

# **Die frühe Infektionsphase von *Ustilago maydis*: Genregulation durch das bW/bE-Heterodimer**

Dissertation der Fakultät für Biologie  
der Ludwig-Maximilians-Universität München  
eingereicht von Andreas Brachmann am 7. Mai 2001

Diese Dissertation wurde am 7. Mai 2001 der Fakultät für Biologie der Ludwig-Maximilians-Universität München zur Beurteilung eingereicht. Die Begutachtung der Arbeit erfolgte durch Frau Prof. Dr. Regine Kahmann (erster Gutachter) und durch Herrn PD Dr. Dirk Eick (zweiter Gutachter). Die Prüfung fand am 27. Juni 2001 statt.

Teile dieser Arbeit wurden in folgenden Artikeln veröffentlicht:

**Romeis, T., Brachmann, A., Kahmann, R. und Kämper, J.** (2000) Identification of a target gene for the bE/bW homeodomain protein complex in *Ustilago maydis*. *Mol Microbiol*, **37**, 54-66.

**Loubradou, G., Brachmann, A., Feldbrügge, M. und Kahmann, R.** (2001) Involvement of the TPR-containing protein Sql1 in filamentous growth of *Ustilago maydis*. A homolog of the transcriptional repressor Ssn6p antagonizes cAMP signalling in *Ustilago maydis*. *Mol Microbiol*, **40**, 719-730.

*"What is the purpose of all this?" man asked politely.*

*"Everything must have a purpose?" asked God.*

*"Certainly," said man.*

*"Then I leave it to you to think of one for all this," said God. And He went away.*



# Zusammenfassung

*Ustilago maydis* ist der Erreger des Maisbeulenbrands. Voraussetzung für eine erfolgreiche Infektion sind Fusion zweier kompatible Sporidien und Ausbildung eines dikaryotischen Filaments. Diese Prozesse werden durch die beiden Paarungstyploci *a* und *b* kontrolliert. Der *a*-Locus kodiert für ein biallelisches Pheromon/Pheromonrezeptor-System, das die Zell/Zell-Erkennung und die Zellfusion reguliert. Die folgende pathogene Entwicklung wird durch den multiallelischen *b*-Locus kontrolliert, der für zwei Homeodomänenproteine kodiert, bW und bE. Nach der Fusion der haploiden Sporidien können sich bW/bE-Heterodimere aus bW- und bE-Proteinen unterschiedlicher Allele bilden. Diese regulieren das filamentöse Wachstum, die Penetration der Pflanzenoberfläche, das Wachstum in der Pflanze und die Tumorinduktion. Das Ziel dieser Arbeit lag in der Isolierung von b-regulierten Genen, die eine Rolle während der frühen Infektionsphase spielen.

Dazu wurden *U. maydis*-Stämme erzeugt, in denen eine regulierte Expression von bW und bE verschiedener Allele möglich ist. Diese Stämme wurden in einem nichtradioaktiven RNA-Fingerprints-Ansatz eingesetzt, in dem nach Unterschieden im Transkriptom nach Ausbildung eines bW/bE-Heterodimers gesucht wurde. Dabei wurde mehr als die Hälfte aller in *U. maydis* transkribierten Gene durchmustert, wobei 348 Amplicons differentiell waren. Die weitere Analyse von 48 ausgewählten Amplicons führte zur Identifikation von 12 neuen b-regulierten Genen. Davon sind 7 induziert und 5 reprimiert. Folglich ist das bW/bE-Heterodimer ein zentrale Regulator, der eine umfangreiche Veränderung des Transkriptoms auslöst.

Für eines der induzierten Gene, *frb52*, das für ein DNA-Polymerase-X-Homolog kodiert, konnte eine direkte Regulation durch das bW/bE-Heterodimer gezeigt werden. Die Deletion dieses Gens zeigte keinen Einfluss auf das Kreuzungsverhalten und die Pathogenität, so dass seine Rolle unklar ist. Ein weiteres induziertes Gen kodiert für ein MAP-Kinase-Homolog, das mit Kpp6 bezeichnet wurde. Kpp6 besitzt einen ungewöhnlichen zusätzlichen N-Terminus von 150 Aminosäuren, der keine Ähnlichkeit zu bekannten Proteinsequenzen aufweist, und dem bislang keine Funktion zugewiesen werden konnte. *kpp6* ist nicht nur b-induziert, sondern weist auch ein kürzeres, pheromoninduziertes Transkript auf. Die gegenwärtigen Daten deuten darauf hin, dass beide Transkripte für das gleiche Protein kodieren. Die Deletion von *kpp6* führt zu einer dramatisch reduzierten Pathogenität. Bei Infektion von Maispflanzen mit Deletionsmutanten tritt keine primäre Anthocyanbildung auf, eine frühe Abwehrreaktion der Pflanze, die bei Infektion mit Wildtyp-Stämmen zu beobachten ist. Kpp6 spielt demnach eine entscheidende Rolle in der frühen Infektionsphase und ist wahrscheinlich an der Kommunikation zwischen Pilz und Pflanze beteiligt.

Die Analyse von drei der reprimierten Gene führte zur Identifizierung eines Locus von sechs Genen (dem *cab*-Locus), die alle pheromoninduziert sind und nach der Zellfusion reprimiert werden. Im Unterschied zu allen anderen bislang bekannten pheromoninduzierten Genen ist die Regulation dieser Gene unabhängig von Prf1. Die regulatorische Rolle von Prf1 scheint auf die Paarungstypgene, *prf1* selber und Gene, die für die Reifung oder die Sekretion der Pheromone benötigt werden, beschränkt zu sein. Die Expression der Gene des *cab*-Locus unterliegt einer negativen Kontrolle durch die das Pheromonsignal übermittelnde MAP-Kinasekaskade und einer positiven Kontrolle durch die cAMP-Kaskade. Diese antagonistische Regulation weist auf eine differentielle Interaktion zwischen beiden Signalmodulen und den durch das bW/bE-Heterodimer kontrollierten Prozessen während der verschiedenen Stadien der frühen Infektionsphase hin.

## Summary

The fungus *Ustilago maydis* is the causative agent of corn smut disease. Prerequisite for successful infection is the fusion of two compatible haploid sporidia and formation of a dikaryon. This process is controlled by the two mating type loci *a* and *b*. The *a*-locus encodes a biallelic pheromone/pheromone receptor system which is responsible for cell-cell recognition and fusion of the sporidia. The subsequent pathogenic development is controlled by the multiallelic *b*-locus, encoding two homeodomain proteins, bW and bE. After fusion of haploid sporidia, bW and bE proteins from different alleles can form heterodimers, triggering downstream cascades of regulatory processes. These control filamentous growth, penetration of the plant surface, growth inside the plant and induction of galls. The aim of this work was the isolation of genes regulated by the bW/bE heterodimer that play a role during early pathogenic development.

For this *U. maydis* strains were constructed in which *bW* and *bE* genes from different alleles can be turned on and off in a regulated fashion. These strains were used in a non-radioactive RNA-fingerprint analysis to identify differences in the transcriptome in response to the formation of the bW/bE heterodimer. The screen covered more than half of all genes transcribed in *U. maydis*, and 348 amplicons appeared to originate from differentially expressed genes. Further analysis of 48 chosen amplicons led to the identification of 12 previously unknown b-regulated genes. Of those, 7 are upregulated, 5 are downregulated. Therefore the bW/bE heterodimer is a central regulator, triggering a vast change in the transcriptome.

For one of the upregulated genes, *frb52* encoding a DNA polymerase X homolog, direct regulation by the bW/bE heterodimer could be shown. Deletion of this gene has no effect on mating and pathogenicity, providing no hint as to the role of the protein in these processes. Another upregulated gene encodes a MAP kinase homolog, named Kpp6. Kpp6 has an unusual amino terminal extension of 150 amino acids that exhibits no similarity to any known protein sequence and has no apparent function. *kpp6* is not only induced after b-induction, but also shows a different shorter transcript in response to pheromone. Present data indicate that both transcripts encode for the same polypeptide. Deletion of *kpp6* leads to a greatly reduced pathogenicity. In infections of corn plants with deletion mutants, no anthocyanin production of the plant is visible, an early defense reaction normally seen in infections with wild-type cells. Therefore Kpp6 has a crucial role in the early infection process and mediates most likely the communication between fungus and plant.

Analysis of three of the downregulated genes led to the identification of a cluster of six genes (the *cab* locus) that are upregulated during pheromone stimulation and shut off after successful cell fusion. Unlike all the other genes known to be upregulated upon pheromone response, this regulation is independent of the transcription factor Prf1. The regulatory role of Prf1 seems to be restricted to the mating type genes, *prf1* itself, and genes necessary for pheromone processing or transport. The expression of the *cab* locus genes is negatively regulated by the pheromone MAP kinase cascade and positively regulated by the cAMP signalling cascade. This antagonistic control points to a differential interaction between the two signalling modules and the processes regulated by the bW/bE heterodimer during different stages of the early infection process.

# Abkürzungen und Fachbegriffe

AM	"ammonium minimal medium"	OD <sub>600</sub>	Optische Dichte bei 600 nm
Amp	Ampicillin	ORF	"open reading frame"
Ara	Arabinose	PAA	Polyacrylamid
bp	Basenpaar(e)	PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
C-terminal	carboxyterminal	PC	Phenol/Chloroform
Cbx	Carboxin	PCR	"polymerase chain reaction"
CGFP	"cyan green fluorescent protein"	PD	"potato dextrose"
CM	"complete medium"	PEG	Polyethylenglycol
cpm	"counts per minute"	Phleo	Phleomycin
DAPI	4',6'-Diamidino-2-Phenylindol	PIPES	Piperazine N-N'-bis (2-Ethansulphonat)
DIC	"differential interference contrast"	PKA	"protein kinase A"
DMF	Dimethylformamid	PKC	"protein kinase C"
DMSO	Dimethylsulfoxid	PRE	"pheromone response element"
DTT	Dithiothreitol	RACE	"rapid amplification of cDNA ends"
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure	RT	"reverse transcription" oder Raumtemperatur
EGFP	"enhanced green fluorescent protein"	SDS	Natriumdodecylsulfat
EGTA	Ethylenglycoltetraessigsäure	SGFP	"synthetic green fluorescent protein"
EMS	"electrophoretic mobility shift"	TAE	Tris-Acetat + Na <sub>2</sub> -EDTA
ERK	"extracellular regulated kinase"	TBE	Tris-Borat + Na <sub>2</sub> -EDTA
EST	"expressed sequence tag"	TE	Tris-Cl + Na <sub>2</sub> -EDTA
GAP	"GTPase activating protein"	TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylen-diamin
GEF	"guanine nucleotide exchange factor"	Tris	Trishydroxymethylamino-methan
GFP	"green fluorescent protein"	U	Unit (Enzymaktivitätseinheit)
Glc	Glucose	UARS	" <i>U. maydis</i> autonomously replicating sequence"
H <sub>2</sub> O <sub>bid.</sub>	zweifach destilliertes Wasser	UAS	"upstream activating sequence"
HMG	"high mobility group"	Ü/N	über Nacht
Hyg	Hygromycin	Upm	Umdrehungen pro Minute
kb	Kilobasenpaar	URS	"upstream regulating sequence"
MAPK	"mitogen activated protein kinase"	UV	ultraviolettes Licht
MAPKK	MAPK-Kinase	wt	Wildtyp
MAPKKK	MAPKK-Kinase	YGFP	"yellow green fluorescent protein"
MOPS	3-(N-Morpholino)propan-sulphonat		
N-terminal	aminoterminal		
Nat	Nourseothricin		
NLS	"nuclear localisation sequence"		
NM	"nitrate minimal medium"		



# Inhaltsverzeichnis

<b>1. EINLEITUNG</b> .....	1
1.1 <i>USTILAGO MAYDIS</i> , EIN MODELLORGANISMUS FÜR PATHOGENE PILZE.....	1
1.2 DER LEBENSZYKLUS VON <i>U. MAYDIS</i> .....	3
1.3 KONTROLLE DER ENTWICKLUNG DURCH DIE PAARUNGSTYPOCI.....	5
1.4 SIGNALTRANSDUKTION WÄHREND DER ZELL/ZELL-ERKENNUNG .....	8
1.5 DIE FRÜHE INFEKTIONSPHASE VON <i>U. MAYDIS</i> .....	11
1.6 FRAGESTELLUNG DIESER ARBEIT .....	13
<b>2. ERGEBNISSE</b> .....	15
2.1 ISOLIERUNG b-REGULIERTER GENE DURCH RNA-FINGERPRINT .....	15
2.1.1 Regulierte Expression der Gene des <i>b</i> -Locus .....	15
2.1.2 Nichtradioaktives RNA-Fingerprint zur Isolierung b-regulierter Gene.....	18
2.1.3 RNA-Fingerprint-Ansatz zur Isolierung b-regulierter Gene .....	20
2.1.4 Sequenzanalyse der ausgewählten Amplicons.....	21
2.1.5 Expressionsanalyse mittels Dot-Blot-Hybridisierung .....	22
2.1.6 Northern-Analyse der zu den Amplicons gehörenden Gene.....	23
2.1.7 Regulation der <i>frb</i> -Gene unter Kreuzungsbedingungen.....	25
2.1.8 Zusammenfassung der Ergebnisse des RNA-Fingerprint-Ansatzes .....	27
2.2 UNTERSUCHUNG DES GENS <i>frb52</i> .....	29
2.2.1 <i>frb52</i> kodiert für ein Protein mit Ähnlichkeit zu DNA-Polymerasen X.....	29
2.2.2 <i>frb52</i> ist ein direkt b-reguliertes Gen .....	29
2.2.3 Die Deletion von <i>frb52</i> hat keinen Einfluss auf Pathogenität.....	32
2.3 UNTERSUCHUNG DES GENS <i>frb110</i> .....	33
2.3.1 Neben <i>frb110</i> befindet sich ein konvergent transkribiertes Gen.....	33
2.3.2 Die beiden Transkripte stammen von zwei verschiedenen Genen.....	33
2.3.3 Die Deletion von <i>frb110</i> hat keinen Einfluss auf Pathogenität.....	35
2.4 UNTERSUCHUNG DES MAP-KINASEGENS <i>kpp6</i> ( <i>frb92</i> ) .....	36
2.4.1 <i>frb92</i> kodiert für die ungewöhnliche MAP-Kinase Kpp6 .....	36
2.4.2 Die Deletion von <i>kpp6</i> hat keinen Einfluss auf Kreuzungsverhalten, Filament- und Appressorienbildung .....	40
2.4.3 <i>kpp6</i> -Deletionsmutanten weisen eine reduzierte Pathogenität auf.....	41
2.4.4 Bei <i>kpp6</i> -Deletionsmutanten sind frühe Infektionsprozesse gestört.....	43
2.4.5 Der N-Terminus von Kpp6 wird für die Pathogenität nicht benötigt .....	46
2.4.6 Die Überexpression von Kpp6 zeigt im Wildtyp keinen Effekt .....	51

2.4.7	Kpp6 und Kpp2 besitzen unterschiedliche, aber teilweise überlappende Funktionen .....	52
2.4.8	Mutationen in der Aktivierungsdomäne von Kpp6 führen zu einem drastischen Pathogenitätsdefekt .....	55
2.4.9	Die beiden Transkripte von <i>kpp6</i> kodieren für das gleiche Protein .....	58
2.4.10	Die PRE-Boxen sind für die Expression von Kpp6 nicht essentiell .....	60
2.4.11	Prf1 hat keinen Einfluss auf die Expression von Kpp6 .....	63
2.4.12	<i>kpp6</i> wird durch die Pheromon-MAP-Kinasekaskade positiv reguliert .....	65
2.5	UNTERSUCHUNG DER b-REPRIMIERTEN GENE <i>frb34</i> UND <i>frb136</i> .....	67
2.5.1	<i>frb34</i> und <i>frb136</i> liegen benachbart in einem Locus mit weiteren ähnlich regulierten Genen .....	67
2.5.2	<i>frb124</i> und <i>frb136</i> werden nicht durch Prf1 reguliert .....	69
2.6	DIE ROLLE VON PRF1 IM KREUZUNGSPROZESS .....	70
2.6.1	Erzeugung von Stämmen, die eine von Prf1 unabhängige Expression der Paarungstypgene ermöglichen .....	70
2.6.2	Prf1 besitzt neben der Regulation der Paarungstypgene weitere Funktionen .....	71
<b>3.</b>	<b>DISKUSSION</b> .....	<b>75</b>
3.1	DAS bW/bE-HETERODIMER ALS TRANSKRIPTIONELLER REGULATOR .....	75
3.1.1	Regulierte Expression der Paarungstypgene .....	75
3.1.2	Der RNA-Fingerprint-Ansatz zur Identifikation b-regulierter Gene .....	76
3.1.3	Das bW/bE-Heterodimer reguliert eine große Anzahl von Genen .....	78
3.1.4	<i>frb52</i> ist ein direktes Zielgen des b-Komplexes .....	79
3.1.5	Weitere Möglichkeiten zur Untersuchung der von b kontrollierten Regulationskaskade .....	80
3.2	DIE ROLLE DER MAP-KINASE KPP6 BEI DER PATHOGENITÄT .....	82
3.2.1	<i>kpp6</i> kodiert für eine ungewöhnliche MAP-Kinase .....	82
3.2.2	Kpp6 besitzt eine wichtige Funktion während der frühen Infektionsphase .....	84
3.2.3	Welche Signale werden von Kpp6 übertragen? .....	85
3.2.4	Spezifitätsdeterminanten in Kpp6 und Kpp2 .....	88
3.3	SIGNALTRANSDUKTION WÄHREND DER FRÜHEN INFEKTIONSPHASE .....	89
3.3.1	Antagonistische Regulation durch cAMP- und Pheromon-MAP-Kinasekaskade .....	90
3.3.2	Modellvorstellungen zur Regulation der frühen Infektionsphase .....	92
<b>4.</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN</b> .....	<b>97</b>
4.1	MATERIAL UND BEZUGSQUELLEN .....	97
4.1.1	Medien, Lösungen, Enzyme und Kits .....	97
4.1.2	Oligonukleotide .....	99
4.1.3	Stämme .....	109
4.1.4	Plasmide und Plasmidkonstruktionen .....	112
4.1.5	Sequenzierungsstrategien .....	129
4.2	MIKROBIOLOGISCHE, ZELLBIOLOGISCHE UND GENETISCHE METHODEN .....	132
4.2.1	<i>Escherichia coli</i> .....	132
4.2.2	<i>Ustilago maydis</i> .....	133

4.3	MOLEKULARBIOLOGISCHE STANDARDMETHODEN .....	137
4.3.1	Isolierung von Nukleinsäuren.....	137
4.3.2	Auftrennung und Nachweis von Nukleinsäuren.....	139
4.3.3	Sequenz- und Strukturanalyse .....	142
4.3.4	PCR-Techniken.....	143
4.3.5	Isolierung von Proteinen.....	145
4.3.6	Auftrennung und Nachweis von Proteinen.....	145
4.4	DIE TECHNIK DES NICHRADIOAKTIVEN RNA-FINGERPRINTS .....	148
4.4.1	Reverse Transkription.....	148
4.4.2	PCR-Ansätze .....	148
4.4.3	Gelelektrophoretische Auftrennung der Amplicons.....	149
4.4.4	Extraktion und Klonierung der Amplicons.....	149
4.5	BIOCHEMISCHE METHODEN.....	149
4.5.1	Gelretardations-Analyse .....	149
4.5.2	DNaseI-Protektionsexperimente.....	150
<b>5.</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>151</b>
<b>6.</b>	<b>ANHANG .....</b>	<b>163</b>
6.1	HOMOLOGE INTEGRATION IN DEN <i>ip</i> -LOCUS VON <i>U. MAYDIS</i> .....	163
6.2	REGULIERBARE PROMOTOREN IN <i>U. MAYDIS</i> .....	166
6.3	KONSTITUTIVE PROMOTOREN UND GFP-VARIANTEN IN <i>U. MAYDIS</i> .....	169
6.4	TESTANSATZ ZUR ISOLIERUNG b-REGULierter GENE .....	172
6.5	AMPLICONS AUS DEM TESTANSATZ ZUR ISOLIERUNG b-REGULierter GENE .....	176
6.6	UNTERSUCHUNG DER GENE <i>big2</i> , <i>big4</i> UND <i>brg2</i> .....	177
6.7	UNTERSUCHUNG DES b-INDUZIERTEN GENS <i>big6</i> .....	178
6.8	<i>pdil</i> , DAS GEN FÜR PROTEINDISULFID-ISOMERASE.....	178
6.9	<i>pkc1</i> , DAS GEN FÜR PROTEINKINASE C.....	180
6.10	<i>phc1</i> , EIN PHYTOCHROMGEN .....	182
6.11	AMPLICONS AUS DEM RNA-FINGERPRINT-ANSATZ.....	180
6.12	<i>frb323</i> , EIN GEN FÜR EINE PLASMAMEMBRAN (H <sup>+</sup> )-ATPASE.....	184
6.13	ERZEUGUNG ZUFÄLLIGER, WENIG REDUNDANTER EST-KLONE .....	185
6.14	<i>nar1</i> ALS GEGENSELEKTIONIERBARER MARKER IN <i>U. MAYDIS</i> .....	187
6.15	<i>pyr6</i> ALS GEGENSELEKTIONIERBARER MARKER IN <i>U. MAYDIS</i> .....	189
6.16	MENGENABSCHÄTZUNG BEI NORTHERN-ANALYSEN IN <i>U. MAYDIS</i> .....	191
6.17	SEQUENZDATEN .....	192



# 1. Einleitung

## 1.1 *Ustilago maydis*, ein Modellorganismus für pathogene Pilze

Im Verlauf der letzten zwanzig Jahre hat sich der Basidiomycet *Ustilago maydis*, der Erreger des Maisbeulenbrands, zu einem der wichtigsten Modellorganismen zur Untersuchung phytopathogener Pilze entwickelt. Er nimmt damit unter den Basidiomyceten eine Stellung ein, die mit der des Reispflichtens *Magnaporthe grisea* unter den Ascomyceten zu vergleichen ist. Begünstigt wurde dies durch Eigenschaften von *U. maydis*, die diesen Pilz zu einem hervorragenden Untersuchungsobjekt machen. Dazu zählt, dass der Lebenszyklus unter kontrollierten Laborbedingungen innerhalb von etwa drei Wochen nachvollzogen werden kann. Das Vorhandensein eines sexuellen Zyklus ermöglicht genetisches Arbeiten, und in den letzten Jahren wurden eine ganze Reihe von molekulargenetischen Methoden, wie z. B. Transformation mit frei replizierenden Plasmiden oder homologe Rekombination zur Deletion von Genen etabliert, was die funktionelle Analyse von Genen erlaubt. Saprophytisch wachsende Zellen von *U. maydis* lassen sich leicht in großem Maßstab in Flüssig- und auf Festmedien kultivieren, wodurch biochemische Arbeiten vereinfacht werden. Bei der Wirtspflanze Mais handelt es sich außerdem um einen gut untersuchten Organismus, der relativ einfach zu kultivieren ist, und mit dem schon sechs bis sieben Tage nach der Aussaat Pathogenitätsstudien durchgeführt werden können (Kahmann *et al.*, 2000).

Die in den letzten Jahren verstärkten Untersuchungen pilzlicher Infektionsmechanismen haben vor allem zwei Gründe. Zum einen dominieren pilzliche Infektionen unter den Ursachen für pflanzliche Krankheiten. So werden von den 162 wichtigsten Infektionskrankheiten der in Mitteleuropa genutzten Pflanzen 135 (83%) durch Pilze, die übrigen durch Nematoden, Bakterien, Viren und Viroide verursacht (Müller und Loeffler, 1992). Der jährlich weltweit durch Pilze verursachte Schaden ist schwer zu beziffern und wird mit zwischen 8% und 25% des Ernteertrags angegeben (Weber, 1993; Börner, 1997). Zum anderen haben durch humanpathogene Pilze hervorgerufene Krankheiten in den letzten Jahren vor allem unter immunsupprimierten oder mit HIV infizierten Patienten stark zugenommen (Guarro *et al.*, 1999). Zu den wichtigsten und am besten untersuchten Erregern zählen dabei die Ascomyceten *Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus* und *Histoplasma capsulatum*<sup>1</sup> und der Basidiomycet *Cryptococcus neoformans*<sup>1</sup> (Hogan *et al.*, 1996; Guarro *et al.*, 1999). Zur Bekämpfung von pathogenen Pilzen stehen nur begrenzte Mittel zur Verfügung. Bei Pflanzenpathogenen werden zu-

---

<sup>1</sup> *Histoplasma capsulatum* wird auch mit *Ajellomyces capsulata* bezeichnet, *Cryptococcus neoformans* mit *Filobasidiella neoformans*; es wird jeweils der gebräuchlichere Name verwendet.

meist Fungizide auf der Basis von Schwermetallionen in organischen Verbindungen verwendet, deren Einsatz mit einem hohen technischen und finanziellen Aufwand verbunden und ökologisch bedenklich ist (Müller und Loeffler, 1992; Börner, 1997). Die gegen Humanpathogene eingesetzten Antibiotika zielen hauptsächlich auf die Biosynthese von Ergosterol, einem Molekül der pilzlichen Zellmembran. Dabei ist in den letzten Jahren verstärkt das Aufkommen von Antibiotikaresistenzen beobachtet worden (Vanden Bossche *et al.*, 1998).

Das primäre Ziel der Untersuchung pathogener Pilze besteht daher darin, auf der Basis des gewonnenen Wissens gezieltere, besser wirksame und verträglichere Wirkstoffe zu entwickeln (Groll *et al.*, 1998; Klein und Li, 1999). Die in diesem Zusammenhang gewonnenen Ergebnisse zeigen eine Vielzahl von Parallelen in der Pathogenität von phyto- und humanpathogenen Pilzen auf. Dazu zählt die in vielen untersuchten Pilzen gefundene Beteiligung evolutionär konservierter Signalübertragungswege, wie z. B. der MAP-Kinasekaskaden oder der cAMP-Kaskaden an der pathogenen Entwicklung (Madhani und Fink, 1998; Borges-Walmsley und Walmsley, 2000). Besonders wichtig war die Erkenntnis, dass die Fähigkeit des Morphologiewechsels zwischen hefeartig und filamentös wachsenden Zellen bzw. Zellverbänden eine wichtige Pathogenitätskomponente darstellt (Madhani und Fink, 1998; Borges-Walmsley und Walmsley, 2000). Die mögliche Übertragbarkeit von Ergebnissen gibt der Untersuchung eines einzelnen Systems damit eine weitergehende Bedeutung.

*U. maydis* bietet in diesem Zusammenhang ein ideales Modellsystem zur molekularen Untersuchung der pathogenen Entwicklung. Neben den oben beschriebenen praktischen Vorzügen stehen in diesem Pilz Entwicklung und Dimorphismus unter Kontrolle des *b*-Paarungstyplocus (siehe Abschnitt 1.3). Dadurch ergibt sich mit der Isolierung der durch diesen Locus regulierten Gene und Proteine die Möglichkeit, Pathogenitätsfaktoren auf direktem Wege zu identifizieren. Ein weiterer Vorteil besteht in der, zumindestens in gemäßigten Breiten, geringen Schadwirkung von *U. maydis*. In Deutschland wird *U. maydis* in die Sicherheitsklasse S1 eingruppiert (ZKBS, Berlin), was das Arbeiten im Labor vereinfacht. Der Befall von Maiskulturen beträgt in Nordamerika im Durchschnitt unter 1% (Christensen, 1963), und da *U. maydis* ungiftig ist, können selbst befallene Maispflanzen als Tierfutter verwendet werden. Die Tumore werden in Mittel- und Südamerika sogar seit Hunderten von Jahren als Delikatesse geschätzt (Banuett, 1992; Valverde *et al.*, 1995; Ruiz-Herrera und Martínez-Espinoza, 1998). Auch in Europa ist die Unbedenklichkeit des Verzehrs von *U. maydis*-Sporen seit einem zweiwöchigen Selbstversuch von F. Imhof im Jahre 1784 bekannt (Imhof, 1784).

## 1.2 Der Lebenszyklus von *U. maydis*

Im Vergleich zu anderen phytopathogenen Pilzen, wie z. B. den Rostpilzen, weist *U. maydis* einen relativ einfachen Lebenszyklus auf. Die Kernphasenwechsel korrelieren dabei mit Änderungen der Zellmorphologie (Abbildung 1A und Kahmann *et al.*, 2000). Voraussetzung für eine erfolgreiche Infektion von Maispflanzen ist die gegenseitige Erkennung der haploiden, hefeartig wachsenden Sporidien<sup>2</sup> (Abbildung 1B, Stadium 1), die unterschiedliche Allele der Paarungstyploci besitzen müssen (siehe Abschnitt 1.3).

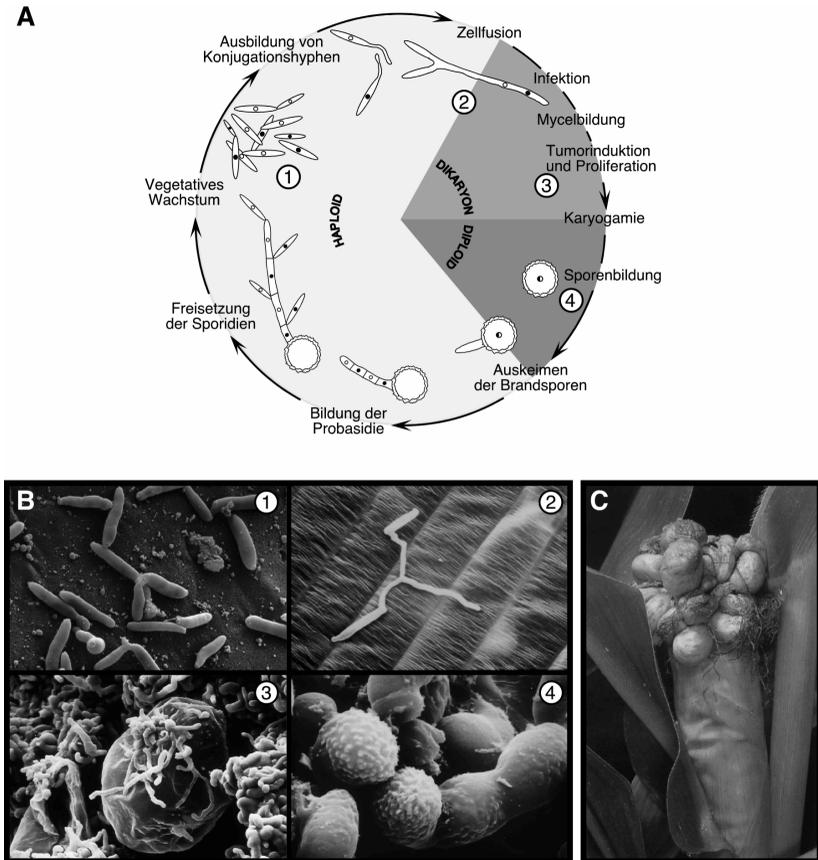
Die zigarrenförmigen Zellen antworten auf das Pheromon des jeweils anderen Paarungstyps mit der Ausbildung von langen, unregelmäßig geformten Konjugationshyphen. Diese können an der Spitze miteinander fusionieren, was zu Ausbildung eines dikaryotischen Filaments führt (Abbildung 1B, Stadium 2; Snetselaar und Mims, 1992; Snetselaar, 1993). In der Natur finden diese Ereignisse auf der Pflanzenoberfläche statt (Holliday, 1961; Snetselaar und Mims, 1993). Die dikaryotischen Filamente bestehen außerhalb der Pflanze aus nur einer Spitzenzelle mit dahinter liegenden leeren Abschnitten. Sie entstehen durch den regelmäßigen Einzug von Septen am distalen Ende der Spitzenzelle und einen darauf folgenden Rücktransport des Zellmaterials nach vorne. Zusammen mit der Neusynthese der Zellwand an der Hyphenspitze führt dies zu einer Vorwärtsbewegung der Spitzenzelle auf der Pflanzenoberfläche, dem sogenannten Spitzenwachstum (Banuett und Herskowitz, 1994b). In diesem Stadium findet genauso wie nach Ausbildung der Konjugationshyphen keine weitere Kernteilung mehr statt, während der Kreuzungsvorgänge ist der Zellzyklus demnach vermutlich arretiert (Snetselaar und Mims, 1992; Snetselaar, 1993; Banuett und Herskowitz, 1994b). Die Prozesse der Zell/Zell-Erkennung und Ausbildung filamentöser Strukturen können auf künstlichen aktivkohlehaltigen Medien nachvollzogen werden. Die dikaryotischen Hyphen erscheinen dabei wegen der luftgefüllten leeren Abschnitte weiß, damit sind sie leicht von glatt wachsenden Kolonien haploider Zellen zu unterscheiden. Die weiteren Entwicklungsschritte von *U. maydis* sind abhängig von der Wirtspflanze<sup>3</sup>.

An geeigneten Stellen erfolgt das Eindringen in die Pflanze, wobei eine Struktur ausgebildet wird, die den Appressorien von z. B. *Magnaporthe grisea* ähnelt (Snetselaar und Mims, 1992; 1993). *U. maydis* kann alle oberirdischen Teile der Maispflanzen infizieren, wobei zumindest unter Laborbedingungen eine Infektion nur in junges Gewebe erfolgreich ist (Christensen,

<sup>2</sup> Es handelt sich dabei eigentlich um Basidiosporen; in dieser Arbeit wird für die hefeartig wachsenden haploiden Zellen der gebräuchlichere Begriff "Sporidie" verwendet (vgl. Christensen, 1963).

<sup>3</sup> Ruiz-Herrera *et al.* (1999a) beschreiben eine erfolgreiche Vollendung des sexuellen Zyklus und die Ausbildung sporenhaltiger Strukturen unter Laborbedingungen außerhalb der Maispflanze. Dazu wurden Mischungen von kompatiblen Stämmen, getrennt durch eine poröse Membran, auf embryogenen Mais-Zellkulturen kultiviert. Obwohl in diesen Experimenten Kernfusion, Rekombination und Meiose beobachtet wurde, ist nicht bekannt, wie diese Prozesse ablaufen und ob sie mit denen in der Maispflanze vergleichbar sind. So ist z. B. nicht geklärt, ob die sporenhaltigen Zellen wirklich die Strukturen sind, in denen die Meiose stattfindet, oder ob es sich dabei um Chlamydosporen handelt (vgl. Kusch und Schauz, 1989).

1963). Der Pilz wächst zunächst intrazellulär, dabei bleibt die Plasmamembran der Pflanzenzellen intakt (Snetselaar und Mims, 1992). Auch während der späteren Stadien scheint sich der Pilz ausschließlich im Apoplasten zu befinden. Obwohl mikroskopisch keine Abwehrreaktion der Pflanze zu erkennen ist (Snetselaar und Mims, 1993), können etwa drei Tage nach Infektion Anthocyanbildung und vereinzelt auch Nekrosen an der Stelle der Infektion beobachtet werden (Banuett und Herskowitz, 1996).



**Abbildung 1: Der Lebenszyklus von *U. maydis*.** A) Schematische Darstellung des Lebenszyklus, nähere Einzelheiten siehe Text. Die Zahlen beziehen sich auf die entsprechenden Stadien in B). **B)** Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von *U. maydis*-Zellen. (1) Haploide Sporidien vermehren sich vegetativ durch Sprossung (mit freundlicher Genehmigung von G. Wanner, C. Quadbeck-Seeger und J. Kämper). (2) Fusion zweier haploider Zellen und Dikaryenbildung auf der Blattoberfläche (aus Snetselaar und Mims, 1993). (3) Starke Proliferation des Pilzmyzels im Tumor (mit freundlicher Genehmigung von K. Snetselaar). (4) Bildung der Brandsporen in den sporogenen Hyphen (aus Snetselaar und Mims, 1994). **C)** Tumorbildung auf einem Maiskolben (aus Murawski, 2000).

Innerhalb der Pflanze beginnt sich der Pilz wieder zu teilen und als echtes dikaryotisches Myzel zu wachsen (Banuett und Herskowitz, 1996). Etwa fünf Tage nach Infektion kann erstmals die Bildung von Tumoren beobachtet werden, die aus einer großen Zahl von stark vergrößerten Pflanzenzellen bestehen<sup>4</sup> (Snetselaar und Mims, 1994). In diesen Tumoren findet in den folgenden Tagen eine starke Proliferation der pilzlichen Filamente statt, der Pilz wächst in diesem Stadium bevorzugt interzellulär (Abbildung 1B, Stadium 3). Ungefähr zehn Tage nach Infektion beginnen sich die Filamente abzurunden. Die einzelnen Zellen wandeln sich in sogenannte Brandsporen<sup>5</sup> um, die einen diploiden Zellkern besitzen (Abbildung 1B, Stadium 4; Snetselaar und Mims, 1994). Der genaue Zeitpunkt der Kernfusion ist nicht bekannt, sie findet aber wahrscheinlich gegen Ende der Proliferationsphase statt (Christensen, 1963). Die Brandsporen sind von einer schwarz pigmentierten Zellwand umgeben, die charakteristische Oberflächenstrukturen aufweist (Abbildung I01B, Stadium 4). Da sich der Großteil der in einem Tumor befindlichen Zellen zu Brandsporen umbildet, erscheinen die Tumore zu späten Zeitpunkten schwarz, was zu dem Namen Maisbeulenbrand geführt hat (Abbildung 1C). Für einen Tumor mittlerer Größe wurde die Anzahl der darin enthaltenen Brandsporen auf etwa 200 Millionen geschätzt (Christensen, 1963). Die Brandsporen werden nach dem Aufplatzen der Tumore durch Wind und Regen verbreitet und können mehrere Jahre überdauern (Christensen, 1963).

Beim Auskeimen erfolgt die Meiose und es wird eine Probasidie ausgebildet, in welche die vier haploiden Kerne einwandern. Von dieser Probasidie werden die Sporidien sukzessive abgeschnürt (Christensen, 1963). Die saprophytisch wachsenden haploiden Sporidien lassen sich unter Laborbedingungen leicht in Flüssig- oder auf Festmedien kultivieren und stellen damit das bevorzugte Untersuchungsobjekt dar. Es ist allerdings nicht bekannt, inwieweit sie im natürlichen Lebenszyklus überhaupt eine Rolle spielen. So wurde unter anderem beobachtet, dass auf der Pflanzenoberfläche auskeimende Brandsporen die Pflanze auch direkt infizieren können (Walter, 1934).

### 1.3 Kontrolle der Entwicklung durch die Paarungstyploci

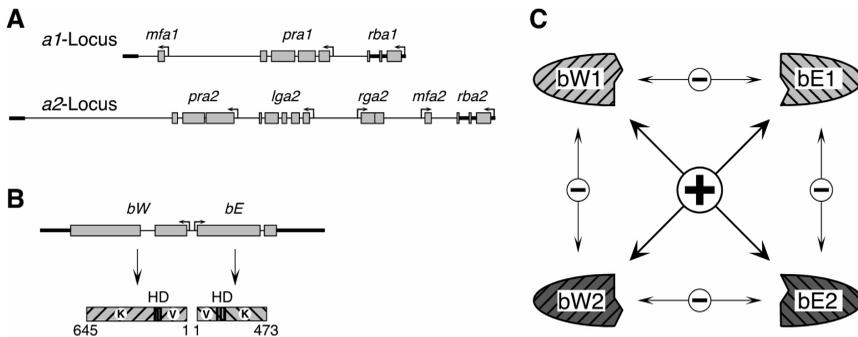
Die Zell/Zell-Erkennung, die Zellfusion und die anschließende Ausbildung des infektiösen dikaryotischen Filaments unterliegt der Kontrolle durch die beiden Paarungstyploci *a* und *b* (für eine Übersicht siehe Kahmann *et al.*, 2000). Für eine erfolgreiche Infektion müssen haploide Sporidien unterschiedliche Allele beider Loci besitzen. Der *a*-Locus, der in zwei

---

<sup>4</sup> Die korrekte Bezeichnung wäre wahrscheinlich "Pflanzengallen", nachdem die Pflanzenzellen weder transformiert sind noch unbeschränktes Wachstum aufweisen; es wird hier trotzdem der üblichere Begriff "Tumor" verwendet (vgl. Christensen, 1963).

<sup>5</sup> Da in nicht allen Fällen aus den Sporen eine Probasidie gebildet wird (Walter, 1934), ist die häufig verwendete Bezeichnung "Teliospore" nicht vollständig korrekt (Christensen, 1963). Aus diesem Grund wird der neutralere Begriff "Brandspore" verwendet.

Allelen vorliegt, ist dabei vor allem für die gegenseitige Erkennung und die Zellfusion verantwortlich, der multiallelische *b*-Locus für die Aufrechterhaltung des dikaryotischen Filaments und die nachfolgende pathogene Entwicklung (Banuett, 1995).



**Abbildung 2: Die Paarungstyploci in *U. maydis*.** A) Schematische Darstellung des *a1*- und des *a2*-Locus. Auf der rechten Seite sind zusätzlich die außerhalb der *a*-Loci liegenden Gene *rba1* bzw. *rba2* angedeutet. Diese beiden Gene sind in ihren N-Termini identisch, besitzen aber unterschiedliche C-Termini (Urban *et al.*, 1996a). B) Schematische Darstellung des *b*-Locus und der davon kodierten Homeodomänen-Proteine *bW* und *bE*. In A) und B) deuten die dickeren schwarzen Balken zwischen den verschiedenen Allelen der *a*- und der *b*-Loci identischen Randbereiche an, die grauen Kästen stehen für kodierende Bereiche. Bei der Darstellung der *b*-Proteine bezeichnet V die variablen und K die konstanten Regionen. C) *bW*- und *bE*-Proteine dimerisieren nur dann miteinander, wenn sie von unterschiedlichen Allelen stammen.

Der *a*-Locus existiert in den beiden Allelen *a1* und *a2* (Abbildung 2A). Es konnte gezeigt werden, dass für die Zellfusion unterschiedliche *a*-Loci ausreichend sind (Trueheart und Herskowitz, 1992). Jedes der beiden Allele kodiert für einen Pheromonvorläufer (Mfa1 bzw. Mfa2) und für einen membranständigen Pheromonrezeptor (Pra1 bzw. Pra2), an den das sekretierte Pheromon des anderen Paarungstyps binden kann (Bölker *et al.*, 1992). Dies führt zur Ausbildung der oben beschriebenen Konjugationshyphen (Spellig *et al.*, 1994). Dieses Pheromon/Pheromonrezeptor-System entspricht dem einer ganzen Reihe von Pilzen, wie z. B. den gut untersuchten der Ascomyceten *Saccharomyces cerevisiae* (Kurjan, 1993) und *Schizosaccharomyces pombe* (Yamamoto *et al.*, 1997). Im Unterschied zu diesen beiden Systemen, bei denen die Gene für beide Paarungstypen in allen Zellen vorhanden sind, liegen sie in *U. maydis*, wie bei allen bisher untersuchten Basidiomyceten, in unterschiedlichen Allelen vor (Banuett, 1998). Die Pheromonvorläufer-Peptide sind im Fall von Mfa1 40 Aminosäuren und im Fall von Mfa2 38 Aminosäuren lang und werden posttranslational modifiziert. Die sekretierten Formen sind dreizehn bzw. neun Aminosäuren lang und an ihren C-Termini vermutlich methyliert und farnesyliert (Spellig *et al.*, 1994). Beide Pheromone entsprechen damit

ihrer Struktur nach dem **a**-Faktor aus *S. cerevisiae*, der ebenfalls C-terminal modifiziert wird<sup>6</sup>. Im *a2*-Locus liegen noch zwei weitere Gene, *lga2* und *rga2* (Abbildung 2A; Urban *et al.*, 1996a). Beide Gene sind zwar während der Kreuzungsvorgänge differentiell reguliert, ihre Deletion hat aber keine Auswirkung auf die Ausbildung des Dikaryons und auf die pathogene Entwicklung (Urban *et al.*, 1996b). Daher ist ihre Rolle bislang ungeklärt.

Der *b*-Locus liegt in mindestens 33 Allelen vor (DeVay, zitiert in Wong und Wells, 1985) und kodiert für zwei divergent transkribierte Gene, *bW* und *bE*, die durch eine intergenische Promotorregion von 200 bp voneinander getrennt sind (Abbildung 2B). Die *bW*-Gene kodieren für Proteine von 645 Aminosäuren und die *bE*-Gene für Proteine von 473 Aminosäuren Länge (Gillissen *et al.*, 1992). Obwohl die *bW*- und die *bE*-Proteine keine Homologie zueinander aufweisen, ist ihr struktureller Aufbau ähnlich. Der N-terminale Bereich der Proteine ist zwischen den einzelnen Allelen zu etwa 40-60% konserviert, zeigt also eine hohe Variabilität. Dagegen ist der C-terminale Bereich mit mehr als 90% Identität zwischen den einzelnen Allelen deutlich stärker konserviert und enthält bei beiden Proteinen ein Homeodomänenmotiv (Abbildung 2B; Kronstad und Leong, 1990; Schulz *et al.*, 1990; Gillissen *et al.*, 1992). Es konnte gezeigt werden, dass für die pathogene Entwicklung *bW*- und *bE*-Proteine von verschiedenen Allelen über ihre variablen N-Termini miteinander interagieren und ein *bW/bE*-Heterodimer ausbilden müssen (Kämper *et al.*, 1995). *b*-Proteine, die von dem gleichen Allel kodiert werden, sind nicht in der Lage zu dimerisieren. Deshalb stellt die Fusion zweier haploider Zellen mit verschiedenem *b*-Locus normalerweise die unbedingte Voraussetzung für die Pflanzeninfektion dar (Abbildung 2C). Allerdings konnte durch Austausch des *bW1*-Gens durch ein *bW2*-Gen im *b1*-Locus des Stammes FB1 (*al b1*) der Stamm CL13 (*al bW2bE1*) hergestellt werden, der als haploider solopathogener Stamm in der Lage ist, Maispflanzen zu infizieren (Bölker *et al.*, 1995b). Damit kann dem *b*-Locus bzw. dem *bW/bE*-Heterodimer die Rolle des zentralen Pathogenitätsfaktors zugeschrieben werden.

Vergleichbare Kompatibilitätsloci besitzt auch das nah verwandte Roggenpathogen *Ustilago hordei*. Allerdings liegen hier die *mfa*, *pra*, *bW* und *bE* entsprechenden Gene benachbart und werden gemeinsam als ein Paarungstyplocus vererbt (Bakkeren und Kronstad, 1993; 1994; 1996). Daher weist dieser Pilz ein bipolares Paarungssystem auf, im Vergleich zu dem tetrapolaren von *U. maydis*. Durch Hybridisierungsstudien konnte gezeigt werden, dass Paarungstyploci vom Typ des *a*- und des *b*-Locus vermutlich in allen Brandpilzen zu finden sind (Bakkeren *et al.*, 1992).

Die Funktion des *bW/bE*-Heterodimers kann von einem künstlichen Fusionsprotein übernommen werden, in dem *bE* mit einer flexiblen Linkerregion an *bW* fusioniert ist (Romeis *et*

---

<sup>6</sup> Experimente mit künstlich hergestelltem Pheromon sind daher nicht so einfach durchzuführen wie im Fall von *S. cerevisiae*, wo der hydrophile  $\alpha$ -Faktor verwendet werden kann. Trotzdem ist es gelungen, auch in *U. maydis* durch Zugabe von künstlich hergestelltem Pheromon zum Wachstumsmedium eine Pheromonantwort hervorzurufen (Spellig *et al.*, 1994; Urban *et al.*, 1996b).

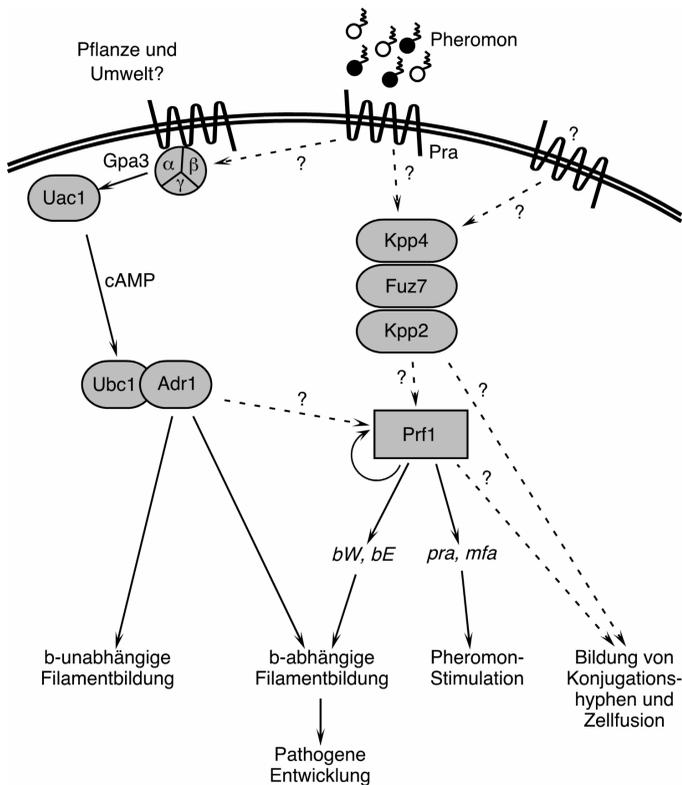
*al.*, 1997). In diesem Fusionsprotein können die variablen N-terminalen Domänen aus bW und bE entfernt werden, ohne dass es zu einem Verlust der Pathogenität kommt. Damit kommt diesen Bereichen neben der Dimerisierung vermutlich keine weitere Funktion zu (Romeis *et al.*, 1997). Dagegen führen Mutationen in den Homeodomänen zu einem Verlust der Pathogenität (Schlesinger *et al.*, 1997). Dieser Befund lässt vermuten, dass für die regulatorische Funktion des bW/bE-Heterodimers Bindung an DNA notwendig ist. bW weist ausserdem eine Domäne auf, die in *S. cerevisiae* zur transkriptionellen Aktivierung eines Reportergens führt (Romeis *et al.*, 2000). Für *Iga2*, ein Gen aus dem *a2*-Locus (Romeis *et al.*, 2000), und kürzlich auch für *dik6*, ein b-reguliertes Gen mit ebenfalls unbekannter Funktion (Bohlmann, 1996; G. Weinzierl, pers. Mitteilung), konnte eine direkte Regulation durch Bindung des bW/bE-Heterodimers in der Promotorregion nachgewiesen werden. Damit erscheint es wahrscheinlich, dass die b-Proteine in *U. maydis* als positive oder negative Regulatoren der Transkription von Pathogenitätsgenen fungieren könnten.

In den Basidiomyceten *Coprinus cinereus* und *Schizophyllum commune* und im Ascomyceten *S. cerevisiae* werden ebenfalls wichtige Entwicklungsprozesse durch Heterodimere aus zwei verschiedenen Homeodomänenproteinen gesteuert (Casselton und Olesnicky, 1998). Nur in *S. cerevisiae* sind bislang Gene bekannt, die von dem Heterodimer, in diesem Fall bestehend aus Mata1p und Mat $\alpha$ 2p, reguliert werden. Dabei wirkt das Heterodimer in diesem Fall nicht direkt als Transkriptionsregulator, sondern rekrutiert die generellen Transkriptionsfaktoren Tup1p und Ssn6p an Promotoren haploid-spezifischer Gene, wo diese einen Repressorkomplex ausbilden (Johnson, 1995). Allerdings sind Mata1p und Mat $\alpha$ 2p deutlich kleiner als die entsprechenden Proteine in Basidiomyceten. Es fehlt ihnen unter anderem die C-terminale basische Domäne, die dafür verantwortlich sein könnte, dass die Heterodimere in Basidiomyceten direkt als Aktivatoren der Transkription dienen könnten (Casselton und Olesnicky, 1998).

## 1.4 Signaltransduktion während der Zell/Zell-Erkennung

Nach Bindung des Pheromons an den Pheromonrezeptor des anderen Paarungstyps kommt es zu einer transkriptionellen Aktivierung sämtlicher in den Paarungstyploci liegender Gene (Urban *et al.*, 1996b). Diese Regulation wird durch die Bindung des Transkriptionsfaktors Prf1 an die sogenannten "pheromone response elements" (PREs) in der Nähe dieser pheromonregulierten Gene vermittelt (Abbildung 3; Hartmann *et al.*, 1996). *prf1*-Deletionsmutanten sind steril und apathogen; eine Deletion in solopathogenen Stämmen, die ohne vorherige Kreuzung mit einem kompatiblen Partner in der Lage sind, Maispflanzen zu infizieren, führt ebenfalls zu einem Verlust der Pathogenität (Hartmann *et al.*, 1996). Der derartiger Stamm, wie z. B. CL13 (*al* *bW2bE1*) wächst auf künstlichen Medien hefeartig, dagegen auf und in der Maispflanze filamentös. Nach Deletion von *prf1* kann dieses filamentöse Wachstum nicht

mehr beobachtet werden. Dies lässt darauf schließen, dass Prf1 nicht nur an der Übertragung des Pheromonsignals, sondern zu einem späteren Zeitpunkt auch an der Übermittlung eines Signals von der Pflanze entscheidend beteiligt ist. Durch Einführung eines konstitutiv exprimierten kompatiblen Paares von *bW*- und *bE*-Genen kann die Pathogenität wieder hergestellt werden (Hartmann *et al.*, 1996). Damit kommt Prf1 eine zentrale Rolle in der Signalübermittlung von der Pheromon-Stimulation hin zur Expression der *b*-Gene und auch später beim Wachstum in der Pflanze zu. Es ist nicht geklärt, ob Prf1 außer der Regulation der Paarungstypgene noch weitere Funktionen zukommen, wie z. B. bei der Ausbildung der Konjugationshyphen, dem ersten sichtbaren Zeichen der Pheromonantwort.



**Abbildung 3: Signaltransduktion in *U. maydis* während der Zell/Zell-Erkennung.** Einzelheiten siehe Text (modifiziert nach Kahmann *et al.*, 2000).

In Zusammenhang mit der Übermittlung des Pheromonsignals spielt die posttranskriptionelle Regulation von Prf1 eine entscheidende Rolle (Hartmann *et al.*, 1999). Prf1 weist eine potentielle MAP-Kinase-Interaktionsdomäne, sowie potentielle Phosphorylierungsstellen für MAP-

Kinasen und für cAMP-abhängige Proteinkinasen A (PKAs) auf. Punktmutationen in den MAP-Kinase-Phosphorylierungsstellen und in der MAPK-Interaktionsdomäne in Prf1 führen zu einem Defekt in der Weiterleitung des Pheromonsignals (Müller *et al.*, 1999). Mit Kpp2<sup>7</sup> konnte eine MAP-Kinase identifiziert werden, welche die Weiterleitung des Signals übernehmen könnte: *kpp2*-Deletionsmutanten zeigen eine deutlich reduzierte Kreuzungskompetenz und Pathogenität (Müller *et al.*, 1999). Interessanterweise kann der Pathogenitätsdefekt der Mutanten durch die konstitutive Expression kompatibler bW- und bE-Proteine nur teilweise wieder aufgehoben werden, Kpp2 scheint daher während der pathogenen Entwicklung eine weitere Rolle zu besitzen, die vermutlich unabhängig von Prf1 ist (Müller *et al.*, 1999).

Mit der MAPKK-Kinase Kpp4<sup>7</sup> (P. Müller, pers. Mitteilung) und der MAPK-Kinase Fuz7<sup>7</sup> (Banuett und Herskowitz, 1994a) wurden weitere mögliche Komponenten der MAP-Kinasekaskade isoliert. Deletionen in den entsprechenden Genen führen zu einem weitgehenden Verlust der Kreuzungskompetenz (Banuett und Herskowitz, 1994a; Andrews *et al.*, 2000; P. Müller, pers. Mitteilung). Mittlerweile konnte gezeigt werden, dass die Expression konstitutiv aktiver Allele beider Gene zur transkriptionellen Aktivierung der Paarungstypgene und zur Ausbildung von Konjugationshyphen führt; diese Effekte sind nicht zu beobachten, wenn *kpp2* deletiert wird (P. Müller, pers. Mitteilung). Damit scheint die Situation in *U. maydis* der in *S. cerevisiae* zu entsprechen, wo das Pheromonsignal ebenfalls über eine MAP-Kinasekaskade übermittelt wird.

In *U. maydis* ist mit der cAMP-Kaskade ein zweites Signaltransduktions-Modul an der Regulation der Zellfusion und Pathogenität beteiligt (Abbildung 3). Es besteht aus Gpa3, der  $\alpha$ -Untereinheit eines heterotrimeren G-Proteins (Regenfelder *et al.*, 1997; Krüger *et al.*, 1998), der Adenylatzyklase Uac1 (Gold *et al.*, 1994) und der regulatorischen und einer katalytischen Untereinheit der PKA, Ubc1 (Gold *et al.*, 1994) und Adr1 (Dürrenberger *et al.*, 1998). Dieses Signaltransduktions-Modul ist in filamentösen Pilzen evolutionär stark konserviert und an der Regulation von Entwicklungsprozessen beteiligt (Kronstad und Staben, 1997). Die Aktivierung des heterotrimeren G-Proteins führt zur Dissoziation der  $\alpha$ -Untereinheit Gpa3 von der  $\beta\gamma$ -Untereinheit und zur Aktivierung von Uac1. Die daraus resultierende Erhöhung der intrazellulären cAMP-Konzentration führt zur Dissoziation des Ubc1/Adr1-Komplexes, so dass Adr1 Zielproteine phosphorylieren kann (Gold *et al.*, 1997; Dürrenberger *et al.*, 1998). Das Signal, das über diese Kaskade übermittelt wird, ist nicht bekannt, es könnte sich dabei unter anderem um das Pheromonsignal handeln, nachdem ein erhöhter intrazellulärer cAMP-Spiegel zu einer transkriptionellen Induktion der Paarungstypgene führt (Krüger

---

<sup>7</sup> Da die Komponenten der MAP-Kinasekaskade in mehreren Ansätzen unabhängig voneinander gefunden wurden, existieren unterschiedliche Bezeichnungen der entsprechenden Gene. *kpp2* entspricht *ubc3*, *fuz7* entspricht *ubc5* und *kpp4* entspricht *ubc4* (Mayorga und Gold, 1998; 1999; Andrews *et al.*, 2000). Die in dieser Arbeit verwendeten Genbezeichnungen wurden von Müller *et al.* (1999 und P. Müller, pers. Mitteilung) übernommen, auch wenn es sich im Fall von *kpp2* und *kpp4* nicht um den in der jeweiligen Erstveröffentlichung verwendeten Namen handelt.

*et al.*, 1998). Diese Regulation ist abhängig von Prf1 und Mutationen in den potentiellen PKA-Phosphorylierungsstellen von Prf1 haben einen deutlichen Einfluss auf die Übertragung des cAMP-Signals und die Paarungskompetenz (M. Feldbrügge, pers. Mitteilung). Eine interessante Möglichkeit ist, dass durch unterschiedliche Phosphorylierung von Prf1 die Information von zwei Signalwegen, der MAP-Kinasekaskade und der cAMP-Kaskade integriert wird. Eine direkte Phosphorylierung von Prf1 konnte allerdings bislang nicht nachgewiesen werden.

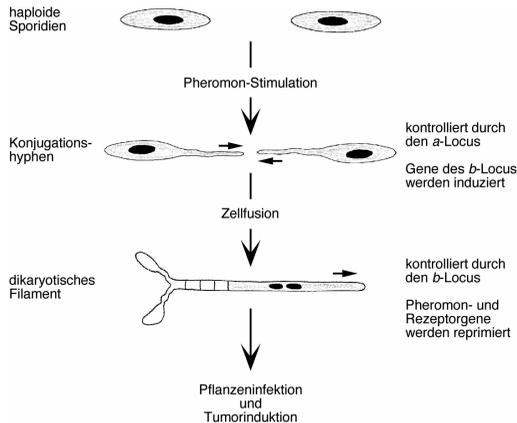
Alle Mutanten mit Deletionen in Komponenten der cAMP-Kaskade weisen Pathogenitätsdefekte auf (Gold *et al.*, 1994; 1997; Regenfelder *et al.*, 1997; Dürrenberger *et al.*, 1998). Demnach spielt diese Kaskade während der biotrophen Phase eine wichtige Rolle und könnte an der Übermittlung von Pflanzen- oder anderen Umweltsignalen beteiligt sein (Krüger *et al.*, 2000). Stämme, in denen die cAMP-Kaskade nicht aktiv ist (durch Deletion von *gpa3*, *uac1* oder *adr1*), zeigen filamentöses Wachstum, das im Fall der *gpa3*- und *uac1*-Deletionsmutanten durch externe Zugabe von cAMP aufgehoben werden kann (Gold *et al.*, 1994; Regenfelder *et al.*, 1997; Dürrenberger *et al.*, 1998). Eine Zugabe von cAMP zum Medium führt dagegen bei Wildtyp-Zellen zu Defekten in der Zytokinese (Gold *et al.*, 1994). Der gleiche Effekt tritt auch in Stämmen auf, in denen *ubc1* deletiert ist oder in denen das konstitutiv aktive Allel *gpa3*<sub>Q206L</sub> exprimiert wird (Gold *et al.*, 1994; Regenfelder *et al.*, 1997). In diesen Fällen sollte eine erhöhte Menge an freier und damit aktiver Adr1 in der Zelle vorliegen.

Interessanterweise sind alle bisher bekannten Komponenten der MAP-Kinasekaskade auch über einen genetischen Ansatz gefunden wurden, in dem nach Suppressormutationen gesucht wurde, die das filamentöse Wachstum von *uac1*-Deletionsmutanten unterdrücken (Mayorga und Gold, 1998; 1999; Andrews *et al.*, 2000). Diese antagonistische Rolle der MAP-Kinase- und der cAMP-Kaskade bei der Regulation der Zellmorphologie unterscheidet sich von der oben beschriebenen synergistischen Funktion bei der transkriptionellen Regulation der Paarungstypene. Es sind bisher keine Gene bekannt, die von den beiden Kaskaden in entgegengesetzter Weise reguliert werden. Unklar ist auch, in welchen Entwicklungsstadien dieser Antagonismus eine Rolle spielt, und ob Prf1 in diesen Fällen an der Signalübermittlung beteiligt ist.

## 1.5 Die frühe Infektionsphase von *U. maydis*

Im Vergleich zu anderen pathogenen Pilzen bietet *U. maydis* den großen Vorteil, dass mit dem bW/bE-Heterodimer der zentrale Regulator sowohl des Morphologiewechsels als auch der pathogenen Entwicklung bekannt ist. Die *bW*- und *bE*-Gene werden schon während der Pheromonantwort und Ausbildung der Konjugationshyphen transkriptionell induziert (Urban *et al.*, 1996b). Erst nach Zellfusion kommt es jedoch zur Heterodimerisierung der bW- und

bE-Proteine, die Pheromon- und Rezeptorgene werden reprimiert und das dikaryotische Filament ausgebildet (Abbildung 4).



**Abbildung 4: Die Prozesse während der frühen Infektionsphase in *U. maydis*.**

Diese Prozesse, die im natürlichen Lebenszyklus von *U. maydis* auf der Pflanzenoberfläche stattfinden und Voraussetzung für die erfolgreiche Infektion der Maispflanzen und die Tumorinduktion sind, werden als frühe Infektionsphase bezeichnet. Damit umfasst diese Phase gleichzeitig die auf künstlichen Medien untersuchbaren Prozesse. Die daran beteiligten Signaltransduktions- und Regulationsprozesse sind bei einer ganzen Reihe von pathogenen Pilzen evolutionär konserviert (Kronstad und Staben, 1997). Über die Prozesse und Gene, die durch die b-Proteine reguliert werden, ist allerdings nur wenig bekannt.

Mit verschiedenen revers genetischen Ansätzen auf mRNA- und Proteinebene konnten bisher neben *lga2* fünf weitere Gene identifiziert werden, die nach Bildung des bW/bE-Heterodimers induziert werden. Dabei handelt es sich um das Endonukleasegen *egl1* (Schauwecker *et al.*, 1995), das Repellentgen *rep1* (Wösten *et al.*, 1996), das Hydrophobingen *hum2* (Bohlmann *et al.*, 1994; Bohlmann, 1996) und zwei Gene für Proteine mit unbekannter Funktion, *dik1* und *dik6* (Bohlmann *et al.*, 1994; Bohlmann, 1996). Einzeldelation dieser Gene führt in keinem Fall zu einem Verlust der Kreuzungskompetenz oder der Pathogenität, so dass nicht bekannt ist, welche Rolle diese Gene während der Entwicklung besitzen (Schauwecker *et al.*, 1995; Bohlmann, 1996; Wösten *et al.*, 1996). Nur im Fall von *Rep1* kann in den Mutanten ein Defekt in der Ausbildung von Lufthyphen beobachtet werden, der jedoch keine Auswirkung auf die Pathogenität hat (Wösten *et al.*, 1996). Damit ist es mit diesen Ansätzen nicht gelungen, Gene zu isolieren, die eine zentrale Rolle bei der pathogenen Entwicklung spielen. Die bislang identifizierten Gene sind wahrscheinlich mit Ausnahme von *lga2* und *dik6* eher indirekt durch das bW/bE-Heterodimer reguliert. Vermutlich liegt hier eine Regula-

tionskaskade vor, bei der die b-abhängige Aktivierung oder Repression einiger zentraler Faktoren indirekt die Regulation einer ganzen Reihe von Genen zur Folge hat.

Wie in Abbildung 4 gezeigt, sind Pheromon-Stimulation und Zellfusion Voraussetzung für b-abhängige Dikaryenbildung. Diese Prozesse laufen bei Kreuzungsansätzen mit kompatiblen haploiden Sporidien auf aktivkohlehaltigen Festmedien nicht synchron und in allen Zellen ab, so dass zum Zeitpunkt der Ausbildung weißer Lufthyphen ein Gemisch aus hefeartig wachsenden haploiden Zellen, pheromonstimulierten Zellen mit Konjugationshyphen und dikaryotischen Filamenten vorliegt. Dadurch war bei den bisherigen Ansätzen z. B. keine Identifikation reprimierter oder nur kurz nach Bildung des b-Komplexes induzierter Gene möglich. Eine Alternative bietet hier die Verwendung diploider Stämme, die durch eine erzwungene Zellfusion von Auxotrophiemutanten erzeugt werden können (Banuett und Herskowitz, 1989). Der Stamm FDB11 (*ala2 b1b2*) entspricht dabei bei Wachstum auf aktivkohlehaltigen Festmedien in Bezug auf die Zellmorphologie und die Genexpression einem dikaryotischen Filament, der Stamm FBD12-3 (*ala2 b1b1*) pheromoninduzierten Zellen. Bei einem Vergleich dieser beiden Stämme könnten zwar b-reprimierte, aber keine transient regulierten Gene identifiziert werden. Zudem weisen die zu vergleichenden Zellen unterschiedliche Morphologien auf, weshalb wahrscheinlich ein Großteil der differentiell exprimierten Gene morphologiespezifisch reguliert sein dürfte.

Ein weiteres Problem besteht in der Sensitivität der bislang verwendeten Ansätze. Alle gefundenen Gene weisen ein relativ hohes Expressionsniveau auf. Für die Identifikation differentiell exprimierter Gene, die ein geringes Expressionsniveau besitzen, wäre eine Überexpression der Gene des *b*-Locus eventuell von Vorteil. Gerade bei solchen nur schwach exprimierten Genen könnte es sich um zentrale Regulatoren der pathogenen Entwicklung handeln.

## 1.6 Fragestellung dieser Arbeit

Das Ziel dieser Arbeit war die Isolierung b-regulierter Gene, die eine Rolle während der frühen Infektionsphase von *U. maydis* spielen. Dazu sollte ein induzierbares Promotorsystem etabliert werden, mit dem eine kontrollierte (Über-)Expression der Gene des *b*-Locus in haploiden Stämmen möglich ist. Es war bereits der durch Kohlenstoffquellen regulierte Promotor der Arabinase *crg1* (Bottin *et al.*, 1996) bekannt, die Beschreibung des durch Stickstoffquellen regulierten Nitratreduktasegens *nar1* (Banks *et al.*, 1993) bot eine zweite Möglichkeit für die Etablierung eines solchen Systems. Ein entsprechendes Expressionsystem sollte zur Identifizierung differentiell exprimierter Gene verwendet werden. Dabei lag der Schwerpunkt auf Genen, deren Expressionsmuster sich zu einem frühen Zeitpunkt nach der induzierten Expression kompatibler b-Proteine verändert und die im idealen Fall direkte Zielgene des bW/bE-Heterodimers darstellen. Als Detektionssystem sollte eine Variante der Technik des "Differential Display" (Liang und Pardee, 1992; 1998) etabliert werden, die eine

Isolierung auch schwach exprimierter Gene ermöglicht<sup>8</sup>. Von den identifizierten und hinsichtlich der differentiellen Regulation durch den b-Komplex bestätigten Genen sollten die interessantesten Kandidaten in Bezug auf ihre Rolle während der pathogenen Entwicklung untersucht werden.

---

<sup>8</sup> Die verwandten Techniken des Differential Displays (Liang und Pardee, 1992) und des RNA-Fingerprints (Welsh *et al.*, 1992) haben sich in den letzten Jahren zu Standardmethoden bei der Identifizierung differentiell exprimierter Gene entwickelt (Matz und Lukyanov, 1998). Die Vorteile dieser Methoden, im Vergleich zu den früher angewandten der subtraktiven oder differentiellen Hybridisierung (Sargent, 1987), liegen in der Möglichkeit, mehrere verschiedene mRNA-Populationen gleichzeitig miteinander zu vergleichen, in der relativ geringen Menge an benötigtem Ausgangsmaterial, in der vergleichsweise einfachen Durchführung und darin, dass der PCR-Amplifikationsschritt theoretisch eine Isolierung auch sehr schwach exprimierter Gene ermöglichen sollte. Außerdem liegt ein wichtiger Vorzug in der Möglichkeit der Identifizierung relativer Expressionsunterschiede (Liang und Pardee, 1995; McClelland *et al.*, 1995). Damit erschien diese Technik als am geeignetsten für die Isolierung b-regulierter Gene. Die Methoden der SAGE ("Serial Analysis of Gene Expression"; Velculescu *et al.*, 1995; Bertelsen und Velculescu, 1998) und der RDA ("Representational Difference Analysis"; Lisitsyn und Wigler, 1993; Hubank und Schatz, 1994) erschienen dagegen weniger geeignet: SAGE ist mit einem relativ großen Aufwand verbunden und bei der RDA können nur wenige Unterschiede gleichzeitig identifiziert, nur zwei mRNA-Populationen miteinander verglichen und nicht gleichzeitig induzierte und reprimierte Gene isoliert werden.

## 2. Ergebnisse

### 2.1 Isolierung b-regulierter Gene durch RNA-Fingerprint

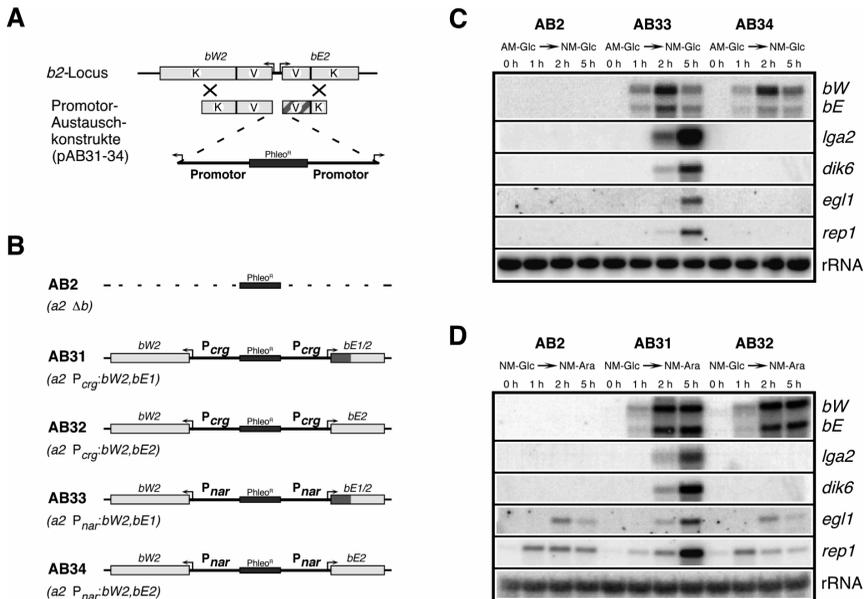
#### 2.1.1 Regulierte Expression der Gene des *b*-Locus

Zur Identifikation und Analyse *b*-regulierter Gene in *U. maydis* wurden Derivate des haploiden Stammes FB2 (*a2 b2*) hergestellt, in denen eine kontrollierte Expression der Gene des *b*-Locus möglich ist. Dazu wurden eine Reihe von Vorversuchen durchgeführt, die zur Etablierung der induzierbaren Promotoren des Nitratreduktasegens *nar1* und des Arabinasegens *crg1* und zur Eingrenzung der essentiellen Promotorelemente führten. Diese Experimente sind im Anhang in den Abschnitten 6.1 bis 6.3 beschrieben. Zur Erzeugung der regulierbaren Stämme wurde die intergenische Promotorregion zwischen *bW2* und *bE2* im *b*-Locus durch Promotorkassetten ersetzt, die entweder zwei divergent orientierte *crg1*- oder *nar1*-Promotoren besitzen. Zwischen den beiden Promotoren befindet sich jeweils eine Phleomycin-Resistenzkassette (Abbildung 5A). Die entsprechenden Plasmidkonstrukte für die homologe Rekombination (pAB31 bis pAB34) enthalten zusätzlich die 5'-Bereiche von entweder *bW2* und *bE2* oder *bW2* und *bE1* (Details siehe Abschnitt 4.1.4). Nach homologer Integration ergab das zwei Paare von Stämmen, in denen sich *bW2* und *bE2* bzw. *bW2* und *bE1* unter Kontrolle des *crg1*- bzw. *nar1*-Promotors befinden und somit kontrolliert exprimiert werden können (AB31 bis AB34, Abbildung 5B). Als zusätzliche Kontrolle wurde der Stamm AB2 erzeugt, ein FB2-Derivat, in dem der gesamte *b*-Locus deletiert und durch eine Phleomycin-Resistenzkassette ersetzt ist (Abbildung 5B).

Um die Funktionalität der erzeugten regulierbaren *b*-Loci zu bestimmen, wurde in Northern-Analysen die Expression von *bW* und *bE* und vier bekannten *b*-regulierten Genen, *lga2* (Urban *et al.*, 1996b; Romeis *et al.*, 2000), *dik6* (Bohlmann *et al.*, 1994), *egl1* (Schauwecker *et al.*, 1995) und *rep1* (Wösten *et al.*, 1996) untersucht. Dazu wurden die Stämme AB2 (*a2 Δb*), AB33 (*a2 P<sub>nar</sub>:bW2,bE1*) und AB34 (*a2 P<sub>nar</sub>:bW2,bE2*) in Minimalmedium mit  $\text{NH}_4^+$  als einziger Stickstoff- und Glucose als einziger Kohlenstoffquelle (AM-Glc) bis  $\text{OD}_{600} \approx 0,5$  angezogen und anschließend in das gleiche Medium, allerdings mit  $\text{NO}_3^-$  statt  $\text{NH}_4^+$  als Stickstoffquelle (NM-Glc) überführt. Vor und eine, zwei und fünf Stunden nach Induktion wurden Zellaliquots entnommen und die Expression analysiert (Abbildung 5C).

Dabei zeigte sich, dass sowohl *bW*- als auch *bE*-Transkripte schon eine Stunde nach Induktion detektierbar waren, unter reprimierenden Bedingungen dagegen nicht (Abbildung 5C). Die Expressionsstärke erreicht etwa zwei Stunden nach Induktion ein Maximum und geht da-

nach auf etwa ein Drittel zurück; auf diesem Niveau bleibt die Expression auch bei längerer Inkubation (nicht gezeigt). Für die vier untersuchten b-regulierten Gene können Transkripte nur im Stamm AB33 ( $a2 P_{nar};bW2,bE1$ ) nachgewiesen werden (Abbildung 5C). Während die direkt b-regulierten Gene *Iga2* (Romeis *et al.*, 2000) und *dik6* (G. Weinzierl, pers. Mitteilung) bereits zwei Stunden nach Induktion exprimiert sind, werden die vermutlich indirekt durch b regulierten Gene *egl1* und *rep1* erst später induziert (Abbildung 5C). Im Stamm AB2 ( $a2 \Delta b$ ) kann wie erwartet keines der Transkripte nachgewiesen werden (Abbildung 5C).

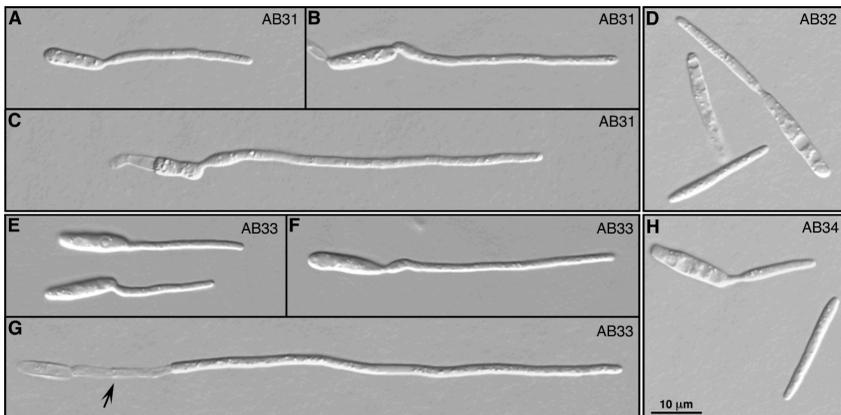


**Abbildung 5: Regulierte Expression der Gene des b-Locus in *U. maydis*.** A) Schematische Darstellung des *b2*-Locus in Stamm FB2 ( $a2 b2$ ) und der Promotor austausch-Konstrukte pAB31 bis pAB34. Verwendete Abkürzungen: K, konstanter Bereich von *bW2* bzw. *bE2* oder *bE1*; V, variabler Bereich von *bW2* bzw. *bE2* oder *bE1*. B) Schematische Darstellung der modifizierten *b*-Loci in den Transformanten AB2, AB31, AB32, AB33 und AB34. Die Stämme AB31 und AB33 enthalten Genfusionen aus dem variablen Bereich von *bE1* und dem konstanten Bereich von *bE2*; genetisch verhalten sich diese wie *bE1*. Schematische Darstellungen sind nicht maßstabsgetreu. C) Northern-Analyse der Stämme AB2, AB33 und AB34. Kultivierung siehe Text; zu den angegebenen Zeitpunkten wurden Aliquots entnommen. Pro Spur wurde etwa 10  $\mu$ g RNA geladen. D) Northern-Analyse der Stämme AB2, AB31 und AB32. Kultivierung siehe Text; zu den angegebenen Zeitpunkten wurden Aliquots entnommen. Pro Spur wurde etwa 9  $\mu$ g RNA geladen. Als Ladungskontrolle in C) und D) wurden Hybridisierungen mit einer für 18S rRNA spezifischen Sonde durchgeführt (siehe Abschnitt 6.16).

Ähnliche Ergebnisse zeigen sich bei der Northern-Analyse mit den Stämmen AB31 ( $a2 P_{crg};bW2,bE1$ ) und AB32 ( $a2 P_{crg};bW2,bE2$ ) (Abbildung 5D). Für diesen Versuch wurden die Stämme in Minimalmedium mit  $NO_3^-$  als einziger Stickstoff- und Glucose als einziger Kohlenstoffquelle (NM-Glc) bis  $OD_{600} \approx 0,5$  angezogen und anschließend in das gleiche Medium, allerdings mit Arabinose statt Glucose als Kohlenstoffquelle (NM-Ara) überführt. In Ver-

gleich zum Versuch mit dem regulierbaren *nar1*-Promotor fallen jedoch einige Unterschiede auf. Sowohl bei AB31 als auch bei AB32 ist auch unter reprimierenden Bedingungen ein schwaches *bW*- und *bE*-Signal erkennbar (Abbildung 5D). Obwohl die Expressionsstärke für die Induktion der vier untersuchten *b*-regulierten Gene nicht ausreicht, könnte dies bei anderen *b*-regulierten Genen der Fall sein. Zusätzlich zeigen *egl1* und *rep1* eine basale Expression in arabinosehaltigem Medium (Abbildung 5D).

Parallel zu den Northern-Analysen wurden die Stämme unter den gleichen Bedingungen auch lichtmikroskopisch untersucht. Unter reprimierenden Bedingungen waren dabei keine morphologischen Unterschiede zwischen den Stämmen FB2 (*a2 b2*), AB2 (*a2 Δb*), AB31 (*a2 P<sub>erg</sub>:bW2,bE1*), AB32 (*a2 P<sub>erg</sub>:bW2,bE2*), AB33 (*a2 P<sub>nar</sub>:bW2,bE1*) und AB34 (*a2 P<sub>nar</sub>:bW2,bE2*) zu erkennen (nicht gezeigt). Etwa zwei Stunden nach Induktion der *b*-Genexpression konnte in den Stämmen AB31 und AB33 die beginnende Ausbildung filamentöser Strukturen beobachtet werden (nicht gezeigt). Nach etwa fünf Stunden Induktion zeigten mehr als 90% aller Zellen der Stämme AB31 und AB33 deutliche Filamente (Abbildung 6A bis C und E bis G). In den Kontrollstämmen zeigten sich keine morphologischen Veränderungen (Abbildung 6D und H).



**Abbildung 6: Filamentbildung nach induzierter *b*-Genexpression.** Im Fall von AB31 (*a2 P<sub>erg</sub>:bW2, bE1*) und AB32 (*a2 P<sub>erg</sub>:bW2,bE2*) wurden die Zellen in NM-Glc bis zu  $OD_{600} \approx 0,5$  kultiviert und anschließend für 5 h in AM-Ara induziert. Im Fall von AB33 (*a2 P<sub>nar</sub>:bW2,bE1*) und AB34 (*a2 P<sub>nar</sub>:bW2, bE2*) wurden die Zellen in AM-Glc bis zu  $OD_{600} \approx 0,5$  kultiviert und anschließend für 5 h in NM-Glc induziert. Es sind charakteristische Einzelzellen der jeweiligen Kulturen gezeigt. Der Pfeil in G) markiert einen leeren Hyphenabschnitt. Die Analyse erfolgte mittels DIC-Mikroskopie an einem Axiophot (ZEISS). Der Längenmaßstab bezieht sich auf alle Abbildungen.

Bei den gebildeten Filamenten besitzt der mit Zytoplasma gefüllte Bereich eine Länge von maximal 100  $\mu\text{m}$  (Abbildung 6G), und bleibt auch bei längerer Inkubation stets uninukleär

(nicht gezeigt und Z. Szabó, pers. Mitteilung). Die Filamente wachsen unter Abschnürung leerer Abschnitte unipolar weiter (Abbildung 6C und G) und können auf geeigneten Festmedien eine Länge von über einem Zentimeter erreichen (nicht gezeigt). Diese Merkmale sind charakteristisch für dikaryotische Filamente nach Fusion haploider Zellen (Banuett und Herskowitz, 1994b; Lehmler *et al.*, 1997; Steinberg *et al.*, 1998).

Die Ergebnisse hinsichtlich der Genexpression, der morphologischen Veränderungen und des b-induzierten Zellzyklus-Arrests entsprechen denen, die nach Fusion kompatibler haploider Zellen beobachtet werden. Beide Systeme sind daher geeignet, kontrollierte Expression der Gene des *b*-Locus zu vermitteln. Da bei Verwendung des *nar1*-Promotors keine *bW*- und *bE*-Transkripte unter reprimierenden Bedingungen detektierbar sind, erscheinen die Stämme AB33 (*a2 P<sub>nar</sub>:bW2,bE1*) und AB34 (*a2 P<sub>nar</sub>:bW2,bE2*) für die Suche nach b-regulierten Genen besser geeignet.

### 2.1.2 Nichtradioaktives RNA-Fingerprint zur Isolierung b-regulierter Gene

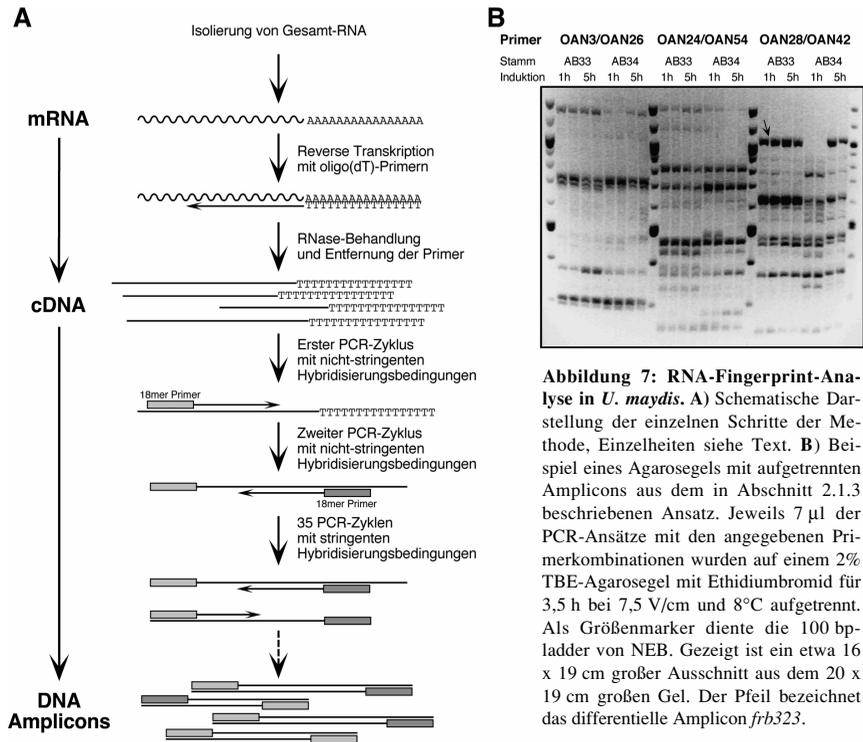
Zur Isolierung b-regulierter Gene wurde die Technik des RNA-Fingerprint (Welsh *et al.*, 1992) angewandt, eine Variante der bekannteren Methode des Differential Display (Liang und Pardee, 1992) zur Identifikation differentiell exprimierter Gene. Dabei wurde das Protokoll von Friedel *et al.* (Friedel *et al.*, 1997) modifiziert und in Bezug auf den GC-Gehalt des Genoms und der Komplexität des Transkriptomts den Bedingungen in *U. maydis* angepasst (siehe unten und Abschnitt 4.4). Die einzelnen Schritte sind in Abbildung 7A schematisch dargestellt. Ausgehend von Gesamt-RNA der zu vergleichenden Stämme oder Bedingungen wird zuerst eine reverse Transkription mit dT-Oligonukleotiden durchgeführt. Die nach RNaseA-Behandlung und Entfernung der dT-Oligonukleotide erhaltenen cDNA-Populationen werden in PCR-Ansätze mit jeweils 2 Oligonukleotiden eingesetzt. Die dazu verwendeten Oligonukleotide sind 18 Nukleotide lang und weisen einen GC-Gehalt von 61,1% (11 GC und 7 AT) auf, was in etwa dem angenommenen GC-Gehalt des *U. maydis*-Genoms von 62%<sup>9</sup> (Leaper *et al.*, 1980; Schildkraut *et al.*, 1962) entspricht. Die Sequenz ist willkürlich und in der Regel wurden bereits vorhandene Oligonukleotide aus anderen Versuchen benutzt. Die stringente Hybridisierungstemperatur dieser Oligonukleotide liegt bei etwa 65°C. Zunächst werden zwei PCR-Zyklen mit einer niedrigeren Hybridisierungstemperatur (50°C) durchgeführt, so dass eine Hybridisierung der Oligonukleotide auch an nicht vollständig komplementäre DNA-Sequenzen in den cDNA-Molekülen möglich ist. Darauf folgen 35 Zyklen mit stringenten Hybridisierungsbedingungen (65°C), in denen die erzeugten Amplicons vervielfältigt werden.

Der wichtigste Unterschied zu dem von Friedel *et al.* (Friedel *et al.*, 1997) veröffentlichten Protokoll besteht in veränderten Oligonukleotid- und Nukleotidkonzentrationen. Dadurch ent-

---

<sup>9</sup> Die Ende 2000 abgeschlossene Sequenzierung von 86% des *U. maydis*-Genoms ergab einen von diesem Wert abweichenden GC-Gehalt von etwa 54% (J. Kämper und R. Kahmann, pers. Mitteilung).

stehen so große Mengen an Amplifikaten, dass diese direkt auf normalen Agarosegelen aufgetrennt und durch Färbung mit Ethidiumbromid sichtbar gemacht werden können. Dies hat mehrere Vorteile: weder Polyacrylamid-Gele noch Radionukleotide werden benötigt und die erhaltenen Amplicons können direkt aus den Gelen ausgeschnitten und kloniert werden. Eine Reamplifikation, die zu einer Anreicherung falsch positiver Kandidaten führen kann (Callard *et al.*, 1994), ist nicht notwendig.



**Abbildung 7: RNA-Fingerprint-Analyse in *U. maydis*.** **A**) Schematische Darstellung der einzelnen Schritte der Methode, Einzelheiten siehe Text. **B**) Beispiel eines Agarosegels mit aufgetrennten Amplicons aus dem in Abschnitt 2.1.3 beschriebenen Ansatz. Jeweils 7  $\mu$ l der PCR-Ansätze mit den angegebenen Primerkombinationen wurden auf einem 2% TBE-Agarosegel mit Ethidiumbromid für 3,5 h bei 7,5 V/cm und 8°C aufgetrennt. Als Größenmarker diente die 100 bp-ladder von NEB. Gezeigt ist ein etwa 16 x 19 cm großer Ausschnitt aus dem 20 x 19 cm großen Gel. Der Pfeil bezeichnet das differentielle Amplicon *frb323*.

Die nicht-stringente Hybridisierungstemperatur während der ersten beiden PCR-Zyklen wurde mit 50°C so gewählt, dass je nach verwendeten Oligonukleotidpaaren zwischen 5 und 30, im Mittel ca. 20 verschiedene Amplicons detektierbar sind. Die Elongationszeit von einer Minute in den darauf folgenden 35 stringenten PCR-Zyklen führt zu einer bevorzugten Amplifikation von Amplicons einer Größe zwischen 150 und 1.200 bp. In Abbildung 7B ist ein Agarosegel aus dem in Abschnitt 2.1.3 beschriebenen Ansatz gezeigt. Durch die Modifikationen der Methode ist erstmals eine RNA-Fingerprint-Analyse mit verhältnismäßig hohem Durchsatz möglich.

### 2.1.3 RNA-Fingerprint-Ansatz zur Isolierung b-regulierter Gene

Nach den in einem Testansatz gewonnenen Erkenntnissen (siehe Abschnitte 6.4 bis 6.6) wurden in dem RNA-Fingerprint-Ansatz zur Isolierung b-regulierter Gene die Stämme AB33 ( $a2 P_{nar}:bW2,bE1$ ) und AB34 ( $a2 P_{nar}:bW2,bE2$ ) verwendet. Die Induktion der b-Genexpression erfolgte durch Wechsel von Wachstum in AM- zu NM-Flüssigmedium für eine und fünf Stunden (siehe Abschnitt 2.1.1) und jeweils in zwei unabhängigen Parallelen, so dass jeder PCR-Ansatz acht cDNA-Populationen umfasste. Insgesamt wurden 412 PCR-Ansätze mit Kombinationen aus 131 verschiedenen Oligonukleotiden durchgeführt und analysiert, wodurch über 8.000 Amplicons entstanden. Unter der Annahme, dass alle Oligonukleotide unter den angewandten Bedingungen mit der gleichen Wahrscheinlichkeit mit cDNA-Molekülen hybridisieren können, entsteht die eine Hälfte der Amplicons durch Amplifikation mit zwei unterschiedlichen Oligonukleotiden und die andere Hälfte durch Amplifikation mit dem gleichen Oligonukleotid an beiden Enden. Bei mehrmaliger Verwendung des gleichen Oligonukleotids entstehen dabei zum Teil die gleichen Amplicons. Diese Zahl muss bei der Bestimmung der Anzahl an erhaltenen unterschiedlichen Amplicons abgezogen werden. Im vorliegenden Fall bedeutet das, dass von den erzeugten 8.000 Amplicons etwa 4.500 verschieden sein dürften<sup>10</sup>. Diese große Anzahl an Amplicons erlaubt statistische Aussagen über die Anzahl der durch das bW/bE-Heterodimer regulierten Gene (siehe Diskussion).

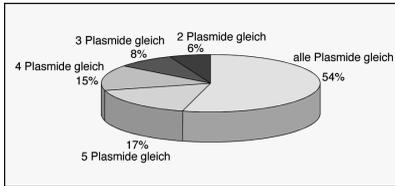
Beim Vergleich zwischen AB33 und AB34 zum Zeitpunkt eine Stunde nach Induktion erschienen 100 Amplicons (1,3%) b-induziert und 9 Amplicons (0,1%) b-reprimiert. Nach fünfständiger Induktion konnten 238 (3,0%) potentiell b-induzierte und 79 (1,0%) potentiell b-reprimierte Amplicons detektiert werden. Dabei war bei 31 b-induzierten Amplicons (0,4%) nur nach einer Stunde, nicht aber nach fünf Stunden ein Signal erkennbar, die entsprechenden Gene könnten also eventuell nur transient induziert sein. Alle Amplicons, die nach einer Stunde b-reprimiert erschienen, waren auch nach fünf Stunden b-reprimiert, d. h. eine transiente Repression war nicht zu erkennen. Insgesamt wurden so 348 Amplicons potentiell b-regulierter Gene identifiziert und aus den entsprechenden Agarosegelen extrahiert.

Für eine weitere Analyse wurden von diesen 48 Amplicons ausgewählt, die ein sehr deutlich differentielles Erscheinungsmuster zeigten, und diese in den Vektor pCR-Topo 2.1 (Invitrogen) kloniert. Dabei handelte es sich um 20 früh- und 28 spätregulierte Amplicons, so dass die interessantere Klasse der frühregulierten Gene leicht überrepräsentiert war<sup>11</sup>. Pro Amplicon wurden jeweils sechs Klone mittels Restriktionsanalyse untersucht (siehe Abschnitt 4.4).

---

<sup>10</sup> Im Mittel entstehen pro Ansatz zehn Amplicons mit zwei verschiedenen Oligonukleotiden, fünf mit dem einen und fünf mit dem anderen Oligonukleotid auf beiden Seiten. Bei 412 Ansätzen mit 131 Oligonukleotiden ergibt das  $(412 \times 10) + (131 \times 5) = 4.775$  verschiedene Amplicons, 3.645 Amplicons  $(412 \times 5 + 281 \times 5)$  wären redundant.

<sup>11</sup> "Frühreguliert" bedeutet hier, dass schon eine Stunde nach Induktion ein Unterschied in der Signalstärke erkennbar ist, "spätreguliert", dass der Unterschied erst fünf Stunden nach Induktion zu beobachten ist. Insgesamt wurden 109 (31%) frühregulierte und 239 (69%) spätregulierte Amplicons identifiziert.



**Abbildung 8: Klonfrequenzen der isolierten Plasmide aus dem RNA-Fingerprint-Ansatz.** Angegeben ist die prozentuale Häufigkeit der einzelnen Klassen, Einzelheiten siehe Text.

Dabei zeigte sich, dass in 26 Fällen alle sechs Klone das gleiche Amplicon beinhalten, in 8 Fällen waren fünf der Plasmide gleich und in 7 Fällen vier der Plasmide. In den übrigen 7 Fällen waren jeweils nur drei oder zwei Plasmide gleich (Abbildung 8). Es scheint also, dass sich in fast der Hälfte der Fälle mehrere Amplicons an der gleichen Position im Gel befunden haben<sup>12</sup>. Durch die Möglichkeit der direkten Klonierung bei der verwendeten Methode des

nicht-radioaktiven RNA-Fingerprints kann jedoch mit einiger Sicherheit davon ausgegangen werden, dass zumindest in den 41 Fällen (86%), in denen mehr als die Hälfte der untersuchten Plasmide das gleiche Insert enthält, auch wirklich das extrahierte Amplicon kloniert wurde. Dies sollte die Anzahl falsch positiver Klone deutlich reduzieren.

### 2.1.4 Sequenzanalyse der ausgewählten Amplicons

Die Sequenzanalyse der 48 Amplicons ergab, dass einige Amplicons mehrfach kloniert worden waren, bzw. den gleichen Genen zugeordnet werden können (Tabelle 1; eine vollständige Liste der Sequenzähnlichkeiten aller analysierten Amplicons befindet sich in Abschnitt 6.11). So entsprachen drei Klone b-reprimierter Amplicons *bE2*, zehn b-induzierte Klone *rep1* und drei weitere Klone lagen doppelt vor. Damit blieben 34 unterschiedliche Klone übrig.

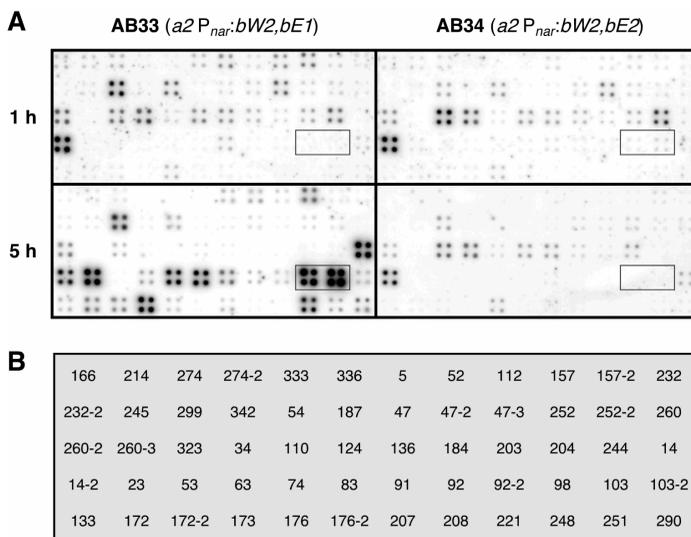
Die Isolierung von *bE2* stellt eine Art Positivkontrolle dar, da nur der Stamm AB34 (*a2 P<sub>nar</sub>:bW2,bE2*), nicht aber AB33 (*a2 P<sub>nar</sub>:bW2,bE1*) *bE2* enthält. Auch das Auftreten des stark b-induzierten Gens *rep1* unter den Amplicons bestätigt das Funktionieren des Ansatzes. Ausserdem wurden mit *excl1* (*frb133*<sup>13</sup>) und *pdi1* (*frb23*<sup>13</sup>) zwei Gene gefunden, deren Regulation in Abhängigkeit von b schon im Testansatz (siehe Abschnitt 6.4) gezeigt werden konnte. Von den übrigen 30 Klonen weisen die Mehrzahl (20) entweder keine Ähnlichkeiten zu bekannten Proteinen oder nur Ähnlichkeiten zu Proteinen mit unbekannter Funktion auf, so dass keine Rückschlüsse auf eine mögliche Rolle getroffen werden konnten. Die Ähnlichkeiten der anderen 10 Klone zu z. B. einer GMP-Synthase aus *S. cerevisiae* oder einem ATP-bindenden Protein, ebenfalls aus *S. cerevisiae*, ließen dies allerdings auf den ersten Blick auch nicht zu (siehe Abschnitt 6.11). Daher wurde zunächst eine Expressionsanalyse der zu den Amplicons gehörenden Gene durchgeführt. In Abschnitt 2.1.8 wird noch einmal genauer auf die Sequenzähnlichkeiten der bestätigten Amplicons b-regulierter Gene eingegangen.

