryzae*. *BMC Genomics*, 12, 288.
- NUNES, C. C., SAILSBERY, J. K. & DEAN, R. A. 2011b. Characterization and application of small RNAs and RNA silencing mechanisms in fungi. *Fungal Biology Reviews*, 25, 172-180.
- ÖKMEN, B., MATHOW, D., HOF, A., LAHRMANN, U., ABMANN, D. & DOEHLEMANN, G. 2018. Mining the effector repertoire of the biotrophic fungal pathogen *Ustilago hordei* during host and non-host infection. *Molecular Plant Pathology*, 19, 2603-2622.
- ÖKMEN, B., SCHWAMMBACH, D., BAKKEREN, G., NEUMANN, U. & DOEHLEMANN, G. 2021. The *Ustilago hordei*-Barley Interaction is a Versatile System for Characterization of Fungal Effectors. *Journal of Fungi* [Online], 7.
- OLIVA, A., ROSEBROCK, A., FERREZUELO, F., PYNE, S., CHEN, H., SKIENA, S., FUTCHER, B. & LEATHERWOOD, J. 2005. The Cell Cycle-Regulated Genes of *Schizosaccharomyces pombe*. *PLOS Biology*, 3, e225.
- ONG, J. Y. & TORRES, J. Z. 2019. Dissecting the mechanisms of cell division. *J Biol Chem*, 294, 11382-11390.
- OSMAN, M., STIGLOHER, C., MUELLER, M. J. & WALLER, F. 2020. An improved growth medium for enhanced inoculum production of the plant growth-promoting fungus *Serendipita indica*. *Plant Methods*, 16, 39.
- OUYANG, S.-Q., JI, H.-M., FENG, T., LUO, S.-J., CHENG, L. & WANG, N. 2023. Artificial trans-kingdom RNAi of FoLRDR1 is a potential strategy to control tomato wilt disease. *PLOS Pathogens*, 19, e1011463.
- PANDEY, P., LEARY, A. Y., TUMTAS, Y., SAVAGE, Z., DAGVADORJ, B., DUGGAN, C., YUEN, E. L., SANGUANKIATTICHAJ, N., TAN, E., KHANDARE, V., CONNERTON, A. J., YUNUSOV, T., MADALINSKI, M., MIRKIN, F. G., SCHORNACK, S., DAGDAS, Y., KAMOUN, S. & BOZKURT, T. O. 2021. An oomycete effector subverts host vesicle trafficking to channel starvation-induced autophagy to the pathogen interface. *eLife*, 10, e65285.
- PANT, S. R., MATSYE, P. D., MCNEECE, B. T., SHARMA, K., KRISHNAVAJHALA, A., LAWRENCE, G. W. & KLINK, V. P. 2014. Syntaxin 31 functions in Glycine max resistance to the plant parasitic nematode *Heterodera glycines*. *Plant Molecular Biology*, 85, 107-121.
- PATIL, N. S. & JADHAV, J. P. 2015. *Penicillium ochrochloron* MTCC 517 chitinase: An effective tool in commercial enzyme cocktail for production and regeneration of protoplasts from various fungi. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 22, 232-236.
- PENN, T. J., WOOD, M. E., SOANES, D. M., CSUKAI, M., CORRAN, A. J. & TALBOT, N. J. 2015. Protein kinase C is essential for viability of the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*. *Molecular Microbiology*, 98, 403-419.
- PETRE, B., CONTRERAS, M. P., BOZKURT, T. O., SCHATAT, M. H., SKLENAR, J., SCHORNACK, S., ABD-EL-HALIEM, A., CASTELLS-GRAELLS, R., LOZANO-DURÁN, R., DAGDAS, Y. F., MENKE, F. L. H., JONES, A. M. E., VOSSSEN, J. H.,

- ROBATZEK, S., KAMOUN, S. & WIN, J. 2021. Host-interactor screens of *Phytophthora infestans* RXLR proteins reveal vesicle trafficking as a major effector-targeted process. *Plant Cell*, 33, 1447-1471.
- PILLAI, R. S., ARTUS, C. G. & FILIPOWICZ, W. 2004. Tethering of human Ago proteins to mRNA mimics the miRNA-mediated repression of protein synthesis. *RNA*, 10, 1518-1525.
- PINNEH, E. C., MINA, J. G., STARK, M. J. R., LINDELL, S. D., LUEMMEN, P., KNIGHT, M. R., STEEL, P. G. & DENNY, P. W. 2019a. The identification of small molecule inhibitors of the plant inositol phosphorylceramide synthase which demonstrate herbicidal activity. *Scientific Reports*, 9, 8083.
- PINNEH, E. C., STOPPEL, R., KNIGHT, H., KNIGHT, M. R., STEEL, P. G. & DENNY, P. W. 2019b. Expression levels of inositol phosphorylceramide synthase modulate plant responses to biotic and abiotic stress in *Arabidopsis thaliana*. *PLOS ONE*, 14, e0217087.
- PLÜCKER, L. 2017. *Analysing the infection biology of the Brassicaceae smut Thecaphora thlaspeos*. unveröffentlichte Masterarbeit, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, Deutschland.
- PLÜCKER, L., BÖSCH, K., GEIßL, L., HOFFMANN, P. & GÖHRE, V. 2021. Genetic Manipulation of the Brassicaceae Smut Fungus *Thecaphora thlaspeos*. *Journal of Fungi*, 7.
- PORTER, K. & DAY, B. 2016. From filaments to function: The role of the plant actin cytoskeleton in pathogen perception, signaling and immunity. *Journal of Integrative Plant Biology*, 58, 299-311.
- PTAK, C., ANDERSON, A. M., SCOTT, R. J., VAN DE VOSSE, D., ROGERS, R. S., SYDORSKY, Y., AITCHISON, J. D. & WOZNAK, R. W. 2009. A Role for the Karyopherin Kap123p in Microtubule Stability. *Traffic*, 10, 1619-1634.
- PUJOL-CARRION, N., PETKOVA, M. I., SERRANO, L. & DE LA TORRE-RUIZ, M. A. 2013. The MAP Kinase Sit2 Is Involved in Vacuolar Function and Actin Remodeling in *Saccharomyces cerevisiae* Mutants Affected by Endogenous Oxidative Stress. *Applied and Environmental Microbiology*, 79, 6459-6471.
- QIAO, L., LAN, C., CAPRIOTTI, L., AH-FONG, A., NINO SANCHEZ, J., HAMBY, R., HELLER, J., ZHAO, H., GLASS, N. L., JUDELSON, H. S., MEZZETTI, B., NIU, D. & JIN, H. 2021. Spray-induced gene silencing for disease control is dependent on the efficiency of pathogen RNA uptake. *Plant Biotechnology Journal*, 19, 1756-1768.
- QIAO, Y., SHI, J., ZHAI, Y., HOU, Y. & MA, W. 2015. *Phytophthora* effector targets a novel component of small RNA pathway in plants to promote infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112, 5850-5855.
- RABE, F., BOSCH, J., STIRNBERG, A., GUSE, T., BAUER, L., SEITNER, D., RABANAL, F. A., CZEDIK-EYSENBERG, A., UHSE, S., BINDICS, J., GENENNER, B., NAVARRETE, F., KELLNER, R., EKKER, H., KUMLEHN, J., VOGEL, J. P., GORDON, S. P., MARCEL, T. C., MÜNSTERKÖTTER, M., WALTER, M. C., SIEBER, C. M. K., MANNHAUPT, G., GÜLDENER, U., KAHMANN, R. & DJAMEI, A. 2016. A complete toolset for the study of *Ustilago bromivora* and *Brachypodium* sp. as a fungal-temperate grass pathosystem. *eLife*, 5.
- RAMAN, V., SIMON, S. A., DEMIRCI, F., NAKANO, M., MEYERS, B. C. & DONOFRIO, N. M. 2017. Small RNA functions are required for growth and development of *Magnaporthe oryzae*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 30, 517-530.
- RAO, R. N., ALLEN, N. E., HOBBS JR, J. N., ALBORN JR, W. E., KIRST, H. A. & PASCHAL, J. W. 1983. Genetic and enzymatic basis of hygromycin B resistance in *Escherichia coli*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 24, 689-695.
- RECK-PETERSON, S. L., REDWINE, W. B., VALE, R. D. & CARTER, A. P. 2018. The cytoplasmic dynein transport machinery and its many cargoes. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 19, 382-398.

- RIVERA, A. L., MAGAÑA-ORTÍZ, D., GÓMEZ-LIM, M., FERNÁNDEZ, F. & LOSKE, A. M. 2014. Physical methods for genetic transformation of fungi and yeast. *Physics of Life Reviews*, 11, 184-203.
- RODRIGUES, A. S. & MIGUEL, C. M. 2017. The pivotal role of small non-coding RNAs in the regulation of seed development. *Plant Cell Rep*, 36, 653-667.
- RODRIGUEZ, R. E., SCHOMMER, C. & PALATNIK, J. F. 2016. Control of cell proliferation by microRNAs in plants. *Current Opinion in Plant Biology*, 34, 68-76.
- ROJEK, J., TUCKER, M. R., RYCHŁOWSKI, M., NOWAKOWSKA, J. & GUTKOWSKA, M. 2021. The Rab Geranylgeranyl Transferase Beta Subunit Is Essential for Embryo and Seed Development in *Arabidopsis thaliana*. *International Journal of Molecular Sciences* [Online], 22.
- RUANO, G. & SCHEURING, D. 2020. Plant Cells under Attack: Unconventional Endomembrane Trafficking during Plant Defense. *Plants*, 9.
- RUI, Q., TAN, X., LIU, F., LI, Y., LIU, X., LI, B., WANG, J., YANG, H., QIAO, L., LI, T., FANG, S., GAO, R., WANG, W., BEDNAREK, S. Y. & BAO, Y. 2021. Syntaxin of plants31 (SYP31) and SYP32 is essential for Golgi morphology maintenance and pollen development. *Plant Physiology*.
- RUIZ-DÍEZ, B. 2002. Strategies for the transformation of filamentous fungi. *Journal of Applied Microbiology*, 92, 189-195.
- SACNUN, J. M., CRESPO, R., PALATNIK, J., RASIA, R. & GONZÁLEZ-SCHAIN, N. 2020. Dual function of HYPONASTIC LEAVES 1 during early skotomorphogenic growth in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*, 102, 977-991.
- SAMBROOK, J., FRISCH, E. F. & MANIATIS, T. 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbour Laboratory Press Cold Spring Harbour, New York, USA.
- 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. & KAHMANN, R. 2010. Pathogenicity Determinants in Smut Fungi Revealed by Genome Comparison. *Science*, 330, 1546-1548.
- SCHMIDT, C. A. & MATERA, A. G. 2020. tRNA introns: Presence, processing, and purpose. *WIREs RNA*, 11, e1583.
- SCHOMBURG, K. T., ARDAO, I., GÖTZ, K., RIECKENBERG, F., LIESE, A., ZENG, A.-P. & RAREY, M. 2012. Computational biotechnology: Prediction of competitive substrate inhibition of enzymes by buffer compounds with protein–ligand docking. *Journal of Biotechnology*, 161, 391-401.
- SCHULER, D., WAHL, R., WIPPEL, K., VRANES, M., MÜNSTERKÖTTER, M., SAUER, N. & KÄMPER, J. 2015. Hxt1, a monosaccharide transporter and sensor required for virulence of the maize pathogen *Ustilago maydis*. *New Phytologist*, 206, 1086-1100.
- SCHULZ, B., BANUETT, F., DAHL, M., SCHLESINGER, R., SCHÄFER, W., MARTIN, T., HERSKOWITZ, I. & 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.
- SCHUMACHER, J., KOKKELINK, L., HUESMANN, C., JIMENEZ-TEJA, D., COLLADO, I. G., BARAKAT, R., TUDZYNSKI, P. & TUDZYNSKI, B. 2008. The cAMP-Dependent Signaling Pathway and Its Role in Conidial Germination, Growth, and Virulence of the Gray Mold *Botrytis cinerea*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 21, 1443-1459.
- SCHUSTER, M. & KAHMANN, R. 2019. CRISPR-Cas9 genome editing approaches in filamentous fungi and oomycetes. *Fungal Genetics and Biology*, 130, 43-53.
- ŠEČIĆ, E., KOGEL, K.-H. & LADERA-CARMONA, M. J. 2021a. Biotic stress-associated microRNA families in plants. *Journal of Plant Physiology*, 263, 153451.
- ŠEČIĆ, E., ZANINI, S., WIBBERG, D., JELONEK, L., BUSCHE, T., KALINOWSKI, J., NASFI, S., THIELMANN, J., IMANI, J., STEINBRENNER, J. & KOGEL, K.-H. 2021b. A novel