<sup>12</sup> Dieses Kontaminationsproblem ist in vielen bisherigen Differential Display- bzw. RNA-Fingerprint-Ansätzen beschrieben worden (Welsh *et al.*, 1992; Bauer *et al.*, 1993; Callard *et al.*, 1994; Li *et al.*, 1994; Mou *et al.*, 1994; Wang und Feuerstein, 1995).

<sup>13</sup> Die zu den isolierten Amplicons gehörenden Gene wurden mit *frb* (Fingerprint-Analyse mit regulierbarem b) bezeichnet. Die Nummer bezieht sich auf die Reihenfolge der ursprünglichen Isolierung der Amplicons.

## 2.1.5 Expressionsanalyse mittels Dot-Blot-Hybridisierung

Zur schnellen Voranalyse der ausgewählten Klone diente die Technik der Dot-Blot-Hybridisierung. Dazu wurden die inserierten DNA-Fragmente durch PCR mit den jeweiligen im RNA-Fingerprint verwendeten Oligonukleotiden amplifiziert und etwa 15 ng Fragment in vier Parallelen mittels eines BioGrid Roboters (BioRobotics) auf geladene Nylonmembranen aufgebracht (Hauser *et al.*, 1998). Die Detektion der Expressionsstärke erfolgte nach Hybridisierung mit radioaktiven Sonden, die ausgehend von den zum RNA-Fingerprint verwendeten cDNA-Präparationen hergestellt wurden (Abbildung 9). Das Verfahren und die Vorgehensweise bei der Datenauswertung ist in Abschnitt 4.3.2 genauer beschrieben.



**Abbildung 9: Dot-Blot-Analyse ausgewählter Klone aus dem RNA-Fingerprint.** A) Gezeigt sind 12 x 5 cm große Ausschnitte der im Original 12 x 8 cm großen Membranen. Die sich zusätzlich auf den Membranen befindenden Kontrollen sind nicht gezeigt. Die Membranen wurden mit radioaktiv markierten cDNA-Sonden hybridisiert, die aus Gesamt-RNA der Stämme AB33 und AB34, jeweils eine und fünf Stunden nach Induktion isoliert worden war. Es handelt sich hier um die gleichen cDNA-Populationen, die auch im RNA-Fingerprint eingesetzt wurden. Einzelheiten zur Technik siehe Abschnitt 4.3.2. Die grauen Kästen zeigen als Beispiel die Position der Klone *frb98* und *frb103* an, wobei beide Amplicons aus dem ORF von *rep1* stammen. Sie weisen daher im Stamm AB33 nach fünfständiger Induktion starke, auf den übrigen Membranen dagegen nur schwache Hybridisierungssignale auf. B) Die Position der einzelnen *frb*-Klone auf den Membranen; für jeden Klon wurde die DNA in vier Parallelen aufgebracht.

Die Analyse ergab im Fall von 25 Amplicons einen deutlichen Signalunterschied, welcher der erwarteten Regulation entspricht (b-abhängige Induktion bei *frb14*, *frb23*, *frb52*, *frb63*, *frb74*, *frb83*, *frb91*, *frb98*, *frb103*, *frb133*, *frb157*, *frb172*, *frb172-2*, *frb173*, *frb248*, *frb251*, *frb290*

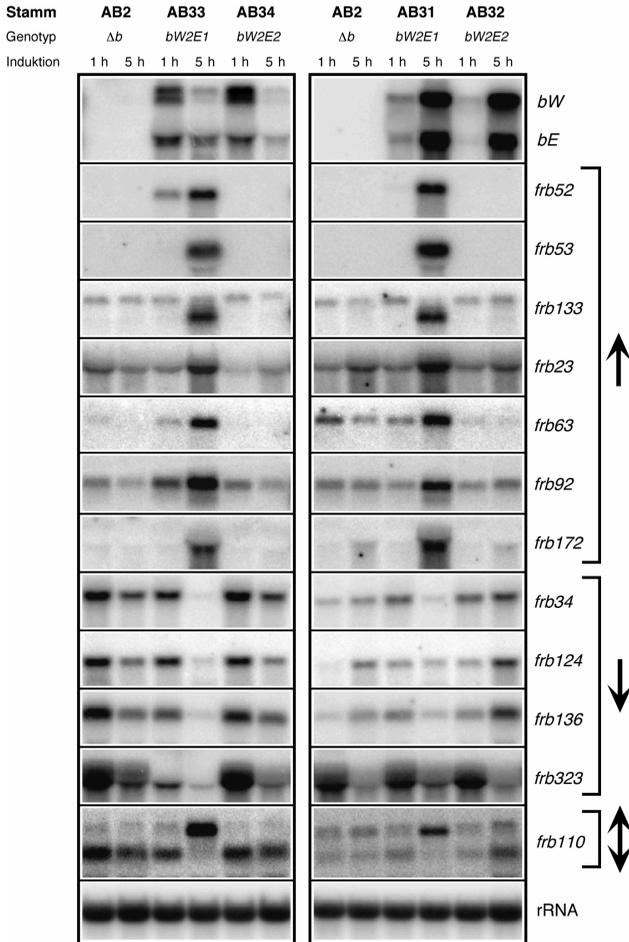
und *frb299*; b-abhängige Repression bei *frb34*, *frb124*, *frb136*, *frb184*, *frb203*, *frb204* und *frb323*). Insbesondere die b-abhängige Regulation von *rep1* konnte bei allen 10 Klonen beobachtet werden. In den übrigen Fällen waren entweder keine Unterschiede in der Signalstärke erkennbar oder die detektierten Signale waren so schwach, dass keine eindeutige Aussage getroffen werden konnte (siehe Diskussion). Bei den mit dieser Methode bestätigten Klonen handelt es sich vor allem um Amplicons, die nach fünfständiger b-Induktion aktiviert erscheinen.

### 2.1.6 Northern-Analyse der zu den Amplicons gehörenden Gene

Das unzureichende Auflösungsvermögen des Dot-Blot-Verfahrens machte eine Northern-Analyse der Kandidaten notwendig, die in der Dot-Blot-Analyse entweder keine oder nicht eindeutig differentielle Ergebnisse gezeigt hatten. Um Medieneffekte ausschließen und die Regulation durch das bW/bE-Heterodimer unabhängig bestätigen zu können, wurden dabei weitere Kontrollen durchgeführt: zum einen wurde die Genexpression auch im Stamm AB2 (*a2 Δb*) getestet und zum anderen erfolgte eine Analyse unter äquivalenten Bedingungen mit den Stämmen AB31 (*a2 P<sub>crs</sub>:bW2,bE1*) und AB32 (*a2 P<sub>crs</sub>:bW2,bE2*) (Abbildung 10). Dadurch konnten einige Klone eliminiert werden, deren Regulation entweder nicht b-abhängig war oder bei denen sich in nur einem der beiden Stammpaare (AB31 und AB32, bzw. AB33 und AB34) eine differentielle Expression des zugehörigen Gens zeigte. Insgesamt wurden so drei b-regulierte Gene identifiziert, die in der Dot-Blot-Analyse keine Unterschiede in der Signalstärke gezeigt hatten (*frb92*, *frb110* und *bE2*). Umgekehrt wiesen fünf der in der Dot-Blot-Analyse bestätigten Gene bei der Northern-Analyse keine eindeutige b-abhängige Regulation auf (*frb91*, *frb157*, *frb184*, *frb204* und *frb299*); der Grund hierfür ist ungeklärt. Bei den übrigen 20 positiven Klonen aus der Dot-Blot-Analyse zeigten die zugehörigen Gene auch in der Northern-Analyse das entsprechende Expressionsmuster. Insgesamt konnte durch die Northern-Analyse die Isolierung und Identifikation von sieben neuen b-induzierten und fünf neuen b-reprimierten Genen bestätigt werden (Abbildung 10). Eines der als b-reprimiert gefundenen Gene, *frb110*, zeigte dabei interessanterweise zwei unterschiedlich große Transkripte, von denen das kleinere negativ und das größere positiv durch b reguliert zu sein schien (Abbildung 10).

Bei genauerer Betrachtung der Expressionsmuster der gefundenen Gene kann eine weitere Klassifizierung vorgenommen werden: Von den sieben b-induzierten Genen zeigen drei (*frb52*, *frb53* und *frb133*) eine strikte Regulation durch das bW/bE-Heterodimer, d. h. in Abwesenheit aktiven Heterodimers ist kein Signal detektierbar (Abbildung 10). Im Fall von *frb52* tritt das b-induzierte Signal bereits eine Stunde nach Induktion auf, was deutlich früher ist als bei allen bisher bekannten und untersuchten b-regulierten Genen (vgl. Abbildung 5C und D). Bei *frb133* ist eine zweite konstitutive Bande zu erkennen, die vermutlich von einer Kreuzhybridisierung mit dem Transkript eines nahe verwandten Gens herrührt. Die übrigen

vier b-induzierten Gene (*frb23*, *frb63*, *frb92* und *frb172*) weisen dagegen ein gewisses basales Expressionsniveau auf, zeigen aber ein deutlich stärkeres Signal bei Anwesenheit des bW/bE-Heterodimers (Abbildung 10).



**Abbildung 10: Northern-Analyse der neu gefundenen differentiell regulierten Gene.** Für die linken sechs Spuren wurden die Stämme AB2 (*a2 Δb*), AB33 (*a2 P<sub>nar</sub>:bW2,bE1*) und AB34 (*a2 P<sub>nar</sub>:bW2,bE2*) in AM bis zu OD<sub>600</sub> ≈ 0,5 angezogen und für 1 bzw. 5 h in NM induziert. Für die rechten sechs Spuren wurden die Stämme AB2 (*a2 Δb*), AB31 (*a2 P<sub>erg</sub>:bW2,bE1*) und AB32 (*a2 P<sub>erg</sub>:bW2,bE2*) in NM-Glc bis zu OD<sub>600</sub> ≈ 0,5 angezogen und für 1 bzw. 5 h in NM-Ara induziert. Pro Spur wurde jeweils etwa 9 μg RNA aufgetragen. Zum Vergleich wurden die Filter mit einer *bW*- und *bE*-spezifischen Sonde hybridisiert.

Ähnlich kann bei zwei der b-reprimierten Gene (*frb136* und *frb323*) schon eine Stunde nach Induktion eine Abnahme des Signals festgestellt werden, bei den übrigen beiden (*frb34* und

*frb124*) dagegen erst nach fünf Stunden. Der Sonderfall von *frb110*, bei dem zwei unterschiedlich große und verschieden regulierte Transkripte auftauchen, ist schon oben erwähnt worden. Die differentielle Regulation beider Transkripte ist erst fünf Stunden nach Induktion eindeutig zu erkennen.

### 2.1.7 Regulation der *frb*-Gene unter Kreuzungsbedingungen

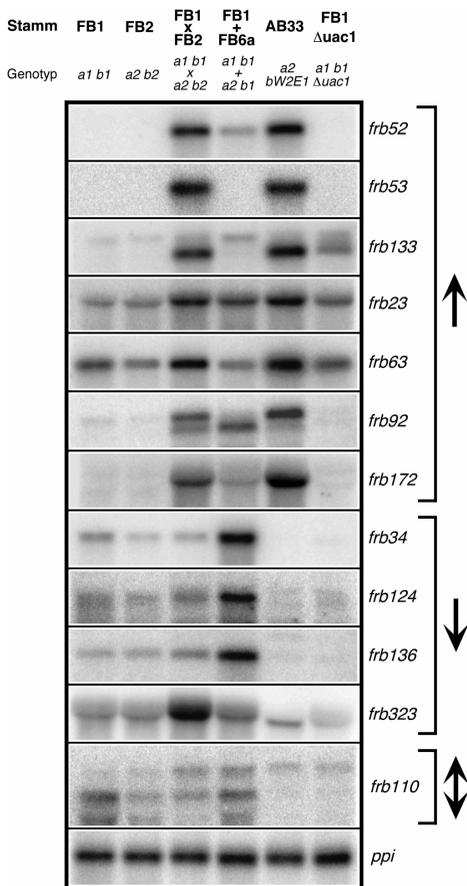
Die Stämme AB31 und AB33 zeigen zwar unter Induktionsbedingungen alle charakteristischen Merkmale eines Dikaryons nach Fusion kompatibler haploider Zellen (siehe Abschnitt 2.1.1), sind allerdings im Unterschied dazu haploid. Deshalb wurde durch eine Northern-Analyse getestet, ob die differentielle Expression der zwölf isolierten b-regulierten Gene auch unter Kreuzungsbedingungen vorliegt. Um zwischen regulatorischen Effekten unterscheiden zu können, die durch Pheromonstimulation einerseits und Bildung funktioneller bW/bE-Heterodimere nach erfolgter Fusion andererseits hervorgerufen werden, wurden weitere Kontrollstämme in die Analyse mit einbezogen. Eine Mischung von Zellen der Stämme FB1 (*al b1*) und FB6a (*a2 b1*), bei der sich die Zellen zwar gegenseitig stimulieren können, aber wegen des gleichen *b*-Locus nicht in der Lage sind, ein filamentöses Dikaryon auszubilden, dient dabei als Indikator für pheromonabhängige Regulation. Eine weitere Kontrolle, neben den haploiden Ausgangsstämmen FB1 (*al b1*) und FB2 (*a2 b2*), stellt der Stamm FB1 $\Delta$ uac1 dar. Dieser Stamm weist eine Deletion des Gens für Adenylatzyklase auf und wächst auch in Abwesenheit funktioneller bW/bE-Heterodimere filamentös (Gold *et al.*, 1994). Er dient damit zur Identifikation von Genen, die allgemein bei filamentösem Wachstum differentiell reguliert sind. Um Medieneffekte auszuschließen, wurden alle Stämme in CM-Flüssigmedium bis zu OD<sub>600</sub>  $\approx$  0,5 angezogen, in einer Dichte von etwa 0,1 OD<sub>600</sub>/cm<sup>2</sup> auf NM-Aktivkohleplatten ausgestrichen und 24 Stunden bei 29°C inkubiert. Im Fall von FB1 $\Delta$ uac1 wurde dem CM-Flüssigmedium 6 mM cAMP zugegeben, damit der filamentöse Phänotyp erst bei Wachstum auf der Aktivkohleplatte auftritt. Zum Zeitpunkt der Zellernte waren bei der Kreuzung FB1 x FB2, bei AB33 und bei FB1 $\Delta$ uac1 deutliche Filamentbildung und bei der Mischung FB1 + Fb6a die Ausbildung von Konjugationshyphen zu beobachten (nicht gezeigt).

Alle sieben b-induzierten Gene zeigen ein deutliches Signal nicht nur im Stamm AB33, sondern auch in der Kreuzung der Stämme FB1 (*al b1*) und FB2 (*a2 b2*). Bis auf *frb133* scheint die Expression keines der Gene durch die Deletion von *uac1* beeinflusst zu sein. Drei Gene dieser Gruppe (*frb52*, *frb23* und *frb92*) weisen ebenfalls pheromonabhängige Induktion auf. Besonders auffällig ist das Auftreten von zwei unterschiedlich großen Transkripten bei *frb92*. Das größere davon scheint b-induziert zu sein und das kleinere während Pheromonstimulation aufzutreten (Abbildung 11).

In der Gruppe der b-reprimierten Gene weisen *frb34*, *frb124* und *frb136* fast identische Expressionsprofile auf. Besonders interessant ist hier die Induktion unter Pheromon-Stimulationsbedingungen. Alle drei Gene weisen ein basales Transkriptionsniveau auf, aber weder in

Stamm AB33 noch in Stamm FB1Δuac1 sind Signale detektierbar (Abbildung 11). *frb323* zeigt neben der schon gezeigten Repression durch b eine induzierte Expression in der Kreuzung von FB1 mit FB2, die allerdings nicht durch Pheromonstimulation erklärt werden kann (Abbildung 11). Der Grund für diese Regulation ist nicht bekannt. Bei Hybridisierung mit einer Sonde, die das Amplicon von *frb110* umfasst, treten wieder zwei unterschiedliche Transkripte auf (Abbildung 11). Das untere davon scheint b-reprimiert zu sein und auch in FB1Δuac1 ist kein Signal erkennbar. Die Regulation des oberen Transkripts ist dagegen schwieriger zu erklären, da es sowohl unter Pheromonstimulation, als auch nach b-Induktion und in Stamm FB1Δuac1 auftritt (Abbildung 11).

Insgesamt zeigt diese Analyse, dass die b-abhängige Regulation der *frb*-Gene auch unter Kreuzungsbedingungen bestätigt werden kann. Außer *frb133* weist keines der b-induzierten Gene ein erhöhtes Expressionsniveau im b-unabhängigen Filament von FB1Δuac1 auf, es handelt sich daher um Gene, die nicht allgemein filamentabhängig induziert werden, sondern wahrscheinlich spezifisch für das b-abhängige Filament sind. Als besonders interessant wurden die Ergebnisse gewertet, die zeigen, dass die Expression der b-reprimierten Gene *frb34*, *frb124* und *frb136* pheromoninduziert ist und dass *frb92* zwei verschieden große und unterschiedlich regulierte Transkripte besitzt.



**Abbildung 11: Northern-Analyse der *frb*-Gene unter Kreuzungsbedingungen.** Kultivierungsbedingungen und weitere Einzelheiten siehe Text; in den Fällen von FB1 x FB2 und FB1 + FB6a wurden die Stämme getrennt angezogen und auf der NM-Aktivkohleplatte mit einer Dichte von 0,05 OD<sub>600</sub>/cm<sup>2</sup> pro Stamm gemischt. Auf die Spuren wurden jeweils etwa 10 µg RNA aufgetragen.

## 2.1.8 Zusammenfassung der Ergebnisse des RNA-Fingerprint-Ansatzes

Ausgehend von den Ergebnissen der Northern-Analyse (Abbildungen 10 und 11) und den Sequenzähnlichkeiten der bestätigten differentiell regulierten Gene (Tabelle 1) wurden die interessantesten Kandidaten für eine weitergehende Analyse ausgewählt (siehe unten).

**Tabelle 1: Sequenzähnlichkeiten der bestätigten b-regulierten Amplicons und Gene**

Amplicon (Gen)	Fragmentlänge (Genlänge)	Ähnlichkeit zu	Identität <sup>14</sup>	angenommene Funktion
<b>b-induziert</b>				
<i>frb23 (pdi1)</i>	274 bp	Pdi1 ( <i>Trichoderma reesei</i> <sup>15</sup> )	42%	Proteindisulfid-Isomerase
<i>frb52</i>	392 bp (2247 bp)	- Polβ ( <i>Homo sapiens</i> )	28%	DNA-Polymerase X
<i>frb53</i>	189 bp	-		
<i>frb63</i>	322 bp	-		
<i>frb92 (kpp6)</i>	752 bp (1608 bp)	Pmk1 ( <i>Magnaporthe grisea</i> ) Pmk1 ( <i>Magnaporthe grisea</i> )	72% 68%	MAP-Kinase MAP-Kinase
<i>frb133 (exc1)</i>	749 bp	Exc1 ( <i>Trichoderma harzianum</i> )	29%	Exochitinase
<i>frb172</i>	741 bp	-		
<b>b-reprimiert</b>				
<i>frb34</i>	1055 bp (1323 bp)	YrhL ( <i>Bacillus subtilis</i> ) YrhL ( <i>Bacillus subtilis</i> )	27% 26%	Acyltransferase Acyltransferase
<i>frb110</i>	527 bp (1794 bp)	- -		
<i>frb124</i>	557 bp	-		
<i>frb136</i>	1091 bp (2025 bp)	Cap10p ( <i>Cryptococcus neoformans</i> ) Cap10p ( <i>Cryptococcus neoformans</i> )	25% 25%	kapselassoziertes Protein kapselassoziertes Protein
<i>frb323</i>	1002 bp	Pma1p ( <i>Cryptococcus neoformans</i> )	66%	Plasmamembran (H <sup>+</sup> )-ATPase

Dazu zählte unter den b-induzierten Genen *frb52*, das keine Ähnlichkeit zu bekannten Genen aufwies. Der sehr frühe Zeitpunkt der b-abhängigen Induktion ließ es wahrscheinlich erscheinen, dass es sich hier um ein direkt durch das bW/bE-Heterodimer reguliertes Gen handeln könnte. Daneben wurde *frb92* ausgewählt, da es ein interessantes pheromon- und b-induziertes Expressionsmuster mit zwei unterschiedlich langen Transkripten zeigt und die abgeleitete Proteinsequenz Ähnlichkeit zu einer Reihe pilzlicher MAP-Kinasen aufweist (Tabelle 1). Die Analyse der anderen fünf b-induzierten Gene wurde zurückgestellt. Bei *frb23 (pdi1)* mit einer starken Ähnlichkeit zu Genen, die für Proteindisulfid-Isomerasen kodieren, und *frb133 (exc1)* mit Homologie zu Exochitinase-Genen scheint es sich um indirekt b-regulierte Gene zu handeln, die in Zusammenhang mit dem morphologischen Wechsel von hefeartigem zu filament-

<sup>14</sup> Bei Sequenzähnlichkeiten wird die prozentuale Identität der abgeleiteten Aminosäuresequenzen mit Proteinen aus öffentlichen Datenbanken angegeben. Im Fall von vollständig sequenzierten Genen bezieht sich die Aussage auf den Vergleich der gesamten Proteine, im Fall von EST-Klonen teilweise nur auf homologe Domänen. Es werden ausschließlich signifikante Ähnlichkeiten aufgeführt.

<sup>15</sup> Wird auch mit *Hypocrea jecorina* bezeichnet, es wird der gebräuchlichere Name verwendet.

tösem Wachstum induziert werden. Das gleiche könnte auch auf die Gene *frb53*, *frb63* und *frb172* zutreffen, die ebenfalls erst zu einem späteren Zeitpunkt induziert werden.

Unter den b-reprimierten Genen fiel die Wahl auf *frb110*, das ebenfalls zwei unterschiedlich regulierte Transkripte besitzt und auf *frb34* und *frb136*. Die abgeleitete Proteinsequenz von *frb34* zeigt Ähnlichkeit zu Acyltransferasen und die von *frb136* zu Cap10p, einem kapsel-assoziierten Protein aus *Cryptococcus neoformans* (Tabelle 1). Da bislang außerhalb des *a*-Locus keine weiteren b-reprimierten Gene bekannt waren, erschien diese Klasse besonders interessant für die weitere Untersuchung. *frb323*, das vermutlich für eine Plasmamembran (H<sup>+</sup>)-ATPase kodiert, wurde wegen des uneinheitlichen Expressionsmusters in die erste Analyse nicht mit einbezogen. *frb124* wurde vorerst nicht weiter untersucht, da eine Southern-Analyse unter nicht-stringenten Hybridisierungsbedingungen mehrere Signale zeigte (nicht gezeigt). Das deutet darauf hin, dass es sich hier um das Mitglied einer eng verwandten Genfamilie in *U. maydis* handelt, was die Untersuchung deutlich erschwert. Die gleiche Southern-Analyse ergab bei vier der fünf ausgewählten Gene (*frb52*, *frb110*, *frb34* und *frb136*) keinen Hinweis auf das Vorliegen nah verwandter Homologe in *U. maydis* (nicht gezeigt). Im Fall von *frb92* konnten weitere Signale detektiert werden. Die Größen entsprachen den für *kpp2* erwarteten Fragmenten (nicht gezeigt).

## 2.2 Untersuchung des Gens *frb52*

### 2.2.1 *frb52* kodiert für ein Protein mit Ähnlichkeit zu DNA-Polymerasen X

Ausgehend von dem *frb52*-Amplicon wurde ein Cosmid und aus diesem ein 8.645 bp großer BamHI-Subklon isoliert. Die Sequenzanalyse ergab für *frb52* einen ORF von 2.247 bp, so dass das abgeleitete Protein 749 Aminosäuren lang ist (genauere Einzelheiten siehe Abschnitt 4.1.5 und Abbildung 38). Es zeigt in seinem C-Terminus von Position 492 bis Position 736 eine für DNA-Polymerasen X typische Domäne. Dort finden sich auch Ähnlichkeiten zu bekannten DNA-Polymerasen X (z. B. 28% Identität mit Pol $\beta$  aus *Homo sapiens* und mit PolIV aus *S. cerevisiae*). In ihren N-Termini weisen DNA-Polymerasen X nur sehr geringe Ähnlichkeit zueinander auf. Das erklärt, warum mit der Sequenz des ursprünglichen Amplicons, das im vorderen Drittel des Gens zwischen Nukleotidposition 319 und 710 liegt, keine verwandten Gene gefunden werden konnten.

187 bp hinter dem Translations-Stoppkodon von *frb52* befindet sich das 3'-Ende eines konvergent transkribierten Gens, das zur Klasse der Translations-Elongationsfaktoren Tu gehört<sup>16</sup>. Auf dem 3.002 bp langen 5'-Bereich von *frb52*, der sich auf dem Subklon befindet, konnten keine weiteren Gene identifiziert werden. In diesem für *U. maydis* ungewöhnlich langen intergenischen Bereich befinden sich auch keine auffälligen Promotorelemente. Die Suche nach Motiven, die der bekannten Bindesequenz des bW/bE-Heterodimers im Promotor von *Iga2* (Romeis *et al.*, 2000) ähneln, brachte zunächst keine überzeugenden Ergebnisse. Daher sollte mittels Gelretardations- und DNase-Footprint-Analysen untersucht werden, ob es sich bei *frb52* um ein direkt b-reguliertes Gen handelt, und wenn ja, an welche Sequenz das bW/bE-Heterodimer im *frb52*-Promotor bindet.

### 2.2.2 *frb52* ist ein direkt b-reguliertes Gen

Im Kontext der Promotoranalyse von *frb52* wurde zunächst untersucht, ob His-Kon8, ein biologisch aktives, verkürztes bW/bE-Fusionsprotein (Romeis *et al.*, 2000), die Transkription von *frb52* induzieren kann. Dazu wurde in den *ip*-Locus des Stamms FB2 (*a2 b2*) ein Konstrukt eingebracht, das *his-kon8* unter Kontrolle des *crg1*-Promotors enthält. In dem so entstandenen Stamm FB2kon8 kann damit die Expression von His-Kon8 durch Wechsel der Kohlenstoffquelle von Glucose zu Arabinose vorgenommen werden. Bei der Northern-Analyse dieses Stammes konnte schon eine Stunde nach Transfer in arabinosehaltiges Medium

---

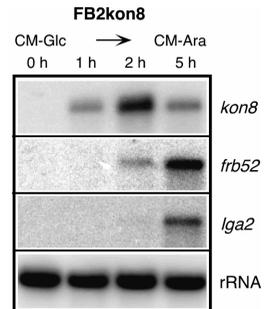
<sup>16</sup> Der klonierte Bereich umfasst mit 3.208 bp wahrscheinlich nicht das gesamte Gen. Die abgeleitete Aminosäuresequenz zeigt Ähnlichkeit zu einer Reihe von Translations-Elongationsfaktoren 2 in verschiedenen Organismen (z. B. 43% Identität mit Eft2 aus *S. pombe* und 38% Identität mit Yn1136c aus *S. cerevisiae*). Das Gen wurde daher *tef2* benannt.

ein deutliches *his-kon8*-Signal detektiert werden, das nach 2 Stunden ein Maximum erreichte und dann auf ein mittleres Niveau zurückging (Abbildung 12). Die Expression von *frb52* war zwei Stunden nach Induktion nachweisbar (Abbildung 12). Dies ist später als bei Verwendung des Stammes AB31 (*a2*  $P_{erg}$ : *bW2, bE1*), wo schon nach einer Stunde ein schwaches Signal auftritt, und ist wahrscheinlich auf die schon früher beobachtete geringere Aktivität von His-Kon8 im Vergleich zum bW/bE-Heterodimer zurückzuführen (Romeis *et al.*, 1997; 2000). Das bekannte b-regulierte Gen *lga2* zeigt eine etwas verzögerte Induktion im Vergleich zu *frb52* (Abbildung 12). Mit diesem Versuch konnte gezeigt werden, dass His-Kon8 die Expression von *frb52* in *U. maydis* reguliert und daher für biochemische Untersuchungen geeignet ist.

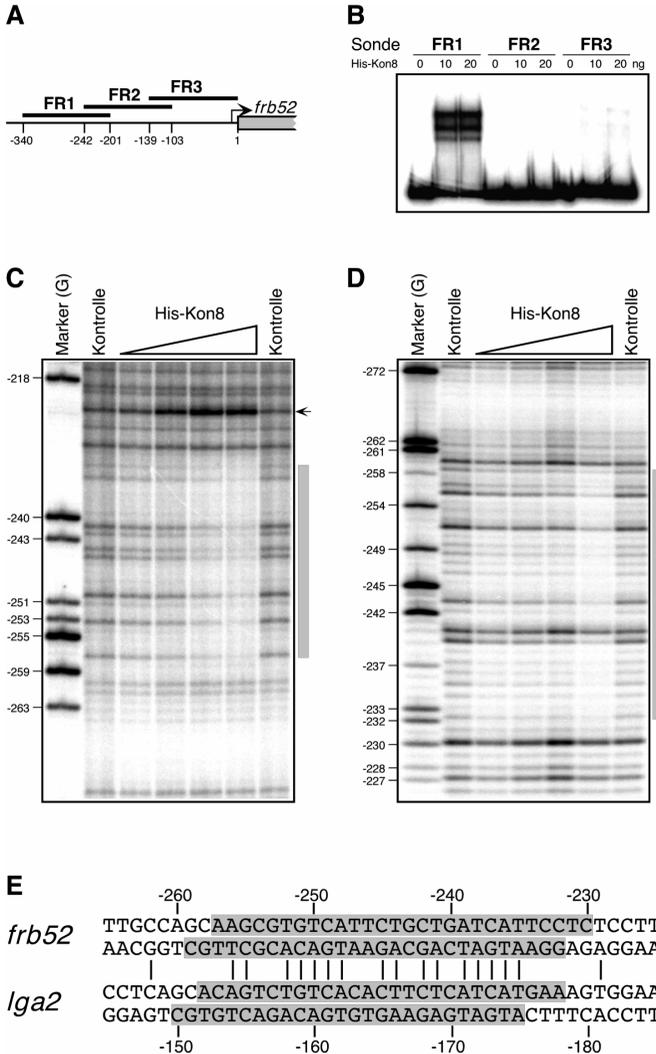
Zum *in vitro*-Nachweis der Bindung von His-Kon8 an den *frb52*-Promotor und um die Region eines möglichen b-Bindemotivs eingrenzen zu können, wurden zunächst zwei etwa 400 bp lange Fragmente aus dem 5'-Bereich in Relretardations-Analysen getestet. Das eine umfasste die Region von Position -741 bis -343 und das andere den Bereich von Position -343 bis +41, jeweils gerechnet vom angenommenen Translations-Startpunkt von *frb52*. Dabei konnte lediglich mit dem zweiten, proximalen Fragment ein His-Kon8/DNA-Komplex nachgewiesen werden (nicht gezeigt). Für eine genauere Analyse wurde der 340 bp Bereich vor *frb52* in drei überlappende, jeweils 140 bp lange Fragmente FR1 bis FR3 zerlegt (Abbildung 13A). Von diesen wies FR1 eine deutliche Bindung an His-Kon8 auf (Abbildung 13B). Mit den Fragmenten FR2 und FR3 konnte keine signifikante Komplexbildung nachgewiesen werden.

Für die genaue Bestimmung der von His-Kon8 gebundenen Region wurde mit dem Fragment FR1 eine DNase-Protektionsanalyse durchgeführt. Dabei konnte sowohl auf dem Plus- als auch auf dem Minus-Strang eine durch die Bindung von His-Kon8 vor DNase-Angriff geschützte Region identifiziert werden (Abbildung 13C und D). Zusätzlich trat auf dem Plus-Strang in der Nähe der His-Kon8-Bindestelle eine DNase-hypersensitive Stelle auf (Abbildung 13C). Die durch His-Kon8 auf beiden Strängen geschützte Region weist eine Länge von 26 bp auf und befindet sich von Position -257 bis -232 relativ zum *frb52*-Translations-Startpunkt (Abbildung 13E).

Von diesen 26 bp stimmen 16 bp mit der für den *lga2*-Promotor ermittelten b-Bindesequenz (Romeis *et al.*, 2000) überein (Abbildung 13E). Damit ist gezeigt, dass es sich bei *frb52* um ein direkt b-reguliertes Gen handelt. Die Induktion der Expression tritt zu einem früheren Zeitpunkt als bei den bislang bekannten b-induzierten Genen auf.



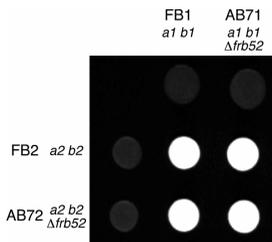
**Abbildung 12: Genregulation durch His-Kon8 in *U. maydis*.** Zellen wurden in CM-Glc bis zu  $OD_{600} \approx 0,5$  angezogen und anschließend für insgesamt 5 h in CM-Ara induziert. Vor Induktion und zu den angegebenen Zeitpunkten danach wurden Aliquots entnommen. Pro Spur wurde etwa 10  $\mu$ g RNA aufgetragen.



**Abbildung 13: Charakterisierung der  $\beta$ -Bindestelle im *frib52*-Promotor.** **A)** Schematische Darstellung der Lage der für die Analysen verwendeten drei PCR-Fragmente; die Abbildung ist maßstabsgerecht. **B)** Gelretardations-Analyse mit den drei Promotorfragmenten und His-Kon8, Einzelheiten siehe Abschnitt 4.5.1. Es treten drei verschieden große His-Kon8/DNA-Komplexe auf, was auch schon bei der Untersuchung des *Iga2*-Promotors beobachtet wurde. Sie sind vermutlich mit Bindung von C-terminal verkürzten His-Kon8-Abbauprodukten an die jeweiligen DNA-Fragmente zu erklären (Romeis *et al.*, 2000). **C)** und **D)** DNase-Protektionsanalyse des Plus- und des Minus-Strangs von FR1. His-Kon8 wurde in steigenden Konzentrationen von 3,3, 10, 30 und 90 ng/ $\mu$ l eingesetzt, weitere Einzelheiten siehe Abschnitt 4.5.2. Geschützte Bereiche sind durch graue Balken, die DNase-hypersensitive Stelle im Plus-Strang (C) durch einen Pfeil verdeutlicht. **E)** Vergleich der  $\beta$ -Bindestellen im *frib52*- und im *Iga2*-Promotor. Geschützte Bereiche sind grau hinterlegt, gleiche Basenpaare zwischen den beiden Sequenzen durch Striche dargestellt. Die Positionen beziehen sich auf den Translations-Startpunkt der Gene.

### 2.2.3 Die Deletion von *frb52* hat keinen Einfluss auf Pathogenität

Zur Untersuchung der Funktion von *frb52* wurden Deletionsmutanten hergestellt, bei denen in den Stämmen FB1 (*a1 b1*) und FB2 (*a2 b2*) der 2.247 bp große ORF vollständig entfernt und durch eine Hygromycin-Resistenzkassette ersetzt ist. Die entsprechenden Transformanten AB71 (*a1 b1 Δfrb52*) und AB72 (*a2 b2 Δfrb52*) zeigen keine erkennbaren Unterschiede im Wachstumsverhalten und in der Zellmorphologie (nicht gezeigt).



**Abbildung 14: Kreuzungsverhalten der *frb52*-Deletionsmutanten.** Die oben und links angegebenen Stämme wurden einzeln und in Kombination auf PD-CC-Festmedium aufgetropft und 24 h bei 21°C inkubiert. Die Kolonien erscheinen bei Ausbildung der dikaryotischen Filamente wegen der luftgefüllten leeren Abschnitte Weiß.

**Tabelle 2: Pathogenität der *frb52*-Deletionsmutanten**

Inoculum	Tumorbildung*	% von Wildtyp
FB1 x FB2	115/126	100%
FB1 x AB72	42/47	98%
AB71 x FB2	41/48	94%
AB71 x AB72	207/243	93%

\* Angegeben ist die Anzahl von Pflanzen mit Tumorbildung im Vergleich zur Gesamtzahl der infizierten Pflanzen 14 Tage nach Infektion.

Auch in Bezug auf das Kreuzungsverhalten auf aktivkohlehaltigem Festmedium (Abbildung 14) und auf Pathogenität bei Infektion von Maispflanzen (Tabelle 2) zeigen sich keine Unterschiede zu den jeweiligen Ausgangsstämmen. Infektionen mit Kreuzungen der Stämme AB71 (*a1 b1 Δfrb52*) und AB72 (*a2 b2 Δfrb52*) führen zu normaler Tumorbildung sowohl was die Anzahl als auch die Größe der resultierenden Tumore angeht (nicht gezeigt). Auch bei der Bildung von Brandsporen innerhalb der Tumore und bei der Sporulation zeigten sich keine Abweichungen zum Wildtyp (nicht gezeigt).

Damit wurde zwar für *frb52* die direkte Regulation durch das bW/bE-Heterodimer nachgewiesen, über die mögliche Rolle im Infektionsprozess kann jedoch nur spekuliert werden (siehe Diskussion).

## 2.3 Untersuchung des Gens *frb110*

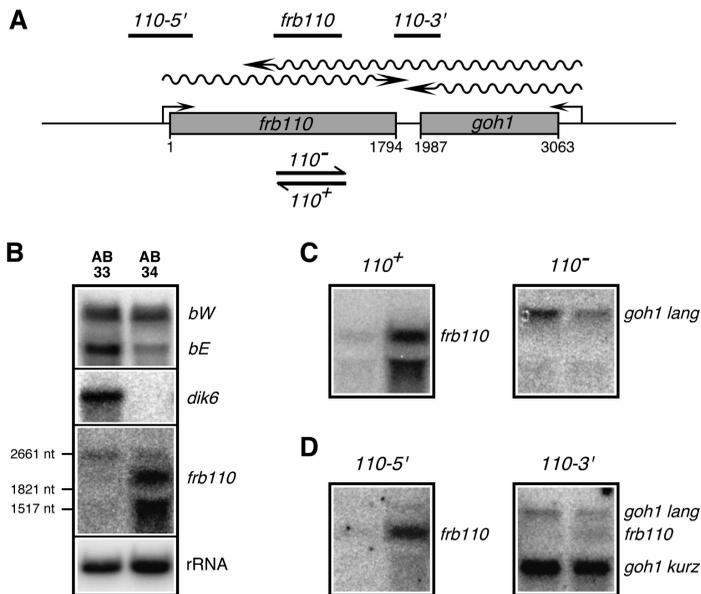
### 2.3.1 Neben *frb110* befindet sich ein konvergent transkribiertes Gen

Mit dem *frb110*-Amplicon als Sonde wurden ein Cosmid und aus diesem zwei überlappende *Xba*I- bzw. *Bam*HI-Subklone isoliert, die zusammen ein 8.625 bp großes Fragment umfassen. Die Sequenzanalyse zeigt für *frb110* einen ORF von 1.794 bp, wobei das Amplicon zwischen Nukleotidposition 834 und 1.360, also in der Mitte des ORFs liegt (Abbildung 15A; genauere Einzelheiten siehe Abschnitt 4.1.5). Das abgeleitete Protein ist 598 Aminosäuren lang und weist keine Ähnlichkeit zu bekannten Proteinen auf. 192 bp hinter dem Translations-Stoppkodon von *frb110* befindet sich das 3'-Ende eines konvergent transkribierten Gens von 1.077 bp Länge (Abbildung 15A). Zu der abgeleiteten Proteinsequenz von 359 Aminosäuren können in den Datenbanken ebenfalls keinerlei Homologien gefunden werden, das Gen wurde daher mit *gohl* (Gen ohne Homologe) benannt. Auf dem 3.376 bp langen 5'-Bereich von *frb110*, der sich auf dem Subklon befindet, konnten keine weiteren Gene oder auffällige Promotorelemente identifiziert werden.

### 2.3.2 Die beiden Transkripte stammen von zwei verschiedenen Genen

Das interessanteste Merkmal von *frb110* ist das Auftreten von zwei verschieden langen und unterschiedlich regulierten Transkripten, die sich in Northern-Analysen mit dem Amplicon als Sonde zeigen (Abbildungen 10, 11 und 15B). Dabei ist das größere ungefähr 2.600 Nukleotide lang und das kleinere etwa 2.000 Nukleotide (Abbildung 15B). Es wurde zunächst versucht, die 5'- und 3'-Enden dieser beiden Transkripte mittels PCR aus einer cDNA-Bank zu isolieren (siehe Abschnitt 4.3.4). Dabei konnte ein Transkriptions-Startpunkt bei Position -50 und Polyadenylierungsstellen bei Position 1.879 und 1.902 relativ zum angenommenen Translations-Startpunkt von *frb110* identifiziert werden, was sehr gut zu dem b-reprimierten Transkript von ungefähr 2.000 Nukleotiden Länge passt. Gleichzeitig wurden bei dieser Analyse eine Reihe von gegenläufigen Transkripten isoliert, die mehrere unterschiedliche Polyadenylierungsstellen an den Positionen 613, 620, 639, 641, 787 bzw. 792 aufwiesen. Dies ließ vermuten, dass es sich bei dem längeren Transkript um *gohl* handeln könnte, das mit der doppelsträngigen *frb110*-Sonde detektiert werden kann. Durch Hybridisierung der Membranen mit einzelstrangspezifischen Sonden konnte die Vermutung bestätigt werden (Abbildung 15C). Kontrollexperimente, in denen doppelsträngige Sonden aus dem 5'-UTR (Position -320 bis 184) bzw. dem 3'-UTR (Position 1.779 bis 2.159) von *frb110* eingesetzt wurden, zeigten die gleichen Ergebnisse, darüber hinaus auch noch das Auftreten eines kürzeren, etwa 1.400 Nukleotide langen und konstitutiv exprimierten *gohl*-Transkripts (Abbildung 15D). Für dieses Transkript konnten Polyadenylierungsstellen an Position 1.842 und 1.849 identifiziert

werden, 146 bzw. 139 Nukleotide hinter dem Stop von *goh1*. Das 5'-Ende der *goh1*-Transkripte dürfte sich daher etwa zwischen Position 3.100 und 3.200 befinden, also 50 bis 150 Nukleotide vor dem Startkodon.

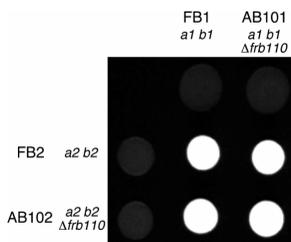


**Abbildung 15: Northern-Analyse des *frb110*-Locus.** A) Schematische Darstellung des sequenzierten *frb110*-Locus. Angegeben ist die Lage der beiden Gene *frb110* und *goh1*, ihrer Transkripte (Wellenlinien) und der für die Northern-Analysen verwendeten Sonden (dicke Linien). Bei *frb110*, *110*<sup>-5'</sup> und *110*<sup>-3'</sup> handelt es sich um doppelsträngige, bei *110*<sup>+</sup> und *110*<sup>-</sup> um einzelsträngige Sonden. Die Abbildung ist maßstabsgetreu. B) Northern-Analyse mit RNA der Stämme AB33 (*a2 P<sub>nar</sub>:bW2,bE1*) und AB34 (*a2 P<sub>nar</sub>:bW2,bE2*). Die Zellen wurden in AM-Glc bis OD<sub>600</sub> = 0,5 inkubiert, dann für 5 h in NM-Glc induziert. Pro Spur wurde etwa 14 µg RNA aufgetrennt. Kontrollhybridisierungen zeigen die induzierte *b*-Genexpression (das Signal für *bE2* in Stamm AB34 ist schwächer als das *bE1*-Signal in Stamm AB33, da eine *bE1*-Sonde verwendet wurde, die nur zum Teil mit *bE2* hybridisiert) und die *b*-abhängige Expression von *dik6*. Das kürzere Signal für *frb110* wird durch die darunter laufende 18S rRNA zerteilt. Dieses Phänomen ist schon öfters bei Northern-Analysen beobachtet worden, z. B. im Fall von *prf1* (Hartmann *et al.*, 1996). Die Größenangaben beziehen sich auf die Positionen eines parallel aufgetragenen RNA-Größenstandards (MERCK RNA-ladder II). C) und D) Gleiche Northern-Analyse wie in B), allerdings mit den oben angegebenen einzelsträngigen (C) bzw. doppelsträngigen (D) Sonden. Die detektierten Transkripte sind rechts daneben angegeben.

Zusammengenommen lassen es diese Daten wahrscheinlich erscheinen, dass es sich bei dem längeren, scheinbar *b*-induzierten Transkript um ein verlängertes *goh1*-Transkript handelt. Dieses Transkript tritt offenbar nur dann auf, wenn *frb110* transkriptionell reprimiert ist. Da keine weiteren Unterschiede auf cDNA-Ebene festgestellt werden konnten (nicht gezeigt), kodieren das längere und das kürzere *goh1*-Transkript vermutlich für das gleiche Protein.

### 2.3.3 Die Deletion von *frb110* hat keinen Einfluss auf Pathogenität

Zur Funktionsanalyse des b-reprimierten Gens *frb110* wurden Deletionsmutanten hergestellt, indem in den Stämmen FB1 (*a1 b1*) und FB2 (*a2 b2*) der 1.794 bp große ORF vollständig entfernt und durch eine Hygromycin-Resistenzkassette ersetzt wurde. Die entsprechenden Transformanten AB101 (*a1 b1 Δfrb110*) und AB102 (*a2 b2 Δfrb110*) zeigen im Vergleich zu den Ausgangsstämmen keine Unterschiede im Wachstumsverhalten und in der Zellmorphologie (nicht gezeigt).



**Abbildung 16: Kreuzungsverhalten der *frb110*-Deletionsmutanten.** Die oben und links angegebenen Stämme wurden einzeln und in Kombination auf PD-CC-Festmedium aufgetropft und 24 h bei 21°C inkubiert. Die Kolonien erscheinen bei Ausbildung der dikaryotischen Filamente wegen der luftgefüllten leeren Abschnitte Weiß.

**Tabelle 3: Pathogenität der *frb110*-Deletionsmutanten**

Inoculum	Tumorbildung*	% von Wildtyp
FB1 x FB2	77/87	100%
FB1 x AB102	33/35	100%
AB101 x FB2	33/35	100%
AB101 x AB102	145/170	96%

\* Angegeben ist die Anzahl von Pflanzen mit Tumorbildung im Vergleich zur Gesamtzahl der infizierten Pflanzen 14 Tage nach Infektion.

Bei Kreuzungstests auf aktivkohlehaltigem Festmedium (Abbildung 16) und bei Infektion von Maispflanzen (Tabelle 3) konnte ebenfalls kein vom Wildtyp abweichender Phänotyp festgestellt werden. Infektionen mit Kreuzungen der Stämme AB101 (*a1 b1 Δfrb110*) und AB102 (*a2 b2 Δfrb110*) führen zur Bildung normaler Tumore mit Brandsporen, deren Sporulation normal verläuft (nicht gezeigt).

Damit kann *frb110* derzeit keine Funktion in *U. maydis* zugeordnet werden. Da es sich allerdings um ein b-reprimiertes Gen handelt, würde man bei Deletion auch keinen Einfluss auf die pathogene Entwicklung erwarten. Interessant wäre hier, Stämme zu untersuchen, in denen *frb110* der Kontrolle durch das bW/bE-Heterodimer entzogen und konstitutiv exprimiert wird. Bei dem unter b-Induktionsbedingungen auftretenden längeren Transkript handelt es sich vermutlich um eine mRNA-Variante eines konvergent transkribierten Nachbargens, die durch alternative Transkriptions-Termination erklärt werden kann. Es ist offen, ob das Auftreten der beiden gegenläufigen Transkripte einen Regulationsmechanismus darstellt.

## 2.4 Untersuchung des MAP-Kinasegens *kpp6* (*frb92*)

### 2.4.1 *frb92* kodiert für die ungewöhnliche MAP-Kinase Kpp6

Für die Untersuchung von *frb92* konnten ausgehend vom Amplicon zwei überlappende Cosmide und aus einem der beiden ein 6.782 bp *Bam*HI-Subklon isoliert werden, der den gesamten ORF des Gens umfasst (Abbildung 17A). Der größte offene Leserahmen ist 1.680 bp lang, spätere Ergebnisse lassen jedoch einen 81 bp weiter 3' gelegenen Translations-Startpunkt wahrscheinlicher erscheinen (siehe Abschnitt 2.4.9)<sup>17</sup>. Damit ist *frb92* insgesamt 1.599 bp lang. Das Amplicon liegt in der Mitte dieses ORFs von Position 458 bis 1.227. Im 2.667 bp langen 5'-Bereich, der sich auf dem sequenzierten Subklon befindet, können keine weiteren offensichtlichen ORFs detektiert werden. Etwa 400 bp vor dem Translations-Startpunkt von *frb92* befinden sich zwei 20 bp voneinander entfernte PRE-Boxen ("pheromone response element"-Boxen), potentielle Bindesequenzen für den Transkriptionsfaktor Prf1 (Abbildung 17A). Dabei entspricht die erste (PRE1) genau der Konsensussequenz TCCCTTTGT (Hartmann *et al.*, 1996; Urban *et al.*, 1996b), die zweite (PRE2) weist an einem Ende einen Nucleotidaustausch auf (ACCCTTTGT). 627 bp hinter dem Stoppkodon von *frb92* beginnt ein in die gleiche Richtung laufender ORF, wobei die von dem 1.886 bp langen Fragment<sup>18</sup> abgeleitete Proteinsequenz keine Ähnlichkeiten zu bekannten Proteinen aufweist.

Die von *frb92* abgeleitete, 533 Aminosäuren lange Proteinsequenz weist dagegen eine hohe Ähnlichkeit zu einer ganzen Reihe vor allem pilzlicher MAP-Kinasen auf. Darunter befinden sich z. B. Pmk1 aus *Magnaporthe grisea* (68% Identität) oder Fus3 (54% Identität) und Kss1 (56% Identität) aus *S. cerevisiae*. Alle diese Proteine besitzen das für MAP-Kinasen typische Motiv [LIVM][TS]XX[LIVM]XT[RK][WY]YRXPX[LIVM][LIVM] in der Unterdomäne VIII (Kültz, 1998), an dem die Phosphorylierung durch MEKs (MAP/ERK-Kinasen) stattfindet (Hunter und Plowman, 1997). Eine enge Verwandtschaft (67% Identität) zeigt sich auch zwischen Kpp6 und der MAP-Kinase Kpp2 aus *U. maydis* (Abbildung 17B), von der angenommen wird, dass sie das Pheromonsignal übermittelt (Müller *et al.*, 1999). Auffällig ist das bei allen diesen MAP-Kinasen identische Phosphorylierungsmotiv TEYVATRWRAP (Aminosäureposition 355 bis 367 in Kpp6, Abbildung 17B; siehe auch Diskussion). Da es sich bei *frb92* offensichtlich um ein MAP-Kinasegen handelt, wurde das Gen aufgrund der Ähnlichkeit zu *kpp2* in *kpp6* umbenannt<sup>19</sup>. Im Gegensatz zu fast allen bekannten MAP-Kinasen, die eine Länge von etwa 350 Aminosäuren aufweisen, besitzt Kpp6 eine zusätzliche, un-

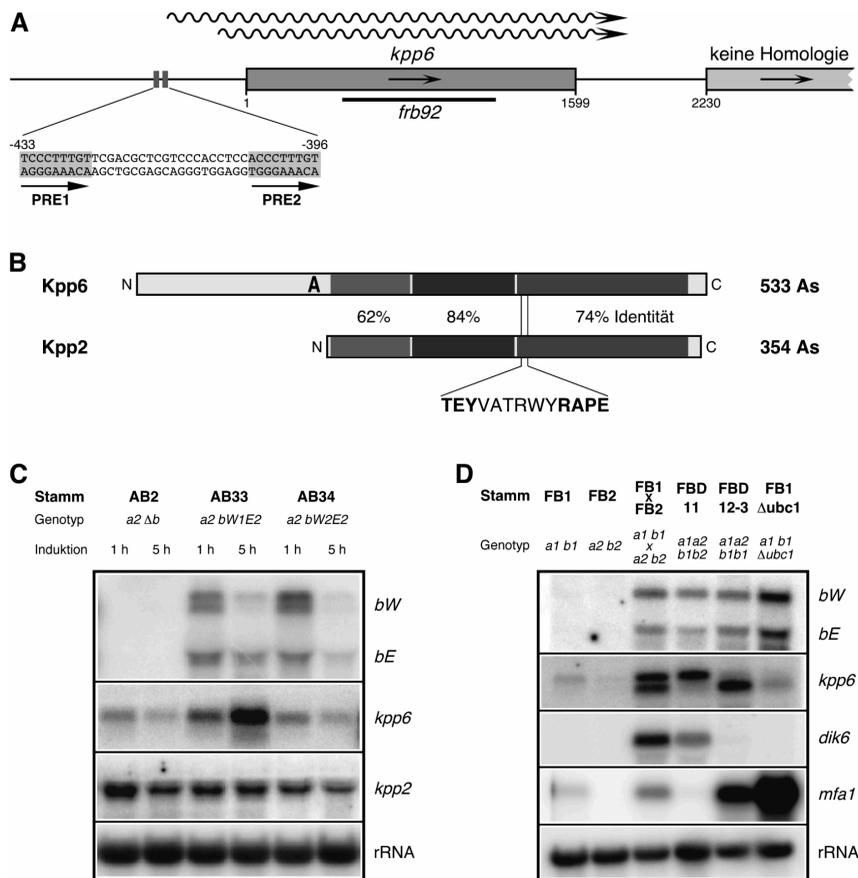
---

<sup>17</sup> Um Missverständnisse zu vermeiden, beziehen sich alle Angaben in Text und Abbildungen auf diesen, erst später ermittelten Translations-Startpunkt und das in FB1 vorliegende Allel, bei dem der Alaninlinker 12 Aminosäuren lang ist (siehe unten).

<sup>18</sup> Auf dem *Bam*HI-Subklon ist vermutlich nicht das vollständige Gen enthalten.

<sup>19</sup> *kpp* steht für Kinase PCR-Produkt; bislang waren fünf verschiedene Kinase PCR-Produkte isoliert worden (P. Müller, pers. Mitteilung).

gefähr 150 Aminosäuren lange N-terminale Domäne ohne Ähnlichkeit zu bekannten Proteinen oder Proteindomänen.



**Abbildung 17: Der *kpp6*-Locus, die MAP-Kinase Kpp6 und die transkriptionelle Regulation von *kpp6*.** **A)** Schematische Darstellung des *kpp6*-Locus. Die Lage des *frb92*-Amplicons ist durch einen dicken Strich, die beiden *kpp6*-Transkripte durch Wellenlinien angedeutet. Die Abbildung ist maßstabsgetreu. **B)** Vergleich der Aminosäuresequenz von Kpp6 und Kpp2. Gezeigt ist außerdem das zwischen beiden Proteinen vollständig konservierte Phosphorylierungsmotiv und die Position des "Alaninlinkers" in Kpp6 ("A"). Die Darstellung ist maßstabsgerecht. **C)** Vergleich der Expression von *kpp6* und *kpp2*. Versuchsbedingungen siehe Abbildung 10. **D)** Northern-Analyse der beiden *kpp6*-Transkripte. Die Stämme wurden in CM-Flüssigmedium bis  $OD_{600} \approx 0,5$  einzeln angezogen, in einer Dichte von insgesamt  $0,1 OD_{600}/cm^2$  auf CM-CC-Festmedium ausgestrichen und 48 h bei  $29^\circ C$  inkubiert. Pro Spur wurde etwa  $9 \mu g$  RNA aufgetrennt.

Zwischen dieser Domäne und der MAP-Kinasedomäne befinden sich auf DNA-Ebene Wiederholungen des Basentriplets GCT, die für einen natürlichen "Alaninlinker" in Kpp6 kodieren. In verschiedenen *U. maydis*-Stämmen konnten durch direkte Sequenzierung von PCR-

Produkten aus dieser Region mehrere *kpp6*-Allele nachgewiesen werden, die sich in der Anzahl der Triplettwiederholungen unterscheiden. In zwei Fällen kodieren sie für 6 Alaninreste (FB2 und ATCC22893), in einem Fall für 8 (ATCC22505), in vier Fällen für 9 (ATCC22883, 22889, 22892 und 22895), in vier Fällen für 11 (ATCC18604, 22885, 22891 und 22895) und in acht Fällen für 12 Alaninreste (FB1, ATCC22882, 22884, 22886, 22887, 22888, 22892<sup>20</sup> und 22898). Wie spätere Versuche andeuten, sind vermutlich alle Allele funktionell (siehe Abschnitt 2.4.7, Fußnote 24).

Ein Vergleich der Expressionsmuster der beiden MAP-Kinasegene *kpp6* und *kpp2* zeigt, dass nur *kpp6* b-abhängig reguliert ist, *kpp2* dagegen mehr oder weniger konstitutiv exprimiert wird (Abbildung 17C). Das in Abbildung 11 aufgefallene Auftreten von zwei unterschiedlich langen und verschieden regulierten Transkripten für *kpp6* wurde in einer zweiten unabhängigen Northern-Analyse mit den diploiden Stämmen FBD11 (*ala2 b1b2*) und FDB12-3 (*ala2 b1b1*) nochmals untersucht. FBD11 (*ala2 b1b2*) weist zwei verschiedene *a*- und *b*-Loci auf und ist daher mit einem dikaryotischen Filament nach Fusion kompatibler haploider Sporidien vergleichbar. FBD12-3 (*ala2 b1b1*) besitzt zwar zwei verschiedene *a*-Loci und kann sich daher selber durch Pheromon stimulieren, hat aber nur ein *b*-Allel in doppelter Kopie. Damit dürfte dieser Stamm dem Zustand haploider, pheromonstimulierter Sporidien vor der Zellfusion entsprechen. Die Kontrollhybridisierungen mit für *dik6* und *mfa1* spezifischen Sonden bestätigen dies (Abbildung 17D): das *mfa1*-Transkript ist in der Kreuzung der Stämme FB1 und FB2, in FBD12-3 und basal exprimiert in FB1 nachweisbar, fehlt hingegen im Stamm FB2 und ist im Stamm FBD11 deutlich reprimiert. Umgekehrt kann das *dik6*-Transkript in der Kreuzung FB1 x FB2 und im Stamm FBD11, nicht jedoch in den Stämmen FB1, FB2 und FBD12-3 detektiert werden (Abbildung 17D).

Wie schon in Abbildung 11 zeigt sich auch hier für *kpp6* ein längeres, etwa 2.300 Nukleotide langes b-induziertes und ein um etwa 200 bis 300 Nukleotide kürzeres pheromoninduziertes Transkript (Abbildung 17D). Weitere Northern-Analysen mit Sonden aus dem 5'- und 3'-UTR von *kpp6* deuten darauf hin, dass beide Transkripte das gleiche 3'-Ende besitzen und sich in ihrem 5'-Ende unterscheiden (nicht gezeigt). Mittels PCR wurde zunächst versucht, das 5'- und 3'-Ende des längeren der beiden Transkripte aus einer cDNA-Bank zu isolieren (siehe Abschnitt 4.3.4). Dabei konnte ein Transkriptions-Startpunkt bei Position -404 und Polyadenylierungsstellen bei Position 1.818 und 1.821 relativ zum angenommenen Translations-Startpunkt von *kpp6* identifiziert werden, was sehr gut mit der beobachteten Transkriptlänge übereinstimmt. Für das kürzere Transkript konnte bislang noch keine Transkriptions-Startstelle bestimmt werden. Spätere Ergebnisse zeigen aber, dass diese mindestens 81 Nukleotide vor dem ATG von *kpp6* liegen muss (siehe Abschnitt 2.4.5 und Abbildung 21C). Die Sequenzierung interner cDNA-Fragmente ergab keinen Anhaltspunkt auf Intronsequenzen, so dass

---

<sup>20</sup> Der Stamm ATCC22892 (*al bM* bzw. *al b18*, je nach Nomenklatur) besitzt zwei unterschiedliche *kpp6*-Allele, die für 9 bzw. 12 Alanine kodieren. Er weist zwar nur jeweils ein *a*- und ein *b*-Allel auf (J. Kämper, pers. Mitteilung), enthält aber entweder eine Verdopplung des *kpp6*-Locus oder ist generell diploid.

davon ausgegangen werden muss, dass beide Transkripte für das gleiche Protein kodieren (siehe Abschnitt 4.3.4).

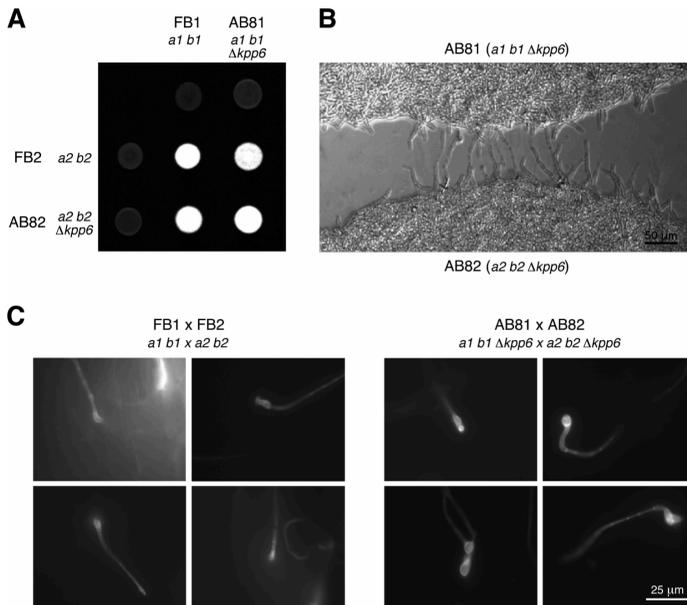
Die Transkriptions-Startstelle des längeren Transkripts befindet sich genau in der zweiten PRE-Box, das kürzere Transkript tritt unter Pheromon-Induktion auf. Nimmt man diese beiden Ergebnisse zusammen, so erscheint es denkbar, dass die pheromoninduzierte Expression von *kpp6* durch Bindung von Prf1 an die PREs im *kpp6*-Promotor vermittelt wird. Dadurch könnte sich der Transkriptions-Startpunkt weiter stromabwärts verschieben, was ein kürzeres Transkript zur Folge hätte. Um diese Hypothese zu testen, wurde der Northern-Analyse ein weiterer Stamm zugefügt, FB1 $\Delta$ ubc1. In diesem Stamm ist das Gen für die regulatorische Untereinheit der PKA (Proteinkinase A) deletiert, was zur konstitutiven Aktivierung der entsprechenden katalytischen Untereinheiten der PKA führt (Gold *et al.*, 1997). Diese Situation ist vergleichbar der einer aktivierten cAMP-Kaskade. Bei den bisher getesteten Prf1-regulierten Genen des *a*-Locus konnte gezeigt werden, dass sie sowohl durch Pheromon-Stimulation, als auch durch eine aktivierte cAMP-Kaskade induziert werden und dass diese Regulation Prf1-abhängig ist (Hartmann *et al.*, 1999). Entsprechend kann in Abbildung 17D die deutlich induzierte Expression von *mfal* im Stamm FB1 $\Delta$ ubc1 im Vergleich zum Ausgangsstamm FB1 beobachtet werden. Auch die Gene des *b*-Locus, in dem sich ebenfalls PRE-Boxen befinden, zeigen eine erhöhte Transkriptionsrate (Abbildung 17D). Im Gegensatz dazu kann im Fall von *kpp6* zwar ein verkürztes Transkript nachgewiesen werden, das Expressionsniveau ist aber ungefähr gleich dem des Ausgangsstamms. Falls Prf1 an die PRE-Boxen im *kpp6*-Promotor bindet, scheint dies keine Auswirkung auf die Transkriptionsrate von *kpp6* zu haben. Es könnte aber die Verschiebung des Transkriptions-Startpunkts erklären (siehe Abschnitt 2.4.11).

*kpp6* kodiert demnach für eine MAP-Kinase, die große Ähnlichkeit zu Kpp2 aufweist aber einen ungewöhnlichen N-Terminus besitzt. *kpp6* ist sowohl pheromon- als auch b-induziert, wobei zwei verschiedene Transkripte entstehen. Im Promotor von *kpp6* befinden sich zwei PRE-Boxen, so dass eine transkriptionelle Regulation durch Prf1 denkbar ist. Ausgehend von diesen Ergebnissen schienen folgende Fragen für die weitere Analyse besonders interessant:

- Welche Funktion oder Funktionen erfüllt Kpp6 während der Kreuzung und dem Infektionsprozess? Welche Signale werden dabei von Kpp6 übermittelt?
- Welche Rolle spielt der ungewöhnliche N-Terminus von Kpp6?
- Existiert eine funktionelle Redundanz zwischen Kpp2 und Kpp6?
- Kodieren die beiden unterschiedlich langen Transkripte von *kpp6* für das gleiche Protein?
- Sind die PRE-Boxen im *kpp6*-Promotor essentiell für die transkriptionelle Regulation?
- Welche Rolle spielt Prf1 bei der Regulation von *kpp6*?

## 2.4.2 Die Deletion von *kpp6* hat keinen Einfluss auf Kreuzungsverhalten, Filament- und Appressorienbildung

Die hohe Ähnlichkeit zwischen Kpp6 und Kpp2 und die induzierte Expression von *kpp6* unter Pheromon-Stimulationsbedingungen ließ eine Rolle während des Kreuzungsprozesses vermuten. Zur Untersuchung einer möglichen Beteiligung von Kpp6 an der Übertragung des Pheromonsignals wurde in den haploiden Stämmen FB1 (*a1 b1*) und FB2 (*a2 b2*) ein 1.680 bp langes Fragment, das den gesamten ORF von *kpp6* und 81 bp aus dem 5'-UTR umfasst, deletiert und durch eine Hygromycin-Resistenzkassette ersetzt (siehe Abschnitte 4.1.3 und 4.1.4). Die entsprechenden Transformanten AB81 (*a1 b1 Δkpp6*) und AB82 (*a2 b2 Δkpp6*) zeigen im Vergleich zu den Ausgangsstämmen keine Unterschiede im Wachstumsverhalten und in der Zellmorphologie (nicht gezeigt).



**Abbildung 18: Kreuzungsverhalten, Filament- und Appressorienbildung von *kpp6*-Deletionsmutanten.** **A)** Die oben und links angegebenen Stämme wurden einzeln und in Kombination auf PD-CC-Festmedium aufgetropft und 24 h bei 21°C inkubiert. **B)** Konfrontations-Analyse nach Snetselaar *et al.* (1996). Die beiden Stämme wurden etwa 100  $\mu$ m entfernt voneinander auf mit Wasseragar beschichtete Objektträger aufgetropft und 12 h bei RT inkubiert. **C)** Appressorienbildung bei Wildtyp- und Mutantenkreuzung. Maispflanzen wurden mit den angegebenen Stämmen infiziert und 48 h nach Infektion Blattstückchen aus der Infektionsregion mit Fungifluor (SIGMA) gefärbt. Filamente und Appressorien sind unter UV-Licht auf der Blattoberfläche deutlich zu erkennen. Die Maßangabe bezieht sich auf alle Abbildungen.

In Bezug auf das Kreuzungsverhalten auf aktivkohlehaltigem Festmedium (Abbildung 18A) zeigen sich keine Unterschiede zu den jeweiligen Ausgangsstämmen. Die Bildung von weissen dikaryotischen Hyphen erfolgt in der Mutanten-Kreuzung genauso wie beim Wildtyp. Die deutlich sensitivere Konfrontations-Analyse lässt ebenfalls keine Unterschiede erkennen (Abbildung 18B). Die gegenseitige Stimulation und Ausbildung von Konjugationshyphen verläuft normal. Die Untersuchung der Appressorienbildung auf der Blattoberfläche mittels Fluoreszenz-Mikroskopie nach Färbung mit Fungifluor (SIGMA) bestätigt die Hyphenbildung bei Kreuzung der Mutanten AB81 (*a1 b1 Δkpp6*) und AB82 (*a2 b2 Δkpp6*) (Abbildung 18C). Die charakteristischen regelmäßigen Septen zwischen den leeren Abschnitten sind deutlich zu erkennen. Auch die gebildeten Appressorien zeigen keine Abweichungen im Vergleich zu Wildtyp-Kreuzungen (Abbildung 18C). Sie scheinen in den Mutanten-Kreuzungen etwas größer zu sein, was aber statistisch nicht abgesichert werden konnte.

Damit kann Kpp6 keine Funktion während der Prozesse der Zell/Zell-Erkennung, der Zellfusion, der Filament- und der Appressorienbildung zugeordnet werden. Dies ist im Hinblick auf die pheromoninduzierte Expression überraschend. Es besteht jedoch die Möglichkeit, dass in den Deletionsmutanten die Rolle von Kpp6 von einem nahen Homologen, z. B. Kpp2, übernommen wird, wie es bei Fus3 und Kss1 in *S. cerevisiae* der Fall ist (Madhani *et al.*, 1997); dadurch könnte ein Funktionsverlust gleichsam maskiert und nicht zu erkennen sein (siehe Abschnitte 2.4.7 und 2.4.8).

### 2.4.3 *kpp6*-Deletionsmutanten weisen eine reduzierte Pathogenität auf

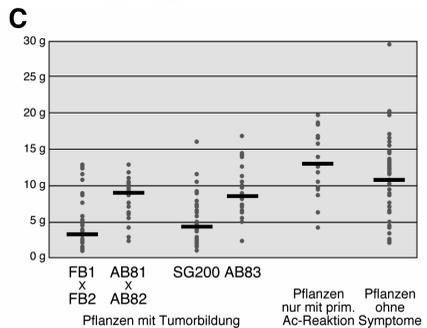
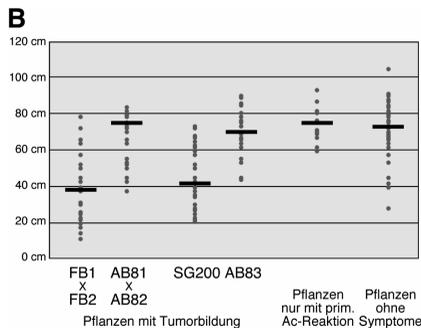
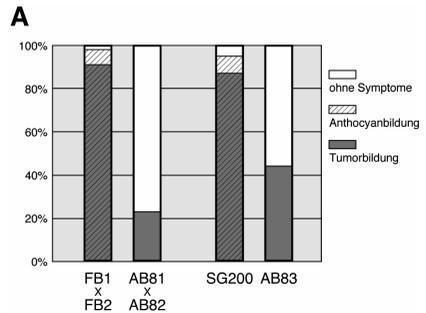
Zur Untersuchung einer möglichen Rolle von Kpp6 im Infektionsprozess wurde zusätzlich zu den schon vorhandenen Stämmen AB81 (*a1 b1 Δkpp6*) und AB82 (*a2 b2 Δkpp6*) der *kpp6*-Locus auch noch im haploiden solopathogenen Stamm SG200 (*a1mfa2 bW2bE1*) deletiert und in gleicher Weise durch eine Hygromycin-Resistenzkassette ersetzt. Der Stamm SG200 (*a1mfa2 bW2bE1*) ist in der Lage, Maispflanzen ohne vorherige Fusion erfolgreich zu infizieren, und dient daher zur Analyse von Postfusions-Ereignissen. Mit dem resultierenden Transformanten AB83 (*a1mfa2 bW2bE1 Δkpp6*) und Kreuzungen der Stämme AB81 und AB82 wurden Maispflanzen infiziert und 14 Tage nach Infektion auf Infektionssymptome untersucht. Dabei zeigte sich eine deutliche Abnahme in der Anzahl von Pflanzen, die Tumore ausbilden (Tabelle 4 und Abbildung 19A). Sie ist von Experiment zu Experiment etwas unterschiedlich und liegt zwischen 20% und 50% des Wildtyp-Niveaus (vgl. Tabellen 4, 6, 9 und 11). Diese Reduktion tritt in gleicher Weise bei den Mutanten-Kreuzungen als auch bei AB83 (*a1mfa2 bW2bE1 Δkpp6*) auf, was darauf schließen lässt, dass es sich um einen Postfusions-Defekt in den Mutanten handelt. Darüber hinaus kommt es bei Infektion mit Kreuzungen der Stämme FB1 (*a1 b1*) und FB2 (*a2 b2*) oder mit SG200 (*a1mfa2 bW2bE1*) zu einer deutlichen Reduktion in Größe und Gewicht der befallenen Pflanzen im Vergleich zu Pflanzen ohne Tumore, während dieser Effekt bei den Infektionen mit *kpp6*-Deletionsmutanten in Bezug auf

das Gewicht der Pflanzen deutlich geringer und in Bezug auf die Pflanzengröße nicht erkennbar ist (Abbildung 19B und C). Die gebildeten Tumore sind in der Regel wesentlich kleiner als bei vergleichbaren Wildtyp-Infektionen, und sie werden häufig nicht an den üblichen Stellen gebildet (siehe unten und Abbildung 20A). Am auffälligsten ist jedoch das vollständige Ausbleiben der Anthocyanbildung in der Nähe der Injektionsstelle bei Infektionen mit den Deletionsmutanten. Aus diesem Grund muss zunächst genauer auf die bei Wildtyp-Infektionen zu beobachtenden Pathogenitätssymptome eingegangen werden.

**Tabelle 4: Pathogenität der *kpp6*-Deletionsmutanten**

Inoculum	prim. Ac-Reaktion*	% von "Wildtyp"	Tumor-bildung*	% von "Wildtyp"
FB1 x FB2	264/270	100%	245/270	100%
AB81 x AB82	0/262	0%	59/262	23%
SG200	145/152	100%	132/152	100%
AB83	0/158	0%	70/158	44%

\* Angegeben ist die Anzahl von Pflanzen mit primärer Anthocyan-Reaktion bzw. Tumorbildung im Vergleich zur Gesamtzahl der infizierten Pflanzen 14 Tage nach Infektion.



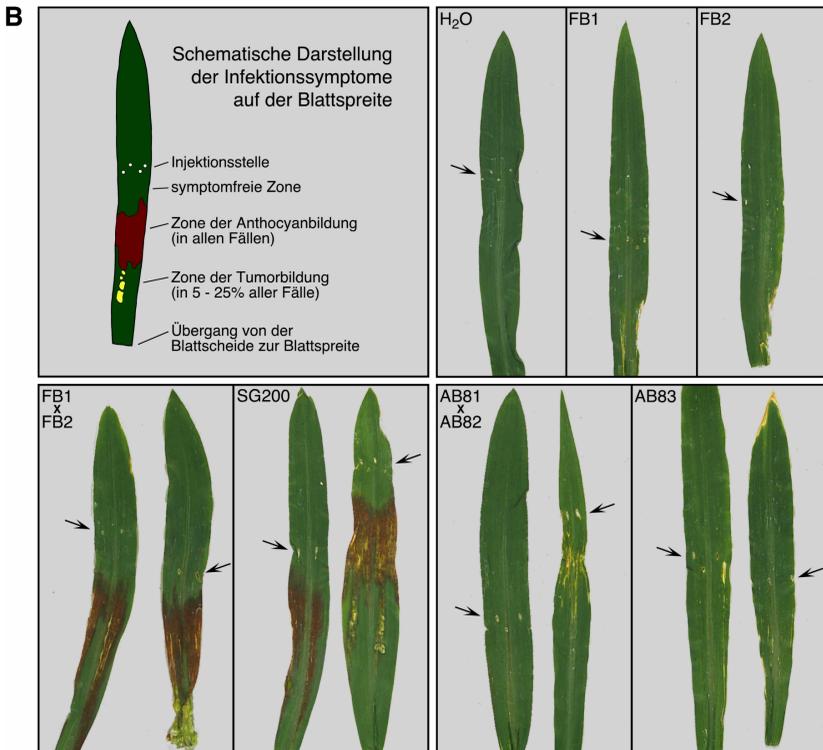
**Abbildung 19: Ergebnisse der Pflanzeninfektionen mit *kpp6*-Deletionsmutanten.** A) Graphische Darstellung der Daten aus Tabelle 4. Die prozentualen Angaben beziehen sich jeweils auf die Gesamtzahl der infizierten Pflanzen. B) und C) Vergleich der Länge (B) und des Gewichts (C) von Maispflanzen 14 Tage nach Infektion mit den angegebenen Stämmen. Die Daten zu Pflanzen, die zwar eine primäre Anthocyan-Reaktion aber keine Tumorbildung aufweisen und die zu symptomfreien Pflanzen sind aus allen vier Infektionen zusammengenommen. Einzelereignisse sind durch graue Punkte, der Median aller Ereignisse durch einen schwarzen Strich dargestellt. Gemessen wurde jeweils die gesamte Pflanze ohne Wurzel. Die Anzahl der Pflanzen und die jeweiligen Medianwerte waren: 29 Pflanzen mit Tumorbildung bei FB1 x FB2 (38 cm, 3,3 g), 24 Pflanzen mit Tumorbildung bei AB81 x AB82 (74 cm, 8,8 g), 39 Pflanzen mit Tumorbildung bei SG200 (42 cm, 4,6 g), 29 Pflanzen mit Tumorbildung bei AB83 (69 cm, 8,2 g), 16 Pflanzen mit primärer Anthocyan-Reaktion aber ohne Tumorbildung (77 cm, 13,1 g) und 45 Pflanzen ohne Symptome (73 cm, 10,7 g). Zur Definition des Begriffs "primäre Anthocyan-Reaktion" siehe Abschnitt 2.4.4.

#### 2.4.4 Bei *kpp6*-Deletionsmutanten sind frühe Infektionsprozesse gestört

Bei Standard-"Spritzinfektionen" werden 200 bis 250 µl einer Pilzsuspension (in Wasser,  $OD_{600} \approx 3,0$ ) in das Innere des Blattwirtels von sieben Tage alten Maispflanzen der Sorte Golden Bantam gespritzt. Die Injektionsstelle befindet sich etwa 1 cm über der Erde, also etwa 1,5 bis 3 cm oberhalb des basalen Pflanzenmeristems. Dabei werden in der Regel die Blattscheiden des ersten und des zweiten Blattes<sup>21</sup> und die Blattspreiten des dritten und vierten Blattes durchstoßen. Als erstes Infektionssymptom ist nach vier bis fünf Tagen auf dem dritten und vierten Blatt eine beginnende Anthocyan-Produktion zu beobachten, und zwar ungefähr 1 bis 3 cm unterhalb der Durchstichstellen (Abbildung 20B). In diesen Regionen kann schon einen Tag nach Infektion Appressorienbildung bei *U. maydis* beobachtet werden (Abbildung 18C), so dass sich hier wahrscheinlich die bevorzugten Eintrittsstellen des Pilzes bei dieser Art der Infektion befinden. Es könnte sich um einen Bereich handeln, in dem sich die Pflanzenzellen zum Zeitpunkt der Infektion im Streckungswachstum befinden und deshalb ein Durchdringen der Zellwand leichter möglich ist. Sieben Tage nach Infektion zeigen sich die ersten Tumore, in der Regel werden die Pflanzen nach zwei Wochen bonitiert. Typischerweise findet man Tumore (1) in und unterhalb des Bereichs der Anthocyan-Produktion auf der Blattspreite des dritten und vierten Blattes, (2) am Übergang von der Blattspreite zur Blattscheide an diesen beiden Blättern, (3) auf und in der Blattscheide und (4) direkt an der Basis der Pflanze (Abbildung 20A). Im Bereich der Tumore tritt häufig ebenfalls Anthocyan-Produktion auf. Vor allem in den Fällen 2 und 4, bei denen die Tumorbildung in oder in der Nähe meristematisch aktiver Bereiche der Pflanze stattfindet, können die Tumore sehr groß werden und bei Bildung "basaler" Tumore unter Umständen zu einem Absterben der Pflanze führen. Oberhalb der Infektionsstelle auf dem dritten und vierten Blatt und auf den weiteren Blättern (so sie noch gebildet werden) finden sich dagegen nur in seltenen Ausnahmefällen Tumore.

Das Ausmaß der Tumorbildung zwischen einzelnen Pflanzen bei derselben Infektion (Abbildung 19B und C) oder zwischen verschiedenen Versuchen und Experimentatoren kann sich deutlich unterscheiden (nicht gezeigt). Bei Pflanzen, die nach Wildtyp-Infektionen Tumorbildung aufweisen, kann jedoch in allen Fällen die Anthocyan-Produktion auf dem dritten und vierten Blatt beobachtet werden (Abbildung 20A und B). Diese Reaktion wird nicht durch die Verletzung der Blätter hervorgerufen, was sich durch Kontrollinfektionen mit Wasser oder haploiden Sporidien zeigen lässt (Abbildung 20B). Sie ist daher vermutlich eine Reaktion der Pflanze auf versuchte oder erfolgreiche Infektion durch *U. maydis* und dient als sensibler Nachweis der Pilz/Pflanzen-Interaktion. Im Rahmen dieser Arbeit wird daher zwischen der Anthocyan-Bildung auf der Blattspreite des dritten und vierten Blattes und einer eventuell später stattfindenden Produktion von Anthocyan in der Nähe von Tumoren unterschieden. Für erstere wird im Folgenden die Bezeichnung "primäre Anthocyan-Reaktion" verwendet.

<sup>21</sup> Gerechnet wird hier nach dem Erscheinen der Blätter, wobei das Keimblatt nicht mit einbezogen wird.



Vergleicht man die Infektionssymptome von Wildtyp- und *kpp6*-Mutanten-Infektionen, so fällt bei Injektion von Deletionsmutanten vor allem ein völliges Ausbleiben der primären Anthocyan-Reaktion auf (Tabelle 4 und Abbildungen 19a und 20). Zwar können in diesem Bereich vereinzelt Nekrosen beobachtet werden, diese treten aber in manchen Fällen auch bei Infektionen mit haploiden Sporidien auf (Abbildung 20B). Tumore finden sich an den schon beschriebenen Stellen, allerdings häufig auch oberhalb der Injektionsstelle auf der Blattspreite des dritten und vierten Blattes und in wenigen Fällen auf der Blattspreite des fünften Blattes (Abbildung 20A). Die gebildeten Tumore sind deutlich kleiner, in ihrer Umgebung zeigt sich nur vereinzelt Anthocyan-Produktion (Abbildung 20A). Bei einigen großen Tumoren konnten sporogene Hyphen und die Bildung normaler Brandsporen beobachtet werden (nicht gezeigt). In einem Fall wurde das Sporulationsverhalten der Brandsporen untersucht, wobei sich keine Abweichungen zum Wildtyp ergaben (nicht gezeigt).

Zur Kontrolle wurde eine unterschiedliche Art der Pflanzeninfektion, die sogenannte Tropfinfektion, durchgeführt. Dabei werden jeweils 800 µl einer Pilzsuspension ( $OD_{600} \approx 3,0$  in Wasser) in die Blattwirtel von 14 Tage alte Pflanzen der Sorte Gaspar Flint gespritzt, ohne die Pflanze dabei zu verletzen. Die resultierenden Tumore befinden sich bei dieser Art der Infektion an den oberen Blättern und vor allem in der männlichen Blüte. Dort zeigt sich auch Anthocyanbildung. Drei Wochen nach Infektion mit FB1 x FB2 konnten an 28 von 45 Pflanzen Tumore beobachtet werden, bei AB81 x AB82 waren es 2 von 45 Pflanzen (7% von Wildtyp). Infektion mit SG200 führte in 6 von 15 Fällen zur Tumorbildung, bei AB83 in 3 von 43 Fällen (17% von Wildtyp). Es zeigte sich ebenfalls eine deutliche Reduktion der Anthocyan-Produktion als Reaktion auf die Infektion mit *kpp6*-Mutanten. Da sich der Effekt im Fall der Spritzinfektion auf das dritte und vierte Blatt beschränkt und deswegen besser darstellbar ist, wurde für die weiteren Untersuchungen diese Art der Infektion angewandt.

Diese Ergebnisse lassen bei den *kpp6*-Deletionsmutanten auf einen Defekt in der Interaktion zwischen Pilz und Pflanze schließen. Um die Prozesse innerhalb der Pflanze nach der Appressorienbildung, die ja noch normal verläuft (Abbildung 18C), genauer untersuchen zu können, wurden *U. maydis*-Stämme hergestellt, die gelbe bzw. blaue Varianten von GFP (YGFP bzw. CGFP) konstitutiv exprimieren. Diese beiden Proteine liegen in ihren Anregungs- und Emissions-Wellenlängen weit genug auseinander, um durch Fluoreszenz-Mikroskopie getrennt nachweisbar zu sein. Die entsprechenden Konstrukte wurden in Einzelkopie in den *ip*-Locus

---

**Abbildung 20 (vorhergehende Seite): Pathogenitätssymptome bei Infektion mit *U. maydis*.** A) Aufnahmen von Maispflanzen 14 Tage nach Infektion mit den angegebenen Kreuzungen. Es wurden Beispiele von Pflanzen mit unterschiedlich starker Tumorsymptomatik ausgewählt. Weitere Einzelheiten siehe Text. B) Primäre Anthocyan-Reaktion nach Infektion mit *U. maydis*. Gezeigt sind Beispiele von dritten Blättern der Maispflanzen 14 Tage nach Infektion mit den angegebenen Stämmen bzw. Kreuzungen. Die Injektionsstellen (durch Pfeile angedeutet), Anthocyan- und Tumorbildung sind deutlich zu erkennen. Die Zahlenangaben in der schematischen Darstellung beziehen sich auf die Häufigkeit des Auftretens von Anthocyan- und Tumorbildung auf der Blattspreite bei Pflanzen mit Tumorbildung nach Infektion mit FB1 x FB2.

eingbracht. Dabei wurden ausgehend vom Stamm SG200 (*almfa2 bW2bE1*) die Transformanten AB120 (*almfa2 bW2bE1 ip'*[ $P_{o2uf};cgfp$ ]*ip*<sup>s</sup>)<sup>22</sup> und AB121 (*almfa2 bW2bE1 ip'*[ $P_{o2uf};ygfp$ ]*ip*<sup>s</sup>) und ausgehend vom Stamm AB83 (*almfa2 bW2bE1 Δkpp6*) die Transformante AB122 (*almfa2 bW2bE1 Δkpp6 ip'*[ $P_{o2uf};ygfp$ ]*ip*<sup>s</sup>) hergestellt.

Drei Tage nach Koinfektion von Maispflanzen mit den Stämmen AB120 und AB121 konnten unterhalb der Durchstichstelle in der Blattspreite gelb und blau fluoreszierende *U. maydis*-Filamente nachgewiesen werden (nicht gezeigt). Auch innerhalb der Tumore fanden sich beide Stämme nebeneinander als sporogene Hyphen (nicht gezeigt). Dies zeigt, dass beide Varianten von GFP in der Pflanze getrennt nachweisbar sind, dass die Expression von CGFP bzw. YGFP keinen Einfluss auf die Pathogenität hat und dass es sich bei der Tumorbildung bei dieser Art der Infektion nicht um ein klonales Ereignis handelt. Dem gegenüber konnten weder bei Einzelinfektion des Stammes AB122 noch bei Koinfektion mit dem Stamm AB120 die gelb fluoreszierenden *kpp6*-Mutantenzellen innerhalb der Pflanze gefunden werden (nicht gezeigt). Dies ist neben der ausbleibenden Anthocyanbildung bei den infizierten Pflanzen ein weiterer Hinweis darauf, dass in den Deletionsmutanten frühe Prozesse nach dem Eindringen in die Pflanze gestört sind und nur ein kleiner Teil der Pilzzellen zu einer erfolgreichen Infektion in der Lage ist (siehe Diskussion). In Fällen, bei denen es zu einer erfolgreichen Infektion und zur Bildung von Tumoren nach Infektion mit dem Stamm AB122 kam, fanden sich in den Tumoren gelb fluoreszierende Filamente und sporogene Hyphen (nicht gezeigt). Bei Koinfektion mit den Stämmen AB120 und AB122 konnten in den resultierenden Tumoren nur die blau fluoreszierenden Hyphen des Stammes AB120 nachgewiesen werden (nicht gezeigt).

Zusammengefasst weisen die *kpp6*-Deletionsmutanten eine deutlich reduzierte Pathogenität auf. Es finden sich weniger Tumore, die Tumore sind kleiner und die Pflanzen sind in der Regel in ihrem Wachstum nur wenig behindert. Am auffälligsten ist die fehlende primäre Anthocyan-Reaktion der Maispflanzen, die normalerweise als Antwort auf die Infektion durch *U. maydis* zu beobachten ist.

## 2.4.5 Der N-Terminus von Kpp6 wird für die Pathogenität nicht benötigt

Bei der Analyse der *kpp6*-Sequenz fällt der ungewöhnliche, etwa 150 Aminosäuren lange N-Terminus von Kpp6 auf, der in ähnlichen Proteinen fehlt. Daher wurde als nächstes untersucht, ob dieser Domäne von Kpp6 eine Funktion zugeordnet werden kann. Es sollte getestet werden, mit welchen Teilen von Kpp6 der beobachtete Pathogenitätsdefekt wieder aufgehoben werden kann. Dazu wurden verschiedene Konstrukte in Einzelkopie in den *ip*-Locus der

---

<sup>22</sup> Für Integrationen in den *ip*-Locus (siehe Abschnitt 6.1) wird die Bezeichnung *ip'*[...] *ip*<sup>s</sup> verwendet, *ip'*[*kpp6*]*ip*<sup>s</sup> steht z. B. für ein in den *ip*-Locus inseriertes Konstrukt, das *kpp6* enthält. Bei sämtlichen in dieser Arbeit verwendeten Konstrukten zur Integration in den *ip*-Locus wird das entsprechende Gen in die entgegengesetzte Richtung relativ zu den *ip*-Genen abgelesen (Abbildung 36).

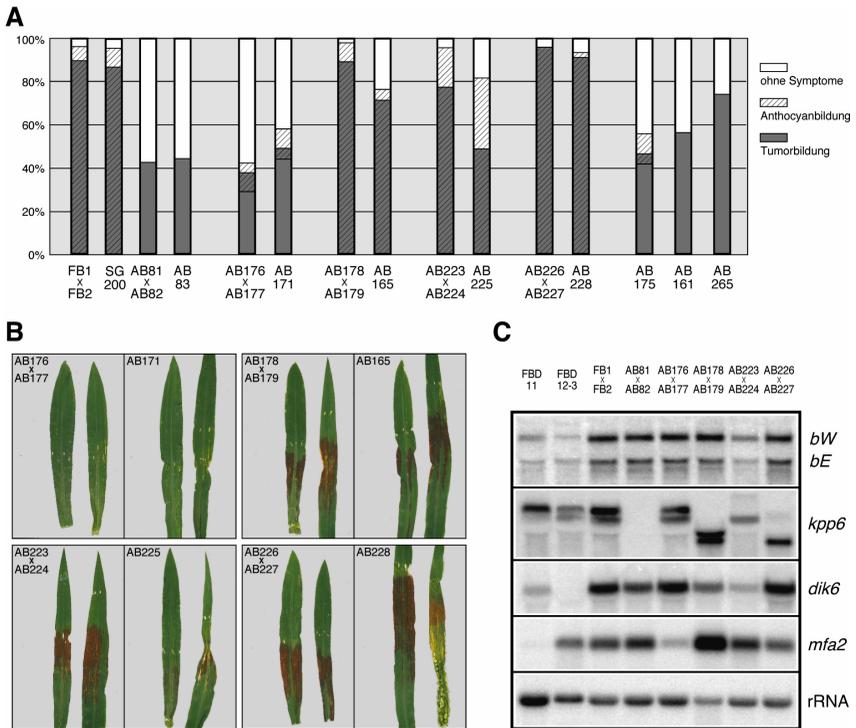
bereits vorhandenen *kpp6*-Deletionsmutanten AB81 (*a1 b1 Δkpp6*), AB82 (*a2 b2 Δkpp6*) und AB83 (*a1mfa2 bW2bE1 Δkpp6*) eingebracht. Das erste Konstrukt enthält eine 2.371 bp lange Promotorregion, den gesamten Leserahmen von *kpp6* und 428 bp des 3'-UTR (pkpp6NA). Zusätzlich wurden zur leichteren Klonierung der Folgekonstrukte mittels gerichteter PCR-Mutagenese an der zunächst angenommenen Translations-Startstelle (also an Position -81) eine *NcoI*-Schnittstelle und direkt hinter das Stoppkodon eine *AscI*-Schnittstelle eingefügt (siehe Abschnitt 4.1.4). Davon ausgehend wurde in einem zweiten Konstrukt der *kpp6*-Promotor direkt an ein verkürztes *kpp6*-Allel (*kpp6C-term*) fusioniert, das für ein an Aminosäureposition 170, also direkt hinter dem Alaninlinker beginnendes Protein kodiert (pkpp6C-term; siehe Abschnitt 4.1.4). Diese Variante umfasst demnach die C-terminale MAP-Kinasedomäne von Kpp6. In den beiden Konstrukten pkpp6NA und pkpp6C-term wurde außerdem jeweils der *kpp6*-Promotor durch den *o2tef*-Promotor ersetzt, um in den Transformanten eine konstitutive Expression von Kpp6 bzw. des C-Terminus von Kpp6 zu ermöglichen. Die so entstandenen Plasmide wurden mit pPo2tef:kpp6NA bzw. pPo2tef:kpp6C-term bezeichnet. Die Transformanten sind in Tabelle 5 zusammengefasst.

**Tabelle 5: Stämme mit Komplementations-Konstrukten**

Transformanten	Genotyp	Ausgangsstamm
AB176	<i>a1 b1 Δkpp6 ip'[P<sub>kpp6</sub>:kpp6]ip<sup>s</sup></i>	AB81
AB177	<i>a2 b2 Δkpp6 ip'[P<sub>kpp6</sub>:kpp6]ip<sup>s</sup></i>	AB82
AB171	<i>a1mfa2 bW2bE1 Δkpp6 ip'[P<sub>kpp6</sub>:kpp6]ip<sup>s</sup></i>	AB83
AB178	<i>a1 b1 Δkpp6 ip'[P<sub>kpp6</sub>:kpp6C-term]ip<sup>s</sup></i>	AB81
AB179	<i>a2 b2 Δkpp6 ip'[P<sub>kpp6</sub>:kpp6C-term]ip<sup>s</sup></i>	AB82
AB165	<i>a1mfa2 bW2bE1 Δkpp6 ip'[P<sub>kpp6</sub>:kpp6C-term]ip<sup>s</sup></i>	AB83
AB223	<i>a1 b1 Δkpp6 ip'[P<sub>o2tef</sub>:kpp6]ip<sup>s</sup></i>	AB81
AB224	<i>a2 b2 Δkpp6 ip'[P<sub>o2tef</sub>:kpp6]ip<sup>s</sup></i>	AB82
AB225	<i>a1mfa2 bW2bE1 Δkpp6 ip'[P<sub>o2tef</sub>:kpp6]ip<sup>s</sup></i>	AB83
AB226	<i>a1 b1 Δkpp6 ip'[P<sub>o2tef</sub>:kpp6C-term]ip<sup>s</sup></i>	AB81
AB227	<i>a2 b2 Δkpp6 ip'[P<sub>o2tef</sub>:kpp6C-term]ip<sup>s</sup></i>	AB82
AB228	<i>a1mfa2 bW2bE1 Δkpp6 ip'[P<sub>o2tef</sub>:kpp6C-term]ip<sup>s</sup></i>	AB83

Alle 12 Stämme zeigten normales Wachstumsverhalten, eine normale Zellmorphologie und normale Filamentbildung auf aktivkohlehaltigem Festmedium (nicht gezeigt). Die Tumorbildung bei den Stämmen, die das Volllängen *kpp6*-Konstrukt tragen, ist vergleichbar der bei Infektion mit *kpp6*-Deletionsmutanten (Stämme AB176 und AB177, bzw. AB171 in Tabelle 6 und Abbildung 21A und B), allerdings konnte in wenigen Fällen (etwa 15% von Wildtyp) eine leichte Anthocyanbildung auf der Blattspreite beobachtet werden (Tabelle 6 und Abbildung 21A). Daraus wird abgeleitet, dass das Volllängen *kpp6*-Konstrukt die Deletion von *kpp6* nur partiell komplementieren kann. Demgegenüber liegt die Anthocyanbildung in den Stämmen, die entweder das C-terminale Fragment von Kpp6 unter Kontrolle des *kpp6*-Promotors enthalten (AB178 und AB179, bzw. AB165) oder das Volllängen- oder das verkürzte

Protein konstitutiv exprimieren (AB223 und AB224, bzw. AB225; AB226 und AB227, bzw. AB228) zwischen 80 und 100% des Wildtyp-Niveaus (Tabelle 6 und Abbildung 21A und B). Die Größe der gebildeten Tumore bei Infektion mit diesen Stämmen entspricht ebenfalls den Ergebnissen bei Wildtyp-Infektionen (nicht gezeigt), in Bezug auf die Anzahl der betroffenen Pflanzen zeigt nur der Stamm AB225 eine auf die Hälfte verringerte Pathogenität (Tabelle 6 und Abbildung 21A und B). Ansonsten wurden bei den Kreuzungen kompatibler Stämme und dem entsprechenden solopathogenen Stamm jeweils vergleichbare Ergebnisse erzielt (Tabelle 6 und Abbildung 21A und B). Demnach können mit diesen Konstrukten *kpp6*-Deletionsmutanten komplementiert werden.