- plant-fungal association reveals fundamental sRNA and gene expression reprogramming at the onset of symbiosis. *BMC Biology*, 19, 171.
- SELITRENNIKOFF, C. P. & BLOOMFIELD, E. C. 1984. Formation and regeneration of protoplasts of wild-type *Neurospora crassa*. *Current Microbiology*, 11, 113-117.
- SERRAZINA, S., DIAS, F. V. & MALHÓ, R. 2014. Characterization of FAB1 phosphatidylinositol kinases in *Arabidopsis* pollen tube growth and fertilization. *New Phytologist*, 203, 784-793.
- SHARMA, R., MISHRA, B., RUNGE, F. & THINES, M. 2014. Gene Loss Rather Than Gene Gain Is Associated with a Host Jump from Monocots to Dicots in the Smut Fungus *Melanopsichium pennsylvanicum*. *Genome Biology and Evolution*, 6, 2034-2049.
- SHEPHERD, M. D., KHAREL, M. K., BOSSERMAN, M. A. & ROHR, J. 2010. Laboratory maintenance of *Streptomyces* species. *Current Protocols Microbiology*, 18, 10E.1.1-10E.1.8.
- SHI, F., WANG, Y., ZHANG, F., YUAN, X., CHEN, H., CHEN, X., CHEN, X. & CUI, X. 2020. Soybean Endo-1,3-Beta-Glucanase (GmGLU) Interaction With Soybean mosaic virus-Encoded P3 Protein May Contribute to the Intercellular Movement. *Frontiers in Genetics*, 11.
- SHI, Z., CHRISTIAN, D. & LEUNG, H. 1995. Enhanced transformation in *Magnaporthe grisea* by restriction enzyme mediated integration of plasmid DNA. *Phytopathology*, 85, 329-333.
- SIETSMA, J. H. & DE BOER, W. R. 1973. Formation and Regeneration of Protoplasts from *Pythium* p1242. *Journal of General Microbiology*, 74, 211-217.
- SILVESTRI, A., TURINA, M., FIORILLI, V., MIOZZI, L., VENICE, F., BONFANTE, P. & LANFRANCO, L. 2020. Different Genetic Sources Contribute to the Small RNA Population in the Arbuscular Mycorrhizal Fungus *Gigaspora margarita*. *Frontiers in Microbiology*, 11.
- SINGH, S., CHAUDHARY, R., DESHMUKH, R. & TIWARI, S. 2022. Opportunities and challenges with CRISPR-Cas mediated homologous recombination based precise editing in plants and animals. *Plant Molecular Biology*.
- SON, H., PARK, A. R., LIM, J. Y., SHIN, C. & LEE, Y.-W. 2017. Genome-wide exonic small interference RNA-mediated gene silencing regulates sexual reproduction in the homothallic fungus *Fusarium graminearum*. *PLOS Genetics*, 13, e1006595.
- SONG, L., FANG, Y., CHEN, L., WANG, J. & CHEN, X. 2021. Role of non-coding RNAs in plant immunity. *Plant Communications*, 2, 100180.
- SONG, R., ZHAI, Q., SUN, L., HUANG, E., ZHANG, Y., ZHU, Y., GUO, Q., TIAN, Y., ZHAO, B. & LU, H. 2019. CRISPR/Cas9 genome editing technology in filamentous fungi: progress and perspective. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 103, 6919-6932.
- SONG, Z., YAN, T., LIU, J., BIAN, Y., HENG, Y., LIN, F., JIANG, Y., WANG DENG, X. & XU, D. 2020. BBX28/BBX29, HY5 and BBX30/31 form a feedback loop to fine-tune photomorphogenic development. *The Plant Journal*, 104, 377-390.
- SOUTHERN, E. M. 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *Journal of Molecular Biology*, 98, 503-517.
- STAUFFER, B. & POWERS, T. 2017. Target of rapamycin signaling mediates vacuolar fragmentation. *Current Genetics*, 63, 35-42.
- STRAUD, S., LEE, I., SONG, B., AVERY, L. & YOU, Y.-J. 2013. The Jaw of the Worm: GTPase-activating Protein EAT-17 Regulates Grinder Formation in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*, 195, 115-125.
- SU, C., LI, Z., CHENG, J., LI, L., ZHONG, S., LIU, L., ZHENG, Y. & ZHENG, B. 2017. The Protein Phosphatase 4 and SMEK1 Complex Dephosphorylates HYL1 to Promote miRNA Biogenesis by Antagonizing the MAPK Cascade in *Arabidopsis*. *Developmental Cell*, 41, 527-539.e5.
- SUELMANN, R. & FISCHER, R. 2000. Nuclear migration in fungi – different motors at work. *Research in Microbiology*, 151, 247-254.
- SVOBODA, P. 2020. Key Mechanistic Principles and Considerations Concerning RNA Interference. *Frontiers in Plant Science*, 11.

- SWART, E. C., SERRA, V., PETRONI, G. & NOWACKI, M. 2016. Genetic Codes with No Dedicated Stop Codon: Context-Dependent Translation Termination. *Cell*, 166, 691-702.
- SYDORSKY, Y., DILWORTH, D. J., YI, E. C., GOODLETT, D. R., WOZNAK, R. W. & AITCHISON, J. D. 2003. Intersection of the Kap123p-mediated nuclear import and ribosome export pathways. *Molecular and Cellular Biology*, 23, 2042-54.
- TEH, O.-K., HATSUGAI, N., TAMURA, K., FUJI, K., TABATA, R., YAMAGUCHI, K., SHINGENOBU, S., YAMADA, M., HASEBE, M., SAWA, S., SHIMADA, T. & HARA-NISHIMURA, I. 2015. BEACH-Domain Proteins Act Together in a Cascade to Mediate Vacuolar Protein Trafficking and Disease Resistance in Arabidopsis. *Molecular Plant*, 8, 389-398.
- TERFRÜCHTE, M., JOEHNK, B., FAJARDO-SOMERA, R., BRAUS, G. H., RIQUELME, M., SCHIPPER, K. & FELDBRÜGGE, M. 2014. Establishing a versatile Golden Gate cloning system for genetic engineering in fungi. *Fungal Genetics and Biology*, 62, 1-10.
- TIAN, Y., SIMANSHU, DHIRENDRA K., MA, J.-B., PARK, J.-E., HEO, I., KIM, V. N. & PATEL, DINSHAW J. 2014. A Phosphate-Binding Pocket within the Platform-PAZ-Connector Helix Cassette of Human Dicer. *Molecular Cell*, 53, 606-616.
- TIWARI, M., SHARMA, D. & TRIVEDI, P. K. 2014. Artificial microRNA mediated gene silencing in plants: progress and perspectives. *Plant Molecular Biology*, 86, 1-18.
- TOMICO-CUENCA, I., MACH, R. L., MACH-AIGNER, A. R. & DERNTL, C. 2021. An overview on current molecular tools for heterologous gene expression in Trichoderma. *Fungal Biology and Biotechnology*, 8, 11.
- TORRES-MARTÍNEZ, S. & RUIZ-VÁZQUEZ, R. M. 2017. The RNAi Universe in Fungi: A Varied Landscape of Small RNAs and Biological Functions. *Annual Review of Microbiology*, 71, 371-391.
- TÓTH, M. E., VÍGH, L. & SÁNTHA, M. 2014. Alcohol stress, membranes, and chaperones. *Cell Stress and Chaperones*, 19, 299-309.
- TROLET, A., BALDRICH, P., CRIQUI, M.-C., DUBOIS, M., CLAVEL, M., MEYERS, B. C. & GENSCHIK, P. 2019. Cell Cycle-Dependent Regulation and Function of ARGONAUTE1 in Plants. *The Plant Cell*, 31, 1734-1750.
- TSUKUDA, T., CARLETON, S., FOTHERINGHAM, S. & HOLLOMAN, W. K. 1988. Isolation and characterization of an autonomously replicating sequence from *Ustilago maydis*. *Molecular and Cellular Biology*, 8, 3703-9.
- URBANOWICZ, B. R., BENNETT, A. B., DEL CAMPILLO, E., CATALÁ, C., HAYASHI, T., HENRISSAT, B., HÖFTE, H., MCQUEEN-MASON, S. J., PATTERSON, S. E., SHOSEYOV, O., TEERI, T. T. & ROSE, J. K. C. 2007. Structural Organization and a Standardized Nomenclature for Plant Endo-1,4- β -Glucanases (Cellulases) of Glycosyl Hydrolase Family 9. *Plant Physiology*, 144, 1693-1696.
- VAN DER LINDE, K. & GÖHRE, V. 2021. How Do Smut Fungi Use Plant Signals to Spatiotemporally Orientate on and In Planta? *Journal of Fungi*, 7.
- VENEMA, J. & TOLLERVEY, D. 1999. Ribosome Synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Annual Review of Genetics*, 33, 261-311.
- VEZIROGLU, E. M. & MIAS, G. I. 2020. Characterizing Extracellular Vesicles and Their Diverse RNA Contents. *Frontiers in Genetics*, 11.
- VILLALOBOS-ESCOBEDO, J. M., HERRERA ESTRELLA, A. & CARRERAS VILLASENOR, N. 2016. The interaction of fungi with the environment orchestrated by RNAi. *Mycologia*, 108, 556-571.
- VISHNOI, N., DHANASEKERAN, K., CHALFANT, M., SUROVSTEV, I., KHOKHA, M. K. & LUSK, C. P. 2020. Differential turnover of Nup188 controls its levels at centrosomes and role in centriole duplication. *Journal of Cell Biology*, 219, e201906031.
- VOLLMEISTER, E., SCHIPPER, K., BAUMANN, S., HAAG, C., POHLMANN, T., STOCK, J. & FELDBRÜGGE, M. 2012. Fungal development of the plant pathogen *Ustilago maydis*. *FEMS Microbiology Reviews*, 36, 59-77.
- WANG, B., SUN, Y., SONG, N., ZHAO, M., LIU, R., FENG, H., WANG, X. & KANG, Z. 2017a. *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* microRNA-like RNA 1 (Pst-milR1), an important