**Abbildung 21: Komplementation der *kpp6*-Deletionsmutanten.** A) Graphische Darstellung der Daten aus Tabelle 6. Die prozentualen Angaben beziehen sich jeweils auf die Gesamtzahl der infizierten Pflanzen. B) Primäre Anthocyan-Reaktion 14 Tage nach Infektion mit den angegebenen Stämmen. C) Northern-Analyse mit den angegebenen Stämmen. Zellen wurden in CM-Flüssigmedium bis  $OD_{600} \approx 0,5$  getrennt inkubiert, im Fall der Kreuzungen im gleichen Verhältnis gemischt und in einer Dichte von  $0,1 OD_{600}/cm^2$  auf CM-CC-Festmedium ausgestrichen. Die Zellernte erfolgte nach 24-stündiger Inkubation bei  $29^\circ C$ . Pro Spur wurde  $10 \mu g$  RNA aufgetrennt.

**Tabelle 6: Komplementation der *kpp6*-Deletionsmutanten**

Inoculum	eingebrahtes Konstrukt	prim. Ac-Reaktion*	% von "Wildtyp"	Tumorbildung*	% von "Wildtyp"
FB1 x FB2		102/106	100%	95/106	100%
SG200		145/152	100%	132/152	100%
AB81 x AB82		0/87	0%	37/87	47%
AB83		0/158	0%	70/158	51%
AB176 x AB177	pkpp6NA	6/45	14%	17/45	42%
AB171	pkpp6NA	14/100	15%	49/100	56%
AB178 x AB179	pkpp6C-term	44/45	100%	40/45	99%
AB165	pkpp6C-term	61/80	80%	57/80	82%
AB223 x AB224	pPo2tef:kpp6NA	42/44	99%	34/44	86%
AB225	pPo2tef:kpp6NA	35/43	85%	21/43	56%
AB226 x AB227	pPo2tef:kpp6C-term	45/47	99%	45/47	100%
AB228	pPo2tef:kpp6C-term	42/45	98%	41/45	100%
AB175	pkpp6wt	6/43	15%	20/43	53%
AB161	pkpp6N-term	0/32	0%	18/32	65%
AB265	pkpp6/2	0/46	0%	34/46	80%

\* Angegeben ist die Anzahl von Pflanzen mit primärer Anthocyan-Reaktion bzw. Tumorbildung im Vergleich zur Gesamtzahl der infizierten Pflanzen 14 Tage nach Infektion.

Dieses Ergebnis ist nicht einfach zu interpretieren (siehe Diskussion). Um Sequenzfehler im Plasmid pkpp6NA, das als Ausgangskonstrukt verwendet wurde, auszuschließen, wurde das Plasmid aus dem Stamm AB171 reisoliert (siehe Abschnitt 4.3.1) und sequenziert. Dabei konnten in *kpp6* und in einem Bereich von 800 bp vor und 428 bp hinter dem Gen keine Sequenzabweichungen festgestellt werden (nicht gezeigt).

Eine weitere Möglichkeit wäre, dass das Einfügen der *NcoI*- bzw. *AscI*-Schnittstellen vor bzw. hinter dem Gen die Expression beeinträchtigt. Daher wurde das Plasmid pkpp6, das denselben Bereich umfasst wie pkpp6NA, die Modifikationen aber nicht besitzt, in den Stamm AB83 eingebracht. Die resultierende Transformante AB175 (*a1mfa2 bW2bE1 Δkpp6 ip'* [*kpp6*]*ip'*) zeigt den Pathogenitätsdefekt der *kpp6*-Deletionsmutante, genauso wie der vergleichbare Stamm AB171 (*a1mfa2 bW2bE1 Δkpp6 ip'*[*P*<sub>*kpp6*</sub>:*kpp6*]*ip'*), der die eingeführten Restriktions-Schnittstellen besitzt: nur bei wenigen Pflanzen ist eine primäre Anthocyan-Reaktion zu beobachten (Tabelle 6 und Abbildung 21A). Damit scheidet diese Erklärungsmöglichkeit aus.

In einer Northern-Analyse wurde geprüft, ob die Expression von *kpp6* in den in Tabelle 5 aufgeführten Stämmen verändert ist. Dazu dienten Kreuzungen der jeweiligen kompatiblen Stämme, die 24 Stunden auf aktivkohlehaltigem Festmedium gewachsen waren. Als Kontrollen wurden die diploiden Stämme FBD11 (*a1a2 b1b2*) und FBD12-3 (*a1a2 b1b1*) verwendet. In allen Kreuzungen können Transkripte von *bW*, *bE*, *dik6* und *mfa2* nachgewiesen werden (Abbildung 21C). Dies zeigt, dass in diesen Fällen ein Gemisch von pheromonstimu-

lierten und fusionierten Zellen vorliegen dürfte<sup>23</sup>. Bei Hybridisierung mit einer für *kpp6* spezifischen Sonde treten in der Wildtyp-Kreuzung FB1 x FB2 die bereits bekannten zwei Transkripte auf, in der Kreuzung der *kpp6*-Deletionsmutanten (AB81 x AB82) dagegen nicht (Abbildung 21C). Die Kreuzung von Stämmen, die *kpp6* unter Kontrolle seines eigenen Promotors im *ip*-Locus tragen (AB176 x AB177) zeigen die gleichen *kpp6*-Transkripte wie die Wildtyp-Kreuzungen (Abbildung 21C). Dies zeigt, dass zumindest für die Genregulation außerhalb der Pflanze der verwendete 2.317 bp lange 5'-Bereich von *kpp6* ausreichend zu sein scheint. Auch im Fall der Kreuzung von Stämmen, in denen der C-Terminus von Kpp6 unter Kontrolle des *kpp6*-Promotors steht (AB178 x AB179), können zwei Transkripte nachgewiesen werden, die, wie erwartet, etwa 600 bp kleiner sind (Abbildung 21C). Da in diesen Stämmen wegen der falsch angenommenen Translations-Startstelle nicht nur der für den N-Terminus kodierende Teil von *kpp6* sondern auch 81 bp des 5'-UTR fehlen (siehe oben), trotzdem aber ein kürzeres Transkript auftritt, befindet sich das 5'-Ende dieses Transkripts vermutlich mehr als 81 bp vor dem ATG-Startkodon (siehe Abschnitt 2.4.1). Dies zeigt sich auch im Vergleich mit den Signalen, die in den Kreuzungen von Stämmen erkennbar sind, in denen Kpp6 bzw. dessen C-Terminus ausgehend von dem konstitutiven *o2tef*-Promotor exprimiert wird (AB223 x AB224 bzw. AB226 x AB227): die entsprechenden Transkripte sind gut nachweisbar und etwas kürzer als die jeweiligen kürzeren *kpp6*-Transkripte bei Verwendung des *kpp6*-Promotors (Abbildung 21C).

Abschließend wurden noch zwei weitere Konstrukte hergestellt, die nur den N-Terminus von Kpp6 (Aminosäuren 1 bis 179) bzw. diesen N-Terminus in N-terminaler Fusion mit Kpp2 unter Kontrolle des *kpp6*-Promotors enthalten (pkpp6N-term bzw. pkpp6/2). Diese Konstrukte wurden in Einzelkopie in den *ip*-Locus des Stammes AB83 (*almfa2 bW2bE1 Δkpp6*) eingebracht. Die daraus entstandenen Transformanten AB161 (*almfa2 bW2bE1 Δkpp6 ip'* [ $P_{kpp6};kpp6N-term$ ] $ip^s$ ) und AB265 (*almfa2 bW2bE1 Δkpp6 ip'* [ $P_{kpp6};kpp6/2$ ] $ip^s$ ) waren ebenfalls nicht in der Lage, nach Infektion Anthocyanbildung in den Maispflanzen hervorzurufen (Tabelle 6 und Abbildung 21A). Die Konstrukte können folglich *kpp6*-Deletionsmutanten nicht komplementieren. Da das Volllängen Kpp6-Konstrukt dazu ebenfalls nicht in der Lage ist, müssen diese Versuche allerdings mit Vorbehalt betrachtet werden.

Zusammenfassend geht aus diesen Ergebnissen hervor, dass dem N-Terminus von Kpp6 in der Pathogenität keine Funktion zugeschrieben werden kann. Das C-terminale MAP-Kinase-Fragment von Kpp6 reicht zur Induktion der Tumor- und Anthocyanbildung aus.

---

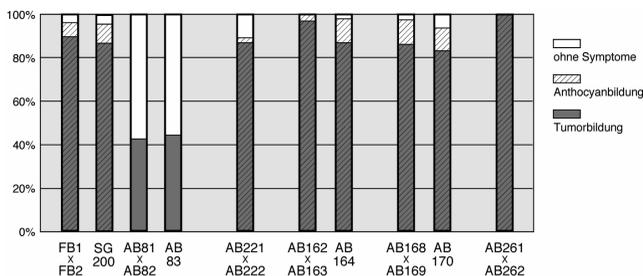
<sup>23</sup> Die relativen Signalstärken von *dik6* und *mfa2* schwanken zwischen den einzelnen Ansätzen. Dieser Effekt ist beim Vergleich von Kreuzungen schon mehrfach beobachtet worden und ist wahrscheinlich auf kleine, statistische Unterschiede in den Kultivierungsbedingungen zurückzuführen. Da in Fällen, in denen ein starkes *dik6*-Signal zu erkennen ist, das *mfa2*-Signal eher schwächer ist und umgekehrt (Abbildung 21C), reflektieren diese Signale vermutlich das relative Verhältnis von fusionierten zu pheromonstimulierten Zellen.

## 2.4.6 Die Überexpression von Kpp6 zeigt im Wildtyp keinen Effekt

Da es sich bei *kpp6* im Unterschied zu *kpp2* um ein transkriptionell reguliertes MAP-Kinasegen handelt, besteht die Möglichkeit, dass eine Überproduktion von Kpp6 oder von Teilen des Proteins zum falschen Zeitpunkt einen dominanten Effekt hervorrufen kann. Aus diesem Grund wurden zusätzlich zu den oben schon erwähnten Konstrukten pPo2tef:kpp6 und pPo2tef:kpp6C-term die Konstrukte pPo2tef:kpp6N-term und pPo2tef:kpp6/2 zur konstitutiven Expression des N-Terminus von Kpp6 bzw. des Fusionsproteins aus Kpp6 und Kpp2 hergestellt. Durch Einzelninsertion der Konstrukte in den *ip*-Locus der Stämme FB1 (*a1 b1*) und FB2 (*a2 b2*) bzw. des solopathogenen Stammes SG200 (*a1mfa2 bW2bE1*) (nur im Fall der Plasmide pPo2tef:kpp6N-term und pPo2tef:kpp6C-term) entstanden die in Tabelle 7 zusammengefassten Stämme (siehe Abschnitte 4.1.3 und 4.1.4). Das Expressionsniveau bei konstitutiver Expression durch den *o2tef*-Promotor entspricht etwa dem von Kpp6 unter induzierten Bedingungen (Abbildung 21C).

**Tabelle 7: Stämme zur Überexpression von Kpp6**

Transformanten	Genotyp	Ausgangsstamm
AB221	<i>a1 b1 ip'[P<sub>o2tef</sub>:kpp6]ip<sup>s</sup></i>	FB1
AB222	<i>a2 b2 ip'[P<sub>o2tef</sub>:kpp6]ip<sup>s</sup></i>	FB2
AB162	<i>a1 b1 ip'[P<sub>o2tef</sub>:kpp6C-term]ip<sup>s</sup></i>	FB1
AB163	<i>a2 b2 ip'[P<sub>o2tef</sub>:kpp6C-term]ip<sup>s</sup></i>	FB2
AB164	<i>a1mfa2 bW2bE1 ip'[P<sub>o2tef</sub>:kpp6C-term]ip<sup>s</sup></i>	SG200
AB168	<i>a1 b1 ip'[P<sub>o2tef</sub>:kpp6N-term]ip<sup>s</sup></i>	FB1
AB169	<i>a2 b2 ip'[P<sub>o2tef</sub>:kpp6N-term]ip<sup>s</sup></i>	FB2
AB170	<i>a1mfa2 bW2bE1 ip'[P<sub>o2tef</sub>:kpp6N-term]ip<sup>s</sup></i>	SG200
AB261	<i>a1 b1 ip'[P<sub>o2tef</sub>:kpp6/2]ip<sup>s</sup></i>	FB1
AB262	<i>a2 b2 ip'[P<sub>o2tef</sub>:kpp6/2]ip<sup>s</sup></i>	FB2



**Abbildung 22: Pathogenitätssymptome bei Überproduktion von Kpp6 in Wildtyp-Stämmen.** Graphische Darstellung der Daten aus Tabelle 8. Die prozentualen Angaben beziehen sich jeweils auf die Gesamtzahl der infizierten Pflanzen.

**Tabelle 8: Pathogenität bei Überexpression von Kpp6**

Inoculum	eingebrautes Konstrukt	Anthocyanbildung <sup>*</sup>	% von "Wildtyp"	Tumorbildung <sup>*</sup>	% von "Wildtyp"
FB1 x FB2		102/106	100%	95/106	100%
SG200		145/152	100%	132/152	100%
AB81 x AB82		0/87	0%	37/87	47%
AB83		0/158	0%	70/158	51%
AB221 x AB222	pPo2tef:kpp6NA	40/45	92%	39/45	97%
AB162 x AB163	pPo2tef:kpp6C-term	30/30	100%	29/30	100%
AB164	pPo2tef:kpp6C-term	44/45	100%	39/45	100%
AB168 x AB169	pPo2tef:kpp6N-term	35/36	100%	31/36	96%
AB170	pPo2tef:kpp6N-term	44/47	98%	39/47	96%
AB261 x AB262	pPo2tef:kpp6/2	31/31	100%	31/31	100%

<sup>\*</sup> Angegeben ist die Anzahl von Pflanzen mit Anthocyan- bzw. Tumorbildung im Vergleich zur Gesamtzahl der infizierten Pflanzen 14 Tage nach Infektion.

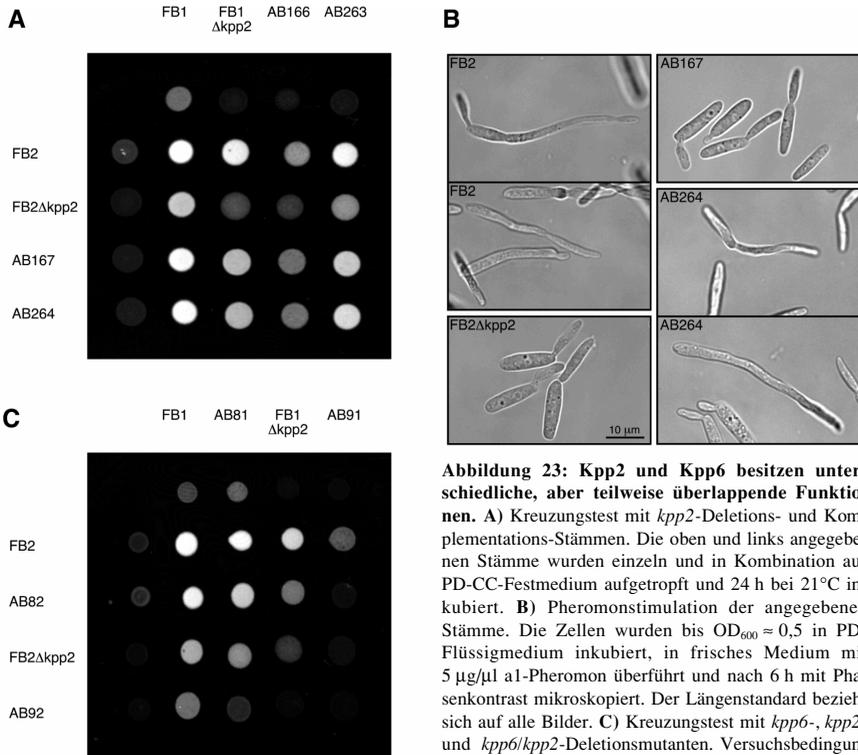
In Bezug auf Zellmorphologie und Wachstum unterschied sich keiner dieser Stämme von dem jeweiligen Ausgangsstamm, das Kreuzungsverhalten bzw. die Filamentbildung auf aktivkohlehaltigem Festmedium waren ebenfalls nicht gestört (nicht gezeigt). Auch bei Pflanzeninfektionen mit diesen Stämmen können keine Unterschiede zum Wildtyp festgestellt werden: Anthocyan-, Tumor- und Sporenbildung verlaufen normal (Tabelle 8, Abbildung 22 und nicht gezeigt).

Eine Überexpression von Kpp6, seiner N- bzw. C-terminalen Domäne und eines Fusionsproteins aus dem N-Terminus von Kpp6 vor Kpp2 ruft demnach in Wildtyp-Stämmen keinen erkennbaren Effekt hervor.

## 2.4.7 Kpp6 und Kpp2 besitzen unterschiedliche, aber teilweise überlappende Funktionen

Der hohe Grad an Sequenzähnlichkeit zwischen Kpp6 und Kpp2 (Abbildung 17B) könnte darauf hindeuten, dass beide Proteine an der Übermittlung des gleichen Signals beteiligt sind, also redundante Funktionen besitzen. Da die jeweiligen Deletionsmutanten jedoch unterschiedliche Phänotypen aufweisen, scheinen sie entweder ausschließlich oder zumindest zusätzlich in verschiedenen Signaltransduktions-Kaskaden zu liegen. Es stellt sich daher zunächst die Frage, worin der spezifische Unterschied zwischen Kpp2 und Kpp6 besteht. Dem N-Terminus von Kpp6, der den größten Unterschied zwischen beiden Proteinen darstellt, könnte dabei eine besondere Rolle zukommen. Aus diesem Grund wurde untersucht, ob eine Expression des C-Terminus von Kpp6 den Kreuzungsdefekt von *kpp2*-Deletionsmutanten aufheben kann. Dieselbe Analyse wurde auch mit dem Fusionsprotein aus dem N-Terminus von Kpp6 vor Kpp2 durchgeführt. Die entsprechenden Konstrukte pkpp6C-term und pPo2tef:kpp6/2 wurden dazu in Einzelkopie in den *ip*-Locus der *kpp2*-Deletionsmutanten

FB1 $\Delta$ kpp2 (*a1 b1*  $\Delta$ kpp2) und FB2 $\Delta$ kpp2 (*a2 b2*  $\Delta$ kpp2) eingebracht, die entsprechenden Transformanten waren AB166 (*a1 b1*  $\Delta$ kpp2 *ip*'[P<sub>kpp6</sub>:kpp6C-term]*ip*<sup>s</sup>) und AB167 (*a2 b2*  $\Delta$ kpp2 *ip*'[P<sub>kpp6</sub>:kpp6C-term]*ip*<sup>s</sup>), bzw. AB263 (*a1 b1*  $\Delta$ kpp2 *ip*'[P<sub>o2tef</sub>:kpp6/2]*ip*<sup>s</sup>) und AB264 (*a2 b2*  $\Delta$ kpp2 *ip*'[P<sub>o2tef</sub>:kpp6/2]*ip*<sup>s</sup>).



**Abbildung 23: Kpp2 und Kpp6 besitzen unterschiedliche, aber teilweise überlappende Funktionen.** **A)** Kreuzungstest mit *kpp2*-Deletions- und Komplementations-Stämmen. Die oben und links angegebenen Stämme wurden einzeln und in Kombination auf PD-CC-Festmedium aufgetropft und 24 h bei 21°C inkubiert. **B)** Phäromonstimulation der angegebenen Stämme. Die Zellen wurden bis  $OD_{600} \approx 0,5$  in PD-Flüssigmedium inkubiert, in frisches Medium mit 5  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  a1-Phäromon überführt und nach 6 h mit Phasenkontrast mikroskopiert. Der Längenstandard bezieht sich auf alle Bilder. **C)** Kreuzungstest mit *kpp6*-, *kpp2*- und *kpp6/kpp2*-Deletionsmutanten. Versuchsbedingungen siehe A).

Bei Kreuzung der *kpp2*-Deletionsmutanten auf aktivkohlehaltigem Festmedium kann der beschriebene Kreuzungsdefekt (Müller *et al.*, 1999) im Vergleich zur Wildtyp-Kreuzung beobachtet werden (Abbildung 23A). Die Expression des C-Terminus von Kpp6 zeigt in den *kpp2*-Mutanten keinen deutlichen Effekt, während es bei Expression des Kpp6/Kpp2-Fusionsproteins zu einer zumindest teilweisen Komplementation des Kreuzungsdefekts kommt (Abbildung 23A). Um dieses Ergebnis abzusichern, wurde ein sensitiverer Nachweis angewandt: Zellen des Stamms FB2 $\Delta$ kpp2 (*a2 b2*  $\Delta$ kpp2) reagieren nicht auf eine Zugabe von a1-Phäromon zum Medium, während FB2-Zellen (*a2 b2*) darauf mit der Bildung von Konjugationshyphen antworten (Abbildung 23B). Im Fall von AB167 (*a2 b2*  $\Delta$ kpp2 *ip*'[P<sub>kpp6</sub>:kpp6C-term]*ip*<sup>s</sup>) konnten in diesem Versuch ebenfalls keine Konjugationshyphen beobachtet werden, im Stamm AB264 (*a2 b2*  $\Delta$ kpp2 *ip*'[P<sub>o2tef</sub>:kpp6/2]*ip*<sup>s</sup>) dagegen schon (Abbildung 23B). Allerdings

konnte in diesem Fall die Ausbildung von Konjugationshyphen nur bei etwa 5-10% aller Zellen beobachtet werden, beim Wildtyp-Stamm FB2 (*a2 b2*) im Vergleich dazu bei über der Hälfte der Zellen (nicht gezeigt).

Zusätzlich wurden die Stämme in Pathogenitätstests eingesetzt. Kreuzungen von *kpp2*-Deletionsmutanten zeigten dabei eine reduzierte Pathogenität (19% von Wildtyp), genauso wie die Kreuzung der Stämme AB166 und AB167 (9% von Wildtyp), in denen zusätzlich der C-Terminus von Kpp6 exprimiert wird (Tabelle 9). Eine Infektion mit einer Kreuzung der Stämme AB163 und AB264, die das Kpp6/Kpp2-Fusionsprotein exprimieren, führt dagegen in fast der Hälfte der Fälle zur Tumorbildung (60% von Wildtyp; Tabelle 9).

Dies zeigt, dass das Kpp6/Kpp2-Fusionsprotein zu einem gewissen Grad die Funktion von Kpp2 übernehmen kann. Der C-Terminus von Kpp6 ist dazu nicht in der Lage.

Durch diese Ergebnisse ist aber nicht ausgeschlossen, dass Kpp6 und Kpp2 teilweise redundante Funktionen erfüllen. Dies könnte z. B. erklären, warum *kpp2*-Deletionsmutanten zwar einen Kreuzungsdefekt aufweisen, aber nicht vollständig steril sind, oder warum *kpp6*-Deletionsmutanten in ihrer Pathogenität deutlich reduziert, aber nicht apathogen sind. Zur Klärung dieser Möglichkeit wurde in den *kpp2*-Deletionsstämmen FB1 $\Delta$ kpp2 und FB2 $\Delta$ kpp2 der gesamte ORF von *kpp6* deletiert und durch eine Hygromycin-Resistenzkassette ersetzt. Die so entstandenen Doppelmutanten AB91 (*a1 b1*  $\Delta$ kpp2  $\Delta$ kpp6) und AB92 (*a2 b2*  $\Delta$ kpp2  $\Delta$ kpp6) zeigten zunächst eine normale Zellmorphologie und normales Wachstum (nicht gezeigt). Bei Kreuzung auf aktivkohlehaltigem Medium konnte keine Filamentbildung mehr beobachtet werden (Abbildung 23C). Dieser Effekt ist deutlich stärker als bei Kreuzung der *kpp2*-Deletionsstämme gegeneinander (Abbildung 23C). Die Doppelmutanten sind allerdings nicht steril, da sich bei Kreuzung mit kompatiblen Wildtyp-Stämme Filamentbildung zeigt. Interessanterweise ist diese Reaktion bei Kreuzung der Doppelmutanten mit kompatiblen *kpp6*-Deletionsmutanten deutlich reduziert (Abbildung 23C), was für eine Funktion von Kpp6 wäh-

**Tabelle 9: Einfluss von Kpp2 und Kpp6 auf die Pathogenität**

Inoculum	Tumorbildung*	% von "Wildtyp"
FB1 x FB2	81/110	100%
AB166 x AB167	2/46	6%
AB263 x AB264	20/45	60%
FB1 x AB82 <sup>24</sup>	30/43	95%
AB81 x FB2 <sup>24</sup>	32/45	97%
AB81 x AB82	29/204	19%
FB1 x FB2 $\Delta$ kpp2	41/45	100%
FB1 $\Delta$ kpp2 x FB2	34/47	98%
FB1 $\Delta$ kpp2 x FB2 $\Delta$ kpp2	7/47	20%
FB1 x AB92	47/57	100%
AB91 x FB2	74/92	100%
AB91 x AB92	0/97	0%

\* Angegeben ist die Anzahl von Pflanzen mit Tumorbildung im Vergleich zur Gesamtzahl der infizierten Pflanzen 14 Tage nach Infektion.

<sup>24</sup> Sowohl die Kreuzung FB1 x AB82, als auch die Kreuzung AB81 x FB2 zeigen in Bezug auf primäre Anthocyan-Reaktion und Tumorbildung keinen Unterschied zu Wildtyp-Kreuzungen. Das bedeutet, dass Kpp6 aus FB1 mit zwölf Alaninen und Kpp6 aus FB2 mit sechs Alaninen funktionell sein müssen. Deswegen ist es wahrscheinlich, dass alle bisher gefundenen *kpp6*-Allele für funktionelle Proteine kodieren (siehe Abschnitt 2.4.1).

rend der Kreuzungsvorgänge spricht. Zusammengefasst zeigen diese Ergebnisse, dass Kpp6 in Bezug auf die Übermittlung des Pheromonsignals teilweise die Funktion von Kpp2 übernehmen kann. Sie deuten aber auch an, dass es eventuell noch eine dritte MAP-Kinase geben könnte, die diese Funktion übernehmen kann, da die *kpp2/kpp6*-Doppelmutanten nicht steril sind.

Vergleicht man die Pathogenität der Einzel- und Doppelmutanten, so zeigt sich bei Kreuzung mit kompatiblen Wildtyp-Stämmen keine Reduktion (Tabelle 9). Die Pflanzeninfektion scheint demnach ein deutlich sensitiverer Test für erfolgte Zellfusion zu sein als der Kreuzungstest auf aktivkohlehaltigem Festmedium. Während jedoch die *kpp6*- und die *kpp2*-Deletionsmutanten in der Kreuzung in diesem Versuch auf etwa 20% des Wildtyp-Niveaus der Tumorbildung kommen, sind die *kpp6/kpp2*-Doppelmutanten vollständig apathogen (Tabelle 9). Das kann darauf hindeuten, dass Kpp2 in der Pflanze eventuell Funktionen von Kpp6 übernimmt. Es war schon bekannt, dass *kpp2*-Deletionsmutanten unabhängig von dem Kreuzungsdefekt auch eine reduzierte Pathogenität aufweisen (Müller *et al.*, 1999).

Diese Ergebnisse zeigen, dass Kpp2 und Kpp6 zwar vermutlich primär unterschiedliche Funktionen besitzen, während der Pflanzeninfektion aber auch eine Redundanz auftritt.

#### 2.4.8 Mutationen in der Aktivierungsdomäne von Kpp6 führen zu einem drastischen Pathogenitätsdefekt

Ein derartiger Fall teilweiser funktioneller Überlappung ist für die beiden MAP-Kinasen Fus3p und Kss1p aus *S. cerevisiae* beschrieben (Madhani *et al.*, 1997). In *fus3*-Deletionsmutanten kann Kss1p die Funktion von Fus3p in der Übermittlung des Pheromonsignals teilweise übernehmen. Erst durch die Verwendung inaktiver Fus3p-Varianten, die zur Signalweiterleitung nicht mehr in der Lage sind, konnte gezeigt werden, dass unter normalen Umständen diese Funktion von Fus3p allein erfüllt wird (Madhani *et al.*, 1997). In Analogie zu diesen Versuchen wurden durch gerichtete PCR-Mutagenese inaktive Kpp6-Varianten hergestellt, die in der Aktivierungsdomäne (Kpp6T355A,Y357F) bzw. der ATP-Bindestelle (Kpp6K220R) mutiert sind. Da in den vorigen Versuchen das Vollständige Kpp6-Konstrukt im *ip*-Locus den Pathogenitätsdefekt von *kpp6*-Deletionsmutanten nicht kompensieren konnte (siehe Abschnitt 2.4.5 und Abbildung 21A und B), sollten die Kpp6-Varianten über homologe Rekombination direkt in den *kpp6*-Locus eingebracht werden.

**Tabelle 10: Transformanten mit Kpp6-Varianten**

Transformanten	Genotyp	Ausgangsstamm
AB301	<i>a1 b1 kpp6NA</i>	FB1
AB302	<i>a2 b2 kpp6NA</i>	FB1
AB303	<i>a1 mfa2 bW2bE1 kpp6NA</i>	SG200
AB311	<i>a1 b1 kpp6T355A,Y357F</i>	FB1
AB312	<i>a2 b2 kpp6T355A,Y357F</i>	FB2
AB313	<i>a1 mfa2 bW2bE1 kpp6T355A,Y357F</i>	SG200
AB321	<i>a1 b1 kpp6K220R</i>	FB1
AB322	<i>a2 b2 kpp6K220R</i>	FB2
AB323	<i>a1 mfa2 bW2bE1 kpp6K220R</i>	FB2

Die dafür benötigten Konstrukte wurden ausgehend von dem Volllängen-Konstrukt *pkpp6NA* durch Hinzufügen einer 1.327 bp langen 3'-Flanke von *kpp6* und Austausch von *kpp6* durch die Mutantenallele erzeugt (siehe Abschnitt 4.1.4). Die Plasmide *pkpp6NA-Cbx* (als Positivkontrolle), *pkpp6T355A,Y357F-Cbx* und *pkpp6K220R-Cbx* besitzen also 2.371 bp des *kpp6*-Promotors, das gesamte Gen, 428 bp des 3'-UTR, daran anschließend eine Carboxin-Resistenzkassette zur Selektion, und hinter dieser die 1.327 bp lange 3'-Flanke von *kpp6*. Bei Transformation dieser Konstrukte in die *kpp6*-Deletionsmutanten AB81 (*a1 b1 Δkpp6*), AB82 (*a2 b2 Δkpp6*) und AB83 (*a1mfa2 bW2bE1 Δkpp6*) konnten Transformanten, in denen die Hygromycin-Resistenzkassette durch *kpp6* bzw. die Varianten ersetzt ist, wegen des Verlusts der Hygromycin-Resistenz einfach vorselektiert werden. Die so erhaltenen Stämme sind in Tabelle 10 aufgeführt und wiesen in Bezug auf Zellmorphologie und Wachstumsverhalten keine Auffälligkeiten auf (nicht gezeigt).

Bei der Analyse des Kreuzungsverhaltens auf aktivkohlehaltigem Festmedium konnte bei den Stämmen, die inaktive Kpp6-Varianten exprimieren, eine leichte Reduktion in der Filamentbildung im Vergleich zu Wildtyp-Kreuzungen beobachtet werden (Abbildung 24A, B und C). Auf die Zugabe von Pheromon zum Medium reagieren aber alle Stämme mit der Ausbildung von Konjugationshyphen (Abbildung 24D). Kpp6 kann daher für die Übermittlung des Pheromonsignals bestenfalls eine untergeordnete Rolle zugeordnet werden.

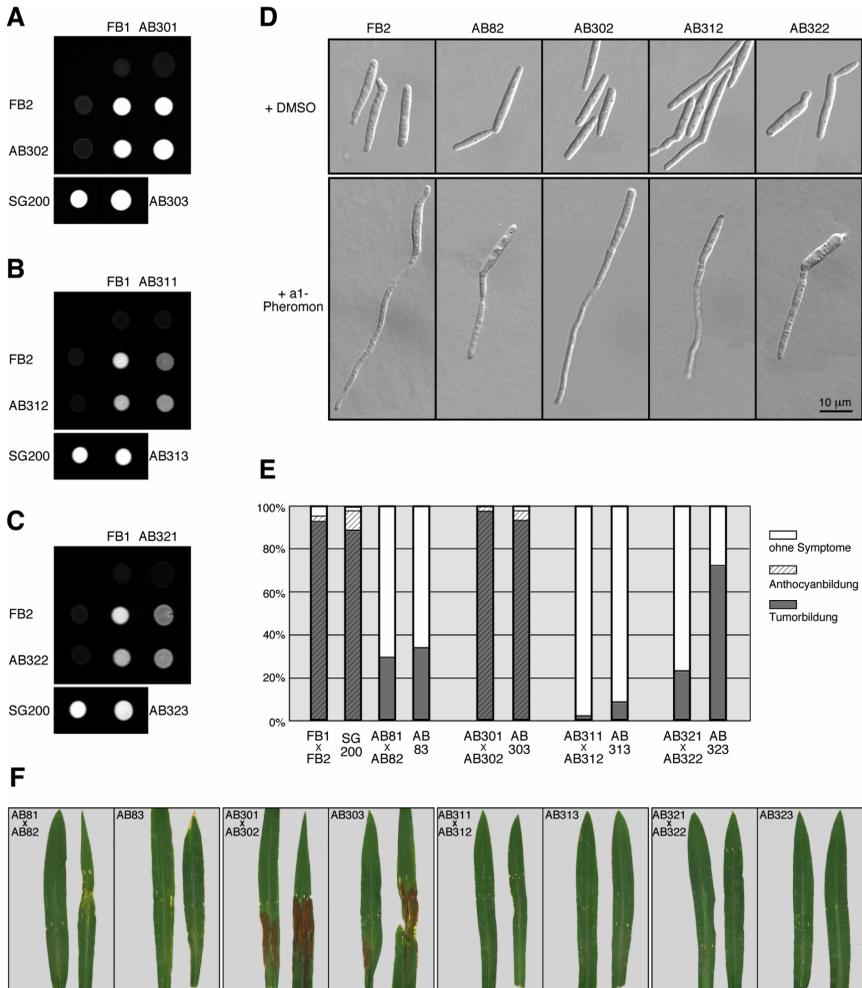
In den Pflanzeninfektionen zeigen die Stämme AB301, AB302 und AB303, die das Wildtyp Kpp6-Allel tragen, wie erwartet keine Unterschiede zum Wildtyp (Tabelle 11 und Abbildung 24E und F). Das verwendete Konstrukt ist demnach funktionell. Dies ist eine weitere Bestätigung dafür, dass die beobachteten Probleme mit dem Volllänge-Konstrukt im *ip*-Locus nicht durch einen Fehler im Konstrukt verursacht sind (siehe Abschnitt 2.4.5).

Demgegenüber können die Stämme mit inaktiven Kpp6-Varianten weder bei Kreuzung noch als solopathogener Stamm nach Infektion eine primäre Anthocyan-Reaktion hervorrufen (Abbildung 24E und F und Tabelle 11). Die Mutation der ATP-Bindestelle (in den Stämmen AB321 und AB322, bzw. AB323) führt zu einer Reduktion der Tumorbildung, wie sie in etwa bei Infektion mit *kpp6*-Deletionsmutanten zu beobachten ist (Abbildung 24E und Tabelle 11).

**Tabelle 11: Pathogenität der Stämme mit inaktiven Kpp6-Varianten**

Inoculum	primäre Ac-Reaktion <sup>a</sup>	% von "Wildtyp"	Tumorbildung <sup>a</sup>	% von "Wildtyp"
FB1 x FB2	40/42	100%	39/42	100%
SG200	43/44	100%	39/44	100%
AB81 x AB82	0/44	0%	13/44	32%
AB83	0/44	0%	15/44	38%
AB301 x AB302	39/39	100%	38/39	100%
AB303	43/44	100%	41/44	100%
AB311 x AB312	0/46	0%	1/46	2%
AB313	0/46	0%	4/46	10%
AB321 x AB322	0/43	0%	10/43	25%
AB323	0/47	0%	34/47	82%

<sup>a</sup> Angegeben ist die Anzahl von Pflanzen mit primärer Anthocyan-Reaktion bzw. Tumorbildung im Vergleich zur Gesamtzahl der infizierten Pflanzen 14 Tage nach Infektion.



**Abbildung 24: Kreuzungs-, Pheromonstimulations- und Pathogenitäts-Tests mit Stämmen mit inaktiven Kpp6-Varianten.** A-C) Kreuzungstest mit Stämmen mit verschiedenen Kpp6-Allelen. Die angegebenen Stämme wurden einzeln und in Kombination auf PD-CC-Festmedium aufgetropft und 24 h bei 21°C inkubiert. D) Pheromonstimulation der angegebenen Stämme. Die Zellen wurden bis  $OD_{600} \approx 0,5$  in PD-Flüssigmedium inkubiert, in frisches Medium mit DMSO bzw. 5  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$   $\alpha 1$ -Pheromon überführt und nach 6 h mittels DIC-Mikroskopie betrachtet. Der Längenstandard bezieht sich auf alle Bilder. E) Graphische Darstellung der Daten aus Tabelle 11. Die prozentualen Angaben beziehen sich jeweils auf die Gesamtzahl der infizierten Pflanzen. F) Primäre Anthocyan-Reaktion auf der Blattspreite 14 Tage nach Infektion mit den angegebenen Kreuzungen bzw. Stämmen.

Bei Infektion mit dem Stamm AB323 (*almfa2 bW2bE1 kpp6K220R*) kommt es zwar zu keiner deutlichen Reduktion in der Anzahl der Pflanzen, die Tumorbildung zeigen, die Tumore

sind jedoch deutlich kleiner und befinden sich an häufig an unüblichen Stellen auf der Pflanze (vgl. Abschnitt 2.4.3).

Die Mutationen in der Aktivierungsdomäne (in den Stämmen AB311 und AB312, bzw. AB313) führen dagegen zu einem drastischen Pathogenitätsdefekt. Im Fall der Kreuzung AB311 x AB312 bildete nur eine der 46 infizierten Pflanzen einen Tumor aus, bei Infektion mit AB313 traten an vier der 46 infizierten Pflanzen jeweils ein Tumor auf (Abbildung 24E und Tabelle 11). Diese fünf Tumore hatten alle einen Durchmesser von weniger als 2 mm, also deutlich kleiner als Tumore von Infektionen mit Wildtyp-Stämmen. Es konnte keine Sporenbildung nachgewiesen werden (nicht gezeigt), was allerdings bei Tumoren dieser Größe häufig der Fall ist (nicht gezeigt und K.-H. Braun, pers. Mitteilung).

## 2.4.9 Die beiden Transkripte von *kpp6* kodieren für das gleiche Protein

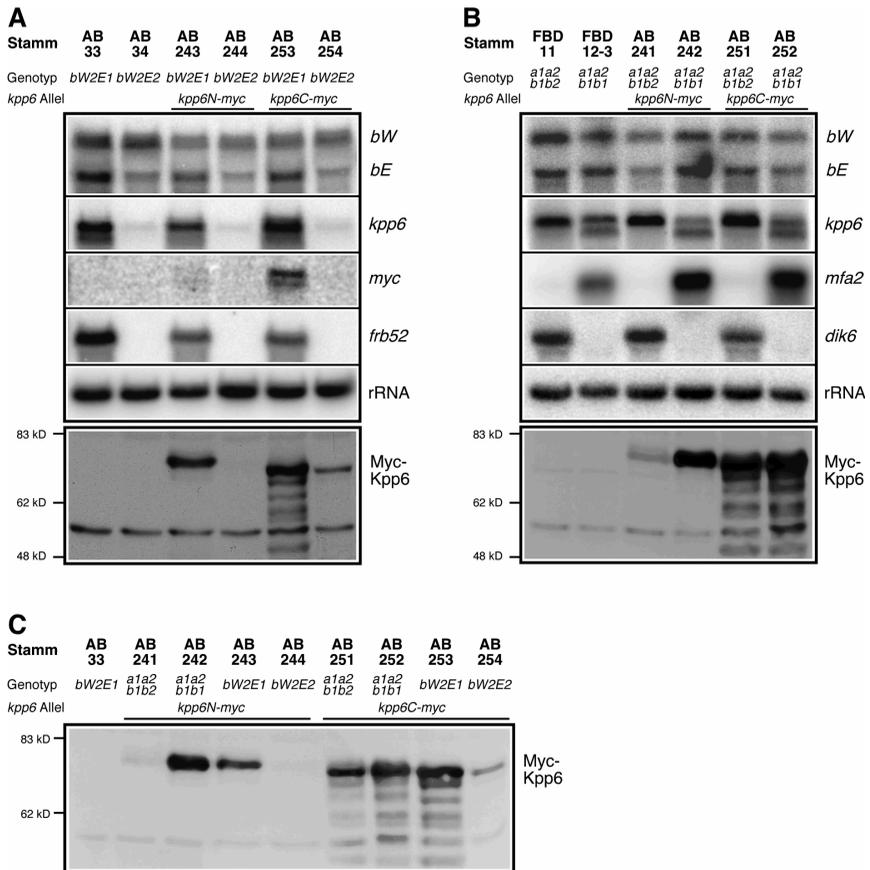
Als nächstes sollte die Frage beantwortet werden, ob ausgehend von den beiden *kpp6*-Transkripten das gleiche oder zwei unterschiedliche Proteine translatiert werden. Die bisherigen Versuche zeigen (siehe Abschnitt 2.4.1), dass beide Transkripte den gesamten ORF von *kpp6* enthalten. Trotzdem ist es denkbar, dass in den beiden Fällen unterschiedliche Translations-Startpunkte verwendet werden. Daher wurden Stämme hergestellt, die Epitop-markierte Varianten von Kpp6 exprimieren. In Western-Analysen sollte anschließend die jeweilige Größe der Fusionsproteine unter b-Induktions- bzw. Pheromon-Stimulationsbedingungen ermittelt werden. Als Epitop wurde ein für einen Triple-Myc-Tag kodierendes Fragment mittels gerichteter PCR-Mutagenese an das angenommene 5'- bzw. 3'-Ende von *kpp6* fusioniert (*kpp6N-myc* bzw. *kpp6C-myc*). Die entsprechenden Konstrukte wurden in Einzelkopie in den *ip*-Locus von Stämmen eingebracht, die entweder jeweils das eine oder das andere Transkript zeigen (FBD11 (*a1a2 b1b2*) und FBD12-3 (*a1a2 b1b1*); Abbildung 17D), oder die eine regulierte Expression des bW/bE-Heterodimers und damit von Kpp6 erlauben (AB33 (*a2 P<sub>nav</sub>:bW2, bE1*) und AB34 (*a2 P<sub>nav</sub>:bW2, bE2*); Abbildung 17C). Die entstandenen Stämme sind in Tabelle 12 zusammengefasst.

**Tabelle 12: Stämme mit Epitop-markierten Kpp6-Varianten**

Transformanten	Genotyp	Ausgangsstamm
AB241	<i>a1a2 b1b2 ip</i> [ <i>P<sub>ippp6</sub>:kpp6N-myc</i> ] <i>ip'</i>	FBD11
AB242	<i>a1a2 b1b1 ip</i> [ <i>P<sub>ippp6</sub>:kpp6N-myc</i> ] <i>ip'</i>	FBD12-3
AB243	<i>a2 P<sub>nav</sub>:bW2, bE1 ip</i> [ <i>P<sub>ippp6</sub>:kpp6N-myc</i> ] <i>ip'</i>	AB33
AB244	<i>a2 P<sub>nav</sub>:bW2, bE2 ip</i> [ <i>P<sub>ippp6</sub>:kpp6N-myc</i> ] <i>ip'</i>	AB34
AB251	<i>a1a2 b1b2 ip</i> [ <i>P<sub>ippp6</sub>:kpp6C-myc</i> ] <i>ip'</i>	FBD11
AB252	<i>a1a2 b1b1 ip</i> [ <i>P<sub>ippp6</sub>:kpp6C-myc</i> ] <i>ip'</i>	FBD12-3
AB253	<i>a2 P<sub>nav</sub>:bW2, bE1 ip</i> [ <i>P<sub>ippp6</sub>:kpp6C-myc</i> ] <i>ip'</i>	AB33
AB254	<i>a2 P<sub>nav</sub>:bW2, bE2 ip</i> [ <i>P<sub>ippp6</sub>:kpp6C-myc</i> ] <i>ip'</i>	AB34

Zur Kontrolle wurden zunächst Northern-Analysen durchgeführt. Dabei konnte die Transkripte der *b*-Gene in allen Stämmen, die b-induzierte Expression von *frb52* bzw. *dik6* in den Stämmen AB33, AB243 und AB253, bzw. FBD11, AB241 und AB251, die pheromoninduzierte Expression von *mfa2* in den Stämmen FBD12-3, AB242 und AB252 und die Repression von *mfa2* in den Stämmen FBD11, AB241 und AB251 unter den Versuchsbedingungen

nachgewiesen werden (Abbildung 25A und B). Die Stämme zeigen also die erwartete pheromon- und b-abhängige Regulation.



**Abbildung 25: Expression von N- und C-terminal markierten Kpp6-Varianten.** A) Die angegebenen Stämme wurden in AM-Flüssigmedium bis  $OD_{600} \approx 0,5$  inkubiert, für 5 h in NM-Flüssigmedium induziert und anschließend die Zellen für die RNA- und Protein-Präparation geerntet. B) Die angegebenen Stämme wurden in CM-Flüssigmedium bis  $OD_{600} \approx 0,5$  inkubiert, in einer Dichte von  $0,1 OD_{600}/cm^2$  auf CM-CC-Festmedium ausgestrichen, für 24 h bei  $29^\circ C$  inkubiert und anschließend die Zellen für die RNA- und Protein-Präparation geerntet. C) Größenvergleich der markierten Kpp6-Fusionsproteine aus den Präparationen von A) und B). Für die Northern-Analysen wurde jeweils etwa  $10 \mu g$  RNA, für die Western-Analysen ungefähr  $100 \mu g$  Proteinextrakt aufgetrennt. In den Western-Analysen zeigen sich bei Verwendung des Anti-Myc-Antikörpers kreuzhybridisierende Proteine mit apparenten Molekularmassen von 84, 70 und 55 kD.

Bei Hybridisierung mit einer für *kpp6* spezifischen Sonde trat im Fall von Stamm FBD12-3 und seiner Derivate AB242 und AB252 nicht nur das kürzere, sondern auch das längere *kpp6*-

Transkript auf (Abbildung 25B). Diese Unterschiede zeigten sich bei mehreren Analysen (vgl. Abbildungen 17D, 21C und 26B). Demgegenüber ist unter b-Induktionsbedingungen fast ausschließlich das längere der beiden Transkripte detektierbar (vgl. Abbildungen 10, 11, 17D, 21C, 25A und B, 26 und 27A). Auf diese Effekte wird in Abschnitt 2.4.11 genauer eingegangen.

In den Western-Analysen mit diesen Stämmen unter Verwendung eines Myc-spezifischen Antikörpers zeigte sich in allen Fällen ein Größenunterschied zwischen den N- und den C-terminal markierten Kpp6-Varianten von etwa 3 kD (Abbildung 25). Dies lässt vermuten, dass nicht der zunächst angenommene und mit dem Epitop-Tag versehene Translations-Startpunkt in *U. maydis* verwendet wird, sondern ein weiter stromabwärts gelegenes ATG benutzt wird. Dazu kommen zwei mögliche Startkodons in Frage, die 72 bzw. 81 Nukleotide weiter 3' liegen, so dass bei beiden ein Fusionsprotein gebildet werden würde, das etwa 3 kD kleiner wäre als angenommen. Beide entsprechen genauso wie die zunächst angenommene Startstelle relativ gut der Konsensus-Sequenz für Translations-Startstellen in filamentösen Pilzen (Ballance, 1990; Konsensus: CAACATG; an Position -81<sup>25</sup>: CATCATG; an Position -9: CGACATG; an Position 1: TAAACATG). Bei der Sequenzanalyse des für den Alaninlinker kodierenden Bereichs von *kpp6* in 18 verschiedenen *U. maydis*-Stämmen zeigte sich, dass drei Stämme eine Punktmutation an Position -7 aufweisen (ATT statt ATG). Das lässt die Benutzung des weiter stromabwärts gelegenen Startkodons wahrscheinlicher erscheinen. Aus diesem Grund wurden alle Positionsangaben im *kpp6*-Locus auf diese Stelle bezogen (siehe Abschnitt 2.4.1 und Abbildung 17A und B).

Vergleicht man die in den Western-Analysen unter b-Induktions- und unter Pheromon-Stimulationsbedingungen bei Verwendung des Anti-Myc-Antikörpers auftretenden Signale (Abbildung 25C), so finden sich keine Unterschiede in der Größe. Es zeigen sich keine Signale kleinerer Proteine, Kpp6 wird daher vermutlich nicht posttranslational modifiziert (Abbildung 25C). Die Signale geringerer Größe, die bei den C-terminal markierten Kpp6-Varianten auftreten, werden wahrscheinlich von N-terminal verkürzten Abbauprodukten hervorgerufen (Abbildung 25C).

Diese Ergebnisse unterstützen die Annahme, dass ausgehend von den beiden Transkripten von *kpp6* das gleiche Protein translatiert wird.

#### **2.4.10 Die PRE-Boxen sind für die Expression von Kpp6 nicht essentiell**

Da sich ungefähr 400 bp vor der Translations-Startstelle von *kpp6* zwei PRE-Boxen befinden und die Expression des Gens unter Kreuzungsbedingungen induziert ist (Abbildung 17A und D), kann auf eine transkriptionelle Regulation durch den Transkriptionsfaktor Prf1 spekuliert

---

<sup>25</sup> Die Positionsangaben beziehen sich auf die letztendlich als wahrscheinlich betrachtete Translations-Startstelle (siehe auch Abschnitt 2.4.1)

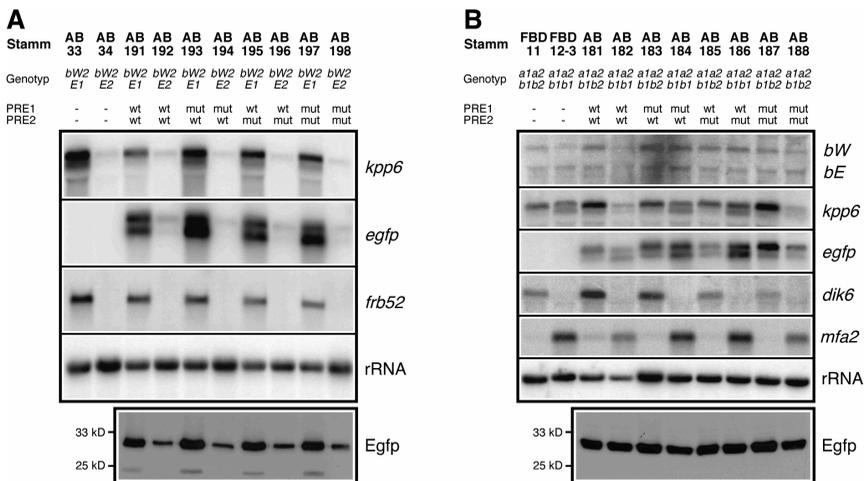
werden. In diesem Fall sollte eine Mutation oder Deletion der PRE-Boxen einen Einfluss auf die Transkription von *kpp6* zeigen. Die Untersuchungen werden dadurch erschwert, dass sich der Transkriptions-Startpunkt des längeren der beiden Transkripte genau in der zweiten PRE-Box befindet (siehe Abschnitt 2.4.1). Bei einer Deletion der PRE-Boxen auftretende Effekte könnten daher nicht eindeutig erklärt werden. Sie können sowohl durch die fehlende Bindung von Prf1 an den Promotor als auch durch Behinderung der generellen Transkriptions-Maschinerie hervorgerufen werden. Aus diesem Grund wurden in die PRE-Boxen durch gerichtete PCR-Mutagenese Punktmutationen eingeführt, die zumindest *in vitro* die Bindung von Prf1 nicht mehr ermöglichen (bei PRE1: TCCCTTTGT wird zu TCCTTTTGT; bei PRE2: ACCCTTTGT wird zu ACCTTTTGT; vgl. Hartmann, 1997). Diese mutierten *kpp6*-Promotoren wurden dann als 2.371 bp lange Fragmente mit Einzel- bzw. Doppelmutation vor *egfp* in ein Plasmid eingebracht, das zur Integration in den *ip*-Locus geeignet ist. Die entsprechenden Konstrukte sind pKpp6(PRE1mut):*egfp*, pKpp6(PRE2mut):*egfp* und pKpp6(PRE1,2mut):*egfp*. Als Kontrolle diente ein Konstrukt mit dem Wildtyp-Promotor, pKpp6:*egfp*. Diese Konstrukte wurden wie im vorigen Abschnitt in Einzelkopie in den *ip*-Locus der Stämme FBD11 (*a1a2 b1b2*) und FBD12-3 (*a1a2 b1b1*), bzw. AB33 (*a2 P<sub>nat</sub>:bW2,bE1*) und AB34 (*a2 P<sub>nat</sub>:bW2,bE2*) eingebracht. Daraus entstanden die in Tabelle 13 zusammengefassten Stämme.

Tabelle 13: Stämme mit Mutationen in den PRE-Boxen

Transformanten	Genotyp	Ausgangsstamm
AB181	<i>a1a2 b1b2 ip</i> [P <sub>app6</sub> : <i>egfp</i> ] <i>ip</i> '	FBD11
AB182	<i>a1a2 b1b1 ip</i> [P <sub>app6</sub> : <i>egfp</i> ] <i>ip</i> '	FBD12-3
AB183	<i>a1a2 b1b2 ip</i> [P <sub>app6</sub> (PRE1mut): <i>egfp</i> ] <i>ip</i> '	FBD11
AB184	<i>a1a2 b1b1 ip</i> [P <sub>app6</sub> (PRE1mut): <i>egfp</i> ] <i>ip</i> '	FBD12-3
AB185	<i>a1a2 b1b2 ip</i> [P <sub>app6</sub> (PRE2mut): <i>egfp</i> ] <i>ip</i> '	FBD11
AB186	<i>a1a2 b1b1 ip</i> [P <sub>app6</sub> (PRE2mut): <i>egfp</i> ] <i>ip</i> '	FBD12-3
AB187	<i>a1a2 b1b2 ip</i> [P <sub>app6</sub> (PRE1,2mut): <i>egfp</i> ] <i>ip</i> '	FBD11
AB188	<i>a1a2 b1b1 ip</i> [P <sub>app6</sub> (PRE1,2mut): <i>egfp</i> ] <i>ip</i> '	FBD12-3
AB191	<i>a2 P<sub>nat</sub>:bW2,bE1 ip</i> [P <sub>app6</sub> : <i>egfp</i> ] <i>ip</i> '	AB33
AB192	<i>a2 P<sub>nat</sub>:bW2,bE2 ip</i> [P <sub>app6</sub> : <i>egfp</i> ] <i>ip</i> '	AB34
AB193	<i>a2 P<sub>nat</sub>:bW2,bE1 ip</i> [P <sub>app6</sub> (PRE1mut): <i>egfp</i> ] <i>ip</i> '	AB33
AB194	<i>a2 P<sub>nat</sub>:bW2,bE2 ip</i> [P <sub>app6</sub> (PRE1mut): <i>egfp</i> ] <i>ip</i> '	AB34
AB195	<i>a2 P<sub>nat</sub>:bW2,bE1 ip</i> [P <sub>app6</sub> (PRE2mut): <i>egfp</i> ] <i>ip</i> '	AB33
AB196	<i>a2 P<sub>nat</sub>:bW2,bE2 ip</i> [P <sub>app6</sub> (PRE2mut): <i>egfp</i> ] <i>ip</i> '	AB34
AB197	<i>a2 P<sub>nat</sub>:bW2,bE1 ip</i> [P <sub>app6</sub> (PRE1,2mut): <i>egfp</i> ] <i>ip</i> '	AB33
AB198	<i>a2 P<sub>nat</sub>:bW2,bE2 ip</i> [P <sub>app6</sub> (PRE1,2mut): <i>egfp</i> ] <i>ip</i> '	AB34

Mit diesen Stämmen wurden Northern-Analysen mit für *kpp6* und *egfp* spezifischen Sonden durchgeführt. Die *egfp*-Signale sollten Auskunft darüber geben, ob die Mutation der PRE-Boxen einen Einfluss auf die Transkriptlänge hat. Aus unbekanntem Gründen zeigen sich beim Wildtyp-Promotor unter b-induzierenden Bedingungen (in Stamm AB191) zwei unterschiedlich lange *egfp*-Transkripte, aber nur ein *kpp6*-Transkript (Abbildung 26A). Dies könnte dar-

auf hindeuten, dass im *ip*-Locus zusätzliche Regulationsmechanismen auftreten, oder der verwendete Promotorbereich für die korrekte Regulation nicht ausreicht. Nachdem dieses Phänomen jedoch nur bei Expression von *egfp* und nicht bei Expression von *kpp6* im *ip*-Locus auftritt (Abbildung 21C und nicht gezeigt), handelt es sich wohl eher um einen Effekt, der in der Kombination des *kpp6*-Promotors mit *egfp* begründet ist. So kann aus diesem Experiment keine sichere Aussage auf den Einfluss der Mutationen in den PRE-Boxen auf die Transkriptlänge getroffen werden. Die Transkriptmengen von *kpp6* und *egfp* sind dagegen in allen Fällen vergleichbar (Abbildung 26A und B). Als Kontrolle dienten Hybridisierungen mit spezifischen Sonden für die b-abhängig exprimierte Gene *frb52* und *dik6* und für das pheromonabhängig exprimierte Gen *mfa2*. Damit konnten in allen Fällen die bei b- bzw. Pheromoninduktion erwarteten Signale detektiert werden (Abbildung 26A und B).



**Abbildung 26: Einfluss von Mutationen in den PRE-Boxen auf die Expression von Kpp6.** **A)** Die angegebenen Stämme wurden in AM-Flüssigmedium bis  $OD_{600} \approx 0,5$  inkubiert, für 5 h in NM-Flüssigmedium induziert und anschließend die Zellen für die RNA- und Protein-Präparation geerntet. **B)** Die angegebenen Stämme wurden in CM-Flüssigmedium bis  $OD_{600} \approx 0,5$  inkubiert, in einer Dichte von  $0,1 OD_{600}/cm^2$  auf CM-CC-Festmedium ausgestrichen, für 24 h bei  $29^\circ C$  inkubiert und anschließend die Zellen für die RNA- und Protein-Präparation geerntet. Für die Northern-Analysen wurde jeweils etwa  $10 \mu g$  RNA, für die Western-Analysen ungefähr  $100 \mu g$  Proteinextrakt aufgetrennt.

Einen deutlich besseren Anhaltspunkt zur Bedeutung der PRE-Boxen für die Expression von Kpp6 bieten hier die Western-Analysen mit Anti-GFP-Antikörper. Die Stämme mit Mutationen in den PRE-Boxen zeigen weder ein geringeres basales noch ein geringeres b-induziertes EGFP-Signal (Stämme AB191 bis 198 in Abbildung 26A) als entsprechende Varianten mit Wildtyp-Promotor. Auch beim Vergleich der b- mit der pheromoninduzierten EGFP-Expression kann kein Unterschied festgestellt werden (Stämme AB181 bis 188 in Abbildung 26B).

Die PRE-Boxen scheinen daher für die Expression von Kpp6 nicht essentiell zu sein. Damit stellt sich die Frage, ob bzw. wie weit Prf1 überhaupt an der transkriptionellen Regulation von *kpp6* beteiligt ist.

#### 2.4.11 Prf1 hat keinen Einfluss auf die Expression von Kpp6

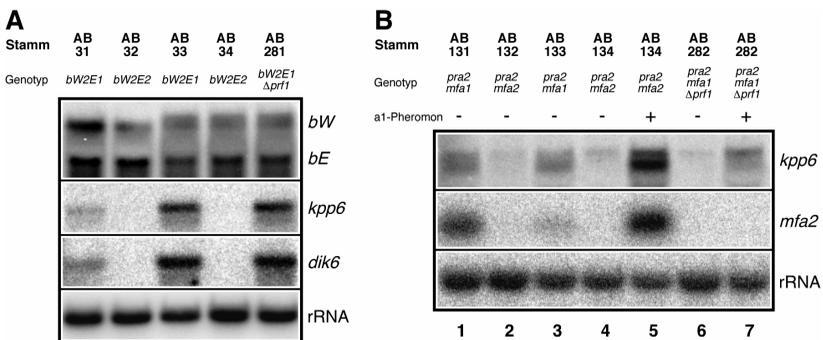
Untersuchungen zur Rolle von Prf1 bei der Regulation von a- oder b-regulierten Genen werden dadurch erschwert, dass Prf1 für die Expression der Pheromon- und Rezeptorgene sowie der Gene des *a*- und des *b*-Locus essentiell ist. Aus diesem Grund war es bislang unmöglich, zwischen direkten Effekten von Prf1 auf die Expression eines Gens und indirekten Effekten durch die Prf1-abhängige Regulation der Paarungstypgene zu unterscheiden. Dazu muss die Expression dieser Gene der Kontrolle durch Prf1 entzogen werden. In den Stämmen AB31 (*a2 P<sub>crq</sub>:bW1,bE2*) und AB33 (*a2 P<sub>nar</sub>:bW1,bE2*) ist das der Fall. Daher wurde im Stamm AB33 der gesamte ORF von *prf1* deletiert und durch eine Nourseothricin-Resistenzkassette ersetzt. Der resultierende Stamm AB281 (*a2 P<sub>nar</sub>:bW1,bE2 Δprf1*) zeigt bei Induktion der *b*-Genexpression normale Filamentbildung (nicht gezeigt). Dies entspricht den Erwartungen, da schon gezeigt werden konnte, dass der Verlust von Prf1 keinen Einfluss auf b-abhängige Prozesse wie Filamentbildung und Pathogenität hat, wenn die Expression der Gene des *b*-Locus gewährleistet ist (Hartmann *et al.*, 1996). In Northern-Analysen unter induzierenden Bedingungen können in diesem Stamm sowohl *dik6*- als auch *kpp6*-Transkripte nachgewiesen werden (Abbildung 27A). Das bedeutet, dass die b-abhängige Regulation von *kpp6* unabhängig von Prf1 erfolgt, was ebenfalls nicht überraschend ist.

Interessanter ist in diesem Zusammenhang die Untersuchung der Bedeutung von Prf1 während der a-abhängigen Induktion von *kpp6*. Dazu wurden Derivate des Stammes FB2 (*a2 b2*) hergestellt, die eine regulierte Expression von Pheromon- und Rezeptorgen erlauben. In diesen Stämmen, AB131 (*P<sub>crq</sub>:pra2,mfa1 b2*), AB132 (*P<sub>crq</sub>:pra2,mfa2 b2*), AB133 (*P<sub>nar</sub>:pra2,mfa1 b2*) und AB134 (*P<sub>nar</sub>:pra2,mfa2 b2*), stehen jeweils *pra2* und entweder *mfa1* oder *mfa2* unter der Kontrolle regulierbarer Promotoren. Die entsprechenden Konstrukte wurden durch homologe Integration in den Promotorbereich von *pra2* im *a2*-Locus eingebracht (siehe Abschnitt 2.6.1). Die Stämme besitzen daher zusätzlich noch *mfa2* mit seinem eigenen Promotor (Abbildung 31).

Mit diesen Stämmen können Prozesse nach Pheromonstimulation der Zellen simuliert werden. So zeigt sich z. B. bei Northern-Analysen unter induzierenden Bedingungen in den Stämmen AB131 bzw. AB133 eine induzierte Expression von *kpp6* und *mfa2*, in den Kontrollstämmen AB132 und AB134 dagegen nicht (Abbildung 27B, Spuren 1 bis 4). Bei Zugabe von a1-Pheromon zum Medium kann auch im Stamm AB134 eine induzierte Expression von *kpp6* und *mfa2* nachgewiesen werden (Abbildung 27B, Spur 5). Auf die Phänotypen bei Induktion der a-Genexpression wird in Abschnitt 2.6.2 näher eingegangen. Da die Pheromon- und Rezeptorgene der Regulation durch Prf1 entzogen sind, kann in diesen Stämmen der Ef-

fekt eines Verlusts von Prf1 auf die Expression von *a*-regulierten Genen untersucht werden. Dazu wurde im Stamm AB133 ebenfalls der gesamte ORF von *prf1* deletiert und durch eine Nourseothricin-Resistenzkassette ersetzt, wodurch der Stamm AB282 ( $P_{nar};pra2,mfa1\ b2\ \Delta prf1$ ) entstand.

Bei der Northern-Analyse dieses Stammes zeigte sich unter induzierenden Bedingungen keine induzierte Expression von *kpp6* und *mfa2* (Abbildung 27B, Spur 6). Bei Zugabe von  $\alpha$ 1-Pheromon zum Medium kann wieder ein *kpp6*-Signal nachgewiesen werden, jedoch kein *mfa2*-Signal (Abbildung 27B, Spur 7). Daraus ergeben sich zwei Folgerungen: (1) Prf1 hat offensichtlich neben der Regulation der Gene des *a*- und des *b*-Locus noch mindestens eine weitere Funktion. Diese könnte die Reifung oder den Export des Pheromons betreffen. (2) Die pheromoninduzierte Expression von *kpp6* wird im Gegensatz zu der von *mfa2* nicht durch Prf1 vermittelt. In Zusammenhang damit ist es auch interessant, dass bei allen bislang untersuchten, Prf1-regulierten Genen (*bW*, *bE*, *pra* und *mfa*) auch die basale Expression abhängig von Prf1 ist (Hartmann *et al.*, 1996; Hartmann, 1997). Für *kpp6* trifft das nicht zu (Abbildung 27B, Spur 6).

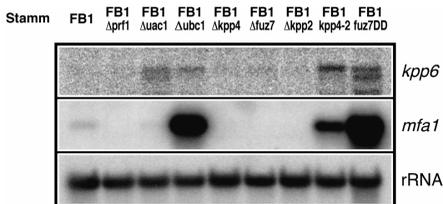


**Abbildung 27: Northern-Analysen zur transkriptionellen Regulation von *kpp6*.** **A)** Die angegebenen Stämme wurden in AM-Glc Flüssigmedium bis  $OD_{600} \approx 0,5$  inkubiert, danach in NM-Ara (AB31 und AB32) bzw. NM-Glc Flüssigmedium (AB33, AB34 und AB281) für 5 h induziert. **B)** Die angegebenen Stämme wurden in AM-Glc Flüssigmedium bis  $OD_{600} \approx 0,5$  inkubiert, danach in einer Dichte von  $OD_{600} = 5,0$  in NM-Ara (AB131 und AB132) bzw. NM-Glc Flüssigmedium (AB133, AB134 und AB282) für 5 h induziert. Im Fall von Spur 5 und Spur 7 wurde dem Medium  $10\ \mu\text{g}/\mu\text{l}$   $\alpha$ 1-Pheromon zugegeben. Bei beiden Analysen wurde jeweils etwa  $10\ \mu\text{g}$  RNA pro Spur aufgetrennt.

Zusammengenommen zeigen diese Resultate, dass Prf1 keinen direkten Einfluss auf die Expression von *kpp6* zu haben scheint. Die beiden Transkripte lassen aber vermuten, dass Prf1 an den Promotor binden kann und dadurch zu einer Verschiebung des Transkriptions-Startpunkts weiter stromabwärts führen könnte. Die beobachteten Unterschiede in der relativen Stärke der beiden Signale in Northern-Analysen mit dem Stamm FBD12-3 (*a1a2 b1b1*) könnten daher durch Unterschiede in der Bindung von Prf1 an den *kpp6*-Promotor begründet sein.

## 2.4.12 *kpp6* wird durch die Pheromon-MAP-Kinasekaskade<sup>26</sup> positiv reguliert

Abschließend wurde getestet, über welche der bekannten Signaltransduktionswege die transkriptionelle Regulation von *kpp6* unter Kreuzungsbedingungen beeinflusst wird. Dazu kann eine Reihe von bereits existierenden Mutanten verwendet werden. Die bereits erwähnten Mutanten FB1 $\Delta$ uac1 (*al bl*  $\Delta$ uac1; Gold *et al.*, 1994) und FB1 $\Delta$ ubc1 (*al bl*  $\Delta$ ubc1; Gold *et al.*, 1997) weisen Deletionen des Gens für Adenylatzyklase bzw. der regulatorischen Unter-einheit der PKA auf, weswegen in diesen Stämmen der cAMP-Signalweg nicht aktiv bzw. konstitutiv aktiviert sein dürfte. In den Mutanten FB1 $\Delta$ kpp4 (*al bl*  $\Delta$ kpp4; P. Müller, pers. Mitteilung), FB1 $\Delta$ fuz7 (*al bl*  $\Delta$ fuz7; Banuett und Herskowitz, 1994a) und FB1 $\Delta$ kpp2 (*al bl*  $\Delta$ kpp2; Müller *et al.*, 1999) sind die Gene für die bekannten Komponenten der Pheromon-MAPK-Signalkaskade deletiert (siehe Einleitung), die das Pheromonsignal auf Prf1 übertragen. Dabei handelt es sich bei Kpp4 um die MAPKKK, bei Fuz7 um die MAPKK und bei Kpp2 um die MAP-Kinase. Im Stamm FB1kpp4-2 (*al bl* P<sub>crg</sub>:*kpp4-2*) befindet sich ein konstitutiv aktives Allel der MAPKKK Kpp4, dessen Expression durch den *crg1*-Promotor gesteuert ist (P. Müller, pers. Mitteilung). Entsprechend trägt der Stamm FB1fuz7DD (*al bl* P<sub>crg</sub>:*fuz7DD*) ein konstitutiv aktives Allel der MAPKK Fuz7, dessen Expression sich ebenfalls unter Kontrolle des *crg1*-Promotors befindet (P. Müller, pers. Mitteilung). Durch Medienwechsel von Glucose- in Arabinose-haltiges Medium kann daher in diesen beiden Stämmen eine Aktivierung der Pheromon-MAPK-Signalkaskade auf zwei verschiedenen Ebenen simuliert werden. In die Northern-Analyse aller Stämme wurden FB1 (*al bl*) und FB1 $\Delta$ prf1 (*al bl*  $\Delta$ prf1) als Kontrollen mit einbezogen.



**Abbildung 28: Regulation von *kpp6* durch cAMP- und MAP-Kinasekaskade.** Die angegebenen Stämme wurden in CM-Glc Flüssigmedium bis OD<sub>600</sub> ≈ 0,5 inkubiert, danach in CM-Ara Flüssigmedium für 5 h induziert. Im Fall von Stamm FB1 $\Delta$ uac1 wurde der Vorkultur 6 mM cAMP zugegeben. Es wurde jeweils etwa 10  $\mu$ g RNA pro Spur aufgetrennt.

Bei Hybridisierung mit einer *mfa1*-spezifischen Sonde kann deutlich die induzierte Expression bei aktivierter cAMP- bzw. Pheromon-MAPK-Signalkaskade nachgewiesen werden (Abbildung 28). Bei Deletion eines der Elemente der Pheromon-MAPK-Signalkaskade oder von *prf1* tritt dagegen überhaupt kein *mfa1*-Signal auf (Abbildung 28). Dies zeigt, dass Prf1

<sup>26</sup> Mit der Identifikation von Kpp6 und dem Nachweis, dass Kpp6 und Kpp2 wahrscheinlich unterschiedliche Funktionen besitzen, muss neben dem bekannten MAP-Kinasemodul aus Kpp4, Fuz7 und Kpp2, welches unter anderem das Pheromonsignal übermittelt, ein zweites Modul mit Kpp6 und noch zu identifizierenden MAPKK- und MAPK-Kinasen postuliert werden. Deswegen wird im Folgenden das MAPK-Modul aus Kpp4, Fuz7 und Kpp2 als Pheromon-MAP-Kinasekaskade bezeichnet, das zweite Modul als Kpp6-MAP-Kinasekaskade.

auch die basale Expression von *mfa1* reguliert und diese Regulation wahrscheinlich eine Signalübermittlung über die Pheromon-MAPK-Kaskade benötigt (vgl. Müller *et al.*, 1999). Bei Deletion von *uac1* kann ebenfalls eine Reduktion in der *mfa1*-Expression gegenüber der Wildtyp-Situation beobachtet werden (Abbildung 28). Betrachtet man dagegen die Ergebnisse im Fall von *kpp6* in diesen Stämmen, zeigt sich, dass die basale Expression von *kpp6* weder durch die Deletion von *prf1*, noch von *kpp4*, *fuz7* oder *kpp2* beeinflusst wird (Abbildung 28). Das bestätigt in Bezug auf Prf1 die bisherigen Resultate. Die konstitutiv aktiven Allele von Kpp4 und Fuz7 können dagegen die Transkription von *kpp6* induzieren (Abbildung 28). Dabei treten im Fall von Kpp4-2 nur das obere Transkript, bei Fuz7DD beide Transkripte auf. Die stärkere Aktivierung von *mfa1* bei Induktion über Fuz7DD im Vergleich zu Kpp4-2 in diesem Versuch (Abbildung 28) könnte eine höhere Menge an aktivem Prf1 reflektieren, was wiederum zu der oben diskutierten Verschiebung des Transkriptions-Startpunkts von *kpp6* führen könnte. Bei den Stämmen mit Mutationen in Komponenten der cAMP-Signalkaskade zeigt sich ein erhöhtes Expressionsniveau von *kpp6* in beiden Fällen (Abbildung 28), so dass keine eindeutige Aussage über eine transkriptionelle Regulation von *kpp6* durch diesen Signalweg getroffen werden kann.

Zusammengefasst zeigen diese Ergebnisse, dass die durch Pheromon stimulierte Expression von *kpp6* vermutlich wenigstens zum Teil durch die schon bekannte Pheromon-MAPK-Signalkaskade vermittelt wird, jedoch von Prf1 unabhängig ist.

## 2.5 Untersuchung der b-reprimierten Gene *frb34* und *frb136*

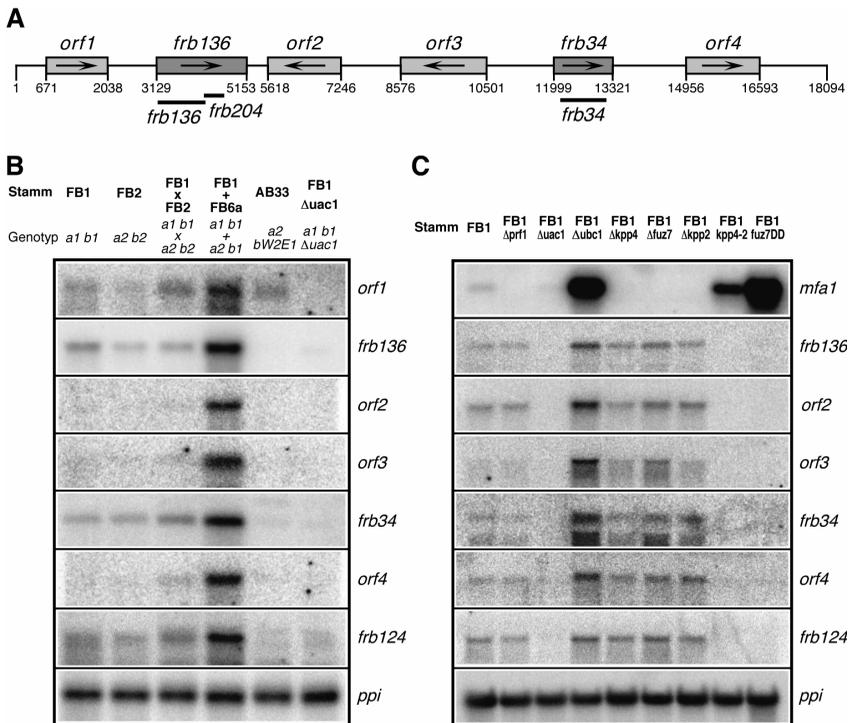
### 2.5.1 *frb34* und *frb136* liegen benachbart in einem Locus mit weiteren ähnlich regulierten Genen

Für die Analyse der b-reprimierten Gene *frb34* und *frb136* wurden ausgehend von den Amplicons Cosmide isoliert. Dabei zeigte sich, dass eines der Cosmide beide Gene enthält. Im Fall von *frb34* wurden für die weitere Untersuchung zwei nebeneinander liegende *Pst*I-Fragmente von 4.727 bp und 5.543 bp Länge und im Fall von *frb136* zwei überlappende Fragmente, ein 4.041 bp langes *Hind*III- und ein 6.247 bp langes *Bam*HI-Fragment, subkloniert (siehe Abschnitt 4.1.5). Die Sequenzanalyse dieser Fragmente ergab, dass sich die Subklone, die *frb34* und *frb136* enthalten, um 396 bp überlappen, so dass insgesamt Information über einen 18.094 bp großen Bereich vorlag. In diesem Bereich befinden sich neben *frb34* und *frb136* noch vier weitere ORFs (Tabelle 14 und Abbildung 29A).

**Tabelle 14: Gene im Locus um *frb34* und *frb136***

Gen	Länge	Ähnlichkeit zu	Identität	angenommene Funktion
<i>orf1</i>	2038 bp	-		
<i>frb136</i>	2025 bp	Cap10p ( <i>Cryptococcus neoformans</i> )	25%	kapselassoziertes Protein
<i>orf2</i>	1629 bp	GMS1 ( <i>S. pombe</i> )	25%	UDP-Galaktose-Transporter
<i>orf3</i>	1926 bp	Cap10p ( <i>Cryptococcus neoformans</i> )	23%	kapselassoziertes Protein
<i>frb34</i>	1323 bp	YrhL ( <i>Bacillus subtilis</i> )	26%	Acylyltransferase
<i>orf4</i>	1638 bp	GMS1 ( <i>S. pombe</i> )	28%	UDP-Galaktose-Transporter

Die abgeleiteten Proteinsequenz von *orf1* zeigt keine Ähnlichkeit zu bekannten Proteinen, Frb34 ist dagegen ähnlich zu YrhL, einer Acyltransferase aus *Bacillus subtilis* (26% Identität). Die von *frb136* und *orf3* kodierten Proteine weisen Ähnlichkeit zu Cap10p, einem kapselassozierten Protein aus *Cryptococcus neoformans* auf (25% bzw. 23% Identität) und sind auch untereinander zu 33% identisch. Das gleiche Phänomen zeigt sich auch bei *orf2* und *orf4*. Beide abgeleiteten Aminosäuresequenzen besitzen Ähnlichkeit zu UDP-Galaktose-Transportern, wie z. B. GMS1 aus *S. pombe* (25% bzw. 28% Identität) und sind zueinander 23% identisch. Interessanterweise besitzen Frb136 und Orf3 mit 675 und 642 Aminosäuren bzw. Orf2 und Orf4 mit 543 und 546 Aminosäuren auch vergleichbare Längen. Es könnte sich hier also um einen Locus zu handeln, der aus einer Genduplikation hervorgegangen ist. Dafür spricht auch, dass die relative Lage von *frb136* zu *orf4* der von *orf3* zu *orf2* entspricht, so dass man sich vorstellen könnte, dass die duplizierten Bereiche zwischen *frb136* und *orf4* inseriert wurden. Allerdings finden sich darüber hinaus keine weiteren Anhaltspunkte für diese Hypothese.



**Abbildung 29: Der genomische Locus um *frb34* und *frb136* und transkriptionelle Regulation der darin befindlichen Gene.** **A)** Schematische Darstellung des sequenzierten Bereichs, die Transkriptionsrichtung der sechs Gene ist durch Pfeile gekennzeichnet. Dicke Striche zeigen die Lage der in dem RNA-Fingerprint-Ansatz isolierten Amplicons. Die Zeichnung ist maßstabsgetreu. **B)** Northern-Analyse der Expression der Gene aus diesem Locus unter Kreuzungsbedingungen. Einzelheiten zu den Versuchsbedingungen siehe Abschnitt 2.1.7 und Abbildung 11. **C)** Northern-Analyse der Genregulation durch die cAMP- und MAPK-Signalkaskade. Einzelheiten zu den Versuchsbedingungen siehe Abschnitt 2.4.11 und Abbildung 27C.

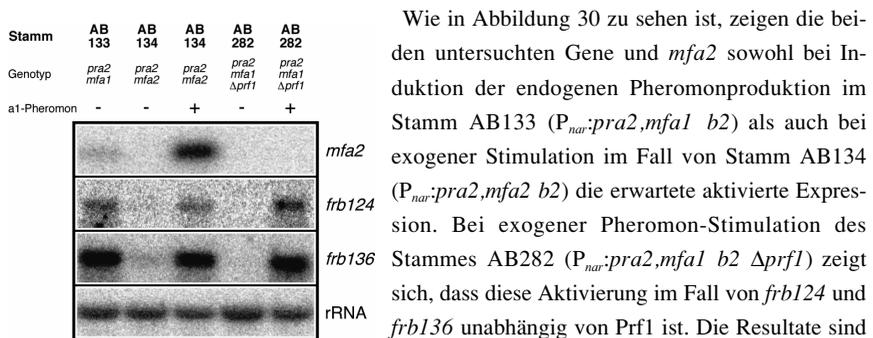
Die Northern-Analyse aller sechs Gene zeigt, dass ihre Expression bei Pheromon-Stimulation induziert ist (Abbildung 29B). Die für *frb34* und *frb136* gefundene Repression durch das bW/bE-Heterodimer kann bei den anderen vier Genen nicht beobachtet werden, was allerdings im Fall von *orf2*, *orf3* und *orf4* darauf zurückzuführen ist, dass diese Gene unter den Versuchsbedingungen keine basale Expression aufweisen (Abbildung 29B). Alle Gene aus diesem Locus unterliegen also zumindest im Fall der Pheromon-Stimulation einer gemeinsamen Kontrolle. Der zugrundeliegende Regulationsmechanismus könnte auch bei *frb124* vorliegen, das sich nicht in diesem Locus befindet, aber das gleiche Expressionsmuster besitzt (Abbildung 29B).

Zur Untersuchung der Frage, über welche Signalkaskaden das Pheromonsignal in diesem Fall übermittelt wird, wurde eine Northern-Analyse mit Mutanten aus der cAMP- und der

Pheromon-MAPK-Signalkaskade durchgeführt. Es zeigte sich, dass mit Ausnahme von *orf1*<sup>27</sup> alle Gene wiederum die gleiche Regulation aufweisen (Abbildung 29C). Im Gegensatz zu den bisher bekannten pheromoninduzierten Genen, wie z. B. *mfa1*, bei denen die Expression durch beide Kaskaden stimuliert werden kann, wird die Transkription der hier getesteten Gene nur durch eine aktivierte cAMP-Signalkaskade aktiviert (Abbildung 29C). Eine Aktivierung der Pheromon-MAPK-Signalkaskade führt dagegen zu einer vollständigen Repression von *frb136*, *orf2*, *orf3*, *frb34*, *orf4* und *frb124* (Abbildung 29C). Die Deletion von *prf1* hat keinen Einfluss auf die basale Expression dieser Gene (Abbildung 29C). Der Locus um *frb136* und *frb34* wurde aufgrund der ähnlichen Expressionsprofile der darin gefundenen Gene als *cab*-Locus bezeichnet ("controlled by *a* and *b* mating type loci").

### 2.5.2 *frb124* und *frb136* werden nicht durch Prf1 reguliert

Diese Beobachtung ist in Einklang damit, dass sich in der gesamten 18,1 kb großen Region keine PRE-Box identifizieren lässt. Trotzdem wurde in einer Northern-Analyse, genauso wie im Fall von *kpp6* (siehe Abschnitt 2.4.11 und Abbildung 27B) getestet, ob die pheromoninduzierte Expression der b-reprimierten Gene unabhängig von Prf1 ist. Da sich in den bisherigen Untersuchungen keine gravierenden Unterschiede zwischen den Genen des *cab*-Locus gezeigt haben, wurde bei diesem Versuch stellvertretend nur die Regulation von *frb136* analysiert. Zusätzlich wurde die Expression von *frb124* untersucht.



**Abbildung 30: Prf1-unabhängige Pheromon-Induktion von *frb124* und *frb136*.** Einzelheiten zu den Versuchsbedingungen siehe Abschnitt 2.4.11 und Abbildung 27B.

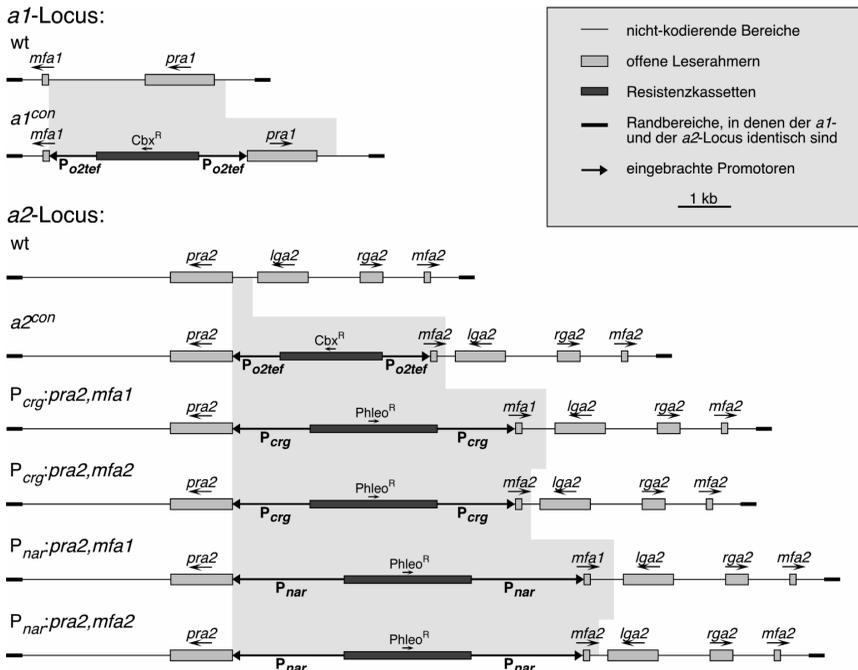
Stimulation unabhängig von der Pheromon-MAPK-Signalkaskade und von Prf1 erfolgt. Ausserdem konnte erstmals auf transkriptioneller Ebene eine antagonistische Regulation durch die cAMP- und die Pheromon-MAPK-Signalkaskade gezeigt werden.

<sup>27</sup> *orf1* konnte unter den Versuchsbedingungen nicht nachgewiesen werden.

## 2.6 Die Rolle von Prf1 im Kreuzungsprozess

### 2.6.1 Erzeugung von Stämmen, die eine von Prf1 unabhängige Expression der Paarungstypgene ermöglichen

Nachdem in den vorangegangenen Versuchen schon für eine Reihe von Genen gezeigt werden konnte, dass ihre durch Pheromon stimulierte Regulation nicht durch Prf1 übermittelt wird, stellte sich die Frage, ob Prf1 außer der Aktivierung der Paarungstypgene überhaupt noch weitere Funktionen zukommen. Dazu wurden zunächst Stämme konstruiert, in denen die durch Prf1 regulierten Gene *bW*, *bE*, *pra* und *mfa* dieser Kontrolle entzogen sind. Im Fall der Gene der *a*-Loci wurden dabei durch homologe Rekombination Konstrukte eingebracht, bei denen sich *pra1* und *mfa1* (*pa1con*) bzw. *pra2* und *mfa2* (*pa2con*) unter Kontrolle von konstitutiven *o2tef*-Promotoren befinden (Abbildung 31).



**Abbildung 31: Konstitutive und regulierte Expression der *a*-Gene.** Schematische Darstellung der *a*-Loci ohne und mit eingebrachten Konstrukten, die jeweils ausgetauschten Bereiche sind grau hinterlegt. Intronbereiche sind in dieser Abbildung nicht eingezeichnet (vgl. Abbildung 2A). Die Zeichnung ist maßstabsgetreu.

Zusätzlich wurden ähnlich wie im Fall von AB31 bis AB34 Konstrukte hergestellt, die nach homologer Rekombination in den *a2*-Locus eine regulierte Expression von *pra2* und *mfa1* bzw. von *pra2* und *mfa2* durch Verwendung des *crg1*- bzw. *nar1*-Promotors erlauben (pPcrg:pra2,mfa1, pPcrg:pra2,mfa2, pPnar:pra2,mfa1 und pPnar:pra2,mfa2; Abbildung 31).

Für eine konstitutive Expression der Gene der *b*-Loci wurden Plasmide konstruiert, welche die Gene *bW1* und *bE1*, bzw. *bW2* und *bE2* unter Kontrolle des *o2tef*-Promotors tragen (pb1con bzw. pb2con). Durch die einzelne, bzw. im Fall von pa1con/pb1con und pa2con/pb2con aufeinander folgende Transformation dieser Konstrukte in die Wildtyp-Stämme FB1 (*a1 b1*) und FB2 (*a2 b2*) entstanden eine Reihe von Stämmen, von denen die folgenden für die weiteren Untersuchungen benutzt wurden: AB141 (*a1<sup>con</sup> b1*), AB142 (*a2<sup>con</sup> b2*), AB144 (*a1 b1<sup>con</sup>*), AB145 (*a2 b2<sup>con</sup>*), AB146 (*a1<sup>con</sup> b1<sup>con</sup>*), AB147 (*a2<sup>con</sup> b2<sup>con</sup>*), AB131 (P<sub>crg</sub>:*pra2,mfa1 b2*), AB132 (P<sub>crg</sub>:*pra2,mfa2 b2*), AB133 (P<sub>nar</sub>:*pra2,mfa1 b2*) und AB134 (P<sub>nar</sub>:*pra2,mfa2 b2*). Alle diese Stämme zeigten unter Normalbedingungen (also im Fall der regulierbaren Stämme im nicht induzierten Zustand) keine Abweichungen im Wachstum und in der Zellmorphologie im Vergleich zu Wildtyp-Stämmen (nicht gezeigt).

## 2.6.2 Prf1 besitzt neben der Regulation der Paarungstypgene weitere Funktionen

Zunächst wurde untersucht, inwieweit die Stämme, in denen die Gene des *a*- und des *b*-Locus konstitutiv exprimiert werden, in der Lage sind, miteinander zu kreuzen und in der Pflanze Tumorbildung auszulösen. Während auf aktivkohlehaltigen Medien bei allen möglichen Kombinationen von Stämmen Filamentbildung nachgewiesen werden konnte (Abbildung 32A), sank die Pathogenitätsrate bei konstitutiver Expression aller Paarungstypgene auf etwa die Hälfte des Wildtyp-Niveaus (Tabelle 15).

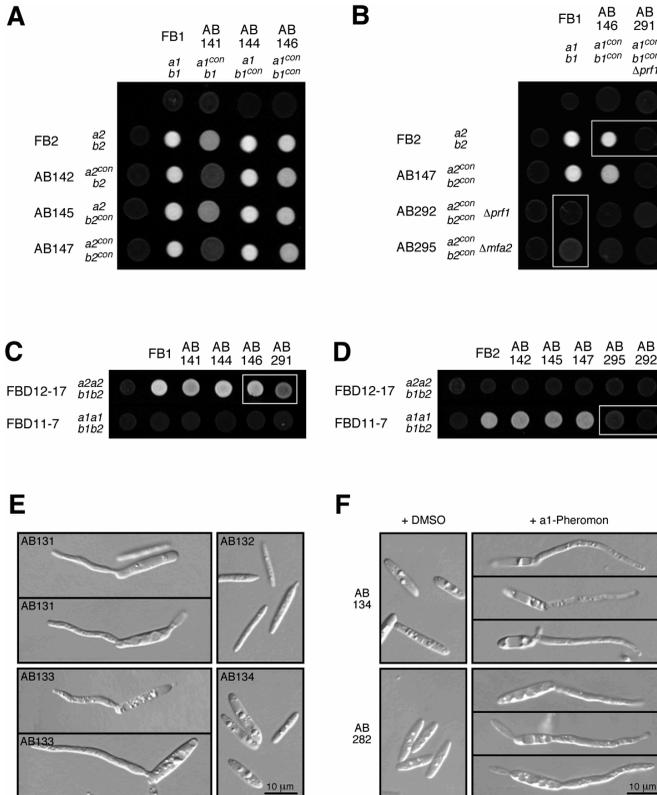
**Tabelle 15: Pathogenität bei konstitutiver Expression der Paarungstypgene**

Inoculum	Genotypen	Tumorbildung <sup>a</sup>	% von Wildtyp
FB1 x FB2	<i>a1 b1</i> x <i>a2 b2</i>	98/115	100%
AB141 x AB142	<i>a1<sup>con</sup> b1</i> x <i>a2<sup>con</sup> b2</i>	33/56	69%
AB144 x AB145	<i>a1 b1<sup>con</sup></i> x <i>a2 b2<sup>con</sup></i>	18/18	100%
AB146 x AB147	<i>a1<sup>con</sup> b1<sup>con</sup></i> x <i>a2<sup>con</sup> b2<sup>con</sup></i>	100/212	56%
AB291 x AB292	<i>a1<sup>con</sup> b1<sup>con</sup> Δprf1</i> x <i>a2<sup>con</sup> b2<sup>con</sup> Δprf1</i>	0/121	0%
AB146 x AB295	<i>a1<sup>con</sup> b1<sup>con</sup></i> x <i>a2<sup>con</sup> b2<sup>con</sup> Δmfa2</i>	0/94	0%
AB146 x AB292	<i>a1<sup>con</sup> b1<sup>con</sup></i> x <i>a2<sup>con</sup> b2<sup>con</sup> Δprf1</i>	0/48	0%
AB291 x AB147	<i>a1<sup>con</sup> b1<sup>con</sup> Δprf1</i> x <i>a2<sup>con</sup> b2<sup>con</sup></i>	0/47	0%

<sup>a</sup> Angegeben ist die Anzahl von Pflanzen mit Tumorbildung im Vergleich zur Gesamtzahl der infizierten Pflanzen 14 Tage nach Infektion.

Allerdings besitzt der Stamm AB147 (*a2<sup>con</sup> b2<sup>con</sup>*) immer noch eine Wildtyp-Kopie des *mfa2*-Gens im *a2*-Locus. Daher wurde in diesem Stamm *mfa2* deletiert, so dass der Stamm AB295 (*a2<sup>con</sup> b2<sup>con</sup> Δmfa2*) entstand. Bei Kreuzung mit AB146 (*a1<sup>con</sup> b1<sup>con</sup>*) konnte nur eine sehr stark

reduzierte Filamentbildung beobachtet werden (Abbildung 32B), jedoch keine Tumorbildung nach Pflanzeninfektion (Tabelle 15). Der konstitutive *o2tef*-Promotor ist demnach entweder zu schwach für eine ausreichende Expression der Pheromongene, oder die konstitutive Expression der Gene des *a*-Locus hat einen negativen Einfluss auf die Bildung und Aufrechterhaltung des filamentösen Dikaryons oder das Wachstum auf und in der Pflanze.



**Abbildung 32: Die Rolle von Prfl bei Kreuzung und Bildung von Konjugationshyphen.** A) Kreuzungsverhalten von Stämmen mit konstitutiver *a*- und *b*-Expression. B) Kreuzungsverhalten bei *prfl*-Deletionsmutanten. C) und D) Pheromon-Stimulationstest mit den angegebenen Stämmen. In A) bis D) wurden jeweils die oben und links angegebenen Stämme einzeln und in Kombination auf PD-CC-Festmedium aufgetropft und 24 h bei 21°C inkubiert. E) und F) Induktion der Konjugationshyphenbildung. Die angegebenen Stämme wurden in AM-Glc Flüssigmedium bis OD<sub>600</sub> ≈ 0,5 inkubiert, danach in einer Dichte von OD<sub>600</sub> = 5,0 in NM-Ara (AB131 und AB132) bzw. NM-Glc Flüssigmedium (AB133, AB134 und AB282) für 5 h induziert und mit DIC-Optik mikroskopiert. Bei den rechten Bildern in F) wurde dem Medium 10 µg/µl a1-Pheromon zugegeben. Der Längenmaßstab bezieht sich auf alle mikroskopischen Abbildungen.

Parallel dazu wurde in den Stämmen AB146 (*a1<sup>con</sup> b1<sup>con</sup>*) und AB147 (*a2<sup>con</sup> b2<sup>con</sup>*) der offene Leserahmen von *prfl* deletiert. Die daraus resultierenden Stämme AB291 (*a1<sup>con</sup> b1<sup>con</sup> Δprf1*)

und AB292 ( $a2^{con} b2^{con} \Delta prf1$ ) können nicht mehr miteinander kreuzen (Abbildung 32B) und sind apathogen (Tabelle 15). Dies könnte damit begründet werden, dass Prf1 für die pheromoninduzierte Expression des *mfa2*-Wildtypgens im *a2*-Locus benötigt wird. Allerdings ist bei Kreuzungen zwischen FB1 (*a1 b1*) und AB295 ( $a2^{con} b2^{con} \Delta mfa2$ ) noch eine leichte Hyphenbildung zu erkennen, während bei Kreuzung von FB1 (*a1 b1*) mit AB292 ( $a2^{con} b2^{con} \Delta prf1$ ) keine Filamente mehr auftreten (Abbildung 32B, linker grauer Kasten). Dies spricht für eine zusätzliche Rolle von Prf1 im Kreuzungsprozess. Noch deutlicher kann dieser Effekt beim Vergleich der Kreuzung AB146 ( $a1^{con} b1^{con}$ ) x FB2 (*a2 b2*) mit der Kreuzung AB291 ( $a1^{con} b1^{con} \Delta prf1$ ) x FB2 (*a2 b2*) beobachtet werden (Abbildung 32B, rechter grauer Kasten).

Der Kreuzungsdefekt kann zwei Ursachen haben: mangelnde Pheromon-Sekretion und damit fehlende Stimulation des Kreuzungspartners, oder Schwierigkeiten bei der Zellfusion. Um die Pheromon-Ausschüttung der Stämme zu testen, wurden sie zusammen mit den sogenannten Pheromon-Testerstämmen FDB12-17 (*a2a2 b1b2*) und FBD11-7 (*a1a1 b1b2*), die auf die Anwesenheit von Pheromon mit Filamentbildung reagieren, auf aktivkohlehaltigem Festmedium inkubiert. Dabei zeigte sich, dass die *prf1*-Deletionsmutanten AB291 und AB292 die Testerstämmen schlechter stimulieren können als die entsprechenden Ausgangsstämme AB146 und AB147 und als der *mfa2*-Deletionsstamm AB295 (Abbildung 32C und D, graue Kästen). Die *prf1*-Deletionsmutanten sekretieren daher vermutlich eine geringere Menge an aktivem Pheromon.