- pathogenicity factor of Pst, impairs wheat resistance to Pst by suppressing the wheat pathogenesis-related 2 gene. *New Phytologist*, 215, 338-350.
- WANG, J., HOLDEN, D. W. & LEONG, S. A. 1988. Gene transfer system for the phytopathogenic fungus *Ustilago maydis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 85, 865-869.
- WANG, M. & DEAN, R. A. 2020. Movement of small RNAs in and between plants and fungi. *Molecular Plant Pathology*, 21, 589-601.
- WANG, M., WEIBERG, A., DELLOTA, E., JR., YAMANE, D. & JIN, H. 2017b. Botrytis small RNA Bc-siR37 suppresses plant defense genes by cross-kingdom RNAi. *RNA biology*, 14, 421-428.
- WANG, M., WEIBERG, A., LIN, F. M., THOMMA, B. P. H. J., HUANG, H. D. & JIN, H. 2016. Bidirectional cross-kingdom RNAi and fungal uptake of external RNAs confer plant protection. *Nature Plants*, 2.
- WANG, P. 2021. Genetic Transformation in Cryptococcus Species. *Journal of Fungi*, 7.
- WANG, S., CHEN, H., TANG, X., ZHANG, H., CHEN, W. & CHEN, Y. Q. 2017c. Molecular tools for gene manipulation in filamentous fungi. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 101, 8063-8075.
- WEIBERG, A., WANG, M., BELLINGER, M. & JIN, H. 2014. Small RNAs: A new paradigm in plant-microbe interactions. *Annual Review of Phytopathology*.
- WEIBERG, A., WANG, M., LIN, F. M., ZHAO, H., ZHANG, Z., KALOSHIAN, I., HUANG, H. D. & JIN, H. 2013. Fungal small RNAs suppress plant immunity by hijacking host RNA interference pathways. *Science*, 342, 118-123.
- WEINZIERL, G. 2001. *Isolierung und Charakterisierung von Komponenten der b-vermittelten Regulationskaskade in Ustilago maydis*. Doktorarbeit, Philipps-Universität Marburg, Deutschland.
- WERNER, B. T., KOCH, A., ŠEČIĆ, E., ENGELHARDT, J., JELONEK, L., STEINBRENNER, J. & KOGEL, K.-H. 2021. Fusarium graminearum DICER-like-dependent sRNAs are required for the suppression of host immune genes and full virulence. *PLOS ONE*, 16, e0252365.
- WINZ, M.-L., PEIL, L., TUROWSKI, T. W., RAPPSILBER, J. & TOLLERVEY, D. 2019. Molecular interactions between Hel2 and RNA supporting ribosome-associated quality control. *Nature Communications*, 10, 563.
- WU, J. D. & CHOU, J. C. 2019. Optimization of Protoplast Preparation and Regeneration of a Medicinal Fungus *Antrodia cinnamomea*. *Mycobiology*, 47, 483-493.
- WU, L., FAN, J. & BELASCO, J. G. 2008. Importance of Translation and Nonnucleolytic Ago Proteins for On-Target RNA Interference. *Current Biology*, 18, 1327-1332.
- WYTINCK, N., SULLIVAN, D. S., BIGGAR, K. T., CRISOSTOMO, L., PELKA, P., BELMONTE, M. F. & WHYARD, S. 2020. Clathrin mediated endocytosis is involved in the uptake of exogenous double-stranded RNA in the white mold phytopathogen *Sclerotinia sclerotiorum*. *Scientific Reports*, 10, 12773.
- XIA, W., YU, X. & YE, Z. 2020. Smut fungal strategies for the successful infection. *Microbial Pathogenesis*, 142, 104039.
- YADAV, P. K. & RAJASEKHARAN, R. 2018. The m(6)A methyltransferase Ime4 and mitochondrial functions in yeast. *Current Genetics*, 64, 353-357.
- YADAVA, P., ABHISHEK, A., SINGH, R., SINGH, I., KAUL, T., PATTANAYAK, A. & AGRAWAL, P. K. 2017. Advances in Maize Transformation Technologies and Development of Transgenic Maize. *Frontiers in Plant Science*, 7.
- YANG, Q., YE, Q. A. & LIU, Y. 2015. Mechanism of siRNA production from repetitive DNA. *Genes & Development*, 29, 526-537.
- YANG, X., PENG, J. & PAN, J. 2019. Nourseothricin N-acetyl transferase (NAT), a new selectable marker for nuclear gene expression in *Chlamydomonas*. *Plant Methods*, 15, 140.
- YELTON, M. M., HAMER, J. E. & TIMBERLAKE, W. E. 1984. Transformation of *Aspergillus nidulans* by using a trpC plasmid. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 81, 1470-4.