Dieses Ergebnis sollte durch in einem zweiten Versuch unter Verwendung der Stämme zur induzierten Expression der *a*-Gene überprüft werden. Die Stämme AB131 ( $P_{crg}:pra2,mfa1 b2$ ) und AB133 ( $P_{nar}:pra2,mfa1 b2$ ) zeigen etwa drei bis vier Stunden nach durch Medienwechsel induzierter Expression von *pra2* und *mfa1* die Ausbildung von Konjugationshyphen (Abbildung 32E). Diese Reaktion tritt nur bei relativ dichten Kulturen auf (nicht gezeigt; in der Regel wurde mit  $OD_{600} \approx 5,0$  bearbeitet), was ein Anzeichen dafür ist, dass die Zellen nicht direkt durch ihr selber produziertes Pheromon stimuliert werden, sondern durch das von der gesamten Kultur gebildete Pheromon im Medium. Bei den Kontrollstämmen AB132 ( $P_{crg}:pra2,mfa2 b2$ ) und AB134 ( $P_{nar}:pra2,mfa2 b2$ ) war unter den gleichen Bedingungen keine Bildung von Konjugationshyphen zu beobachten (Abbildung 32E). Exogene Zugabe von a1-Pheromon zum Medium kann diese Reaktion hervorrufen (nur gezeigt für AB134; Abbildung 32F, obere Bilder).

Der schon in Abschnitt 2.4.11 erwähnte Stamm AB282 ( $P_{nar}:pra2,mfa1 b2 \Delta prf1$ ), der ein Derivat des Stammes AB133 mit einer zusätzlichen Deletion von *prf1* ist, zeigt nach induzierter Expression von *pra2* und *mfa1* keine Konjugationshyphen-Bildung, kann aber ebenfalls durch Zugabe von a1-Pheromon zum Medium dazu stimuliert werden (Abbildung 32F, untere Bilder). Dieses Ergebnis bestätigt, dass Prf1 eine Rolle im Prozess der Pheromonreife oder des Pheromonexports spielt. Am wahrscheinlichsten erscheint dabei eine Beteiligung an der transkriptionellen Kontrolle von Genen, die für spezifische Peptidasen oder Transporterproteine kodieren.



## 3. Diskussion

Das Ziel dieser Arbeit bestand in der Identifikation b-regulierter Gene in *U. maydis*, um Einblicke in die Regulation der frühen Infektionsphase durch das bW/bE-Heterodimer zu gewinnen. Dazu wurden in einem RNA-Fingerprint-Ansatz eine Reihe neuer b-induzierter und erstmals auch b-reprimierter Gene isoliert. Bei der genaueren Untersuchung der interessantesten Kandidaten zeigte sich, dass *frb52* ein direkt b-reguliertes Gen ist. Für die b-induzierte MAP-Kinase Kpp6 konnte eine Rolle während früher Infektionsprozesse abgeleitet werden. Die Analyse der b-reprimierten Gene *frb34* und *frb136* ergab, dass diese Gene benachbart sind. Sie, vier weitere Gene aus dieser Region und *frb124* zeigen nicht nur eine negative Regulation durch das bW/bE-Heterodimer, sondern weisen auch eine Induktion während des Zellfusionsprozesses auf. Bei dieser Signalübermittlung wirken die cAMP- und die MAPK-Kaskade antagonistisch und unabhängig von Prf1.

### 3.1 Das bW/bE-Heterodimer als transkriptioneller Regulator

#### 3.1.1 Regulierte Expression der Paarungstypgene

Mit Hilfe des *ip*-Integrationsystems konnten zwei regulierbare Promotorsysteme etabliert werden: der Promotor des Nitratreduktasegens *nar1* und der des Arabinasegens *crg1* (siehe Abschnitt 6.2). Dies ermöglicht erstmals eine reproduzierbare und kontrollierte Expression von Genen in *U. maydis*. Die regulierbaren Promotoren wurden zur Induktion der Expression der Gene des *b*-Locus und der Pheromon- und Pheromonrezeptorgene in haploiden Sporidien verwendet. In Bezug auf Genregulation und Morphologie gleichen diese Stämme im induzierten Zustand in allen untersuchten Punkten Wildtyp-Zellen nach Pheromonstimulation bzw. Ausbildung des dikaryotischen Filaments. Sie können daher zur Analyse der jeweiligen Prozesse herangezogen werden. Bei den b-Induktionsstämmen kommt der zusätzliche Vorteil hinzu, dass die Bildung der bW/bE-Heterodimere direkt erfolgt, ohne dass vorherige Pheromonstimulation und Zellfusion stattgefunden haben müssen. Diese Situation entspricht zwar nicht dem natürlichen Ablauf, ermöglicht aber gerade deswegen die Analyse eines synchron ablaufenden Morphologiewechsels.

Innerhalb von zwei Stunden nach Induktion der gleichzeitigen Expression des Pheromonrezeptors Pra2 und des a1-Pheromons kommt es zu einem Erliegen der Zell- und Kernteilung (nicht gezeigt), so dass vermutlich eine Arretierung des Zellzyklus vorliegt. Interessanterweise konnte eine Arretierung des Zellzyklus auch zwei Stunden nach Induktion der *b*-

Genexpression in *U. maydis* festgestellt werden (nicht gezeigt und Z. Szabó, pers. Mitteilung). Ein Ausbleiben von Zell- und Kernteilung nach Pheromonstimulation bzw. nach Ausbildung dikaryotischer Filamente wurde schon bei morphologischen Untersuchungen von Kreuzungsstrukturen beobachtet (Snetselaar und Mims, 1992; Snetselaar, 1993; Banuett und Herskowitz, 1994b). In *S. cerevisiae* erfolgt nach Pheromonstimulation ebenfalls ein Arretierung des Zellzyklus, so dass sich die Zellkerne bei der unmittelbar nach der Zellfusion erfolgenden Kernfusion im gleichen Stadium des Zellzyklus befinden (Sprague und Thorner, 1992).

In *U. maydis* wird die Arretierung des Zellzyklus nach der Zellfusion wahrscheinlich durch Ausbildung des funktionellen bW/bE-Heterodimers aufrecht erhalten. Nach Infektion der Pflanze wird sie wieder aufgehoben und ein echtes dikaryotisches Myzel ausgebildet. Dieser Wechsel könnte durch Pflanzensignale gesteuert sein, da Dikaryen durch Kokultivierung mit Mais-Zellkulturen möglicherweise zur Kernteilung angeregt werden können (Ruiz-Herrera *et al.*, 1999a). Die Identifizierung von Faktoren, die an der Regulation des Zellzyklus beteiligt sind, wäre vor allem hinsichtlich einer möglichen Beteiligung der Pheromon-MAP-Kinase- bzw. der cAMP-Kaskade an diesem Prozess interessant<sup>28</sup>.

### 3.1.2 Der RNA-Fingerprint-Ansatz zur Identifikation b-regulierter Gene

Die Methode des Differential Displays wurde in *U. maydis* schon mehrfach erfolgreich eingesetzt und hat zur Identifikation der differentiell exprimierten Gene *dik1*, *dik6*, *hum2*, *gpa4* und *mig1* geführt (Bohlmann *et al.*, 1994; Bohlmann, 1996; Regenfelder *et al.*, 1997; Basse *et al.*, 2000). Die wichtigste Veränderung der Technik in dieser Arbeit bestand in der Modifizierung der Reaktionsbedingungen, so dass die Amplicons ohne vorherige Reamplifikation kloniert werden können, womit eine potentielle Quelle für die Anreicherung falsch positiver Kandidaten (Bauer *et al.*, 1993; Callard *et al.*, 1994; Wang und Feuerstein, 1995) entfällt.

Von den 48 ausgewählten Amplicons aus dem zweiten RNA-Fingerprint-Ansatz stammen 27 Amplicons (56%) von differentiell exprimierten Genen, 18 Amplicons (38%) waren falsch positive Kandidaten. Damit ist der Anteil richtig positiver Klone etwa gleich hoch wie bei vergleichbaren veröffentlichten Ansätzen (Debouck, 1995; Wan *et al.*, 1996). Für drei Amplicons (*frb5*, *frb47-4* und *frb187*; 6%) konnten weder in den Dot-Blot- noch in den Northern-Analysen Signale detektiert werden. Eine weitergehende RT-PCR-Analyse erscheint hier sinnvoll, da es sich gerade bei schwach exprimierten Genen um zentrale Regulatoren handeln könnte, die bislang nicht identifiziert wurden.

---

<sup>28</sup> Kürzlich konnten in *U. maydis* mit Cru1, einem Zellzyklus-Regulator aus der Familie der Frizzy-verwandten Proteine und mit Crk1, einer Zyklin-abhängigen Kinase Faktoren isoliert werden, die an den Prozessen der Zellfusion bzw. der Filamentbildung beteiligt zu sein scheinen, und die einer Regulation durch die Pheromon-MAP-Kinasekaskade bzw. durch die cAMP-Signalkaskade unterliegen (J. Pérez-Martín, pers. Mitteilung).

Für die Bestimmung, inwieweit in diesem Ansatz das Transkriptom von *U. maydis* abgedeckt wurde, müssen einige Grundannahmen getroffen werden. Aus der vorhandenen Sequenzinformation des *U. maydis*-Genoms ergab sich, dass es insgesamt nicht mehr als 7.500 Gene enthalten dürfte (J. Kämper und R. Kahmann, pers. Mitteilung). Aus dem Vergleich mit entsprechenden Daten aus *S. cerevisiae* kann gefolgert werden, dass davon etwa 5.600 Gene transkribiert und potentiell detektierbar wären<sup>29</sup>. Unter der vereinfachenden Annahme, dass die Wahrscheinlichkeit der Detektion im RNA-Fingerprint für jedes Transkript gleich groß ist, bedeutet das, dass mehr als die Hälfte des Transkriptoms von *U. maydis* durchmustert wurde<sup>30</sup>. Die genauer untersuchten 48 Amplicons würden demnach etwa 7,6% aller potentiell durch das bW/bE-Heterodimer regulierten Gene repräsentieren.

Eine interessante Alternative läge in der Verwendung von cDNA-Microarrays zur Identifikation differentiell exprimierter Gene (Schena *et al.*, 1995; Wodicka *et al.*, 1997). Diese wurden vor allem in *S. cerevisiae* zur vergleichenden Untersuchung von globalen Expressionsprofilen in einer Reihe von Ansätzen erfolgreich eingesetzt, wobei der Vorteil dieser Technik in der Möglichkeit liegt, funktionelle Kategorien von ähnlich regulierten Genen identifizieren zu können (Spellman *et al.*, 1998; Hughes *et al.*, 2000). Mit der Ende 2000 abgeschlossenen Sequenzierung von 86% des *U. maydis*-Genoms steht die Information für die Erstellung eines entsprechenden cDNA-Microarrays zur Verfügung (J. Kämper und R. Kahmann, pers. Mitteilung). Schwierigkeiten bestehen hier jedoch im Nachweis differentieller Expression bei sehr ähnlichen Mitgliedern von Genfamilien und in Fällen, bei denen unterschiedliche lange Transkripte desselben Gens auftreten. Entsprechende Probleme waren bei der Dot-Blot-Analyse im Fall von *bE2* und *frb110* aufgetreten. Bei der Untersuchung von Unterschieden im Transkriptom muss generell beachtet werden, dass es sich nur um die erste Ebene der Expressionskontrolle handelt. Zwar besteht bei Pilzen eine deutlich bessere Korrelation zwischen der Menge an Transkript und der Menge an gebildetem Protein, als das z. B. bei höheren Eukaryonten der Fall ist; dennoch konnten in *S. cerevisiae* gerade bei schwach exprimierten Genen zum Teil starke Abweichungen der nachweisbaren von der aufgrund der Transkriptstärke angenommenen Proteinmenge nachgewiesen werden (Gygi *et al.*, 1999).

---

<sup>29</sup> *S. cerevisiae* besitzt etwa 6.200 Gene (Dujon, 1996), wobei in einer SAGE-Analyse für 4.665 dieser Hefegene Transkripte nachgewiesen werden konnten (Velculescu *et al.*, 1997). Um in dieser Untersuchung nachweisbar zu sein, mussten die Transkripte in einer Kopienzahl von mindestens 0,3 pro Zelle vorliegen (Velculescu *et al.*, 1997), bei einer insgesamt angenommenen Anzahl von etwa 15.000 mRNA-Molekülen pro Hefezelle (Hereford und Rosbash, 1977). Geht man davon aus, dass eine derartige Kopienzahl auch bei einer RNA-Fingerprint-Analyse die untere Detektionsgrenze darstellt, dann würde das, übertragen auf *U. maydis*, bedeuten, dass dort etwa 5.600 Gene detektierbar wären.

<sup>30</sup> Nach der Formel für die Binominalverteilung von Bernoulli würde ein beliebiges transkribiertes Gen mit einer Wahrscheinlichkeit von  $1 - \binom{5.599}{5.600}^{4.500} \approx 55\%$  mindestens einmal identifiziert werden. Eine Erzeugung weiterer Amplicons erscheint nicht sinnvoll, da sich mit zunehmender Anzahl die Redundanz erhöht, so dass z. B. für eine Abdeckung von 90% des Transkriptoms etwa 13.000 unabhängige Amplicons generiert werden müssten, was insgesamt über 20.000 Amplicons entsprechen würde.

### 3.1.3 Das bW/bE-Heterodimer reguliert eine große Anzahl von Genen

In dieser Arbeit konnten sieben neue b-induzierte und fünf neue b-reprimierte Gene isoliert werden. Davon zeigten zwei (*frb52* und *frb323*) schon eine Stunde nach Induktion der b-Genexpression ein differentielles Expressionsmuster, bei den übrigen zehn Genen war ein Unterschied erst nach fünf Stunden zu erkennen. Rechnet man diese Zahlen auf das gesamte Transkriptom von *U. maydis* hoch, so bedeutet das, dass etwa 20 Gene (0,4%) zu dem frühen und 171 Gene (3,1%) zu dem späteren Zeitpunkt differentiell exprimiert wären<sup>31</sup>. Damit zeigten sich in diesem Ansatz deutlich mehr Unterschiede als bei einem früher durchgeführten, vergleichbaren Differential Display-Ansatz, in dem nur 0,44% der Gene b-abhängig reguliert schienen (Bohlmann, 1996). Dabei waren nur acht der insgesamt 1.800 erzeugten Amplicons differentiell, was für eine unterschiedliche Sensitivität der verwendeten Techniken spricht (Bohlmann, 1996).

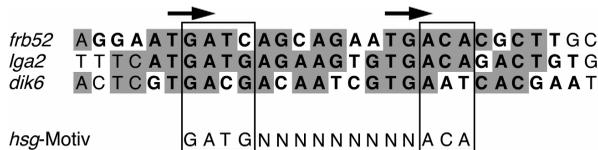
Das bW/bE-Heterodimer reguliert demnach direkt oder indirekt eine große Anzahl von Genen. Bei den meisten der zu dem späteren Zeitpunkt induzierten Gene handelt es sich wahrscheinlich eher um indirekt regulierte Gene, die in Zusammenhang mit dem filamentösen Wachstum exprimiert werden. Für *pdi1*, ein Gen, das für eine Proteindisulfid-Isomerase kodiert, könnte die induzierte Expression mit einer erhöhten Sekretion von zum Umbau der Zellwand benötigten Enzyme begründet werden (siehe Abschnitt 6.8). Unter den sekretierten Proteinen könnte sich z. B. Exc1 befinden, das Ähnlichkeit zu Exochitinasen aufweist. Zu der gleichen Klasse der filamentabhängig exprimierten Gene zählen vermutlich auch *frb53*, *frb63* und *frb172*, wobei die Expression in diesen drei Fällen spezifisch für das b-abhängige Filament zu sein scheint. Unterschiede in der Morphologie der bekannten Typen von Filamenten wurden schon mehrfach beschrieben (Banuett und Herskowitz, 1994b; Z. Szabó, pers. Mitteilung), konnten bislang jedoch nur unzureichend klassifiziert werden. Daher war es bei Mutanten, die filamentöses Wachstum zeigen, bisher nicht möglich zu spezifizieren, welcher der Signalwege, die Morphologiewechsel kontrollieren können, betroffen war. Gene, wie z. B. *frb53*, die spezifisch im b-abhängigen Filament exprimiert werden, könnten als molekulare Marker für die verschiedenen Filamenttypen dienen. Alternativ ist auch eine Verwendung als Reportergen zur Untersuchung der Regulationsvorgänge bei der b-abhängigen Filamentbildung vorstellbar. In dieser Hinsicht unterscheidet sich *frb53* von den auch in anderen Filamenttypen exprimierten Genen *rep1*, *egl1* und *hum2* (nicht gezeigt und G. Weinzierl, pers. Mitteilung).

---

<sup>31</sup> Bei diesen Berechnungen wurde das bekannte, b-regulierte Gen *rep1* mit einbezogen, *bE2* dagegen nicht.

### 3.1.4 *frb52* ist ein direktes Zielgen des b-Komplexes

Mit *frb52*, das schon eine Stunde nach b-Induktion differentiell exprimiert ist, konnte ein direktes Zielgen des bW/bE-Heterodimers identifiziert werden. Bei der im DNase I-Protektionsexperiment von dem b-Komplex geschützten Region sind 16 der 26 Basenpaare identisch mit der b-Bindesequenz im Promotor von *lga2* (Abbildung 33). Relativ konserviert ist in beiden Sequenzen das Motiv GATG- (9n) -ACA, das im Fall von *lga2* vollständig erhalten ist und im Fall von *frb52* nur eine Abweichung zeigt (Abbildung 33). Dieses Motiv ist identisch mit dem konservierten *hsg*-Motiv in *S. cerevisiae*, an das das Heterodimer aus Mat $\alpha$ 1p und Mat $\alpha$ 2p bindet (Goutte und Johnson, 1988). Dies könnte für eine evolutionäre Konservierung der Regulationsmechanismen von Homeodomänenprotein-Komplexen sprechen. Vergleicht man dagegen die b-Bindesequenzen in den Promotoren von *lga2* und *frb52* mit der im Promotor von *dik6* (G. Weinzierl, pers. Mitteilung), so sind zwischen *lga2* und *dik6* nur 13, zwischen *frb52* und *dik6* nur 10 und zwischen allen dreien nur 8 der 26 Basenpaare in den protektierten Regionen identisch (Abbildung 33). Außerdem zeigt die b-Bindestelle im *dik6*-Promotor eine deutliche Abweichung von dem *hsg*-Motiv. Daher kann aus den vorliegenden Daten keine eindeutige Konsensussequenz für b-Bindestellen abgeleitet werden. Auffällig ist jedoch die in allen drei Sequenzen auftretende Wiederholung des Basentriplets TGA im Abstand von neun Nucleotiden (Abbildung 33).



**Abbildung 33: Vergleich der b-Bindesequenzen in den Promotoren von *frb52*, *lga2* und *dik6*.** Die durch Bindung von His-Kon8 auf beiden DNA-Strängen protektierten Nucleotide sind fett dargestellt, identische Nucleotide durch graue Kästen hinterlegt. Darunter ist das konservierte *hsg*-Motiv aus *S. cerevisiae* angegeben. Die Pfeile bezeichnen die TGA-Basentriplets. Die b-Bindesequenz aus dem *lga2*-Promotor stammt aus Romeis *et al.* (2000), die aus dem *dik6*-Promotor von G. Weinzierl (pers. Mitteilung) und das *hsg*-Motiv aus Goutte und Johnson (1998).

Für *frb52* konnte in Deletionsmutanten kein Einfluss auf das Kreuzungsverhalten und die pathogene Entwicklung beobachtet werden. Das gleiche Ergebnis zeigte sich bei Deletion von *lga2* (Urban *et al.*, 1996a). Nur bei Deletion von *dik6* konnte eine Reduktion in der Pathogenität der Deletionsmutanten festgestellt werden (G. Weinzierl, pers. Mitteilung). Damit ist ungeklärt, welche Rolle diese direkten Zielgene des bW/bE-Heterodimers während der Entwicklung spielen. Einer der Gründe für das Fehlen eines eindeutigen Phänotyps von Mutan-

tenstämmen kann genetische Redundanz sein<sup>32</sup>. Ob ein zu *frb52* ähnliches Gen in *U. maydis* existiert, ist bislang nicht bekannt. Eine weitere Möglichkeit besteht darin, dass die Deletion der Gene zwar einen Einfluss auf das Kreuzungsverhalten oder die Pathogenität hat, die Unterschiede aber zu gering sind, um mit den verwendeten Methoden detektierbar zu sein. Aus diesem Grund erscheint die Etablierung sensitiverer Kreuzungs- und Pathogenitätstests sinnvoll, wie z. B. die Analyse simultaner Infektionen von Mutanten- und Wildtyp-Stämmen. Unter derartigen Konkurrenzbedingungen sollte ein positiver bzw. negativer Effekt von Mutationen leichter nachweisbar sein.

Für die zu Frb52 ähnliche DNA-Polymerase  $\beta$  in Säugerzellen konnte eine Rolle im sogenannten BER-Mechanismus ("base excision repair") der DNA-Reparatur ermittelt werden (Dianov *et al.*, 1999; Prasad *et al.*, 2000). Eine Induktion eines derartigen Reparatursystems könnte während der Interaktion mit der Pflanze notwendig sein. Falls Maispflanzen auf die Infektion durch *U. maydis* mit der Induktion einer sogenannten hypersensitiven Antwort und der Produktion reaktiver Sauerstoffspezies (Heath, 2000) reagieren, so könnte dies Schäden in der pilzlichen DNA hervorrufen. In einem solchen Fall wäre bei Deletion der DNA-Polymerase X wahrscheinlich kein deutlicher Phänotyp zu erwarten, da in eukaryotischen Zellen noch eine Reihe weiterer Reparaturmechanismen vorhanden sind, die entsprechende Reparaturfunktionen zumindestens teilweise übernehmen können (Seeberg *et al.*, 1995)<sup>33</sup>.

Eine interessante alternative Möglichkeit für eine Funktion von *frb52* während der pathogenen Entwicklung basiert auf der Beobachtung, dass eine Überexpression von DNA-Polymerase  $\beta$  in humanen Zelllinien eine höhere spontane Mutationsrate zur Folge hat (Frosina, 2000). Die Induktion von *frb52* könnte ebenfalls zu einer höheren Mutationsrate in *U. maydis*-Zellen während der pathogenen Entwicklung führen. Eine derartige Variation der Mutationsrate in Abhängigkeit von den Umweltbedingungen, auch als adaptive Evolution bezeichnet, stellt bei Pathogenen einen wichtigen Abwehrmechanismus gegen die Immunantwort der Wirtsorganismen dar (Metzgar und Wills, 2000). In einigen Fällen wird dabei eine Beteiligung von DNA-Reparaturmechanismen angenommen (Rosenberg *et al.*, 1998; Radman, 1999).

### 3.1.5 Weitere Möglichkeiten zur Untersuchung der von b kontrollierten Regulationskaskade

Damit konnten bislang zwar drei direkte Zielgene des bW/bE-Heterodimers identifiziert werden, keines dieser Gene besitzt jedoch eine zentrale Bedeutung während der pathogenen Entwicklung. Ein Problem bei der Identifizierung solcher Zielgene liegt darin, dass die Mehrzahl

---

<sup>32</sup> Im Fall von *dik6* konnte inzwischen mit *dkh6* ein ähnliches Gen gefunden werden, das die Funktion von *dik6* übernehmen könnte (G. Weinzierl, pers. Mitteilung).

<sup>33</sup> Im Zusammenhang mit möglichen Abwehrmechanismen der Pflanze kann auch die b-abhängige Repression von *frb323*, einem Gen für eine Plasmamembran (H<sup>+</sup>)-ATPase gesehen werden (siehe Abschnitt 6.12).

der in den bisherigen Arbeiten und auch der in dieser Arbeit isolierten b-regulierten Gene wahrscheinlich einer indirekten Regulation unterliegen. Dieser Effekt könnte durch die Etablierung eines posttranslationalen Systems zur kontrollierten Bildung von bW/bE-Heterodimeren in der Zelle eliminiert werden. Ein derartiges System ist von Sablowski und Meyerowitz (1998) erfolgreich zur Identifikation von direkten Zielgenen eines Heterodimers aus Homeodomänenproteinen in *Arabidopsis thaliana* eingesetzt worden. Es basiert auf der Interaktion der Hormon-Bindedomäne des Glukokortikoid-Rezeptors mit Hsp90<sup>34</sup>. Dieses System wäre wahrscheinlich auch in *U. maydis* anwendbar, nachdem es sich bei den Hsp90-Proteinen um eine in Eukaryoten sehr konservierte Proteinfamilie handelt (Sablowski und Meyerowitz, 1998). Allerdings treten in *U. maydis* generell Probleme bei der Expression heterologer Gene auf, deren molekulare Ursachen derzeit nicht verstanden sind (O. Ladendorf und J. Kämper, pers. Mitteilung).

Alternativ wäre zur Untersuchung der b-abhängigen Prozesse ein gerichteter Ansatz vorstellbar, bei dem gezielt potentielle Zielgene isoliert und deletiert werden. Die abgeschlossene Sequenzierung von *U. maydis* erleichtert ein derartiges Vorgehen. Als Kandidaten dafür könnten z. B. die durch den A-Paarungstyplocus regulierten Gene *pcc1* und *clp1* aus dem Basidiomyceten *Coprinus cinereus* dienen (Murata *et al.*, 1998; Inada *et al.*, 2001). Der A-Paarungstyplocus ist dem b-Locus von *U. maydis* vergleichbar (Banham *et al.*, 1995; Kues, 2000). Bei Überexpression von Clp1 bzw. bei Deletion von *pcc1* kommt es unabhängig von A zur Ausbildung von Schnallenstrukturen in den Filamenten, einem Prozess der normalerweise durch das A-Heterodimer gesteuert wird (Murata *et al.*, 1998; Inada *et al.*, 2001). Bei *clp1* könnte es sich sogar um ein direktes Zielgen handeln, da sich im Promotor dieses Gens die Sequenz GATG-(11n)-ACA befindet, die dem oben erwähnten *hsg*-Motiv aus *S. cerevisiae* ähnelt. Homologe dieser Proteine könnten auch in *U. maydis* wichtige Entwicklungsschritte bei der b-abhängigen Filamentbildung kontrollieren. Da die entsprechenden Gene in *Coprinus cinereus* A-abhängig exprimiert sind, könnten eventuell vorhandene Homologe in *U. maydis* durch b reguliert sein und sollten daher auch im RNA-Fingerprint-Ansatz identifizierbar sein<sup>35</sup>.

---

<sup>34</sup> Proteine, die in Fusion mit der Hormon-Bindedomäne exprimiert werden, werden im Zytosol zurückgehalten. Bei Zugabe von Steroidhormonen erfolgt die Dissoziation von Hsp90 und das Fusionsprotein kann in den Zellkern gelangen. Bei gleichzeitiger Zugabe von Inhibitoren der Proteinbiosynthese findet so ausschließlich eine Aktivierung direkter Zielgene statt.

<sup>35</sup> Aus diesem Grund wurden auch Oligonukleotide benutzt, die Ähnlichkeit zu Sequenzen aus der HMG-Domäne von *pcc1* aus *Coprinus cinereus* aufweisen. Von den bislang untersuchten Amplicons, die mit diesen Oligonukleotiden erzeugt wurden, wies allerdings keines Ähnlichkeiten zu diesen Sequenzen auf (nicht gezeigt). Ein ähnlicher Versuch, durch Verwendung sequenzspezifischer Oligonukleotide gezielt differentiell exprimierte Mitglieder einer bestimmten Genklasse zu isolieren, ist für Mitglieder der Zinkfinger-Genfamilie bereits erfolgreich durchgeführt worden (Stone und Wharton, 1994).

Es stellt sich allerdings die Frage, ob bei der Vielzahl der durch das bW/bE-Heterodimer regulierten Gene und Prozesse die Identifikation weiterer zentraler Regulatoren überhaupt Aufschluss über die verschiedenen durch b regulierten Vorgänge bieten würde. Stattdessen könnte gerade die Untersuchung von Effektoren, deren Ausfall nur einen Teil des pathogenen Programms betreffen, dazu besser geeignet sein. In diesem Zusammenhang muss darauf hingewiesen werden, dass die interessantesten Ergebnisse dieser Arbeit durch die Analyse der vermutlich indirekt durch b regulierten Gene *kpp6*, *frb34*, *frb124* und *frb136* gewonnen wurden.

Eine andere Strategie könnte daher eventuell mehr Erfolg zeigen: Nachdem mehr als die Hälfte der erzeugten Amplicons von differentiell regulierten Genen stammt, kann mit der Technik des RNA-Fingerprints eine Subpopulation von Genen isoliert werden, die in Bezug auf b-regulierte Gene deutlich angereichert ist. Die Sequenzanalyse der genomischen Loci von *frb52*, *frb110*, *kpp6*, *frb136* (*frb204*) und *frb34* zeigte, dass die Amplicons in allen Fällen Teile des offenen Leserahmens beinhalten. Eine Integration einer Resistenzkassette in den entsprechenden Regionen würde wahrscheinlich zu einem Ausfall der Genfunktion führen. Mit einer durchschnittlichen Größe von 500 bp liefern die Amplicons ausreichend große Flanken zur homologen Rekombination. Aufgrund dieser Eigenschaften wäre ein Vorgehen denkbar, bei dem die Amplicons zunächst kloniert und sequenziert werden. Anschließend könnten davon ausgehend direkt Konstrukte für die Insertionsmutagenese der entsprechenden Gene in solopathogenen haploiden Stämmen hergestellt werden, wie dies im Fall von *big6* mit vergleichsweise geringem Aufwand durchgeführt wurde (siehe Abschnitt 6.7). Dem Nachteil, dass in einigen Fällen mit der Insertion einer Resistenzkassette die Funktion des Gens eventuell nicht beeinträchtigt wird, stände der Vorteil der schnelleren Funktionsanalyse einer großen Anzahl von Genen gegenüber, von denen die Hälfte b-reguliert sein sollte.

## 3.2 Die Rolle der MAP-Kinase Kpp6 bei der Pathogenität

### 3.2.1 *kpp6* kodiert für eine ungewöhnliche MAP-Kinase

Mit *kpp6* konnte ein MAP-Kinasegen identifiziert werden, dessen Expression durch das bW/bE-Heterodimer stark induziert wird. Im Promotorbereich konnten keine Sequenzen mit Ähnlichkeit zu den bisher bekannten b-Bindesequenzen gefunden werden. Da die transkriptionelle Aktivierung auch erst zu einem späteren Zeitpunkt nach Induktion der *b*-Genexpression stattfindet handelt es sich vermutlich um ein indirekt durch b reguliertes Gen. Bei der weiteren Untersuchung zeigten sich zwei verschieden große Transkripte, von denen das eine b-induziert ist und das andere unter Pheromon-Stimulationsbedingungen auftritt. Nach den bisherigen Ergebnissen kodieren aber beide Transkripte für dasselbe Protein. Die unterschiedliche Transkriptlänge wird vermutlich durch die Bindung von Prf1 an die im Promotor befindlichen PRE-Boxen bewirkt, was eine Verschiebung des Transkriptions-Startpunkts zur Folge hat.

Die Bindung von Prf1 im Promotor scheint dabei keinen Einfluss auf die Transkription von *kpp6* zu haben. Dieser Befund steht im Gegensatz zu den Ergebnissen bei allen bisher untersuchten Genen, die PRE-Boxen in der Nähe ihres Promotors besitzen. Sowohl für die Gene des *b*-Locus als auch für *mfa* und *pra* konnte gezeigt werden, dass Prf1 essentiell für die Transkription ist (Hartmann *et al.*, 1996). Das bedeutet, dass die pheromoninduzierte Expression von *kpp6* durch einen anderen Transkriptionsfaktor bewirkt wird. Es könnte sich hier sogar um dasselbe Protein handeln, das auch die *b*-abhängige Induktion vermittelt. Da pheromonstimulierte und *b*-induzierte Zellen eine Reihe von Gemeinsamkeiten aufweisen, wie z. B. eine Arretierung des Zellzyklus und unipolares Wachstum, erscheint eine ähnliche Regulation einiger Gene in beiden Situationen wahrscheinlich. Mit der Analyse des *kpp6*-Promotors und der Identifizierung von daran bindenden Faktoren könnte die Isolierung eines verbindenden Elements zwischen diesen beiden Signalkaskaden möglich sein. Dies wäre ein großer Schritt hin zu einem Verständnis der während der frühen Infektionsphase ablaufenden Prozesse.

Kpp6 selber weist in seinem N-Terminus eine etwa 150 Aminosäuren große Domäne auf, die keinerlei Ähnlichkeit zu bekannten Proteinen oder Proteindomänen besitzt. Es finden sich auch keine Motive, die eine Prozessierung oder einen Transport des Proteins in ein bestimmtes Zellkompartiment vermitteln. Durch Western-Analysen konnte die Anwesenheit des N-Terminus in Kpp6 gezeigt werden. Der N-Terminus unterscheidet Kpp6 deutlich von fast allen bekannten MAP-Kinasen, deren Größe konserviert ist und bei etwa 350 Aminosäuren liegt<sup>36</sup>. Mögliche Funktionen des N-Terminus könnten in der Vermittlung oder Verhinderung einer spezifischen Interaktion mit anderen Proteinen liegen. Nachdem allerdings die Deletion dieses Bereichs keinen Effekt in Bezug auf die untersuchten Phänotypen zeigt und auch ein Protein, in dem der N-Terminus von Kpp6 an Kpp2 fusioniert ist, die Rolle von Kpp2 übernehmen kann, erscheint das eher unwahrscheinlich. Damit bleibt die Funktion dieser Domäne zunächst ungeklärt.

Ein ebenfalls ungeklärtes Phänomen ist, dass ein in den *ip*-Locus integriertes Fragment aus dem *kpp6*-Locus die *kpp6*-Deletionsmutanten nicht komplementieren kann, obwohl der darin enthaltene Promotorbereich für die pheromon- und *b*-abhängige Regulation ausreicht. Dies lässt zunächst auf ein außerhalb dieses Fragments liegendes Promotorelement schließen, das für die transkriptionelle Regulation zu dem Zeitpunkt, an dem der Pathogenitätsdefekt der *kpp6*-Deletionsmutanten beobachtet werden kann, notwendig ist. Ein Konstrukt, in dem ein für die C-terminale MAP-Kinasedomäne kodierendes Fragment unter der Kontrolle des gleichen Promotorfragments steht, reicht allerdings für die Komplementation der Deletions-

<sup>36</sup> Bis jetzt wurden nur in Säugerzellen mit den MAP-Kinasen der ERK5-Subfamilie Kinasen mit davon abweichender Struktur gefunden (Kültz, 1998). Im humanen ERK5 befindet sich am C-Terminus eine zusätzliche, 400 Aminosäuren große Domäne, die keine Ähnlichkeit zu bekannten Proteinen oder Proteindomänen aufweist (Kasler *et al.*, 2000). Dieser Bereich vermittelt Bindung zu Transkriptionsfaktoren der MEF2-Familie und enthält außerdem eine transkriptionelle Aktivierungsdomäne (Kasler *et al.*, 2000). Er besitzt jedoch keine Ähnlichkeit zu der N-terminalen Domäne von Kpp6. Interessanterweise sind bei allen MAP-Kinasen N- und C-Terminus benachbart; aus diesem Grund befinden sich der N-Terminus von Kpp6 und der C-Terminus von ERK5 vermutlich an vergleichbaren Stellen im Molekül (vgl. Abbildung 34).

mutanten aus. Eine mögliche Erklärung könnte darin bestehen, dass in dem für den N-Terminus kodierenden Bereich ein zusätzliches, negativ regulatorisches Element liegt. Zur Klärung dieses Phänomens wäre eine Untersuchung der *kpp6*-Expression auf und in der Pflanze hilfreich. Technisch besteht hier allerdings die Schwierigkeit, genügende Mengen an Pilzmaterial vor allem aus den frühen Stadien der Infektion zu erhalten.

Ungewöhnlich ist außerdem der Alaninlinker, der sich zwischen dem N-Terminus und der eigentlichen MAP-Kinasedomäne befindet. Dabei handelt es sich je nach Allel um sechs bis zwölf Wiederholungen des Basentriplets GCT, wobei wahrscheinlich alle Allele für funktionelle Kpp6-Proteine kodieren. Derartige, als Mikrosatelliten bezeichnete Triplettwiederholungen finden sich in allen untersuchten eukaryontischen Genomen, zeichnen sich in der Regel durch eine variable Länge aus und entstehen vermutlich durch Genkonversion (Jakupciak und Wells, 2000; Richard und Paques, 2000). Von besonderem Interesse sind hier Wiederholungen der Sequenz CAG<sup>37</sup>, die zur Bildung von unterschiedlich langen Folgen von Glutaminresten im Protein führen, wobei Proteine mit vielen aufeinander folgenden Glutaminresten zur Ausbildung unlöslicher Fibrillen neigen (Cummings und Zoghbi, 2000). Bislang gibt es keine Arbeit, die sich mit der Auswirkung einer Folge von Alaninresten in einem Protein befasst hat. Es ist aber anzunehmen, dass dieser Bereich in Kpp6 eine flexible Struktur zwischen den beiden Domänen einnehmen kann, er wurde deshalb als "Alaninlinker" bezeichnet.

### 3.2.2 Kpp6 besitzt eine wichtige Funktion während der frühen Infektionsphase

Obwohl *kpp6* während der Pheromonstimulation transkriptionell induziert und auch während des vegetativen Wachstums basal exprimiert ist, weisen Deletionsmutanten außerhalb der Pflanze keinen erkennbaren Phänotyp auf. Bei Austausch von *kpp6* durch das Allel *kpp6T355A,Y357F*, das für eine nicht mehr aktivierbare Variante kodiert, zeigt sich ebenfalls keine Abweichung vom Wildtyp. Damit kann ausgeschlossen werden, dass in den Deletionsmutanten ein homologes Protein die Funktion von Kpp6 während dieser Prozesse übernimmt (vgl. Madhani *et al.*, 1997), weshalb die Bedeutung der transkriptionellen Regulation von *kpp6* in diesen Stadien unklar ist. Allerdings werden z. B. auch die Gene des *b*-Locus bereits während der Pheromonstimulation aktiviert, obwohl kein funktionelles bW/bE-Heterodimer ausgebildet werden kann, die Proteine also nach allen bekannten Daten vor der Zellfusion keine Funktion besitzen (Hartmann *et al.*, 1996; Urban *et al.*, 1996b). Im Fall der *b*-Proteine könnte diese Expression notwendig sein, damit nach der Zellfusion eine schnelle Bildung von *b*-Komplexen erfolgt, die für die Etablierung des Dikaryons benötigt werden. Bei Kpp6 wäre etwas Ähnliches denkbar; allerdings laufen in den Mutanten die Filamentbildung, das Spitzenwachstum und die Bildung appressorienähnlicher Strukturen normal ab, was eine Beteiligung an diesen Prozessen unwahrscheinlich erscheinen lässt. Die daran beteiligte MAP-Ki-

---

<sup>37</sup> Es handelt sich dabei um den gleichen Mikrosatelliten wie bei den Wiederholungen des Basentriplets GCT; das Basentriplett CAG befindet sich auf dem Gegenstrang in einem unterschiedlichen Leseraster.

nase Kpp2 ist dagegen konstitutiv exprimiert. Dies steht im Gegensatz zu der Situation in *S. cerevisiae*, wo die Expression der für die Übertragung des Pheromonsignals verantwortliche MAP-Kinase Fus3p während der Pheromonstimulation induziert ist (Elion *et al.*, 1990). Daran ist der Transkriptionsfaktor Ste12p beteiligt, der eine ähnliche Rolle wie Prf1 spielt. Vor diesem Hintergrund und aufgrund der hohen Ähnlichkeit zu Kpp2 ist es denkbar, dass Kpp6 aus einer ursprünglich an der Pheromon-Signaltransduktion beteiligten MAP-Kinase entstanden ist, deren Expression einer stringenten Kontrolle durch Prf1 unterlag.

Kpp6 kann erst während der pathogenen Entwicklung in der Pflanze eine Funktion zugeordnet werden: Deletionsmutanten und Stämme mit inaktiven *kpp6*-Allelen zeigen einen dramatischen Pathogenitätsdefekt. Es scheint sich bei Kpp6 um einen Virulenzfaktor<sup>38</sup> zu handeln, der für das vegetative Wachstum nicht von Bedeutung ist. Die Anzahl an Pflanzen, bei denen es zur Tumorbildung kommt, ist geringer, und die gebildeten Tumore sind in den meisten Fällen deutlich kleiner und befinden sich zum Teil an Stellen, an denen bei Wildtyp-Infektionen normalerweise keine Tumorbildung zu beobachten ist. Die in den Tumoren gefundenen pilzlichen Filamente und Brandsporen lassen dagegen keine Unterschiede zum Wildtyp erkennen. Auch wenn dadurch nicht ausgeschlossen ist, dass Kpp6 beim Wachstum in der Pflanze eine Funktion besitzt, die z. B. in der Orientierung des Pilzmyzels hin zu meristematisch aktiven Bereichen in der Pflanze liegen könnte, so scheinen in den *kpp6*-Mutanten vor allem frühe Prozesse während der Pflanzeninfektion gestört zu sein. Diese Vermutung wird durch den auffälligsten Mutanten-Phänotyp unterstützt, das vollständige Ausbleiben der primären Anthocyanbildung durch die Maispflanze. Nachdem *kpp6*-Deletionsmutanten noch zur Ausbildung normaler appressorienähnlicher Strukturen in der Lage sind, bislang aber in der Nähe der Infektionsstellen keine pilzlichen Filamente in der Pflanze detektiert werden konnten, tritt der Pathogenitätsdefekt vermutlich während oder kurz nach dem Eindringen in die Pflanze auf. Sehr interessant wäre in diesem Zusammenhang eine genauere mikroskopische Analyse des Penetrationsvorgangs. Bei simultaner Infektion und Detektion von solopathogenen Wildtyp- und Mutanten-Zellen, die mit unterschiedlichen GFP-Proteinen markiert sind (siehe Abschnitt 2.4.4), wäre ein direkter Vergleich während der Penetration möglich.

### 3.2.3 Welche Signale werden von Kpp6 übertragen?

In phytopathogenen Pilzen konnten in den letzten Jahren eine Reihe von homologen MAP-Kinasen isoliert werden. Dabei handelt es sich um Pmk1 und Mps1 aus *Magnaporthe grisea* (Xu und Hamer, 1996; Xu *et al.*, 1998), um Chk1 aus *Cochliobolus heterostrophus* (Lev *et al.*, 1999), um Cmk1 aus *Colletotrichum lagenarium* (Takano *et al.*, 2000), um Bmp1 aus

<sup>38</sup> Der Begriff "Virulenzfaktor" ist in der Literatur nicht eindeutig definiert (vgl. Schäfer, 1994; Hogan *et al.*, 1996; Agrios, 1997). Er wird hier zur Bezeichnung eines Gens bzw. Proteins benutzt, dessen Ausfall im vegetativen Wachstum keine Auswirkung hat aber zu einer deutlichen Reduktion der Pathogenität führt.

*Botrytis cinerea* (Zheng *et al.*, 2000) und um FMK1 aus *Fusarium oxysporum* (Di Pietro *et al.*, 2001). In allen Fällen kommt es bei Deletion der entsprechenden Gene zu Defekten bei der Ausbildung der Infektionsstrukturen und bei der Penetration der Pflanzenoberfläche (Xu, 2000). Die MAP-Kinasen Pmk1, Cmk1 und Bmp1 sind wahrscheinlich auch für die weitere pathogene Entwicklung in der Pflanze notwendig, da die entsprechenden Deletionsmutanten auch nach Verwundung der Pflanzenoberfläche den Wirt nicht infizieren können (Xu und Hamer, 1996; Takano *et al.*, 2000; Zheng *et al.*, 2000). Im Gegensatz dazu können *Magnaporthe grisea*-Mutanten, in denen das Gen für die MAP-Kinase Mps1 deletiert ist, Reispflanzen durch Wundstellen infizieren (Xu *et al.*, 1998).

Bislang liegen nur für *Magnaporthe grisea* weitere Daten zu den vermittelten Signalen oder Zielproteinen der MAP-Kinasen vor. Hier konnte gezeigt werden, dass Cutin-Monomere und die Hydrophobizität der Oberfläche wichtige Signale für die Appressorienbildung darstellen (Lee und Dean, 1994; Gilbert *et al.*, 1996). Mit dem für die Ausbildung der Infektionsstruktur notwendigen Plasmamembranprotein Pth11 könnte ein Rezeptor für eines dieser Signale identifiziert worden sein (DeZwaan *et al.*, 1999). Die Defekte der *pth11*-Deletionsmutanten können durch Zugabe von cAMP aufgehoben werden (DeZwaan *et al.*, 1999), was für eine Beteiligung der cAMP-Kaskade an der Signalübermittlung spricht. Ein wichtiger Prozess, der sowohl durch die Pmk1-Kinasekaskade als auch durch die cAMP-Kaskade reguliert wird, ist die für die Penetration notwendige Erhöhung des Zellurgors in den Appressorien durch Akkumulation großer Mengen an Glycerin (Thines *et al.*, 2000). Direkte Zielproteine der Kinasen konnten bisher nicht isoliert werden.

Über die von Kpp6 übermittelten Signale und regulierten Prozesse kann nur spekuliert werden. Mögliche Signale könnten ebenfalls Moleküle darstellen, die verstärkt an Orten der Zellwandsynthese, z. B. beim Längenwachstum der Pflanzenzellen, auftreten. An diesen Stellen wäre ein Eindringen des Pilzes leichter möglich. Damit würde Kpp6 eine Funktion in der Orientierung des filamentösen Wachstums auf der Blattoberfläche erfüllen. An der Perception des Signals könnte das von dem schon erwähnten b-induzierten Gen *dik6* kodierte Siebentransmembranprotein beteiligt sein. Die Expression von *dik6* ist auf das b-abhängige Filament außerhalb der Pflanze beschränkt (G. Weinzierl, pers. Mitteilung).

Für eine genauere Untersuchung wäre die Etablierung eines *in vitro*-Systems zur Ausbildung appressorienähnlicher Strukturen hilfreich, ähnlich der bei *Magnaporthe grisea* angewandten Kultivierung auf hydrophoben Membranen. Eine möglich Alternative läge in der Verwendung des von Ruiz-Herrera *et al.* (1999a) beschriebenen Kultursystems in Gegenwart embryogener Maiszellen. Dabei kann zwar keine Bildung von Infektionsstrukturen beobachtet werden, wenn damit allerdings dikaryotische Filamente wirklich zur Kernteilung und zur Myzelbildung gebracht werden können, wäre es interessant zu untersuchen, inwieweit *kpp6*-Mutanten dazu noch in der Lage sind. Falls sich hier ein Unterschied zum Wildtyp zeigen sollte, wäre das ein möglicher Ansatzpunkt zur Identifizierung eines Pflanzensignals.

Zu den weiteren Mitgliedern der an der Signalübertragung beteiligten MAP-Kinasekaskade, zu der Kpp6 gehört, liegen ebenfalls keine Daten vor. Ein Versuch einer Epistasisanalyse mit einer konstitutiv aktiven Form von Fuz7 hatte keinen Erfolg<sup>39</sup>. Mit den schon beschriebenen Stämmen FB1kpp4-2 und FB1fuz7DD (siehe Abschnitt 2.4.12) könnte eine derartige Analyse durchgeführt werden, falls die Expression dieser Allele einen Einfluss auf die pathogene Entwicklung hat. Eine mögliche direkte Interaktion zwischen Kpp6 und Fuz7 wäre auch durch einen "Two Hybrid"-Ansatz in Hefe nachweisbar, wie das z. B. im Fall der MAP-Kinase Fus3p und der MAPK-Kinase Ste7p aus *S. cerevisiae* erfolgreich geschehen ist (Marcus *et al.*, 1994). In einem derartigen Ansatz könnten auch weitere MAPK-Kinasen, die im sequenzierten Teil des Genoms von *U. maydis* vorhanden sind, auf eine Interaktion mit Kpp6 untersucht werden.

Theoretisch könnten bei einer Durchmusterung einer Two Hybrid-Genbibliothek auch Gene identifiziert werden, die von Kpp6 reguliert werden. Es besteht hier allerdings eventuell das Problem, dass einige Zielproteine mit der unphosphorylierten Form der MAP-Kinase nicht interagieren. Entsprechend konnte z. B. in *S. cerevisiae* in einem Two Hybrid-Ansatz für den durch Fus3p phosphorylierten Zellzyklus-Inhibitor Far1p eine Interaktion mit Fus3p nachgewiesen werden, nicht jedoch für den Transkriptionsfaktor Ste12p (Ferguson *et al.*, 1994). Trotzdem könnte ein derartiger Ansatz sinnvoll sein, da nicht ausgeschlossen werden kann, dass Kpp6 auch im unphosphorylierten Zustand regulatorische Funktionen erfüllt. Eine derartige Regulation wurde z. B. bei der MAP-Kinase Kss1p in *S. cerevisiae* beobachtet (Bradwell *et al.*, 1998). Interessant wäre auch ein entsprechender Ansatz zur Identifizierung von Proteinen, die mit dem N-Terminus von Kpp6 interagieren.

Eine potentielle Funktion von Kpp6 besteht in der Kontrolle der Orientierung des Spitzenwachstums auf der Pflanzenoberfläche hin zu bevorzugten Eintrittstellen. Innerhalb der Pflanze ist eine ähnliche Rolle vorstellbar, wodurch die häufig unübliche Positionierung der Tumore bei Infektion mit *kpp6*-Deletionsmutanten erklärt wäre. Daneben könnte Kpp6 auch für die Regulation des Penetrationsvorgangs selber verantwortlich sein und z. B. die Expression von extrazellulären lytischen Proteinen steuern, die für das Durchdringen der pflanzlichen Zellwand benötigt werden. Eine weitere Möglichkeit besteht in der Regulation der Gene des *b*-Locus während des Wachstums auf und in der Pflanze. Diese Erklärung erscheint jedoch eher unwahrscheinlich, da *kpp6*-Mutanten zumindestens auf der Blattoberfläche normales filamentöses Spitzenwachstum zeigen. Zur Klärung der Frage, ob der Pathogenitätsverlust auf eine fehlende Expression der *b*-Gene in den Mutanten zurückgeführt werden kann,

---

<sup>39</sup> Dazu wurden durch PCR-Mutagenese in der regulatorischen Domäne von Fuz7 Mutationen eingeführt (SIADT wurde zu DDADD), was zu einer konstitutiven Aktivierung von Fuz7 führen sollte (vgl. Mansour *et al.*, 1996a und Abschnitt 4.1.4). Dieses Allel wurde unter Kontrolle des *o2tef*-Promotors in den *ip*-Locus eingebracht, konnte aber in einem Kontrollexperiment *fuz7*-Deletionsmutanten nicht komplementieren (nicht gezeigt). Das Allel scheint daher inaktiv zu sein.

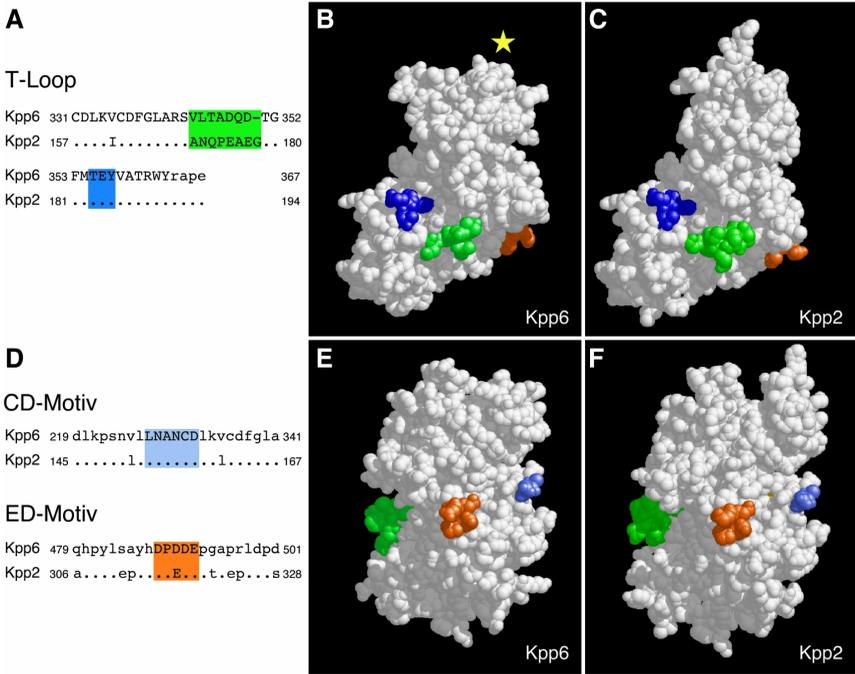
müsste *kpp6* in einem Stamm, in dem eine konstitutive Expression des bW/bE-Heterodimers erfolgt, durch das inaktive *kpp6T355A,Y357F*-Allel ersetzt werden.

Daneben wäre denkbar, dass Kpp6 für die Aufrechterhaltung der Zellwand-Integrität notwendig ist. Die Mutanten könnten in diesem Fall Probleme bei der Bildung der appressorien-ähnlichen Strukturen aufweisen, was Defekte bei der Penetration zur Folge hätte, das weitere Wachstum innerhalb der Pflanze könnte dagegen normal verlaufen. Eine entsprechende MAP-Kinase wurde mit Mps1 aus *Magnaporthe grisea* isoliert (Xu *et al.*, 1998). Sie zeigt Homologie zu Sl2p aus *S. cerevisiae* (Davenport *et al.*, 1995). Beide MAP-Kinasen können der YERK2-Unterfamilie zugeordnet werden, deren Mitglieder an der Aufrechterhaltung der Zellwand-Integrität beteiligt sind (Kültz, 1998). Kpp6 gehört dagegen wie Kpp2 zu der YERK1-Unterfamilie pilzlicher MAP-Kinasen, die bei Paarungsvorgängen, Morphologie-wechsel und Pathogenitätsprozessen wichtige Rollen spielen (Kültz, 1998). Da *kpp6*-Mutanten auch keinen erkennbaren Zellwanddefekt zeigen, wie er bei *mps1*- und *slt2*-Mutanten zu beobachten ist (nicht gezeigt), erscheint eine Funktion bei der Aufrechterhaltung der Zellwand-Integrität eher unwahrscheinlich.

### 3.2.4 Spezifitätsdeterminanten in Kpp6 und Kpp2

In dieser Arbeit konnten für Kpp2 und Kpp6 unterschiedliche, aber teilweise überlappende Funktionen festgestellt werden. So scheint Kpp6 an der Übertragung des Pheromonsignals nicht beteiligt zu sein und in *kpp2*-Deletionsmutanten die Rolle von Kpp2 nur zum Teil übernehmen zu können. Da die *kpp6/kpp2*-Doppelmutanten allerdings nicht völlig steril sind, könnte in *U. maydis* noch eine dritte MAP-Kinase vorhanden sein, welche die Funktion von Kpp2 übernimmt. Mit der nun fast vollständig vorhandenen Genomsequenz von *U. maydis* wird diese Frage einfach zu klären sein. Dagegen erscheint es wahrscheinlich, dass Kpp2 in den *kpp6*-Deletionsmutanten die Funktion von Kpp6 übernimmt.

Da Kpp6 und Kpp2 einen hohen Grad an Ähnlichkeit aufweisen, stellt sich die Frage, worin die Spezifität zwischen diesen beiden MAP-Kinasen begründet ist. Wie oben beschrieben, scheint der N-Terminus von Kpp6 daran nicht beteiligt zu sein. Ein ähnliches Problem besteht bei den sehr ähnlichen MAP-Kinasen in Säugerzellen. Hier konnten zwei unterschiedliche Bereiche identifiziert werden, die vor allem für die Interaktion der MAP-Kinasen mit den entsprechenden MAPK-Kinasen wichtig sind. Dabei handelt es sich zum einen um den sog. "T-Loop", auf dem sich auch das TEY-Phosphorylierungsmotiv befindet, der die Spezifität zwischen unterschiedlichen p38-Proteinen vermittelt (Enslin *et al.*, 2000). Zum anderen konnte eine sogenannte "docking groove" oder Bindetasche gefunden werden, die zur Diskriminierung zwischen ERK2 und p38 $\alpha$  dient (Tanoue *et al.*, 2000; 2001). Sie wird von sogenannten ED- und CD-Motiven begrenzt, deren Austausch zwischen ERK2 und p38 zu einer veränderten Spezifität führt (Tanoue *et al.*, 2001).



**Abbildung 34: Vergleich der Interaktionsdomänen von Kpp6 und Kpp2.** Die Vorhersagen der Molekülstrukturen wurden mit dem Programm SWISSMODEL (Peitsch, 1996; Guex *et al.*, 1999) erstellt, die grafische Darstellung erfolgte mit dem Programm RASMOL (Sayle und Milner-White, 1995). Das Modell für Kpp6 enthält nur den C-Terminus ab Aminosäure 190, da der N-Terminus keine Homologien zu bekannten Aminosäuresequenzen besitzt; aus diesem Grund ist keine Strukturvorhersage möglich. Die Farben der hervorgehobenen Bereiche sind in allen Abbildungen gleich: dunkelblau, TEY-Phosphorylierungsmotiv; grün, unterschiedliche Sequenz im T-Loop; orange, ED-Motiv; hellblau, CD-Motiv. Bei den Sequenzvergleichen sind identische Sequenzen durch Punkte, die Sequenzen der jeweiligen Motive durch Großbuchstaben, danebenliegende Sequenzen durch Kleinbuchstaben und die in den Molekülmodellen hervorgehobenen Aminosäurereste durch farbige Kästen gekennzeichnet. **A)** Sequenzvergleich des T-Loops von Kpp6 und Kpp2. **B)** und **C)** Der T-Loop in Kpp6 und Kpp2, an der rechten Seite sind die ED-Motive zu erkennen. In der Furche oberhalb des dunkelblau markierten TEY-Motivs auf der linken Seite befinden sich die katalytischen Zentren in Kpp6 und Kpp2, der gelbe Stern bezeichnet die Lage des N-Terminus in Kpp6. **D)** Sequenzvergleich der ED- und CD-Motive von Kpp6 und Kpp2. **E)** und **F)** Die Bindetasche in Kpp6 und Kpp2. Hervorgehoben sind die ED- und CD-Motive, die Bindetasche befindet sich dazwischen. Auf der linken Seite sind die grün eingezeichneten Aminosäurereste der T-Loops zu erkennen. Im Vergleich zu **B)** und **C)** sind diese Abbildungen um ungefähr 100° nach links gedreht.

Vergleicht man die Sequenzen im Bereich des T-Loops in Kpp6 und Kpp2, so findet sich in dieser Domäne ein Block von sieben bzw. acht unterschiedlichen Aminosäuren (Abbildung 34A). Dieser Unterschied zeigt sich auch deutlich in Strukturmodellen für die beiden MAP-Kinasen<sup>40</sup> (Abbildung 34B und C). Der Bereich der unterschiedlichen Aminosäuren befindet

<sup>40</sup> Da es sich bei MAP-Kinasen um stark konservierte Proteine handelt, ist eine Modellierung anhand der bekannten Strukturdaten von ERK2 aus Ratte (Zhang *et al.*, 1994), p38 aus Mensch (Wilson *et al.*, 1996) und p38 aus Maus (Wang *et al.*, 1997) mit einem relativ hohen Grad an Genauigkeit möglich.

sich an der Oberfläche des Moleküls und könnte so die Spezifität vermitteln. Betrachtet man dagegen das ED- und das CD-Motiv aus der postulierten Bindetasche, so weisen Kpp6 und Kpp2 nur minimale Unterschiede auf (Abbildung 34D). Entsprechend erscheint die Oberfläche der Moleküle in dieser Region fast identisch (Abbildung 34E und F), weshalb sie bei der Differenzierung zwischen den beiden MAP-Kinasen wahrscheinlich eine eher untergeordnete Rolle spielt. Da Kpp6 und Kpp2 zueinander insgesamt sehr ähnlich sind, könnte ein Austausch der unterschiedlichen Aminosäuren des T-Loops alleine zu einer Veränderung der Spezifität führen. Dies lässt ein entsprechendes Experiment attraktiv erscheinen.

Dieser Bereich des T-Loops ist auch bei den MAP-Kinasen Fus3p und Kss1p aus *S. cerevisiae* und bei Pmk1 aus *Magnaporthe grisea* unterschiedlich (nicht gezeigt). Trotzdem kann der Paarungsdefekt von *fus3/kss1*-Doppelmutanten in Hefe durch die heterologe Expression von Pmk1 zumindest teilweise komplementiert werden (Xu und Hamer, 1996), was für die evolutionäre Konservierung der MAP-Kinasekaskaden in Pilzen spricht.

### 3.3 Signaltransduktion während der frühen Infektionsphase

#### 3.3.1 Antagonistische Regulation durch cAMP- und Pheromon-MAP-Kinasekaskade

Die sechs Gene des *cab*-Locus und *frb124* unterliegen nicht nur einer negativen Regulation durch das bW/bE-Heterodimer, sondern weisen auch eine Induktion während des Kreuzungsprozesses auf. Bei dieser Signalübermittlung wirkt die cAMP-Kaskade positiv und die Pheromon-MAPK-Kaskade negativ auf die Expression der Gene und sie ist unabhängig von dem Transkriptionsfaktor Prf1. Diese antagonistische Regulation steht im Gegensatz zu der durch Prf1 vermittelten Regulation der Paarungstypgene, bei der sowohl die cAMP- als auch die MAP-Kinasekaskade eine induzierende Wirkung haben (Hartmann *et al.*, 1996; 1999). Ein antagonistisches Verhalten der beiden Signalkaskaden war schon früher beobachtet worden, da alle bisher bekannten Komponenten der Pheromon-MAP-Kinasekaskade auch über einen genetischen Ansatz gefunden wurden, in dem nach Suppressormutationen gesucht wurde, die das filamentöse Wachstum von *uac1*-Deletionsmutanten unterdrücken<sup>41</sup> (Mayorga und Gold, 1998; 1999; Andrews *et al.*, 2000). Die fast identischen Expressionsprofile der sechs Gene aus dem *cab*-Locus lassen auf eine gemeinsame Regulation durch die gleichen Transkriptionsfaktoren schließen, gemeinsame *cis*-regulatorische Sequenzen in den Promotorregionen der Gene konnten allerdings bislang nicht identifiziert werden. Eine das gesamte Genom von

---

<sup>41</sup> Kürzlich konnte zusätzlich mit *hgl1* ein Gen identifiziert werden, dessen Deletion zu einem Verlust des filamentösen Wachstumsphänotyps von *adr1*-Deletionsmutanten führt (J. Kronstad, pers. Mitteilung). Hgl1 weist Ähnlichkeit zu dem *S. cerevisiae*-Transkriptionsfaktor Flo8p auf, der an der Regulation der Pseudohyphenbildung beteiligt ist (Rupp *et al.*, 1999) und könnte unter positiver Kontrolle durch die Pheromon-MAP-Kinasekaskade stehen.

*S. cerevisiae* umfassende Expressionsanalyse konnte kürzlich zeigen, dass eine derartige gemeinsame Regulation benachbarter Gene häufig auftritt (Cohen *et al.*, 2000).

*U. maydis*-Stämme, in denen eine aktivierte cAMP-Kaskade vorliegt, zeichnen sich durch eine glänzende Kolonimorphologie aus (Regenfelder *et al.*, 1997; Krüger *et al.*, 2000). Elektronenmikroskopische Untersuchungen dieser Stämme zeigten, dass solche Zellen von einer fibrillären Hülle umgeben sind, deren Zusammensetzung aber nicht bekannt ist (Krüger *et al.*, 2000). Die von *frb136* und *orf3* kodierten Proteine weisen Ähnlichkeit zu Cap10p aus *Cryptococcus neoformans* auf, das vermutlich eine Rolle in der Kapselbildung besitzt (Chang und Kwon-Chung, 1999). *cap10*-Deletionsmutanten weisen einen Verlust der für die Pathogenität des Pilzes essentiellen Polysaccharid-Kapsel auf. *orf2* und *orf4* kodieren für Proteine mit Ähnlichkeit zu UDP-Galaktose-Transportern, wie z. B. Gms1 aus *S. pombe*, die für den Transfer von Nucleotid-Zuckern aus dem Zytosol in das endoplasmatische Retikulum verantwortlich sind (Tabuchi *et al.*, 1997). *gms1*-Deletionsmutanten in *S. pombe* weisen daher einen Defekt in der Synthese von Oligogalaktose-Seitenketten extrazellulärer Proteine auf (Tabuchi *et al.*, 1997). Die zu dem von *frb34* kodierten Protein ähnlichen Acyltransferasen in Bakterien sind ebenfalls an der Modifizierung von Zuckerketten beteiligt. So acetyliert z. B. OafA aus *Salmonella typhimurium* das O-Antigen, ein in der äußeren Lipopolysaccharidhülle integriertes Oligosaccharid (Slauch *et al.*, 1996). Damit scheinen alle diese Proteine an der Synthese und Modifikation von Oligosacchariden beteiligt zu sein und könnten eine Rolle bei der Bildung der fibrillären Hülle von *ubc1*-Deletionsmutanten spielen. Mutationen in Genen des *cab*-Locus könnten daher zu einem Verlust des glänzenden Koloniephänotyps von Stämmen mit aktivierter cAMP-Signalkaskade führen.

In einen genetischen Ansatz, in dem nach Suppressoren gesucht wurde, die in der Lage sind, die glänzende Kolonimorphologie von *ubc1*-Deletionsmutanten zu revertieren, konnte kürzlich mit Ssq1 ein zu Ssn6p aus *S. cerevisiae* homologes Protein identifiziert werden (Loubradou *et al.*, 2001). In Hefe kann Ssn6p mit vier Tup1p-Molekülen (Redd *et al.*, 1997) einen Komplex ausbilden, der als genereller Transkriptionsrepressor wirkt (Smith und Johnson, 2000). Es wird angenommen, dass Ssq1 in *U. maydis* die gleiche Funktion erfüllt und antagonistisch zur cAMP-Kaskade wirkt (Loubradou *et al.*, 2001). Der Repressorkomplex könnte auch die durch eine aktivierte Pheromon-MAP-Kinasekaskade vermittelte Repression der Gene aus dem *cab*-Locus vermitteln. Einen Anhaltspunkt dafür würde eine vergleichende Northern-Analyse des *ubc1*-Deletionsstamms und der Suppressormutante bieten.

In *Cryptococcus neoformans* wird die Transkription von *CAP10* vermutlich durch den Transkriptionsfaktor Ste12 $\alpha$ p, ein Homolog von Ste12p aus Hefe, positiv reguliert (Chang und Kwon-Chung, 1999). Die Regulation der Kapselbildung scheint hier ebenfalls unter der Kontrolle der cAMP-Kaskade zu stehen, da Mutanten in Gpa1p, einer  $\alpha$ -Untereinheit eines heterotrimeren G-Proteins, dazu nicht mehr in der Lage sind, dieser Effekt durch Zugabe von cAMP aber wieder aufgehoben werden kann (Alsbaugh *et al.*, 1998). Damit unterliegen die Kapselbildung in *Cryptococcus neoformans* und die Ausbildung des glänzenden Koloniephä-

notyps in *U. maydis* einer ähnlichen Regulation. Es ist bislang noch nicht untersucht worden, ob ein konstitutiv aktives Allel der in *Cryptococcus neoformans* bereits identifizierten MAPKK-Kinase Ste11p (Wang und Heitman, 1999, Clarke *et al.*, 2001) die Kapselbildung inhibieren kann.

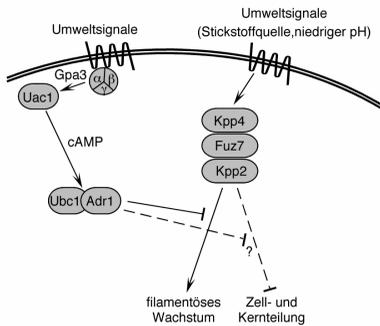
Genauso wie die Pheromon-MAP-Kinasekaskade hat auch das bW/bE-Heterodimer einen reprimierenden Einfluss auf die Expression der Gene aus dem *cab*-Locus und von *frb124*. Damit liegt hier wie im Fall von *kpp6* eine ähnliche Regulation durch diese beiden Signalkaskaden vor. Der angenommene Sql1/Tup1-Repressorkomplex ist zur DNA-Bindung selber nicht in der Lage, sondern wird durch spezifische DNA-Bindeproteine an die Zielpromotoren gebracht (Smith und Johnson, 2000). Es besteht die Möglichkeit, dass ein solches Bindeprotein unter positiver Kontrolle durch beide Signalkaskaden steht. Da in den Promotorregionen der Gene aus dem *cab*-Locus keine potentiellen b-Bindemotive gefunden wurden (nicht gezeigt), erscheint es eher unwahrscheinlich, dass im Fall der b-abhängigen Repression das bW/bE-Heterodimer selber den DNA-Bindefaktor darstellt. Eine weitere interessante Möglichkeit besteht darin, dass das bW/bE-Heterodimer seine reprimierende Funktion durch eine negative Regulation der cAMP-Kaskade ausübt. Die Gene des *cab*-Locus würden in diesem Fall keiner direkten Kontrolle durch das bW/bE-Heterodimer unterliegen, das Fehlen von Transkripten wäre vielmehr auf eine ausbleibende Aktivierung durch die cAMP-Signalkaskade zurückzuführen. Dies stände in Übereinstimmung mit der Beobachtung, dass in einem *uac1*-Deletionsstamm für die Gene des *cab*-Locus ebenfalls keine Transkripte nachgewiesen werden können. Unterstützt wird diese Annahme durch eine Northern-Analyse, die gezeigt hat, dass nach fünfständiger Expression des bW/bE-Heterodimers eine etwa vierfache Abnahme des *adr1*-Signals auftritt (nicht gezeigt). Es sind daneben noch eine Reihe weiterer Szenarien vorstellbar, wie der b-Komplex die cAMP-Kaskade negativ regulieren könnte, wie z. B. die Aktivierung einer Phosphodiesterase, die gebildetes cAMP wieder spaltet und so zu einer Erniedrigung des intrazellulären cAMP-Niveaus führt, die Aktivierung einer spezifischen Phosphatase, die durch *Adr1* phosphorylierte Proteine wieder dephosphorylieren kann, oder aber die Inaktivierung von *Uac1* oder *Gpa3*. Nachdem eine aktivierte cAMP-Kaskade wahrscheinlich einen negativen Einfluss auf die Ausbildung filamentöser Strukturen besitzt, könnte diese negative Regulation durch das bW/bE-Heterodimer für die Ausbildung des b-abhängigen Filaments notwendig sein.

### 3.3.2 Modellvorstellungen zur Regulation der frühen Infektionsphase

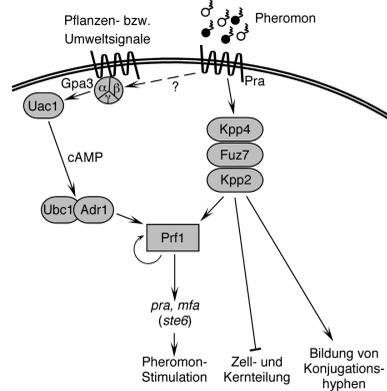
Aufgrund der in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse in Bezug auf die Regulation der frühen Infektionsphase erscheint das in Abbildung 3 dargestellte Modell stark vereinfacht, da es die zeitliche Abfolge der Prozesse außer acht lässt. In Abbildung 35 sind daher für die drei wesentlichen Stadien der frühen Infektionsphase, Pheromonstimulation und Konjugations-

hyphenbildung, Spitzenwachstum auf der Pflanze und Myzelbildung in der Pflanze, getrennte Modelle angegeben, wobei nur die jeweils wichtigsten Signalmodule und vermuteten Prozesse gezeigt sind.

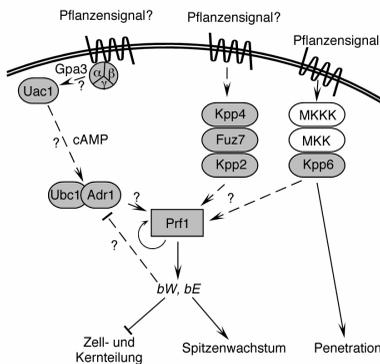
**A vegetatives Wachstum**



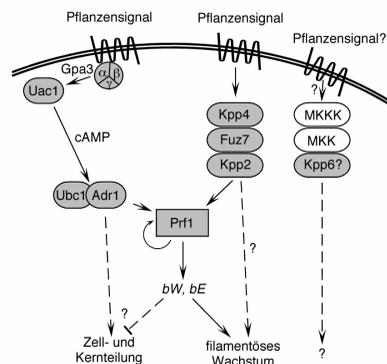
**B Pheromonstimulation und Konjugationshyphenbildung**



**C Spitzenwachstum auf der Pflanze**



**D Myzelbildung in der Pflanze**



**Abbildung 35: Modell zur Regulation der frühen Infektionsphase.** Es sind jeweils nur die wichtigsten an den jeweiligen Prozessen beteiligten Regulatoren angegeben. Angenehme Effekte, für die bislang keine experimentellen Bestätigung vorliegt, sind durch gestrichelte Pfeile mit Fragezeichen dargestellt, die noch nicht identifizierten MAPKKK und MAPKK (in der Zeichnung mit MKKK und MKK abgekürzt) durch weiße Ovale angedeutet. Nähere Einzelheiten siehe Text.

Im Vergleich dazu ist in Abbildung 35A die für die vegetative Wachstumsphase angemessene Regulation durch die cAMP- und die Pheromon-MAP-Kinasekaskade dargestellt. Dabei

scheinen beide Signalwege primär antagonistische Funktionen zu besitzen, was sich vor allem in Bezug auf das filamentöse Wachstum deutlich zeigt. Eine Aktivierung der Pheromon-MAP-Kinasekaskade führt unabhängig von Prf1 zu filamentösem Wachstum, auslösende Signale könnten Umweltsignale, wie z. B. die verfügbaren Stickstoffquellen oder der pH der Umgebung sein (Ruiz-Herrera *et al.*, 1995). Durch eine Aktivierung des cAMP-Signalwegs kann die Filamentbildung reprimiert werden. Interessant wäre in diesem Zusammenhang die Untersuchung der möglichen Beteiligung beider Signalkaskaden an der Regulation des Zellzyklus. Auch hier könnte sich eine entgegengesetzte Kontrolle durch die beiden Kaskaden zeigen.

Es ist bislang nicht bekannt, an welcher Stelle die Repression durch den cAMP-Weg ansetzt. Dafür sind mehrere Szenarien vorstellbar: Die katalytische Untereinheit kann durch direkte Interaktion mit Proteinen aus der Pheromon-MAP-Kinasekaskade die Signalübertragung modifizieren. In humanen Zellkulturen konnte z. B. gezeigt werden, dass eine zu Ste20p aus Hefe ähnliche Kinase, die an der Signalübermittlung auf ein MAP-Kinase modul beteiligt ist, durch PKA phosphoryliert und dadurch aktiviert wird (Zhou *et al.*, 2000). Denkbar wäre auch eine Interaktion mit Proteintyrosin-Phosphatasen, die MAP-Kinasen dephosphorylieren und dadurch inaktivieren. Ein entsprechendes Beispiel wurde in humanen T-Zellen gefunden (Saxena *et al.*, 1999). Neben diesen direkten Interaktionen ist auch eine Regulation gemeinsamer Zielproteine, wie im Fall des Repressors Sko1p in Hefe, vorstellbar (Proft *et al.*, 2001). Und schließlich können die von der cAMP- und der MAP-Kinasekaskade aktivierten Effektoren zusammen die Transkription gemeinsamer Zielgene kontrollieren. Dies ist z. B. bei der transkriptionellen Regulation des Hefegens *FLO11* der Fall (Rupp *et al.*, 1999; Pan und Heitman, 2000). Im Gegensatz zur Situation in *U. maydis* hat bei allen beschriebenen Beispielen die cAMP-Kaskade einen aktivierenden Einfluss auf die MAP-Kinasekaskade bzw. ist die Regulation durch die beiden Signalwege synergistisch. So besitzen z. B. bei den gut untersuchten Prozessen der Pseudohyphenbildung in *S. cerevisiae* und der Filamentbildung in *Candida albicans* beide Signalkaskaden einen aktivierenden Einfluss (Brown und Gow, 1999; Pan *et al.*, 2000). Damit unterscheidet sich die Regulation von der in *U. maydis*, bei der sich insgesamt das Bild eines balancierten Systems ergibt, durch das Wachstum, Zellteilung und Zellmorphologie den jeweiligen Umweltbedingungen entsprechend moduliert werden (Abbildung 35A).

Die Kontrolle der Paarungstypgene während der ersten Phase der Infektion, der gegenseitigen Erkennung der Kreuzungspartner, unterliegt dagegen einer positiven Regulation durch beide Signalwege, vermutlich durch Aktivierung von Prf1 (Abbildung 35B). Durch die transkriptionelle Aktivierung der Pheromon- und Pheromonrezeptorgene kommt es zu einer Verstärkung der Pheromonstimulation. Während über die Pheromon-MAP-Kinasekaskade das Pheromon signal vermittelt wird, ist bislang nicht bekannt, durch welches Signal die cAMP-Kaskade aktiviert wird. Es ist nicht ausgeschlossen, dass es sich dabei ebenfalls um das Pheromon signal handelt. In diesem Stadium könnte durch die sehr starke Aktivierung der Phe-

romon-MAP-Kinasekaskade die negative Kontrolle durch den cAMP-Weg überspielt werden, so dass es zur Ausbildung von Konjugationshyphen und zu einer Arretierung des Zellzyklus kommt. In dieser Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass Prf1 neben der Kontrolle der Paarungstypgene noch eine weitere essentielle Funktion erfüllt. Wahrscheinlich liegt diese in der transkriptionellen Kontrolle von Genen, deren Produkte für die Reifung oder den Transport der Pheromone benötigt werden. Ein potentielles Zielgen könnte ein zu *STE6* aus *S. cerevisiae* homologes Gen sein. Ste6p ist der spezifische Transporter für das a-Pheromon (Kuchler *et al.*, 1989) und ist während des Kreuzungsvorgangs transkriptionell aktiviert (Erdman *et al.*, 1998). Es ist anzunehmen, dass sich im Genom von *U. maydis* ein entsprechendes Gen findet, das über Bindung von Prf1 an PRE-Boxen in der Promotorregion reguliert wird. Die Bildung der Konjugationshyphen und die Arretierung des Zellzyklus (P. Müller, pers. Mitteilung) erfolgt dagegen unabhängig von Prf1.

Nach Zellfusion und Ausbildung des Dikaryons beschränkt sich die essentielle Funktion von Prf1 wahrscheinlich auf die transkriptionelle Regulation der Gene des *b*-Locus (Abbildung 35C). Es ist nicht bekannt, über welchen der möglichen Signalwege Prf1 in diesem Stadium aktiviert wird. Eine interessante Möglichkeit besteht in der Aktivierung durch Kpp6. Das bW/bE-Heterodimer ist in diesem Stadium der zentrale Regulator, der das Spitzenwachstum kontrolliert und die Arretierung des Zellzyklus aufrecht erhält, wobei eine wichtige Funktion in der Repression der cAMP-Kaskade liegen könnte. Das MAPK-Modul, in dem sich Kpp6 befindet, scheint eine zentrale Rolle bei der Kontrolle der Penetration der Pflanzenoberfläche zu spielen.

Es ist nicht klar, ob Kpp6 nach dem Eindringen in die Pflanze weitere Funktionen erfüllt (Abbildung 35D). Für die Pheromon-MAPK- und die cAMP-Signalkaskade sind die Rollen während der Myzelbildung ebenfalls nicht bekannt. Da Mutanten in Komponenten dieser Kaskaden jedoch Pathogenitätsdefekte aufweisen, scheinen sie für eine erfolgreiche Infektion benötigt zu werden. Eine zentrale Rolle könnte wiederum in der Aktivierung von Prf1 und damit der Regulation der Expression des bW/bE-Heterodimers liegen, falls dieses für die Myzelbildung in der Pflanze notwendig ist. Eine erneute Aktivierung der cAMP-Kaskade durch Pflanzensignale könnte zur Überwindung der durch *b* induzierten Arretierung des Zellzyklus führen, die Pheromon-MAP-Kinasekaskade könnte in Verbindung mit dem bW/bE-Heterodimer eine Funktion in der Regulation des filamentösen Wachstums einnehmen.

Aus diesen Modellvorstellungen ergeben sich weitere Schlussfolgerungen bezüglich der Interaktion der einzelnen Komponenten der Signalwege. Wenn die Pheromon-MAP-Kinasekaskade während der vegetativen Wachstumsphase für das filamentöse Wachstum benötigt wird, so sollten auch Doppelmutanten in *Adr1* und Komponenten der MAPK-Moduls hefeartig wachsen. Eine Deletion von *uac1* oder *adr1* in Stämmen, die die konstitutiv aktiven Varianten Kpp4-2 oder Fuz7DD exprimieren, sollte zu einer Arretierung des Zellzyklus führen, wenn dieser antagonistisch durch die beiden Signalwege reguliert ist. Umgekehrt könnte durch eine

Epsitasisanalyse von *ubc1* mit *kpp4-2* bzw. *fuz7DD* bestimmt werden, ob die negative Regulation durch den cAMP-Signalweg ober- oder unterhalb der Pheromon-MAP-Kinasekaskade ansetzt. Falls der b-Komplex die cAMP-Kaskade negativ reguliert, müsste die Expression des bW/bE-Heterodimers in einem *ubc1*-Deletionsstamm zu filamentösem Wachstum führen. Mit diesen Experimenten könnten wichtige Einblicke in das Zusammenspiel der Signalkaskaden gewonnen werden.

Die in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse zeigen, dass für den erfolgreichen Ablauf der pathogenen Entwicklung in *U. maydis* ein Zusammenspiel der cAMP- und MAP-Kinasekaskaden und des bW/bE-Heterodimers bei der Kontrolle der Pathogenitätsprozesse notwendig ist. Mit *kpp6*, *frb124* und den Genen aus dem *cab*-Locus stehen jetzt Zielgene zur Verfügung, die durch diese Signalwege differentiell reguliert werden und damit gute Ansatzpunkte für die weitere Analyse bieten. Das interessanteste Thema ist hierbei sicher die Regulation der Zellmorphologie, da die Möglichkeit zu einer Änderung der Wuchsform einen entscheidenden Pathogenitätsfaktor bei Pilzen darstellt und in den verschiedenen Pathogenen an der Kontrolle des Dimorphismus die gleichen Signalmodule beteiligt zu sein scheinen. Die Ergebnisse aus *U. maydis* könnten hier hilfreich bei der Suche nach neuen Angriffsstellen zur Bekämpfung pilzlicher Infektionen sein. In diesem Zusammenhang ist auch die weitere Analyse der MAP-Kinase Kpp6 von Bedeutung. Die Identifizierung der übermittelten Signale und der durch Kpp6 regulierten Gene ist ein wichtiger Schritt hin zu einem Verständnis der Kommunikation zwischen Pilz und Pflanze.

# 4. Material und Methoden

## 4.1 Material und Bezugsquellen

### 4.1.1 Medien, Lösungen, Enzyme und Kits

#### Chemikalien

Alle in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien waren p. a. Qualität und wurden von den Firmen Sigma, Merck, Fluka, Riedel-de-Haën und Roth bezogen; Einzelheiten siehe Brachmann (1995).

#### Puffer und Lösungen

Standard-Puffer und Lösungen wurden nach Ausubel *et al.* (1987) und Sambrook *et al.* (1989) hergestellt, Einzelheiten dazu siehe Brachmann (1995). Spezielle Puffer und Lösungen sind unter den jeweiligen Methoden aufgeführt.

#### Medien

Für die Kultivierung von *E. coli* wurden dYT- und LB-Flüssigmedien und YT-Festmedium verwendet (Ausubel *et al.*, 1987; Sambrook *et al.*, 1989; Brachmann, 1995). Medienzusätze wurden, soweit nicht anders vermerkt, in folgenden Konzentrationen eingesetzt: Ampicillin (100 µg/ml), Chloramphenicol (25 µg/ml), Kanamycin (40 µg/ml), Tetracyclin (25 µg/ml) und X-Gal (40 µg/ml).

Für die Kultivierung von *U. maydis* wurden folgende Medien verwendet:

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

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

PD-Medium:

- 24 g Potato Dextrose Broth
- mit H<sub>2</sub>O auf 1 l aufgefüllt und autoklaviert

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

- 1,5 g NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>
- 2,5 g Casamino Acids
- 0,5 g DNA
- 1 g Yeast Extract
- 10 ml Vitamin-Lösung (siehe unten)
- 62,5 ml Salz-Lösung (siehe unten)
- mit H<sub>2</sub>O auf 980 ml aufgefüllt
- mit NaOH auf pH 7,0 eingestellt und autoklaviert
- nach dem Autoklavieren:
- 20 ml 50% (w/v) Glucose-Lösung zugesetzt (f. c. 1%)

NM Nitrat-Minimalmedium (Holliday, 1974):

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

AM Ammonium-Minimalmedium (Holliday, 1974):

- 3 g (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>
- 62,5 ml Salz-Lösung (siehe unten)
- mit H<sub>2</sub>O auf 980 ml aufgefüllt
- mit NaOH auf pH 7,0 eingestellt und autoklaviert
- nach dem Autoklavieren:
- 20 ml 50% (w/v) Glucose-Lösung zugesetzt (f. c. 1%)

Salz-Lösung (Holliday, 1974):

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

Spurenelement-Lösung (Holliday, 1974):

60 mg  $H_3BO_3$   
140 mg  $MnCl_2 \times 4 H_2O$   
400 mg  $ZnCl_2$   
40 mg  $NaMoO_4 \times 2 H_2O$   
100 mg  $FeCl_3 \times 6 H_2O$   
40 mg  $CuSO_4 \times 5 H_2O$   
Mit  $H_2O$  auf 1 l aufgefüllt und sterilfiltriert

Vitamin-Lösung (Holliday, 1974):

100 mg Thiamin  
50 mg Riboflavin  
50 mg Pyridoxin  
200 mg Kalziumpantothenat  
500 mg p-Aminobenzoensäure  
200 mg Nikotinsäure  
200 mg Cholinchlorid  
1000 mg myo-Inositol  
Mit  $H_2O$  auf 1 l aufgefüllt und sterilfiltriert

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

- a) Top-Agar:  
1,5% (w/v) Bacto-Agar  
1 M Sorbitol  
in YEPS-Medium (Tsukuda *et al.*, 1988)
- b) Bottom-Agar:  
wie a), zusätzlich doppelt konzentriertes Antibiotikum

CM-CC aktivkohlehaltiges Vollmedium

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

6 g  $NH_4NO_3$   
10 g Casamino Acids  
1 g DNA  
2 g Yeast Extract  
20 ml Vitamin-Lösung  
250 ml Salz-Lösung  
10 g Aktivkohle  
20 g Bacto-Agar  
mit  $H_2O$  auf 960 ml aufgefüllt  
mit NaOH auf pH 7,0 eingestellt und autoklaviert  
nach dem Autoklavieren:  
40 ml 50% (w/v) Glucose-Lösung zugesetzt (f. c. 2%)

PD-CC aktivkohlehaltiges PD-Medium:

24 g Potato Dextrose Broth  
10 g Aktivkohle  
20 g Bacto-Agar  
mit  $H_2O$  auf 1 l aufgefüllt und autoklaviert

Für Medien mit Arabinose als einziger Kohlenstoffquelle (CM-Ara, NM-Ara und NM-Ara) wurde nach dem Autoklavieren Arabinose statt Glucose in einer Endkonzentration von 1% zugegeben. Für Festmedien wurde Bacto-Agar in einer Endkonzentration von 2% zugegeben. Medienzusätze wurden, soweit nicht anders vermerkt, in folgenden Konzentrationen eingesetzt: Carboxin (2 µg/ml), Hygromycin (200 µg/ml), ClonNAT (150 µg/ml) und Phleomycin (40 µg/ml). Im Fall der Selektion mit Phleomycin auf Festmedien muss zusätzlich Tris-Cl pH 8,0 in einer Endkonzentration von 100 mM zugesetzt werden, da ansonsten das Antibiotikum wegen der Ansäuerung des Mediums durch *U. maydis* inaktiviert wird.

## Enzyme

Restriktionsenzyme wurden von NEB Biolabs bezogen, alle übrigen Enzyme von Roche mit den Ausnahmen Superscript Reverse Transkriptase (Gibco) und *Taq* DNA-Polymerase (Laborpräparation).

## Verwendete Kits und sonstiges Material

RNeasy Kit (Qiagen) zur Präparation hochreiner Gesamt-RNA, QiaQuick PCR Purification Kit (Qiagen) zur Aufreinigung von PCR-Produkten, JETquick Plasmid Miniprep Kit (Genomed) zur Präparation hochreiner Plasmid-DNA, JETquick General DNA Clean-Up Kit (Genomed) zur Aufreinigung von Plasmiden vor der Sequenzierung, First-Choice RLM-RACE Kit (Ambion) zur 5'-RACE, TOPO TA Cloning Kit (Invitrogen) zur Klonierung von PCR-Produkten, NEBlot Kit (NEB Biolabs) zur radioaktiven Markierung von DNA-Fragmenten, BigDye Kit (ABI) zur fluoreszenzmarkierten Sequenzierung, Microspirin S-200 und S-300 Säulen (Amersham Pharmacia Biotech) zur Aufreinigung von radioaktiv markierten DNA-Sonden und Microspirin G-25 Säulen (Amersham Pharmacia Biotech) zur Aufreinigung von radioaktiv markierten Oligonukleotiden. Weiteres verwendetes Material ist unter den jeweiligen Methoden beschrieben.

## 4.1.2 Oligonukleotide

Die Oligonukleotide wurden von den Firmen ARK Scientific, Metabion und MWG synthetisiert, die Nukleotidsequenz ist jeweils vom 5'- in Richtung 3'-Ende angegeben.

### REV24

TTC ACA CAG GAA ACA GCT ATG ACC

Hauptsächlich zur Sequenzierung verwendetes Oligonukleotid; liegt neben dem Polylinker von pBS(+)<sub>SK</sub>, pUC19, pSL1180, pNEB193 und pCR-Topo.

### UNI24

ACG ACG TTG TAA AAC GAC GGC CAG

Hauptsächlich zur Sequenzierung verwendetes Oligonukleotid; liegt neben dem Polylinker von pBS(+)<sub>SK</sub>, pUC19, pSL1180, pNEB193 und pCR-Topo.

### T7-24

GAA TTG TAA TAC GAC TCA CTA TAG

Hauptsächlich zur Sequenzierung verwendetes Oligonukleotid; liegt neben dem Polylinker von pSP72.

### SP6-24

CAT ACG ATT TAG GTG ACA CTA TAG

Hauptsächlich zur Sequenzierung verwendetes Oligonukleotid; liegt neben dem Polylinker von pSP72.

### pyr6-NotI-5'

CAG GCG GCC GCG GTC TGA AAC AAA ATA TGT TGA GG

Erzeugt eine *NotI*-Schnittstelle am 3'-Ende des *pyr6*-Promotors, verwendet zur Herstellung von  $\Delta$ pyr6.

### pyr6-NotI-3'

CAG GCG GCC GCT CGA TCG TGA TCG TGT TGA ATT G

Erzeugt eine *NotI*-Schnittstelle am 5'-Ende des *pyr6*-Terminators, verwendet zur Herstellung von  $\Delta$ pyr6.

### OAN1

CTC GAG GGC CCG CGC GCT CTT GAG CGT G

Liegt im *argI*-Promotor, unter anderem verwendet zur Erzeugung einer *NdeI*-Schnittstelle am 3'-Ende des *argI*-Promotors.

### OAN2

ACC CCC GGG CAT ATG GTA TCT TTT TTG GCC TC

Verwendet zur Erzeugung einer *NdeI*-Schnittstelle am 3'-Ende des *argI*-Promotors.

### OAN3

CTC TCG CTA TCC TCA GCC

Liegt im *dik6*-Gen.

### OAN4

TGT TGG ACG GCA TGG TGG

Liegt im *dik6*-Gen.

### OAN5

CCG ATA TCC ATA TGT TAA CGT TTA AAC TCC TTG CGA GGC

Verwendet zur Erzeugung einer *NdeI*-, einer *HpaI*- und einer *PmeI*-Schnittstelle am von Banks *et al.* (1993) angenommenen, falschen 3'-Ende des *narI*-Promotors.

### OAN6

CCG ATA TCC ATG GTT AAC GTT TAA ACT CCT TGC GAG GC

Verwendet zur Erzeugung einer *NcoI*-, einer *HpaI*- und einer *PmeI*-Schnittstelle am von Banks *et al.* (1993) angenommenen, falschen 3'-Ende des *narI*-Promotors.

### OAN7

CCG ATA TCA TAT GGT GAG CAA GGG CGA GG

Verwendet zur Erzeugung einer *NdeI*-Schnittstelle am Translations-Startpunkt von *sgfp*.

### OAN8

GGG CCC

*SmaI*-Linker.

### OAN9

TTA ATG TCA TGA TAA TAA TGG

Verwendet zur gerichteten PCR-Mutagenese der *SspI*-Schnittstelle in pSP72 und pUC19 (zusammen mit OAN10 und OAN11).

### OAN10

CAA TAT AAT TGA AGC ATT TAT C

Verwendet zur gerichteten PCR-Mutagenese der *SspI*-Schnittstelle in pSP72 und pUC19 (zusammen mit OAN9 und OAN11).

### OAN11

TAC CGC GCC ACA TAG CAG

Verwendet zur gerichteten PCR-Mutagenese der *SspI*-Schnittstelle in pSP72 und pUC19 (zusammen mit OAN9 und OAN10).

### OAN12

GGA ATT CAT ATG TCG AGC ATC ACA CTT C

Verwendet zur Erzeugung einer *NdeI*-Schnittstelle am Translations-Startpunkt von *pyr6*.

### OAN13

GGA ATT CCA TGG CGA TCA CAC TTC

Verwendet zur Erzeugung einer *NcoI*-Schnittstelle am Translations-Startpunkt von *pyr6*.

### OAN14

GGC GCG CCT ACT TCT GAC CAA TAC GTT TC

Verwendet zur Erzeugung einer *AseI*-Schnittstelle hinter dem Stoppkodon von *pyr6*.

**OAN15**

GGA ATT CAT ATG TCC TAC CCG CCA TCC

Verwendet zur Erzeugung einer *NdeI*-Schnittstelle am von Banks *et al.* (1993) angenommenen, falschen Translations-Startpunkt von *nar1*.

**OAN16**

GGC GCG CCT AGA AAA ACA CGA CGC AAC G

Verwendet zur Erzeugung einer *AscI*-Schnittstelle hinter dem Stoppkodon von *nar1*.

**OAN17**

CAG GCG GCC GCT CGT TGT AGT CCT TGC G

Verwendet zur Erzeugung einer *NotI*-Schnittstelle am von Banks *et al.* (1993) angenommenen, falschen 3'-Ende des *nar1*-Promotors.

**OAN18**

CAG GCG GCC GCA TAC GTT TGT TCT CGT C

Verwendet zur Erzeugung einer *NotI*-Schnittstelle am 5'-Ende des *nar1*-Terminators. Benutzt zur Herstellung von pΔ*nar1*.

**OAN19**

GGA ATT CAT ATG TGA AAT GTT GGC AAA GG

Verwendet zur Erzeugung einer *NdeI*-Schnittstelle am von Bohlmann (1996) angenommenen, falschen Ende des *dik6*-Promotors.

**OAN20**

GGC GCG CCT TGC ACC AAG GCC TTG AAG C

Verwendet zur Erzeugung einer *AscI*-Schnittstelle hinter dem Stoppkodon von *dik6*.

**OAN21**

GGC GCG CCA TAC GTT TGT TCT CGT C

Verwendet zur Erzeugung einer *AscI*-Schnittstelle hinter dem Stoppkodon von *nar1*.

**OAN22**

CGC GCC GCG GCC GCG G

*NotI*-Linker, wurde in die *AscI*-Schnittstelle von pNEB193 eingesetzt, ergab pNEB193-NotI.

**OAN23**

AAG TCG GTC TTG GTG CCG

Liegt im *bW*-Gen.

**OAN24**

GCT CGA TCT CGT TGA GGC

Liegt im *bE*-Gen.

**OAN25**

CCG GAT CCA TGG TCG TTG TAG TCC TTG CG

Verwendet zur Erzeugung einer *NcoI*-Schnittstelle am von Banks *et al.* (1993) angenommenen, falschen Translations-Startpunkt von *nar1*.

**OAN26**

ATG TCC TAC CCG CCA TCC

Liegt im *nar1*-Locus.

**OAN27**

CTC TGG TGG ATA CAC GGC

Liegt im *nar1*-Locus (enthält Sequenzfehler).

**OAN28**

CAG GTC GTC ATG TTG CCG

Liegt im *nar1*-Locus.

**OAN29**

CTC ACC GAG TCG TGT AGC

Liegt im *nar1*-Locus.

**OAN30**

TCC ACC TCG GTA GAC TCG

Liegt im *nar1*-Locus.

**OAN31**

AAC GTT GCA GGT CCC AGC

Liegt im *nar1*-Locus.

**OAN32**

GGG ATC CAT ATG TCC TAA CTG CTC GTG TGG

Verwendet zur Erzeugung einer *NdeI*-Schnittstelle am richtigen 3'-Ende des *nar1*-Promotors.

**OAN33**

GGA ATT CAT ATG ACG ATC TCC TCA ACC

Verwendet zur Erzeugung einer *NdeI*-Schnittstelle am richtigen Translations-Startpunkt von *nar1*.

**OAN34**

AGA GGG ATG ACG CAC CAC

Liegt im *dik6*-Gen.

**OAN35**

GTG TAT GCA CCC CTT CCG

Liegt im *dik6*-Gen.

**OAN36**

CCA TCG CTG CTG CAT TCC

Liegt im *dik6*-Gen.

**OAN37**

CAG CCA TTC GAT CCC AGC

Liegt im *dik6*-Promotor.

**OAN38**

CCT GGA CTG CCA ATC ACG

Liegt im *dik6*-Promotor.

**OAN39**

GGA ATT CAT ATG GCT GGG ATC GAA TGG C

Verwendet zur Erzeugung einer *NdeI*-Schnittstelle am richtigen Ende des *dik6*-Promotors.

**OAN40**

ACT CGG TGG ATA CGA CGG

Liegt im *nar1*-Locus.

**OAN41**

CTT GAG CGT CAG CGT ACG

Liegt im *nar1*-Locus.

**OAN42**

TCT TTG ACC TCC GGG TCG

Liegt im *nar1*-Locus.

**OAN43**

TAA GAA CAG GCG GGC AGC

Verwendet für RNA-Fingerprint.

**OAN44**

CGA AAT AGC TCG CTG CCG  
Liegt im *big5*-Locus.

**OAN45**

AAC CGA CTC ATG CCC GAC  
Liegt im *big5*-Locus.