- YU, J., ZHANG, Y., CUI, H., HU, P., YU, X. & YE, Z. 2015. An efficient genetic manipulation protocol for *Ustilago esculenta*. *FEMS Microbiology Letters*, 362.
- ZANINI, S., ŠEČIĆ, E., BUSCHE, T., GALLI, M., ZHENG, Y., KALINOWSKI, J. & KOGEL, K.-H. 2021. Comparative Analysis of Transcriptome and sRNAs Expression Patterns in the *Brachypodium distachyon*-*Magnaporthe oryzae* Pathosystems. *International journal of molecular sciences*, 22, 650.
- ZANINI, S., ŠEČIĆ, E., JELONEK, L. & KOGEL, K.-H. 2018. A Bioinformatics Pipeline for the Analysis and Target Prediction of RNA Effectors in Bidirectional Communication During Plant-Microbe Interactions. *Frontiers in plant science*, 9, 1212-1212.
- ZHANG, B.-S., LI, Y.-C., GUO, H.-S. & ZHAO, J.-H. 2022a. *Verticillium dahliae* Secretes Small RNA to Target Host MIR157d and Retard Plant Floral Transition During Infection. *Frontiers in Plant Science*, 13.
- ZHANG, C., CHEN, L., PENG, D., JIANG, A., HE, Y., ZENG, Y., XIE, C., ZHOU, H., LUO, X., LIU, H., CHEN, L., REN, J., WANG, W. & ZHAO, Y. 2020. METTL3 and N6-Methyladenosine Promote Homologous Recombination-Mediated Repair of DSBs by Modulating DNA-RNA Hybrid Accumulation. *Molecular Cell*, 79, 425-442.e7.
- ZHANG, C., ZONG, H., ZHUGE, B., LU, X., FANG, H., ZHU, J. & ZHUGE, J. 2016a. Protoplast preparation and polyethylene glycol (PEG)-mediated transformation of *Candida glycerinogenes*. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 21, 95-102.
- ZHANG, J., JIN, X., WANG, Y., ZHANG, B. & LIU, T. 2022b. A cytochrome P450 monooxygenase in non-defoliating strain of *Verticillium dahliae* manipulates virulence via scavenging reactive oxygen species. *Phytopathology*.
- ZHANG, L., SI, Q., YANG, K., ZHANG, W., OKITA, T. W. & TIAN, L. 2022c. mRNA Localization to the Endoplasmic Reticulum in Plant Endosperm Cells. *International Journal of Molecular Sciences* [Online], 23.
- ZHANG, N., FAN, Y., LI, C., WANG, Q., LEKSAWASDI, N., LI, F. & WANG, S. A. 2018. Cell permeability and nuclear DNA staining by propidium iodide in basidiomycetous yeasts. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 102, 4183-4191.
- ZHANG, T., ZHAO, Y.-L., ZHAO, J.-H., WANG, S., JIN, Y., CHEN, Z.-Q., FANG, Y.-Y., HUA, C.-L., DING, S.-W. & GUO, H.-S. 2016b. Cotton plants export microRNAs to inhibit virulence gene expression in a fungal pathogen. *Nature Plants*, 2, 16153.
- ZHAO, J.-H. & GUO, H.-S. 2022. RNA silencing: From discovery and elucidation to application and perspectives. *Journal of Integrative Plant Biology*, 64, 476-498.
- ZHAO, J. H., ZHANG, T., LIU, Q. Y. & GUO, H. S. 2021a. Trans-kingdom RNAs and their fates in recipient cells: advances, utilization, and perspectives. *Plant Communications*, 2, 100167.
- ZHAO, Y., CHEN, Y., JIN, M. & WANG, J. 2021b. The crosstalk between m6A RNA methylation and other epigenetic regulators: a novel perspective in epigenetic remodeling. *Theranostics*, 11, 4549-4566.
- ZHONG, L., HE, X., SONG, H., SUN, Y., CHEN, G., SI, X., SUN, J., CHEN, X., LIAO, W., LIAO, Y. & BIN, J. 2020. METTL3 Induces AAA Development and Progression by Modulating N6-Methyladenosine-Dependent Primary miR34a Processing. *Molecular Therapy - Nucleic Acids*, 21, 394-411.
- ZHOU, J., FU, Y., XIE, J., LI, B., JIANG, D., LI, G. & CHENG, J. 2012. Identification of microRNA-like RNAs in a plant pathogenic fungus *Sclerotinia sclerotiorum* by high-throughput sequencing. *Molecular Genetics and Genomics*, 287, 275-282.
- ZHOU, W., LI, Z., ZHANG, J., MOU, B. & ZHOU, W. 2021. The OsIME4 gene identified as a key to meiosis initiation by RNA in situ hybridization. *Plant Biology*, 23, 861-873.
- ZHU, C., LIU, J.-H., ZHAO, J.-H., LIU, T., CHEN, Y.-Y., WANG, C.-H., ZHANG, Z.-H., GUO, H.-S. & DUAN, C.-G. 2022. A fungal effector suppresses the nuclear export of AGO1-miRNA complex to promote infection in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 119, e2114583119.
- ZOU, G., XIAO, M., CHAI, S., ZHU, Z., WANG, Y. & ZHOU, Z. 2021. Efficient genome editing in filamentous fungi via an improved CRISPR-Cas9 ribonucleoprotein method facilitated by chemical reagents. *Microbial Biotechnology*, 14, 2343-2355.

- ZOU, H., FANG, H.-M., ZHU, Y. & WANG, Y. 2010. *Candida albicans* Cyr1, Cap1 and G-actin form a sensor/effector apparatus for activating cAMP synthesis in hyphal growth. *Molecular Microbiology*, 75, 579-591.
- ZUCCARO, A., BASIEWICZ, M., ZURAWSKA, M., BIEDENKOPF, D. & KOGEL, K.-H. 2009. Karyotype analysis, genome organization, and stable genetic transformation of the root colonizing fungus *Piriformospora indica*. *Fungal Genetics and Biology*, 46, 543-550.
- ZUO, W., ÖKMEN, B., DEPOTTER, J. R. L., EBERT, M. K., REDKAR, A., MISAS VILLAMIL, J. & DOEHLEMANN, G. 2019. Molecular Interactions Between Smut Fungi and Their Host Plants. *Annual Review of Phytopathology*, 57, 411-430.

7. Ergänzende Daten

Auf dem Datenträger, der dieser Arbeit beiliegt, befinden sich folgende Daten:

- Eine elektronische Version dieser Arbeit

Im Institut für Mikrobiologie wurden die gewonnenen Daten hinterlegt, insbesondere:

- Datensätze der sRNA-Sequenzierung
- Vorhergesagte Annotationen von rRNA, tRNA und weiteren ncRNAs in LF1 und LF2
- Verwendete Annotationen in LF1 für Prä-mRNAs, 5'-UTRs, 3'-UTRs und Exons
- Dateien der Zieltranskript-Vorhersagen