**OAN46**

TTC CGG TGC TCT TCT CCG  
Liegt im *big1*-Locus.

**OAN47**

ATT GGC CAA CGG CAG GTC  
Liegt im *big1*-Locus.

**OAN48**

TGG GAG CAA AGT GGG GAC  
Liegt im *brg1*-Locus.

**OAN49**

CGC AGT TGC TGT CGA TCT  
Liegt im *brg1*-Locus.

**OAN50**

CCT CTC GTT CCG CTT TGC  
Liegt im *big4*-Locus.

**OAN51**

TGT CGG GCT CGT TGA AGC  
Liegt im *big2*-Locus.

**OAN52**

TGA CAA GGC CAT GTC CGC  
Liegt im *brg2*-Locus.

**OAN53**

TGG GTA GGT TTC CGG TGG  
Verwendet für RNA-Fingerprint.

**OAN54**

AGG CCC AGG AGA TCA ACC  
Verwendet für RNA-Fingerprint.

**OAN55**

ACC TTC CCG ACA TGC CTG  
Verwendet für RNA-Fingerprint.

**OAN56**

GAC CAT GGT ACC GTC AGG  
Verwendet für RNA-Fingerprint.

**OAN57**

ATG TCT TTG ATG ATG  
Liegt im *nar1*-Promotor.

**OAN58**

TTT GAT GAT GTA GAG  
Liegt im *nar1*-Promotor.

**OAN59**

CAT GCT ATT TGG ATC  
Liegt im *dik6*-Promotor.

**OAN60**

CTA TTT GGA TCG ATG  
Liegt im *dik6*-Promotor.

**OAN61**

TTG GTC AAG CGT TCG GCG  
Liegt im *nar1*-Promotor.

**OAN63**

GCC CTT GCT CAC CAT GGT TCC TAA CTG  
Verwendet zur Erzeugung einer *NcoI*-Schnittstelle am Übergang zwischen *nar1*-Promotor und *sgfp* (zusammen mit OAN61 und OAN81, ergab pRU4Nco).

**OAN64**

GCC CTT GCT CAG CAT GCT TCC TAA CTG  
Verwendet zur Erzeugung einer *SphI*-Schnittstelle am Übergang zwischen *nar1*-Promotor und *sgfp* (zusammen mit OAN61 und OAN81, ergab pRU4Sph).

**OAN65**

GTT TGA ACG ATG GCC GGG  
Liegt im *nos*-Terminator (enthält Sequenzfehler).

**OAN66**

GCC CTT GCT CAC CAT CTT TCC TAA CTG  
Verwendet zur Erzeugung der Wildtyp-Sequenz des *nar1*-Promotors am Übergang zwischen *nar1*-Promotor und *sgfp* (zusammen mit OAN61 und OAN81, ergab pRU4wt).

**OAN67**

TGA GGT CCT TGG ACT GCG  
Liegt im *pdil*-Locus.

**OAN68**

AGT TCC CCC TTG AGG ACC  
Liegt im *pdil*-Locus.

**OAN69**

GGA GAT GTT TCG TGC CGC  
Liegt im *pkc1*-Locus.

**OAN70**

ACG AGC GCT GGC AAG AAG  
Liegt im *pkc1*-Locus.

**OAN71**

AAG GAG ACT CAG CCG CAC  
Liegt im *pkc1*-Locus.

**OAN72**

GAC GAA GTC GAG ACG ACC  
Liegt im *pkc1*-Locus.

**OAN73**

GGA ACG ATT CGC ACG ACC  
Liegt im *pkc1*-Locus.

**OAN74**

GAG CAG TTC ATG ATG GTA AG  
Verwendet zur PCR-Analyse von Integrationsereignissen im *ip*-Locus.

**OAN75**

TTC GAG CTG GTT GCC TGC  
Verwendet zur PCR-Analyse von Integrationsereignissen im *ip*-Locus.

**OAN76**

CTA TGC GGC ATC AGA GCA G

Verwendet zur PCR-Analyse von Integrationsereignissen im *ip*-Locus.

**OAN77**

TTC GCT CTA CCG ATG CCT T

Verwendet zur PCR-Analyse von Integrationsereignissen im *ip*-Locus.

**OAN78**

TCT CCA AGC CAC GGT TCC

Verwendet zur PCR-Analyse von Integrationsereignissen im *ip*-Locus.

**OAN79**

GAT GAG CAA GGC GAG ACC

Liegt im *big6*-Gen.

**OAN80**

CAG TCG CGT GAA GAA GGC

Liegt im *big6*-Gen.

**OAN81**

TCG CAA GAC CGG CAA CAG

Liegt im *nos*-Terminator.

**OAN82**

AGC GCA ATT TAT TGC ATG CC

Liegt im *pkc1*-Promotor.

**OAN83**

CCT TCC ATG ATG CGA CGC

Liegt im *pkc1*-Gen.

**OAN84**

AAG TGC TAG CGG TCA CCG

Verwendet für RNA-Fingerprint.

**OAN85**

TAT TGC ATG CCC ATA TGG CGG TAA GTT TCC

Erzeugt eine *NdeI*-Schnittstelle am Translations-Startpunkt von *pkc1*. Verwendet zur Herstellung von pPnar:pkc1 Ble (zusammen mit OAN86).

**OAN86**

TCC ATG ATG CGA CGC TGG

Liegt im *pkc1*-Gen. Verwendet zur Herstellung von pPnar:pkc1 Ble (zusammen mit OAN85).

**OAN87**

CGT CTC GAT CGA CGT CAC

Liegt im *pyr6*-Locus.

**OAN88**

ATG CGT GTT GGC ACG CTC

Liegt im *pyr6*-Locus.

**OAN89**

TTC AGG GTC AGC TTG CCG

Verwendet für RNA-Fingerprint.

**OAN90**

ACG CTG AAC TTG TGG CCG

Verwendet für RNA-Fingerprint.

**OAN91**

TTG GAC GAA GAC ACG CGC

Verwendet für RNA-Fingerprint.

**OAN92**

TCG GCC TTG AAC GAC TCG

Verwendet für RNA-Fingerprint.

**OAN93**

TCT CGG TGA CCA CCA ACC

Verwendet für RNA-Fingerprint.

**OAN94**

ATC TCG GTC GGT GTG GTC

Verwendet für RNA-Fingerprint.

**OAN95**

AAT TCC CGG G

*SmaI*-Linker zum Einsetzen in eine *EcoRI*-Schnittstelle.

**OAN96**

AAT TCC CCG GGG

*SmaI*-Linker zum Einsetzen in eine *EcoRI*-Schnittstelle, wobei im Polylinker von pCR-TOPO der Leserahmen von *lacZ* erhalten bleibt. Wurde für die Konstruktion von pCR-Sma verwendet.

**OAN97**

TTC TGG TGG GAC CCA GAC

Verwendet für RNA-Fingerprint.

**OAN98**

ACC TCG TCC TCC TAA CGC

Verwendet für RNA-Fingerprint, weist Ähnlichkeit zu Sequenzen aus der HMG-Domäne von *pcc1* aus *Coprinus cinereus* auf.

**OAN99**

ACC TCG CCC TCC TAA TGC

Verwendet für RNA-Fingerprint, weist Ähnlichkeit zu Sequenzen aus der HMG-Domäne von *pcc1* aus *Coprinus cinereus* auf.

**OAN100**

ATC GTC GGC CAG ATG TGG

Verwendet für RNA-Fingerprint, weist Ähnlichkeit zu Sequenzen aus der HMG-Domäne von *pcc1* aus *Coprinus cinereus* auf.

**OAN101**

GGC GCT CGT ACT TCA TGC

Verwendet für RNA-Fingerprint, weist Ähnlichkeit zu Sequenzen aus der HMG-Domäne von *pcc1* aus *Coprinus cinereus* auf.

**OAN102**

GGC GCT CGT ACT TCA TCC

Verwendet für RNA-Fingerprint, weist Ähnlichkeit zu Sequenzen aus der HMG-Domäne von *pcc1* aus *Coprinus cinereus* auf.

**OAN103**

GTT GTA GCG GTA GTC GGG

Verwendet für RNA-Fingerprint, weist Ähnlichkeit zu Sequenzen aus der HMG-Domäne von *pcc1* aus *Coprinus cinereus* auf.

**OAN104**

ACT AGT AAC GGC CGC CAG

Liegt im Polylinker von pCR-Topo, kann zusammen mit OAN105 zur Amplifikation von inserierten DNA-Fragmenten verwendet werden.

**OAN105**

CCA GTG TGA TGG ATA TCT GC

Liegt im Polylinker von pCR-Topo, kann zusammen mit OAN104 zur Amplifikation von inserierten DNA-Fragmenten verwendet werden.

**OAN108**

GAG TAG TCG AAG TGG GCG

Verwendet für RNA-Fingerprint.

**OAN109**

TCT GGA CCG ATG GCT GTG

Verwendet für RNA-Fingerprint.

**OAN110**

GAA GAG CGC CCA ATA CGC

Verwendet für RNA-Fingerprint.

**OAN117**

CCG ATC TTG CCT AGC AGC

Liegt im *frb136/frb34*-Locus.

**OAN118**

GGC AGT TCC CTC TTC AGG

Liegt im *frb136/frb34*-Locus.

**OAN119**

CGA GTC TCG AGC TCA TCC

Liegt im *frb52*-Locus.

**OAN120**

TTG CAA GCC ACC GAT CGC

Liegt im *frb52*-Locus.

**OAN121**

GTA CTT GCT ACC CAC GCG

Liegt im *kpp6*-Locus.

**OAN122**

TCG GAT GCA TCC TCG CTG

Liegt im *kpp6*-Locus.

**OAN123**

AAC GTA TCC GCC TCC ACC

Liegt im *frb110*-Locus.

**OAN124**

TGA ACG ACG CAT CGA GGC

Liegt im *frb110*-Locus.

**OAN125**

CAG TGT GCA CGA GAA CGC

Verwendet für RNA-Fingerprint.

**OAN126**

ATG AAG ACC AAG GCG GCC

Liegt im *frb136/frb34*-Locus.

**OAN127**

CCT CGA CGA GAA CCT TGG

Liegt im *frb323*-Locus.

**OAN128**

TCG CCA AGT TCC TGC TCC

Liegt im *frb323*-Locus.

**OAN129**

TTT ACG TCG CCG TCC AGC

Liegt im *crgl*-Promotor.

**OAN130**

AGA TCA CGA CAC CGC GAG

Liegt im *crgl*-Promotor.

**OAN131**

GCG GCT GTA GAC TGT TCC

Liegt im *frb136/frb34*-Locus.

**OAN132**

GTG AGT GAG TGA GCG AGG

Liegt im *frb52*-Locus.

**OAN133**

TTG CTC GAC GTG GTT CGG

Liegt im *frb52*-Locus.

**OAN134**

TCA GAT GAC CGG AGT ATC G

Liegt im *frb136/frb34*-Locus.

**OAN135**

GAG GGT AGC TCG ATG TCG

Liegt im *frb136/frb34*-Locus.

**OAN136**

TAC TGG GTC CTG GAC AGG

Liegt im *frb323*-Locus.

**OAN137**

GAA GAC TGG TTC CAG CGG

Liegt im *frb323*-Locus.

**OAN141**

ACG GCA TGG TCC ATC AGC

Liegt im *frb52*-Locus.

**OAN142**

AGC GTC CTC TGC TTC TCG

Liegt im *frb52*-Locus.

**OAN143**

TTT CGT ACC GCG TGC GAG

Liegt im *frb52*-Locus.

**OAN144**

GAA AGT CGG TGA ACG CGG

Liegt im *kpp6*-Locus.

**OAN145**

TCG AGC TCC TCT GTG GTC

Liegt im *kpp6*-Locus.

**OAN146**

GCA GTG CTT GGT GGA ACG  
Liegt im *kpp6*-Locus.

**OAN147**

TGC GCT CTG CAC CTC TTG  
Verwendet für RNA-Fingerprint.

**OAN148**

GAG CCA TGT CTT GTG GCC  
Verwendet für RNA-Fingerprint.

**OAN149**

TCT GGA AGT GGG TGG GTG  
Liegt im *frb110*-Locus.

**OAN150**

TTG AGG AGC ACG GAT CCG  
Liegt im *frb110*-Locus.

**OAN151**

TGA GAA CTG CCT CGG TCG  
Liegt im *frb110*-Locus.

**OAN152**

TTG TGC AGC AGC GTG CAG  
Liegt im *frb136/frb34*-Locus.

**OAN153**

CAG CGC CAG CAT CAC ATC  
Liegt im *frb136/frb34*-Locus.

**OAN154**

GAG AAA GGT AGC TCG AGC G  
Liegt im *frb136/frb34*-Locus.

**OAN155**

CGG CGC GCC GGA ATG GCT TGG TGT CAA TAC  
Erzeugt eine *AscI*-Schnittstelle vor dem *frb52*-Gen,  
verwendet zur Herstellung einer 5'-Flanke von *frb52*  
für die Konstruktion von pΔ*frb52* Hyg(-).

**OAN156**

CGG CGC GCC GCG ATG TGC GCA ATT GCT G  
Erzeugt eine *AscI*-Schnittstelle hinter dem *frb52*-Gen,  
verwendet zur Herstellung einer 3'-Flanke von *frb52*  
für die Konstruktion von pΔ*frb52* Hyg(-).

**OAN157**

CGG CGC GCC GAT GAC AGT TAA TGG TAG TGG  
Erzeugt eine *AscI*-Schnittstelle vor dem *kpp6*-Gen,  
verwendet zur Herstellung einer 5'-Flanke von *kpp6*  
für die Konstruktion von pΔ*kpp6* Hyg(-).

**OAN158**

CGG CGC GCC TGC TTC GTC AGC GTC AGT C  
Erzeugt eine *AscI*-Schnittstelle hinter dem *kpp6*-Gen,  
verwendet zur Herstellung einer 3'-Flanke von *kpp6*  
für die Konstruktion von pΔ*kpp6* Hyg(-) (zusammen  
mit OAN146).

**OAN159**

CCG CGG CCG CTT TCG TTT TGG GTG CGC TGG  
Erzeugt eine *NotI*-Schnittstelle vor dem *frb110*-Gen,  
verwendet zur Herstellung einer 5'-Flanke von *frb110*  
für die Konstruktion von pΔ*frb110* Hyg(+).

**OAN160**

CCG CGG CCG CTC GCA AGC AAG AGC AAG AG  
Erzeugt eine *NotI*-Schnittstelle hinter dem *frb110*-  
Gen, verwendet zur Herstellung einer 3'-Flanke von  
*frb110* für die Konstruktion von pΔ*frb110* Hyg(+)  
(zusammen mit OAN151).

**OAN161**

ATG CAG CAT CCA GCT CCG  
Liegt im *frb52*-Locus.

**OAN162**

CGG ATG CCG CTG ATC ATC  
Liegt im *kpp6*-Locus.

**OAN163**

ACA ACT CGA TCG TCC GCC  
Liegt im *frb110*-Locus.

**OAN164**

GGA ATT CCA TAT GCT TTC GTC CGG TGC G  
Verwendet bei der gerichteten PCR-Mutagenese in  
*fuz7* zur Herstellung von po2tef:*fuz7CA* (zusammen  
mit OAN165, OAN166 und OAN167).

**OAN165**

CCG GTA CCA ACA AAG TCG TCT GCG TCG TCG TTG  
ATG AGC TCT CCG C  
Verwendet bei der gerichteten PCR-Mutagenese in  
*fuz7* zur Herstellung von po2tef:*fuz7CA* (zusammen  
mit OAN164, OAN166 und OAN167).

**OAN166**

CCG GTA CCA GTA CCT ACA TGT CGC CTG  
Verwendet bei der gerichteten PCR-Mutagenese in  
*fuz7* zur Herstellung von po2tef:*fuz7CA* (zusammen  
mit OAN164, OAN165 und OAN167).

**OAN167**

CCG CGG CCG CTT ACT TCA TCC CAT CGG CC  
Verwendet bei der gerichteten PCR-Mutagenese in  
*fuz7* zur Herstellung von po2tef:*fuz7CA* (zusammen  
mit OAN164, OAN165 und OAN166).

**OAN168**

CAT CGC AAG ACC GGC AAC  
Liegt im *nos*-Terminator.

**OAN169**

GTG AGC TGA TAC CGC TCG  
Liegt im Rückgrat von pSP72.

**OAN170**

TGC TCT GCC TCG TCT ACG  
Liegt im *phc1*-Gen.

**OAN171**

GGT GAG GTC GAG CAA GTC  
Liegt im *phc1*-Gen.

**OAN172**

GGA ATT CCA TAT GTT TTC AGG CAA AGA GAA TG  
Verwendet zur Erzeugung einer *NdeI*-Schnittstelle am Translations-Startpunkt von *pra2*. Diente zur Herstellung von *ppra2-NdeI-mfa1* (zusammen mit OAN173).

**OAN173**

TCC GAT CCC AAA CCG TGG  
Liegt in *pra2*. Verwendet u. a. zur Erzeugung einer *NdeI*-Schnittstelle am Translations-Startpunkt von *pra2*. Diente zur Herstellung von *ppra2-NdeI-mfa1* (zusammen mit OAN172).

**OAN174**

GGA ATT CCA TAT GCT TTC GAT CTT CGC TCA G  
Verwendet zur Erzeugung einer *NdeI*-Schnittstelle am Translations-Startpunkt von *mfa1*. Diente zur Herstellung von *ppra2-NdeI-mfa1* (zusammen mit OAN175).

**OAN175**

GGC GAC TCA ATT CCG ACG  
Liegt in *mfa1*. Verwendet u. a. zur Erzeugung einer *NdeI*-Schnittstelle am Translations-Startpunkt von *mfa1*. Diente zur Herstellung von *ppra2-NdeI-mfa1* (zusammen mit OAN174).

**OAN176**

GGA ATT CCA TAT GCT CTC TAT TTT CGA AAC CG  
Verwendet zur Erzeugung einer *NdeI*-Schnittstelle am Translations-Startpunkt von *mfa2*. Diente zur Herstellung von *ppra2-NdeI-mfa2* (zusammen mit OAN177).

**OAN177**

GGA ATT CAA GTG GTC TCG ACC TGC  
Liegt in *mfa2*. Verwendet u. a. zur Erzeugung einer *NdeI*-Schnittstelle am Translations-Startpunkt von *mfa2*. Diente zur Herstellung von *ppra2-NdeI-mfa2* (zusammen mit OAN176).

**OAN178**

TGA TGG CGG GTT GAG CTG  
Liegt im *pra2*-Promotor.

**OAN179**

ATC TTA GGC TGG CTG GCC  
Liegt im *pra2*-Promotor.

**OAN180**

GAG CTG CTC TAT AGA CTG C  
Liegt im Rückgrat von  $\lambda$ gt10. Verwendet als linkes äußeres Oligonukleotid zur Amplifikation von cDNA-Enden aus der  $\lambda$ gt10 cDNA-Bank.

**OAN181**

AGA CTG CTG GGT AGT CCC  
Liegt im Rückgrat von  $\lambda$ gt10. Verwendet als linkes inneres Oligonukleotid zur Amplifikation von cDNA-Enden aus der  $\lambda$ gt10 cDNA-Bank.

**OAN182**

GGG TAA ATA ACA GAG GTG GC  
Liegt im Rückgrat von  $\lambda$ gt10. Verwendet als rechtes äußeres Oligonukleotid zur Amplifikation von cDNA-Enden aus der  $\lambda$ gt10 cDNA-Bank.

**OAN183**

TGG CTT ATG AGT ATT TCT TCC  
Liegt im Rückgrat von  $\lambda$ gt10. Verwendet als rechtes inneres Oligonukleotid zur Amplifikation von cDNA-Enden aus der  $\lambda$ gt10 cDNA-Bank.

**OAN184**

TGA TGA CGA GCC TGG TGC  
Liegt im *kpp6*-Gen.

**OAN185**

CTG CGC AAG GAA CTC TGG  
Liegt im *kpp6*-Gen.

**OAN186**

ATC TCC GGA GCA CGG TAC  
Liegt im *kpp6*-Gen.

**OAN187**

TCG GTC ATG AAG CCG GTG  
Liegt im *kpp6*-Gen.

**OAN188**

CAT CCA TCC CGC TGG TCG  
Liegt im *kpp6*-Promotor.

**OAN189**

TGG AAG AAG GAA GCC GCC  
Liegt im *kpp6*-Promotor.

**OAN190**

AAG CCG CCG AAA ACA GCG  
Liegt im *kpp6*-Promotor.

**OAN191**

TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT  
oligo (dT)<sub>30</sub> zur reversen Transkription von mRNA.

**OAN196**

GGC CAT GGC CGC CAT TGA TCA TGC  
Erzeugt eine *NcoI*-Schnittstelle am zunächst angenommenen Translations-Startpunkt von *kpp6*, verwendet zur Herstellung von *pkpp6N* (zusammen mit OAN197).

**OAN197**

GGC CAT GGT GAC AGT TAA TGG TAG  
Erzeugt eine *NcoI*-Schnittstelle am zunächst angenommenen 3'-Ende des *kpp6*-Promotors, verwendet zur Herstellung von *pkpp6N* (zusammen mit OAN196).

**OAN198**

GGC CAT GGC CGG ATC CGC CGC CAT TGA TCA TGC  
Erzeugt eine *NcoI*-Schnittstelle mit dahinter liegender *Bam*HI-Schnittstelle am zunächst angenommenen Translations-Startpunkt von *kpp6*, verwendet zur Herstellung von *pkpp6N-myc* (zusammen mit OAN120).

**OAN199**

GAG GCG CGC CAG CGT CAG TCG CAC  
Erzeugt eine *AscI*-Schnittstelle am 5'-Ende des *kpp6*-Terminators, verwendet zur Herstellung von *pkpp6NA* (zusammen mit OAN200).

**OAN200**

TCA AAG TGC GCC ACG TGC  
Liegt im *kpp6*-Terminator, verwendet u. a. zur Herstellung von *pkpp6NA* (zusammen mit OAN199).

**OAN201**

CCG GCG CGC CTC AAC GAA GAA GCG GCT G  
Erzeugt eine *AscI*-Schnittstelle hinter dem Stoppkodon von *kpp6*, verwendet zur Herstellung von *pkpp6NA* (zusammen mit OAN185).

**OAN202**

CCG GCG CGC CTC AGG ATC CAC GAA GAA GCG GCT  
GAA ATT C  
Erzeugt eine *Bam*HI-Schnittstelle vor und eine *AscI*-Schnittstelle hinter dem Stoppkodon von *kpp6*, verwendet zur Herstellung von *pkpp6C-myc* (zusammen mit OAN185).

**OAN203**

CCG GCG CGC CTC AGT GGT TTT CGT TGC GGA G  
Erzeugt ein Stoppkodon mit dahinter liegender *AscI*-Schnittstelle am Ende des N-Terminus von *kpp6*, verwendet zur Herstellung von *pkpp6N-term* (zusammen mit OAN196).

**OAN204**

GGC CAT GGC CTC CCA TTC TGC ACT C  
Erzeugt eine Translations-Startstelle mit *NcoI*-Schnittstelle am Beginn des C-Terminus von *kpp6*, verwendet zur Herstellung von *pkpp6C-term* (zusammen mit OAN186).

**OAN205**

GAG GTG GGA CGA GCG TCG AAC AAA AGG AAC GGA  
CAA GC  
Verwendet zur Erzeugung einer Punktmutation in PRE1.

**OAN206**

TCG ACG CTC GTC CCA CCT CCA CCT TTT GTG TCT  
TCT GTC  
Verwendet zur Erzeugung einer Punktmutation in PRE2.

**OAN207**

GGG TTG GAT CTT CCG GAT GGC GAC CTT TTG ACC  
Verwendet zur Erzeugung des *kpp6K220R*-Allels durch gerichtete PCR-Mutagenese (zusammen mit OAN204 und OAN201).

**OAN208**

ACG GTA CCA TCG CGT GGC GAC GAA TTC GGC CAT  
GAA GCC GGT G  
Verwendet zur Erzeugung des *kpp6T355A,Y357F*-Allels durch gerichtete PCR-Mutagenese (zusammen mit OAN204 und OAN201).

**OAN209**

CIC ICI CIC ICI CIC ICI C  
dl/dC-Oligonukleotid, verwendet für 5'-RACE.

**OAN210**

ATG CGG AGA CAA AGG GCG  
Liegt im *mfa1*-Promotor.

**OAN211**

GGC GTC GGT AAC GAA AGG  
Liegt im *mfa1*-Promotor.

**OAN212**

AAT CGC CGA GGC GTA TCG  
Liegt im *frb110*-Locus.

**OAN213**

GTA CGT GAT GGT GGA GGC  
Liegt im *frb110*-Locus.

**OAN214**

TGA GAA CGA TCC CCG AGC  
Liegt im *frb110*-Locus.

**OAN215**

ATC TTG GCC GAA CGA CGC  
Liegt im *frb110*-Locus.

**OAN216**

GGC CAT GGC AGC AGC AGC AGC AGC GAC AGA ACG  
AGC  
Erzeugt eine *NcoI*-Schnittstelle am Ende des N-Terminus von *kpp6*, verwendet zur Herstellung von *pkpp6/2* (zusammen mit OAN196).

**OAN217**

GGT TAT GCC GGT ACT GCC ACC TTT TTT TTT TTT  
TTT TTT TTT TTT  
Verwendet für 3'-RACE.

**OAN218**

GGT TAT GCC GGT ACT GCC ACC CCC CCC CCC CCC C  
Verwendet für 5'-RACE.

**OAN219**

TAT GCC GGT ACT GCC ACC  
Verwendet für 3'- und 5'-RACE.

**OAN220**

GAG ATG GAT GAG CAG CCG  
Liegt im *frb110*-Locus.

**OAN221**

CGG CAG CAG TTC ATC CAC  
Liegt im *prf1*-Locus.

**OAN222**

TTT GGC GTG CGA GAC ACC  
Liegt im *prf1*-Locus.

**OAN227**

CGA AAC ACC ACG TCA CGG  
Liegt im *frb52*-Promotor.

**OAN228**

AGA AGA GCA CTG ACA AAC AAT AG  
Liegt im *frb52*-Promotor.

**OAN229**

CTG ATC ATT ACT CTC CTT CC  
Liegt im *frb52*-Promotor.

**OAN230**

AGG TGG GAG GAG GGG TC  
Liegt im *frb52*-Promotor.

**OAN231**

CAA AAC AGC AAT GGT GAC TCG  
Liegt im *frb52*-Promotor.

**OAN232**

GGA ATG GCT TGG TGT CAA TAC  
Liegt im *frb52*-Promotor.

**OAN233**

CAT CGC TGT TGC GTT CCC  
Liegt im *frb52*-Locus.

**OAN234**

TTC AAA GAG GCG CGA GGC  
Liegt im *frb52*-Locus.

**OAN235**

CAG CCA TAC GAG CTC TCG  
Liegt im *frb110*-Locus.

**OAN236**

TCG CGA TGA TCG GAC TGC  
Liegt im *frb110*-Locus.

**OAN237**

AGG ATG GCG AGC CAA CGC  
Liegt im *frb110*-Locus.

**OAN238**

ATG CTG ACT CGC ACC TCG  
Liegt im *frb110*-Locus.

**OAN239**

CCC GGG CGA AAC ACC ACG TCA CGG  
Liegt im *frb52*-Promotor.

**OAN240**

GCC GGC AGA AGA GCA CTG ACA AAC AAT AG  
Liegt im *frb52*-Promotor.

**OAN241**

CCA TCT TCG ACA AAA TCT TCC G  
Liegt im *a2*-Locus, verwendet u. a. zur Erzeugung einer 5'-Flanke von *mfa2* für die Konstruktion von  $\Delta$ *mfa2* Hyg (zusammen mit OAN242).

**OAN242**

CAC GGC CTG AGT GGC CTT TGG ACG TGA TGT AAG  
GTG TCC

Erzeugt eine *Sfi*I-Schnittstelle am 3'-Ende des *mfa2*-Promotors, verwendet zur Herstellung einer 5'-Flanke von *mfa2* für die Konstruktion von  $\Delta$ *mfa2* Hyg (zusammen mit OAN241).

**OAN243**

GTG GGC CAT CTA GGC CAT GTG CTT TAG TGT GCA  
CAG ACC

Erzeugt eine *Sfi*I-Schnittstelle am 5'-Ende des *mfa2*-Terminators, verwendet zur Herstellung einer 3'-Flanke von *mfa2* für die Konstruktion von  $\Delta$ *mfa2* Hyg (zusammen mit OAN244).

**OAN244**

GTG ATA TTG ACA CGT TGA ACA TGT C

Liegt im *a2*-Locus, verwendet u. a. zur Erzeugung einer 3'-Flanke von *mfa2* für die Konstruktion von  $\Delta$ *mfa2* Hyg (zusammen mit OAN243).

**OAN245**

GGA TGT GTC AAG CCC CTG

Liegt im *mfa2*-Promotor.

**OAN246**

GTA CCG GTC TGT GCA CAC

Liegt im *mfa2*-Terminator.

**OAN247**

GAC GAA GAG GTA CAG CAG G

Liegt im *mfa2*-Promotor.

**OAN248**

ACA TGT CTG AGG ATG ACA CG

Liegt im *mfa2*-Terminator.

**OAN249**

GCG CGC GTA TAC GAC TCA CTA TAG GGA CTA GTA  
ACG GCC GCC AG

Verwendet zur Herstellung eines Templates für T7-RNA-Polymerase aus dem *frb110*-Locus. Diente zur Erzeugung einzelsträngiger RNA-Sonden.

**OAN250**

GCG CGC GTA TAC GAC TCA CTA TAG GGC CAG TGT  
GAT GGA TAT CTG C

Verwendet zur Herstellung eines Templates für T7-RNA-Polymerase aus dem *frb110*-Locus. Diente zur Erzeugung einzelsträngiger RNA-Sonden.

**OAN251**

GCG CGC GTA TAC GAC TCA CTA TAG GGC AGA GAC  
AGG TTA CGC G

Verwendet zur Herstellung eines Templates für T7-RNA-Polymerase aus dem *frb110*-Locus (zusammen mit OAN252). Diente zur Erzeugung einzelsträngiger RNA-Sonden.

**OAN252**

TTG GGG CTA AGC CAA GCG

Liegt im *frb110*-Locus, verwendet u. a. zur Herstellung eines Templates für T7-RNA-Polymerase (zusammen mit OAN251).

**OAN258**

CAT GCG TTG GTG TGG AGG  
Liegt im *kpp6*-Promotor.

**OAN259**

GAT ACA CCC GAG GCG ACC  
Liegt im *kpp6*-Promotor.

**OAN260**

TAC GCG CAC CTC GAT CTC  
Liegt im *frb110*-Locus.

**OAN261**

CCT CCG CCA TCT CCA ACC  
Liegt im *frb110*-Locus.

**OAN262**

TCG TCT GCG GTG TTC TGG  
Liegt im *frb110*-Locus.

**OAN263**

TCG CGC TTG TTG TCA CCC  
Liegt im *frb110*-Locus.

**OGW54**

ACA TAT CTA GCG GCG CCG  
Liegt im Rückgrat der Plasmide der freireplizierenden cDNA-Bank. Verwendet als äußeres Oligonukleotid zur Amplifikation von 3'-cDNA-Enden.

**OGW55**

GTA CCG GTC TGT GCA CAC  
Liegt im Rückgrat der Plasmide der freireplizierenden cDNA-Bank. Verwendet als inneres Oligonukleotid zur Amplifikation von 3'-cDNA-Enden.

**OGW56**

CTG ATT TCC ACC CTC CCG  
Liegt im Rückgrat der Plasmide der freireplizierenden cDNA-Bank. Verwendet als äußeres Oligonukleotid zur Amplifikation von 5'-cDNA-Enden.

**OGW57**

TCT GAC CCT TCC GTT GCC  
Liegt im Rückgrat der Plasmide der freireplizierenden cDNA-Bank. Verwendet als inneres Oligonukleotid zur Amplifikation von 5'-cDNA-Enden.

**Oligonukleotide aus anderen Projekten, die im RNA-Fingerprint benutzt wurden:**

<b>OOL1</b>	CGC ATC TTC GTT GGG GAC
<b>OOL2</b>	CAA CAG GAC GAC GTA CCC
<b>OOL3</b>	AGT AGC GGC AAC CGT CAG
<b>OOL4</b>	CCC TGC TCC GTT ACT CTC
<b>OOL15</b>	TTT GTG TGT GCG CCA GCG
<b>OOL16</b>	AGC TGC ATC AGG TCG GAG
<b>OOL17</b>	TCG CGT TTC AAC ACC GGC

<b>OOL18</b>	GAG GGT ATC AGC AGC TCC
<b>OOL19</b>	CGG CAT ACA GCG ATA CGG
<b>OOL20</b>	CCA GAT GAG TGC CGA CAG
<b>OOL21</b>	CGG TGT CGT CCA TCA CAG
<b>OGW30</b>	TGT CAC GAA CCG CGA ACG
<b>OGW31</b>	CGG CCC ATT CAC GAT TCG
<b>OGW32</b>	CGA ATC GTG AAT GGG CCG
<b>OGW33</b>	CTG GTG ACA TTG GGC TGG
<b>OGW34</b>	AGC AGC TCC TCA CAG ACG
<b>OGW35</b>	TGC TTG GCA GCC CTT CAC
<b>OGW36</b>	TTG GGC GAG CAA GAA GGC
<b>OGW37</b>	TGT GGA TGT TGC GTG CGC
<b>OGW38</b>	TCC TCA CAG ACG CCT TGC
<b>OCH1</b>	CTC CTC GTG CCT TAT GCC
<b>OCH2</b>	GTC TTG CAC AAC CCA GCG
<b>OCH3</b>	CTT GGT CTC CAT GGC TCG
<b>OCH4</b>	GCT CGG TGG TAG CAT GGA
<b>OCH5</b>	AGC CGG AAC CAC GCT TAC
<b>OCH6</b>	ATG GAG CGG TTG CTG GTG
<b>OCH7</b>	GGT GAT AGG CGT AGT CGC
<b>OCH8</b>	TTG GCC ATG TCA CGC GTC
<b>OCH9</b>	ATC TTG GGC TCG TTG GGC
<b>OCH10</b>	GCT CGA CGT ACG ACT GAG
<b>OCH11</b>	ACG CAA GCG AGA GAT GGC
<b>OCH12</b>	AGT GCA AAC CAG GCT CGC
<b>OCH13</b>	GAG AAC GCG AAG CTC GAC
<b>OCH14</b>	TTG GTG TTG TTG GCG CGC
<b>OCH15</b>	AGG AGG GTG TCC GAT TGC
<b>OCH16</b>	GTG TGA AGC TCG CCA GAG
<b>OCH17</b>	GAC TCA AAC ACG CGA CC
<b>OCH18</b>	CGT CAG CAT CCG TCC ATC
<b>OCH19</b>	CAA TGC GGT CTG GGT CTG
<b>OCH20</b>	TGA AAG CCG GAA CCA CGC
<b>OCH21</b>	CGG ATC TGA AGC TAG CCG
<b>OKC8</b>	TTC AAA CGT CGC CCT CGC

<b>OKC9</b>	AGA GAC AAG TGG GGA GCC	<b>PAL4</b>	GTC AGG GAT ACC GAG AGC
<b>OKC10</b>	GCT TGA CAG TCG ATC GCC	<b>PAL5</b>	CCA GCC GCC AGA GTT TTG
<b>OKC22</b>	TCC TAT GGG AGA CAC GCG	<b>PAL6</b>	GAG AGT TAG CCG CAG TCG
<b>OX13</b>	TGC ACC GTG ATC TCG GAG	<b>PAL7</b>	GTT ACA GCA ACC GCC AGG
<b>OX14</b>	TGG AAG GCG CTC ACA GAC	<b>PAL8</b>	GGG GTC CTT CAA TGG GAG
<b>OX15</b>	TAC TTG CCG CTG CAG CTG	<b>PAL9</b>	TCC GAG GGA GAT TCC GTC
<b>OX16</b>	CAG GGC GAC GAC ATC TTC	<b>PAL10</b>	GCC ACA GGG CAG AGT CTT
<b>OX17</b>	AAG ATG GTG GGC GAC GAG	<b>PAL11</b>	TCC GGC GGT AGT TGG TGA
<b>OX18</b>	CTA GCT TGT CAC CCT GCC	<b>PAL12</b>	CAG CCT GGG CGA CAA GAT
<b>PAL1</b>	AGT CGC AGC ACA GGT GAG	<b>PAL13</b>	TTA AGG GCT CGG AGG CAC
<b>PAL2</b>	CGT TCC GTA GGT CCA GGT	<b>PAL14</b>	TCG TGG TGA GCG TGT CTG
<b>PAL3</b>	CCC AGG TCG TCG TGT TCA	<b>pET-term</b>	GGT TAT GCC GGT ACT GCC

### 4.1.3 Stämme

#### *E. coli*-Stämme

Für sämtliche Klonierungen wurde der Stamm DH5 $\alpha$  (Hanahan, 1985) verwendet, bei dem es sich um ein Derivat des *E. coli*-Stammes K12 mit folgenden genetischen Markern handelt: F', *endA1*, *hsdR*, *hsdM*, *sup44*, *thi-1*, *gyrA1*, *gyrA96*, *relA1*, *recA1*, *lacZ*  $\Delta$ M15. Für die Klonierung von PCR-Amplifikaten in PCR-Topo mit dem TOPO-TA Klonierungs-Kit (In-

vitrogen) wurde teilweise der Stamm TOP10 (Invitrogen) benutzt, ebenfalls ein *E. coli* K12 Derivat mit dem Genotyp: F', *mcrA*,  $\Delta$ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*),  $\Phi$ 80*lacZ* $\Delta$ M15,  $\Delta$ *lacX74*, *deoR*, *recA1*, *araD139*,  $\Delta$ (*ara-leu*)7697, *galU*, *galK*, *rpsL*(Str<sup>R</sup>), *endA1*, *nupG*.

#### *U. maydis*-Stämme

Tabelle 16: Ausgangsstämme

Stamm	Genotyp	Resistenz	Referenz	Stamm	Genotyp	Resistenz	Referenz
FB1	<i>al b1</i>	-	Banuett und Herskowitz, 1989	ATCC#22887	<i>al bG</i>	-	ATCC
FB2	<i>a2 b2</i>	-	Banuett und Herskowitz, 1989	ATCC#22888	<i>al bH</i>	-	ATCC
FB6a	<i>a2 b1</i>	-	Banuett und Herskowitz, 1989	ATCC#22889	<i>al bI</i>	-	ATCC
FB6b	<i>al b2</i>	-	Banuett und Herskowitz, 1989	ATCC#22505	<i>al bJ</i>	-	ATCC
ATCC#22898	<i>al bA</i>	-	ATCC	ATCC#22891	<i>al bK</i>	-	ATCC
ATCC#22882	<i>al bB</i>	-	ATCC	ATCC#22892	<i>al bL</i>	-	ATCC
ATCC#22883	<i>al bC</i>	-	ATCC	ATCC#22893	<i>al bM</i>	-	ATCC
ATCC#22884	<i>al bD</i>	-	ATCC	ATCC#22894	<i>al bN</i>	-	ATCC
ATCC#22885	<i>al bE</i>	-	ATCC	ATCC#22895	<i>al bO</i>	-	ATCC
ATCC#22886	<i>al bF</i>	-	ATCC	ATCC#22896	<i>al bP</i>	-	ATCC
				FBD11	<i>ala2 b1b2</i>	-	Banuett und Herskowitz, 1989
				FBD12-3	<i>ala2 b1b1</i>	-	Banuett und Herskowitz, 1989

Fortsetzung Tabelle 16

Stamm	Genotyp	Resistenz	Referenz	Stamm	Genotyp	Resistenz	Referenz
FBD11-7	<i>a1a1 b1b2</i>	-	Banuett und Herskowitz, 1989	FB1Δprf1	<i>a1 b1 Δprf1</i>	Nat <sup>R</sup>	Müller <i>et al.</i> , 1999
FBD12-17	<i>a2a2 b1b2</i>	-	Banuett und Herskowitz, 1989	FB1Δuac1	<i>a1 b1 Δuac1</i>	Hyg <sup>R</sup>	Krüger, 1999
AG1	<i>a1 Δb</i>	Cbx <sup>R</sup>	A. Grandel, pers. Mitteilung	FB1Δubc1	<i>a1 b1 Δubc1</i>	Nat <sup>R</sup>	Müller <i>et al.</i> , 1999
CL13	<i>a1 bW2bE1</i>	-	Bölker <i>et al.</i> , 1995a	FB1Δkpp4	<i>a1 b1 Δkpp4</i>	Hyg <sup>R</sup>	P. Müller, pers. Mitteilung.
SG200	<i>a1mfa2 bW2bE1</i>	Phleo <sup>R</sup>	Bölker <i>et al.</i> , 1995b	FB1Δfuz7	<i>a1 b1 Δfuz7</i>	Nat <sup>R</sup>	G. Weinzierl, pers. Mitteilung
HA103	<i>a1 bW2bE1<sup>com</sup></i>	Cbx <sup>R</sup>	Hartmann <i>et al.</i> , 1996	FB2Δfuz7	<i>a2 b2 Δfuz7</i>	Nat <sup>R</sup>	G. Weinzierl, pers. Mitteilung
FB1Δkpp2	<i>a1 b1 Δkpp2</i>	Nat <sup>R</sup>	Müller <i>et al.</i> , 1999	FB1kpp4-2	<i>a1 b1 ip'[P<sub>erg</sub>:kpp4-2]ip'</i>	Cbx <sup>R</sup>	P. Müller, pers. Mitteilung
FB2Δkpp2	<i>a2 b2 Δkpp2</i>	Nat <sup>R</sup>	Müller <i>et al.</i> , 1999	FB1fuz7DD	<i>a1 b1 ip'[P<sub>erg</sub>:fuz7DD]ip'</i>	Cbx <sup>R</sup>	P. Müller, pers. Mitteilung
CL13Δkpp2	<i>a1 bW2bE1 Δkpp2</i>	Nat <sup>R</sup>	Müller <i>et al.</i> , 1999				

Tabelle 17: In dieser Arbeit hergestellte Stämme

Stamm	Genotyp	Resistenz <sup>a</sup>	aus <sup>aa</sup>	Stamm	Genotyp	Resistenz <sup>a</sup>	aus <sup>aa</sup>
AB1	<i>a1 Δb</i>	P	FB1	AB113	<i>a1 b1 Δkpp6 ip'[P<sub>o2of</sub>:fuz7CA]ip'</i>	H,C	FB1Δkpp6
AB2	<i>a2 Δb</i>	P	FB2	AB114	<i>a2 b2 Δkpp6 ip'[P<sub>o2of</sub>:fuz7CA]ip'</i>	H,C	FB2Δkpp6
AB4	<i>a1 P<sub>nar</sub>:bW2,bE1</i>	P	CL13	AB115	<i>a1 b1 Δkpp2 ip'[P<sub>o2of</sub>:fuz7CA]ip'</i>	N,C	FB1Δkpp2
AB31	<i>a2 P<sub>erg</sub>:bW2,bE1</i>	P	FB2	AB116	<i>a2 b2 Δkpp2 ip'[P<sub>o2of</sub>:fuz7CA]ip'</i>	N,C	FB2Δkpp2
AB32	<i>a2 P<sub>erg</sub>:bW2,bE2</i>	P	FB2	AB117	<i>a1 b1 Δfuz7 ip'[P<sub>o2of</sub>:fuz7CA]ip'</i>	N,C	FB1Δfuz7
AB33	<i>a2 P<sub>nar</sub>:bW2,bE1</i>	P	FB2	AB118	<i>a2 b2 Δfuz7 ip'[P<sub>o2of</sub>:fuz7CA]ip'</i>	N,C	FB2Δfuz7
AB34	<i>a2 P<sub>nar</sub>:bW2,bE2</i>	P	FB2	AB120	<i>a1mfa2 bW2bE1 ip'[P<sub>o2of</sub>:gfp]ip'</i>	P,C	SG200
AB50	<i>a2 b2 Δbig6</i>	H	FB2	AB121	<i>a1mfa2 bW2bE1 ip'[P<sub>o2of</sub>:gfp]ip'</i>	P,C	SG200
AB51	<i>a1mfa2 bW2bE1 Δbig6</i>	P,H	SG200	AB122	<i>a1mfa2 bW2bE1 Δkpp6 ip'[P<sub>o2of</sub>:gfp]ip'</i>	P,H,C	AB83
AB52	<i>a1mfa2 bW2bE1 Δbig6</i>	P,H	SG200	AB131	<i>P<sub>erg</sub>:pra2,mfa1 b2</i>	P	FB2
AB53	<i>a1 b1 Δbig6</i>	H	FB1	AB132	<i>P<sub>erg</sub>:pra2,mfa2 b2</i>	P	FB2
AB54	<i>a1 b1 Δbig6</i>	H	FB1	AB133	<i>P<sub>nar</sub>:pra2,mfa1 b2</i>	P	FB2
AB60	<i>a2 b2 P<sub>nar</sub>:pkc1</i>	P	FB2	AB134	<i>P<sub>nar</sub>:pra2,mfa2 b2</i>	P	FB2
AB61	<i>a2 b2 P<sub>nar</sub>:pkc1</i>	P	FB2	AB141	<i>a1<sup>com</sup> b1</i>	C	FB1
AB62	<i>a1 bW2bE1 P<sub>nar</sub>:pkc1</i>	P	CL13	AB142	<i>a2<sup>com</sup> b2</i>	C	FB2
AB63	<i>a1 bW2bE1 P<sub>nar</sub>:pkc1</i>	P	CL13	AB143	<i>a2<sup>com</sup> b1</i>	C	FB6a
AB71	<i>a1 b1 Δfrb52</i>	H	FB1	AB144	<i>a1 b1<sup>com</sup></i>	P	FB1
AB72	<i>a2 b2 Δfrb52</i>	H	FB2	AB145	<i>a2 b2<sup>com</sup></i>	P	FB2
AB81	<i>a1 b1 Δkpp6</i>	H	FB1	AB146	<i>a1<sup>com</sup> b1<sup>com</sup></i>	P,C	AB144
AB82	<i>a2 b2 Δkpp6</i>	H	FB2	AB147	<i>a2<sup>com</sup> b2<sup>com</sup></i>	P,C	AB145
AB83	<i>a1mfa2 bW1bE2 Δkpp6</i>	P,H	SG200	AB148	<i>a1<sup>com</sup> b1</i>	P	FB1
AB85	<i>a2 P<sub>nar</sub>:bW2,bE1 Δkpp6</i>	P,H	AB33	AB149	<i>a2<sup>com</sup> b2</i>	P	FB2
AB86	<i>a2 P<sub>nar</sub>:bW2,bE2 Δkpp6</i>	P,H	AB34	AB151	<i>a1 b1 Δphc1</i>	N	FB1
AB91	<i>a1 b1 Δkpp2 Δkpp6</i>	N,H	FB1Δkpp2	AB152	<i>a2 b2 Δphc1</i>	N	FB2
AB92	<i>a2 b2 Δkpp2 Δkpp6</i>	N,H	FB2Δkpp2				
AB93	<i>a1 bW2bE1 Δkpp2 Δkpp6</i>	N,H	CL13Δkpp2				
AB101	<i>a1 b1 Δfrb110</i>	H	FB1				
AB102	<i>a2 b2 Δfrb110</i>	H	FB2				
AB111	<i>a1 b1 ip'[P<sub>o2of</sub>:fuz7CA]ip'</i>	C	FB1				
AB112	<i>a2 b2 ip'[P<sub>o2of</sub>:fuz7CA]ip'</i>	C	FB2				

Fortsetzung Tabelle 17

Stamm	Genotyp	Resis- tenz*	aus**	Stamm	Genotyp	Resis- tenz*	aus**
AB153	<i>almfa2 bW2bE1 Δphc1</i>	P,N	SG200	AB193	<i>a2 P<sub>nar</sub>::bW2,bE1</i> <i>ip'[P<sub>kyo6</sub>(PRE1mut)::egfp]ip'</i>	P,C	AB33
AB161	<i>almfa2 bW2bE1 Δkpp6</i> <i>ip'[P<sub>kyo6</sub>:kpp6N-term]ip'</i>	P,C	AB83	AB194	<i>a2 P<sub>nar</sub>::bW2,bE2</i> <i>ip'[P<sub>kyo6</sub>(PRE1mut)::egfp]ip'</i>	P,C	AB34
AB162	<i>a1 b1 ip'[P<sub>o2of</sub>:kpp6N-term]ip'</i>	C	FB1	AB195	<i>a2 P<sub>nar</sub>::bW2,bE1</i> <i>ip'[P<sub>kyo6</sub>(PRE2mut)::egfp]ip'</i>	P,C	AB33
AB163	<i>a2 b2 ip'[P<sub>o2of</sub>:kpp6N-term]ip'</i>	C	FB2	AB196	<i>a2 P<sub>nar</sub>::bW2,bE2</i> <i>ip'[P<sub>kyo6</sub>(PRE2mut)::egfp]ip'</i>	P,C	AB34
AB164	<i>almfa2 bW2bE1</i> <i>ip'[P<sub>o2of</sub>:kpp6N-term]ip'</i>	P,C	SG200	AB197	<i>a2 P<sub>nar</sub>::bW2,bE1</i> <i>ip'[P<sub>kyo6</sub>(PRE1.2mut)::egfp]ip'</i>	P,C	AB33
AB165	<i>almfa2 bW2bE1 Δkpp6</i> <i>ip'[P<sub>kyo6</sub>:kpp6C-term]ip'</i>	P,H,C	AB83	AB198	<i>a2 P<sub>nar</sub>::bW2,bE2</i> <i>ip'[P<sub>kyo6</sub>(PRE1.2 mut)::egfp]ip'</i>	P,C	AB34
AB166	<i>a1 b1 Δkpp2</i> <i>ip'[P<sub>kyo6</sub>:kpp6C-term]ip'</i>	N,C	FB1Δkpp2	AB201	<i>a1 b1 Δkpp6</i> <i>ip'[P<sub>kyo6</sub>:kpp6K220R]ip'</i>	H,C	AB81
AB167	<i>a2 b2 Δkpp2</i> <i>ip'[P<sub>kyo6</sub>:kpp6C-term]ip'</i>	N,C	FB2Δkpp2	AB202	<i>a2 b2 Δkpp6</i> <i>ip'[P<sub>kyo6</sub>:kpp6K220R]ip'</i>	H,C	AB82
AB168	<i>a1 b1 ip'[P<sub>o2of</sub>:kpp6C-term]ip'</i>	C	FB1	AB203	<i>almfa2 bW2bE1 Δkpp6</i> <i>ip'[P<sub>kyo6</sub>:kpp6K220R]ip'</i>	P,H,C	AB83
AB169	<i>a2 b2 ip'[P<sub>o2of</sub>:kpp6C-term]ip'</i>	C	FB2	AB211	<i>a1 b1 Δkpp6</i> <i>ip'[P<sub>kyo6</sub>:kpp6T355A,Y357F]ip'</i>	H,C	AB81
AB170	<i>almfa2 bW2bE1</i> <i>ip'[P<sub>o2of</sub>:kpp6C-term]ip'</i>	P,C	SG200	AB212	<i>a2 b2 Δkpp6</i> <i>ip'[P<sub>kyo6</sub>:kpp6T355A,Y357F]ip'</i>	H,C	AB82
AB171	<i>almfa2 bW2bE1 Δkpp6</i> <i>ip'[P<sub>kyo6</sub>:kpp6NA]ip'</i>	P,H,C	AB83	AB213	<i>almfa2 bW2bE1 Δkpp6</i> <i>ip'[P<sub>kyo6</sub>:kpp6T355A,Y357F]ip'</i>	P,H,C	AB83
AB172	<i>almfa2 bW2bE1 Δkpp6</i> <i>ip'[P<sub>kyo6</sub>(PRE1mut)::kpp6NA]ip'</i>	P,H,C	AB83	AB221	<i>a1 b1 ip'[P<sub>o2of</sub>:kpp6NA]ip'</i>	C	FB1
AB173	<i>almfa2 bW2bE1 Δkpp6</i> <i>ip'[P<sub>kyo6</sub>(PRE2mut)::kpp6NA]ip'</i>	P,H,C	AB83	AB222	<i>a2 b2 ip'[P<sub>o2of</sub>:kpp6NA]ip'</i>	C	FB2
AB174	<i>almfa2 bW2bE1 Δkpp6</i> <i>ip'[P<sub>kyo6</sub>(PRE1.2mut)::kpp6NA]ip'</i>	P,H,C	AB83	AB223	<i>a1 b1 Δkpp6</i> <i>ip'[P<sub>o2of</sub>:kpp6NA]ip'</i>	H,C	AB81
AB175	<i>almfa2 bW2bE1 Δkpp6</i> <i>ip'[P<sub>kyo6</sub>:kpp6wt]ip'</i>	P,H,C	AB83	AB224	<i>a2 b2 Δkpp6</i> <i>ip'[P<sub>o2of</sub>:kpp6NA]ip'</i>	H,C	AB82
AB176	<i>a1 b1 Δkpp6</i> <i>ip'[P<sub>kyo6</sub>:kpp6NA]ip'</i>	H,C	AB81	AB225	<i>almfa2 bW2bE1 Δkpp6</i> <i>ip'[P<sub>o2of</sub>:kpp6NA]ip'</i>	P,H,C	AB83
AB177	<i>a2 b2 Δkpp6</i> <i>ip'[P<sub>kyo6</sub>:kpp6NA]ip'</i>	H,C	AB82	AB226	<i>a1 b1 Δkpp6</i> <i>ip'[P<sub>o2of</sub>:kpp6C-term]ip'</i>	H,C	AB81
AB178	<i>a1 b1 Δkpp6</i> <i>ip'[P<sub>kyo6</sub>:kpp6C-term]ip'</i>	H,C	AB81	AB227	<i>a2 b2 Δkpp6</i> <i>ip'[P<sub>o2of</sub>:kpp6C-term]ip'</i>	H,C	AB82
AB179	<i>a2 b2 Δkpp6</i> <i>ip'[P<sub>kyo6</sub>:kpp6C-term]ip'</i>	H,C	AB82	AB228	<i>almfa2 bW2bE1 Δkpp6</i> <i>ip'[P<sub>o2of</sub>:kpp6C-term]ip'</i>	P,H,C	AB83
AB181	<i>a1a2 b1b2 ip'[P<sub>kyo6</sub>:egfp]ip'</i>	C	FBD11	AB241	<i>a1a2 b1b2</i> <i>ip'[P<sub>kyo6</sub>:kpp6N-myc]ip'</i>	C	FBD11
AB182	<i>a1a2 b1b1 ip'[P<sub>kyo6</sub>:egfp]ip'</i>	C	FBD12-3	AB242	<i>a1a2 b1b1</i> <i>ip'[P<sub>kyo6</sub>:kpp6N-myc]ip'</i>	C	FBD12-3
AB183	<i>a1a2 b1b2</i> <i>ip'[P<sub>kyo6</sub>(PRE1mut)::egfp]ip'</i>	C	FBD11	AB243	<i>a2 P<sub>nar</sub>::bW2,bE1</i> <i>ip'[P<sub>kyo6</sub>:kpp6N-myc]ip'</i>	P,C	AB33
AB184	<i>a1a2 b1b1</i> <i>ip'[P<sub>kyo6</sub>(PRE1mut)::egfp]ip'</i>	C	FBD12-3	AB244	<i>a2 P<sub>nar</sub>::bW2,bE2</i> <i>ip'[P<sub>kyo6</sub>:kpp6N-myc]ip'</i>	P,C	AB34
AB185	<i>a1a2 b1b2</i> <i>ip'[P<sub>kyo6</sub>(PRE2mut)::egfp]ip'</i>	C	FBD11	AB251	<i>a1a2 b1b2</i> <i>ip'[P<sub>kyo6</sub>:kpp6C-myc]ip'</i>	C	FBD11
AB186	<i>a1a2 b1b1</i> <i>ip'[P<sub>kyo6</sub>(PRE2mut)::egfp]ip'</i>	C	FBD12-3	AB252	<i>a1a2 b1b1</i> <i>ip'[P<sub>kyo6</sub>:kpp6C-myc]ip'</i>	C	FBD12-3
AB187	<i>a1a2 b1b2</i> <i>ip'[P<sub>kyo6</sub>(PRE1.2mut)::egfp]ip'</i>	C	FBD11	AB253	<i>a2 P<sub>nar</sub>::bW2,bE1</i> <i>ip'[P<sub>kyo6</sub>:kpp6C-myc]ip'</i>	P,C	AB33
AB188	<i>a1a2 b1b1</i> <i>ip'[P<sub>kyo6</sub>(PRE1.2mut)::egfp]ip'</i>	C	FBD12-3	AB254	<i>a2 P<sub>nar</sub>::bW2,bE2</i> <i>ip'[P<sub>kyo6</sub>:kpp6C-myc]ip'</i>	P,C	AB34
AB191	<i>a2 P<sub>nar</sub>::bW2,bE1</i> <i>ip'[P<sub>kyo6</sub>:egfp]ip'</i>	P,C	AB33				
AB192	<i>a2 P<sub>nar</sub>::bW2,bE2</i> <i>ip'[P<sub>kyo6</sub>:egfp]ip'</i>	P,C	AB34				

Fortsetzung Tabelle 17

Stamm	Genotyp	Resis- tenz*	aus**	Stamm	Genotyp	Resis- tenz*	aus**
AB261	<i>a1 b1 ip'(P<sub>o2:af</sub>:kpp6/2)ip<sup>s</sup></i>	C	FB1	RU3	<i>a2 b2 ip'(P<sub>nor(1169):sgfp)ip<sup>s</sup></sub></i>	C	FB2
AB262	<i>a2 b2 ip'(P<sub>o2:af</sub>:kpp6/2)ip<sup>s</sup></i>	C	FB2	RU4	<i>a2 b2 ip'(P<sub>nor(986):sgfp)ip<sup>s</sup></sub></i>	C	FB2
AB263	<i>a1 b1 Δkpp2 ip'(P<sub>o2:af</sub>:kpp6/2)ip<sup>s</sup></i>	N,C	FB1Δkpp2	RU5	<i>a2 b2 ip'(P<sub>nor(625):sgfp)ip<sup>s</sup></sub></i>	C	FB2
AB264	<i>a2 b2 Δkpp2 ip'(P<sub>o2:af</sub>:kpp6/2)ip<sup>s</sup></i>	N,C	FB2Δkpp2	RU6	<i>a2 b2 ip'(P<sub>nor(584):sgfp)ip<sup>s</sup></sub></i>	C	FB2
AB265	<i>a1mfa2 bW2bE1 Δkpp6 ip'(P<sub>kpp6</sub>:kpp6/2)ip<sup>s</sup></i>	P,H,C	AB83	RU7	<i>a2 b2 ip'(P<sub>nor(445):sgfp)ip<sup>s</sup></sub></i>	C	FB2
AB281	<i>a2 P<sub>nar</sub>:bW2.bE1 Δprf1</i>	P,N	AB33	RU11	<i>a2 b2 ip'(P<sub>crj(3512):sgfp)ip<sup>s</sup></sub></i>	C	FB2
AB282	<i>P<sub>nar</sub>:pra2.mfa1 b2 Δprf1</i>	P,N	AB133	RU12	<i>a2 b2 ip'(P<sub>crj(1405):sgfp)ip<sup>s</sup></sub></i>	C	FB2
AB291	<i>a1<sup>com</sup> b1<sup>com</sup> Δprf1</i>	C,N	AB146	RU13	<i>a2 b2 ip'(P<sub>crj(1306):sgfp)ip<sup>s</sup></sub></i>	C	FB2
AB292	<i>a2<sup>com</sup> b2<sup>com</sup> Δprf1</i>	C,N	AB147	RU4wt	<i>a2 b2 ip'(P<sub>nor(986,nc0):sgfp)ip<sup>s</sup></sub></i>	C	FB2
AB295	<i>a2<sup>com</sup> b2<sup>com</sup> Δmfa2</i>	C,H	AB147	RU4Nco	<i>a2 b2 ip'(P<sub>nor(986,nc0):sgfp)ip<sup>s</sup></sub></i>	C	FB2
AB301	<i>a1 b1 kpp6NA</i>	C	AB81	RU4Sph	<i>a2 b2 ip'(P<sub>nor(986,5ph):sgfp)ip<sup>s</sup></sub></i>	C	FB2
AB302	<i>a2 b2 kpp6NA</i>	C	AB82	RU4egfp	<i>a2 b2 ip'(P<sub>nor(986,nc0):egfp)ip<sup>s</sup></sub></i>	C	FB2
AB303	<i>a1mfa2 bW2bE1 kpp6NA</i>	P,C	AB83	RU4egfp-d1	<i>a2 b2 ip'(P<sub>nor(986,nc0):egfp-d1)ip<sup>s</sup></sub></i>	C	FB2
AB311	<i>a1 b1 kpp6T355A.Y357F</i>	C	AB81	RU4egfp-d2	<i>a2 b2 ip'(P<sub>nor(986,nc0):egfp-d2)ip<sup>s</sup></sub></i>	C	FB2
AB312	<i>a2 b2 kpp6T355A.Y357F</i>	C	AB82	FB2kon8	<i>a2 b2 ip'(P<sub>crj</sub>:his-kon8)ip<sup>s</sup></i>	C	FB2
AB313	<i>mfa2 bW2bE1 kpp6T355A.Y357F</i>	P,C	AB83	CH1	<i>a1 b1 Δpyr6</i>	-	FB1
AB321	<i>a1 b1 kpp6K220R</i>	C	AB81	CH2	<i>a2 b2 Δpyr6</i>	-	FB2
AB322	<i>a2 b2 kpp6K220R</i>	C	AB82	ES1	<i>a1 b1 Δnar1</i>	-	FB1
AB323	<i>mfa2 bW2bE1 kpp6K220R</i>	P,C	AB83	ES2	<i>a2 b2 Δnar1</i>	-	FB2
CU1	<i>a2 b2 ip'(P<sub>nar</sub>:sgfp)ip<sup>s</sup></i>	C	FB2	* Abkürzungen: C, Cbx <sup>8</sup> ; H, Hyg <sup>8</sup> ; N, Nat <sup>8</sup> ; P, Phleo <sup>8</sup> . Die Resistenzen sind in der Reihenfolge ihrer Einführung angegeben.			
CU2	<i>a2 b2 ip'(P<sub>crj</sub>:sgfp)ip<sup>s</sup></i>	C	FB2	** "aus" bezeichnet den Ausgangsstamm, d. h. den Stamm, in dem die jeweils letzte Transformation erfolgte.			
CU3	<i>a2 b2 ip'(P<sub>crj</sub>:sgfp)ip<sup>s</sup></i>	C	FB2	Sämtliche Transformanten wurden durch Southern-Analyse bestätigt. In fast allen Fällen wurden mindestens zwei unabhängige Transformanten hergestellt und für die weiteren Experimente hergenommen.			
CU4	<i>a2 b2 ip'(P<sub>o2:af</sub>:sgfp)ip<sup>s</sup></i>	C	FB2				
CU7	<i>a2 b2 ip'(P<sub>o1:af</sub>:sgfp)ip<sup>s</sup></i>	C	FB2				
RU1	<i>a2 b2 ip'(P<sub>nar(Banks)</sub>:sgfp)ip<sup>s</sup></i>	C	FB2				
RU2	<i>a2 b2 ip'(P<sub>nar(2054)</sub>:sgfp)ip<sup>s</sup></i>	C	FB2				

#### 4.1.4 Plasmide und Plasmidkonstruktionen

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

##### Ausgangsplasmide

###### pSP72 (Promega)

Sehr kleiner Klonierungsvektor, keine Blau/Weiß-Selektion möglich.

###### pBS(+)**SK** (Stratagene)

Klonierungsvektor, Blau/Weiß-Selektion ist möglich.

###### pUC19 (Yanisch-Perron *et al.*, 1985)

Klonierungsvektor, Blau/Weiß-Selektion ist möglich.

###### pSL1180 (Pharmacia)

Klonierungsvektor mit sehr großem Polylinker; enthält zwar das Gen für β-Galaktosidase, trotzdem ist keine Blau/Weiß-Selektion möglich.

**pNEB193** (NEB)

Klonierungsvektor, Derivat von pUC19 mit verändertem Polylinker, der vor allem Erkennungssequenzen für selten schneidende Enzyme enthält; Blau/Weiß-Selektion ist möglich.

**pCR-Topo** (Invitrogen)

Vektor zur Klonierung von PCR-Produkten mittels Topoisomerase-Aktivität. Die entsprechenden PCR-Produkte können mit *EcoRI* wieder ausgeschnitten werden; Blau/Weiß-Selektion ist möglich.

**pCM54** (Tsukuda *et al.*, 1988)

Ist ein frei replizierendes Plasmid, das eine Hygromycin-Resistenzkassette und eine UARS ("Ustilago autonomously replicating sequence") enthält.

**pBS-hhh** (J. Kämper, pers. Mitteilung)

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

**pCBX122** (Keon *et al.*, 1991)

Ein Derivat von pCM54, das anstatt der Hygromycin-eine Carboxin-Resistenzkassette als 3,2 kb *EcoRI/HindIII*-Fragment und eine UARS enthält.

**pb<sup>son</sup>** (Hartmann *et al.*, 1996)

Ist ein Transformationskonstrukt zur Herstellung eines konstitutiv exprimierten und aktiven *b*-Allels; enthält als Selektionsmarker eine modifizierte Carboxin-Resistenzkassette aus pCBX122, an die an beiden Enden *NotI*-Schnittstellen angefügt wurden.

**pbE1-k-W2** (Romeis *et al.*, 1997)

Enthält das Gen für das bE1-k-W2 Fusionsprotein unter Kontrolle des *tef*-Promotors und eine modifizierte Hygromycin-Resistenzkassette aus pCM54, an die an beiden Enden *NotI*-Schnittstellen angefügt wurden.

**pBR322-NatI** (G. Bakkeren, pers. Mitteilung)

Ein pBR322-Derivat, das eine etwa 1,4 kb große Nourseothricin-Resistenzkassette trägt.

**pSLNat** (p103; C. Aichinger, pers. Mitteilung)

Ein 1,4 kb *XbaI/BglII*-Fragment aus pBR322-NatI, das die Nourseothricin-Resistenzkassette enthält, wurde in pSL1180 ligiert, der mit *AvrII* und *BglII* geöffnet worden war.

**HBt-SGFP-TYG-nos** (Sheen *et al.*, 1995)

Das Plasmid enthält *sgfp-TYG* als 726 bp *NcoI/NotI*-Fragment und den *nos*-Terminator als 287 bp *NotI/EcoRI*-Fragment.

**pUThsp70Not** (R. Kahmann, pers. Mitteilung)

Ist ein Derivat von pUT715 (Cayla), der das Phleomycin-Resistenzgen vor dem *trpC*-Terminator trägt. In die singuläre *EcoRV*-Schnittstelle vor dem Gen wurde der *hsp70*-Promotor als 1,2 kb *SmaI*-Fragment aus pCM54 eingefügt (ergab pUThsp70). Anschließend wurde in die singuläre *HpaI*-Schnittstelle vor dem Promotor ein *NotI*-Linker eingesetzt.

**pOTEF-SG** (Spellig *et al.*, 1996)

Enthält den *o2tef*-Promotor vor *sgfp-TYG* und dem *nos*-Terminator. Zusätzlich befindet sich auf dem Plasmid eine Carboxin-Resistenzkassette zur Selektion in *U. maydis*.

**pBS-nar1p** (Brachmann, 1995)

Enthält den von Banks *et al.* (1993) veröffentlichten 505 bp *nar1*-Promotor als PCR-Fragment (MB55 und MB56) mit *NdeI*-Schnittstelle am Translations-Startpunkt.

**pCRGFP2** (Bottin *et al.*, 1996)

Frei replizierender Vektor, der den 3,6 kb *crgl*-Promotor vor *sgfp* und zusätzlich eine Carboxin-Resistenzkassette enthält.

**pGE24** (G. Weinzierl, pers. Mitteilung)

Enthält den *sc*-Promotor aus pSMUT (Bölker *et al.*, 1995a) als PCR-Produkt, so dass er als 496 bp *NotI/NdeI*-Fragment ausgeschnitten werden kann.

**pEGFP** (Clontech)

Enthält das *egfp*-Gen als 726 bp *NcoI/NotI*-Fragment.

**pCGFP** (Clontech)

Enthält das *cgfp*-Gen als 726 bp *NcoI/NotI*-Fragment.

**pYGFP** (Clontech)

Enthält das *ygfp*-Gen als 726 bp *NcoI/NotI*-Fragment.

**pd1EGFP-N1** (Clontech)

Enthält das *egfp-dl*-Allel als 852 bp *NcoI/NotI*-Fragment mit einer internen *NcoI*-Schnittstelle.

**pD2EGFP-1** (Clontech)

Enthält das *egfp-d2*-Allel als 852 bp *NcoI/NotI*-Fragment mit einer internen *NcoI*-Schnittstelle.

**pKon8** (Romeis *et al.*, 2000)

Enthält das *kon8*-Allel mit *NdeI*-Schnittstelle am Translations-Startpunkt.

**pSPfuz7** (Regenfelder *et al.*, 1997)

Enthält ein 8 kb *PvuII*-Fragment aus dem *fuz7*-Locus.

**pSL1180 3'W/3'E** (J. Kämper, pers. Mitteilung)

Enthält 3'-Flanken des *bW*- und des *bE*-Gens mit einer dazwischen liegenden *NotI*-Schnittstelle; Ausgangsplasmid für *b*-Deletionskonstrukte.

**pE1W2ΔP#1** (J. Kämper, pers. Mitteilung)

Enthält das *bW1*- und das *bE2*-Gen "Kopf an Kopf", wobei sich an den Translations-Startstellen eine *NdeI*-Schnittstelle befindet.

**pJBbE2** (Bergemann, 1993)

Enthält ein Intron-freies *bE2*-Gen mit einer *NdeI*-Schnittstelle am Translations-Startpunkt.

**pWI<sub>631</sub>-GA** (Kämper *et al.*, 1995)

Enthält ein Intron-freies *bW1*-Gen mit einer *NdeI*-Schnittstelle am Translations-Startpunkt.

**pUMa1** (Urban *et al.*, 1996a)

Enthält den gesamten *a1*-Locus als 10,0 kb *BamHI*-Fragment in pSL1180.

**pUMa2** (Urban *et al.*, 1996a)

Enthält den gesamten *a2*-Locus als 12,5 kb *MluI*-Fragment in pSL1180.

**pTZa2B6,5** (Urban, 1995)

Enthält ein 6,5 kb *BamHI*-Fragment aus dem *a2*-Locus.

**pTZ-pra1** (P. Müller, pers. Mitteilung)

Enthält das 5'-Ende von *pra1*, wobei sich an der Translations-Startstelle eine *NdeI*-Schnittstelle befindet.

**pΔprf** (Müller *et al.*, 1999)

Deletionskonstrukt für *prf1*, enthält eine Nourseothricin-Resistenzkassette zwischen 5'- und 3'-Flanken aus dem *prf1*-Locus.

**p123/kpp2** (P. Müller, pers. Mitteilung)

Enthält *kpp2* als 1.073 bp *NcoI/NotI*-Fragment, flankiert von dem *o2tef*-Promotor und dem *nos*-Terminator (als *NotI/EcoRI*-Fragment).

**pCK152** (C. Koch, pers. Mitteilung)

Enthält ein 120 bp *BamHI*-Fragment, das für ein Triple-Myc-Epitop kodiert.

**pLGD312** (J. Perez-Martin, pers. Mitteilung)

Hefeplasmid, welches das *lacZ*-Gen unter Kontrolle des *cyc1*-Promotors enthält. Besitzt außerdem eine Ura-Kassette. Verwendet zur Herstellung des One-Hybrid Plasmids pOH.

**Cosmidbank pUMcos<sup>Δ</sup>** (Bölker *et al.*, 1995a)

Cosmidbank des *U. maydis*-Stammes FBD11 (*a1a2 b1b2*), erzeugt durch Ligation partiell restringierter *MboI*-Fragmente in die *BamHI*-Schnittstelle des Vektors pUMcos. pUMcos ist ein Derivat des Vektors pScos1 (Stratagene), in dem ein *BgIII/HindIII*-Fragment, das die Neomycin-Resistenzkassette enthält, durch ein *EcoRV/SmaI*-Fragment aus dem Vektor pCBX122, das die Carboxin-Resistenzkassette enthält, ausgetauscht wurde.

**λgt10 cDNA-Bank** (Schauwecker *et al.*, 1995)

cDNA-Bank des Stammes FBD11 (*a1a2 b1b2*) nach Wachstum auf aktivkohlehaltigem Vollmedium. Erstellt mit dem cDNA Bank-Kit von Amersham.

**Freireplizierende cDNA-Bank** (G. Weinzierl, pers. Mitteilung)

Freireplizierende cDNA-Bank einer Kreuzung der Stämme FB1 (*a1 b1*) und FB2 (*a2 b2*) nach Wachstum auf aktivkohlehaltigem Vollmedium (für 12, 24 und 48 Stunden). Erstellt in Anlehnung an den cDNA Library Kit von Clontech.

**pCR-rep1** (G. Weinzierl, pers. Mitteilung)

Enthält ein 429 bp *BamHI/HindIII*-Fragment von *rep1* aus dem Plasmid pSL6,8NdeIrep1, bei dem die überhängenden Enden aufgefüllt bzw. entfernt wurden und das in den mit *SmaI* linearisierten Vektor pCR-Sma eingefügt wurde.

**pCR-dik6** (G. Weinzierl, pers. Mitteilung)

Enthält ein 549 bp *BstBI/AIwNI*-Fragment von *dik6* aus dem Plasmid p6,5kbMluIdik6, bei dem die überhängenden Enden aufgefüllt bzw. entfernt wurden

und das in den mit *SmaI* linearisierten Vektor pCR-Sma eingefügt wurde.

**pCR-Iga2** (G. Weinzierl, pers. Mitteilung)

Enthält ein *BsmBI/HindIII*-Fragment von *Iga2* aus dem Plasmid pUMa2, bei dem die überhängenden Enden aufgefüllt bzw. entfernt wurden und das in den mit *SmaI* linearisierten Vektor pCR-Sma eingefügt wurde.

**pCR-eglI** (G. Weinzierl, pers. Mitteilung)

Enthält ein 522 bp *NcoI/HindIII*-Fragment von *eglI* aus dem Plasmid pGE80, bei dem die überhängenden Enden aufgefüllt bzw. entfernt wurden und das in den mit *SmaI* linearisierten Vektor pCR-Sma eingefügt wurde.

**pELiv64** (Hartmann, 1997)

Enthält ein 1,3 kb cDNA-Fragment von *act1* aus *U. maydis*.

**pCR-ppi** (G. Weinzierl, pers. Mitteilung)

Enthält ein 132 bp *MscI/EcoRI*-Fragment von *ppiI* aus dem Plasmid pdik2cDNAH10, bei dem die überhängenden Enden aufgefüllt bzw. entfernt wurden und das in den mit *SmaI* linearisierten Vektor pCR-Sma eingefügt wurde.

**pSP4,2EcoRV** (Bölker *et al.*, 1992)

Enthält ein 4,2 kb *EcoRV*-Fragment aus dem *aI*-Locus.

**pTZa2XhoI3,5#3** (Bölker *et al.*, 1992)

Enthält ein 3,5 kb *XhoI*-Fragment aus dem *a2*-Locus.

## In dieser Arbeit hergestellte Plasmide

### Hilfskonstrukte

**pSP72ΔSspI**

Entstanden aus pSP72, in dem die *SspI*-Schnittstelle in der TATA-Box des Ampicillin-Resistenzgens durch gerichtete PCR-Mutagenese zerstört wurde. Dabei wurde die Sequenz ATTATT zu ATAATT verändert. Verwendung fanden die Oligonukleotide OAN9, OAN10 und OAN11.

**pUC19ΔSspI**

Ein Derivat von pUC19, in dem die *SspI*-Schnittstelle auf die gleiche Weise wie bei pSP72ΔSspI zerstört

wurde.

**pNEB193-NotI**

Ein Derivat von pNEB193, in dem ein *NotI*-Linker (OAN22) in die *AscI*-Schnittstelle eingefügt wurde. Das Oligonukleotid wurde so gewählt, dass die entstandene *NotI*-Schnittstelle auf beiden Seiten von *AscI*-Schnittstellen flankiert wird.

**pCR-Sma**

Ein Derivat von pCR-Topo, in dem ein *SmaI*-Linker (OAN96) in den mit *EcoRI* geöffneten Vektor eingefügt wurde. Das Oligonukleotid wurde so gewählt, dass die entstandene *SmaI*-Schnittstelle auf beiden Seiten von *EcoRI*-Schnittstellen flankiert wird und Blau/Weiß-Selektion weiterhin möglich ist.

### Plasmide mit Resistenzkassetten

**pSL-Ble(+), pSL-Ble(-)**

Enthält die Phleomycin-Resistenzkassette als 2.407 bp *NotI*-Fragment aus pUTHsp70Not, in unterschiedlicher Orientierung in die *NotI*-Schnittstelle von pSL1180 inseriert. Das *ble*-Gen (aus *Streptoloteichus hindustanus*) wird von dem *hsp70*-Promotor (aus *U. maydis*) und dem *trpC*-Terminator (aus *Aspergillus nidulans*) flankiert.

**pSL-Cbx(+), pSL-Cbx(-)**

Enthält die Carboxin-Resistenzkassette als 1.939 bp *NotI*-Fragment aus *pb<sup>con</sup>*, in unterschiedlicher Orientierung in die *NotI*-Schnittstelle von pSL1180 inseriert. Das *ip'*-Gen wird von seinem eigenen Promotor und Terminator flankiert.

**pSL-Hyg(+), pSL-Hyg(-)**

Enthält die Hygromycin-Resistenzkassette als 2.896 bp *NotI*-Fragment aus pbE1-k-W2, in unterschiedlicher Orientierung in die *NotI*-Schnittstelle von pSL1180 inseriert. Das *hph*-Gen (aus *E. coli*) wird von dem *hsp70*-Promotor und dem *hsp70*-Terminator flankiert (beide aus *U. maydis*).

**pSL-Nat(+), pSL-Nat(-)**

Aus pSLNat wurde die Nourseothricin-Resistenzkassette als 1.455 bp *BamHI/PstI*-Fragment ausgeschnitten und in die entsprechenden Stellen in pBS(+)-SK eingefügt (pBS-Nat). Daraus wurde die Kassette als 1.467 bp *NotI*-Fragment ausgeschnitten und in unterschiedlicher Orientierung in die *NotI*-

Schnittstelle von pSL1180 inseriert. Das *natI*-Gen (aus *Streptomyces noursei*) wird von dem *gapI*-Promotor (aus *U. maydis*) und dem *cyclI*-Terminator (aus *S. cerevisiae*) flankiert.

**pNEB-Ble(+), pNEB-Ble(-)**

Enthält die Phleomycin-Resistenzkassette als 2.407 bp *NotI*-Fragment aus pSL-Ble(+), in unterschiedlicher Orientierung in die *NotI*-Schnittstelle von pNEB193-*NotI* inseriert.

**pNEB-Cbx(+), pNEB-Cbx(-)**

Enthält die Carboxin-Resistenzkassette als 1.939 bp *NotI*-Fragment aus pSL-Cbx(+), in unterschiedlicher Orientierung in die *NotI*-Schnittstelle von pNEB193-*NotI* inseriert.

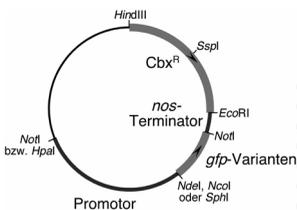
**pNEB-Hyg(+), pNEB-Hyg(-)**

Enthält die Hygromycin-Resistenzkassette als 2.896 bp *NotI*-Fragment aus pSL-Hyg(+), in unterschiedlicher Orientierung in die *NotI*-Schnittstelle von pNEB193-*NotI* inseriert.

**pNEB-Nat(+), pNEB-Nat(-)**

Enthält die Nourseothricin-Resistenzkassette als 1.467 bp *NotI*-Fragment, aus pSL-Nat(+) in unterschiedlicher Orientierung in die *NotI*-Schnittstelle von pNEB193-*NotI* inseriert.

**Plasmide zur Integration in den ip-Locus**



**Abbildung 36: Schematische Darstellung der Plasmide zur Integration in den ip-Locus**

**pRU1**

Die Herstellung dieses Vektors lief über einige Zwischenkonstrukte: Die Carboxin-Resistenzkassette aus pCBX122 wurde als 1.871 bp *Eco47III/SmaI*-Fragment in pBS(+)*SK*, der mit *EcoRV* linearisiert worden war, zwischenkloniert, und aus diesem Plasmid

als 1.889 bp *Clal/EcoRI*-Fragment herausgeschnitten und in den mit *NdeI* und *EcoRI* linearisierten Vektor pSP72Δ*SspI* inseriert, wobei die überhängenden Enden der *Clal*- und der *NdeI*-Schnittstelle aufgefüllt wurden (ergab pSP-*EcoRI*-Cbx-(-)-*HindIII*, in dem die Carboxin-Resistenzkassette in Richtung von der *EcoRI* zur *HindIII*-Schnittstelle läuft, und pSP-*EcoRI*-Cbx(-)-*HindIII* mit gegenläufiger Resistenzkassette; für die weiteren Schritte wurde der erstere Klon verwendet).

Der *nos*-Terminator wurde als 293 bp *NotI/EcoRI*-Fragment aus HBT-SGFP-TYG-*nos* in die entsprechenden Stellen in pBS(+)*SK* integriert und anschließend die *PstI*-Schnittstelle im Terminator durch Linearisierung, Entfernung der überhängenden Enden und Religation deletiert (ergab p*NotI*-*noterm*Δ*PstI*-*EcoRI*).

Für den *narI*-Promotor wurde zunächst im bereits vorhandenen Konstrukt pBS-*narI*p der Promotor durch Einfügen eines 1.120 bp *NheI/MscI*-Fragments aus dem Cosmid 2B5 in den mit *NheI* und *EcoRV* linearisierten Vektor in Richtung 5' verlängert. Damit war der *narI*-Promotor insgesamt 1.548 bp lang. Aus diesem Konstrukt wurde der *narI*-Promotor als 1.401 bp *AgeI/NotI*-Fragment ausgeschnitten, wobei das überhängende *AgeI*-Ende aufgefüllt wurde, und in den mit *Eco47III* und *NotI* geöffneten Vektor pSL1180 eingefügt (ergab pSL1,4k*bnarI*p mit 1.377 bp *narI*-Promotor).

pSL1,4k*bnarI*p wurde anschließend mit *MluI* und *NotI* geöffnet, wobei das überhängende *MluI*-Ende aufgefüllt wurde, und der *nos*-Terminator aus p*NotI*-*noterm*Δ*PstI*-*EcoRI* als 295 bp *EcoRV/NotI*-Fragment eingefügt. Aus diesem Konstrukt wurden der *narI*-Promotor und der *nos*-Terminator zusammen als 1.702 bp *EcoRI/EcoRV*-Fragment ausgeschnitten und in den mit den gleichen Enzymen geöffneten Vektor pSP-*EcoRI*-Cbx-(-)-*HindIII* eingefügt, wodurch pRUpro(-) entstand (durch Einfügen dieses Fragments in pSP-*EcoRI*-Cbx(-)-*HindIII* entstand pRUpro(+)) mit gegenläufiger Carboxin-Resistenzkassette).

Das *sgfp*-Gen wurde aus dem Vektor HBT-SFGP-TYG-*nos* mittels PCR amplifiziert, wobei durch Verwendung des Oligonukleotids OAN7 eine *NdeI*-Schnittstelle am Translations-Startpunkt erzeugt wurde. Es wurde anschließend als 726 bp *NdeI/NotI*-Fragment in den mit den gleichen Enzymen geöffneten Vektor pRUpro(-) eingefügt, wodurch pRUpro(-)*sgfp* entstand (durch Einfügen dieses Fragments

in pRUpro(+) entstand pRUpro(+)-sgfp mit gegenläufiger Carboxin-Resistenzkassette).

pRUpro(-)-sgfp wurde durch Restriktion mit *EcoRV* und *SphI* geöffnet und ein 932 bp *StuI/SphI narI*-Promotorfragment aus dem Cosmid 2B5 eingefügt, so dass der *narI*-Promotor insgesamt 2.262 bp lang war (ergab pRUpro(-)-lang).

Abschließend wurde pRUpro(-)-lang mit *HpaI* geöffnet und ein *NotI*-Linker (NEB) eingeführt. Das daraus entstandene Plasmid pRU1 enthält ein pSP72-Rückgrat mit zerstörter *SspI*-Schnittstelle als 2.258 bp *HindIII/NotI*-Fragment, den (nicht funktionellen) *narI*-Promotor als 2.317 bp *NotI/NdeI*-Fragment, das *sgfp*-Gen als 726 bp *NdeI/NotI*-Fragment, den *nos*-Terminator als 287 bp *NotI/EcoRI*-Fragment und die Carboxin-Resistenzkassette als 1.884 bp *EcoRI/HindIII*-Fragment.

#### pRU2

Für dieses Konstrukt wurde durch PCR-Amplifikation mit OAN32 und MB55 ausgehend von pRU1 ein *narI*-Promotorfragment erzeugt, bei dem sich die *NdeI*-Schnittstelle am richtigen Translations-Startpunkt von *narI* befindet. Dieses Amplifikat wurde mit *NdeI* und *NheI* geschnitten und das 217 bp Fragment in die entsprechenden Stellen in pRU1 eingefügt. Das *narI*-Promotorfragment ist damit 2.054 bp lang (bis zur *StuI*-Schnittstelle).

#### pRU3

Entstanden durch Austausch des 425 bp *NheI/NdeI narI*-Promotorfragments in pRUpro(-)-sgfp durch das entsprechende Fragment aus pRU2. Das *narI*-Promotorfragment ist damit 1.169 bp lang (bis zur *AgeI*-Schnittstelle).

#### pRU4

Entstanden aus pRU3 durch Deletion des 189 bp *EcoRV/Eco47III*-Fragments. Das *narI*-Promotorfragment ist damit 986 bp lang (bis zur *Eco47III*-Schnittstelle).

#### pRU5

Entstanden aus pRU3 durch Deletion des 550 bp *EcoRV/StuI*-Fragments. Das *narI*-Promotorfragment ist damit 625 bp lang (bis zur *StuI*-Schnittstelle).

#### pRU6

Entstanden aus pRU3 durch Deletion des 581 bp *EcoRV/PvuII*-Fragments. Das *narI*-Promotorfrag-

ment ist damit 594 bp lang (bis zur *PvuII*-Schnittstelle).

#### pRU7

Entstanden aus pRU3 durch Deletion des 712 bp *EcoRV/BstXI*-Fragments. Dabei wurde das überhängende *BstXI*-Ende entfernt. Das *narI*-Promotorfragment ist damit 463 bp lang (bis zur *BstXI*-Schnittstelle).

#### pRU11

Für dieses Konstrukt wurde zunächst der *crglI*-Promotor als 3,5 kb *Ec oRI/HindIII*-Fragment aus pCRGFP2 in die entsprechenden Stellen von pBS(+)-SK eingefügt. Anschließend wurde in diesem Vektor eine interne *NdeI*-Schnittstelle im Promotor durch Linearisierung mit *NdeI*, Auffüllen der überhängenden Enden und Religation entfernt und mittels gerichteter PCR-Mutagenese (mit den Oligonukleotiden OAN1 und OAN2) an der Translations-Startstelle eine *NdeI*-Schnittstelle eingeführt (ergab pBS<sub>crglI</sub>-*NdeI*). Aus diesem Konstrukt wurde der *crglI*-Promotor als 3.522 bp *BamHI/NdeI*-Fragment ausgeschnitten und in den mit *EcoNI* und *NdeI* geöffneten Vektor pRU2 inseriert, wobei die überhängenden *BamHI*- und *EcoNI*-Schnittstellen aufgefüllt worden waren.

#### pRU12

Aus pBS<sub>crglI</sub>-*NdeI* wurde der *crglI*-Promotor als 1.413 bp *XhoI/NdeI*-Fragment ausgeschnitten und in den mit *EcoNI* und *NdeI* geöffneten Vektor pRU2 inseriert, wobei die überhängenden *XhoI*- und *EcoNI*-Schnittstellen aufgefüllt worden waren.

#### pRU13

Aus pBS<sub>crglI</sub>-*NdeI* wurde der *crglI*-Promotor als 1.347 bp *PstI/NdeI*-Fragment ausgeschnitten und in den mit *EcoNI* und *NdeI* geöffneten Vektor pRU2 inseriert, wobei die überhängenden *PstI*- und *EcoNI*-Schnittstellen entfernt bzw. aufgefüllt worden waren.

#### pCU1

Entstanden aus pRU2, in dem das *NotI/NdeI narI*-Promotorfragment durch das 1.210 bp *NotI/NdeI hsp70*-Promotorfragment aus pb<sup>com</sup> ersetzt wurde.

#### pCU2

Der *sc*-Promotor wurde als 496 bp *NotI/NdeI* Fragment in die entsprechenden Stellen in pSL1180 zwi-

schenkloniert, dort als *FspI/NdeI*-Fragment ausgeschnitten und in den mit *HpaI* und *NdeI* geöffneten Vektor pRU4 eingesetzt. Dieser Umweg war notwendig geworden, da eine direkte Klonierung als *NotI/NdeI*-Fragment in pRU2 zu Rekombinationen im Plasmid geführt hatte (was evtl. durch das Auftreten repetitiver Sequenzen im *sc*-Promotor begründet ist).

#### pCU3

Entstanden aus pRU2, in dem das *NotI/NdeI narI*-Promotorfragment durch das 277 bp *NotI/NdeI tef*-Promotorfragment aus pb<sup>com</sup> ersetzt wurde.

#### pCU4

Der *o2tef*-Promotor wurde als 873 bp *KpnI/SmaI*-Fragment aus pOTEF-SG ausgeschnitten und in den mit *SmaI* linearisierten Vektor pRUpro(-) inseriert, wobei die überhängenden *KpnI*-Enden entfernt wurden. Aus diesem Konstrukt konnte der *o2tef*-Promotor als 903 bp *NotI/NdeI*-Fragment ausgeschnitten und an Stelle des *narI*-Promotors in den mit *NorI* (Partialverdau) und *NdeI* geöffneten Vektor pRU2 eingefügt werden.

#### pCU7 (G. Loubradou, pers. Mitteilung)

Entstanden aus pCU4, in dem durch Verdau mit *SacI* und Religation ein 306 bp Fragment mit sieben Tetracyclin-Operatorsequenzen entfernt wurde. Der so gewonnene *o1tef*-Promotor mit 7 statt 14 Operatorsequenzen kann als 597 bp *NotI/NdeI*-Fragment ausgeschnitten werden.

#### pRU4wt

Entstanden aus pRU4, in dem durch gerichtete PCR-Mutagenese mit den Oligonukleotiden OAN66, OAN61 und OAN81 die Wildtyp *narI*-Sequenz am Translations-Startpunkt erzeugt wurde.

#### pRU4Nco

Entstanden aus pRU4, in dem durch gerichtete PCR-Mutagenese mit den Oligonukleotiden OAN63, OAN61 und OAN81 eine *NcoI*-Schnittstelle am Translations-Startpunkt erzeugt wurde.

#### pRU4Sph

Entstanden aus pRU4, in dem durch gerichtete PCR-Mutagenese mit den Oligonukleotiden OAN64, OAN61 und OAN81 eine *SphI*-Schnittstelle am Translations-Startpunkt erzeugt wurde.

#### pRU4efgp

Entstanden durch Austausch des *sgfp*-Gens in pRU4Nco durch das *egfp*-Gen, das als 726 bp *NcoI/NotI*-Fragment aus pEGFP ausgeschnitten wurde.

#### pRU4egfp-d1

Entstanden durch Austausch des *sgfp*-Gens in pRU4Nco durch das *egfp-d1*-Allel aus pd1EGFP-N1. Da das *egfp-d1*-Allel eine interne *NcoI*-Schnittstelle besitzt, wurde zunächst ein 125 bp *NcoI/NotI* 3'-Fragment aus pd1EGFP-N1 in pRU4Nco eingebracht und in einem zweiten Schritt das 727 bp *NcoI* 5'-Fragment eingefügt.

#### pRU4egfp-d2

Entstanden durch Austausch des *sgfp*-Gens in pRU4Nco durch das *egfp-d2*-Allel aus pd2EGFP-1. Da das *egfp-d2*-Allel eine interne *NcoI*-Schnittstelle besitzt, wurde zunächst ein 125 bp *NcoI/NotI* 3'-Fragment aus pd2EGFP-1 in pRU4Nco eingebracht und in einem zweiten Schritt das 727 bp *NcoI* 5'-Fragment eingefügt.

#### pCU4egfp

Das *sgfp*-Gen in pCU4 wurde mit einem 732 bp *SmaI/NotI*-Fragment aus pOTEF-SG ausgetauscht, welches das *egfp*-Gen enthält.

#### pCU4cgfp

Das *egfp*-Gen in pCU4egfp wurde mit einem 726 bp *NcoI/NotI*-Fragment aus pCGFP ausgetauscht, welches das *cgfp*-Gen enthält.

#### pCU4ygf

Das *egfp*-Gen in pCU4egfp wurde mit einem 726 bp *NcoI/NotI*-Fragment aus pYGFp ausgetauscht, welches das *ygf*-Gen enthält.

#### pRU4kon8

Enthält *kon8* unter Kontrolle des *narI*-Promotors. Für die Herstellung dieses Vektors mussten Zwischenschritte durchgeführt werden, da das *kon8*-Allel zwei interne *NdeI*-Schnittstellen besitzt. Zunächst wurde ein 98 bp *Bst1107I/NdeI kon8*-3'-Fragment aus pKon8 in den mit *NorI* und *NdeI* geöffneten Vektor pRU4 eingefügt, wobei die überhängenden *NorI*-Enden aufgefüllt wurden. Dieses Konstrukt wurde mit *PflMI* und *NdeI* geschnitten und in einer Drei-Frag-

ment-Ligation ein 168 bp *NdeI/XhoI*- und ein 1.086 bp *XhoI/PfI*M1-Fragment aus pKon8 eingefügt.

#### **pRU12kon8**

Enthält kon8 unter Kontrolle des *crg1*-Promotors. Hergestellt durch Drei-Fragment-Ligation aus einem 5.610 bp *NdeI/EcoRI*-Fragment aus pRU12 und einem 168 bp *NdeI/XhoI*- und einem 1.399 bp *XhoI/EcoRI*-Fragment aus pRU4kon8.

#### **pPo2tef:fuz7CA**

Ein Derivat von pCU4, welches das (inaktive) *fuz7CA*-Allel als 1.313 bp *NdeI/NotI*-Fragment unter Kontrolle des *o2tef*-Promotors trägt. Dazu wurden in einer Vier-Fragment-Ligation folgende Stücke miteinander verbunden: ein 798 bp *NdeI/KpnI* PCR-Produkt, das den 5'-Bereich von *fuz7* umfasst, wobei am Translations-Startpunkt eine *NdeI*-Schnittstelle eingeführt und die regulatorische Domäne verändert wurde (von SIADT in DDADD siehe Mansour *et al.*, 1996b), entstanden durch Amplifikation des Bereichs aus pSPfuz7 mit den Oligonukleotiden OAN164 und OAN165 und nachfolgende Restriktion mit *NdeI* und *KpnI*; ein 515 bp *KpnI/NotI* PCR-Produkt, das den 3'-Bereich von *fuz7* umfasst, wobei hinter dem Stoppkodon eine *NotI*-Schnittstelle eingeführt wurde, entstanden durch Amplifikation des Bereichs aus pSPfuz7 mit den Oligonukleotiden OAN166 und OAN167 und nachfolgende Restriktion mit *KpnI* und *NotI*; ein 287 bp *NotI/EcoRI nos*-Terminator-Fragment aus pCU4; ein 5.045 bp *NdeI/EcoRI*-Fragment aus pCU4, das die Carboxin-Resistenzkassette, das pSP72-Rückgrat und den *o2tef*-Promotor umfasst.

### **Plasmide zur Integration in den b-Locus**

#### **pΔb Ble(+), pΔb Ble(-)**

Konstrukt zur Deletion des *b*-Locus. Entstanden durch Einfügen der 2.407 bp *NotI*-Phleomycin-Resistenzkassette aus pSL-Ble(+) in die *NotI*-Schnittstelle von pSL1180 3'W/3'E (in unterschiedlicher Orientierung).

#### **pbW2-NdeI-bE1**

Enthält ein Intron-freies 1.837 bp *NdeI/PvuII* 5'-Fragment von *bW2* und ein Intron-freies 761 bp *NdeI/PvuII* 5'-Fragment von *bE1*. Entstanden durch Einfügen des 2.598 bp *PvuII*-Fragments aus pE1W2ΔP#1 in den mit *PvuII* linearisierten Vektor pBS(+)/SK.

#### **pbW2-NdeI-bE2**

Enthält ein Intron-freies 1.837 bp *NdeI/PvuII* 5'-Fragment von *bW2* und ein Intron-freies 761 bp *NdeI/PvuII* 5'-Fragment von *bE2*. Entstanden durch Austausch des 674 bp *NdeI/XbaI* 5'-Fragments von *bE1* in pbW2-NdeI-bE1 durch ein genauso großes *NdeI/XbaI* 5'-Fragment von *bE2* aus pJBbE2.

#### **pbW1-NdeI-bE1**

Enthält ein Intron-freies 1.837 bp *NdeI/PvuII* 5'-Fragment von *bW1* und ein Intron-freies 761 bp *NdeI/PvuII* 5'-Fragment von *bE1*. Entstanden durch Austausch des 1.427 bp *NdeI/BspEI* 5'-Fragments von *bW2* in pbW2-NdeI-bE1 durch ein genauso großes *NdeI/BspEI* 5'-Fragment von *bW1* aus pW1<sub>631</sub>-GA.

#### **pPnar:bW2,bE1 Ble(+)(=pAB33),**

#### **pPnar:bW2,bE1 Ble(-)**

Transformations-Konstrukte, durch die im *b*-Locus ein *bW2*- und ein *bE1*-Gen unter Kontrolle des *nar1*-Promotors gebracht werden können. Enthalten die 5'-Enden von *bW2* und *bE1* mit einer dazwischen liegenden Promotorkassette aus zwei divergenten *nar1*-Promotoren, die durch eine Phleomycin-Resistenzkassette in unterschiedlicher Orientierung getrennt sind. Entstanden durch Ligation der 2.109 bp *NotI/NdeI nar1*-Promotorfragmente aus pRU2 und der 2.407 bp *NotI* Phleomycin-Resistenzkassette aus pSL-Ble(+) in den mit *NdeI* linearisierten Vektor pbW2-NdeI-bE1.

#### **pPnar:bW2,bE2 Ble(+)(=pAB34),**

#### **pPnar:bW2,bE2 Ble(-)**

Transformations-Konstrukte, durch die im *b*-Locus ein *bW2*- und ein *bE2*-Gen unter Kontrolle des *nar1*-Promotors gebracht werden können. Enthalten die 5'-Enden von *bW2* und *bE2* mit einer dazwischen liegenden Promotorkassette aus zwei divergenten *nar1*-Promotoren, die durch eine Phleomycin-Resistenzkassette in unterschiedlicher Orientierung getrennt sind. Entstanden durch Ligation der 6.625 bp *NdeI nar1/Ble*-Promotorkassette aus pPnar:bW2,bE1 Ble(+) in den mit *NdeI* linearisierten Vektor pbW2-NdeI-bE2.

#### **pPcrg:bW2,bE1 Ble(+)(=pAB31),**

#### **pPcrg:bW2,bE1 Ble(-)**

Transformations-Konstrukte, durch die im *b*-Locus ein *bW2*- und ein *bE1*-Gen unter Kontrolle des *crg1*-Promotors gebracht werden können. Enthalten die

5'-Enden von *bW2* und *bE1* mit einer dazwischen liegenden Promotorkassette aus zwei divergenten *crG1*-Promotoren, die durch eine Phleomycin-Resistenzkassette in unterschiedlicher Orientierung getrennt sind. Entstanden durch Ligation der 1.468 bp *NotI/NdeI crG1*-Promotorfragmente aus pRU12 und der 2.407 bp *NotI* Phleomycin-Resistenzkassette aus pSL-Ble(+) in den mit *NdeI* linearisierten Vektor pbW2-NdeI-bE1.

**pPcrg:bW2,bE2 Ble(+)** (=pAB32),

**pPcrg:bW2,bE2 Ble(-)**

Transformations-Konstrukte, durch die im *b*-Locus ein *bW2*- und ein *bE2*-Gen unter Kontrolle des *crG1*-Promotors gebracht werden können. Enthalten die 5'-Enden von *bW2* und *bE2* mit einer dazwischen liegenden Promotorkassette aus zwei divergenten *crG1*-Promotoren, die durch eine Phleomycin-Resistenzkassette in unterschiedlicher Orientierung getrennt sind. Entstanden durch Ligation der 5.343 bp *NdeI crG1/Ble*-Promotorkassette aus pPcrg:bW2,bE1 Ble(+) in den mit *NdeI* linearisierten Vektor pbW2-NdeI-bE2.

**pPo2tef:bW2,bE1 Ble(+)**,

**pPo2tef:bW2,bE1 Ble(-)**

Transformations-Konstrukte, durch die im *b*-Locus ein *bW2*- und ein *bE1*-Gen unter Kontrolle des *o2tef*-Promotors gebracht werden können. Enthalten die 5'-Enden von *bW2* und *bE1* mit einer dazwischen liegenden Promotorkassette aus zwei divergenten *o2tef*-Promotoren, die durch eine Phleomycin-Resistenzkassette in unterschiedlicher Orientierung getrennt sind. Entstanden durch Ligation der 903 bp *NotI/NdeI o2tef*-Promotorfragmente aus pCU4 und der 2.407 bp *NotI* Phleomycin-Resistenzkassette aus pSL-Ble(+) in den mit *NdeI* linearisierten Vektor pbW2-NdeI-bE1. Die Transformation in *U. maydis* hat trotz mehrmaliger Versuche bislang nicht funktioniert; eventuell ist die Expression einer entsprechend großen Menge an bW/bE-Heterodimer letal.

**pPo2tef:bW2,bE2 Ble(+)**,

**pPo2tef:bW2,bE2 Ble(-)**

Transformations-Konstrukte, durch die im *b*-Locus ein *bW2*- und ein *bE2*-Gen unter Kontrolle des *o2tef*-Promotors gebracht werden können. Enthalten die 5'-Enden von *bW2* und *bE2* mit einer dazwischen liegenden Promotorkassette aus zwei divergenten *o2tef*-Promotoren, die durch eine Phleomycin-Resistenz-

kassette in unterschiedlicher Orientierung getrennt sind. Entstanden durch Ligation der 4.213 bp *NdeI o2tef/Ble*-Promotorkassette aus pPo2tef:bW2,bE1 Ble(+) in den mit *NdeI* linearisierten Vektor pbW2-NdeI-bE2.

**pPo2tef:bW1,bE1 Ble(+)**,

**pPo2tef:bW1,bE1 Ble(-)**

Transformations-Konstrukte, durch die im *b*-Locus ein *bW1*- und ein *bE1*-Gen unter Kontrolle des *o2tef*-Promotors gebracht werden können. Enthalten die 5'-Enden von *bW1* und *bE1* mit einer dazwischen liegenden Promotorkassette aus zwei divergenten *o2tef*-Promotoren, die durch eine Phleomycin-Resistenzkassette in unterschiedlicher Orientierung getrennt sind. Entstanden durch Ligation der 4.213 bp *NdeI o2tef/Ble*-Promotorkassette aus pPo2tef:bW2,bE1 Ble(+) in den mit *NdeI* linearisierten Vektor pbW1-NdeI-bE1.

**pPo2tef:bW2,bE1 Cbx(+)**,

**pPo2tef:bW2,bE1 Cbx(-)**

Transformations-Konstrukte, durch die im *b*-Locus ein *bW2*- und ein *bE1*-Gen unter Kontrolle des *o2tef*-Promotors gebracht werden können. Enthalten die 5'-Enden von *bW2* und *bE1* mit einer dazwischen liegenden Promotorkassette aus zwei divergenten *o2tef*-Promotoren, die durch eine Carboxin-Resistenzkassette in unterschiedlicher Orientierung getrennt sind. Entstanden durch Austausch der 2.407 bp *NotI* Phleomycin-Resistenzkassette in pPo2tef:bW2,bE1 Ble(+) mit der 1.939 bp *NotI* Carboxin-Resistenzkassette aus pSL-Cbx(+).

**pPo2tef:bW2,bE1 Hyg(+)**,

**pPo2tef:bW2,bE1 Hyg(-)**

Transformations-Konstrukte, durch die im *b*-Locus ein *bW2*- und ein *bE1*-Gen unter Kontrolle des *o2tef*-Promotors gebracht werden können. Enthalten die 5'-Enden von *bW2* und *bE1* mit einer dazwischen liegenden Promotorkassette aus zwei divergenten *o2tef*-Promotoren, die durch eine Hygromycin-Resistenzkassette in unterschiedlicher Orientierung getrennt sind. Entstanden durch Austausch der 2.407 bp *NotI* Phleomycin-Resistenzkassette in pPo2tef:bW2,bE1 Ble(+) mit der 2.896 bp *NotI* Hygromycin-Resistenzkassette aus pSL-Hyg(+).

**pPo2tef:bW2,bE1 Nat(+),****pPo2tef:bW2,bE1 Nat(-)**

Transformations-Konstrukte, durch die im *b*-Locus ein *bW2*- und ein *bE1*-Gen unter Kontrolle des *o2tef*-Promotors gebracht werden können. Enthalten die 5'-Enden von *bW2* und *bE1* mit einer dazwischen liegenden Promotorkassette aus zwei divergenten *o2tef*-Promotoren, die durch eine Nourseothricin-Resistenzkassette in unterschiedlicher Orientierung getrennt sind. Entstanden durch Austausch der 2.407 bp *NorI* Phleomycin-Resistenzkassette in pPo2tef:bW2,bE1 Ble(+) mit der 1.467 bp *NorI* Nourseothricin-Resistenzkassette aus pSL-Nat(+).

**Plasmide zur Integration in den *a*-Locus****pSL-a2**

Enthält einen 2.539 bp Bereich aus dem *a2*-Locus, der die Region von *pra2* bis *lga2* umfasst. Entstanden durch Einfügen eines 2.539 bp *NcoI/XhoI*-Fragments aus pTZ6,5kbH in die entsprechenden Stellen von pSL1180.

**ppra2-NdeI-mfa1**

Ein Derivat von pSL-a2, wobei am Translations-Startpunkt von *pra2* eine *NdeI*-Schnittstelle eingeführt wurde und daran anschließend divergent ein *mfa1*-Gen mit seinem eigenen Terminator. Dazu wurden in einer Vier-Fragment-Ligation folgende Stücke miteinander verbunden: ein 255 bp *NdeI/PstI* PCR-Produkt, das den 5'-Bereich von *pra2* umfasst, wobei am Translations-Startpunkt eine *NdeI*-Schnittstelle eingeführt wurde, entstanden durch Amplifikation des Bereichs aus pSL-a2 mit den Oligonukleotiden OAN172 und OAN173 und nachfolgende Restriktion mit *NdeI* und *PstI*; ein 602 bp *NdeI/EcoRI* PCR-Produkt, das *mfa1* mit Terminator umfasst, wobei am Translations-Startpunkt eine *NdeI*-Schnittstelle eingeführt wurde, entstanden durch Amplifikation des Bereichs aus pUMa1 mit den Oligonukleotiden OAN174 und OAN175 und nachfolgende Restriktion mit *NdeI* und *EcoRI*; ein 768 bp *ApoI/BspEI* *lga2*-Terminatorfragment aus pSL-a2; ein 4.330 bp *PstI/BspEI*-Fragment aus pSL-a2, das den 3'-Bereich von *pra2*, das pSL1180-Rückgrat und das *lga2*-Gen umfasst.

**ppra2-NdeI-mfa2**

Ein Derivat von pSL-a2, wobei am Translations-Startpunkt von *pra2* eine *NdeI*-Schnittstelle eingeführt wurde und daran anschließend divergent ein

*mfa2*-Gen mit seinem eigenen Terminator. Dazu wurden in einer Vier-Fragment-Ligation folgende Stücke miteinander verbunden: ein 255 bp *NdeI/PstI* PCR-Produkt, das den 5'-Bereich von *pra2* umfasst, wobei am Translations-Startpunkt eine *NdeI*-Schnittstelle eingeführt wurde, entstanden durch Amplifikation des Bereichs aus pSL-a2 mit den Oligonukleotiden OAN172 und OAN173 und nachfolgende Restriktion mit *NdeI* und *PstI*; ein 329 bp *NdeI/EcoRI* PCR-Produkt, das *mfa2* mit Terminator umfasst, wobei am Translations-Startpunkt eine *NdeI*-Schnittstelle eingeführt wurde, entstanden durch Amplifikation des Bereichs aus pUMa2 mit den Oligonukleotiden OAN176 und OAN177 und nachfolgende Restriktion mit *NdeI* und *EcoRI*; ein 768 bp *ApoI/BspEI* *lga2*-Terminatorfragment aus pSL-a2; ein 4.330 bp *PstI/BspEI*-Fragment aus pSL-a2, das den 3'-Bereich von *pra2*, das pSL1180-Rückgrat und das *lga2*-Gen umfasst.

**pPnar:pra2,mfa1 Ble(+),****pPnar:pra2,mfa1 Ble(-)**

Transformations-Konstrukte, durch die im *a2*-Locus das *pra2*- und ein *mfa1*-Gen unter Kontrolle des *nar1*-Promotors gebracht werden können. Enthalten *pra2* und *mfa1* mit einer dazwischen liegenden Promotorkassette aus zwei divergenten *nar1*-Promotoren, die durch eine Phleomycin-Resistenzkassette in unterschiedlicher Orientierung getrennt sind. Anschließend daran befindet sich das *lga2*-Gen. Entstanden durch Einsetzen der 6.625 bp *NdeI nar1*/Ble-Promotorkassette aus pPnar:bW2,bE1 Ble(+) in den mit *NdeI* linearisierten Vektor ppra2-NdeI-mfa1.

**pPnar:pra2,mfa2 Ble(+),****pPnar:pra2,mfa2 Ble(-)**

Transformations-Konstrukte, durch die im *a2*-Locus das *pra2*- und ein *mfa2*-Gen unter Kontrolle des *nar1*-Promotors gebracht werden können. Enthalten *pra2* und *mfa2* mit einer dazwischen liegenden Promotorkassette aus zwei divergenten *nar1*-Promotoren, die durch eine Phleomycin-Resistenzkassette in unterschiedlicher Orientierung getrennt sind. Anschließend daran befindet sich das *lga2*-Gen. Entstanden durch Einsetzen der 6.625 bp *NdeI nar1*/Ble-Promotorkassette aus pPnar:bW2,bE1 Ble(+) in den mit *NdeI* linearisierten Vektor ppra2-NdeI-mfa2.

**pPcrg:pra2,mfa1 Ble(+),**

**pPcrg:pra2,mfa1 Ble(-)**

Transformations-Konstrukte, durch die im *a2*-Locus das *pra2*- und ein *mfa1*-Gen unter Kontrolle des *crg1*-Promotors gebracht werden können. Enthalten *pra2* und *mfa1* mit einer dazwischen liegenden Promotorkassette aus zwei divergenten *crg1*-Promotoren, die durch eine Phleomycin-Resistenzkassette in unterschiedlicher Orientierung getrennt sind. Anschließend daran befindet sich das *lga2*-Gen. Entstanden durch Einsetzen der 5.343 bp *NdeI* *crg1*/Ble-Promotorkassette aus pPcrg:bW2,bE1 Ble(+) in den mit *NdeI* linearisierten Vektor ppra2-NdeI-mfa1.

**pPcrg:pra2,mfa2 Ble(+),**

**pPcrg:pra2,mfa2 Ble(-)**

Transformations-Konstrukte, durch die im *a2*-Locus das *pra2*- und ein *mfa2*-Gen unter Kontrolle des *crg1*-Promotors gebracht werden können. Enthalten *pra2* und *mfa2* mit einer dazwischen liegenden Promotorkassette aus zwei divergenten *crg1*-Promotoren, die durch eine Phleomycin-Resistenzkassette in unterschiedlicher Orientierung getrennt sind. Anschließend daran befindet sich das *lga2*-Gen. Entstanden durch Einsetzen der 5.343 bp *NdeI* *crg1*/Ble-Promotorkassette aus pPcrg:bW2,bE1 Ble(+) in den mit *NdeI* linearisierten Vektor ppra2-NdeI-mfa2.

**pa2con Cbx(+), pa2con Cbx(-)**

Transformations-Konstrukte, durch die im *a2*-Locus das *pra2*- und ein *mfa2*-Gen unter Kontrolle des *o2tef*-Promotors gebracht werden können. Enthalten *pra2* und *mfa2* mit einer dazwischen liegenden Promotorkassette aus zwei divergenten *o2tef*-Promotoren, die durch eine Carboxin-Resistenzkassette in unterschiedlicher Orientierung getrennt sind. Anschließend daran befindet sich das *lga2*-Gen. Entstanden durch Einsetzen der 3.747 bp *NdeI* *o2tef* Cbx-Promotorkassette aus pPo2tef:bW2,bE2 Cbx(+) in den mit *NdeI* linearisierten Vektor ppra2-NdeI-mfa2.

**pa2con Ble(+), pa2con Ble(-)**

Transformations-Konstrukte, durch die im *a2*-Locus das *pra2*- und ein *mfa2*-Gen unter Kontrolle des *o2tef*-Promotors gebracht werden können. Enthalten *pra2* und *mfa2* mit einer dazwischen liegenden Promotorkassette aus zwei divergenten *o2tef*-Promotoren, die durch eine Phleomycin-Resistenzkassette in unterschiedlicher Orientierung getrennt sind. An-

schließend daran befindet sich das *lga2*-Gen. Entstanden durch Einsetzen der 4.215 bp *NdeI* *o2tef*/Ble-Promotorkassette aus pPo2tef:bW2,bE2 Ble(+) in den mit *NdeI* linearisierten Vektor ppra2-NdeI-mfa2.

**palcon Cbx(+), palcon Cbx(-)**

Da der *al*-Locus interne *NdeI*-Schnittstellen besitzt, musste die Herstellung dieser Konstrukte über mehrere Zwischenschritte laufen. Zunächst wurde ein 677 bp *mfa1* PCR-Produkt, entstanden durch Amplifikation aus pUMa1 mit OAN174 und OAN175 (wobei eine *NdeI*-Schnittstelle am Translations-Startpunkt erzeugt wurde) in pCR-Topo kloniert. Dieser Vektor wurde mit *NdeI* und *XhoI* geöffnet und in einer Drei-Fragment-Ligation ein 629 bp *NdeI*/*BstBI*-Fragment aus pTZ-*pra1*, das den 5'-Bereich von *pra1* umfasst, und ein 470 bp *BstBI*/*Sall*-Fragment aus pUMa1, das den 5'-Bereich von *rba1* umfasst, eingefügt (ergab *palpro*). Dieses Konstrukt wurde mit *NdeI* linearisiert und die 3.747 bp *NdeI* *o2tef*/Cbx-Promotorkassette aus pa2con Cbx(+) eingesetzt. Daran anschließend, je nach der Orientierung der Carboxin-Resistenzkassette, die Plasmide *palcon* Cbx(+) und *palcon* Cbx(-). Diese Plasmide wurden mit *BstBI* linearisiert und in einer Drei-Fragment-Ligation ein 1.065 bp *BstBI*/*BspHI*-Fragment aus pUMa1, das den 3'-Bereich von *lga2* umfasst, und ein 481 bp *NcoI*/*BstBI*-Fragment aus pUMa1, das den 3'-Bereich von *rba1* umfasst, eingefügt. Durch diese Transformations-Konstrukte, können im *al*-Locus das *pra1*- und das *mfa1*-Gen unter Kontrolle des *o2tef*-Promotors gebracht werden. Sie enthalten *mfa1* und *pra1* mit einer dazwischen liegenden Promotorkassette aus zwei divergenten *o2tef*-Promotoren, die durch eine Carboxin-Resistenzkassette in unterschiedlicher Orientierung getrennt sind. Anschließend daran befindet sich das *rba1*-Gen.

**palcon Ble(+), palcon Ble(-)**

Transformations-Konstrukte, durch die im *al*-Locus das *pra1*- und das *mfa1*-Gen unter Kontrolle des *o2tef*-Promotors gebracht werden können. Enthalten *mfa1* und *pra1* mit einer dazwischen liegenden Promotorkassette aus zwei divergenten *o2tef*-Promotoren, die durch eine Phleomycin-Resistenzkassette in unterschiedlicher Orientierung getrennt sind. Anschließend daran befindet sich das *rba1*-Gen. Entstanden durch Austausch der 3.747 bp *NdeI* *o2tef* Cbx-Promotorkassette in *palcon* Cbx(+) durch die

4.215 bp *NdeI* o2eff/Ble-Promotorkassette aus pPo2tef:bW2,bE2 Ble(+).

#### pΔmfa2 Hyg

Durch PCR-Amplifikation mit den Oligonukleotiden OAN241 und OAN242, ausgehend von genomischer DNA aus dem Stamm FB2 (*a2 b2*), wurde ein 857 bp Amplifikat aus dem 5'-UTR von *mfa2* erzeugt, das an der Translations-Startstelle eine *SfiI*-Schnittstelle besitzt. Auf die gleiche Weise wurde durch Amplifikation mit OAN243 und OAN244 eine 828 bp 3'-Flanke erzeugt, mit *SfiI*-Schnittstelle hinter dem Stoppkodon von *mfa2*. Diese beiden Fragmente wurden mit *SfiI* geschnitten, mit der 1.884 bp *SfiI* Hygromycin-Resistenzkassette aus pBS-hhn ligiert, und das Ligationsprodukt in pCR-Topo kloniert.

### Plasmide für die Untersuchung von *kpp6*

#### pΔkpp6 Hyg(-)

Für die Herstellung dieses Deletionskonstrukts wurden zunächst zwei Bereiche aus dem *kpp6*-Locus subkloniert. Für die 5'-Flanke war dies ein 3,5 kb *BamHI/NotI*-Fragment aus dem Cosmid 4D9, das in die entsprechenden Stellen in pBS(+)-SK inseriert wurde, aus dem anschließend ein internes *HindIII*-Fragment deletiert wurde (ergab SAN3314). Für die 3'-Flanke wurde ein 7,0 kb *BamHI*-Fragment aus dem Cosmid 6F7, das den gesamten *kpp6*-Locus umfasst, in die *BamHI*-Schnittstelle von pUC19 inseriert (ergab SAN3336). Anschließend wurde SAN3314 mit *BstXI* und *SacI* geöffnet und in einer Vier-Fragment-Ligation drei weitere Fragmente eingefügt: ein 101 bp *BstXI/AscI*-Fragment, das durch Amplifikation des 5'-UTR von *kpp6* aus SAN3336 mit den Oligonukleotiden OAN157 und REV24 und anschließende Restriktion mit *BstXI* und *AscI* entstanden ist (dabei entstand eine *AscI*-Schnittstelle am zunächst angenommenen Translations-Startpunkt von *kpp6*); ein 171 bp *AscI/HindIII*-Fragment, das durch Amplifikation des 3'-UTR von *kpp6* aus SAN3336 mit den Oligonukleotiden OAN158 und OAN146 und anschließende Restriktion mit *AscI* und *HindIII* entstanden ist (dabei entstand eine *AscI*-Schnittstelle am Stoppkodon von *kpp6*); ein 491 bp *HindIII/SacI*-Fragment aus SAN3336, das den daran anschließenden 3'-UTR von *kpp6* umfasst. Dieses Konstrukt wurde mit *AscI* linearisiert und die 2.912 bp *AscI* Hygromycin-Resistenzkassette aus pNEB-Hyg(+) in Minus-Orientierung inseriert. Das Deletionskonstrukt

enthält eine 909 bp *HindIII/AscI* 5'-Flanke und eine 662 bp *AscI/SacI* 3'-Flanke; bei homologer Rekombination in *U. maydis* wird der gesamte ORF von *kpp6* und zusätzlich 81 bp des *kpp6*-Promotors deletiert.

#### pΔkpp6 Ble(-)

Entstanden aus pΔkpp6 Hyg(+) durch Austausch der 2.912 bp *AscI* Hygromycin-Resistenzkassette mit der 2.423 bp *AscI* Phleomycin-Resistenzkassette aus pNEB-Ble(+) in Minus-Orientierung.

#### pkpp6wt

Zur Herstellung dieses Vektors wurde pRU4 mit *EcoRI* und *HpaI* geöffnet und in einer Drei-Fragment-Ligation ein 4.201 bp *StuI/NdeI*- und ein 185 bp *NdeI/EcoRI*-Fragment aus SAN3336 inseriert. Das entstandene Plasmid enthält 2.371 bp *kpp6*-Promotor, das gesamte *kpp6*-Gen, 435 bp des 3'-UTR von *kpp6* und daran anschließend eine Carboxin-Resistenzkassette zur Integration in den *ip*-Locus.

#### pkpp6N

Zur Herstellung dieses Konstrukts wurde pkpp6wt mit *SphI* und *EagI* geöffnet und in einer Drei-Fragment-Ligation zwei PCR-Amplifikate eingefügt: ein 571 bp *SphI/NcoI*-Fragment, das durch Amplifikation des 5'-UTR von *kpp6* aus SAN3314 mit den Oligonukleotiden OAN197 und REV24 und anschließende Restriktion mit *SphI* und *NcoI* entstanden ist (dabei entstand eine *NcoI*-Schnittstelle am zunächst angenommenen Translations-Startpunkt von *kpp6*), und ein 260 bp *NcoI/EagI*-Fragment, das durch Amplifikation des 5'-Bereichs von *kpp6* aus pkpp6wt mit den Oligonukleotiden OAN196 und OAN121 und anschließende Restriktion mit *NcoI* und *EagI* entstanden ist (dabei entstand ebenfalls eine *NcoI*-Schnittstelle am zunächst angenommenen Translations-Startpunkt von *kpp6*). Das Konstrukt unterscheidet sich von pkpp6wt durch die zusätzliche *NcoI*-Schnittstelle am zunächst angenommenen Translations-Startpunkt von *kpp6*.

#### pkpp6NA

Zur Herstellung dieses Konstrukts wurde pkpp6N mit *KpnI* und *NdeI* geöffnet und in einer Drei-Fragment-Ligation zwei PCR-Amplifikate eingefügt: ein 34 bp *KpnI/AscI*-Fragment, das durch Amplifikation des 3'-Endes von *kpp6* aus pkpp6N mit den Oligonukleotiden OAN201 und OAN185 und anschließende Restriktion mit *KpnI* und *AscI* entstanden ist (dabei ent-

stand eine *AscI*-Schnittstelle hinter dem Stoppkodon von *kpp6*, und ein 250 bp *AscI/NdeI*-Fragment, das durch Amplifikation des 3'-UTRs von *kpp6* aus pkpp6N mit den Oligonukleotiden OAN199 und OAN200 und anschließende Restriktion mit *AscI* und *NdeI* entstanden ist (dabei entstand ebenfalls eine *AscI*-Schnittstelle hinter dem Stoppkodon von *kpp6*). Abschließend wurde das fehlende 480 bp *KpnI*-Fragment aus dem 3'-Bereich von *kpp6* aus pkpp6N ausgeschnitten und in die *KpnI*-Schnittstelle in diesem Konstrukt eingefügt. Dieser Vektor unterscheidet sich von pkpp6N durch die zusätzliche *AscI*-Schnittstelle hinter dem Stoppkodon von *kpp6*.

#### **pkpp6N-term**

Für dieses Konstrukt wurde durch PCR mit den Oligonukleotiden OAN196 und OAN203 aus pkpp6NA und anschließende Restriktion mit *NcoI* und *AscI* ein 619 bp *NcoI/AscI*-Fragment erzeugt, das 81 bp des *kpp6*-Promotors und ein verkürztes *kpp6*-Allel umfasst, das für die Aminosäuren 1 bis 179 kodiert. Anschließend wurde in pkpp6NA das *NcoI/AscI kpp6*-Fragment durch dieses PCR-Amplifikat ausgetauscht.

#### **pkpp6C-term**

Für dieses Konstrukt wurde durch PCR mit den Oligonukleotiden OAN204 und OAN186 aus pkpp6NA und anschließende Restriktion mit *NcoI* und *NarI* ein 94 bp *NcoI/NarI*-Fragment erzeugt, das eine *NcoI*-Schnittstelle und damit eine Translations-Startstelle an Aminosäureposition 170 in *Kpp6* erzeugt. Durch Austausch des 679 bp *NcoI/NarI* 5'-Bereichs von *kpp6* in pkpp6NA mit diesem Fragment entstand ein verkürztes *kpp6*-Allel, das für den C-Terminus ab Aminosäureposition 170 kodiert.

#### **pPkpp6:kpp2**

Entstanden aus pkpp6NA durch Austausch von *kpp6* und *kpp6*-Terminator durch ein 1.364 bp *NcoI/EcoRI*-Fragment aus p123/kpp2, das *kpp2* und den *nos*-Terminator umfasst. Damit ist in diesem Konstrukt *kpp2* unter der Kontrolle des *kpp6*-Promotors.

#### **pkpp6/2**

Entstanden durch Einfügen eines 579 bp *NcoI*-Fragments, das durch PCR-Amplifikation aus pkpp6NA mit den Oligonukleotiden OAN196 und OAN216 und Restriktion mit *NcoI* entstanden ist in die entsprechende Stelle in pPkpp6:kpp2. Dieses Fragment umfasst 81 bp des *kpp6*-Promotors und einen 5'-Bereich

des *kpp6*-Gens, der für die N-terminalen 168 Aminosäuren kodiert. Damit steht in diesem Konstrukt ein Fusionsgen aus dem 5'-Bereich von *kpp6* und dem gesamten *kpp2*-Gen unter der Kontrolle des *kpp6*-Promotors.

#### **pkpp6T355A,Y357F**

Für dieses Konstrukt wurde durch gerichtete PCR-Mutagenese mit den Oligonukleotiden OAN208, OAN204 und OAN201 ein 1.101 bp Fragment des 3'-Bereichs erzeugt, das für ein verändertes *kpp6*-Allel mit Aminosäure-Substitutionen an Position 355 (T wird zu A) und 357 (Y wird zu F) kodiert und außerdem eine zusätzliche interne *EcoRI*-Schnittstelle besitzt. Durch Restriktion mit *NarI* und *AscI* entstand ein 1.001 bp Fragment, das gegen das entsprechende Fragment in pkpp6NA ausgetauscht wurde.

#### **pkpp6K220R**

Für dieses Konstrukt wurde durch gerichtete PCR-Mutagenese mit den Oligonukleotiden OAN207, OAN204 und OAN201 ein 1.101 bp Fragment des 3'-Bereichs erzeugt, das für ein verändertes *kpp6*-Allel mit einer Aminosäure-Substitution an Position 220 (K wird zu R) kodiert und außerdem eine zusätzliche interne *BspEI*-Schnittstelle besitzt. Durch Restriktion mit *NarI* und *AscI* entstand ein 1.001 bp Fragment, das gegen das entsprechende Fragment in pkpp6NA ausgetauscht wurde.

#### **pPo2tef:kpp6NA**

Entstanden durch Austausch des 2.362 bp *NcoI/DraIII*-Fragments in pCU4cgfp, das *cgfp*, den *nos*-Terminator und die Hälfte der Carboxin-Resistenzkassette umfasst, durch ein 3.479 bp *NcoI/DraIII*-Fragment aus pkpp6NA, das 81 bp des *kpp6*-Promotors, das gesamte *kpp6*-Gen, den 435 bp 3'-UTR und ebenfalls die Hälfte der Carboxin-Resistenzkassette umfasst. Damit steht in diesem Konstrukt *kpp6* unter Kontrolle des *o2tef*-Promotors.

#### **pPo2tef:kpp6N-term**

Entstanden in vergleichbarer Weise wie pPo2tef:kpp6NA, wobei hier ein 2.417 bp *NcoI/DraIII*-Fragment aus pkpp6N-term, auf dem 81 bp des *kpp6*-Promotors, das *kpp6N-term*-Allel, der 435 bp 3'-UTR und die Hälfte der Carboxin-Resistenzkassette liegen, eingesetzt wurde. Damit steht in diesem Konstrukt *kpp6N-term* unter Kontrolle des *o2tef*-Promotors.

**pPo2tef:kpp6C-term**

Entstanden in vergleichbarer Weise wie pPo2tef:kpp6NA, wobei hier ein 2.897 bp *NcoI/DraIII*-Fragment aus pkpp6C-term, auf dem das *kpp6C-term*-Allel, der 435 bp 3'-UTR und die Hälfte der Carboxin-Resistenzkassette liegen, eingesetzt wurde. Damit steht in diesem Konstrukt *kpp6C-term* unter Kontrolle des *o2tef*-Promotors.

**pPo2tef:kpp2**

Entstanden durch Drei-Fragment-Ligation aus einem 1.073 bp *NcoI/NotI*-Fragment aus p123/kpp2 und einem 3.715 bp *NcoI/DraIII*- und einem 1.637 bp *DraIII/NcoI*-Fragment aus pCU4cgfp. Damit ist in diesem Konstrukt *kpp2* unter der Kontrolle des *o2tef*-Promotors.

**pPo2tef:kpp6/2**

Entstanden durch Einfügen eines 579 bp *NcoI*-Fragments, das durch PCR-Amplifikation aus pkpp6NA mit den Oligonukleotiden OAN196 und OAN216 und Restriktion mit *NcoI* entstanden ist in die entsprechende Stelle in pPo2tef:kpp2. Dieses Fragment umfasst 81 bp des *kpp6*-Promotors und einen 5'-Bereich des *kpp6*-Gens, der für die N-terminalen 168 Aminosäuren kodiert. Damit steht in diesem Konstrukt ein Fusionsgen aus dem 5'-Bereich von *kpp6* und dem gesamten *kpp2*-Gen unter der Kontrolle des *o2tef*-Promotors.

**pkpp6NA-Cbx**

Für die Herstellung dieses Plasmids zur Integration in den *kpp6*-Locus wurde zunächst ein Zwischenkonstrukt erzeugt, das eine 3'-Flanke von *kpp6* enthält. Dazu wurden in einer Drei-Fragment-Ligation ein 464 bp *BamHI/EcoRI*-Fragment aus pΔkpp6 Ble(-) und ein daran anschließendes 889 bp *EcoRI/HindIII*-Fragment aus SAN3336 in den mit *BamHI* und *HindIII* geöffneten Vektor pSP72 eingefügt. Aus diesem Konstrukt wurde die 3'-Flanke als 2.482 bp *AscI/BglI*-Fragment ausgeschnitten und zusammen mit einem 1.579 bp *AscI/MfeI*-Fragment aus der Carboxin-Resistenzkassette von pNEB-Cbx(+) und einem 5.966 bp *MfeI/BglI*-Fragment aus pkpp6NA ligiert. Das entstandene Konstrukt besteht aus 2.371 bp *kpp6*-Promotor, dem *kpp6NA*-Allel, 435 bp *kpp6*-Terminator, der Carboxin-Resistenzkassette und einer 909 bp 3'-Flanke von *kpp6*.

**pkpp6T355A,Y357F-Cbx**

Genauso entstanden wie pkpp6NA-Cbx, außer dass in den letzten Ligationsschritt ein 5.966 bp *MfeI/BglI*-Fragment aus pkpp6T355A,Y357F eingesetzt wurde. Das entstandene Konstrukt besteht aus 2.371 bp *kpp6*-Promotor, dem *kpp6T355A,Y357F*-Allel, 435 bp *kpp6*-Terminator, der Carboxin-Resistenzkassette und einer 909 bp 3'-Flanke von *kpp6*.

**pkpp6K220R-Cbx**

Genauso entstanden wie pkpp6NA-Cbx, außer dass in den letzten Ligationsschritt ein 5.966 bp *MfeI/BglI*-Fragment aus pkpp6k220R eingesetzt wurde. Das entstandene Konstrukt besteht aus 2.371 bp *kpp6*-Promotor, dem *kpp6K220R*-Allel, 435 bp *kpp6*-Terminator, der Carboxin-Resistenzkassette und einer 909 bp 3'-Flanke von *kpp6*.

**pkpp6N-myc**

Für dieses Konstrukt wurde mit den Oligonukleotiden OAN198 und OAN120 ein 649 bp PCR-Amplifikat erzeugt, das den 5'-Bereich von *kpp6* umfasst und eine zusätzliche *BamHI*-Schnittstelle direkt hinter der *NcoI*-Schnittstelle an dem angenommenen Translations-Startpunkt von *kpp6* einführt. Nach Restriktion mit *NcoI* und *EagI* entstand ein 269 bp Fragment, das gegen das entsprechende Fragment in pkpp6NA ausgetauscht wurde. Anschließend wurde der Vektor mit *BamHI* geöffnet und ein 120 bp *BamHI*-Fragment aus pCK152 eingefügt, das für ein Triple-Myc-Epitop kodiert. Die *BamHI*-Schnittstelle wurde dabei so gelegt, dass dieses Fragment im Leseraster von *kpp6* liegt.

**pkpp6C-myc**

Zur Herstellung dieses Konstrukts wurde pkpp6N mit *KpnI* und *NdeI* geöffnet und in einer Drei-Fragment-Ligation zwei PCR-Amplifikate eingefügt: ein 34 bp *KpnI/AscI*-Fragment, das durch Amplifikation des 3'-Endes von *kpp6* aus pkpp6N mit den Oligonukleotiden OAN202 und OAN185 und anschließende Restriktion mit *KpnI* und *AscI* entstanden ist (dabei entstand eine *AscI*-Schnittstelle hinter dem Stoppkodon von *kpp6* und zusätzlich davor im kodierenden Bereich eine *BamHI*-Schnittstelle), und ein 250 bp *AscI/NdeI*-Fragment, das durch Amplifikation des 3'-UTRs von *kpp6* aus pkpp6N mit den Oligonukleotiden OAN199 und OAN200 und anschließende Restriktion mit *AscI* und *NdeI* entstanden ist (dabei entstand ebenfalls eine *AscI*-Schnittstelle hinter dem

Stoppkodon von *kpp6*). Anschließend wurde das fehlende 480 bp *KpnI*-Fragment aus dem 3'-Bereich von *kpp6* aus *pkpp6N* ausgeschnitten und in die *KpnI*-Schnittstelle in diesem Konstrukt eingefügt. Schließlich wurde der Vektor mit *BamHI* geöffnet und ein 120 bp *BamHI*-Fragment aus *pCK152* eingefügt, das für ein Triple-Myc-Epitop kodiert. Die *BamHI*-Schnittstelle wurde dabei so gelegt, dass dieses Fragment im Leseraster von *kpp6* liegt.

#### **pPkpp6(PRE1,2mut):kpp6**

Für dieses Konstrukt wurden zunächst zwei PCR-Fragmente aus dem *kpp6*-Promotorbereich erzeugt: ein 227 bp *SphI/HgaI*-Fragment, entstanden aus SAN3314 durch Amplifikation mit den Oligonukleotiden OAN205 und REV24 und nachfolgende Restriktion mit *SphI* und *HgaI*, das die erste PRE-Box enthält und dort eine Punktmutation einführt (TCCCTTTGT wird zu TCC~~T~~TTTGT), und ein 350 bp *HgaI/NcoI*-Fragment, entstanden aus *pkpp6N* durch Amplifikation mit den Oligonukleotiden OAN206 und OAN197 und nachfolgende Restriktion mit *HgaI* und *NcoI*, das die zweite PRE-Box enthält und dort ebenfalls eine Punktmutation einführt (ACCCTTTGT wird zu ACC~~T~~TTTGT). Diese beiden Fragmente wurden in einer Drei-Fragment-Ligation in den mit *SphI* und *NcoI* geöffneten Vektor *pkpp6N* eingebracht. Damit unterscheidet sich *pPkpp6(PRE1,2mut):kpp6* von *pkpp6N* nur durch die beiden Punktmutationen in den PRE-Boxen.

#### **pPkpp6(PRE1mut):kpp6**

Dieses Konstrukt ist ähnlich wie *pPkpp6(PRE1,2mut):kpp6* entstanden; allerdings wurde in die Drei-Fragment-Ligation statt dem 350 bp PCR-Produkt, das die Punktmutation in PRE2 besitzt ein entsprechendes Wildtyp-Fragment aus *pkpp6N* eingesetzt, so dass das Endkonstrukt nur eine mutierte PRE1 aufweist.

#### **pPkpp6(PRE2mut):kpp6**

Dieses Konstrukt ist ähnlich wie *pPkpp6(PRE1,2mut):kpp6* entstanden; allerdings wurde in die Drei-Fragment-Ligation statt dem 227 bp PCR-Produkt, das die Punktmutation in PRE1 besitzt ein entsprechendes Wildtyp-Fragment aus *pkpp6N* eingesetzt, so dass das Endkonstrukt nur eine mutierte PRE2 aufweist.

#### **pPkpp6:egfp**

Entstanden durch Austausch von *kpp6* und dem *kpp6*-Terminator in *pkpp6NA* durch ein 1.012 bp *NcoI/EcoRI*-Fragment aus *pRU4egfp*, das *egfp* und den *nos*-Terminator umfasst. Damit steht in diesem Konstrukt *egfp* unter der Kontrolle des *kpp6*-Promotors.

#### **pPkpp6(PRE1mut):egfp**

Entstanden durch Austausch von *kpp6* und dem *kpp6*-Terminator in *pPkpp6(PRE1mut):kpp6* durch ein 1.012 bp *NcoI/EcoRI*-Fragment aus *pRU4egfp*, das *egfp* und den *nos*-Terminator umfasst. Damit steht in diesem Konstrukt *egfp* unter der Kontrolle des *kpp6*-Promotors, in dem PRE1 mutiert ist.

#### **pPkpp6(PRE2mut):egfp**

Entstanden durch Austausch von *kpp6* und dem *kpp6*-Terminator in *pPkpp6(PRE2mut):kpp6* durch ein 1.012 bp *NcoI/EcoRI*-Fragment aus *pRU4egfp*, das *egfp* und den *nos*-Terminator umfasst. Damit steht in diesem Konstrukt *egfp* unter der Kontrolle des *kpp6*-Promotors, in dem PRE2 mutiert ist.

#### **pPkpp6(PRE1,2mut):egfp**

Entstanden durch Austausch von *kpp6* und dem *kpp6*-Terminator in *pPkpp6(PRE1,2mut):kpp6* durch ein 1.012 bp *NcoI/EcoRI*-Fragment aus *pRU4egfp*, das *egfp* und den *nos*-Terminator umfasst. Damit steht in diesem Konstrukt *egfp* unter der Kontrolle des *kpp6*-Promotors, in dem beide PRE-Boxen mutiert sind.

### **weitere Plasmide**

#### **pΔ*frb52* Hyg(-)**

Für die Herstellung dieses Deletionskonstrukts wurden zunächst zwei Bereiche aus dem *frb52*-Locus subkloniert. Für die 5'-Flanke war dies ein 1,1 kb *HindIII*-Fragment aus dem Cosmid 4D5, das in die *HindIII*-Schnittstelle von *pUC19* inseriert wurde (ergab SAN3351). Für die 3'-Flanke wurde ein 1,5 kb *HindIII/KpnI*-Fragment aus demselben Cosmid, das den 3'-UTR von *frb52* umfasst, in die entsprechenden Schnittstellen von *pUC19* inseriert (ergab SAN3375). Anschließend wurde SAN3351 mit *XbaI* und *KpnI* geöffnet und in einer Drei-Fragment-Ligation zwei weitere Fragmente eingefügt: ein 203 bp *XbaI/AscI*-Fragment, das durch Amplifikation des 5'-UTR von *frb52* aus SAN3351 mit den Oligonukleotiden OAN155 und REV24 und anschließende Restriktion mit *XbaI* und *AscI* entstanden ist (dabei entstand eine

*AscI*-Schnittstelle am Translations-Startpunkt von *frb52*); und ein 328 bp *AscI/KpnI*-Fragment, das durch Amplifikation des 3'-UTR von *frb52* aus SAN3375 mit den Oligonukleotiden OAN156 und UNI24 und anschließende Restriktion mit *AscI* und *KpnI* entstanden ist (dabei entstand eine *AscI*-Schnittstelle am Stoppkodon von *frb52*). Dieses Konstrukt wurde mit *KpnI* linearisiert und ein 1.077 bp *KpnI*-Fragment aus SAN3375 eingefügt, das den angrenzenden Bereich aus dem 3'-UTR von *frb52* enthält. Dieses Konstrukt wurde mit *AscI* linearisiert und die 2.912 bp *AscI* Hygromycin-Resistenzkassette aus pNEB-Hyg(+) in Minus-Orientierung inseriert. Das Deletionskonstrukt enthält eine 809 bp *HindIII/AscI* 5'-Flanke und eine 1.405 bp *AscI/KpnI* 3'-Flanke; bei homologer Rekombination in *U. maydis* wird der gesamte ORF von *frb52* deletiert.

#### **pΔfrb110 Hyg(+)**

Für die Herstellung dieses Deletionskonstrukts wurden zunächst zwei überlappende Bereiche aus dem *frb110*-Locus subkloniert. Für die 5'-Flanke war dies ein 5,0 kb *XbaI*-Fragment aus dem Cosmid 29D4, das den 5'-UTR von *frb110* und das Gen umfasst und in die *XbaI*-Schnittstelle von pBS(+)-SK inseriert wurde (ergab SAN3198). Für die 3'-Flanke wurde ein 5,4 kb *BamHI*-Fragment aus demselben Cosmid, das den 3'-UTR von *frb110* und das gesamte Gen umfasst, in die *BamHI*-Schnittstelle von pUC19 inseriert (ergab SAN3337). Aus SAN3198 wurde ein internes *BamHI*-Fragment entfernt und der Vektor religiert (ergab SAN3324). Anschließend wurde das Plasmid pSL1180 mit *NdeI* und *PstI* geöffnet und in einer Drei-Fragment-Ligation zwei weitere Fragmente eingefügt: ein 100 bp *NdeI/NotI*-Fragment, das durch Amplifikation des 5'-UTR von *frb110* aus SAN3324 mit den Oligonukleotiden OAN159 und REV24 und anschließende Restriktion mit *NdeI* und *NotI* entstanden ist (dabei entstand eine *NotI*-Schnittstelle am Translations-Startpunkt von *frb110*); und ein 360 bp *NotI/PstI*-Fragment, das durch Amplifikation des 3'-UTR von *frb110* aus SAN3337 mit den Oligonukleotiden OAN160 und OAN151 und anschließende Restriktion mit *NotI* und *PstI* entstanden ist (dabei entstand eine *NotI*-Schnittstelle am Stoppkodon von *frb110*). Aus diesem Konstrukt wurden die PCR-Fragmente als 373 bp *NdeI/AscI*-Fragment geschnitten und mit drei weiteren Fragmenten in einer Vier-Fragment-Ligation zusammengefügt: einem 1.099 bp *SphI/NdeI*-Fragment aus SAN3198, das die

5'-Flanke enthält, einem 592 bp *AscI/KpnI*-Fragment aus SAN3337, das die 3'-Flanke enthält und dem mit *SphI* und *KpnI* geöffneten Vektor pUC19. Dieses Konstrukt wurde mit *NotI* linearisiert und die 2.896 bp *NotI* Hygromycin-Resistenzkassette aus pSL-Hyg(+) in Plus-Orientierung inseriert. Das Deletionskonstrukt enthält eine 1.199 bp *SphI/NotI* 5'-Flanke und eine 865 bp *NotI/KpnI* 3'-Flanke; bei homologer Rekombination in *U. maydis* wird der gesamte ORF von *frb110* deletiert.

#### **pΔnar1**

Für dieses Konstrukt wurde ein 3,2 kb *EcoRI/NotI*-Fragment aus dem 3'-UTR von *nar1* aus dem Cosmid 20C4 in die entsprechenden Stellen in pSL1180 inseriert (die *NotI*-Schnittstelle liegt hinter dem Stoppkodon von *nar1* und wurde durch gerichtete PCR-Mutagenese mit dem Oligonukleotid OAN18 erzeugt), dieses mit *NotI* und *NruI* geöffnet, ein 172 bp *NotI/SmaI*-Polylinker aus pSL1180 eingefügt, der entstandene Vektor mit *Bsp120I* und *NdeI* linearisiert und schließlich der *nar1*-Promotor als 2.109 bp *NotI/NdeI*-Fragment aus pRU2 eingesetzt. Daraus entstand das Plasmid pΔnar1pro, in das beliebige Gene als *NdeI/NotI*-Fragmente eingebaut werden können, um durch homologe Rekombination in den *nar1*-Locus eingebracht zu werden. Das eigentliche Deletionskonstrukt pΔnar1 entstand durch Restriktion mit *NotI* und *NdeI*, Auffüllen der überhängenden Enden und Religation. Es besitzt eine 2,1 kb 5'-Flanke und eine 3,2 kb 3'-Flanke und bei homologer Rekombination in *U. maydis* wird das gesamte *nar1*-Gen deletiert.

#### **pNEB-nar1**

Enthält das *nar1*-Gen als *NdeI/AscI*-Fragment in pNEB193, entstanden durch Amplifikation mit den Oligonukleotiden OAN33 und OAN18.

#### **pΔpyr6**

Für dieses Konstrukt wurde zunächst ein 4,0 kb *PstI*-Fragment aus dem Cosmid 29F4 ein den mit *PstI* linearisierten Vektor pUC19 kloniert (ergab pUC-pyr6). Danach wurde durch PCR-Amplifikation aus diesem Konstrukt mit den Oligonukleotiden UNI24 und pyr6-NotI-5' eine 5'-Flanke und durch Amplifikation mit REV24 und pyr6-NotI-3' eine 3'-Flanke erzeugt. Diese beiden Fragmente wurden mit *NotI* und *PstI* geschnitten und zusammen in den mit *PstI* geöffneten Vektor pUC19 inseriert. Das Konstrukt besitzt eine 1,6 kb *PstI/NotI* 5'-Flanke und eine 1,7 kb

*PstI/NorI* 3'-Flanke; bei homologer Rekombination in *U. maydis* wird das gesamte *pyr6*-Gen deletiert.

#### **pNEB-pyr6 NdeI-AscI**

Enthält das *pyr6*-Gen als *NdeI/AscI*-Fragment in pNEB193, entstanden durch Amplifikation mit den Oligonukleotiden OAN12 und OAN14.

#### **pNEB-pyr6 NcoI-AscI**

Enthält das *pyr6*-Gen als *NcoI/AscI*-Fragment in pNEB193, entstanden durch Amplifikation mit den Oligonukleotiden OAN13 und OAN14.

#### **pΔbig6 Hyg(+)**

Dazu wurde das Plasmid pFA7, welches das Amplicon von *big6* trägt, mit *MfeI* geöffnet und eine *ApoI* Hygromycin-Resistenzkassette aus pSL-Hyg(+) ΔEcoRI in Plus-Orientierung eingesetzt. Die *MfeI*-Schnittstelle befindet sich etwa in der Mitte des 1.207 bp großen Amplicons, Hyg(+)-ΔEcoRI ist ein Derivat von pSL-Hyg(+), bei dem die interne EcoRI-Schnittstelle in der Hygromycin-Resistenzkassette durch gerichtete PCR-Mutagenese zerstört ist (G. Weinzierl, pers. Mitteilung).

#### **pPnar:pkc1 Ble(+)**

Für dieses Konstrukt wurde zunächst ein 1,9 kb *PstI*-Fragment aus dem Cosmid 1C12, das etwa 1,1 kb *pkc1*-Promotor und etwa 0,8 kb des 5'-Bereichs von *pkc1* umfasst, in die entsprechende Stelle in pUC19 kloniert und die *NdeI*-Schnittstelle im Vektor-Rückgrat deletiert. Anschließend wurde durch gerichtete PCR-Mutagenese mit den Oligonukleotiden OAN85 und OAN86 eine neue *NdeI*-Schnittstelle am Translations-Startpunkt von *pkc1* eingeführt. In diese Schnittstelle wurde ein 3.430 bp *NdeI*-Fragment aus pSL-Ble(+)-nar1pr eingefügt, die den *nar1*-Promotor und eine Phleomycin-Resistenzkassette enthält. pSL-Ble(+)-nar1pr ist entstanden durch die Insertion eines 2.882 bp *HpaI/SspI*-Fragments aus pRU4 in den mit *NruI* linearisierten Vektor pSL-Ble(+). Das Konstrukt pSL-Ble(-)-nar1pr mit gegenläufiger Phleomycin-Re-

sistenzkassette wurde ebenfalls hergestellt; in diesem Fall erfolgte die Insertion in pSL-Ble(-). Mit dem *pkc1*-Insertionskonstrukt kann nach homologer Rekombination in *U. maydis* eine regulierte Expression von *pkc1* erreicht werden.

#### **pΔphc1 Nat(+)**

Für dieses Konstrukt wurde zunächst ein 3,2 kb *PstI*-Fragment aus dem Cosmid 1C12, das in der Mitte des Gens *phc1* liegt, in die entsprechende Stelle in pUC19 kloniert. Anschließend wurde ein internes 1.977 bp *SacII/NcoI*-Fragment deletiert und durch eine 1.470 bp *SacII/BspHI* Nourseothricin-Resistenzkassette aus pSL-Nat(-) ersetzt. Damit besitzt dieses Deletionskonstrukt noch Flanken von 739 und 495 bp.

#### **pOH**

One-Hybrid Hefevektor, der eine singuläre *SmaI*-Schnittstelle vor einem *cyc1*-Basalpromotor und dem *lacZ*-Gen besitzt. Entstanden aus pLGΔ312 durch Linearisierung mit *XmaI*, Auffüllen der überhängenden Enden, darauf folgend Linearisierung mit *SalI* und Einfügen eines *PmlI/SalI* Polylinker-Fragments aus pSL1180. In dem so entstandenen Plasmid pLG-S wurde durch Restriktion mit *SmaI* und anschließende Religation ein 252 bp *SmaI*-Fragment entfernt, so dass eine singuläre *SmaI*-Schnittstelle und damit pOH entsteht.

#### **pFA#**

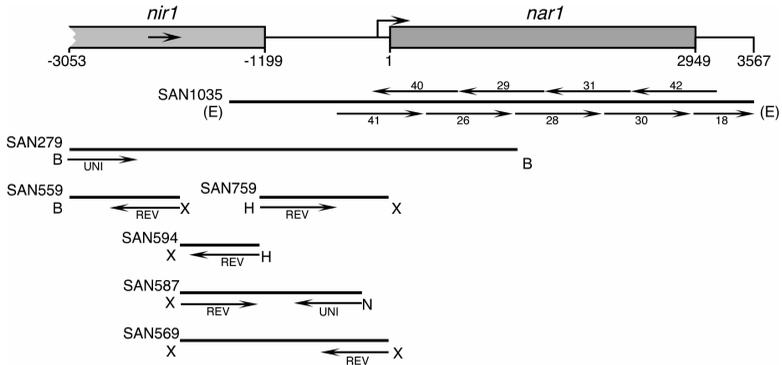
Klone aus dem RNA-Fingerprint-Testansatz; die Amplicons wurden in pCR-Topo kloniert, die Nummer entspricht der Nummerierung der Amplicons im Testansatz.

#### **pFRB#**

Klone aus dem zweiten RNA-Fingerprint-Ansatz; die Amplicons wurden in pCR-Topo kloniert, die Nummer entspricht der Nummerierung der Amplicons im Ansatz.

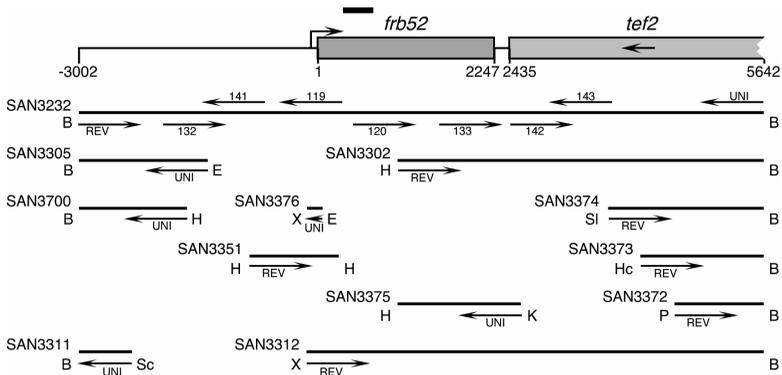
## 4.1.5 Sequenzierungsstrategien

### *nar1*-Locus



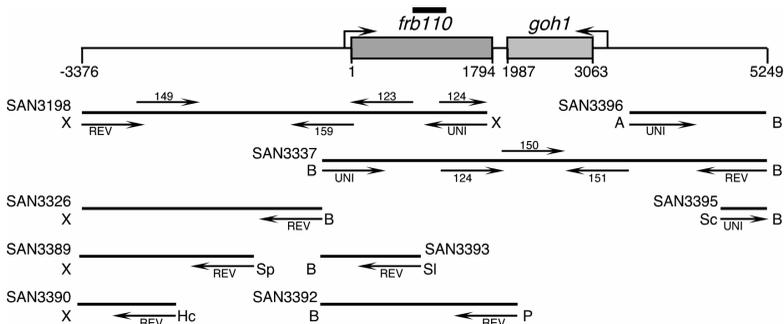
**Abbildung 37: Der *nar1*-Locus.** Dargestellt ist die relative Lage der Subklone aus den Cosmiden 20C4 (SAN1035) und 2B5 (restliche Klone) und der Einzelsequenzen. Die *EcoRI*-Schnittstelle des Subklons SAN1035 konnte in den Subklonen aus dem anderen Cosmid nicht gefunden werden, deswegen ist die genaue Lage unklar. Er geht im 3'-Bereich von *nar1* noch etwa 2,7 kb weiter. Verwendete Restriktionsenzyme: B, *Bgl*III; E, *EcoRI*; H, *Hind*III; N, *Nhe*I; X, *Xho*I. Verwendete Oligonukleotide: REV, REV24; UNI, UNI24; die Nummern beziehen sich auf OAN-Oligonukleotide. Die Abbildung ist maßstabsgerecht.

### *frb52*-Locus



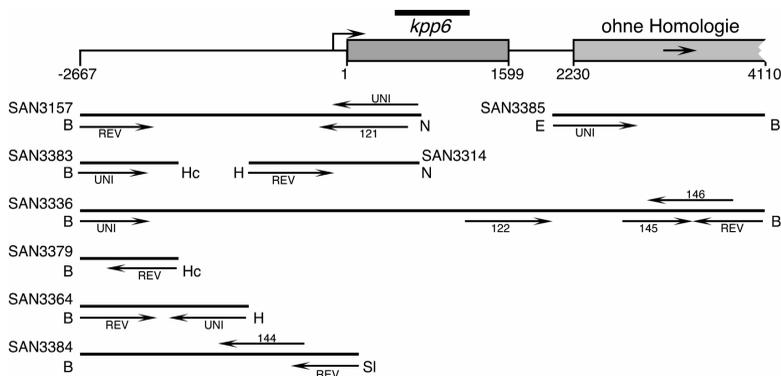
**Abbildung 38: Der *frb52*-Locus.** Dargestellt ist die relative Lage der Subklone aus dem Cosmid 4D5 und der Einzelsequenzen. Verwendete Restriktionsenzyme: B, *Bam*HI; E, *Eco*RI; Hc, *Hinc*II; H, *Hind*III; K, *Kpn*I; P, *Pst*I; Sc, *Sac*I; SI, *Sal*I; X, *Xba*I. Verwendete Oligonukleotide: REV, REV24; UNI, UNI24; die Nummern beziehen sich auf OAN-Oligonukleotide. Der dicke Strich gibt die Lage des *frb52*-Amplicons an. Die Abbildung ist maßstabsgerecht.

**frb110-Locus**

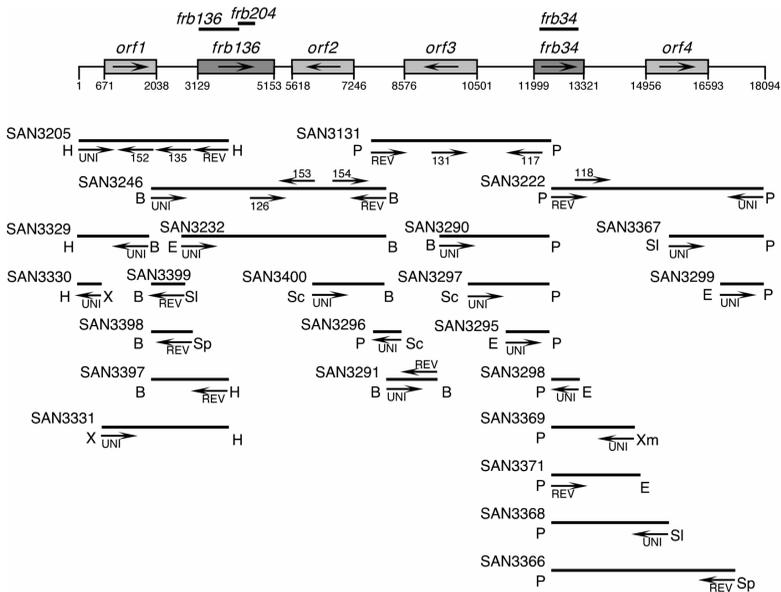


**Abbildung 39: Der *frb110*-Locus.** Dargestellt ist die relative Lage der Subklone aus dem Cosmid 29D4 und der Einzelsequenzen. Verwendete Restriktionsenzyme: A, *ApoI*; B, *BamHI*; Hc, *HincII*; P, *PstI*; Sc, *SacI*; Sl, *Sall*; Sp, *SphI*; X, *XbaI*. Verwendete Oligonukleotide: REV, REV24; UNI, UNI24; die Nummern beziehen sich auf OAN-Oligonukleotide. Der dicke Strich gibt die Lage des *frb110*-Amplicons an. Die Abbildung ist maßstabsgerecht.

**kpp6-Locus**



**Abbildung 40: Der *kpp6*-Locus.** Dargestellt ist die relative Lage der Subklone und der Einzelsequenzen. Die Plasmide SAN3157, SAN3314, SAN3364 und SAN3379 stammen aus dem Cosmid 4D9 (die *NotI*-Schnittstelle liegt im Cosmid-Rückgrat), die Plasmide SAN3336, SAN3383, SAN3384 und SAN3385 stammen aus dem Cosmid 6F7. Verwendete Restriktionsenzyme: B, *BamHI*; E, *EcoRI*; Hc, *HincII*; H, *HindIII*; N, *NorI*; Sl, *Sall*. Verwendete Oligonukleotide: REV, REV24; UNI, UNI24; die Nummern beziehen sich auf OAN-Oligonukleotide. Der dicke Strich gibt die Lage des *frb92*-Amplicons an. Die Abbildung ist maßstabsgerecht.

*frb136/frb34-Locus (cab-Locus)*

**Abbildung 41: Der *frb136/frb34-Locus (cab-Locus)*.** Dargestellt ist die relative Lage der Subklone und der Einzelsequenzen. Die Plasmide SAN3205, SAN3329, SAN3330 und SAN3331 stammen aus dem Cosmid 8C12, die übrigen Plasmide stammen aus dem Cosmid 25D8. Verwendete Restriktionsenzyme: B, *Bam*HI; E, *Eco*RI; Hc, *Hinc*II; H, *Hind*III; Sc, *Sac*I; SI, *Sal*I; Sp, *Sph*I; P, *Pst*I; X, *Xba*I, Xm, *Xma*I. Verwendete Oligonukleotide: REV, REV24; UNI, UNI24; die Nummern beziehen sich auf OAN-Oligonukleotide. Die dicken Striche geben die Lage der Amplicons *frb34*, *frb136* und *frb204* an. Die Abbildung ist maßstabsgerecht.

## 4.2 Mikrobiologische, zellbiologische und genetische Methoden

### 4.2.1 *Escherichia coli*

#### Kultivierung von *E. coli*

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

#### Bestimmung der Zelldichte bei *E. coli*

Die Zelldichte von Flüssigkulturen wurde photometrisch in einem Novospec II Photometer (Pharmacia Biotech) bei 600 nm bestimmt. Um eine lineare Abhängigkeit sicherzustellen, wurden für die Messung der OD<sub>600</sub> die Kulturen durch entsprechende Verdünnung auf einen Wert unterhalb von 0,8 verdünnt. Als Nullwert wurde die OD<sub>600</sub> des jeweiligen Kulturmediums verwendet. OD<sub>600</sub> = 1,0 entspricht etwa 10<sup>9</sup> Zellen/ml.

#### RbCl-Transformation von *E. coli*

Dieses Protokoll ist modifiziert nach Cohen *et al.* (1972). Zur Herstellung transformationskompetenter Bakterienzellen wurden 100 ml LB-Medium, dem je 10 mM MgCl<sub>2</sub> und MgSO<sub>4</sub> zugesetzt war, mit 1 ml einer frischen DH5α-Übernachtskultur angeimpft und bis zu einer OD<sub>600</sub> ≈ 0,5 bei 37°C und 200 Upm inkubiert. Die Zellen wurden durch Zentrifugieren für 15 min bei 3.000 Upm und 4°C (Heraeus Varifuge 3.0R) pelletiert und in 33 ml eiskalter RF1-Lösung resuspendiert. Nach 30 bis 60 min Inkubation auf Eis wurden die Zellen erneut abzentrifugiert (15 min, 3.000 Upm, 4°C, Heraeus Varifuge 3.0R), der Überstand abgenommen, die Zellen in 5 ml eiskalter RF2-Lösung resuspendiert und 15 min inkubiert. Die Zellsuspension wurde zu je 100 µl aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

Zur Transformation wurden die Zellen auf Eis aufgetaut, jeweils 50 µl mit 10 µl Plasmidlösung (1-5 ng Plasmid) bzw. Ligationsansatz versetzt und 15 min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock von 2 min bei 42°C wurde der Transformations-Ansatz zur phänotypischen Expression der durch das eingebrachte Plasmid vermittelten Antibiotikaresistenz mit 800 µl dYT-Medium versetzt und 30 min bei 500 Upm und 37°C in einem Eppendorf-Wärmeblock inkubiert. 200 µl des Transformations-Ansatzes wurde auf YT-Platten mit 100 µg/ml Ampicillin ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Auf diese Weise konnte eine Transformationsrate von 10<sup>6</sup> Transformanten pro 1 µg eingesetzter Plasmid-DNA erreicht werden.

#### RF1-Lösung:

100 mM RbCl  
50 mM MnCl<sub>2</sub> x 4 H<sub>2</sub>O  
30 mM K-Acetat  
10 mM CaCl<sub>2</sub> x 2 H<sub>2</sub>O  
15% (v/v) Glycerin  
in H<sub>2</sub>O<sub>bid.</sub>  
mit Essigsäure auf pH 5,8 einstellen und sterilfiltrieren

#### RF2-Lösung:

10 mM MOPS  
10 mM RbCl  
75 mM CaCl<sub>2</sub> x 2 H<sub>2</sub>O  
15% (v/v) Glycerin  
in H<sub>2</sub>O<sub>bid.</sub>  
mit NaOH auf pH 5,8 einstellen und sterilfiltrieren

#### Elektroporations-Transformation von *E. coli*

Eine frische Übernachtskultur von *E. coli* DH5α wurde 1:100 in 500 ml LB-Medium verdünnt und bei 37°C und 200 Upm bis zu einer OD<sub>600</sub> ≈ 0,7 geschüttelt. Die Zellen wurden dann für 15-30 min auf 0°C heruntergekühlt und anschließend abzentrifugiert

(300 Upm, 15 min, 4°C, Heraeus Varifuge 3.0R). Das Pellet wurde in 500 ml kaltem Wasser resuspendiert, abzentrifugiert, erneut in kaltem Wasser (250 ml) resuspendiert und wieder pelletiert. Anschließend wurden die Zellen in 10 ml kaltem 10%igem Glycerin resuspendiert, abzentrifugiert und schließlich in 0,5 bis 1 ml kaltem 10%igem Glycerin aufgenommen. Die transformationskompetenten Zellen wurden aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C aufbewahrt.

Zur Transformation wurden die elektrokompetenten Zellen langsam auf Eis aufgetaut. 40 µl Zellsuspension wurden mit bis zu 5 µl DNA aus einem Liga-

tionsansatz gemischt und 1 min auf Eis inkubiert. Der Transformationsansatz wurde daraufhin in eine vorgekühlte 0,2 cm breite Elektroporationsküvette überführt und die Küvette in die vorgesehene Halterung des Gene Pulsers gestellt (Gene Pulser, BioRad). Direkt danach wurde der Puls ausgelöst (25 mF, 2,5 kV, 200 W). Die Entladungszeit sollte zwischen 4 und 5 msec liegen. Im Anschluss an die Entladung wurde sofort 1 ml SOC-Medium in den Transformationsansatz pipettiert. Die Zellen wurden zur Regeneration 45 min bei 37°C inkubiert und anschließend auf YT-Amp-Platten ausgestrichen.

## 4.2.2 *Ustilago maydis*

### Kultivierung von *U. maydis*

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

### Induktion von Stämmen

Die Stämme wurden aus Vorkultur in Flüssigmedium angeimpft, das reprimierende Bedingungen bot (im Fall des *nar1*-Promotors Ammoniumionen als einzige Stickstoffquelle, im Fall des *crG1*-Promotors Glucose als einzige Kohlenstoffquelle) und bis zu  $OD_{600} = 0,5$  bei 29°C und 200 Upm inkubiert. Die Zellen wurden daraufhin abzentrifugiert (3.000 Upm, 5 min, RT, Heraeus Varifuge 3.0R), der Überstand abgenommen und die Zellen im gleichen Volumen  $H_2O_{bid}$  resuspendiert. Nach nochmaliger Pelletierung (3.000 Upm, 5 min, RT, Heraeus Varifuge 3.0R) wurden die Zellen in Flüssigmedium resuspendiert, das induzierende Bedingungen bot (im Fall des *nar1*-Promotors Nitrationen als einzige Stickstoffquelle, im Fall des *crG1*-Promotors Arabinose als einzige Kohlenstoffquelle). Die Kulturen wurden bei 29°C und 200 Upm

für die gewünschte Zeit geschüttelt. Bei der Zellernte wurden die Kulturen schnell auf 0°C heruntergekühlt und die weiteren Schritte auf Eis bzw. die Zentrifugationsschritte bei 4°C durchgeführt.

Bei Induktion auf Festmedien wurde die Vorkultur unter reprimierenden Bedingungen durchgeführt.

### Bestimmung der Zelldichte bei *U. maydis*

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

### Transformation von *U. maydis*

Dieses Protokoll ist modifiziert nach Schulz *et al.* (1990) und Gillissen *et al.* (1992). Von einer auf Platte wachsenden Kultur wurde eine 4 ml YEPS-Flüssigkultur angesetzt und für 8-10 h bei 28°C geschüttelt. Diese Vorkultur wurde anschließend 1/300 in 50 ml frischem YEPS<sub>T</sub>-Medium verdünnt und bei 29°C bis zu einer Zelldichte von  $1-2 \times 10^7$  Zellen/ml (bis maximal  $OD_{600} = 1,0$ ) geschüttelt. Nach Erreichen des optimalen Zelltiters wurden die Zellen durch

Zentrifugieren (3.200 Upm, 10 min, 4°C, Heraeus Varifuge 3.0R) geerntet, einmal mit 25 ml SCS gewaschen und in 2 ml SCS mit 2,5 bis 5 mg/ml Novozym resuspendiert. Die in diesem Puffer bei Raumtemperatur ablaufende Protoplastierung kann mikroskopisch verfolgt werden, da die zigarrenförmigen Zellen nach Lyse der Zellwand eine kugelige Form einnehmen. Nach vollständiger Protoplastierung (5-15 min) wurden 10 ml SCS zugegeben und die Protoplasten durch 10minütige Zentrifugation bei 2.300 Upm (4°C, Heraeus Varifuge 3.0R) pelletiert. Um das Novozym vollständig zu entfernen, wurde dieser Waschgang dreimal wiederholt. Anschließend wurde mit 10 ml STC gewaschen und das Pellet danach in einem Volumen von 0,5 ml eiskaltem STC aufgenommen. Die so behandelten Protoplasten können 3-4 h auf Eis oder aliquotiert bei -80°C mehrere Monate aufbewahrt werden.

Zur integrativen Transformation wurden 50 µl Protoplasten mit 1-5 µl linearisierter Plasmid-DNA (ca. 5 µg) und 1 µl Heparin-Lösung für 10 min auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 0,5 ml STC/PEG folgte eine weitere Inkubation von 15 min auf Eis. Anschließend wurde der gesamte Transformationsansatz auf einer kurz zuvor mit Top-Agar überschichteten Regenerationsagarplatte ausgestrichen. Nach 2 bis 5 Tagen Inkubation bei 28°C wurden die gewachsenen Kolonien mit Zahnstochern auf Antibiotikum-haltigen PD-Platten, vereinzelt. Potentielle Transformanten wurden mittels Ganz-Zell-PCR vorselektiert und abschließend durch Southern-Blot Analyse verifiziert. Die Stämme wurden vor weiteren Experimenten insgesamt dreimal vereinzelt.

SCS:

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

STC:

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

STC/PEG:

15 ml STC  
10 g PEG4000

## Kreuzungsversuche bzw. Test auf filamentöses Wachstum

*U. maydis*-Stämme wurden von Platte in YEPS-Flüssigmedium inokuliert. Bei 29°C wurden die Zellen bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,5-1,0 inkubiert. Die Zellen wurden geerntet (Zentrifugieren bei 3.500 Upm für 7 min bei RT in der Heraeus Varifuge 3.0R) und das Pellet anschließend in H<sub>2</sub>O<sub>bid.</sub> so aufgenommen, dass die Zelldichte bei etwa OD<sub>600</sub> = 5,0 lag. Bei Kreuzungen wurde gleiche Volumina der jeweiligen Kreuzungspartner in einem Eppendorf-Gefäß miteinander gemischt. Von jedem Ansatz wurden 3 µl auf eine PD-CC-Platte getropft. Die Platte wurde für 24 h bei 21°C unter Luftabschluss inkubiert. Anschließend wurde der Kreuzungsversuch anhand der Filamentbildung ausgewertet.

## Konfrontationstest

Diese Methode ist in Snetselaar *et al.* (1996) beschrieben. Die zu testenden Stämme wurden im CM-Medium bei 29°C mit 200 Upm bis zu einer Dichte von OD<sub>600</sub> = 0,8 geschüttelt. Die Zellen wurden pelletiert (3.000 Upm, 5 min, RT, Heraeus Varifuge 3.0R) und bis zu einer OD<sub>600</sub> = 5,0 in H<sub>2</sub>O<sub>bid.</sub> resuspendiert. Objektträger wurden mit 2%igem Wasseragar in einer Höhe von ca. 2 mm beschichtet und 0,5 µl der Zellsuspension in einer Reihe auf den Objektträger getropft. Nach dem Eintrocknen der ersten Reihe (ca. 5 min) wurde der zweite Stamm in einer zweiten Reihe in etwa 100-200 µm Abstand getropft (0,5 µl). Nachdem die zweite Reihe eingetrocknet war, wurde über die Tropfen, die nahe aneinander lagen, sich aber nicht berührten, 3 µl Paraffinöl getropft. Diese Objektträger wurden in einer feuchten Kammer bei 29°C inkubiert bis sie unter einem Phasenkontrast-Mikroskop (Axiophot, ZEISS) mittels DIC-Mikroskopie analysiert werden konnten.

## Pheromonstimulation in Flüssigkultur

Die zu testenden Stämme wurden im PD- bzw. AM-Flüssigmedium bei 29°C mit 200 Upm bis zu einer Dichte von OD<sub>600</sub> = 0,8 geschüttelt. Jeweils 1 ml Kultur wurde in 15 ml PPN Zentrifugenröhrchen (Greiner) pelletiert (3.000 Upm, 5 min, RT, Heraeus

Varifuge 3.0R) und der Überstand abgenommen. Die Pellets wurden in 1 ml PD- bzw. NM-Medium, dem zuvor kompatibles Pheromon in DMSO in einer Endkonzentration von 1 µg/ml oder nur DMSO zugesetzt worden war, resuspendiert. Die Zellen wurden anschließend in den PPN-Röhrchen auf einem Rollo-drum Inkubator (New Brunswick Scientific) bei ca. 20 Upm in nahezu waagrecht Position gedreht. Nach verschiedenen Zeitpunkten wurde die Bildung von Konjugationshyphen mikroskopisch analysiert.

### Test auf Pathogenität

Die Einzelheiten der beiden verwendeten Pathogenitätstests, Spritz- und Tropfinfektion, sind in Abschnitt 2.4.4 ausführlich erklärt. Etwa 14 Tage nach Infektion wurden die entstandenen Tumore lichtmikroskopisch auf Sporenbildung untersucht.

### Sporulation und Segregationsanalyse

Von den infizierten Pflanzen wurden Tumore abgeschnitten und etwa eine Woche bei 37°C getrocknet. Die aus den Tumoren präparierten Sporen wurden 15 min in einer 1,5%igen CuSO<sub>4</sub>-Lösung inkubiert, um eventuell noch vorhandene Sporidien abzutöten und anschließend mit H<sub>2</sub>O<sub>bid</sub> gewaschen. Verdünnungen dieser Sporensuspension wurden auf YEPS<sub>1</sub>-Platten ausplattiert, denen Chloramphenicol, Kanamycin und Tetracyclin zugesetzt war, um bakterielle Kontaminationen zu entfernen. Die aus einer Spore auswachsenden Sporidien wurden zweimal vereinzelt und der Genotyp durch Testkreuzungen mit den Stämmen FB1 (*a1 b1*), FB2 (*a2 b2*), FB6b (*a1 b2*) und FB6a (*a2 b1*) bestimmt. Als Schnelltest zum Nachweis für erfolgreiche Meiose können die aus einer Spore entstandenen Kolonien auch direkt auf PD-CC Festmedium vereinzelt werden. Bereiche mit hoher Koloniedichte müssen filamentös erscheinen, dicht nebeneinander liegende Kolonien in der Hälfte der Fälle an der Kontaktstelle Filamentbildung zeigen, in der anderen Hälfte der Fälle dagegen nicht, und einzeln liegende Kolonien müssen eine glatte Koloniemorphologie aufweisen.

### Test auf filamentöses Wachstum auf der Maispflanze

Zur Untersuchung des filamentöses Wachstums auf der Maispflanze und der Ausbildung von appressorienartigen Infektionsstrukturen wurden Maispflanzen mittels Spritzinfektion infiziert. Nach 24 und 48 h wurde dann ein Stück von der Blattspreite des dritten Blatts, das unterhalb der Durchstichstelle lag, ausgeschnitten und mit einer Rasierklinge in kleine Stücke geschnitten. Die Blattstücke wurden 1 min in eine Fungifluor-Färbelösung (Sigma) gelegt und danach zweimal mit Wasser gewaschen. Die Präparate wurden anschließend in einem Tropfen Wasser unter UV-Licht im Fluoreszenz-Mikroskop (Axiophot, ZEISS) untersucht.

### Mikroskopie und Bildverarbeitung

Die zellmorphologische Betrachtung von *U. maydis* erfolgte an einem Lichtmikroskop (Axiophot, ZEISS) mittels Nomarski-Optik. Für DIC-Mikroskopie und Fluoreszenz-Mikroskopie wurde ein 100faches Plan-Apochromat Objektiv (ZEISS) mit 1,4 numerischer Apertur verwendet. 8 µl der entsprechenden Kultur bzw. des fixierten Präparats wurden zur Analyse auf Objektträger getropft. Für die Betrachtung und photographische Dokumentation sind Zelldichten von etwa 2,5 x 10<sup>6</sup> Zellen/ml ideal, die Kulturen sollten entsprechend verdünnt werden. Für die Fluoreszenz-Mikroskopie wurden Filter mit folgendem Anregungs- und Emissionsspektrum eingesetzt: DAPI-Färbung, 365 nm und >397 nm; SGFP und EGFP, 450-490 nm und 515-565 nm; YGFP, 500-520 nm und 535-550 nm; CGFP, 390-420 nm und >450 nm. Digitale Aufnahmen mit einer hochauflösenden CCD-Kamera (C4742-25, Hamamatsu) wurden mit dem Programm IMAGE PRO PLUS (Media Cybernetics) nachbearbeitet (Bildausschnitt, Kontrastverstärkung, Maßstabskalierung) und als TIFF-Dateien für die weitere Bearbeitung in den Programmen PHOTOSHOP 5.5 (Adobe) und CANVAS 6.0 (Deneba) abgespeichert.

## Fixierung von Zellen

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

## DAPI-Färbung

Etwa 500 µl fixierte Zellen in PBS wurden pelletiert (3.000 Upm, 5 min, RT, Heraeus Biofuge 15) und in 200 µl H<sub>2</sub>O<sub>bid</sub> aufgenommen. Diese Zellsuspension wurde auf ein mit Polylysin beschichtetes Deckglas

gegeben und 10 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde das Deckglas mit den Zellen nach unten für kurze Zeit in eine Petrischale mit PBS gelegt (Waschschritt). Das Deckglas wurde abgetropft, so dass ca. 10 µl am Deckglas verblieben. 10 µl einer DAPI-Lösung (Sigma D-9542) wurden in eine Petrischale mit 10 ml PBS gegeben, das Deckglas mit den Zellen nach unten auf die Flüssigkeit gelegt und so für 10 min bei 60°C inkubiert. Nach einem weiteren Waschschritt (10 min in PBS) wurde das Deckglas abgetropft und auf einen Objektträger gelegt. Das Präparat wurde mit VALAP versiegelt und im Dunkeln bei 4°C aufbewahrt.

### VALAP:

33% (w/w) Vaseline

33% (w/w) Lanolin

33% (w/w) Paraffin

### 4.3 Molekularbiologische Standardmethoden

Standardtechniken, wie z. B. Aufreinigung, Fällung, Restriktion und elektrophoretische Auftrennung von DNA, oder Klonierungstechniken (Ausubel *et al.*, 1987; Sambrook *et al.*, 1989) sind in Brachmann (1995) ausführlicher beschrieben. Die Konzentration von Nucleinsäuren wurde photometrisch bestimmt. Bei einer Schichtdicke von 1 cm entspricht  $OD_{260} = 1$  einer Konzentration von 50  $\mu\text{g/ml}$  doppelsträngiger

DNA, 33  $\mu\text{g/ml}$  einzelsträngiger DNA, bzw. 40  $\mu\text{g/ml}$  RNA.

Als Maß für die Reinheit der Desoxyribonucleinsäuren diente der Quotient aus  $OD_{260}$  zu  $OD_{280}$ . Für reine DNA und RNA sollte er bei etwa 1,8 liegen. Niedrigere Werte weisen auf Verunreinigungen mit Proteinen hin, höhere Werte auf Verunreinigungen mit Salzen oder Zuckern. Die Messungen erfolgten in einem Lambda Bio UV-Spektralphotometer (Perkin Elmer).

#### 4.3.1 Isolierung von Nucleinsäuren

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

Die Isolierung erfolgte durch "Lyse durch Kochen" nach Sambrook *et al.* (1989). 1,5 ml einer *E. coli*-Übernachtskultur wurden pelletiert (14.000 Upm, 30 sec, RT, Heraeus Biofuge 15). Das Zellpellet wurde in 300  $\mu\text{l}$  STET resuspendiert, nach Zugabe von 20  $\mu\text{l}$  Lysozym-Lösung kräftig geschüttelt und anschließend 40 sec bei 95°C in einem Eppendorf-Heizblock inkubiert. Die lysierten Zellen und die denaturierte genomische DNA wurden 15 min bei 14.000 Upm abzentrifugiert (Heraeus Biofuge 15) und danach mit einem sterilen Zahnstocher aus der wässrigen Lösung entfernt. Die Reinigung der Plasmid-DNA erfolgte durch Fällung mit 40  $\mu\text{l}$  3 M Na-Acetat, pH 5,3 und 400  $\mu\text{l}$  Isopropanol bei RT für 5 min und anschließender Zentrifugation für 5 min bei 14.000 Upm (Heraeus Biofuge 15). Das Pellet wurde mit 70% Ethanol gewaschen und nach Trocknen in 200  $\mu\text{l}$  TE-Puffer mit 20  $\mu\text{g/ml}$  RNase A aufgenommen. Mit dieser Methode gelang es routinemäßig, aus 1,5 ml Übernachtskultur etwa 50  $\mu\text{g}$  Plasmid-DNA zu isolieren.

##### STET:

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

##### Lysozym-Lösung:

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

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

Diese Methode ist modifiziert nach Hoffman und Winston (1987). Dabei wurden 1,5 ml einer Übernachtskultur in YEPS<sub>L</sub>-Flüssigmedium wurden zusammen mit 0,3 g Glasperlen in einem 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß pelletiert (14.000 Upm, 30 sec, RT, Heraeus Biofuge 15), der Überstand abgossen und das Pellet in 400  $\mu\text{l}$  *Ustilago*-Lysispuffer und 400  $\mu\text{l}$  TE-Phenol/Chloroform aufgenommen. Die Proben wurden für 10 min auf einem Vibrax-VXR Schüttler (IKA) geschüttelt. Nach Phasentrennung (14.000 Upm, 5 min, RT, Heraeus Biofuge 15) wurden 400  $\mu\text{l}$  des Überstands in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt und mit 1 ml Ethanol gefällt. Nach Zentrifugation (14.000 Upm, 30 sec, RT, Heraeus Biofuge 15) wurde das Pellet in 50  $\mu\text{l}$  TE mit 20  $\mu\text{g/ml}$  RNase A aufgenommen, bei 50°C resuspendiert und bei -20°C aufbewahrt.

##### *Ustilago*-Lysispuffer:

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

TE-Phenol/Chloroform:

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

### Reisolierung von in den *ip*-Locus integrierten Plasmiden

Bei der in Abschnitt 6.1 beschriebenen Methode der gezielten Integration in den *ip*-Locus wird jeweils das gesamte Plasmid inseriert und kann daher auch wieder leicht reisoliert werden. Im Fall der Analyse des Stamms AB171 (*a2mfa1 bW2bE1 Δkpp6 ip*<sup>[P<sub>kpp6</sub>:kpp6NA]ip</sup>) wurde dazu genomische DNA nach der oben beschriebenen Methode isoliert, mit *Dra*III verdaut, das Enzym inaktiviert, der gesamte Ansatz in eine Ligase-Reaktion eingesetzt und schließlich mittels Elektroporation in *E. coli* DH5α-Zellen transformiert. Die erhaltenen Transformanten enthielten das ursprünglich integrierte Plasmid, das zur Suche nach möglichen Mutationen sequenziert wurde.

### RNA-Isolierung aus *U. maydis*-Flüssigkulturen

Diese Methode ist modifiziert nach Schmitt *et al.* (1990). Zellen von einer frischen Platte wurden aus einer Vorkultur in 20 ml Medium angeimpft und bis OD<sub>600</sub> ≈ 0,5 bei 29°C und 200 Upm inkubiert. 15 ml dieser Kultur wurden abzentrifugiert (3.000 Upm, 10 min, RT, Heraeus Varifuge 3.0R) und das Pellet in 600 µl AE-Puffer mit 1% (w/v) SDS resuspendiert. Anschließend wurden 600 µl AE-Phenol zugegeben und die Probe 20 sec kräftig geschüttelt. Der Zellaufschluss erfolgte bei 65°C für 4 min unter ständigem Schütteln (Eppendorf Thermomixer). Im Anschluss daran wurde die Probe auf -80°C abgekühlt, bis sich Phenolkristalle bildeten (etwa 4 min). Nach Phasentrennung durch Zentrifugieren (22.000 Upm, 20 min, 4°C, Beckman Avanti30 Zentrifuge) wurde die obere wässrige Phase, welche die RNA enthält, in ein neues Gefäß überführt. Es folgte eine Extraktion mit 600 µl AE-Phenol/Chloroform. Die wässrige RNA-Lösung (400 µl) wurde danach mit 40 µl 3 M Na-Acetat pH 5,3 versetzt und mit 1 ml Ethanol gefällt (1 h bei -20°C). Nach Zentrifugation (22.000 Upm, 20 min, 4°C, Beckman Avanti30 Zentrifuge) wurde die RNA mit 70% Ethanol gewaschen, getrocknet, in 20 µl

H<sub>2</sub>O<sub>bid.</sub> oder RNA-Lagerpuffer aufgenommen und bei -80°C aufbewahrt. Zur Kontrolle und Konzentrationsabschätzung wurde 1 µl auf einem 1%igen TBE-Agarosegel analysiert und photometrisch bei 260 nm gemessen.

AE-Puffer:

50 mM Na-Acetat, pH 5,3  
10 mM Na<sub>2</sub>-EDTA  
in H<sub>2</sub>O<sub>bid.</sub>

AE-Phenol/Chloroform:

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

RNA-Lagerpuffer:

1 mM Na-Citrat, pH 6,4  
in H<sub>2</sub>O<sub>bid.</sub>

### RNA-Isolierung nach der alkalischen Phenol-Methode

Diese Methode ist modifiziert nach Timberlake (1986). Sie dient zur Präparation von Gesamt-RNA aus Pilzkulturen, die auf Festmedien gewachsen waren. Dazu wurde das Pilzmaterial von drei Platten abgekrazt, in flüssigen Stickstoff überführt und zu einem feinen Pulver gemörsert. Das gefrorene Pulver wurde mit 5 ml RNA-Lysepuffer durchmischt und erneut mit flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Mischung wurde zu einem feinen Pulver gemörsert, in 10 ml TE-Phenol überführt, in diesem bei RT aufgetaut und anschließend mit 0,5 ml Glasperlen für 4 min in 50 ml PPN-Röhrchen heftig geschüttelt. Dem Ansatz wurden 10 ml Chloroform zugesetzt, nach Zentrifugation (10.000 Upm, 15 min, 4°C, Beckmann Avanti30 Zentrifuge) und Phasentrennung die wässrige Phase in neue Gefäße überführt, dreimal mit dem gleichen Volumen TE-Phenol/Chloroform ausgeschüttelt, die RNA anschließend durch Zugabe von 1/3 Volumen 8 M Li-Acetat für 2 h bei 0°C gefällt und durch Zentrifugation (wie oben) pelletiert. Das Pellet wurde zweimal mit RNA-Waschlösung gewaschen, nach Trocknung in 200-400 µl H<sub>2</sub>O<sub>bid.</sub> oder RNA-Lagerpuffer aufgenommen und bei -80°C gelagert. Zur Kontrolle und Konzentrationsabschätzung wurde standardmäßig 1 µl auf einem 1%igen TBE-Agarosegel aufgetrennt und photometrisch bei 260 nm gemessen.

**RNA-Lysepuffer:**

Unter ständigem Rühren 40 ml Lösung 2 (12% (w/v) Natrium-p-Aminosäure in  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bid}}$ , frisch ansetzen) langsam in 40 ml Lösung 3 (2% (w/v) tri-iso-Propyl-naphthalensulfonat in  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bid}}$ , frisch ansetzen) tropfen lassen, dann 20 ml Lösung 1 (1 M Tris-Cl, pH 8,5; 1,25 M NaCl; 250 mM EGTA in  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bid}}$ ) zugeben. Bei der Zugabe von Lösung 1 kann der Lysepuffer trüb oder flockig werden. Der pH wird mit NaOH auf 8,9

eingestellt. Ist der Lysepuffer trübe bzw. bildet sich ein Niederschlag, so muss er auf Eis so lange gerührt werden, bis er wieder klar wird. Vor Gebrauch kann der Lysepuffer filtriert werden; er ist auf Eis einen Tag haltbar.

**RNA-Waschlösung:**

300 mM Na-Acetat, pH 5,3  
70% (v/v) Ethanol  
in  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bid}}$ .

**4.3.2 Auftrennung und Nachweis von Nukleinsäuren****Denaturierende Gelelektrophorese von RNA**

Eine Denaturierung der RNA durch eine Behandlung mit Glyoxal und DMSO erreicht werden. Diese Methode hat gegenüber der häufig verwendeten Formamid/Formaldehyd-Denaturierung den Vorteil, bei der Gelelektrophorese eine deutlich bessere Auftrennung der Fragmente zu bieten. Die RNA-Probe (5-15  $\mu\text{g}$ ) wurde dazu in 16  $\mu\text{l}$  MOPS-Puffer mit 1 M Glyoxal und 50% DMSO für 1 h bei 50°C denaturiert, mit 4  $\mu\text{l}$  RNA-Auftragspuffer versetzt und auf ein 1% MOPS-Agarosegel aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte bei 5-7 V/cm für 2 h, das Gel wurde alle 30 min im Puffer umgedreht und gleichzeitig die Elektrodenpolung vertauscht, um den pH-Wert des Puffers möglichst konstant zu halten. In der Regel wurden mehrere parallele Auftrennungen gleichzeitig durchgeführt.

**MOPS-Puffer:**

200 mM MOPS, pH 7,0  
80 mM Na-Acetat  
10 mM  $\text{Na}_2\text{-EDTA}$   
in  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bid}}$ .

**RNA-Auftragspuffer:**

50% (w/v) Saccharose  
0,25% (w/v) Bromphenolblau  
0,25% (w/v) Xylencyanol FF  
in MOPS-Puffer

**Transfer von DNA (Southern-Blot)**

Diese Methode ist modifiziert nach Southern (1975). Der Transfer der aufgetrennten DNA-Fragmente auf ein Agarosegel auf eine Nylonmembran erfolgte durch Kapillar-Blot. Hierbei wird die Transfer-Lösung (0,4 M NaOH) aus einem Pufferreservoir über Kapillarkräfte durch das Gel hindurch in einen auf dem Gel platzierten Stapel Papierhandtücher gesaugt. Die DNA-Fragmente werden durch den Pufferstrom aus dem Gel eluiert und binden an die darüberliegende Nylonmembran (Hybond- $\text{N}^+$ , Amersham Pharmacia Biotech). Vor dem Transfer wurde das Agarosegel für 15 min in 0,25 M HCl inkubiert, um einen Teil der Purine abzuspalten, damit ein Transfer großer DNA-Fragmente erleichtert wird. Anschließend wurde das Gel für 15 min in DENAT-Lösung inkubiert. Der Kapillar-Blot erfolgte in der Regel über Nacht, mindestens aber für 2 h.

**DENAT-Lösung:**

1,5 M NaCl  
0,4 M NaOH  
in  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bid}}$ .

**Transfer von RNA (Northern-Blot)**

Der Transfer der Nukleinsäuren auf eine Nylonmembran (Hybond- $\text{N}^+$ , Amersham Pharmacia Biotech) erfolgte durch Kapillar-Blot in 20x SSC über Nacht. Vor dem Transfer wurden die MOPS-RNA-Gele für 15 min in 20x SSC äquilibriert. Anschließend wurde die Membran getrocknet und die RNA-Moleküle

durch UV-Bestrahlung (302 nm, 120 mJ/cm<sup>2</sup>) kovalent mit der Membran verknüpft. Ein Nachweis der transferierten 18S- und 28S-rRNA-Banden auf der Membran wurde mittels Färbung mit Methylblau (200 mg/l in 300 mM Na-Acetat) durchgeführt. Dazu wurde die Membran in der Färbelösung 5 min inkubiert, anschließend mit H<sub>2</sub>O gewaschen, getrocknet und das Bandenmuster photographisch dokumentiert.

20x SSC:

- 300 mM Na-Citrat, pH 7,0
- 3 M NaCl
- in H<sub>2</sub>O<sub>bid.</sub>

### Spezifischer Nachweis immobilisierter Nucleinsäuren

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

Hybridisierungspuffer:

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

Waschpuffer:

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

### Herstellung von Hybridisierungssonden für Northern-Analysen

Doppelsträngige Hybridisierungssonden wurden mit dem NEBlot Kit (NEB Biolabs) unter Verwendung von α<sup>32</sup>P-dCTP hergestellt. Überschüssige Nucleotide und Oligonucleotide wurden durch Aufreinigung über Microspin S-200 Säulchen entfernt. Dabei wurden folgende DNA-Fragmente eingesetzt:

*bW/bE* und *kon8*

- ein 2.598 bp *PvuII*-Fragment aus pbW2-NdeI-bE1

*lga2* ein *EcoRI*-Fragment aus pCR-Iga2

*dik6* ein 579 bp *EcoRI*-Fragment aus pCR-dik6

*egl1* ein 582 bp *EcoRI*-Fragment aus pCR-egl1

*rep1* ein 459 bp *EcoRI*-Fragment aus pCR-rep1

*mfa1* ein 675 bp *EcoRV*-Fragment aus

pSP4,2EcoRV

*mfa2* ein 386 bp *SpeI/PstI*-Fragment aus

pTza2Xhol3,5#3

*gfp* ein 726 bp *NdeI/NotI*-Fragment aus pRU4

*myc* ein 120 bp *BamHI*-Fragment aus pCK152

*ip* ein 1.884 bp *EcoRI/HindIII*-Fragment aus

pRU4

*ppil* ein 165 bp *EcoRI*-Fragment aus pCR-ppi1

*act1* ein 1,2 kb *EcoRI/SphI*-Fragment aus pELiv64

*big1-6*, *brg1-2*, *exc1*, *pdi1*, *pkc1* und *frbX*

die *EcoRI*-Fragmente aus den jeweiligen pCR-Topo-Klonen

*phc1* ein 1.977 bp *SacII/NcoI*-Fragment aus dem

3,2 kb *PstI*-Subklon aus dem Cosmid 1C12

*frb110-5'*

ein 504 bp *BamHI/SacI*-Fragment aus SAN3393

*frb110-3'*

ein 380 bp *XbaI/PstI*-Fragment aus SAN3392

*orf1* ein 988 bp *XbaI/BamHI*-Fragment aus

SAN3329

*orf2* ein 541 bp *SacI/PstI*-Fragment aus SAN3400

*orf3* ein 1.387 bp *BamHI*-Fragment aus SAN3291

*orf4* ein 1.916 bp *SacI*-Fragment aus SAN3366

Die einzelsträngigen Sonden *frb110*<sup>+</sup> und *frb110*<sup>-</sup> wurden mittels linearer PCR hergestellt. Dazu wurde aus pFRB110 das 1.019 bp *EcoRI*-Fragment isoliert, welches das *frb110*-Amplicon enthält, und als Matrize eingesetzt. Für die Sonde zur Detektion des Plus-Stranges wurde das Oligonucleotid OAN75 ver-

wendet, im Fall des Minus-Stranges OCH18 (jeweils 1  $\mu\text{M}$ ). Nukleotide wurden in einer Endkonzentration von 50 nM eingesetzt, als radioaktives Nukleotid wurde pro Reaktion 50  $\mu\text{Ci}$   $\alpha^{32}\text{P}$ -dATP verwendet, was etwa einer Endkonzentration von 500 nM entspricht. Die Reaktion wurde in insgesamt 40 Zyklen durchgeführt. Überschüssige Nukleotide und Oligonukleotide wurden durch Aufreinigung über Microspin S-200 Säulchen entfernt.

Zur Herstellung einer 18S-rRNA-spezifischen Sonde wurde ein Oligonukleotid mit der Sequenz:

ACG GGT TGA CAT TTT GTT GGC CCC T

durch Phosphorylierung des 5'-Endes radioaktiv markiert. Dabei wurden 10 pmol Oligonukleotid mit 50  $\mu\text{Ci}$   $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP und 10 U T4-Polynukleotid Kinase (NEB Biolabs) für 45 min bei 37°C in PNK-Puffer (10 mM Tris-Cl, pH7,5; 50 mM NaCl, 10 mM  $\text{MgCl}_2$ ; 2 mM DTT) inkubiert. Überschüssige Nukleotide wurden durch Aufreinigung über Microspin G-25 Säulchen entfernt.

## Expressionsanalyse mit Dot-Blot-Hybridisierung

Diese Technik wurde zur schnellen Voranalyse der aus dem RNA-Fingerprint gewonnenen Klone benutzt. Dazu wurden die Amplicons mit den jeweiligen im RNA-Fingerprint verwendeten Oligonukleotiden in einer 96well-Mikrotiterplatte vervielfältigt und pro Spot ungefähr 15 ng Fragment mittels eines BioGrid Roboters (BioRobotics) auf geladene Hybond-XL Nylonmembranen (Amersham Pharmacia Biotech) aufgebracht. Die Membranen wurden vor dem Beladen mit DENAT-Lösung inkubiert. Danach wurden die Membranen durch Inkubation in RENAT-Lösung neutralisiert, getrocknet und die DNA durch UV-Behandlung (302 nm, 120  $\text{mJ}/\text{cm}^2$ ) mit der Membran kovalent vernetzt. Vorhybridisierung der Membranen erfolgte für 1 h bei 65°C in Church-Hybridisierungspuffer, Hybridisierung in 15 ml Church-Hybridisierungspuffer mit ca.  $4 \times 10^6$  cpm/ml Hybridisierungssonde für 36 h bei 65°C. Die Membranen wurden zweimal für je 1 h bei 65°C mit 50 ml Church-Waschpuffer gewaschen, danach für 72 h auf Phosphorscreens (Molecular Dynamics) aufgelegt und mit einem STORM840 Phosphorimager (Molecular Dynamics) eingelesen.