8. Anhang

```

nat1      1 atgaccactcttgacgacacggcttacgggtacogcaccagtgccccggggacgcccagggccatcgaggcaactggatgggtccttcacc
nat1Um    1 .....g..c.....c..c.....c.....tcg..g..c..t.....g..c..c..c..g.....

nat1      91 accgacaccgtcttcccgctcaccgccaccggggacggcttcaccctgcccggaggtgcccggggaccccgccctgaccaaggtgttcccc
nat1Um    91 .....t.....g.....c.....c.....g..c.....c.....

nat1     181 gacgacgaatcggacgacgaatcggacgacggggaggacggcgaccgggactcccggacgttcgtcgcgtacggggacgacggcgacctg
nat1Um   181 .....g.....g.....c.....c.....g..c..c..t.....c.....c.....c

nat1     271 gggggcttcgtgggtcatctcgtactcggcgtggaaccgcccggctgaccgtcggagacatcgaggctgccccgggacacccggggcacggg
nat1Um   271 ..c.....t..c.....c.....t..t..c.....t..c.....t..t.....c

nat1     361 gtcggggcgcgcttgatggggctcgcgacggaggttcgcccggcgagcggggcggggcacctctggctggaggtcaccacgtcaacgca
nat1Um   361 ....t..t..cc.c..a.....c..e.....t.....t..t.....t.....c.....t

nat1     451 ccggcgatccaacgcgtaccggcggtggggttcacctctgcccctggacaccccccgtacgacggcaccgcctcggacggcgagcgg
nat1Um   451 ..c..c.....c.....c..c.....g.....a..c.....g..g..c.....t

nat1     541 caggcgctctacatgagcatgccctgcccc-----tag
nat1Um   541 .....tcg.....ccatgg...

```

NcoI

Abbildung 21 Sequenzvergleich des Nourseothricin-Resistenz vermittelnden *nat1*-Gens mit dem für *U. maydis* Codon-Optimierten, aber nicht funktionalen *nat1Um*. Hervorgehoben sind unterschiedliche Basenpaare. Die zu Klonierungszwecken in *nat1Um* inserierte *NcoI*-Schnittstelle ist unterstrichen.

Tabelle 23 sRNA-Kandidaten aus *T. thlaspeos*. Diese 97 sRNAs kartieren über ihre gesamte Länge ohne Fehlpaarungen oder Lücken auf das Genom beider Stämme, wurden in beiden Replikaten beider Stämme identifiziert, kartieren nicht auf rRNA- oder tRNA-Annotationen aus LF1 (siehe auch Abbildung 16) und sind 20-24 nt lang. Zudem weisen sie eine normalisierte Abundanz von mindestens 2 in jedem Replikat auf. Normalisiert wurde, indem für jede einzigartige Sequenz die Anzahl dem Genom zugeordneter Reads pro Million Reads in der jeweiligen Bibliothek berechnet wurde. Die sRNAs sind sortiert nach ihrer absteigenden Abundanz in Replikat LF1_1. Diese sRNAs wurden für die Zieltranskript-Vorhersage verwendet.

sRNA	Sequenz
Tt_sRNA_1	GCGGTGTAGGTTTCATGTCGACT
Tt_sRNA_2	TGCGGTGTAGGTTTCATGTCGACT
Tt_sRNA_3	CCAGTGGATGAAGACCGAGCG
Tt_sRNA_4	CCAGTGGATGAAGACCGAGCGT
Tt_sRNA_5	GTCCAGTGGATGAAGACCGAGCGT
Tt_sRNA_6	GTCCAGTGGATGAAGACCGAGCG
Tt_sRNA_7	AGCTGTGCGGATAAACTGAACACT
Tt_sRNA_8	CRACTTGGCAATTTTTGTTCTACC
Tt_sRNA_9	CGGTCACCTGGTGTCTCACATTC
Tt_sRNA_10	ATCTATGATGAACAGAAATCT
Tt_sRNA_11	GACGGTGCTGAGAAAATACTTG
Tt_sRNA_12	TTGTAATACTTAGCGGTCTCT
Tt_sRNA_13	ATCTATGATGAACAGAAATCTT
Tt_sRNA_14	CCAGTGGATGAAGACCGAGCGTT
Tt_sRNA_15	GTTGATCCGAATTTTTCTATTTCT

Tt_sRNA_16	TTGTAAAACCTTAGCGGTCTCTA
Tt_sRNA_17	TTCCATTTTTTCGCACGGGGAGA
Tt_sRNA_18	ATTTTCGGGCACCCACTCTGATC
Tt_sRNA_19	CTCGTTGATGAGCTCTATAACG
Tt_sRNA_20	GTGCGGTGTAGGTTTCATGTGCGACT
Tt_sRNA_21	CGACATGATGAACAAACAAGATT
Tt_sRNA_22	TCCAGTGGATGAAGACCGAGCG
Tt_sRNA_23	AACTTAGTCGTATCATATTGTCTC
Tt_sRNA_24	GACGGTGCTGAGAAAATACTTGG
Tt_sRNA_25	TAGACAGTCTGCTTTTTTTTCGGC
Tt_sRNA_26	TCCAGTGGATGAAGACCGAGCGT
Tt_sRNA_27	TGGGCTGAAATGTCTGGGACATTC
Tt_sRNA_28	GTCCAGTGGATGAAGACCGAGC
Tt_sRNA_29	ACTTAGTCGTATCATATTGTCTC
Tt_sRNA_30	CCTGATCTACTGTATCTCGGACT
Tt_sRNA_31	GAGGCTGGGCTGGTCCGATGGCA
Tt_sRNA_32	AATTTTCGGGCACCCACTCTGATC
Tt_sRNA_33	ACTTAGTCGTATCATATTGTCT
Tt_sRNA_34	TTTTTCGGGCACCCACTCTGATC
Tt_sRNA_35	GGACGGTGCTGAGAAAATACTTGG
Tt_sRNA_36	ATCGATGACAATATGGAATATA
Tt_sRNA_37	CCAGTGGATGAAGACCGAGC
Tt_sRNA_38	CCCAAATATATGGACCTGGAGCG
Tt_sRNA_39	ACTTAGTCGTATCATATTGTCTCT
Tt_sRNA_40	TGCGGTGTAGGTTTCATGTGCGACTT
Tt_sRNA_41	ATCGATGACAATATGGAATATACG
Tt_sRNA_42	AGAGTCAGACCGTTGCGACATCA
Tt_sRNA_43	CGACAAATGGCCTGGATCGCAA
Tt_sRNA_44	TTGGCCGCTCAGATCTGATGGACC
Tt_sRNA_45	CCTGCGGTGGACGAGATCGATGTG
Tt_sRNA_46	TTTCGGGCACCCACTCTGATC
Tt_sRNA_47	CAGGCTGTGCTGATGATTTCCA
Tt_sRNA_48	CCGGACAAGGACAAAGGGGGCT
Tt_sRNA_49	CGACGAGTAAACCAGGTGTGTT
Tt_sRNA_50	TGGCCGCTCAGATCTGATGGAC
Tt_sRNA_51	CCCAAATATATGGACCTGGAGC
Tt_sRNA_52	CCTTACTGGAGGATGGCTGAGGT
Tt_sRNA_53	TATACCATCTTTTCGGGGCTGAGGT
Tt_sRNA_54	TTCCATTTTTTCGCACGGGGAGATC
Tt_sRNA_55	GAGGGGACGTTGGCTGAGCTGGCT
Tt_sRNA_56	AGACTAAAGAATAAACTAACCTTT
Tt_sRNA_57	TGGCCGCTCAGATCTGATGGACC
Tt_sRNA_58	CTGCCCAAATATATGGACCTGGA
Tt_sRNA_59	ACTACTCTTGGTCTGGAAGCGATC