Auf den Membranen wurden die Fragmente in jeweils 4 Parallelen getropft, zusammen mit Fragmenten aus bekannten Genen (zur Kontrolle) bzw. Fragmenten aus dem RNA-Fingerprint Testansatz. Insgesamt wurden 16 Membranen hergestellt. Die Hybridisierungssonden wurden aus den acht, für den RNA-Fingerprint-Ansatz verwendeten cDNA-Präparationen mit dem NEBlot Kit (NEB Biolabs) hergestellt, und jeweils 2 Membranen mit einer Sonde hybridisiert. Die Ergebnisse zwischen zwei Membranen einer Sonde bzw. zwischen den beiden Sonden aus den zwei parallelen cDNA-Präparationen stimmten sehr gut überein. Für die Auswertung wurden pro Filter aus den vier Spots pro Fragment ein repräsentativer Spot ausgesucht, der keine unspezifischen Hybridisierungssignale in der Nähe aufwies, und von diesem Signal der Hintergrund des jeweiligen Filters abgezogen (in IMAGEQUANT, Molecular Dynamics). Für jeden Zustand wurden so pro Fragment vier Werte erhalten, von denen der Median für die weitere Auswertung ermittelt wurde, um den Effekt eventueller großer Abweichungen auf einer der Membranen zu eliminieren. Die Medianwerte aus allen vier untersuchten Zuständen pro Fragment wurden gegeneinander normalisiert. Dazu wurden die Mittelwerte der genauso berechneten Signale für *nar1*, *bw*- und *bE*-Fragmente, die sich zur Kontrolle auf den Membranen befanden, hergenommen. Die relative Signalstärke bei diesen drei Fragmenten stimmte sehr gut miteinander überein. Alle diese Berechnungen wurden mit dem Programm EXCEL 98 (Microsoft) durchgeführt.

### RENAT-Lösung:

500 mM Tris-Cl, pH 7,2  
1,5 M NaCl  
in  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bid}}$ .

### Church-Hybridisierungspuffer:

500 mM Na-Phosphat-Puffer, pH 7,2  
1 mM  $\text{Na}_2\text{-EDTA}$   
7% (w/v) SDS  
in  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bid}}$ .

### Church-Waschpuffer:

40 mM Na-Phosphat-Puffer, pH 7,2  
0,1% (w/v) SDS  
in  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bid}}$ .

### 4.3.3 Sequenz- und Strukturanalyse

#### Sequenzierung von DNA

DNA wurde mit einem ABI 377 Sequenzierautomat von Perkin Elmer sequenziert. Vor der automatischen Sequenzierung wurde die DNA mit dem JETquick-Kit (Genomed) aufgereinigt. Die Sequenzreaktion wurde mit 35 Zyklen und unter Verwendung des BigDye-Kits nach Angabe des Herstellers (ABI) durchgeführt. Das Prinzip entspricht der Didesoxy-Methode nach Sanger *et al.* (1977): In den Reaktionsansatz werden ddNTPs gegeben, durch deren Einbau ein Kettenabbruch erfolgt. Die verschiedenen Basen sind mit unterschiedlichen Fluoreszenz-Farbstoffen markiert. Nach der Sequenzreaktion wurde die DNA gefällt. Das getrocknete Pellet wurde in 4 µl Formamid mit 25 mM Na<sub>3</sub>-EDTA, pH 8,0 aufgenommen und 5 min bei 95°C aufgeköcht. Ein 1,5 µl Aliquot wurde anschließend auf das Gel aufgetragen. Die Banden wurden nach der Auftrennung in einem Sequenzgel und Anregung durch einen Laser von einer Photozelle detektiert. Die erhaltenen Daten wurden mit der Software des ABI377 Systems auf einem Apple Macintosh ausgewertet und die so erhaltenen Sequenz-Rohdaten konnten zur weiteren Bearbeitung in das Programm SEQUENCENAVIGATOR (ABI) exportiert werden.

#### Sequenz- und Strukturanalyse

Es wurden folgende Programme benutzt:

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

**DNA-STRIDER 1.3** (Marck, 1988; Douglas, 1995) zur Erstellung und zur Bearbeitung von Plasmid- und genomischen Sequenzen; wichtig vor allem zur Vorbereitung von Klonierungsschritten.

**BLAST2** (Altschul *et al.*, 1990; 1997; Gish und States, 1993; Madden *et al.*, 1996) zur Identifikation ähnlicher Proteine oder DNA-Sequenzen in den öffentlichen Datenbanken.

**PROPSEARCH** (Hobohm und Sander, 1995) zur Identifikation ähnlicher Proteine bzw. Proteinfamilien nach einem Algorithmus, der Proteinparameter wie z. B. Aminosäure-Zusammensetzung, mole-

kulare Masse, Hydrophobizität und Ladung berücksichtigt.

**SMART** (Schultz *et al.*, 1998; 2000) zur Identifikation konservierter Domänen in Proteinen, bzw. zur Identifikation von Proteinen mit ähnlichen Domänen oder ähnlicher Domänenstruktur.

**PSORT2** (Nakai und Kanehisa, 1992; Horton und Nakai, 1996; 1997; Nakai und Horton, 1999) zur Vorhersage der subzellulären Lokalisierung von Proteinen.

**SIGNALP** (Nielsen *et al.*, 1997a; 1997b) zur Identifikation N-terminaler Signalpeptide.

**NETPHOS** (Blom *et al.*, 1999) zur Vorhersage potentieller Serin-, Threonin- oder Tyrosin-Phosphorylierungsstellen in einem Protein.

**SAPS** (Brendel *et al.*, 1992) zur statistischen Analyse von Proteinen, z. B. in Bezug auf Hydrophobizität, Ladungsverteilung oder repetitive Elemente.

**COILS** (Lupas *et al.*, 1991) zur Identifikation von Coiled-Coil Regionen in einem Protein nach dem Algorithmus von Lupas.

**PAIRCOIL** (Berger *et al.*, 1995) zur Identifikation von Coiled-Coil Regionen in einem Protein nach dem Algorithmus von Berger.

**PESTFIND** (Rogers *et al.*, 1986; Rechsteiner und Rogers, 1996) zur Identifikation von PEST-Sequenzen in einem Protein

**PREDICTPROTEIN** (Rost, 1996) zur Sequenzanalyse und Strukturvorhersage von Proteinen.

**SWISSMODEL** (Peitsch, 1996; Guex *et al.*, 1999) zur Erstellung einer dreidimensionalen Modellstruktur von Proteinen anhand von Strukturdaten homologer Proteine.

**SWISS PDB-VIEWER 2.0** (Guex und Peitsch, 1997) zur Betrachtung und Analyse von dreidimensionalen Proteinstrukturen.

**RASMOL 2.6** (Sayle und Milner-White, 1995) zur Darstellung von dreidimensionalen Proteinstrukturen.

**CHIME 2.6** (MDL Informations Systems, Inc.) zur Darstellung und Analyse von dreidimensionalen Molekülstrukturen.

**PROTEIN EXPLORER 1.80β** (<http://www.umass.edu/microbio/chime/explorer>) zur einfacheren Analyse von Proteinstrukturen in CHIME 2.6.

**CLUSTALW** (Eddy, 1995) und **CLUSTALX** (Heringa, 1999) zum Vergleich und aneinander Anpassen

(Alignment) mehrerer Protein- oder DNA-Sequenzen.

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

### 4.3.4 PCR-Techniken

#### Standard-PCR-Ansätze

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

94/2-1UTaq-94/1-[94/0,5-65/1-72/1] $\times$ 30-72/5

Für die Darstellung von PCR-Protokollen wird eine vereinfachte Schreibweise verwendet: 94/2-1UTaq-94/1-[94/0,5-65/1-72/1,5] $\times$ 30-72/5 bezeichnet z. B. ein Protokoll mit Denaturierung bei 94°C für 2 min, Zugabe von 1 U *Taq* DNA-Polymerase ("Hot-Start"), Denaturierung bei 94°C für 1 min, 30 Zyklen mit jeweils 30 sec Denaturierung bei 94°C, 1 min Annealing bei 65°C und 1,5 min Elongation bei 72°C, mit einer abschließenden Elongationsphase von 5 min bei 72°C.

Bei Benutzung anderer Oligonukleotide oder Herstellung längerer Amplifikate mussten die Hybridisierungstemperatur bzw. die Elongationszeit entsprechend angepasst werden. Bei schwierigen Ansätzen wurde außerdem die Konzentration der  $\text{Mg}^{2+}$ -Ionen optimiert (die wichtigsten Parameter einer PCR-Reaktion sind die Temperatur, bei der die Oligonukleotide binden und die Konzentration von  $\text{Mg}^{2+}$ -Ionen). PCR-Ansätze mit *Pfu* DNA-Polymerase wurden in der Regel genauso durchgeführt, allerdings in dem entsprechenden Reaktionspuffer. Es wurden die PCR-Geräte OmniGene (Hybaid), PTC100 (MJ Research) und Robocycler Gradient96 (Stratagene) verwendet.

PCR-Puffer (*Taq* DNA-Polymerase):

10 mM Tris-Cl, pH 8,3  
50 mM KCl  
1,5 mM  $\text{MgCl}_2$   
in  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bid}}$ .

PCR-Puffer (*Pfu* DNA-Polymerase):

20 mM Tris-Cl, pH 8,8  
10 mM KCl  
10 mM  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$   
2 mM  $\text{MgSO}_4$   
1% (v/v) Triton X-100  
1 mg/ml BSA  
in  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bid}}$ .

#### Ganz-Zell-PCR aus *E. coli*-Zellen

Zur einfachen Überprüfung von Transformanten kann man eine PCR direkt aus *E. coli*-Zellen durchführen. Dabei wurden Einzelkolonien in 100  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}_{\text{bid}}$  resuspendiert und davon jeweils 1,5  $\mu\text{l}$  zu einem 50  $\mu\text{l}$  Reaktionsansatz gegeben. Der einzige Unterschied zu Standard-PCR-Ansätzen bestand in einer längeren initialen Denaturierungszeit (5-10 min), um ein Platzen der *E. coli*-Zellen zu erreichen. Für den Nachweis der Insertion von PCR-Fragmenten in den Vektor pCR-Topo wurden die Oligonukleotide UNI24 und REV24 bzw. OAN104 und OAN105 verwendet.

#### Ganz-Zell-PCR aus *U. maydis*-Zellen

Dieselbe Technik kann man ebenfalls zur Untersuchung von *U. maydis*-Transformanten einsetzen. Diese Technik hat sich als zuverlässiges Mittel zur Vorauswahl richtiger Transformanten erwiesen. Es sind jedoch einige Punkte zu beachten: (1) das Zellmaterial sollte frisch sein, idealerweise als drei Tage alte Kolonie von einer PD-Platte, (2) es sollte nicht zuviel Material eingesetzt werden, idealerweise eine Kolonie mit einem Durchmesser von etwa 1 mm,

(3) die Amplifikation von Fragmenten, die länger als 1,5 kb sind, verläuft generell relativ schlecht und nicht immer reproduzierbar, die Amplifikatlängen sollten daher zwischen 200 und 500 bp liegen, (4) die Elongationszeiten müssen für eine erfolgreiche Amplifikation gegenüber Standard-PCR-Ansätzen verdoppelt werden, und (5) kommt es immer wieder zum Ausfall einzelner Reaktionen. Aus diesem Grund wurden diese Analysen so durchgeführt, dass sich im Fall einer erfolgreichen Transformation kein Amplifikat ergeben sollte, dagegen im Wildtyp eine Bande erkennbar war. Mit allen Klonen, die im Ansatz kein Amplifikat zeigten, wurde weitergearbeitet. Durch diese Vorgehensweise gehen potentiell richtige Transformanten, bei denen die PCR-Reaktion nicht funktioniert hat, nicht verloren. Die Ansätze wurden genauso durchgeführt wie im Fall der Ganz-Zell-PCR in *E. coli*. In der Regel wurden zwei bis drei PCR-Runden durchgeführt, wobei nach der Analyse die potentiell richtigen Klone jedesmal wieder aus den Zellsuspensionen heraus auf PD-Platten neu vereinzelt wurden. Abschließend wurden die Transformanten durch Southern-Analyse bestätigt. Es wurden folgende Kombinationen an Oligonukleotiden eingesetzt:

<i>ip</i> -Locus:	OAN74/OAN75 OAN74/OAN76 OAN77/OAN78
<i>b</i> -Locus:	OAN23/OAN24
<i>a2</i> -Locus:	OAN178/OAN179
<i>a1</i> -Locus:	OAN210/OAN211
<i>mfa2</i> :	OAN245/OAN246
<i>frb52</i> :	OAN233/OAN234
<i>frb110</i> :	OAN235/OAN236
<i>kpp6</i> :	OAN162/OAN121
<i>big6</i> :	OAN79/OAN80
<i>pkc1</i> :	OAN82/OAN83
<i>phc1</i> :	OAN170/OAN171
<i>prf1</i> :	OAN221/OAN222
<i>nar1</i> :	OAN30/OAN31
<i>pyr6</i> :	OAN87/OAN88

### Gerichtete PCR-Mutagenese

Für die gerichtete PCR-Mutagenese zur Erzeugung interner Punktmutationen (z. B. bei der Herstellung der *kpp6-K220R* und *kpp6-T355A,Y357F* Allele) wurde eine Modifikation der sogenannten "Megapri-

mer"-Technik (Chen und Przybyla, 1994) verwendet. Dabei wurde zunächst ein kurzes (100-200 bp langes) PCR-Fragment erzeugt, wobei mit einem der beiden Oligonukleotide die gewünschte Mutation eingefügt wurde. Dieses Fragment, der sogenannte "Megapri-mer", wurde in einem zweiten PCR-Ansatz zusammen mit einem weiteren Oligonukleotid eingesetzt, so dass ein gewünschte Mutation in der Mitte des so entstandenen Amplifikats liegt. Abschließend wurde dieses Fragment an internen Restriktions-Schnittstellen geschnitten und kloniert. Die Konzentration des Megaprimers in der zweiten Reaktion ist ein kritischer Parameter. Standardmäßig wurden jeweils zwei Ansätze mit 400 nM und 40 nM Megapri-mer parallel angesetzt. Dabei wurde in der Regel *Pfu* DNA-Polymerase verwendet, um eine geringere Fehlerrate zu erreichen.

### Techniken zur Bestimmung von mRNA-Enden

Für die Bestimmung von 5'- und 3'-Enden von mRNA-Molekülen wurden verschiedene Techniken angewendet. Am einfachsten war dabei die Amplifikation der Enden aus cDNA-Bibliotheken, wie z. B. der  $\lambda$ gt10-Bank oder der freireplizierenden cDNA-Bank. Während bei der ersten die Orientierung der inserierten Fragmente nicht festgelegt ist, sind die cDNA-Moleküle in der zweiten Bibliothek für Voll-länge-Fragmente angereichert und gerichtet kloniert. Die Amplifikationen wurden in jeweils zwei Schritten durchgeführt, wobei die erhaltenen Fragmente aus der ersten Reaktion in einem zweiten Ansatz mit intern gelegenen Oligonukleotiden reamplifiziert wurden. In Fällen, in denen sich kein eindeutiges Bandenmuster zeigte, wurden die aufgetrennten Fragmente auf Nylonmembranen transfertiert und mit einer Gen-spezifischen Sonde hybridisiert. Die Oligonukleotide für die Amplifikationen waren im Fall der  $\lambda$ gt10-Bank OAN180 und OAN181 bzw. OAN182 und OAN183, im Fall der freireplizierenden cDNA-Bank OGW54 und OGW55 bzw. OGW56 und OGW57.

In einigen Fällen wurden die mRNA-Enden auch direkt mittels 3'- bzw. 5'-RACE bestimmt (Ausubel *et al.*, 1987; Sambrook *et al.*, 1989). Im Fall der 3'-RACE wurde die mRNA mit dem Oligonukleotid OAN217 revers transkribiert. Dieses Oligonukleotid weist an seinem 3'-Ende eine oligo (dT)<sub>24</sub>-Sequenz und an seinem 5'-Ende eine spezifische 21 bp Nukleotidsequenz auf, so dass die entstandenen cDNA-

Moleküle am 3'-Ende mit internen Oligonukleotiden und pET-term bzw. OAN219 amplifiziert werden können. Im Fall der 5'-RACE wurde die cDNA-Synthese mit oligo (dT)<sub>18</sub> durchgeführt und an die entstandenen Moleküle mit Terminaler Transferase Guanin-Nukleotide angefügt. Anschließend wurden die Moleküle mit dem Oligonukleotid OAN218 in einem linearen PCR-Ansatz eingesetzt. Dieses Oligonukleotid weist an seinem 3'-Ende eine oligo (dC)<sub>15</sub>-Se-

quenz und an seinem 5'-Ende eine spezifische 21 bp Nukleotidsequenz auf, so dass die entstandenen cDNA PCR-Produkte anschließend am 5'-Ende mit internen Oligonukleotiden und pET-term bzw. OAN219 amplifiziert werden können.

Für die spezifische Amplifikation von Volllänge-cDNA-Molekülen wurde der FirstChoice RLM-RACE Kit von Ambion verwendet.

### 4.3.5 Isolierung von Proteinen

Gesamt-Protein aus *U. maydis* wurde entweder aus etwa 200 ml Flüssigkultur bei OD<sub>600</sub> = 0,5 oder von 2 rechteckigen (12 x 12 cm) Festmedienplatten, auf denen die Zellen mit 0,1 OD<sub>600</sub>/cm<sup>2</sup> ausgestrichen und dann 24 h bei 29°C kultiviert wurden, durchgeführt. Im Fall der Flüssigkulturen wurden die Zellen pelletiert (3.000 Upm, 10 min, 4°C, Heraeus Varifuge 3.0R), in 5 ml Proteinpuffer aufgenommen, erneut abzentrifugiert (3.000 Upm, 5 min, 4°C, Heraeus Varifuge 3.0R) und schließlich in 1 ml Proteinpuffer mit Proteinase-Inhibitoren aufgenommen. Diese Suspension wurde in die mit flüssigem Stickstoff vorgekühlten Metallbecher der Zelmühle überführt, in denen sich zwei kleine Metallkugeln befanden. Im Fall der Präparation von Festmedien wurden die Zellen von den Platten abgekratzt, direkt in die Becher gegeben und 1 ml Proteinpuffer mit Proteinase-Inhibitoren zupipettiert. Die Zellen wurden in der Zelmühle zweimal für 5 min bei einer Frequenz von 30 pro Sekunde geöffnet, wobei die Becher dazwischen mit flüssigem Stickstoff gekühlt wurden. Anschließend wurde gewartet, bis die Suspension aufgetaut aber noch kalt war, und in frische Eppendorf-Gefäße auf Eis pipettiert. Unlösliche Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation pelletiert (22.000 Upm, 30 min, 4°C, Beckman Avanti30), der Überstand in ein neues Re-

aktionsgefäß überführt, mit 6x Probenpuffer versetzt und 5 min bei 95°C inkubiert. Diese Proben wurden bei -20°C gelagert. Zur Mengenbestimmung wurden vor der Zugabe von Probenpuffer Aliquots abgenommen und mit dem BCA Protein Assay Kit (Pierce) die Proteinkonzentration bestimmt.

#### Proteinpuffer:

100 mM PIPES, pH 6,9  
5 mM MgSO<sub>4</sub>  
1 mM Na<sub>2</sub>-EDTA  
1 mM Na<sub>2</sub>-EGTA  
in H<sub>2</sub>O<sub>bid</sub>.

#### Proteinase-Inhibitoren:

234,4 µg/ml Pefabloc (Roche)  
1 Tablette/50 ml Complete EDTA-free (Roche)

#### Probenpuffer (6x):

300 mM Tris-Cl, pH 8,0  
30% (v/v) Glycerin  
20% (w/v) SDS  
0,5 g/l Bromphenolblau  
15% (v/v) β-Mercaptoethanol (frisch zugeben)  
in H<sub>2</sub>O<sub>bid</sub>.

### 4.3.6 Auftrennung und Nachweis von Proteinen

#### SDS-Gelelektrophorese von Proteinen

Es wurde die Methode der diskontinuierlichen SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese angewendet (Laemmli, 1970). Proteinextrakte werden dabei unter

denaturierenden Bedingungen elektrophoretisch ihrer Molekülmasse entsprechend aufgetrennt. Dabei wird zwischen zwei vertikale Glasplatten ein 1 mm dickes Trenngel und darüber ein weitmäschigeres Sammelgel gegossen. Die Proteine werden an der Grenze der Gele aufgrund des pH-Sprungs verdichtet und an-

schließend nach ihrer Größe aufgetrennt. Durch dieses diskontinuierliche System wird eine höhere Bandenschärfe erzielt. Es wurden in der Regel 100 µg Proteinextrakt in einer Mini Proteom II Apparatur (Biorad) bei 200V für 1 h aufgetrennt. Für die Auftrennung von Proteinextrakten mit GFP bzw. GFP-Derivaten wurden 15%ige Trenngele, für die Auftrennung von Extrakten mit Epitop-markierten Kpp6-Varianten 10%ige Trenngele verwendet. Zur Detektion der Proteinbanden und des Größenmarkers wurden die Gele nach der Auftrennung für 10 min in Coomassie-Färbelösung gefärbt und anschließend in Entfärbelösung entfärbt, bis die Banden gut sichtbar waren.

**Proteingel-Laufpuffer:**

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

**Sammelgel:**

125 mM Tris-Cl, pH 6,8  
5% (w/v) Acrylamid  
0,13% (w/v) Bisacrylamid  
0,1% (w/v) SDS  
0,1% (w/v) Ammoniumpersulfat  
0,1% (v/v) TEMED  
in H<sub>2</sub>O<sub>bid.</sub>

**Trenngel:**

375 mM Tris-Cl, pH 8,8  
10% bzw. 15% (w/v) Acrylamid  
0,27% (w/v) Bisacrylamid  
0,1% (w/v) SDS  
0,1% (w/v) Ammoniumpersulfat  
0,1% (v/v) TEMED  
in H<sub>2</sub>O<sub>bid.</sub>

**Coomassie-Färbelösung:**

0,25% (w/v) Coomassie Brilliant Blue R-250  
45% (v/v) Methanol  
10% (v/v) Essigsäure  
in H<sub>2</sub>O<sub>bid.</sub>

**Entfärbelösung:**

45% (v/v) Methanol  
10% (v/v) Essigsäure  
in H<sub>2</sub>O<sub>bid.</sub>

## Transfer von Proteinen (Western-Blot)

Die im Gel aufgetrennten Proteine wurden mittels eines Semi-Dry Elektro-Blots (UniEquip) in einem dreistufigen Puffersystem auf eine Nitrozellulose-Membran (Immobilon-P von Millipore) transferiert. Dabei wurde das Gel zunächst für 10 min in Kathodenpuffer äquilibriert und die Membran für 10 sec in Methanol aktiviert, mit H<sub>2</sub>O<sub>bid.</sub> gewaschen und mit Anodenpuffer 2 äquilibriert. Der Blot wurde folgendermaßen aufgebaut (von unten = Kathode nach oben = Anode): drei Whatman-Papiere, getränkt in Kathodenpuffer; das Polyacrylamidgel; die Nitrozellulose-Membran; ein Whatman-Papier, getränkt in Anodenpuffer 2; zwei Whatman-Papiere, getränkt in Anodenpuffer 1. Durch Anlegen der Spannung (1 h, 1 mA/cm<sup>2</sup>) wurden die Proteine auf die Membran transferiert.

**Anodenpuffer 1:**

300 mM Tris-Cl, pH 10,4  
15% (v/v) Methanol  
in H<sub>2</sub>O<sub>bid.</sub>

**Anodenpuffer 2:**

30 mM Tris-Cl, pH 10,4  
15% (v/v) Methanol  
in H<sub>2</sub>O<sub>bid.</sub>

**Kathodenpuffer:**

25 mM Tris-Cl, pH 9,4  
40 mM ε-Aminocaprinsäure  
15% (v/v) Methanol  
in H<sub>2</sub>O<sub>bid.</sub>

## Nachweis von immobilisierten Proteinen

Der immunologische Nachweis von Proteinen erfolgte mit Hilfe der an die sekundären Antikörper gekoppelten Meerrettich-Peroxidase (HRP). Dazu wurde die Nitrozellulose-Membran nach dem Elektro-Blot zunächst für 1 h mit 5% Magermilchpulver in TBST geblockt. Anschließend wurde die Membran zweimal für 10 min mit TBST gewaschen und für 1 h mit dem primären Antikörper, verdünnt in TBST, inkubiert. Nach dreimaligem Waschen für 10 min mit TBST wurde die Membran für 45 min mit dem sekundären Antikörper, verdünnt in TBST mit 0,5% Magermilchpulver, inkubiert. Abschließend wurde

die Membran dreimal für 10 min mit TBST und dreimal für 10 min mit PBS gewaschen. Es wurden folgende Antikörper verwendet: monoklonaler Maus anti-GFP (1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ , Roche, in einer Verdünnung von 1:2.000) mit Ziege anti-Maus (HRP-gekoppelt, Promega, in einer Verdünnung von 1:4.000); polyklonaler Hase anti-Myc A14 (0,2  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ , Santa Cruz, in einer Verdünnung von 1:200) mit Ziege anti-Hase (HRP-gekoppelt, NEB Biolabs, in einer Verdünnung von 1:2.000). Bei Verwendung des häufig benutzten monoklonalen anti-Myc Antikörpers 9E10 zeigten sich kreuzhybridisierende Banden auf der Höhe von Kpp6, deshalb musste auf den A14-Antikörper ausgewichen werden.

Zur Detektion wurden die frisch angesetzten Lösungen ECL I und ECL II zu gleichen Teilen gemischt, auf der Membran verteilt, diese nach 1 min kurz abgetrocknet, in einen Plastikbeutel gelegt, damit ein Röntgenfilm belichtet und dieser entwickelt. Je nach Signalstärke waren nach 1 sec bis 1 h Exposition deutliche Banden zu erkennen.

**TBST:**

20 mM Tris-Cl, pH 7,6  
136 mM NaCl  
0,05% (v/v) Tween 20  
in  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bid}}$ .

**PBS:**

20 mM Na-Phosphat-Puffer, pH 7,0  
150 mM NaCl  
1 mM  $\text{Na}_2\text{-EDTA}$   
in  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bid}}$ .

**ECL I:**

100 mM Tris-Cl, pH 8,0  
0,44% (v/v) p-Coumarinsäure (Sigma) in DMSO  
1% (v/v) Luminol (Fluka) in DMSO  
in  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bid}}$ .

**ECL II:**

100 mM Tris-Cl, pH 8,0  
0,018% (v/v)  $\text{H}_2\text{O}_2$   
in  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bid}}$ .

## 4.4 Die Technik des nichtradioaktiven RNA-Fingerprints

Diese Methode ist eine modifizierte Version des Standard RNA-Fingerprints (Welsh *et al.*, 1992), das wiederum eine Variante des bekannteren Differential Displays (Liang und Pardee, 1992) ist. Unter Berücksichtigung der Modifikationen von Friedel *et al.* (1997) wurde diese Methode im Rahmen der Arbeit

weiterentwickelt, so dass auf den Einsatz radioaktiv markierter Nucleotide und Polyacrylamid-Gele verzichtet werden konnte. In Abschnitt 2.1.2 und in der Diskussion wurde schon auf die Vorteile dieser Methode gegenüber den bisher benutzten eingegangen.

### 4.4.1 Reverse Transkription

Pro Ansatz wurden 15 µg Gesamt-RNA eingesetzt. Dabei wurden jeweils zwei vollkommen unabhängige Parallelen durchgeführt (d. h. Anzucht und Induktion der Stämme und RNA-Präparation verliefen parallel). Die RNA wurde mit dem RNeasy-Kit (Qiagen) isoliert und anschließend mit DNaseI inkubiert, um DNA-Kontaminationen zu entfernen. Für die reverse Transkription wurden die 15 µg RNA zunächst mit 500 pmol oligo (dT)<sub>18</sub> in 62,5 µl H<sub>2</sub>O<sub>bid.</sub> für 10 min bei 70°C denaturiert, anschließend direkt auf Eis gegeben. Nach Zugabe von 20 µl RT-Puffer (5x, Gibco), 10 µl 0,1 M DTT und 4 µl 25 mM dNTPs wurde der Ansatz für 10 min bei Raumtemperatur und anschließend für 2 min bei 37°C inkubiert, 800 U Superscript II Reverse Transkriptase (Gibco) zugege-

ben (4 µl), und die Reaktion für 50 min bei 37°C durchgeführt. Danach wurde die Reverse Transkriptase 15 min bei 75°C inaktiviert, 2,5 µl einer 10 mg/ml RNaseA-Lösung zugegeben und dadurch die RNA für 30 min bei 37°C abgedaut. Mittels QiaQuick Spin Columns (Qiagen) wurden die noch vorhandenen Oligonucleotide und Nucleotide abgetrennt. Die cDNA-Moleküle wurden mit 100 µl 10 mM Tris-Cl, pH 8,5 eluiert und in Aliquots zu 10 µl bei -20°C gelagert. In Testansätzen zeigte sich, dass regelmäßig etwa 0,4% der eingesetzten RNA revers transkribiert wurde. Bei einem angenommenen Anteil von 1% mRNA in der Gesamt-RNA würde das bedeuten, dass etwa 40% der eingesetzten mRNA-Moleküle revers transkribiert werden würden.

### 4.4.2 PCR-Ansätze

Pro Ansatz wurden 0,5 µl der cDNA-Lösung aus dem ersten Schritt eingesetzt. Zusammen mit jeweils 20 pmol der beiden Primer und 0,1 µl einer 25 mM dNTP-Lösung wurden 19 µl Ansätze in Standard PCR-Puffer (für *Taq* DNA-Polymerase) hergestellt. In der Regel wurden zwölf Kombinationen von Oligonucleotiden mit jeweils acht cDNA-Populationen parallel in einer 96well PCR-Mikrotiterplatte durchgeführt. Die verwendeten Oligonucleotide haben beliebige Sequenzen, wobei es sich gezeigt hat, dass Sequenzen aus kodierenden Bereichen deutlich bessere Resultate ergaben. Aus diesem Grund wurden bevorzugt Oligonucleotide benutzt, die in anderen Versuchen bereits Verwendung gefunden hatten. Die Oligonucleotide waren 18 Nucleotide lang, mit 11 G oder C und 7 A oder T Basen, was einem GC-Gehalt von 61,1% entspricht. Sie wiesen keine Selbstkomplementarität und keine Komplementarität zueinander

auf, hatten am 3'-Ende eine G oder C Base und am 5'-Ende bevorzugt eine G Base, um ideale Bedingungen für die Klonierung mit dem TOPO TA Klonierungs-Kit (Invitrogen) zu schaffen. Es wurden folgende PCR-Bedingungen angewendet (zur Schreibweise siehe Abschnitt 4.3.4):

94/2-2UTaq-94/1-[94/1,5-50/3,5-72/3]x2-  
[94/1-65/1-72/1]x40-72/5

Wichtig war dabei vor allem die Anwendung eines "Hot-Start"-Protokolls, d. h. die Zugabe der *Taq* DNA-Polymerase erst nach Denaturierung des PCR-Ansatzes. Die verwendeten Bedingungen waren ideal für die Amplifikation aus cDNA von *U. maydis* und zur Erzeugung von 5-30 Amplicons einer Größe von 200-1200 bp. Für andere Zwecke und Ansätze müssen die initiale Hybridisierungstemperatur und die Elongationszeiten entsprechend angeglichen werden.

### 4.4.3 Gelelektrophoretische Auftrennung der Amplicons

Pro Ansatz wurden 7 µl der Reaktion elektrophoretisch über ein Agarosegel aufgetrennt. Die Gele enthielten 2% SeaKem LE Agarose (FMC), waren 20 x 20 cm groß, etwa 4 mm hoch, und die verwendeten Kämme waren 1 mm dick mit 50 Spuren (ca. 3 mm breit). Der Gel- und Laufpuffer war 0,5x TBE mit 5 µg/ml Ethidiumbromid. Die Auftrennung erfolgte für 3,5 h bei 6-7 V/cm und 8°C im Kühlraum. Die Gele wurden nach dem Lauf mit einer GelDoc 2000

Geldokumentations-Anlage (BioRad) unter UV-Licht analysiert und mit dem Programm MULTIANALYST (BioRad) ausgewertet.

TBE-Puffer (5x):

500 mM Tris-Borat, pH 7,9  
10 mM Na<sub>2</sub>-EDTA  
in H<sub>2</sub>O<sub>bid</sub>.

### 4.4.4 Extraktion und Klonierung der Amplicons

Amplicons, die zwischen den zu vergleichenden Ansätzen ein differentielles Muster aufwiesen wurden unter UV-Durchlicht aus den Gelen ausgeschnitten, durch eine Pipettenspitze mit Filtereinsatz zentrifugiert (8.000 Upm, 5 min, RT, Heraeus Biofuge 15) und anschließend 2 µl der extrahierten DNA mit Hilfe des TOPO TA Klonierungs-Kits (Invitrogen) in den Vektor pCR-Topo kloniert. Pro Amplicon wurden jeweils sechs Klone ausgewählt und mittels Ganz-Zell PCR unter Verwendung der Oligonukleotide UNI24 und REV24 oder OAN104 und OAN105

die inserierten DNA-Fragmente amplifiziert. Durch die gleichzeitige Restriktion mit den Enzymen *EcoRI*, *HinI* und *HinPII* und Auftrennung über ein 2%iges Agarosegel konnten für jeden Klon ein spezifisches Bandenmuster erzielt werden. Auf diese Weise war es möglich zu ermitteln, wie viele der Klone identische DNA-Fragmente inseriert hatten (ein Beispiel ist in Abbildung 47C im Anhang abgebildet). Für die weitere Analyse wurden für jedes Amplicon einer der am häufigsten vorkommenden Klone ausgewählt und das entsprechende Plasmid präpariert.

## 4.5 Biochemische Methoden

### 4.5.1 Gelretardations-Analyse

Die Bindung eines Proteins an ein DNA-Fragment kann anhand des veränderten Laufverhaltens in einem Polyacrylamid-Gel nachgewiesen werden. Die DNA-Fragmente wurden entweder durch PCR mit radioaktiven Nukleotiden oder Auffüllreaktionen an überhängenden Fragment-Enden, ebenfalls in Gegenwart radioaktiver Nukleotide markiert, dann zunächst über Microspin S-200 Säulchen die nicht eingebauten Nukleotide bzw. Oligonukleotide abgetrennt und die Sonden über ein Polyacrylamid-Gel aufgereinigt. Für die Reaktionsansätze wurden 5 µl 4x Retentionspuffer mit 10 µg BSA, 1 µg poly (dIdC) und 2 µl His-Kon8 Proteinlösung mit H<sub>2</sub>O<sub>bid</sub> in einem Volumen von insgesamt 18 µl für 10 min bei 25°C vorinku-

biert. Das Protein befand sich in Puffer E und es wurden jeweils drei Ansätze mit 0, 16 und 32 ng Protein durchgeführt. Anschließend wurden pro Ansatz 2 µl des radioaktiv markierten Fragments mit einer spezifischen Aktivität von ca. 20.000 cpm/µl zugegeben und für weitere 15 min bei 25°C inkubiert. Die Reaktionen wurden über native 3,5% Polyacrylamid-Gele mit einer Quervernetzung von 30:0,8 in 0,5x TBE-Puffer für 2,7 h bei 125 V aufgetrennt, getrocknet und auf einen strahlungssensitiven Phosphorimager-Screen aufgelegt. Die Auswertung erfolgte nach Exposition für mindestens 8 h auf einem STORM840 Phosphorimager (Molecular Dynamics) mit der IMAGEQUANT Software (Molecular Dynamics).

Retentionspuffer (4x):

100 mM Hepes, pH 7,9  
640 mM KCl  
8 mM Na<sub>2</sub>-EDTA  
40% (v/v) Glycerin  
4 mM DTT  
4 mM Pefabloc  
4x Complete (Roche)

Puffer E:

25 mM Hepes, pH 7,4  
80 mM KCl  
2 mM Na<sub>2</sub>-EDTA  
15% (v/v) Glycerin  
2 mM DTT

## 4.5.2 DNaseI-Protektionsexperimente

Die genaue Bindestelle eines Proteins auf der DNA kann durch "Footprinting"-Techniken ermittelt werden. Bei DNaseI-Protektionsexperimenten wird das Fragment partiell mit DNaseI geschnitten, so dass ca. alle 300 bp ein Einzelstrangbruch eingeführt wird. Ist die DNA durch ein Protein gebunden, dann ist dieser Bereich vor dem Zugriff durch DNaseI geschützt, was nach Auftrennung der erhaltenen Fragmente durch ein Ausbleiben von Einzelstrangbrüchen in dieser Region erkennbar ist.

Die zu untersuchenden DNA-Fragmente wurden mit Polynukleotid-Kinase an ihren 5'-Enden radioaktiv markiert und über ein Polyacrylamid-Gel gereinigt. Die Bindung erfolgte für 30 min bei 25°C in einem Gesamtvolumen von 20 µl. Dabei wurden 5 µl 4x Retentionspuffer, 100.000 cpm des Fragments, unterschiedliche Mengen an His-Kon8 in 4 µl Puffer E und BSA in einer Endkonzentration von 500 ng/µl eingesetzt. Im Fall des in Abbildung 13C und D dargestellten Experiments wurden insgesamt 0, 66, 200, 900 und 2.700 ng His-Kon8 verwendet. Nach Bindung des Proteins an die DNA wurde die DNaseI-Reaktion durch Zugabe von 2 µl DNaseI-Lösung (667 µg/µl in 120 mM MgCl<sub>2</sub>) gestartet und nach 15 sec Inkubation bei 25°C durch die Zugabe

von 80 µl Stopplösung (50 mM MgCl<sub>2</sub> und 0,5% (w/v) SDS in H<sub>2</sub>O<sub>bid</sub>) gestoppt. Die Reaktion wurde anschließend mit TE-Phenol/Chloroform extrahiert, die DNA mit Ethanol unter Zugabe von 40 µg Glykogen gefällt, mit 70%igem Ethanol gewaschen und schließlich in 5 µl Formamid-Puffer aufgenommen. Für die parallel durchgeführte Sequenzreaktion wurde der T7 DNA Sequencing Kit (Pharmacia) verwendet. Die Auftrennung erfolgte über ein denaturierendes 6%iges Polyacrylamid-Gel (2.000V für 1 h). Das Gel wurde nach dem Lauf für 15 min in H<sub>2</sub>O gewässert, für 1 h bei 80°C getrocknet und auf einen strahlungsensitiven Phosphorimager-Screen aufgelegt. Die Auswertung erfolgte nach Exposition für mindestens 12 h auf einem STORM840 Phosphorimager (Molecular Dynamics) mit der IMAGEQUANT Software (Molecular Dynamics).

Formamid-Puffer:

10 mM Na<sub>2</sub>-EDTA, pH 8,0  
0,25% (w/v) Bromphenolblau  
0,25% (w/v) Xylencyanol FF  
in Formamid

## 5. Literaturverzeichnis

- Abdallah, B.M., Simoes, T., Fernandes, A.R., Strauss, J., Seiboth, B., Sa-Correia, I. und Kubicek, C.P.** (2000) Glucose does not activate the plasma-membrane-bound H<sup>+</sup>-ATPase but affects *pmaA* transcript abundance in *Aspergillus nidulans*. *Arch Microbiol*, **174**, 340-345.
- Agrios, G.N.** (1997) *Plant Pathology*. Academic Press, San Diego.
- Alspaugh, J.A., Perfect, J.R. und Heitman, J.** (1998) Signal transduction pathways regulating differentiation and pathogenicity of *Cryptococcus neoformans*. *Fungal Gen Biol*, **25**, 1-14.
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. und Lipman, D.J.** (1990) Basic local alignment search tool. *J Mol Biol*, **215**, 403-410.
- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schaffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. und Lipman, D.J.** (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res*, **25**, 3389-3402.
- Andrews, D.L., Egan, J.D., Mayorga, M.E. und Gold, S.E.** (2000) The *Ustilago maydis* *ubc4* and *ubc5* genes encode members of a MAP kinase cascade required for filamentous growth. *Mol Plant Microbe Interact*, **13**, 781-786.
- Aquino-Pinero, E.E. und Rodriguez del Valle, N.** (1997) Different protein kinase C isoforms are present in the yeast and mycelium forms of *Sporothrix schenckii*. *Mycopathologia*, **138**, 109-115.
- Arellano, M., Valdivieso, M.H., Calonge, T.M., Coll, P.M., Duran, A. und Perez, P.** (1999) *Schizosaccharomyces pombe* protein kinase C homologues, pck1p and pck2p, are targets of rho1p and rho2p and differentially regulate cell integrity. *J Cell Sci*, **112**, 3569-3578.
- Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A. und Struhl, K.** (1987) *Current Protocols in Molecular Biology*. John Wiley & Sons, Inc., USA.
- Azzi, A., Boscoboinik, D. und Hensey, C.** (1992) The protein kinase C family. *Eur J Biochem*, **208**, 547-557.
- Bakkeren, G., Gibbard, B., Yee, A., Froeliger, E., Leong, S. und Kronstad, J.** (1992) The *a* and *b* loci of *Ustilago maydis* hybridize with DNA sequences from other smut fungi. *Mol Plant Microbe Interact*, **5**, 347-355.
- Bakkeren, G. und Kronstad, J.W.** (1993) Conservation of the *b* mating-type gene complex among bipolar and tetrapolar smut fungi. *Plant Cell*, **5**, 123-136.
- Bakkeren, G. und Kronstad, J.W.** (1994) Linkage of mating-type loci distinguishes bipolar from tetrapolar mating in basidiomycetous smut fungi. *Proc Natl Acad Sci USA*, **91**, 7085-7089.
- Bakkeren, G. und Kronstad, J.W.** (1996) The pheromone cell signaling components of the *Ustilago a* mating-type loci determine intercompatibility between species. *Genetics*, **143**, 1601-1613.
- Ballance, D.J.** (1990) Transformation system for filamentous fungi and an overview of fungal gene structure. In Leong, S.A. und Berka, R.M. (eds.), *Molecular and industrial mycology*, Vol. **8**. Marcel Dekker, New York.
- Banham, A.H., Asante-Owusu, R.N., Göttgens, B., Thompson, S.A.J., Kingsnorth, C.S., Mellor, E.J.C. und Casselton, L.A.** (1995) An N-terminal dimerization domain permits homeodomain proteins to choose compatible partners and initiate sexual development in the mushroom *Coprinus cinereus*. *Plant Cell*, **7**, 773-783.
- Banks, G.R., Shelton, P.A., Kanuga, N., Holden, D.W. und Spanos, A.** (1993) The *Ustilago maydis nar1* gene encoding nitrate reductase activity: sequence and transcriptional regulation. *Gene*, **131**, 69-78.
- Banuett, F.** (1992) *Ustilago maydis*, the delightful blight. *Trends Genet*, **8**, 174-180.
- Banuett, F.** (1995) Genetics of *Ustilago maydis*, a fungal pathogen that induces tumors in maize. *Annu Rev Genet*, **29**, 179-208.
- Banuett, F.** (1998) Signalling in the yeasts: an informational cascade with links to the filamentous fungi. *Microbiol Mol Biol Rev*, **62**, 249-274.
- Banuett, F. und Herskowitz, I.** (1989) Different *a* alleles of *Ustilago maydis* are necessary for maintenance of filamentous growth but not for meiosis. *Proc Natl Acad Sci USA*, **86**, 5878-5882.

- Banuett, F. und Herskowitz, I.** (1994a) Identification of *fuz7*, a *Ustilago maydis* MEK/MAPKK homolog required for *a*-locus-dependent and -independent steps in the fungal life cycle. *Genes Dev*, **8**, 1367-1378.
- Banuett, F. und Herskowitz, I.** (1994b) Morphological transitions in the life cycle of *Ustilago maydis* and their genetic control by the *a* and *b* loci. *Exp Mycology*, **18**, 247-266.
- Banuett, F. und Herskowitz, I.** (1996) Discrete developmental stages during teliospore formation in the corn smut fungus, *Ustilago maydis*. *Development*, **122**, 2965-2976.
- Basse, C.W., Lottspeich, F., Steglich, W. und Kahmann, R.** (1996) Two potential indole-3-acetaldehyde dehydrogenases in the phytopathogenic fungus *Ustilago maydis*. *Eur J Biochem*, **242**, 648-656.
- Basse, C.W., Stumpferl, S. und Kahmann, R.** (2000) Characterization of a *Ustilago maydis* gene specifically induced during the biotrophic phase: evidence for negative as well as positive regulation. *Mol Cell Biol*, **20**, 329-339.
- Bauer, D., Müller, H., Reich, J., Riedel, H., Ahrenkiel, V., Warthoe, P. und Strauss, M.** (1993) Identification of differentially expressed mRNA species by an improved display technique (DDRT-PCR). *Nucleic Acids Res*, **21**, 4272-4280.
- Bergemann, J.** (1993) Molekularbiologische Untersuchungen der Transkripte und Produkte des *b*-Locus von *Ustilago maydis*. Dissertation der Fakultät für Biologie, Freie Universität Berlin.
- Berger, B., Wilson, D.B., Wolf, E., Tonchev, T., Milla, M. und Kim, P.S.** (1995) Predicting coiled coils by use of pairwise residue correlations. *Proc Natl Acad Sci USA*, **92**, 8259-8263.
- Bertelsen, A.H. und Velculescu, V.E.** (1998) High-throughput gene expression analysis using SAGE. *Developments in Drug Therapy*, **3**, 152-159.
- Bertioli, D.J., Schlichter, U.H., Adams, M.J., Burrows, P.R., Steinbiss, H.H. und Antoniw, J.F.** (1995) An analysis of differential display shows a strong bias towards high copy number mRNAs. *Nucleic Acids Res*, **23**, 4520-4523.
- Bevan, M., Barnes, W.M. und Chilton, M.D.** (1983) Structure and transcription of the nopaline synthase gene region of T-DNA. *Nucleic Acids Res*, **11**, 369-385.
- Bitoun, R. und Zamir, A.** (1986) Spontaneous amplification of yeast CEN ARS plasmids. *Mol Gen Genet*, **204**, 98-102.
- Blom, N., Gammeltoft, S. und Brunak, S.** (1999) Sequence and structure-based prediction of eukaryotic protein phosphorylation sites. *J Mol Biol*, **294**, 1351-1362.
- Boeke, J.D., LaCroute, F. und Fink, G.R.** (1984) A positive selection for mutants lacking orotidine-5'-phosphate decarboxylase activity in yeast: 5-fluoro-orotic acid resistance. *Mol Gen Genet*, **197**, 345-346.
- Bohlmann, R.** (1996) Isolierung und Charakterisierung von filamentspezifisch exprimierten Genen aus *Ustilago maydis*. Dissertation der Fakultät für Biologie, Ludwig-Maximilians-Universität München.
- Bohlmann, R., Schauwecker, F., Basse, C. und Kahmann, R.** (1994) Genetic regulation of mating and dimorphism in *Ustilago maydis*. In Daniels, M.J. (ed.) *Advances in Molecular Genetics of Plant-Microbe Interactions*. Kluwer Acad. Publ., Dordrecht, Vol. 3, pp. 239-245.
- Bölker, M., Böhnert, H.U., Braun, K.H., Görl, J. und Kahmann, R.** (1995a) Tagging pathogenicity genes in *Ustilago maydis* by restriction enzyme-mediated integration (REMI). *Mol Gen Genet*, **248**, 547-552.
- Bölker, M., Genin, S., Lehmler, C. und Kahmann, R.** (1995b) Genetic regulation of mating, and dimorphism in *Ustilago maydis*. *Can J Bot*, **73**, 320-325.
- Bölker, M., Urban, M. und Kahmann, R.** (1992) The *a* mating type locus of *U. maydis* specifies cell signaling components. *Cell*, **68**, 441-450.
- Borges-Walmsley, M.I. und Walmsley, A.R.** (2000) cAMP signalling in pathogenic fungi: control of dimorphic switching and pathogenicity. *Trends Microbiol*, **8**, 133-141.
- Börner, H.** (1997) *Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz*. Eugen Ulmer Verlag, Stuttgart.
- Bottin, A., Kämper, J. und Kahmann, R.** (1996) Isolation of a carbon source-regulated gene from *Ustilago maydis*. *Mol Gen Genet*, **253**, 342-352.
- Brachmann, A.** (1995) Suche nach frühen *b*-regulierten Genen in *Ustilago maydis* mit Hilfe der Methode des "Differential Display". Diplomarbeit an der Fakultät für Biologie, Ludwig-Maximilians-Universität München.
- Bradwell, L., Cook, J.G., Voora, D., Baggott, D.M., Martinez, A.R. und Thorner, J.** (1998) Repression of yeast Ste12 transcription factor by direct binding of unphosphorylated Kss1 MAPK and its regulation by Ste7 MEK. *Genes Dev*, **12**, 2887-2898.

- Brendel, V., Bucher, P., Nourbakhsh, I.R., Blaisdell, B.E. und Karlin, S.** (1992) Methods and algorithms for statistical analysis of protein sequences. *Proc Natl Acad Sci USA*, **89**, 2002-2006.
- Broomfield, P.L. und Hargreaves, J.A.** (1992) A single amino-acid change in the iron-sulphur protein subunit of succinate dehydrogenase confers resistance to carboxin in *Ustilago maydis*. *Curr Genet*, **22**, 117-121.
- Brown, A.J.P. und Gow, N.A.R.** (1999) Regulatory networks controlling *Candida albicans* morphogenesis. *Trends Microbiol*, **7**, 333-338.
- Callard, D., Lescure, B. und Mazzolini, L.** (1994) A method for the elimination of false positives generated by the mRNA differential display technique. *Biotechniques*, **16**, 1096-1097, 1100-1093.
- Campbell, W.H. und Kinghorn, K.R.** (1990) Functional domains of assimilatory nitrate reductases and nitrite reductases. *Trends Biochem Sci*, **15**, 315-319.
- Casselton, L.A. und Olesnicky, N.S.** (1998) Molecular genetics of mating recognition in basidiomycete fungi. *Microbiol Mol Biol Rev*, **62**, 55-70.
- Chang, Y.C. und Kwon-Chung, K.J.** (1999) Isolation, characterization and localization of a capsule-associated gene, *CAP10*, of *Cryptococcus neoformans*. *J Bacteriol*, **181**, 5636-5643.
- Chen, B. und Przybyla, A.E.** (1994) An efficient site-directed mutagenesis method based on PCR. *Biotechniques*, **17**, 657-659.
- Chiu, W., Niwa, Y., Zeng, W., Hirano, T., Kobayashi, H. und Sheen, J.** (1996) Engineered GFP as a vital reporter in plants. *Curr Biol*, **6**, 325-330.
- Christensen, J.J.** (1963) Corn smut induced by *Ustilago maydis*. *Amer Phytopathol Soc Monogr*, **2**.
- Clarke, D.L., Woodlee, G.L., McClelland, C.M., Seymour, T.S. und Wickes, B.L.** (2001) The *Cryptococcus neoformans* *STE11 $\alpha$*  gene is similar to other fungal mitogen-activated kinase kinase kinase (MAPKKK) genes but is mating type specific. *Mol Microbiol*, **40**, 200-213.
- Cohen, B.A., Mitra, R.D., Hughes, J.D. und Church, G.M.** (2000) A computational analysis of whole-genome expression data reveals chromosomal domains of gene expression. *Nat Genetics*, **26**, 183-186.
- Cohen, S.N., Chang, A.C. und Hsu, L.** (1972) Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. *Proc Natl Acad Sci USA*, **69**, 2110-2114.
- Cummings, C.J. und Zoghbi, H.Y.** (2000) Fourteen and counting: unraveling trinucleotide repeat diseases. *Hum Mol Genet*, **9**, 909-916.
- Czerny, T.** (1996) High primer concentration improves PCR amplification from random pools. *Nucleic Acids Res*, **24**, 985-986.
- Daboussi, M.J., Djebali, A., Gerlinger, C., Blaiseau, P.L., Bouvier, I., Cassan, M., Lebrun, M.H., Parisot, D. und Brygoo, Y.** (1989) Transformation of seven species of filamentous fungi using the nitrate reductase gene of *Aspergillus nidulans*. *Curr Genet*, **15**, 453-456.
- Davenport, K.R., Sohasky, M., Kamada, Y., Levin, D.E. und Gustin, M.C.** (1995) A second osmosensing signal transduction pathway in yeast. Hypotonic shock activates the PKC1 protein kinase-regulated cell integrity pathway. *J Biol Chem*, **270**, 30157-30161.
- Davis, S.J., Vener, A.V. und Vierstra, R.D.** (1999) Bacteriophytochromes: phytochrome-like photoreceptors from nonphotosynthetic eubacteria. *Science*, **286**, 2517-2520.
- Debouck, C.** (1995) Differential display or differential dismay? *Curr Opin Biotechnol*, **6**, 597-599.
- Dekker, L.V., Palmer, R.H. und Parker, P.J.** (1995) The protein kinase C and protein kinase C related gene families. *Curr Opin Struct Biol*, **5**, 396-402.
- DeZwaan, T.M., Carroll, A.M., Valent, B. und Sweigard, J.A.** (1999) *Magnaporthe grisea* Pth11p is a novel plasma membrane protein that mediates appressorium differentiation in response to inductive substrate cues. *Plant Cell*, **11**, 2013-2030.
- Di Pietro, A., Garcia-MacEira, F.I., Meglec, E. und Roncero, M.I.** (2001) A MAP kinase of the vascular wilt fungus *Fusarium oxysporum* is essential for root penetration and pathogenesis. *Mol Microbiol*, **39**, 1140-1152.
- Dianov, G.L., Prasad, R., Wilson, S.H. und Bohr, V.A.** (1999) Role of DNA polymerase beta in the excision step of long patch mammalian base excision repair. *J Biol Chem*, **274**, 13741-13743.
- Dickman, M.B. und Yarden, O.** (1999) Serine/threonine protein kinases and phosphatases in filamentous fungi. *Fungal Genet Biol*, **26**, 99-117.
- Douglas, S.E.** (1995) DNA Strider. An inexpensive sequence analysis package for the Macintosh. *Mol Biotechnol*, **3**, 37-45.

- Dujon, B.** (1996) The yeast genome project: what did we learn? *Trends Genet*, **12**, 263-270.
- Dürrenberger, F., Wong, K. und Kronstad, J.W.** (1998) Identification of a cAMP-dependent protein kinase catalytic subunit required for virulence and morphogenesis in *Ustilago maydis*. *Proc Natl Acad Sci USA*, **95**, 5684-5689.
- Eddy, S.R.** (1995) Multiple alignment using hidden Markov models. *Proc Int Conf Intell Syst Mol Biol*, **3**, 114-120.
- Elion, E.A., Grisafi, P.L. und Fink, G.R.** (1990) *FUS3* encodes a cdc2+/CDC28-related kinase required for the transition from mitosis into conjugation. *Cell*, **60**, 649-664.
- Enslin, H., Brancho, D.M. und Davis, R.J.** (2000) Molecular determinants that mediate selective activation of p38 MAP kinase isoforms. *EMBO J*, **19**, 1301-1311.
- Eraso, P. und Gancedo, C.** (1987) Activation of yeast plasma membrane ATPase by acid pH during growth. *FEBS Lett*, **224**, 187-192.
- Erdman, S., Lin, L., Malczynski, M. und Snyder, M.** (1998) Pheromone-regulated genes required for yeast mating differentiation. *J Cell Biol*, **9**, 461-483.
- Ferguson, B., Horeka, J., Printen, J., Schultz, J., Stevenson, B.J. und Sprague, G.F.J.** (1994) The yeast pheromone response pathway: new insights into signal transmission. *Cell Mol Biol Res*, **40**, 223-228.
- Fernandez, D., Ouinten, M., Tantaoui, A., Geiger, J.P., Daboussi, M.J. und Langin, T.** (1998) *Fot1* insertions in the *Fusarium oxysporum f. sp. albedinis* genome provide diagnostic PCR targets for detection of the date palm pathogen. *Appl Environ Microbiol*, **64**, 633-636.
- Freedman, R.B., Hirst, T.R. und Tuite, M.F.** (1994) Protein disulphide isomerase: building bridges in protein folding. *Trends Biochem Sci*, **19**, 331-336.
- Friedel, R.H., Schnürch, H., Stubbusch, J. und Barde, Y.A.** (1997) Identification of genes differentially expressed by nerve growth factor- and neurotrophin-3-dependent sensory neurons. *Proc Natl Acad Sci USA*, **94**, 12670-12675.
- Frosina, G.** (2000) Overexpression of enzymes that repair endogenous damage to DNA. *Eur J Biochem*, **267**, 2135-2149.
- Gilbert, M.S., Johnson, A. und Dean, R.** (1996) Chemical signals responsible for appressorium formation in the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. *Physiol Mol Plant Pathol*, **48**, 335-346.
- Gillissen, B., Bergemann, J., Sandmann, C., Schröer, B., Bölker, M. und Kahmann, R.** (1992) A two-component regulatory system for self/non-self recognition in *Ustilago maydis*. *Cell*, **68**, 647-657.
- Gish, W. und States, D.J.** (1993) Identification of protein coding regions by database similarity search. *Nat Genet*, **3**, 266-272.
- Gold, S., Duncan, G., Barrett, K. und Kronstad, J.** (1994) cAMP regulates morphogenesis in the fungal pathogen *Ustilago maydis*. *Genes Dev*, **8**, 2805-2816.
- Gold, S.E., Brogdon, S.M., Mayorga, M.E. und Kronstad, J.W.** (1997) The *Ustilago maydis* regulatory subunit of a cAMP-dependent protein kinase is required for gall formation in maize. *Plant Cell*, **9**, 1585-1594.
- Gold, S.E. und Kronstad, J.W.** (1994) Disruption of two genes for chitin synthase in the phytopathogenic fungus *Ustilago maydis*. *Mol Microbiol*, **11**, 897-902.
- Gossen, M., Freundlieb, S., Bender, G., Müller, G., Hillen, W. und Bujard, H.** (1995) Transcriptional activation by tetracyclines in mammalian cells. *Science*, **268**, 1766-1769.
- Goutte, C. und Johnson, A.D.** (1988) a1 protein alters the DNA binding specificity of  $\alpha 2$  repressor. *Cell*, **52**, 875-882.
- Groll, A.H., De Lucca, A.J. und Walsh, T.J.** (1998) Emerging targets for the development of novel antifungal therapeutics. *Trends Microbiol*, **6**, 117-124.
- Guarro, J., Gene, J. und Stchigel, A.M.** (1999) Developments in fungal taxonomy. *Clin Microbiol Rev*, **12**, 454-500.
- Guex, N., Diemand, A. und Peitsch, M.C.** (1999) Protein modelling for all. *Trends Biochem Sci*, **24**, 364-367.
- Guex, N. und Peitsch, M.C.** (1997) SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: an environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis*, **18**, 2714-2723.
- Gygi, S.P., Rochon, Y., Franza, B.R. und Aebersold, R.** (1999) Correlation between protein and mRNA abundance in yeast. *Mol Cell Biol*, **19**, 1720-1730.
- Hanahan, D.** (1985) Techniques for transformation in *E. coli*. In Rickwood, D. und Hames, B.D. (eds.), *DNA cloning, a practical approach*, Vol. **1**, pp. 109-135. IRL Press.

- Hartmann, H.A.** (1997) Die Pheromonantwort in *Ustilago maydis*: Kontrolle von Zellfusion und Pathogenität. Dissertation der Fakultät für Biologie, Ludwig-Maximilians-Universität München.
- Hartmann, H.A., Kahmann, R. und Bölker, M.** (1996) The pheromone response factor coordinates filamentous growth and pathogenicity in *Ustilago maydis*. *EMBO J*, **15**, 1632-1641.
- Hartmann, H.A., Krüger, J., Lottspeich, F. und Kahmann, R.** (1999) Environmental signals controlling sexual development of the corn smut fungus *Ustilago maydis* through the transcriptional regulator Prf1. *Plant Cell*, **11**, 1293-1306.
- Hauser, N.C., Vingron, M., Scheideler, M., Krems, B., Hellmuth, K., Entian, K.D. und Hoheisel, J.D.** (1998) Transcriptional profiling on all open reading frames of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, **14**, 1209-1221.
- Heath, M.C.** (2000) Nonhost resistance and nonspecific plant defenses. *Curr Opin Plant Biol*, **3**, 315-319.
- Hereford, L.M. und Rosbash, M.** (1977) Number and distribution of polyadenylated RNA sequences in yeast. *Cell*, **10**, 453-462.
- Heringa, J.** (1999) Two strategies for sequence comparison: profile-preprocessed and secondary structure-induced multiple alignment. *Comput Chem*, **23**, 341-364.
- Hernandez, A., Cooke, D.T. und Clarkson, D.T.** (1998) Effects of abnormal-sterol accumulation on *Ustilago maydis* plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase stoichiometry and polypeptide pattern. *J Bacteriol*, **180**, 412-415.
- Hobohm, U. und Sander, C.** (1995) A sequence property approach to searching protein databases. *J Mol Biol*, **251**, 390-399.
- Hoffman, C.S. und Winston, F.** (1987) A ten-minute DNA preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformation of *E. coli*. *Gene*, **57**, 267-272.
- Hogan, L.H., Klein, B.S. und Levitz, S.M.** (1996) Virulence factors of medically important fungi. *Clin Microbiol Reviews*, **9**, 469-488.
- Holden, D.W., Kronstad, J.W. und Leong, S.A.** (1989) Mutation in a heat-regulated hsp70 gene of *Ustilago maydis*. *EMBO J*, **8**, 1927-1934.
- Holliday, R.** (1961) The genetics of *Ustilago maydis*. *Genet Res Camb*, **2**, 204-230.
- Holliday, R.** (1971) Biochemical measure of the time and frequency of radiation-induced allelic recombination in *Ustilago*. *Nat New Biol*, **232**, 233-236.
- Holliday, R.** (1974) *Ustilago maydis*. In King, R.C. (ed.) *Handbook of Genetics*, Vol. **1**, pp. 575-595. Plenum Press, New York, USA.
- Horton, P. und Nakai, K.** (1996) A probabilistic classification system for predicting the cellular localization sites of proteins. *Proc Int Conf Intell Syst Mol Biol*, **4**, 109-115.
- Horton, P. und Nakai, K.** (1997) Better prediction of protein cellular localization sites with the k nearest neighbors classifier. *Proc Int Conf Intell Syst Mol Biol*, **5**, 147-152.
- Hubank, M. und Schatz, D.G.** (1994) Identifying differences in mRNA expression by representational difference analysis of cDNA. *Nucleic Acids Res*, **22**, 5640-5648.
- Hughes, T.R., Marton, M.J., Jones, A.R., Roberts, C.J., Stoughton, R., Armour, C.D., Bennett, H.A., Coffey, E., Dai, H., He, Y.D., Kidd, M.J., King, A.M., Meyer, M.R., Slade, D., Lum, P.Y., Stepaniants, S.B., Shoemaker, D.D., Gachotte, D., Chakraburty, K., Simon, J., Bard, M. und Friend, S.H.** (2000) Functional discovery via a compendium of expression profiles. *Cell*, **102**, 109-126.
- Hunter, T. und Plowman, G.D.** (1997) The protein kinases of budding yeast: six score and more. *Trends Biochem Sci*, **22**, 18-22.
- Imhof, F.J.** (1784) *Zeeae maydis morbus ad ustilaginem vulgo relatus*. Dissertation. Standort: Bibliothek des Botanischen Instituts, Ludwig-Maximilians-Universität München.
- Inada, K., Morimoto, Y., Arima, T., Murata, Y. und Kamada, T.** (2001) The *clp1* gene of the mushroom *Coprinus cinereus* is essential for A-regulated sexual development. *Genetics*, **157**, 133-140.
- Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J. und White, T.J.** (eds.) (1990) *PCR Protocols: a guide to methods and applications*. Academic Press, San Diego, USA.
- Jakupciak, J.P. und Wells, R.D.** (2000) Gene conversion (recombination) mediates expansions of CTG/CAG repeats. *J Biol Chem*, **275**, 40003-40013.
- Johnson, A.D.** (1995) Molecular mechanisms of cell-type determination in budding yeast. *Curr Opin Genet Dev*, **5**, 552-558.
- Jurecic, R., Nguyen, T. und Belmont, J.W.** (1996) Differential mRNA display using anchored oligo-dT and long sequence-specific primers as arbitrary primers. *Trends Genet*, **12**, 502-504.

- Kahmann, R. und Basse, C.** (1999) REMI (Restriction Enzyme Mediated Integration) and its impact on the isolation of pathogenicity genes in fungi attacking plants. *Eur J Plant Pathol*, **105**, 221-229.
- Kahmann, R., G., S., Basse, C., Feldbrügge, M. und Kämper, J.** (2000) *Ustilago maydis*, the causative agent of corn smut disease. In Kronstad, J.W. (ed.) *Fungal Pathology*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- Kämper, J., Reichmann, M., Romeis, T., Bölker, M. und Kahmann, R.** (1995) Multiallelic recognition: non-self-dependent dimerization of the bE and bW homeodomain proteins in *Ustilago maydis*. *Cell*, **81**, 73-83.
- Kasler, H.G., Victoria, J., Duramad, O. und Winoto, A.** (2000) ERK5 is a novel type of mitogen-activated protein kinase containing a transcriptional activation domain. *Mol Cell Biol*, **20**, 8382-8389.
- Keon, J.P., White, G.A. und Hargreaves, J.A.** (1991) Isolation, characterization and sequence of a gene conferring resistance to the systemic fungicide carboxin from the maize smut pathogen, *Ustilago maydis*. *Curr Genet*, **19**, 475-481.
- Klein, L.L. und Li, L.** (1999) Design and preparation of cycloheptamine antifungal agents. *Curr Pharm Des*, **5**, 57-71.
- Kringstein, A.M., Rossi, F.M., Hofmann, A. und Blau, H.M.** (1998) Graded transcriptional response to different concentrations of a single transactivator. *Proc Natl Acad Sci USA*, **95**, 13670-13675.
- Kronstad, J.W. und Leong, S.A.** (1990) The *b* mating-type locus of *Ustilago maydis* contains variable and constant regions. *Genes Dev*, **4**, 1384-1395.
- Kronstad, J.W. und Staben, C.** (1997) Mating type in filamentous fungi. *Annu Rev Genet*, **31**, 245-276.
- Kronstad, J.W., Wang, J., Covert, S.F., Holden, D.W., McKnight, G.L. und Leong, S.A.** (1989) Isolation of metabolic genes and demonstration of gene disruption in the phytopathogenic fungus *Ustilago maydis*. *Gene*, **79**, 97-106.
- Krüger, J.** (1999) Der cAMP-Weg und sein Einfluß auf Pheromonsignaltransduktion und Pathogenität in *Ustilago maydis*. Dissertation der Fakultät für Biologie, Ludwig-Maximilians-Universität München.
- Krüger, J., Loubradou, G., Regenfelder, E., Hartmann, A. und Kahmann, R.** (1998) Crosstalk between cAMP and pheromone signalling pathways in *Ustilago maydis*. *Mol Gen Genet*, **260**, 193-198.
- Krüger, J., Loubradou, G., Wanner, G., Regenfelder, E., Feldbrügge, M. und Kahmann, R.** (2000) Activation of the cAMP pathway in *Ustilago maydis* reduces fungal proliferation and teliospore formation in plant tumors. *Mol Plant Microbe Interact*, **13**, 1034-1040.
- Kuchler, K., Sterne, R.E. und Thorner, J.** (1989) *Saccharomyces cerevisiae* *STE6* gene product: a novel pathway for protein export in eukaryotic cells. *EMBO J*, **8**, 3973-3984.
- Kues, U.** (2000) Life history and developmental processes in the basidiomycete *Coprinus cinereus*. *Microbiol Mol Biol Rev*, **64**, 316-353.
- Kültz, D.** (1998) Phylogenetic and functional classification of mitogen- and stress-activated protein kinases. *J Mol Evol*, **46**, 571-588.
- Kurjan, J.** (1993) The pheromone response pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *Annu Rev Genet*, **27**, 147-179.
- Kusch, G. und Schauz, K.** (1989) Light and electron microscopic studies of chlamydospore development in *Ustilago maydis* (Ustilaginales, Basidiomycetes). *Cryptogamic Botany*, **1**, 230-235.
- Laemmli, U.K.** (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685.
- Leaper, S., Resnick, M.A. und Holliday, R.** (1980) Repair of double-strand breaks and lethal damage in DNA of *Ustilago maydis*. *Genet Res*, **35**, 291-307.
- Lee, Y.-H. und Dean, R.** (1994) Hydrophobicity of contact surface induces appressorium formation in *Magnaporthe grisea*. *FEMS Microbiol Lett*, **115**, 71-76.
- Lehmler, C., Steinberg, G., Snetselaar, K., Schliwa, M., Kahmann, R. und Bölker, M.** (1997) Identification of a motor protein required for filamentous growth in *Ustilago maydis*. *EMBO J*, **16**, 3464-3473.
- Lev, S., Sharon, A., Hadar, R., Ma, H. und Horwitz, B.A.** (1999) A mitogen-activated protein kinase of the corn leaf pathogen *Cochliobolus heterostrophus* is involved in conidiation, appressorium formation, and pathogenicity: diverse roles for mitogen-activated protein kinase homologs in foliar pathogens. *Proc Natl Acad Sci USA*, **96**, 13542-13547.
- Levin, D.E. und Bartlett-Heubusch, E.** (1992) Mutants in the *S. cerevisiae* *PKC1* gene display a cell cycle-specific osmotic stability defect. *J Cell Biol*, **116**, 1221-1229.

- Lewis, C.M. und Fincham, J.R.S. (1970) Genetics of nitrate reductase in *Ustilago maydis*. *Genet Res*, **16**, 151-163.
- Li, F., Barnathan, E.S. und Kariko, K. (1994) Rapid method for screening and cloning cDNAs generated in differential mRNA display: application of northern blot for affinity capturing of cDNAs. *Nucleic Acids Res*, **22**, 1764-1765.
- Liang, P. und Pardee, A.B. (1992) Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. *Science*, **257**, 967-971.
- Liang, P. und Pardee, A.B. (1995) Recent advances in differential display. *Curr Opin Immunol*, **7**, 274-280.
- Liang, P. und Pardee, A.B. (1998) Differential display. A general protocol. *Mol Biotechnol*, **10**, 261-267.
- Lisitsyn, N. und Wigler, M. (1993) Cloning the differences between two complex genomes. *Science*, **259**, 946-951.
- Lohmann, J., Schickle, H. und Bosch, T.C. (1995) REN display, a rapid and efficient method for nonradioactive differential display and mRNA isolation. *Biotechniques*, **18**, 200-202.
- Loomis, W.F., Kuspa, A. und Shaulsky, G. (1998) Two-component signal transduction systems in eukaryotic microorganisms. *Curr Opin Microbiol*, **1**, 643-648.
- Loomis, W.F., Shaulsky, G. und Wang, N. (1997) Histidine kinases in signal transduction pathways of eukaryotes. *J Cell Sci*, **110**, 1141-1145.
- Loubens, I., Debarbieux, L., Bohin, A., Lacroix, J.M. und Bohin, J.P. (1993) Homology between a genetic locus (*mdoA*) involved in the osmoregulated biosynthesis of periplasmic glucans in *Escherichia coli* and a genetic locus (*hrpM*) controlling pathogenicity of *Pseudomonas syringae*. *Mol Microbiol*, **10**, 329-340.
- Loubradou, G., Brachmann, A., Feldbrügge, M. und Kahmann, R. (2001) Involvement of the TPR-containing protein Ssq1 in filamentous growth of *Ustilago maydis*. A homolog of the transcriptional repressor Ssn6p antagonizes cAMP signalling in *Ustilago maydis*. *Mol Microbiol*, **40**, 719-730.
- Lupas, A., Van Dyke, M. und Stock, J. (1991) Predicting coiled coils from protein sequences. *Science*, **252**, 1162-1164.
- Madden, T.L., Tatusov, R.L. und Zhang, J. (1996) Applications of network BLAST server. *Methods Enzymol*, **266**, 131-141.
- Madhani, H.D. und Fink, G.R. (1998) The control of filamentous differentiation and virulence in fungi. *Trends Cell Biol*, **8**, 348-353.
- Madhani, H.D., Styles, C.A. und Fink, G.R. (1997) MAP kinases with distinct inhibitory functions impart signaling specificity during yeast differentiation. *Cell*, **91**, 673-684.
- Malardier, L., Daboussi, M.J., Julien, J., Roussel, F., Scazzocchio, C. und Brygoo, Y. (1989) Cloning of the nitrate reductase gene (*niaD*) of *Aspergillus nidulans* and its use for transformation of *Fusarium oxysporum*. *Gene*, **78**, 147-156.
- Mansour, S.J., Candia, J.M., Gloor, K.K. und Ahn, N.G. (1996a) Constitutively active mitogen-activated protein kinase kinase 1 (MAPKK1) and MAPKK2 mediate similar transcriptional and morphological responses. *Cell Growth Differ*, **7**, 243-250.
- Mansour, S.J., Candia, J.M., Matsuura, J.E., Manning, M.C. und Ahn, N.G. (1996b) Interdependent domains controlling the enzymatic activity of mitogen-activated protein kinase kinase 1. *Biochemistry*, **35**, 15529-15536.
- Marck, C. (1988) 'DNA Strider': a 'C' program for the fast analysis of DNA and protein sequences on the Apple Macintosh family of computers. *Nucleic Acids Res*, **16**, 1829-1836.
- Marcus, S., Polverino, A., Barr, M. und Wigler, M. (1994) Complexes between STE5 and components of the pheromone-responsive mitogen-activated protein kinase module. *Proc Natl Acad Sci USA*, **91**, 7762-7766.
- Marzluf, G.A. (1997) Genetic regulation of nitrogen metabolism in the fungi. *Microbiol Mol Biol Rev*, **61**, 17-32.
- Mathieu-Daude, F., Welsh, J., Vogt, T. und McClelland, M. (1996) DNA rehybridization during PCR: the 'C<sub>0</sub>t effect' and its consequences. *Nucleic Acids Res*, **24**, 2080-2086.
- Matz, M.V. und Lukyanov, S.A. (1998) Different strategies of differential display: areas of application. *Nucleic Acids Res*, **26**, 5537-5543.
- Mayorga, M.E. und Gold, S.E. (1998) Characterization and molecular genetic complementation of mutants affecting dimorphism in the fungus *Ustilago maydis*. *Fungal Genet Biol*, **24**, 364-376.

- Mayorga, M.E. und Gold, S.E.** (1999) A MAP kinase encoded by the *ubc3* gene of *Ustilago maydis* is required for filamentous growth and full virulence. *Mol Microbiol*, **34**, 485-497.
- McClelland, M., Honeycutt, R., Mathieu-Daude, F., Vogt, T. und Welsh, J.** (1997) Fingerprinting by arbitrarily primed PCR. *Methods Mol Biol*, **85**, 13-24.
- McClelland, M., Mathieu-Daude, F. und Welsh, J.** (1995) RNA fingerprinting and differential display using arbitrarily primed PCR. *Trends Genet*, **11**, 242-246.
- Metzgar, D. und Wills, C.** (2000) Evidence for the adaptive evolution of mutation rates. *Cell*, **101**, 581-584.
- Miller, S.M., Schmitt, R. und Kirk, D.L.** (1993) *Jordan*, an active *Volvox* transposable element similar to higher plant transposons. *Plant Cell*, **5**, 1125-1138.
- Mori, K., Ogawa, N., Kawahara, T., Yanagi, H. und Yura, T.** (1998) Palindrome with spacer of one nucleotide is characteristic of the *cis*-acting unfolded protein response element in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*, **273**, 9912-9920.
- Mou, L., Miller, H., Li, J., Wang, E. und Chalifour, L.** (1994) Improvements to the differential display method for gene analysis. *Biochem Biophys Res Commun*, **199**, 564-569.
- Müller, E. und Loeffler, W.** (1992) *Mykologie*. Thieme Verlag, Stuttgart, New York.
- Müller, P., Aichinger, C., Feldbrügge, M. und Kahmann, R.** (1999) The MAP kinase *kpp2* regulates mating and pathogenic development in *Ustilago maydis*. *Mol Microbiol*, **34**, 1007-1017.
- Murata, Y., Fujii, M., Zolan, M.E. und Kamada, T.** (1998) Molecular analysis of *pcc1*, a gene that leads to A-regulated sexual morphogenesis in *Coprinus cinereus*. *Genetics*, **149**, 1753-1761.
- Murawski, D.A.** (2000) Pilze. *National Geographic (deutsche Ausgabe)*, **August 2000**, 90-103.
- Nakai, K. und Horton, P.** (1999) PSORT: a program for detecting sorting signals in proteins and predicting their subcellular localization. *Trends Biochem Sci*, **24**, 34-36.
- Nakai, K. und Kanehisa, M.** (1992) A knowledge base for predicting protein localization sites in eukaryotic cells. *Genomics*, **14**, 897-911.
- Nielsen, H., Engelbrecht, J., Brunak, S. und von Heijne, G.** (1997a) Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. *Protein Eng*, **10**, 1-6.
- Nielsen, H., Engelbrecht, J., Brunak, S. und von Heijne, G.** (1997b) A neural network method for identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. *Int J Neural Syst*, **8**, 581-599.
- Nishizuka, Y.** (1988) The molecular heterogeneity of protein kinase C and its implications for cellular regulation. *Nature*, **334**, 661-665.
- Osbourn, A.E.** (1996) Preformed antimicrobial compounds and plant defense against fungal attack. *Plant Cell*, **8**, 1821-1831.
- Pan, X., Harashima, T. und Heitman, J.** (2000) Signal transduction cascades regulating pseudohyphal differentiation of *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Opin Microbiol*, **3**, 567-572.
- Pan, X. und Heitman, J.** (2000) Sok2 regulates yeast pseudohyphal differentiation via a transcription factor cascade that regulates cell-cell adhesion. *Mol Cell Biol*, **22**, 8364-8372.
- Paravicini, G., Mendoza, A., Antonsson, B., Cooper, M., Losberger, C. und Payton, M.A.** (1996) The *Candida albicans* *PKC1* gene encodes a protein kinase C homolog necessary for cellular integrity but not dimorphism. *Yeast*, **12**, 741-756.
- Peitsch, M.C.** (1996) ProMod and Swiss-Model: Internet-based tools for automated comparative protein modeling. *Biochem Soc Trans*, **24**, 274-279.
- Pepper, A.E.** (1998) Molecular evolution: old branches on the phytochrome family tree. *Curr Biol*, **8**, R117-120.
- Perlin, D.S., Brown, C.L. und Haber, J.E.** (1988) Membrane potential defect in hygromycin B-resistant *pma1* mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*, **263**, 18118-18122.
- Prasad, R., Dianov, G.L., Bohr, V.A. und Wilson, S.H.** (2000) FEN1 stimulation of DNA polymerase  $\beta$  mediates an excision step in mammalian long patch base excision repair. *J Biol Chem*, **275**, 4460-4466.
- Proft, M., Pascual-Ahuir, A., de Nadal, E., Arino, J., Serrano, R. und Posas, F.** (2001) Regulation of the Sko1 transcriptional repressor by the Hog1 MAP kinase in response to osmotic stress. *EMBO J*, **20**, 1123-1133.
- Quadbeck-Seeger, C., Wanner, G., Huber, S., Kahmann, R. und Kämper, J.** (2000) A protein with similarity to the human retinoblastoma binding protein 2 acts specifically as a repressor for genes regulated by the *b* mating type locus in *Ustilago maydis*. *Mol Microbiol*, **38**, 154-166.

- Radman, M.** (1999) Enzymes of evolutionary change. *Nature*, **401**, 866-869.
- Rechsteiner, M. und Rogers, S.W.** (1996) PEST sequences and regulation by proteolysis. *Trends Biochem Sci*, **21**, 267-271.
- Redd, M.J., Arnaud, M.B. und Johnson, A.D.** (1997) A complex composed of tup1 and ssn6 represses transcription *in vitro*. *J Biol Chem*, **272**, 11193-11197.
- Regenfelder, E., Spellig, T., Hartmann, A., Lauenstein, S., Bölker, M. und Kahmann, R.** (1997) G proteins in *Ustilago maydis*: Transmission of multiple signals? *EMBO J*, **16**, 1934-1942.
- Richard, G.-F. und Paques, F.** (2000) Mini- and microsatellite expansions: the recombination connection. *EMBO Reports*, **1**, 122-126.
- Rogers, S., Wells, R. und Rechsteiner, M.** (1986) Amino acid sequences common to rapidly degraded proteins: the PEST hypothesis. *Science*, **234**, 364-368.
- Romeis, T., Brachmann, A., Kahmann, R. und Kämper, J.** (2000) Identification of a target gene for the bE/bW homeodomain protein complex in *Ustilago maydis*. *Mol Microbiol*, **37**, 54-66.
- Romeis, T., Kämper, J. und Kahmann, R.** (1997) Single-chain fusions of two unrelated homeodomain proteins trigger pathogenicity in *Ustilago maydis*. *Proc Natl Acad Sci USA*, **94**, 1230-1234.
- Rosenberg, S.M., Thulin, C. und Harris, R.S.** (1998) Transient and heritable mutators in adaptive evolution in the lab and in nature. *Genetics*, **148**, 1559-1566.
- Rossi, F.M., Guicherit, O.M., Spicher, A., Kringstein, A.M., Fatyol, K., Blakely, B.T. und Blau, H.M.** (1998) Tetracycline-regulatable factors with distinct dimerization domains allow reversible growth inhibition by p16. *Nat Genet*, **20**, 389-393.
- Rost, B.** (1996) PHD: predicting one-dimensional protein structure by profile-based neural networks. *Methods Enzymol*, **266**, 525-539.
- Ruiz-Herrera, J., León, C.G., Guevara-Olvera, L. und Cárabez-Trejo, A.** (1995) Yeast-mycelial dimorphism of haploid and diploid strains of *Ustilago maydis*. *Microbiology*, **141**, 695-703.
- Ruiz-Herrera, J., Leon-Ramirez, C., Cabrera-Ponce, J.L., Martínez-Espinoza, A.D. und Herrera-Estrella, L.** (1999a) Completion of the sexual cycle and demonstration of genetic recombination in *Ustilago maydis in vitro*. *Mol Gen Genet*, **262**, 468-472.
- Ruiz-Herrera, J. und Martínez-Espinoza, A.D.** (1998) The fungus *Ustilago maydis*, from the aztec cuisine to the research laboratory. *International Microbiology*, **1**, 149-158.
- Ruiz-Herrera, J., Martínez-Espinoza, A.D., Alvarez, P.E. und Xoconostle-Cazares, B.** (1999b) Carboxin-resistant mutant of *Ustilago maydis* is impaired in its pathogenicity for *Zea mays*. *Curr Microbiol*, **39**, 291-294.
- Rupp, S., Summers, E., Lo, H.-J., Madhani, H. und Fink, G.** (1999) MAP kinase and cAMP filamentation signaling pathways converge on the unusually large promoter of the yeast *FLO11* gene. *EMBO J*, **18**, 1257-1269.
- Sablowski, R.W. und Meyerowitz, E.M.** (1998) A homolog of *NO APICAL MERISTEM* is an immediate target of the floral homeotic genes *APETALA3/PISTILLATA*. *Cell*, **92**, 93-103.
- Sambrook, J., Frisch, E.F. und Maniatis, T.** (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, New York.
- Sanger, F., Nicklen, S. und Coulson, A.R.** (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA*, **74**, 5463-5467.
- Sargent, T.D.** (1987) Isolation of differentially expressed genes. In Berger, S.L. und Kimmel, A.R. (eds.), *Guide to Molecular Cloning Techniques*, Vol. **152**, pp. 423-432. Academic Press, Inc., San Diego.
- Saxena, M., Williams, S., Taskén, K. und Mustelin, T.** (1999) Crosstalk between cAMP-dependent kinase and MAP kinase through a protein tyrosine phosphatase. *Nat Cell Biol*, **1**, 305-311.
- Sayle, R.A. und Milner-White, E.J.** (1995) RASMOL: biomolecular graphics for all. *Trends Biochem Sci*, **20**, 374.
- Schäfer, W.** (1994) Molecular mechanisms of fungal pathogenicity to plants. *Annu Rev Phytopathol*, **32**, 461-477.
- Schauwecker, F., Wanner, G. und Kahmann, R.** (1995) Filament-specific expression of a cellulase gene in the dimorphic fungus *Ustilago maydis*. *Biol Chem Hoppe-Seyler*, **376**, 617-625.
- Schena, M., Shalon, D., Davis, R.W. und Brown, P.O.** (1995) Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science*, **270**, 467-470.
- Schildkraut, C.L., Marmur, J. und Doty, P.** (1962) Determination of the base composition of deoxyribonucleic acid from its buoyant density in CsCl. *J Mol Biol*, **4**, 430-443.

- Schlesinger, R., Kahmann, R. und Kämper, J. (1997) The homeodomains of the heterodimeric bE and bW proteins of *Ustilago maydis* are both critical for function. *Mol Gen Genet*, **254**, 514-519.
- Schmitt, M.E., Brown, T.A. und Trumppower, B.L. (1990) A rapid and simple method for preparation of RNA from *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res*, **18**, 3091-3092.
- Schultz, J., Copley, R.R., Doerks, T., Ponting, C.P. und Bork, P. (2000) SMART: a web-based tool for the study of genetically mobile domains. *Nucleic Acids Res*, **28**, 231-234.
- Schultz, J., Milpetz, F., Bork, P. und Ponting, C.P. (1998) SMART, a simple modular architecture research tool: identification of signaling domains. *Proc Natl Acad Sci USA*, **95**, 5857-5864.
- Schulz, B., Banuett, F., Dahl, M., Schlesinger, R., Schäfer, W., Martin, T., Herskowitz, I. und Kahmann, R. (1990) The *b* alleles of *U. maydis*, whose combinations program pathogenic development, code for polypeptides containing a homeodomain-related motif. *Cell*, **60**, 295-306.
- Seeberg, E., Eide, L. und Bjoras, M. (1995) The base excision repair pathway. *Trends Biochem Sci*, **20**, 391-397.
- Serrano, R. (1988) Structure and function of proton translocating ATPase in plasma membranes of plants and fungi. *Biochim Biophys Acta*, **947**, 1-28.
- Shamu, C.E., Cox, J.S. und Walter, P. (1994) The unfolded-protein-response pathway in yeast. *Trends Cell Biol.*, **4**, 56-60.
- Sheen, J., Hwang, S., Niwa, Y., Kobayashi, H. und Galbraith, D.W. (1995) Green-fluorescent protein as a new vital marker in plant cells. *Plant J*, **8**, 777-784.
- Slauch, J.M., Lee, A.A., Mahan, M.J. und Mekalanos, J.J. (1996) Molecular characterization of the *oafa* locus responsible for acetylation of *Salmonella typhimurium* O-antigen: OafA is a member of a family of integral membrane trans-acetylases. *J Bacteriol*, **178**, 5904-5909.
- Smith, R.L. und Johnson, A.D. (2000) Turning genes off by Ssn6-Tup1: a conserved system of transcriptional repression in eukaryotes. *TIBS*, **25**, 325-330.
- Snetselaar, K.M. (1993) Microscopic observation of *Ustilago maydis* mating interactions. *Exp Mycol*, **17**, 345-355.
- Snetselaar, K.M., Bölker, M. und Kahmann, R. (1996) *Ustilago maydis* mating hyphae orient their growth toward pheromone sources. *Fungal Gen Biol*, **20**, 299-312.
- Snetselaar, K.M. und Mims, C.W. (1992) Sporidial fusion and infection of maize seedlings by the smut fungus *Ustilago maydis*. *Mycologia*, **84**, 193-203.
- Snetselaar, K.M. und Mims, C.W. (1993) Infection of maize stigmas by *Ustilago maydis*: Light and electron microscopy. *Phytopathol*, **83**, 843.
- Snetselaar, K.M. und Mims, C.W. (1994) Light and electron microscopy of *Ustilago maydis* hyphae in maize. *Mycol Res*, **98**, 347-355.
- Southern, E.M. (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol*, **98**, 503-517.
- Spellig, T., Bölker, M., Lottspeich, F., Frank, R.W. und Kahmann, R. (1994) Pheromones trigger filamentous growth in *Ustilago maydis*. *EMBO J*, **13**, 1620-1627.
- Spellig, T., Bottin, A. und Kahmann, R. (1996) Green fluorescent protein (GFP) as a new vital marker in the phytopathogenic fungus *Ustilago maydis*. *Mol Gen Genet*, **252**, 503-509.
- Spellman, P.T., Sherlock, G., Zhang, M.Q., Iyer, V.R., Anders, K., Eisen, M.B., Brown, P.O., Botstein, D. und Futcher, B. (1998) Comprehensive identification of cell cycle-regulated genes of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* by microarray hybridization. *Mol Biol Cell*, **9**, 3273-3297.
- Sprague, G.F. und Thorner, J.W. (1992) Pheromone response and signal transduction during the mating process of *Saccharomyces cerevisiae*. In Broach, J.R., Pringle, J.R. and Jones, E.W. (eds.), *The molecular and cellular biology of the yeast Saccharomyces: gene expression*, pp. 657-744. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Steinberg, G., Schliwa, M., Lehmler, C., Bölker, M., Kahmann, R. und McIntosh, J.R. (1998) Kinesin from the plant pathogenic fungus *Ustilago maydis* is involved in vacuole formation and cytoplasmic migration. *J Cell Sci*, **111**, 2235-2246.
- Stone, B. und Wharton, W. (1994) Targeted RNA fingerprinting: the cloning of differentially-expressed cDNA fragments enriched for members of the zinc finger gene family. *Nucleic Acids Res*, **22**, 2612-2618.

- Tabuchi, M., Tanaka, N., Iwahara, S. und Takegawa, K.** (1997) The *Schizosaccharomyces pombe gms1<sup>+</sup>* gene encodes an UDP-galactose transporter homologue required for protein glycosylation. *Biochem Biophys Res Comm*, **232**, 121-125.
- Takano, Y., Kikuchi, T., Kubo, Y., Hamer, J.E., Mise, K. und Furusawa, I.** (2000) The *Colletotrichum lagenarium* MAP kinase gene *CMK1* regulates diverse aspects of fungal pathogenesis. *Mol Plant Microbe Interact*, **13**, 374-383.
- Tanoue, T., Adachi, M., Moriguchi, T. und Nishida, E.** (2000) A conserved docking motif in MAP kinases common to substrates, activators and regulators. *Nat Cell Biol*, **2**, 110-116.
- Tanoue, T., Maeda, R., Adachi, M. und Nishida, E.** (2001) Identification of a docking groove on ERK and p38 MAP kinases that regulates the specificity of docking interactions. *EMBO J*, **20**, 466-479.
- Teasdale, R.D. und Jackson, M.R.** (1996) Signal-mediated sorting of membrane proteins between the endoplasmic reticulum and the golgi apparatus. *Annu Rev Cell Dev Biol*, **12**, 27-54.
- Thines, E., Weber, R.W.S. und Talbot, N.J.** (2000) MAP kinase and protein kinase A-dependent mobilization of triacylglycerol and glycogen during appressorium turgor generation by *Magnaporthe grisea*. *Plant Cell*, **12**, 1703-1718.
- Timberlake, W.E.** (1986) Isolation of stage- and cell-specific genes from fungi. In Bailey, J. (ed.) *Biology and Molecular Biology of Plant-Pathogen Interactions*, Vol. **H1**, pp. 343-357. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg.
- Trueheart, J. und Herskowitz, I.** (1992) The *a* locus governs cytoduction in *Ustilago maydis*. *J Bacteriol*, **174**, 7831-7833.
- Tsukuda, T., Carleton, S., Fotheringham, S. und Holloman, W.K.** (1988) Isolation and characterization of an autonomously replicating sequence from *Ustilago maydis*. *Mol Cell Biol*, **8**, 3703-3709.
- Unkles, S.E.** (1989) Fungal biotechnology and the nitrate assimilation pathway. In Wray, J.L. und Kinghorn, J.R. (eds.), *Molecular and Genetic Aspects of Nitrate Assimilation*, pp. 341-363. Oxford University Press, Oxford.
- Urban, M.** (1995) Pheromonantwort beim Maisbrandpilz *Ustilago maydis*. Dissertation der Fakultät für Biologie, Freie Universität Berlin.
- Urban, M., Kahmann, R. und Bölker, M.** (1996a) The biallelic *a* mating type locus of *Ustilago maydis*: remnants of an additional pheromone gene indicate evolution from a multiallelic ancestor. *Mol Gen Genet*, **250**, 414-420.
- Urban, M., Kahmann, R. und Bölker, M.** (1996b) Identification of the pheromone response element in *Ustilago maydis*. *Mol Gen Genet*, **251**, 31-37.
- Valverde, M.E., Paredes Lopez, O., Pataky, J.K. und Guevara Lara, F.** (1995) Huitlacoche (*Ustilago maydis*) as a food source - biology, composition, and production. *Crit Rev Food Sci Nutr*, **35**, 191-229.
- Vanden Bossche, H., Dromer, F., Improvisi, I., Lozano-Chiu, M., Rex, J.H. und Sanglard, D.** (1998) Antifungal drug resistance in pathogenic fungi. *Med Mycol*, **36**, 119-128.
- Varshavsky, A., Turner, G., Du, F. und Xie, Y.** (2000) The ubiquitin system and the N-end rule pathway. *Biol Chem*, **381**, 779-789.
- Velculescu, V.E., Zhang, L., Vogelstein, B. und Kinzler, K.W.** (1995) Serial analysis of gene expression. *Science*, **270**, 484-487.
- Velculescu, V.E., Zhang, L., Zhou, W., Vogelstein, J., Basrai, M.A., Bassett, D.E., Hieter, P., Vogelstein, B. und Kinzler, K.W.** (1997) Characterization of the yeast transcriptome. *Cell*, **88**, 243-251.
- Venema, K. und Palmgren, M.G.** (1995) Metabolic modulation of transport coupling ratio in yeast plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase. *J Biol Chem*, **270**, 19659-19667.
- Walter, J.M.** (1934) The mode of entrance of *Ustilago zeae* into corn. *Phytopathol*, **24**, 1012-1020.
- Wan, J.S., Sharp, S.J., Poirier, G.M., Wagaman, P.C., Chambers, J., Pyati, J., Hom, Y.L., Galindo, J.E., Huvar, A., Peterson, P.A., Jackson, M.R. und Erlander, M.G.** (1996) Cloning differentially expressed mRNAs. *Nat Biotechnol*, **14**, 1685-1691.
- Wang, J., Holden, D.W. und Leong, S.A.** (1988) Gene transfer system for the phytopathogenic fungus *Ustilago maydis*. *Proc Natl Acad Sci USA*, **85**, 865-869.
- Wang, P. und Heitman, J.** (1999) Signal transduction cascades regulating mating, filamentation and virulence in *Cryptococcus neoformans*. *Curr Opin Microbiol*, **2**, 358-362.
- Wang, X. und Feuerstein, G.Z.** (1995) Direct sequencing of DNA isolated from mRNA differential display. *Biotechniques*, **18**, 448-453.

- Wang, Z., Harkins, P.C., Ulevitch, R.J., Han, J., Cobb, M.H. und Goldsmith, E.J. (1997) The structure of mitogen-activated protein kinase p38 at 2.1-Å resolution. *Proc Natl Acad Sci USA*, **94**, 2327-2332.
- Weber, H. (1993) *Allgemeine Mykologie*. Gustav Fischer Verlag, Jena, Stuttgart.
- Wedlich-Söldner, R., Bölker, M., Kahmann, R. und Steinberg, G. (2000) A putative endosomal t-SNARE links exo- and endocytosis in the phytopathogenic fungus *Ustilago maydis*. *EMBO J*, **19**, 1974-1986.
- Welsh, J., Chada, K., Dalal, S.S., Cheng, R., Ralph, D. und McClelland, M. (1992) Arbitrarily primed PCR fingerprinting of RNA. *Nucleic Acids Res.* **20**, 4965-4970.
- Wilson, K.P., Fitzgibbon, M.J., Caron, P.R., Griffith, J.P., Chen, W., McCaffrey, P.G., Chambers, S.P. und Su, M.S. (1996) Crystal structure of p38 mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem*, **271**, 27696-27700.
- Wodicka, L., Dong, H., Mittmann, M., Ho, M.H. und Lockhart, D.J. (1997) Genome-wide expression monitoring in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nat Biotechnol*, **15**, 1359-1367.
- Wong, G.J. und Wells, K. (1985) Modified bifactorial incompatibility in *Tremella mesenterica*. *Trans Br Mycol Soc*, **84**, 95-109.
- Wösten, H.A., Bohlmann, R., Eckerskorn, C., Lottspeich, F., Bölker, M. und Kahmann, R. (1996) A novel class of small amphipathic peptides affect aerial hyphal growth and surface hydrophobicity in *Ustilago maydis*. *EMBO J*, **15**, 4274-4281.
- Xoconostle Cazares, B., Leon Ramirez, C. und Ruiz Herrera, J. (1996) Two chitin synthase genes from *Ustilago maydis*. *Microbiology*, **142**, 377-387.
- Xu, J.-R. (2000) MAP kinases in fungal pathogens. *Fungal Gen Biol*, **31**, 137-152.
- Xu, J.R. und Hamer, J.E. (1996) MAP kinase and cAMP signaling regulate infection structure formation and pathogenic growth in the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. *Genes Dev*, **10**, 2696-2706.
- Xu, J.R., Staiger, C.J. und Hamer, J.E. (1998) Inactivation of the mitogen-activated protein kinase Mps1 from the rice blast fungus prevents penetration of host cells but allows activation of plant defense responses. *Proc Natl Acad Sci USA*, **95**, 12713-12718.
- Yamamoto, M., Imai, Y. und Watanabe, Y. (1997) Mating and sporulation in *Schizosaccharomyces pombe*. In Pringle, J.R., Broach, J.R. und Jones, E.W. (eds.), *The molecular and cellular biology of the yeast Saccharomyces. Cell cycle and cell biology*, Vol. **3**, pp. 1037-1106. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Yanisch-Perron, C., Vieira, J. und Messing, J. (1985) Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene*, **33**, 103-119.
- Yeh, K.C. und Lagarias, J.C. (1998) Eukaryotic phytochromes: light-regulated serine/threonine protein kinases with histidine kinase ancestry. *Proc Natl Acad Sci USA*, **95**, 13976-13981.
- Zhang, F., Strand, A., Robbins, D., Cobb, M.H. und Goldsmith, E.J. (1994) Atomic structure of the MAP kinase ERK2 at 2.3 Å resolution. *Nature*, **367**, 704-711.
- Zheng, L., Campbell, M., Murphy, J., Lam, S. und Xu, J.R. (2000) The *BMP1* gene is essential for pathogenicity in the gray mold fungus *Botrytis cinerea*. *Mol Plant Microbe Interact*, **13**, 724-732.
- Zhou, T.-H., Ling, K., Guo, J., Zhou, H., Wu, Y.-L., Jing, Q., Ma, L. und Pei, G. (2000) Identification of a human brain-specific isoform of mammalian STE20-like kinase 3 that is regulated by cAMP-dependent protein kinase. *J Biol Chem*, **275**, 2513-2519.