Tt_sRNA_60	CGCTAGGCGCTCTGAATCGACCT
Tt_sRNA_61	ACGGTGCTGAGAAAATACTTG
Tt_sRNA_62	CTGCGGTGGACGAGATCGATGTG
Tt_sRNA_63	ATGCGACCGTTTGAACCTTGGT
Tt_sRNA_64	ATATTAAGTGAGTGTGTTGAAA
Tt_sRNA_65	GACGGTGCTGAGAAAATACTT
Tt_sRNA_66	CCTTTCAGGCTGTGCTGATGATT
Tt_sRNA_67	GACGGTGCTGAGAAAATACT
Tt_sRNA_68	CCTTACTGGAGGATGGCTGAGGTT
Tt_sRNA_69	GAGGCTGGGCTGGTCCGATGGC
Tt_sRNA_70	GTGGCTAAAGATCTTTTTGTAGG
Tt_sRNA_71	GGCTGGGCTGGTCCGATGGCA
Tt_sRNA_72	CTACTCTTGGTCTGGAAGCGATC
Tt_sRNA_73	GGCAAGGGATCGTCGTTGCAGGCT
Tt_sRNA_74	TCCGGCCGAAAAAAGCAGACT
Tt_sRNA_75	CACGACGAGTAAACCAGGTGTGTT
Tt_sRNA_76	ACGGTGCTGAGAAAATACTTGG
Tt_sRNA_77	TGCCCAAATATATGGACCTGGAGC
Tt_sRNA_78	GGAGGCTGGGCTGGTCCGATGGCA
Tt_sRNA_79	ATGGCTGTAACGGACTAAAATAT
Tt_sRNA_80	GCTTCGGCGGGGGATCTTGATGGC
Tt_sRNA_81	GACGGTGCTGAGAAAATACTTGA
Tt_sRNA_82	AACGTGTTTCTACTTTCTGATC
Tt_sRNA_83	TATCTACATCGGATTCTGAGGT
Tt_sRNA_84	CTTAGTCGTATCATATTGTCTC
Tt_sRNA_85	TTGGCCGCTCAGATCTGATGGAC
Tt_sRNA_86	AATTGTCTTCTTGATTCGTCTTTT
Tt_sRNA_87	ATCTACATCGGATTCTGAGGT
Tt_sRNA_88	TGATCCGAATTTTTCTATTTCT
Tt_sRNA_89	CCGTCCGAGCCCTCCCGCCTCT
Tt_sRNA_90	TGCTTTTTTTCGGCCGGATTCCCT
Tt_sRNA_91	TGCGGTGTAGTTTCATGTGCGAC
Tt_sRNA_92	ACTGGAAACATGGGTACACTAAC
Tt_sRNA_93	CAGTCCAGTGGATGAAGACCGAGC
Tt_sRNA_94	ACTAGGACAAACCGCTATTGGC
Tt_sRNA_95	TTAACTTAGTCGTATCATATTGTC
Tt_sRNA_96	CTTAGTCGTATCATATTGTCTCT
Tt_sRNA_97	TTGATCCGAATTTTTCTATTTCT

Danksagung

Zuerst möchte ich mich bei Prof. Michael Feldbrügge für die Möglichkeit der Promotion in seinem Institut und die Flexibilität bei der Themenwahl bedanken. Danke auch für die zielgerichteten Fragen, die die Thematik auf den Punkt getroffen haben.

Prof. Laura Rose möchte ich für die Übernahme des Zweitgutachtens und die Rolle als Mentorin danken.

Vielen Dank auch an Vera für die Betreuung und für den Freiraum, einigen eigenen Ideen nachzugehen. Es war interessant, mit einem Pilz zu arbeiten, für den viele Methoden noch gar nicht oder noch nicht so gut etabliert waren.

Ich möchte mich für die finanzielle Förderung im Rahmen des Boost Funds PlaMint des Strategieprojektes BioSC bedanken, durch den Teile dieser Arbeit sowie wissenschaftlicher Austausch im Rahmen von Veranstaltungen ermöglicht wurden.

Danke auch an die Graduiertenschule iGrad-Plant dafür, dass ich als assoziiertes Mitglied an Veranstaltungen teilnehmen durfte.

Für Unterstützung am RNAi-Thema möchte ich mich bei Arne Weiberg, Antoine Porquier und Florian Dunker für die Anleitung zur Herstellung der sRNA-Bibliotheken und Einweisung in die Auswertung bedanken und bei Kathi Zarnack für Antworten auf bioinformatische Fragen.

Bei allen Mitgliedern des Instituts möchte ich mich für die angenehme Arbeitsatmosphäre, den steten Austausch und die nette Zeit nach Feierabend bedanken. Danke auch an Uli und Elisabeth für technische und bürokratische Hilfe.

Schließlich möchte ich mich bei meiner Familie, den Tulinskis und ganz besonders bei Markus für die stete Unterstützung bedanken.