## 6. Anhang

### 6.1 Homologe Integration in den *ip*-Locus von *U. maydis*

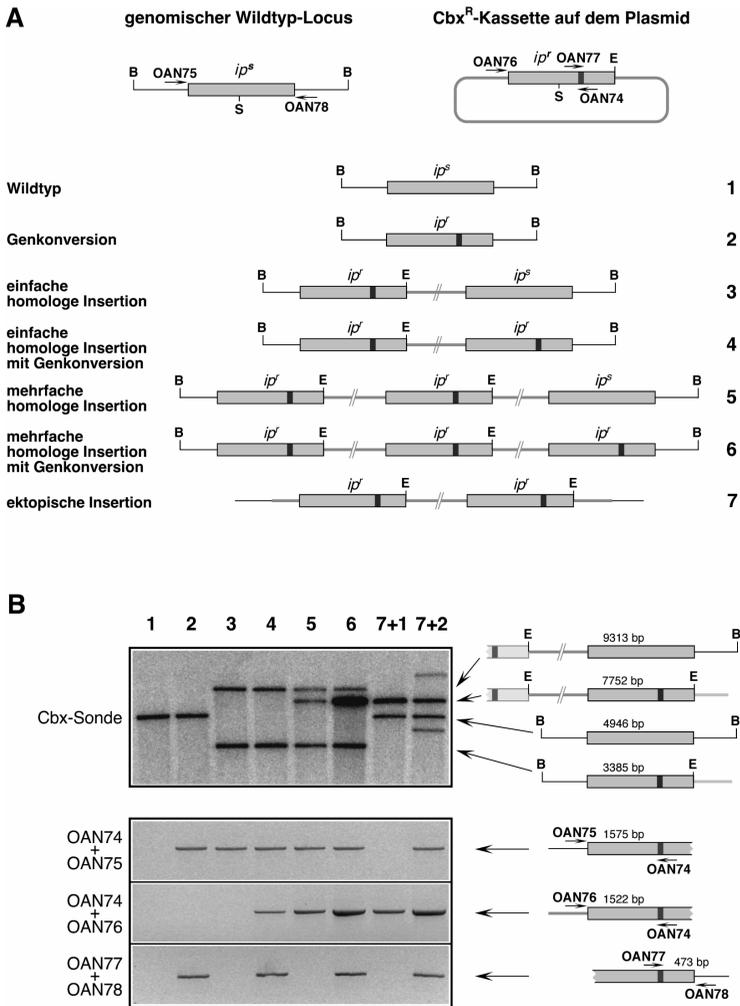
Bisherige Promotoranalysen in *U. maydis*, wie z. B. die Arbeiten zum Promotor des Arabinosegens *crg1* (Bottin *et al.*, 1996) erfolgten unter Zuhilfenahme frei replizierender Vektoren<sup>42</sup>. Da jedoch bislang nur wenige Daten über die Kopienzahl der verwendeten Vektoren und die Reproduzierbarkeit der erhaltenen Ergebnisse veröffentlicht sind<sup>43</sup>, wurde nach einer geeigneten Methode gesucht, um die zu vergleichenden Promotoren in einem definierten genomischen Umfeld zu integrieren, so dass sie in einfacher Kopienzahl vorliegen und die Versuche ohne Selektionsdruck durchgeführt werden können. Dazu bietet sich in *U. maydis* der *ip*-Locus an, der für die Eisen-Schwefel-Untereinheit der Sukzinat-Dehydrogenase kodiert. Ein Aminosäureaustausch in  $Ip^s$  führt zu Resistenz gegen das Antibiotikum Carboxin (Keon *et al.*, 1991; Broomfield und Hargreaves, 1992). Transformation von *U. maydis* mit Plasmiden, die neben dem gewünschten Expressionskonstrukt das *ip<sup>r</sup>*-Allel (die sogenannte Cbx-Resistenzkassette) enthalten und in diesem linearisiert sind, führen im Idealfall zu einer einfachen homologen Insertion in den *ip*-Locus und damit zu Carboxin-Resistenz (Abbildung 42A). Daneben sind eine Reihe weiterer unterschiedlicher Integrationsereignisse möglich, die in Abbildung 42A dargestellt sind. Durch Ganz-Zell-PCR-Analyse der Transformanten mit verschiedenen Oligonukleotidpaaren kann eine schnelle Vorauswahl der richtigen Transformanten getroffen werden, so dass sich letztlich bei fast allen vorselektierten Transformanten in der abschließenden Southern-Analyse die richtige, das heißt einfache homologe Insertion bestätigte ließ (Abbildung 42B und für weitere Einzelheiten siehe Abschnitt 4.3.4).

Das System der Integration in den *ip*-Locus besitzt noch weitere Vorzüge. Die integrierten Konstrukte können zur Analyse relativ einfach wieder reisoliert werden, was z. B. im Fall des Stammes AB171 (*al1mfa2 bW2bE1 Δkpp6 ip'[P<sub>kpp6</sub>:kpp6]ip<sup>s</sup>*) notwendig war (siehe Abschnitte 2.4.5 und 4.3.1). Des Weiteren können Analysen bei Stämmen mit im Genom integrierten Reporterkonstrukten ohne Antibiotika-Selektionsdruck durchgeführt werden, wodurch mögliche Verfälschungen der Ergebnisse vermieden werden. Das Integrationssystem fand bereits bei

<sup>42</sup> Ein System, das mit den stabil propagierten CEN ARS-Plasmiden in *S. cerevisiae* (Bitoun und Zamir, 1986) vergleichbar wäre, existiert bisher nicht.

<sup>43</sup> Tsukuda *et al.* (1988) geben für frei replizierende Vektoren mit Hygromycin-Resistenz eine relativ stabile Kopienzahl von etwa 25 pro Zelle an. Da diese Untersuchungen ohne internen Standard durchgeführt wurden, handelt es sich allerdings um eine sehr grobe Abschätzung, worauf die Autoren auch ausdrücklich hinweisen. Eigene Untersuchungen unter Verwendung eines internen Standards deuten auf eine Kopienzahl von weniger als 10 Plasmiden pro Zelle hin (nicht gezeigt und G. Weinzierl, pers. Mitteilung).

der Analyse der Promotoren von *mig1* (Basse *et al.*, 2000) und *lga2* (Romeis *et al.*, 2000) und einer Deletionsanalyse von *sql1* (Loubradou *et al.*, 2001) Verwendung.



**Abbildung 42: Gezielte Integration in den *ip*-Locus von *U. maydis*.** **A)** Schematische Darstellung der möglichen Insertionsereignisse. Die Lage der verwendeten Oligonukleotide OAN74 bis 78 und der relevanten Restriktionsschnittstellen ist angegeben. **B)** Southern-Analyse (oben) und Ganz-Zell-PCR-Analyse (unten) von ausgewählten Transformanten. Rechts daneben schematische Darstellung der hybridisierenden DNA-Banden bzw. PCR-Amplifikate. Details zu den experimentellen Bedingungen siehe Abschnitt 4.3.2 und 4.3.4. Verwendete Restriktionsenzyme: S, *SspI* (für Plasmid-Linearisierung); B, *Bam*HI, E, *Eco*RI (beide für Southern-Analyse). Zeichnung ist nicht maßstabsgerecht.

Durch die PCR-Analyse können nicht nur richtige Transformanten schnell identifiziert werden, sondern es kann auch zwischen Insertionen mit bzw. ohne gleichzeitig erfolgter Genkonversion unterschieden werden (Abbildung 42B, vergleiche insbesondere die Amplifikate bei Verwendung der Oligonukleotid-Kombination OAN77 + OAN78 bei den Spuren 3 mit 4 bzw. 5 mit 6). Während im Rahmen dieser Arbeit in Bezug auf Wachstum, Zellmorphologie, Kreuzungsverhalten und Pathogenität keinerlei Unterschiede zwischen carboxinresistenten und -resistenten *U. maydis*-Stämmen festgestellt werden konnten, berichten Ruiz-Herrera *et al.* (1999b) von einer deutlichen Reduktion der Pathogenität bei *U. maydis*-Stämmen, bei denen eine Carboxin-Resistenzkassette in das Chitinsynthetase-Gen *chs4* inseriert worden war. Eine mögliche Erklärung könnte darin bestehen, dass bei den von Ruiz-Herrera *et al.* (1999b) untersuchten Stämmen gleichzeitig durch Genkonversion im Wildtyp *ip*-Locus ein zweites carboxinresistentes Allel entstanden ist. In diesem Fall liegt in den Zellen kein *ip<sup>s</sup>*-Gen mehr vor, was in der Arbeit allerdings nicht untersucht wurde. Die Vermutung wird dadurch unterstützt, dass die Sukzinatdehydrogenase-Aktivität in Proteinextrakten aus den carboxinresistenten Stämmen etwa bei der Hälfte der Aktivität von Extrakten aus Kontrollstämmen lag und bei Zugabe von Carboxin keine Veränderung zu beobachten war (Ruiz-Herrera *et al.*, 1999b). Dagegen ist in den Kontrolleextrakten die Aktivität in Gegenwart von Carboxin um die Hälfte reduziert (Ruiz-Herrera *et al.*, 1999b). Dies spricht dafür, dass in dem carboxinresistenten Stamm ausschließlich *Ip<sup>r</sup>*-Protein vorlag. Allerdings verdeutlicht diese Arbeit die Notwendigkeit der PCR-Analyse bei Integration in den *ip*-Locus, zumindestens falls die Transformanten in Pathogenitätstests eingesetzt werden sollen. Um derartige unerwartete Effekte zu vermeiden, wurden ausschließlich Transformanten verwendet, die ein *ip<sup>s</sup>*- und ein *ip<sup>r</sup>*-Allel besitzen.

Bei den hergestellten Konstrukten wurde versucht, ein größtmögliches Maß an Kompatibilität zu erreichen, so dass z. B. ein einfacher Austausch von Promotoren oder Resistenzkassetten zwischen verschiedenen Plasmidkonstrukten möglich ist. Dazu wurden durch gerichtete PCR-Mutagenese und geeignete Klonierungsstrategien Promotoren in der Regel als *NotI/NdeI*-Fragmente, Gene als *NdeI/AscI*-Fragmente und Terminatoren als *AscI/NotI*-Fragmente kloniert. Damit sind transkriptionelle Fusionen zwischen beliebigen Promotoren und Genen direkt am Translationsstart möglich. Als Schnittstelle für den Übergang wurde die Erkennungssequenz von *NdeI* (CA↓TATG) gewählt (siehe auch Abschnitt 6.3). Das Rückgrat dieses Kassettensystems sind Plasmide, welche die in *U. maydis* verwendeten Resistenzkassetten als *NotI*- bzw. *AscI*-Fragmente enthalten (pSL-Cbx, pSL-Ble, pSL-Hyg, und pSL-Nat, bzw. pNEB-Cbx, pNEB-Ble, pNEB-Hyg, und pNEB-Nat; Details siehe Abschnitt 4.1.4). Diese Plasmide haben bereits bei einer ganzen Reihe von Projekten Verwendung gefunden (Hartmann *et al.*, 1999; Müller *et al.*, 1999; Basse *et al.*, 2000; Romeis *et al.*, 2000; Wedlich-Söldner *et al.*, 2000; Loubradou *et al.*, 2001).

## 6.2 Regulierbare Promotoren in *U. maydis*

Banks *et al.* (1993) beschreiben die Isolierung von *nar1* aus *U. maydis*, dem Gen für das Apoenzym der Nitratreduktase. Da dieses Gen bei Wachstum in Medien mit  $\text{NO}_3^-$  als einziger Stickstoffquelle induziert und durch  $\text{NH}_4^+$  reprimiert ist, bietet sich der *nar1*-Promotor für die regulierte Expression von Genen an. Es war bereits bekannt, dass der veröffentlichte 503 bp lange Promotorbereich nicht ausreicht, nitratinduzierte Expression zu vermitteln (nicht gezeigt). Aus diesem Grund wurde ausgehend von der vorhandenen Sequenzinformation ein Cosmid-Klon und aus diesem ein 6,6 kb langer *BgIII/HindIII*-Subklon isoliert. Dieser Subklon diente zur Herstellung eines ATG-Fusionskonstrukts von 2,2 kb *nar1*-Promotorbereich vor *sgfp* (Sheen *et al.*, 1995; Chiu *et al.*, 1996). Dabei wurde der von Banks *et al.* (1993) angenommene Translationsstartpunkt von *nar1* verwendet. Nach homologer Integration dieses Konstrukts in den *ip*-Locus (Stamm RU1) konnte bei Wachstum der Zellen in induzierendem Nitrat-Minimalmedium zwar ein *sgfp*-Transkript, jedoch keine Fluoreszenz nachgewiesen werden (nicht gezeigt). Dies deutete darauf hin, dass der Translationsstartpunkt falsch bestimmt gewesen sein könnte. Die anschließende Sequenzanalyse des gesamten *BgIII/HindIII*-Subklons zeigte eine Reihe von Abweichungen zu der publizierten Sequenz<sup>44</sup> (EMBL# X67687). Das von Banks *et al.* (1993) als Translationsstartpunkt angenommene ATG-Basentriplett befindet sich in dem sequenzierten Allel außerhalb des Leserasters. Der vermutliche Startpunkt liegt 208 bp weiter stromaufwärts, und insgesamt ist *nar1* damit nicht 2.724 sondern 2.949 bp lang. Die abgeleitete Nar1-Sequenz von 983 Aminosäuren weist große Ähnlichkeit zu einer Reihe pilzlicher Nitratreduktasen auf (z. B. 47% Identität mit Nar1 aus *Hebeloma cylindrosporum* bzw. 41% Identität mit NiaD aus *Aspergillus nidulans*). Es finden sich alle in Nitratreduktasen konservierten Domänen (Campbell und Kinghorn, 1990): die N-terminale Molybdopterin- (Position 87 bis 539), die zentrale Häm- (Position 596 bis 663) und die C-terminale FAD/NADP-Bindedomäne (Position 746 bis 965). Der *BgIII/HindIII*-Subklon ist insgesamt 6.620 bp lang und umfasst 1.855 bp des 3'-Endes des Nitritreduktase-Gens *nir1*<sup>45</sup>, einen 1.198 bp großen intergenischen Bereich, den gesamten ORF von *nar1* (2.949 bp) und 618 bp des 3'-UTR von *nar1*. Die Transkription beider Gene läuft in die gleiche Richtung (Abbildung 43A).

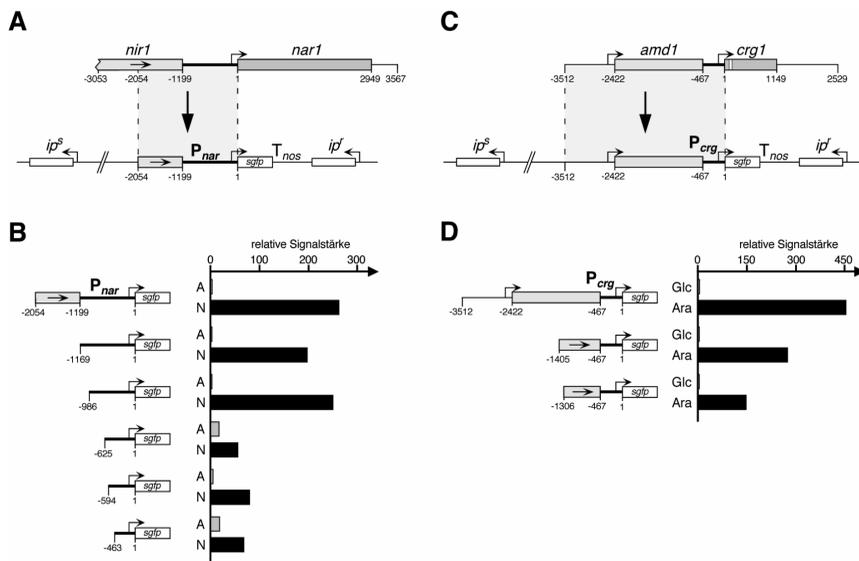
Ausgehend von dem angenommenen neuen Translationsstart wurde ein neues Fusionskonstrukt mit 2.054 bp *nar1*-Promotorbereich vor *sgfp* hergestellt und ebenfalls in den *ip*-Locus inseriert (Abbildung 43A und B). Als Terminator diente ein 287 bp langes Fragment aus dem

---

<sup>44</sup> Insgesamt fanden sich gegenüber der publizierten 3.333 bp Sequenz des *nar1*-Locus 112 Abweichungen: 24 Deletionen, 42 Insertionen und 46 Basenaustausche.

<sup>45</sup> Das von dem klonierten 3'-Bereich kodierte, 618 Aminosäuren lange Peptid weist starke Ähnlichkeit zu C-Termini einer Reihe pilzlicher Nitritreduktasen auf (z. B. jeweils 54% Identität mit Nir1 aus *Hebeloma cylindrosporum* und mit NiaA aus *Aspergillus nidulans*). Da schon Holliday (1971) und Banks *et al.* (1993) die räumliche Nähe von *nir1* und *nar1* in *U. maydis* zeigen konnten, kann davon ausgegangen werden, dass es sich bei dem Fragment um das 3'-Ende der Nitritreduktase *nir1* handelt.

3'-UTR des Nopalinsynthese-Gens ( $T_{nos}$ ) aus *Agrobacterium tumefaciens* (Bevan *et al.*, 1983), das in *U. maydis* Transkriptions-Termination vermittelt (Romeis *et al.*, 2000)<sup>46</sup>. In diesem Fall konnte sowohl ein *sgfp*-Transkript als auch Fluoreszenz bei Wachstum in Flüssigmedium mit  $\text{NO}_3^-$  als einziger Stickstoffquelle nachgewiesen werden, nicht jedoch, wenn das Medium  $\text{NH}_4^+$  enthielt (nicht gezeigt).



**Abbildung 43: Regulierbare Promotoren in *U. maydis*.** **A**) Schematische Darstellung des *nir1/nar1*-Locus und der genomischen Organisation des *ip*-Locus nach singulärer homologer Integration der Reporterkonstrukte. **B**) Schematische Darstellung der Reporterkonstrukte mit verschiedenen langen *nar1*-Promotorfragmenten. Die entsprechenden Stämme sind: RU2 (2.054 bp), RU3 (1.169 bp), RU4 (986 bp), RU5 (625 bp), RU6 (594 bp) und RU7 (463 bp). Daneben ist die relative *sgfp*-Transkriptstärke nach fünfständigem Wachstum in Minimalmedium mit  $\text{NH}_4^+$  (A) bzw.  $\text{NO}_3^-$  (N) als einziger Stickstoffquelle angegeben. **C**) Schematische Darstellung des *amd1/crg1*-Locus und der genomischen Organisation des *ip*-Locus nach singulärer homologer Integration der Reporterkonstrukte. **D**) Schematische Darstellung der Reporterkonstrukte mit verschiedenen langen *crg1*-Promotorfragmenten. Die entsprechenden Stämme sind: RU11 (3.512 bp), RU12 (1.405 bp) und RU13 (1.306 bp). Daneben ist die relative *sgfp*-Transkriptstärke nach fünfständigem Wachstum in Vollmedium mit Glucose (Glc) bzw. Arabinose (Ara) als einziger Kohlenstoffquelle angegeben. Die relativen Transkriptstärken in **B**) und **D**) beziehen sich jeweils auf die *sgfp*-Transkriptstärke unter reprimierenden Bedingungen bei Verwendung des längsten Reporterkonstrukts (mit bloßem Auge waren dabei keine Signale zu erkennen). Zum Mengenabgleich wurden die Filter anschließend mit einer 18S rRNA-Sonde hybridisiert (siehe Abschnitt 6.16); die Quantifizierung erfolgte mit Hilfe eines STORM460 Phosphoimager und IMAGEQUANT-Software. Zeichnungen sind maßstabsgerecht.

Zur Bestimmung der für  $\text{NO}_3^-$ -Induktion bzw.  $\text{NH}_4^+$ -Repression verantwortlichen Promotorbereiche wurden schrittweise Promotorverkürzungen vorgenommen und in identischer Weise an

<sup>46</sup> Alle weiteren *gfp*-Reportergen-Konstrukte enthalten ebenfalls den *nos*-Terminator.

*sgfp* fusioniert (Abbildung 43B), und die Konstrukte mittels homologer Rekombination in Einzelkopie in den *ip*-Locus eingebracht, um einen direkten Vergleich der Transkriptmengen vornehmen zu können. Dabei zeigte sich, dass ein 966 bp langes Promotorfragment in der Lage ist, volle  $\text{NO}_3^-$ -Induktion und  $\text{NH}_4^+$ -Repression zu vermitteln. Eine weitere Verkürzung des *nar1*-Promotors führt zu wesentlich geringerer Induzierbarkeit und dem Auftreten eines deutlichen Signals bei Wachstum mit  $\text{NH}_4^+$  (Abbildung 43B).

Da ein Wechsel der Stickstoffquelle im Medium Veränderungen im zellulären Expressionsmuster nach sich zieht, kann das bei Analysen zu einer Beeinflussung oder Überlagerung der zu untersuchenden Genexpression führen<sup>47</sup>. Um derartige Medieneinflüsse identifizieren und ausschließen zu können, wurde mit dem *crg1*-Promotor in ähnlicher Weise ein zweites regulierbares Promotorsystem etabliert. Bottin *et al.* (1996) konnten bereits zeigen, dass ein 3,5 kb langes Promotorfragment zu heterologer Arabinose-induzierter und Glucose-reprimierter Expression ausreicht. Die Sequenzanalyse des entsprechenden Fragments ergab, dass sich darauf ein vollständiger, 1.956 bp langer ORF befindet (Abbildung 43C). Die abgeleitete Proteinsequenz zeigt starke Ähnlichkeit zu pilzlichen Acetamidasen (z. B. 33% Identität mit Amd1 aus *S. pombe* bzw. 30% Identität mit AmdS aus *Aspergillus nidulans*) und das Gen wurde daher mit *amd1* bezeichnet.

Die Analyse verschieden langer *crg1*-Promotorfusionen mit *sgfp* zeigte nach singulärer Integration in den *ip*-Locus, dass die Verkürzungen zwar zu einer gewissen Abnahme der Induzierbarkeit führen (Abbildung 43C und D). Mit keinem der Konstrukte konnte jedoch in den Transformanten bei Wachstum in Medien mit Glucose als Kohlenstoffquelle *sgfp*-Transkript nachgewiesen werden (Abbildung 43D und nicht gezeigt). Im Folgenden wurde daher ausschließlich mit dem 1.405 bp langen *crg1*-Promotorfragment gearbeitet, das zum einen deutlich kürzer ist und auf dem sich zum anderen nur noch ein vermutlich inaktives 3'-Fragment von *amd1* befindet, anstatt dem vollständigen Gen.

---

<sup>47</sup> Dieser Fall ist z. B. bei der Untersuchung der Gene *big2* und *big4* aufgetreten, die einer komplexen gleichzeitigen Regulation durch verschiedene Kohlenstoffquellen und das bW/bE-Heterodimer unterliegen (siehe Abschnitt 6.6). Die parallele Verwendung beider Promotoren ermöglichte in dieser Arbeit einen Ausschluss derartiger medienbedingter Expressionsunterschiede (siehe Abschnitt 2.1.6). Das Problem könnte auch durch die Etablierung eines kontrollierbaren Promotorsystems auf der Basis heterologer Regulatoren, wie z. B. dem bakteriellen tet-Repressor (Gossen *et al.*, 1995; Kringstein *et al.*, 1998; Rossi *et al.*, 1998), umgangen werden. In diesem Fall würde die Expression durch Zugabe von Tetrazyklin induziert werden, was zumindest in den üblicherweise verwendeten Konzentrationen auf *U. maydis* selber keine erkennbare Auswirkung hat (S. Gilles und M. Feldbrügge, pers. Mitteilung).

### 6.3 Konstitutive Promotoren und GFP-Varianten in *U. maydis*

In der gleichen Weise wie die regulierbaren Promotoren von *nar1* und *crgl* wurden in das oben beschriebene Expressionssystem bekannte DNA-Fragmente mit konstitutiver Promotoraktivität in *U. maydis* eingebracht. Es handelt sich hierbei um den Promotor des Hitzeschockgens *hsp70* aus *U. maydis*,  $P_{hsp}$  (Wang *et al.*, 1988; Holden *et al.*, 1989), den Promotor des Translations-Elongationsfaktors 1 aus *U. maydis*,  $P_{tef}$  (Spellig *et al.*, 1996), Derivate davon mit zusätzlich 7 bzw. 14 Tetracyclin-Operatorsequenzen,  $P_{o1tef}$  (siehe Abschnitt 4.1.4) bzw.  $P_{o2tef}$  (Spellig *et al.*, 1996) und ein DNA-Fragment aus *S. cerevisiae*,  $P_{sc}$  (Bölker *et al.*, 1995a). Bislang war in Hinsicht auf die relativen Promotorstärken lediglich bekannt, dass  $P_{tef}$  eine schwache konstitutive Promotoraktivität aufweist, die durch Hinzufügen von 14 Tetracyclin-Operatorsequenzen etwa um das achtfache gesteigert werden kann (Spellig *et al.*, 1996).

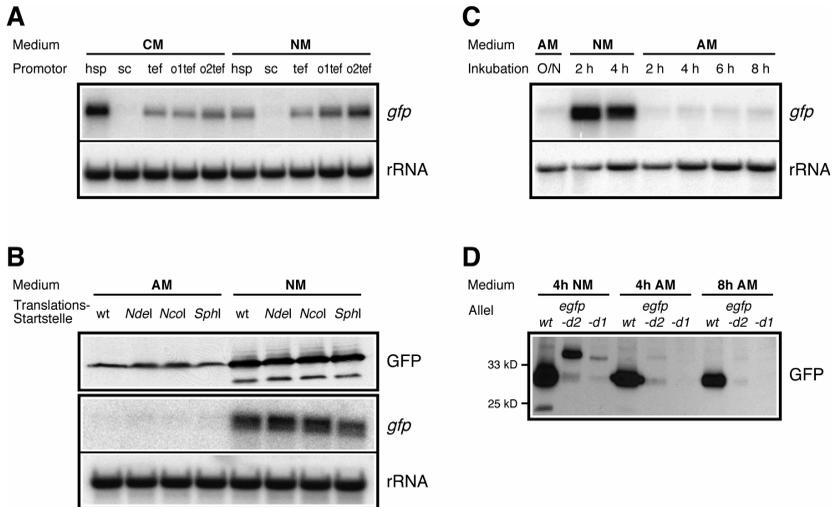
Transformanten mit singulärer homologer Integration der entsprechenden Reporterkonstrukte wurden in Voll- und in Minimalmedium auf die jeweilige Menge an *sgfp*-Transkript hin untersucht (Abbildung 44A). Dabei zeigte sich, dass  $P_{sc}$  sehr schwache,  $P_{tef}$ ,  $P_{o1tef}$  und  $P_{o2tef}$  mittlere bis hohe und  $P_{hsp}$  hohe Promotoraktivität aufweisen. Zumindest in Minimalmedium zeigt sich der etwa achtfache Expressionsunterschied zwischen  $P_{tef}$  und  $P_{o2tef}$ ;  $P_{o1tef}$  liegt dazwischen. Während bei  $P_{sc}$  und  $P_{tef}$  kein Unterschied zwischen Voll- und Minimalmedium beobachtet werden kann, zeigt  $P_{hsp}$  eine stärkere Promotoraktivität in Vollmedium bzw.  $P_{o1tef}$  und  $P_{o2tef}$  in Minimalmedium (Abbildung 44A). Insgesamt kann wohl davon ausgegangen werden, dass  $P_{hsp}$  und  $P_{o2tef}$  zur Überexpression von Genen in *U. maydis* verwendet werden können.

Bei den bisher verwendeten Reporterkonstrukten wurde für den Übergang zwischen Promotor und *sgfp* die Erkennungssequenz für *NdeI* (CA↓TATG) verwendet. Daneben existieren weitere Möglichkeiten, mittels Klonierung transkriptionelle Fusionen direkt am Translationsstart eines Gens zu erzeugen, z. B. die Verwendung der Erkennungssequenzen für *NcoI* (C↓CATGG) bzw. *SphI* (GCATG↓C)<sup>48</sup>. Gegenüber *NdeI* haben diese Varianten den Nachteil, dass je nach zu exprimierendem Gen eventuell die zweite Aminosäure verändert werden muss<sup>49</sup>. Sie haben aber den Vorteil, dass ihre Erkennungssequenzen besser mit der von Ballance (1990) ermittelten Konsensussequenz für Translations-Startstellen in filamentösen Pilzen (CA<sup>C</sup>/<sub>A</sub><sup>A</sup>/<sub>C</sub> ATGC) übereinstimmt. Entsprechend finden sich in *U. maydis* zwar Gene mit *NcoI*- bzw. *SphI*-Erkennungsstellen am Translationsstart (z. B. *egl1* bzw. *iad1*; Schauwecker *et al.*, 1995; Basse *et al.*, 1996), bislang jedoch keine mit *NdeI*-Erkennungssequenzen am ATG.

<sup>48</sup> Es wären dafür auch noch die Restriktionsenzyme *PciI* (A↓CATGT) und *XbaI* (T↓CATGA) verwendbar.

<sup>49</sup> In *S. cerevisiae* konnte gezeigt werden, dass die zweite Aminosäure nach der sogenannten "N-end rule" einen wichtigen Einfluss auf die Halbwertszeit von Proteinen hat (Varshavsky *et al.*, 2000). Falls in *U. maydis* ein ähnlicher Mechanismus des Proteinabbaus vorliegt, könnte eine Veränderung der zweiten Aminosäure unerwünschte Effekte zur Folge haben.

Zur Analyse eines möglichen Einflusses unterschiedlicher Startstellen auf die Translations-effizienz in *U. maydis* wurden mittels gerichteter PCR-Mutagenese Reporterkonstrukte herge-stellt, die jeweils den 986 bp *nar1*-Promotor vor *sgfp* enthalten und sich nur in den Transla-tions-Startstellen unterscheiden: eine Wildtyp *nar1*-Promotorsequenz (gga aag atg gtg), eine Erkennungssequenz für *NdeI* (gga CAT ATG gtg), eine für *NcoI* (gga aCC ATG Gtg) und eine für *SphI* (gga aGC ATG Ctg).



**Abbildung 44: Konstitutive Promotoren und GFP-Varianten in *U. maydis*.** A) Northern-Analyse von *U. maydis*-Transformanten mit singulärer Integration von Reporterkonstrukten mit konstitutiven Promotoren vor *sgfp*. Die entsprechenden Stämme sind: CU1 ( $P_{hsp}$ ), CU2 ( $P_{sc}$ ), CU3 ( $P_{tef}$ ), CU7 ( $P_{o1tef}$ ) und CU4 ( $P_{o2tef}$ ). Die Stämme wurden in NM-Glc bzw. CM-Glc Flüssigmedium bis  $OD_{600} \approx 0,5$  inkubiert. Pro Spur wurde etwa 10  $\mu$ g RNA geladen. B) Western- und Northern-Analyse von *U. maydis* Transformanten mit singulärer Integration von Reporterkonstrukten, die das 986 bp *nar1*-Promotorfragment vor *sgfp* mit unterschiedlichen Translations-Startstellen enthalten. Die entsprechenden Stämme sind: RU4wt (wt), RU4 (*NdeI*), RU4Nco (*NcoI*) und RU4Sph (*SphI*). Zellen wurden in AM bis zu  $OD_{600} \approx 0,5$  kultiviert, anschließend für 5 h in AM bzw. NM induziert und geerntet. Pro Spur wurde etwa 100  $\mu$ g Protein bzw. etwa 10  $\mu$ g RNA geladen. Bei der kleineren Proteinbande scheint es sich um ein GFP-Abbauprodukt zu handeln, das bei starker Expression sichtbar ist. Bei Verwendung des *nar1*-Promotors zur Expression von Genen in *U. maydis* zeigen sich in Northern-Analysen jeweils zwei Signale, wobei der Größenunterschied etwa 50 bis 100 Nukleotide beträgt (siehe auch C). Der *nar1*-Promotor besitzt wahrscheinlich zwei unterschiedliche Transkriptions-Startpunkte (alternativ ist auch differentielles Spleißen im 5'-UTR möglich). C) Northern-Analyse von Stamm RU4egfp, der in singulärer Kopie das 986 bp *nar1*-Promotorfragment vor *egfp* enthält. Zellen wurden in AM bis zu  $OD_{600} \approx 0,5$  kultiviert, anschließend für 4 h in NM induziert und schließlich für insgesamt 8 h wieder in AM wachsen gelassen. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden Aliquots entnommen. Pro Spur wurde etwa 10  $\mu$ g RNA geladen. D) Western-Analyse von *U. maydis* Transformanten mit singulärer Integration von Reporterkonstrukten mit 986 bp *nar1*-Promotor vor verschiedenen *egfp*-Allelen; die entsprechenden Stämme sind: RU4egfp, RU4egfp-d2 und RU4egfp-d1. Kultivierung siehe C), zu den angegebenen Zeitpunkten wurden Aliquots entnommen. Pro Spur wurde etwa 80  $\mu$ g Protein geladen.

Nach singulärer homologer Integration in den *ip*-Locus wurden die Transformanten unter re-primierenden und induzierenden Wachstumsbedingungen auf die jeweiligen Mengen an *sgfp*-

Transkript und an GFP-Protein untersucht. Dabei zeigte sich, dass die Unterschiede in den Translations-Startstellen nicht nur keinen Einfluss auf die Transkription haben, sondern erstaunlicher Weise auch kein Unterschied in der Translationseffizienz erkennbar ist (Abbildung 44B). Darüber hinaus scheint es sich bei GFP um ein in *U. maydis* sehr stabiles Protein zu handeln, da unter reprimierenden Bedingungen fast kein *sgfp*-Transkript, aber eine deutliche Menge an GFP-Protein nachweisbar ist. Dies kann zu Problemen bei Expressionsstudien führen, wenn dabei GFP bzw. GFP-Fluoreszenz als Marker benutzt wird.

Aus diesem Grund wurden in demselben Reportersystem das häufig verwendete *egfp* (Basse *et al.*, 2000; Wedlich-Söldner *et al.*, 2000) und die beiden destabilisierten Allele *egfp-d2* und *egfp-d1* (Clontech) mit einer angegebenen Halbwertszeit von zwei bzw. einer Stunde unter Kontrolle des 986 bp langen *nar1*-Promotorfragments kloniert und in singulärer Kopie in *U. maydis* eingebracht. In der Northern-Analyse zeigt sich, dass schon zwei Stunden nach Induktion des *nar1*-Promotors ein starkes *gfp*-Transkript sichtbar ist, das innerhalb von zwei Stunden nach Wechsel zu reprimierenden Medienbedingungen wieder verschwindet<sup>50</sup> (Abbildung 44C). Der *nar1*-Promotor eignet sich daher sowohl für Gen-Aktivierung als auch für die Inaktivierung von Genen und damit zur Analyse von Effekten, die durch das Ausschalten von z. B. essentiellen Genen verursacht werden. In diesem Zusammenhang wäre interessant zu untersuchen, ob durch unterschiedliche Konzentrationen an Nitrat im Medium, oder durch die Zugabe geringer Mengen an Ammonium eine graduelle Regulation der Promotoraktivität erzielt werden kann.

Die parallel durchgeführte Western-Analyse bestätigt die hohe Stabilität von GFP in *U. maydis*. Selbst acht Stunden nach Ausschalten des Promotors ist noch ein starkes Signal zu erkennen (Abbildung 44D). Dagegen weisen die destabilisierten Versionen von EGFP auch in *U. maydis* eine deutlich kürzere Halbwertszeit auf. Demnach werden offensichtlich die PEST-Sequenzen der Ornithin-Decarboxylase aus Maus, die in diesen Versionen an GFP fusioniert sind (Clontech), in *U. maydis* erkannt. Damit konnte erstmals gezeigt werden, dass dieser konservierte Protein-Abbauweg (Rechsteiner und Rogers, 1996) auch in *U. maydis* existiert, was bisher nur vermutet worden war (Loubradou *et al.*, 2001). Die erhöhte Instabilität führt allerdings auch zu einer geringeren Akkumulation der Proteine unter induzierenden Bedingungen (Abbildung 44D) und damit zu deutlich schwächerer Fluoreszenz (nicht gezeigt). Daher eignen sie sich nur für Promotorstudien entsprechend stark exprimierter Gene, bieten aber gegenüber EGFP den Vorteil einer höheren zeitlichen Auflösung.

---

<sup>50</sup> In diesem Experiment kann ein schwaches *gfp*-Hintergrundsignal unter reprimierenden Bedingungen beobachtet werden. Derartige Unterschiede zwischen Versuchen wurden vereinzelt festgestellt. Der *nar1*-Promotor scheint ein gewisses basales Expressionsniveau zu besitzen, daher muss in jedem Einzelfall geprüft werden, ob das zu Problemen in der Analyse führen kann.

## 6.4 Testansatz zur Isolierung b-regulierter Gene

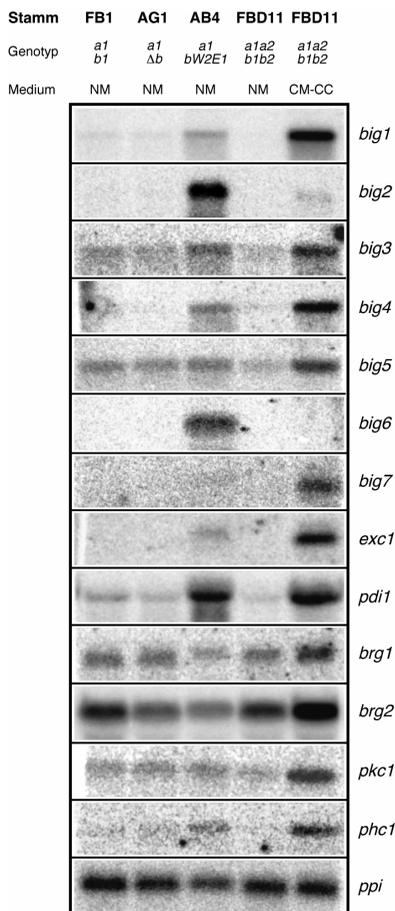
Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine nichtradioaktive Variante der Technik des RNA-Fingerprints entwickelt, da trotz aller Vorteile und Verbesserungen der letzten Jahre (Liang und Pardee, 1995; 1998; Matz und Lukyanov, 1998) die üblicherweise verwendeten Methoden des Differential Display und des RNA-Fingerprints einige Nachteile aufweisen: Die Verwendung radioaktiv markierter Nukleotide und die Auftrennung der erzeugten Amplicons über Polyacrylamid-Gele erschwert eine Automatisierung und damit die Analyse einer großen Anzahl an Reaktionen. Zwar wurde mit dem sogenannten "REN display" ("Rapid, efficient and non-radioactive display") eine nichtradioaktive Variante entwickelt, bei der die Amplicons durch Silberfärbung sichtbar gemacht werden (Lohmann *et al.*, 1995). Diese Methode ist jedoch relativ aufwendig und benötigt immer noch eine Auftrennung mittels Polyacrylamid-Gelen. Ein zweiter Nachteil besteht in der Notwendigkeit, die extrahierten Amplicons vor der Klonierung oder direkten Sequenzierung reamplifizieren zu müssen. Bei diesem Schritt kann es zu einer Anreicherung von kontaminierenden Amplicons kommen (Bauer *et al.*, 1993; Callard *et al.*, 1994; Wang und Feuerstein, 1995). Dies ist wahrscheinlich eine der häufigsten Ursachen für das Auftreten falsch positiver Kandidaten, was sicher das größte Problem bei diesen Methoden darstellt. Auch wenn die Verbesserungen der letzten Jahre eine deutliche Erhöhung des Anteils an positiven Klonen gebracht haben (Liang und Pardee, 1998), kann das Problem nicht vollständig eliminiert werden, da es vermutlich in der geringen Menge an Ausgangsmaterial und den damit verbundenen statistischen Unterschieden in den cDNA-Populationen begründet ist (Matz und Lukyanov, 1998). Darüberhinaus gibt es keinerlei Untersuchungen zu dem minimalen Expressionsniveau, das ein Gen in der Zelle aufweisen muss, um mit diesen Methoden detektierbar zu sein (Matz und Lukyanov, 1998). Während in einzelnen Publikationen die erfolgreiche Identifizierung gering exprimierter, differentiell regulierter Gene beschrieben wird (z. B. Wan *et al.*, 1996), zeigen andere Publikationen eine deutliche Überrepräsentation stark transkribierter Gene unter den isolierten Klonen (Bertioli *et al.*, 1995; McClelland *et al.*, 1995).

Das Ziel der Etablierung eines modifizierten Systems in dieser Arbeit lag in der Elimination möglichst vieler der oben angeführten Nachteile. Dazu wurde als Ausgangspunkt eine Variante des RNA-Fingerprint-Protokolls verwendet, bei der aus den cDNA-Populationen mit zwei 18mer Oligonukleotiden zunächst unter nicht-stringenten Bedingungen eine Grundmenge an Amplicons geschaffen wird, die anschließend durch Amplifikation unter stringenten Bedingungen vervielfältigt wird (Friedel *et al.*, 1997). Diese Methode weist an sich schon eine Reihe an Vorzügen im Vergleich zu den Originalprotokollen auf. Dadurch, dass nur zwei Amplifikationszyklen unter nicht-stringenten Bedingungen stattfinden, ist das entstehende Bandenmuster deutlich einheitlicher und klarer, was eine größere Reproduzierbarkeit zur Folge hat (Friedel *et al.*, 1997). Die entstehenden Amplicons liegen nicht, wie beim Differen-

tial Display, ausschließlich in der 3'-Region der Transkripte, sondern häufig im kodierenden Bereich, so dass die Sequenzanalyse Aussagen über die regulierten Gene ermöglicht. Und schließlich können theoretisch alle Oligonukleotide verwendet werden, deren stringente Hybridisierungstemperatur größer als die in diesem Protokoll verwendeten 65°C ist. Eine derartige Verwendung beliebiger Oligonukleotide wurde auch für die Technik des Differential Display bereits beschrieben (Jurecic *et al.*, 1996) und bedeutet eine Reduzierung der Kosten für die Durchführung der Analyse.

In einem ersten Testansatz sollte getestet werden, ob mit dieser Methode und den Stämmen zur *b*-Induktion Gene identifiziert werden können, deren Expression durch das *bW/bE*-Heterodimer kontrolliert wird. Dazu wurden die beiden Stämme AG1 (*a1 Δb*) und AB4 (*a1 P<sub>nar</sub>:bW2, bE1*) zwei Stunden nach Wechsel von reprimierendem AM- zu induzierendem NM-Flüssigmedium verglichen. Diese beiden Stämme entsprechen in Bezug auf *b*-Induktion und Expressionsmuster der *b*-regulierten Gene *dik6*, *egl1* und *rep1* den Stämmen AB2 (*a2 Δb*) bzw. AB33 (*a2 P<sub>nar</sub>:bW2,bE1*) (nicht gezeigt). Es handelt sich aber um früher hergestellte Derivate des haploiden Stammes FB1 (*a1 b1*), d. h. die Deletion des *b*-Locus bzw. der Austausch des intergenischen Promotorbereichs ist im *b1*-Locus erfolgt.

Bei den PCR-Ansätzen wurden 36 Kombinationen von 18 verschiedenen Oligonukleotiden verwendet, wodurch etwa 700 Amplicons entstanden, von denen etwa 450 verschieden sein dürften<sup>51</sup>. 30 Amplicons zeigten ein differentielles Erscheinungsmuster. Sie wurden aus dem Gel extrahiert, kloniert und analysiert (Einzel-



**Abbildung 45: Northern-Analyse der Amplicons aus dem RNA-Fingerprint-Testansatz.** Für die ersten vier Spalten wurden die Stämme in AM bis zu  $OD_{600} = 0,5$  angezogen und für 2 h in NM induziert. Die RNA der fünften Spalte stammt von Zellen, die 48 h auf CM-Charcoal-Festmedium kultiviert worden waren. Pro Spur wurde etwa 5  $\mu$ g RNA geladen.

<sup>51</sup> Diese Zahl ergibt sich aus  $(36 \times 10) + (18 \times 5) = 450$  verschiedene Amplicons, 270 Amplicons ( $54 \times 5$ ) wären redundant (vgl. Abschnitt 2.1.3).

heiten, auch zu den hier nicht beschriebenen Amplicons, siehe Abschnitt 6.5). 18 Amplicons schienen dabei von b-induzierten und 12 von b-reprimierten Genen zu stammen.

Eine Northern-Analyse, bei der einige ausgewählte Amplicons als Sonde verwendet wurden, bestätigte die Identifikation von neun neuen b-induzierten (*big1* bis *big7*, *excl* und *pdil*) und zwei potentiell b-reprimierten Genen (*brg1* und *brg2*) (Abbildung 45, vergleiche jeweils die Signalstärke in Stamm AG1 mit AB4). In drei Fällen waren keine Signale erkennbar, die Expressionsstärke der entsprechenden Gene liegt offensichtlich unterhalb des Detektionsniveaus (nicht gezeigt). Von den b-induzierten Genen zeigen *big1*, *big3*, *big5* und *pdil* eine basale Expression in Stämmen wie FB1 (*al b1*) oder AG1 (*al Δb*), die kein aktives bW/bE-Heterodimer besitzen. Bei den übrigen fünf Genen ist unter diesen Bedingungen kein Signal detektierbar (Abbildung 45). Alle b-induzierten Gene bis auf *big2* und *big6* sind auch im diploiden Stamm FBD11 (*ala2 b1b2*) stark exprimiert, wenn dieser auf aktivkohlehaltigem Festmedium kultiviert wird (Abbildung 45, letzte Spur). Dort sind die Gene des *b*-Locus induziert, so dass aktive bW/bE-Heterodimere vorliegen (in NM-Flüssigmedium ist das Expressionniveau dagegen sehr niedrig) und die Zellen filamentös wachsen (nicht gezeigt). Die nur geringe bzw. fehlende Expression von *big2* und *big6* kann entweder durch Medieneffekte oder durch eine nur vorübergehende Expression kurz nach *b*-Induktion bedingt sein.

Die beiden eventuell b-reprimierten Gene *brg1* und *brg2* zeigen keine eindeutige Regulation in Abhängigkeit vom bW/bE-Heterodimer, der Unterschied in der Signalstärke ist nur etwa zweifach (Abbildung 45, vergleiche die Signalstärke in Stamm AG1 mit AB4). Es ist zwar denkbar, dass die Zeit von zwei Stunden nach *b*-Induktion für einen vollständigen Abbau der Transkripte reprimierter Gene nicht ausreicht. Die jeweils deutlich stärkeren Signale im diploiden Stamm FBD11 bei Wachstum auf aktivkohlehaltigem Festmedium (Abbildung 45, letzte Spur) lassen aber eine strikte Regulation durch *b* unwahrscheinlich erscheinen.

**Tabelle 18: Ergebnisse der Sequenzanalyse von b-regulierten und weiteren interessanten Amplicons aus dem Testansatz**

Gen	Fragmentlänge	Ähnlichkeit zu	Identität	angenommene Funktion
<i>big1</i>	483 bp	-		
<i>big2</i>	339 bp	C13G6.10c ( <i>S. pombe</i> )	41%	(serinreiches Protein)
<i>big3</i>	852 bp	-		
<i>big4</i>	491 bp	C13G6.10c ( <i>S. pombe</i> )	30%	(serinreiches Protein)
<i>big5</i>	331 bp	-		
<i>big6</i>	1207 bp	MdoH ( <i>E. coli</i> )	26%	Glucanbiosynthese-Protein
<i>big7</i>	244 bp	-		
<i>excl</i>	749 bp	Exc1 ( <i>Trichoderma harzianum</i> )	29%	Exochitinase
<i>pdil</i>	274 bp	Pdi1 ( <i>Trichoderma reesei</i> )	42%	Proteindisulfid-Isomerase
<i>brg1</i>	375 bp	SPAC9.08c ( <i>S. pombe</i> )	34%	Steroidreduktase
<i>brg2</i>	642 bp	C13G6.10c ( <i>S. pombe</i> )	29%	(serinreiches Protein)
<i>pkc1</i>	804 bp	Pkc1 ( <i>Trichoderma reesei</i> )	85%	Proteinkinase C
<i>phc1</i>	-	AphB ( <i>Anabaena sp.</i> )	26%	Phytochrom (Photorezeptor)

Die Sequenzanalyse der Amplicons der b-regulierten Gene zeigte in zwei Fällen deutliche Ähnlichkeiten zu pilzlichen Exochitinasen (*exc1*) bzw. Proteindisulfid-Isomerasen (*pdi1*) (Tabelle 18). Die abgeleitete Aminosäuresequenz des Amplicons von *big6* ist ähnlich zu dem Glucanbiosynthese-Protein MdoH aus *E. coli*, die von *brg1* zu einer angenommenen Steroidreduktase aus *S. pombe* (SPAC9.08c) und die von *big2*, *big4*, und *brg2* zu einem postulierten serinreichen Protein, ebenfalls aus *S. pombe* (C13G6.10c). Dabei sind die Regionen, in denen die Proteinsequenzen verwandt sind, im Fall von *big2* und *brg2* die gleichen und unterschiedlich zu der im Fall von *big4*. Bei drei Amplicons konnten keine Ähnlichkeiten festgestellt werden (*big1*, *big3* und *big5*). Die Gene wurden entsprechend ihrer Regulation durch b mit *big* (b-induziertes Gen) bzw. *brg* (b-reprimiertes Gen) bezeichnet (Tabelle 18).

Einige dieser Gene wurden weiter analysiert, zum Teil im Rahmen von Großpraktika und Diplomarbeiten; die Ergebnisse hierzu sind in den Abschnitten 6.6 bis 6.8 zusammengefasst. In diesem Zusammenhang müssen noch zwei weitere Gene erwähnt werden: Es wurde ein Fragment isoliert, das große Ähnlichkeit zu pilzlichen Proteinkinasen C aufweist (z. B. 85% Identität mit Pkc1 aus *Trichoderma reesei*), das zugehörige Gen wurde mit *pkc1* bezeichnet. In chromosomaler Nachbarschaft befindet sich ein weiteres interessantes Gen, das für ein Homolog pilzlicher Histidinkinasen und pflanzlicher Phytochrome kodiert (*phc1*, Tabelle 18). Während *pkc1* keine eindeutige Regulation durch b zeigt, scheint *phc1* b-induziert zu sein (Abbildung 45). Beide Gene wurden ebenfalls weiter untersucht (siehe Abschnitte 6.9 und 6.10).

Der Testansatz zeigte, dass es möglich ist, mit den hergestellten Stämmen zur kontrollierten b-Genexpression und dem modifizierten RNA-Fingerprint-Protokoll neue b-regulierte Gene zu identifizieren. Unter den verwendeten Bedingungen (Induktion für zwei Stunden) wurden allerdings mit *exc1* und *pdi1* auch Gene identifiziert, die wohl eher indirekt reguliert sind und deren Induktion eine Folge des beginnenden filamentösen Wachstums sein könnte (siehe Diskussion). Ein früherer Zeitpunkt nach Induktion scheint eher angebracht, um direkt regulierte Gene zu isolieren. Auf der anderen Seite könnte das zu Problemen bei der Suche nach b-reprimierten Genen führen; dafür wäre ein späterer Zeitpunkt eventuell geeigneter.

Allerdings sind bei weitem noch nicht alle Möglichkeiten der Technik ausgeschöpft worden. Zum Beispiel könnten die Reaktionsbedingungen unter Beachtung des sogenannten "C<sub>0</sub>t-Effekts" (Mathieu-Daude *et al.*, 1996; McClelland *et al.*, 1997) optimiert werden: Wenn zu einem späten Zeitpunkt in der PCR-Amplifikation eine große Menge eines bestimmten Endprodukts vorhanden ist, kommt es teilweise zur Rehybridisierung, so dass die Oligonukleotide nicht mehr daran binden können und daher keine Amplifikation mehr erfolgt. Dieser Effekt kann ab einem Verhältnis von Endprodukt zu freien Oligonukleotiden von 1:100 beobachtet werden und nimmt mit zunehmender Endproduktkonzentration immer weiter zu, so dass bei einem Verhältnis von 1:3 praktisch überhaupt keine Amplifikation mehr erfolgt (Czerny, 1996). Durch Reduzierung der Menge an freien Oligonukleotiden kann daher in einem RNA-

Fingerprint-Ansatz eine bevorzugte Amplifikation von Amplicons seltenerer cDNA-Moleküle erzielt werden, was die Sensitivität der Methode erhöhen würde. Dazu müssen in der Reaktion zu allen Zeiten Nukleotide im Überschuss zur Verfügung stehen, was hier im Gegensatz zu den üblichen radioaktiven Techniken möglich ist. Der durch die Reduktion der Konzentration an Oligonukleotiden hervorgerufene "Plateau-Effekt" führt allerdings gleichzeitig zu einer Nivellierung der Endproduktmengen. Dadurch können eventuell Expressionsunterschiede bei stärker exprimierten Genen nicht mehr detektierbar sein (Mathieu-Daude *et al.*, 1996).

## 6.5 Amplicons aus dem Testansatz zur Isolierung b-regulierter Gene

**Tabelle 19: Größe und Homologien der Amplicons**

Amplicon	Länge	Oligos	Ähnlichkeit zu	Ident.	angenommene Funktion	Gen
<i>fa1</i>	792 bp	PAL6-pETerm	-			
<i>fa1-2</i>	702 bp	pETerm-?	Sen3 ( <i>Homo sapiens</i> )	33%	SUMO-spezifische Protease	
<i>fa2</i>	702 bp	PAL6-pETerm	Gox1 ( <i>Talaromyces flavus</i> )	35%	Glucose-Oxidase	
<i>fa3</i>	749 bp	PAL6-PAL6	Exc1 ( <i>Trichoderma harzianum</i> )	29%	Exochitinase	<i>exc1</i>
<i>fa4</i>	410 bp	OAN11-OAN11	-			
<i>fa5</i>	1215 bp	?-OAN11	Pma1 ( <i>Cryptococcus neoformans</i> )	47%	Plasmamembran (H <sup>+</sup> )-ATPase	
<i>fa5-2</i>	1015 bp	OAN11-OAN11	SPCC825.03c ( <i>S. pombe</i> )	46%	Syntaxin	
<i>fa5-3</i>	985 bp	pETerm-pETerm	Ura1 ( <i>S. pombe</i> )	42%	Carbamoylphosphat-Synthase	
<i>fa6</i>	759 bp	OAN11-pETerm	SPCC4G3.01 ( <i>S. pombe</i> )	67%	Phosphoglycerat-Dehydrogenase	
<i>fa7</i>	1207 bp	pETerm-OAN40	MdoH ( <i>E. coli</i> )	26%	Glucanbiosynthese-Protein	<i>big6</i>
<i>fa8</i>	583 bp	pETerm-pETerm	-			
<i>fa8-2</i>	619 bp	OAN40-?	Idh1 ( <i>Histoplasma capsulatum</i> )	60%	Isocitrat-Dehydrogenase UE1	
<i>fa9</i>	646 bp	OAN31-OAN31	Rph1 ( <i>S. pombe</i> )	61%	Helicase	
<i>fa10</i>	331 bp	OAN31-pETerm	-			<i>big5</i>
<i>fa11 (=fa9)</i>	645 bp	OAN31-OAN31	Rph1 ( <i>S. pombe</i> )	61%	Helicase	
<i>fa12</i>	483 bp	OAN31-OAN27	-			<i>big1</i>
<i>fa13</i>	804 bp	OAN31-OAN31	Pkc1 ( <i>Trichoderma reesei</i> )	85%	Proteinkinase C	<i>pkc1</i>
<i>fa13-2</i>	852 bp	OAN31-?	-			<i>big3</i>
<i>fa14</i>	487 bp	OAN35-OAN31	SCI35.33c ( <i>Streptomyces coelicolor</i> )	54%	Dehydrogenase	
<i>fa14-2</i>	482 bp	OAN31-OAN31	-			
<i>fa15</i>	358 bp	OAN11-OAN11	Dsk1 ( <i>S. pombe</i> )	57%	Proteinkinase	
<i>fa15-2</i>	375 bp	OAN38-OAN11	SPAC9.08c ( <i>S. pombe</i> )	34%	Steroidreduktase	<i>brg1</i>
<i>fa16</i>	323 bp	OAN11-OAN11	KIAA0535 ( <i>Homo sapiens</i> )	80%	Zinkfinger-Protein	
<i>fa17</i>	339 bp	OOL2-OOL2	C13G6.10c ( <i>S. pombe</i> )	41%	(serinreiches Protein)	<i>big2</i>
<i>fa18 (=fa17)</i>	339 bp	OOL2-OOL2	C13G6.10c ( <i>S. pombe</i> )	41%	(serinreiches Protein)	<i>big2</i>
<i>fa19</i>	678 bp	PAL3-PAL12	Nmt2 ( <i>S. pombe</i> )	69%	Thiazol-Biosynthesenzym	
<i>fa20</i>	732 bp	PAL12-PAL3	Kin2 ( <i>U. maydis</i> )	100%	Kinesin	<i>kin2</i>
<i>fa20-2</i>	678 bp	PAL12-PAL3	Nmt2 ( <i>S. pombe</i> )	69%	Thiazol-Biosynthesenzym	
<i>fa21</i>	642 bp	PAL12-PAL3	C13G6.10c ( <i>S. pombe</i> )	29%	(serinreiches Protein)	<i>brg2</i>
<i>fa22</i>	491 bp	PAL12-PAL6	C13G6.10c ( <i>S. pombe</i> )	30%	(serinreiches Protein)	<i>big4</i>
<i>fa23</i>	274 bp	PAL6-PAL12	Pdi1 ( <i>Trichoderma reesei</i> )	42%	Proteindisulfid-Isomerase	<i>pdi1</i>
<i>fa23-2</i>	321 bp	PAL6-?	-			
<i>fa24 (=fa3)</i>	749 bp	PAL6-PAL6	Exc1 ( <i>Trichoderma harzianum</i> )	29%	Exochitinase	<i>exc1</i>
<i>fa25 (=fa9)</i>	645 bp	OAN31-OAN31	Rph1 ( <i>S. pombe</i> )	61%	Helicase	

Fortsetzung Tabelle 19

Amplicon	Länge	Oligos	Ähnlichkeit zu	Ident.	angenommene Funktion	Gen
<i>fa26</i>	244 bp	PAL12-OAN31	-			<i>big7</i>
<i>fa27</i>	1242 bp	OAN34-OAN34	Cct2 ( <i>S. pombe</i> )	70%	T-Komplex-Protein 1β (Chaperon)	
<i>fa27-2</i>	1271 bp	OOL3-OAN34	CpeB ( <i>Streptomyces reticuli</i> )	60%	Catalase-Peroxidase	
<i>fa28</i>	606 bp	OOL3-OAN34	L3 und L4 ( <i>Vibrio cholerae</i> )	60%	ribosomale Proteine	
<i>fa28-2</i>	590 bp	OAN34-OAN34	EF-1α ( <i>Dissophora decumbens</i> )	87%	Translation-Elongationsfaktor	
<i>fa29</i>	299 bp	OAN34-OAN34	Mst1 ( <i>Amanita muscaria</i> )	62%	Hexose-Transporter	
<i>fa30</i>	192 bp	OAN34-PAL12	Pim1 ( <i>S. cerevisiae</i> )	53%	Lon-Protease (mitochondriell)	
<i>fa30-2</i>	193 bp	OAN34-?	CM06B1 ( <i>C. elegans</i> )	40%	Esterase	

## 6.6 Untersuchung der Gene *big2*, *big4* und *brg2*

Unter den im RNA-Fingerprint-Testansatz identifizierten b-regulierten Genen erschienen *big2*, *big4* und *brg2*, deren abgeleitete Aminosäuresequenzen alle Ähnlichkeiten zu einem serinreichen Protein aus *S. pombe* aufwiesen, als am interessantesten für die weitere Analyse. Die relative Lage der ähnlichen Regionen in dem *S. pombe*-Protein ist in Abbildung 46 gezeigt.

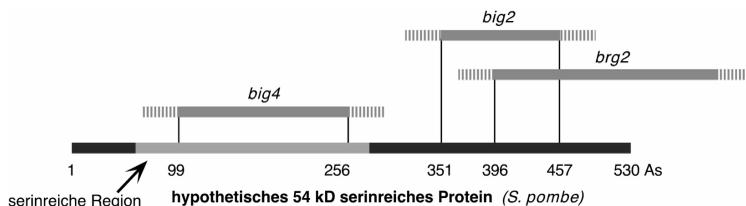


Abbildung 46: Relative Lage der Amplicons von *big4*, *big2* und *brg2* zu dem offenen Leserahmen aus *S. pombe*.

Die im Rahmen der Diplomarbeit von C. Hohenlohe durchgeführte Untersuchung der Gene ergab, dass nur *big2* und *brg2* zueinander und zu dem *S. pombe*-Protein wirklich homolog sind, wobei die Proteine jedoch keine N-terminale serinreiche Region besitzen. Sie sind 330 bzw. 357 Aminosäuren groß und sind vermutlich extrazellulär lokalisiert. Bei *big4* ist die zunächst gefundene Ähnlichkeit durch das Vorhandensein einer serinreichen Domäne begründet, darüber hinaus finden sich keine Ähnlichkeiten. Das abgeleitete Protein ist 1.828 Aminosäuren groß, wahrscheinlich im Zellkern lokalisiert und besitzt als einziges auffälliges Motiv zwei Coiled-Coil Domänen. Deletionsmutanten aller drei Gene und *big2/brg2*-Doppelmutanten zeigten in Bezug auf Zellmorphologie, Wachstum, Kreuzungsverhalten und Pathogenität keine deutlichen Unterschiede zum Wildtyp. Im Fall von *big2* und *brg2* könnte das dadurch begründet sein, dass sich im Genom von *U. maydis* vermutlich noch weitere Homologe befinden, worauf Southern-Analysen, die unter nicht-stringenten Bedingungen durchgeführt wurden, hindeuten. Aus diesem Grund kann über die Funktion der drei Gene nur spekuliert werden.

Interessanter ist in diesem Zusammenhang jedoch, dass die b-abhängige Regulation von *big2* und *big4* unabhängig bestätigt werden konnte (*brg2* zeigte sich als konstitutiv exprimiert). Allerdings sind beide Gene darüber hinaus auch einer starken Regulation durch Medieneinflüsse, wie z. B. durch die verwendeten Stickstoff- und Kohlenstoffquellen, unterworfen. Das erschwerte die Analyse und hat dazu geführt, dass die im eigentlichen RNA-Fingerprint-Ansatz gewonnen Amplicons vor der weiteren Untersuchung einer ausführlichen Voranalyse in unterschiedlichen b-Induktionsstämmen (Abbildung 10) und unter Kreuzungsbedingungen (Abbildung 11) unterzogen wurden.

## 6.7 Untersuchung des b-induzierten Gens *big6*

Die von dem *big6*-Amplicon abgeleitete Aminosäuresequenz zeigte Ähnlichkeit zu MdoH, einem Protein, das an der Biosynthese periplasmatischer Glucane in *E. coli* beteiligt ist (Loubens *et al.*, 1993). Wegen dieser Homologie und dem deutlichen b-induzierten Expressionsmuster (Abbildung 45) war dieses Gen ein interessanter Kandidat für die weitere Funktionsanalyse. Es ist denkbar, dass es sich bei *big6* um ein Protein handelt, das spezifisch für den Aufbau der Zellwand b-abhängiger Filamente benötigt wird. Da sich der homologe Bereich in etwa in der Mitte von MdoH befindet, wurde davon ausgegangen, dass sich das relativ große *big6*-Amplicon (1.207 bp) ebenfalls in der Mitte des *big6*-Gens befinden könnte. Deshalb wurde in diesem Fall auf die Isolierung eines Subklons verzichtet, und statt dessen direkt ausgehend von dem Amplicon, durch Insertion einer Hygromycin-Resistenzkassette in eine interne Schnittstelle, ein Konstrukt zur Disruption des *big6*-Gens hergestellt (siehe Abschnitt 4.1.4). Durch Transformation in FB1 (*a1 b1*), FB2 (*a2 b2*) und SG200 (*a1mfa2 bW2bE1*) entstanden die *big6*-Insertionsmutanten AB50 (*a2 b2 Δbig6*), AB51 (*a1mfa2 bW2bE1 Δbig6*), AB52 (*a1mfa2 bW2bE1 Δbig6*), AB53 (*a1 b1 Δbig6*) und AB54 (*a1 b1 Δbig6*).

**Tabelle 20: Pathogenität der *big6*-Insertionsmutanten**

Inoculum	Genotypen	Tumorbildung*	% von Wildtyp
FB1 x FB2	<i>a1 b1</i> x <i>a2 b2</i>	8/8	100%
AB53 x FB2	<i>a1 b1 Δbig6</i> x <i>a2 b2</i>	4/4	100%
AB54 x FB2	<i>a1 b1</i> x <i>a2 b2 Δbig6</i>	4/4	100%
FB1 x AB50	<i>a1 b1</i> x <i>a2 b2 Δbig6</i>	4/4	100%
AB53 x AB50	<i>a1 b1 Δbig6</i> x <i>a2 b2 Δbig6</i>	6/8	75%
AB54 x AB50	<i>a1 b1 Δbig6</i> x <i>a2 b2 Δbig6</i>	7/8	88%
SG200	<i>a1mfa2 bW2bE1</i>	6/16	100%
AB51	<i>a1mfa2 bW2bE1 Δbig6</i>	13/30	100%
AB52	<i>a1mfa2 bW2bE1 Δbig6</i>	13/32	100%

\* Angegeben ist die Anzahl von Pflanzen mit Tumorbildung im Vergleich zur Gesamtzahl der infizierten Pflanzen 14 Tage nach Infektion.

In Bezug auf Zellmorphologie, Wachstum, Kreuzungsverhalten, Tumorinduktion und Sporogenese zeigten sich keine deutlichen Unterschiede zu den entsprechenden Ausgangsstämmen (Tabelle 20 und nicht gezeigt). Die bei den Mutanten-Kreuzungen gebildeten Tumore waren im Vergleich etwas kleiner als die der Wildtyp-Kreuzungen (nicht gezeigt). Damit bleibt die Rolle von *big6* bislang ungeklärt<sup>52</sup>. Falls *big6* wirklich an der Zellwand-Synthese beteiligt ist, wäre denkbar, dass an diesem Prozess in *U. maydis* eine ganze Reihe homologer Enzyme mitwirken, wie das bereits im Fall der Chitinsynthetase-Gene beobachtet wurde (Gold und Kronstad, 1994; Xoconostle Cazares *et al.*, 1996).

## 6.8 *pdi1*, das Gen für Proteindisulfid-Isomerase

In beiden RNA-Fingerprint-Ansätzen wurden Amplicons gefunden, die eine starke Ähnlichkeit zu pilzlichen Proteindisulfid-Isomerasen aufweisen (Tabellen 1 und 18). Das entsprechende Gen weist eine basale Transkription auf, die im b-abhängigen Filament etwa um das achtfache erhöht ist (Abbildungen 10, 11 und 45). Ausgehend von diesen Amplicons wurde das Cosmid 21C3 isoliert, das vermutlich das gesamte Gen enthält. Die Sequenzanalyse eines Teils eines 5,1 kb langen *EcoRI*-Subklons ergab, dass sich darauf ein ORF befindet, der für die 452 C-terminalen Aminosäuren kodiert. Vergleiche mit homologen Proteindisulfid-Isomerasen zeigten, dass wahrscheinlich etwa 40 bis 50 Aminosäuren aus dem N-Terminus des Proteins fehlen. Das Proteinfragment enthält die zwei bei Proteindisulfid-Isomerasen konservierten Thio-reduktase-Domänen, das zugehörige Gen wurde daher mit *pdi1* bezeichnet. Am C-Terminus befindet sich ein Motiv (HEEL), das dem Retentionssignal von endoplasmatischen Proteinen in *S. cerevisiae* und anderen Pilzen (HDEL) ähnelt (Teasdale und Jackson, 1996). Von den 204 bislang veröffentlichten *U. maydis*-Proteinen besitzt nur eines ein potentielles Retentionssignal am C-Terminus. Es handelt sich dabei um die Farnesyl-Diphosphat-Farnesyltransferase (Squalen-Synthetase) Erg9 mit dem ebenfalls vom Konsensus abweichenden Motiv KLEL. Da in *U. maydis* keine weiteren endoplasmatischen Proteine bekannt sind, kann keine Aussage darüber getroffen werden, welches das in *U. maydis* üblicherweise vorkommende Retentionssignal ist. Beide Sequenzen bieten sich aber für die mikroskopische Darstellung des endoplasmatischen Retikulums (ERs) mittels Expression eines Fusionsproteins aus GFP und den entsprechenden Signalsequenzen für Lokalisation und Retention im ER an.

Proteindisulfid-Isomerasen sind lösliche Proteine im ER, die eine Schlüsselrolle in der Faltung und Sekretion von Proteinen spielen (Freedman *et al.*, 1994). Sie katalysieren je nach dem Redoxpotential der zellulären Umgebung die Bildung bzw. Spaltung von Disulfid-Brük-

---

<sup>52</sup> Kürzlich wurde im Rahmen des deutschen *Neurospora crassa*-Sequenzierungsprojekts ein hypothetisches Protein von 1.002 Aminosäuren identifiziert, das 50% Identität mit Big6 besitzt und ebenfalls Ähnlichkeit zu MdoH aus *E. coli* aufweist.

ken in Proteinen und beeinflussen dadurch vor allem die Faltung von sekretierten Proteinen (Freedman *et al.*, 1994). Die Transkription ist durch den sogenannten "unfolded protein response pathway" reguliert, der in *S. cerevisiae* genauer untersucht wurde (Shamu *et al.*, 1994). Die Akkumulation von ungefalteten Proteinen im ER führt dabei zu einer erhöhten Transkription von *pdi1* und einer Reihe weitere Chaperone in *S. cerevisiae* (Mori *et al.*, 1998). Daher ist es vorstellbar, dass die beobachtete b-abhängige Induktion von *pdi1* in *U. maydis* nicht durch eine direkte Bindung des bW/bE-Heterodimers an den Promotor hervorgerufen wird, sondern eine Folge des Morphologiewechsels ist. Dafür spricht, dass dieses Gen auch während der durch Pheromon stimulierten Bildung von Konjugationshyphen und in dem b-unabhängig filamentös wachsenden Stamm FB1Δuac1 induziert ist. Der Wechsel von hefeartigem zu filamentösem Wachstum bedingt wahrscheinlich eine erhöhte Sekretion der zum Umbau der Zellwand notwendigen Enzyme. Ein gutes Indiz dafür ist die durch b induzierte Expression der vermutlich sekretierten Exochitinase Exc1.

## 6.9 *pk1*, das Gen für Proteinkinase C

Im RNA-Fingerprint-Testansatz wurde ein Amplicon mit hoher Ähnlichkeit zu pilzlichen Proteinkinasen C (PKCs) isoliert (Tabelle 18). Obwohl sich für das zugehörige Gen keine b-abhängige Regulation nachweisen ließ (Abbildung 45) wurde es trotzdem weiter untersucht, da PKCs in allen bisher untersuchten Organismen eine zentrale Rolle in einer Reihe von zellulären Prozessen spielen (Nishizuka, 1988; Azzi *et al.*, 1992). Dazu wurde ausgehend von dem Amplicon das Cosmid IC12 isoliert, das vermutlich das gesamte Gen enthält. Die Sequenzierung von zwei nebeneinander liegenden *PstI*-Subklonen ergab eine genomische Sequenz von insgesamt 4.118 bp. Darauf befinden sich ein 1.125 bp langen Promotorbereich und ein ORF von 2.993 bp Länge. Durch RT-PCR konnte die Existenz eines 96 bp langen Introns von Position 15 bis 110 nachgewiesen werden (nicht gezeigt). Somit kodiert dieser ORF für ein 965 Aminosäuren großes Proteinfragment, das auf seiner gesamten Länge Ähnlichkeit vor allem zu PKCs aus filamentösen Pilzen aufweist. Es besitzt die zwei bei pilzlichen PKCs vorkommenden cysteinreichen Domänen von Aminosäureposition 509 bis 556 bzw. von 577 bis 626 und eine potentielle Rho-Interaktionsdomäne von Position 212 bis 273. Die Ca<sup>2+</sup>-Interaktionsdomäne ist nur sehr schwach konserviert, weshalb es sich wahrscheinlich um ein Mitglied der Familie der nicht durch Kalziumionen regulierten, sogenannten "novel PKCs" handelt (Dekker *et al.*, 1995). Die katalytische Domäne beginnt ab Position 897 und aus dem Vergleich mit den homologen Proteinen kann geschlossen werden, dass noch etwa 250 Aminosäuren des C-Terminus in dieser Sequenz fehlen. Aufgrund dieser Daten wurde das zugehörige Gen mit *pk1* bezeichnet.

Während in höheren Eukaryonten mehrere Isoformen von PKCs vorhanden sind, enthält das Genom von *S. cerevisiae* nur ein einziges *pkc*-Gen, dessen Deletion letal ist (Levin und Bart-

lett-Heubusch, 1992). Da ein derartiger letaler Phänotyp auch bei Deletion von *pkc1* in *U. maydis* möglich gewesen wäre, wurde ein Konstrukt zur regulierten Expression von *pkc1* hergestellt. Dazu wurde mittels gerichteter PCR-Mutagenese eine *NdeI*-Schnittstelle am Translations-Startpunkt von *pkc1* eingeführt und in diese eine Kasseette eingesetzt, die aus einer Phleomycin-Resistenzkassette und dem *nar1*-Promotor bestand (siehe Abschnitt 4.1.4).

Durch Transformation in FB1 (*a1 b1*) und CL13 (*a1 bW2bE1*) entstanden die konditionalen *pkc1*-Mutanten AB60 (*a1 b1 P<sub>nar</sub>:pkc1*), AB61 (*a1 b1 P<sub>nar</sub>:pkc1*), AB62 (*a1 bW2bE1 P<sub>nar</sub>:pkc1*) und AB63 (*a1 bW2bE1 P<sub>nar</sub>:pkc1*). In Bezug auf Zellmorphologie und Wachstum zeigten sich keine Unterschiede zu den entsprechenden Ausgangsstämmen, weder unter induzierenden noch unter reprimierenden Bedingungen. Der für *pkc*-Mutanten in *S. cerevisiae* beschriebene Defekt in der Osmoregulation trat nicht auf. Die Mutanten AB62 (*a1 bW2bE1 P<sub>nar</sub>:pkc1*) und AB63 (*a1 bW2bE1 P<sub>nar</sub>:pkc1*) waren jedoch in ihrer Pathogenität deutlich gestört (Tabelle 21). In keinem einzigen Fall konnte Tumorbildung beobachtet werden, und nur in zwei Fällen war in der Höhe der Durchstichstelle Anthocyanbildung zu erkennen. Allerdings war auch diese Reaktion deutlich geringer als bei dem vergleichbaren Ausgangsstamm.

**Tabelle 21: Pathogenität der konditionalen *pkc1*-Mutanten**

Inoculum	Genotypen	Tumorbildung*	% von Wildtyp
CL13	<i>a1 bW2bE1</i>	6/6	100%
AB62	<i>a1 bW2bE1 P<sub>nar</sub>:pkc1</i>	0/9	0%
AB63	<i>a1 bW2bE1 P<sub>nar</sub>:pkc1</i>	0/9	0%

\* Angegeben ist die Anzahl von Pflanzen mit Tumorbildung im Vergleich zur Gesamtzahl der infizierten Pflanzen 14 Tage nach Spritzinfektion in Maispflanzen der Sorte Gaspar Flint.

Damit scheint es wahrscheinlich, dass *U. maydis* mehrere PKCs besitzt, denen unterschiedliche Funktionen zukommen könnten. Eine ähnliche Situation liegt z. B. in *S. pombe* vor, das zwei PKCs besitzt und wo nur die Deletion beider Gene letal ist (Levin und Bartlett-Heubusch, 1992). Obwohl ihre Rollen in der Regulation der Zellintegrität partiell überlappen, besitzen sie darüber hinaus auch spezifische Funktionen, so z. B. in der Aufrechterhaltung der Zellpolarität, an der nur Pck2 und nicht Pck1 beteiligt ist (Arellano *et al.*, 1999). In *Candida albicans* führt die Deletion des einzigen bisher isolierten *pkc*-Gens (*CaPKC1*) ausschließlich zu einem Defekt in der Zellintegrität, morphologische Prozesse, wie z. B. der Wechsel von hefeartigem zu filamentösem Wachstum sind nicht betroffen (Paravicini *et al.*, 1996). Das lässt ebenfalls die Existenz weiterer PKCs vermuten. Eine differentielle Expression verschiedener PKC-Isoformen konnte im dimorphen Pilz *Sporothrix schenckii* (Aquino-Pinero und Rodriguez del Valle, 1997) und in *Neurospora crassa* mit biochemischen Ansätzen nachgewiesen werden (Dickman und Yarden, 1999). Eine vergleichbare Situation könnte auch in *U. maydis* vorliegen: Pkc1 könnte spezifisch für die Signalübertragung im b-abhängigen Filament oder in der Interaktion mit der Pflanze benötigt werden, womit dieses Protein ein sehr interessanter Kandidat für die weitere Analyse ist.

Mindestens genauso wichtig ist das Ergebnis, dass der *nar1*-Promotor zur Erzeugung konditionaler Mutanten verwendet werden kann. Die angewendete Technik der Integration einer Resistenz/Promotorkassette am Translations-Startpunkt ist auf andere Gene einfach übertragbar. Der *nar1*-Promotor scheint nach den vorliegenden Daten innerhalb der Pflanze nicht aktiv zu sein. Allerdings ist dieser Schluss nicht zwingend, da der Pathogenitätsdefekt auch durch Überexpression von Pkc1 oder ein vorübergehendes Ausschalten des *nar1*-Promotors auf der Blattoberfläche bedingt sein könnte.

## 6.10 *phc1*, ein Phytochromgen

Auf dem gleichen Cosmid wie *pkc1* befindet sich ein 3.216 bp langes *PstI*-Fragment, das einen durchgehenden ORF enthält, dessen abgeleitete Aminosäuresequenz Ähnlichkeit zu pflanzlichen Phytochromen (speziell zu Phytochrom C) und zu pilzlichen Histidinkinasen aufweist. Im einzelnen finden sich darin eine chromophorbundene GAF-Domäne, eine Histidinkinase-Phosphatakzeptor-Domäne und eine Histidinkinase-ATPase-Domäne. Eine potentielle Translations-Startstelle und ein Stoppkodon konnten nicht gefunden werden, so dass es sich wahrscheinlich um ein Fragment aus der Mitte des ORFs handelt. Diese Struktur entspricht der pflanzlicher und bakterieller Lichtrezeptoren (Pepper, 1998; Yeh und Lagarias, 1998; Davis *et al.*, 1999), daher wurde das zugehörige Gen mit *phc1* bezeichnet. Ein derartiger Lichtrezeptor ist bislang in Pilzen nicht beschrieben worden. Es ist denkbar, dass er in *U. maydis* zur Koordination der Interaktion mit der Wirtspflanze dienen könnte. Aus diesem Grund wurde ein Deletionskonstrukt hergestellt, bei dem ein 1.977 bp langer Bereich, der alle drei oben genannten Domänen umfasst, entfernt und durch eine Nourseothricin-Resistenzkassette ersetzt wurde (siehe Abschnitt 4.1.4).

Durch Transformation in FB1 (*a1 b1*), FB2 (*a2 b2*) und SG200 (*a1mfa2 bW2bE1*) entstanden die *phc1*-Deletionsmutanten AB151 (*a1 b1 Δphc1*), AB152 (*a2 b2 Δphc1*) und AB153 (*a1mfa2 bW2bE1 Δphc1*). In Bezug auf Zellmorphologie, Wachstum, Kreuzungsverhalten, Tumorinduktion und Sporogenese zeigten sich keine deutlichen Unterschiede zu den entsprechenden Ausgangsstämmen (Tabelle 22 und nicht gezeigt).

**Tabelle 22: Pathogenität der *phc1*-Deletionsmutanten**

Inoculum	Genotypen	Tumorbildung*	% von Wildtyp
FB1 x FB2	<i>a1 b1</i> x <i>a2 b2</i>	44/46	100%
AB151 x AB152	<i>a1 b1 Δphc1</i> x <i>a2 b2 Δphc1</i>	134/137	100%
SG200	<i>a1mfa2 bW2bE1</i>	15/16	100%
AB153	<i>a1mfa2 bW2bE1 Δphc1</i>	60/62	100%

\* Angegeben ist die Anzahl von Pflanzen mit Tumorbildung im Vergleich zur Gesamtzahl der infizierten Pflanzen 14 Tage nach Infektion.

Damit bleibt auch die Rolle von Phc1 bislang ungeklärt. Im Rahmen eines Großpraktikums wurden umliegende Bereiche sequenziert, was zur Identifikation einer N-terminal gelegenen sogenannten PAS-Domäne und einer C-terminal gelegenen sogenannten Histidinkinase-Akzeptordomäne führte (A. Buckenmeier, pers. Mitteilung). Der ORF konnte jedoch nicht eindeutig festgelegt werden, die Isolierung eines cDNA-Klons von *phc1* steht noch aus. Versuche, eine Rolle von Phc1 in der Osmoregulation nachzuweisen, vergleichbar der Funktion der Histidinkinasen in *S. cerevisiae* und *Candida albicans* (Loomis *et al.*, 1997; 1998), brachten keine eindeutigen Ergebnisse (A. Buckenmeier, pers. Mitteilung). Da die Deletionsmutanten jedoch normales Wachstum in Flüssigmedium zeigen, scheint Phc1 bei diesen Prozessen keine essentielle Rolle zu spielen.

## 6.11 Amplicons aus dem RNA-Fingerprint-Ansatz

**Tabelle 23: Größe und Homologien der Amplicons**

Amplicon	Länge	Oligos	Ähnlichkeit zu	Ident.	angenommene Funktion	Gen
<i>frb5</i>	444 bp	OAN26-OAN26	-			
<i>frb14<sup>*</sup></i>	(700 bp)	(OAN70/OAN94)	Rep1 ( <i>U. maydis</i> )	100%	Repellent	<i>rep1</i>
<i>frb14-2</i>	757 bp	OAN70-OAN70	Tal1 ( <i>S. pombe</i> )	60%	Transaldolase	
<i>frb23</i>	274 bp	PAL6-PAL12	Pdi1 ( <i>Trichoderma reesei</i> )	42%	Proteindisulfid-Isomerase	<i>pdi1</i>
<i>frb34</i>	1055 bp	OAN28-OAN28	YrhL ( <i>Bacillus subtilis</i> )	27%	Acylyltransferase	
<i>frb47</i>	373 bp	OAN89-OAN26	-			
<i>frb47-2</i>	329 bp	OAN26-OAN89	T29A15.130 ( <i>Arabidopsis thaliana</i> )	40%	Importin- $\beta$ -Untereinheit	
<i>frb47-3</i>	375 bp	OAN26-OAN26	-			
<i>frb52</i>	392 bp	OAN80-OAN80	-			
<i>frb53</i>	189 bp	OAN35-OAN80	-			
<i>frb54</i>	932 bp	OAN36-OAN36	bE2 ( <i>U. maydis</i> )	100%	Homeodomänen-Protein	<i>bE2</i>
<i>frb63</i>	322 bp	PAL14-OAN54	-			
<i>frb74<sup>*</sup></i>	(400 bp)	(OAN80/OOL15)	Rep1 ( <i>U. maydis</i> )	100%	Repellent	<i>rep1</i>
<i>frb83</i>	488 bp	OAN90/OAN91	Rep1 ( <i>U. maydis</i> )	100%	Repellent	<i>rep1</i>
<i>frb91</i>	796 bp	OCH6-OAN51	SPBC409.08 ( <i>S. pombe</i> )	41%	Membrantransport-Protein	
<i>frb92</i>	752 bp	OCH6-OCH6	Pmk1 ( <i>Magnaporthe grisea</i> )	72%	MAP-Kinase	<i>kpp6</i>
<i>frb98</i>	474 bp	OX17-OX17	Rep1 ( <i>U. maydis</i> )	100%	Repellent	<i>rep1</i>
<i>frb103<sup>*</sup></i>	(800 bp)	(OAN72/OCH20)	Rep1 ( <i>U. maydis</i> )	100%	Repellent	<i>rep1</i>
<i>frb103-2</i>	797 bp	OAN72-OAN72	SPBC21D10.02 ( <i>S. pombe</i> )	56%	Glucosamin-Fruktose-6-P-Aminotransferase	
<i>frb110</i>	527 bp	OAN75-OCH18	-			
<i>frb112</i>	788 bp	OCH15-OCH15	-			
<i>frb124</i>	557 bp	OCH12-OAN94	-			
<i>frb133</i>	749 bp	PAL6-PAL6	Exc1 ( <i>Trichoderma harzianum</i> )	29%	Exochitinase	<i>exc1</i>
<i>frb136</i>	1091 bp	OGW34-OGW34	Cap10p ( <i>Cryptococcus neoformans</i> )	25%	kapselassoziiertes Protein	
<i>frb157</i>	610 bp	OGW33-OX15	Mir1 ( <i>Neurospora crassa</i> )	37%	Phosphat-Transportprotein	
<i>frb157-2</i>	617 bp	OGW33-OGW33	-			
<i>frb166</i>	905 bp	OAN91-OAN91	-			
<i>frb172</i>	741 bp	OX17-OX17	-			
<i>frb173</i>	474 bp	OX17-OX17	Rep1 ( <i>U. maydis</i> )	100%	Repellent	<i>rep1</i>

Fortsetzung Tabelle 23

Amplicon	Länge	Oligos	Ähnlichkeit zu	Ident.	angenommene Funktion	Gen
<i>frb176</i>	702 bp	OCH12-OCH12	Suc1 ( <i>S. pombe</i> )	66%	regulatorische Untereinheit der zyklinabhängigen Kinase	
<i>frb176-2</i>	726 bp	OCH12-OCH12	-			
<i>frb176-3</i>	747 bp	OCH12-OCH12	Rep1 ( <i>U. maydis</i> )	100%	Repellent	<i>rep1</i>
<i>frb177</i>	932 bp	OAN36-OAN36	bE2 ( <i>U. maydis</i> )	100%	Homeodomänen-Protein	<i>bE2</i>
<i>frb184</i>	401 bp	OOL18-OOL18	-			
<i>frb187</i>	544 bp	OAN49-OAN49	-			
<i>frb203</i>	401 bp	OOL18-OOL18	-			
<i>frb204</i>	472 bp	OCH8-OOL17	Cap10p ( <i>Cryptococcus neoformans</i> )	24%	kapselassoziiertes Protein	
<i>frb207</i>	652 bp	OAN102-OCH11	GdhB ( <i>Agaricus bisporus</i> )	58%	Glutamat-Dehydrogenase	
<i>frb208</i>	757 bp	OCH12-OAN101	-			
<i>frb208-2</i>	747 bp	OCH12-OCH12	Rep1 ( <i>U. maydis</i> )	100%	Repellent	<i>rep1</i>
<i>frb214</i>	289 bp	OAN102-OAN102	SPAP7G5.02c ( <i>S. pombe</i> )	66%	GMP-Synthase	
<i>frb214-2</i>	287 bp	OAN102-OAN102	-			
<i>frb221</i>	288 bp	OAN102-OAN100	Mcx1 ( <i>S. cerevisiae</i> )	47%	ClpX-ähnliches Chaperon	
<i>frb221-2</i>	294 bp	OAN102-OAN100	-			
<i>frb232</i>	595 bp	OOL21-OOL21	SPBC1347.04 ( <i>S. pombe</i> )	37%	Hypothetisches Protein	
<i>frb232-2</i>	620 bp	OOL21-OOL21	CG10877 ( <i>Drosophila melanogaster</i> )	51%	Hypothetisches Protein	
<i>frb244</i>	276 bp	OAN100-OAN70	Iad2 ( <i>U. maydis</i> )	100%	Indol-3-Acetaldehyd-Dehydrogenase	<i>iad2</i>
<i>frb245</i>	429 bp	OAN71-OAN71	-			
<i>frb248*</i>	(210 bp)	(OAN72/OAN98)	Rep1 ( <i>U. maydis</i> )	100%	Repellent	<i>rep1</i>
<i>frb251*</i>	(330 bp)	(OAN73/OAN97)	Rep1 ( <i>U. maydis</i> )	100%	Repellent	<i>rep1</i>
<i>frb252</i>	555 bp	OX17-OX17	SPAC694.07c ( <i>S. pombe</i> )	42%	Transkription-Initiationsfaktor	
<i>frb252-2</i>	521 bp	OX17-OX17	-			
<i>frb260</i>	933 bp	OOL3-OAN36	PapA ( <i>Streptomyces pristinaespiralis</i> )	36%	Pristinamycin-Biosynthese	
<i>frb260-2</i>	933 bp	OAN36-OAN36	bE2 ( <i>U. maydis</i> )	100%	Homeodomänen-Protein	<i>bE2</i>
<i>frb260-3</i>	934 bp	OOL3-OOL3	Sid2 ( <i>U. maydis</i> )	100%	Ferrichrom-Siderophor-Peptid-Synthetase	<i>sid2</i>
<i>frb274</i>	341 bp	OAN51-OAN51	-			
<i>frb274-2</i>	338 bp	OAN81-OAN51	-			
<i>frb290</i>	741 bp	OX17-OX17	-			
<i>frb299</i>	688 bp	OAN11-OX14	-			
<i>frb323</i>	1002 bp	OAN23-OAN23	Pma1p ( <i>Cryptococcus neoformans</i> )	66%	Plasmamembran (H <sup>+</sup> )-ATPase	
<i>frb333</i>	382 bp	OAN70-OAN70	-			
<i>frb336</i>	382 bp	OAN69-OAN31	-			
<i>frb342</i>	544 bp	OAN49-OAN49	-			

\* Fünf der Amplicons aus *rep1* wurden nicht durch Sequenzanalyse sondern mittels Southern-Analyse bestätigt. Die ungefähre Größe und die im RNA-Fingerprint verwendeten Oligonukleotide sind in Klammern angegeben.

## 6.12 *frb323*, ein Gen für eine Plasmamembran (H<sup>+</sup>)-ATPase

In beiden RNA-Fingerprint-Ansätzen wurden unabhängig voneinander Amplicons gefunden, die eine starke Ähnlichkeit zu Plasmamembran (H<sup>+</sup>)-ATPasen aufweisen (Tabellen 1 und 19). Die Expressionsanalyse ergab keine eindeutigen Ergebnisse, es zeigte sich jedoch eine b-abhängige Repression in Nitrat-Minimalmedium (Abbildungen 10 und 11). Die Abnahme der

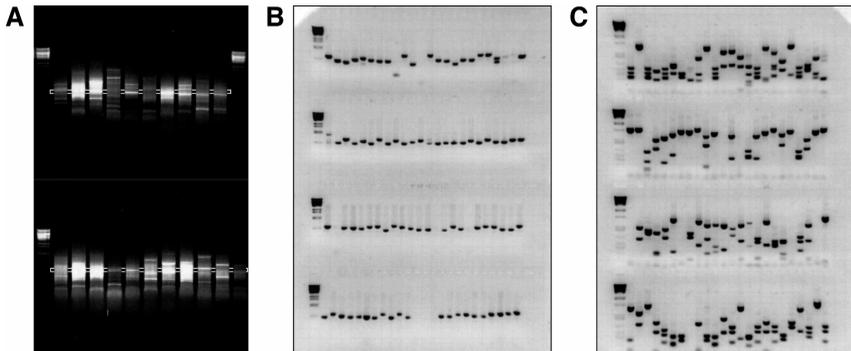
Transkriptmenge erfolgt innerhalb einer Stunde nach Induktion, so dass eine direkte Regulation durch das bW/bE-Heterodimer nicht ausgeschlossen werden kann. Ausgehend von dem Amplicon *frb323* wurde das Cosmid 10E4 isoliert, das vermutlich das gesamte Gen enthält. Die Sequenzanalyse eines Teils eines 4.339 bp langen *HindIII*-Subklons ergab, dass sich darauf ein ORF befindet, der für die 588 C-terminalen Aminosäuren kodiert. Vergleiche mit homologen Plasmamembran ( $H^+$ )-ATPasen zeigten, dass wahrscheinlich etwa 350 Aminosäuren aus dem N-Terminus des Proteins fehlen. Ein entsprechendes Protein mit einem Molekulargewicht von 104 kD konnte in *U. maydis* nachgewiesen werden (Hernandez *et al.*, 1998).

Pilzliche Plasmamembran ( $H^+$ )-ATPasen wirken als elektrogene Protonenpumpen, die einen elektrochemischen Protonengradienten über die Plasmamembran aufbauen. Dieser Gradient ist für die Aufnahme einer Reihe von Nährstoffen durch sekundären aktiven Transport (Serrano, 1988) und zur Aufrechterhaltung des intrazellulären pH-Werts (Eraso und Gancedo, 1987; Venema und Palmgren, 1995) notwendig. Eine Regulation auf transkriptioneller Ebene wurde nur in wenigen Fällen beschrieben, wie z. B. eine Glucose-abhängige Repression bei *pmaA* aus *Aspergillus nidulans* (Abdallah *et al.*, 2000). Über den physiologischen Nutzen einer b-abhängigen Repression in *U. maydis* kann nur spekuliert werden. Mutationen in *PMAL*, einem der beiden Gene für Plasmamembran ( $H^+$ )-ATPasen in *S. cerevisiae*, die eine Erniedrigung des Membranpotentials zur Folge haben, führen zu einer Resistenz gegenüber dem Antibiotikum Hygromycin B (Perlin *et al.*, 1988). Dieser Effekt ist vermutlich auf eine veränderte Stoffaufnahme aus dem Medium zurückzuführen. Ähnlich könnte ein geringeres Membranpotential in *U. maydis* zum Zeitpunkt der Infektion eine erhöhte Resistenz gegenüber von der Pflanze produzierten Abwehrstoffen (Osborn, 1996) zur Folge haben. Auf der anderen Seite sind aber funktionelle Plasmamembran ( $H^+$ )-ATPasen sicher für die Aufnahme von Nährstoffen innerhalb der Pflanze wichtig. Ein interessanter Ansatz könnte darin bestehen, ein Fusionsprotein aus ATPase und GFP unter dem natürlichen Promotor in *U. maydis* zu exprimieren und die Expression und Lokalisation im Verlauf der Pflanzeninfektion zu analysieren.

### 6.13 Erzeugung zufälliger, wenig redundanter EST-Klone

Die für den RNA-Fingerprint entwickelte Technik kann in modifizierter Weise auch für die Erzeugung von EST-Klonen verwendet werden. Für die Herstellung von Dot-Blot-Membranen mit cDNA-Fragmenten aus *U. maydis* durch die Firma Lion (Heidelberg) wurden 288 beliebige, zufällige EST-Klone einer Größe zwischen 600 und 800 bp benötigt, wobei die Redundanz so gering wie möglich sein sollte. Dazu wurden zunächst sechs Mischungen von jeweils zehn im RNA-Fingerprint-Ansatz verwendeten Oligonukleotiden hergestellt. Diese wurden alleine und in Kombinationen von jeweils zwei Mischungen in den PCR-Ansätzen eingesetzt, so dass insgesamt 21 unterschiedliche Ansätze durchgeführt wurden. Die Reaktio-

nen wurden in 50 µl PCR-Puffer mit einer Mischung aus jeweils 0,5 µl cDNA-Präparation aus den Stämmen FB1 (*al b1*) und HA103 (*al bW2bE1<sup>com</sup>*), die in NM-Flüssigmedium kultiviert worden waren, durchgeführt (die cDNA-Synthese verlief wie in Abschnitt 4.4.1 beschrieben). Die Oligonukleotide wurden in einer insgesamten Endkonzentration von 2 µM eingesetzt, die Nukleotide in einer Endkonzentration von 125 µM. Pro Reaktion wurden 4 U *Taq* DNA-Polymerase verwendet, auf einen "Hot-Start" wurde verzichtet. Die PCR-Bedingungen waren: 94/3-[94/1,5-50/3,5-72/4]x4-[94/1-65/1-72/2]x40-72/5 (zur Schreibweise siehe Abschnitt 4.3.4).



**Abbildung 47: Erzeugung von zufälligen, wenig redundanten EST-Klonen.** A) Auftrennung der 21 PCR-Ansätze auf einem 1% TBE-Agarosegel. Die weißen Striche deuten den ausgeschnittenen und eluierten Bereich an. B) Beispiel eines Agarosegels zur Abschätzung der Größe der ESTs. Jeweils 7 µl der 50 µl PCR-Ansätze in 96well-Mikrotiterplatten wurden mit einer 8-Kanal-Pipette auf ein 1% TBE-Agarosegel mit viermal 26 Spuren aufgetragen und mit 4 V/cm für etwa 30 min aufgetrennt. Die Gele sind 8 x 12 cm groß, die Taschen 2 mm breit und 1 mm voneinander entfernt. C) Beispiel eines Agarosegels zur Identifikation mehrfach vorkommender Klone. Jeweils 10 µl der PCR-Ansätze wurden in einem Volumen von 20 µl mit 2 U *HinP1I* und 2 U *HinI* für 3 h bei 37°C in 96well-Mikrotiterplatten verdaut. Die Auftrennung erfolgte genauso wie in B), allerdings über ein 2% TBE-Agarosegel.

Die entstandenen Amplicons wurden über ein 1% TBE-Agarosegel aufgetrennt und eine etwa 1 mm breite Bande in der Höhe von 700 bp ausgeschnitten (Abbildung 47A), daraus die DNA eluiert und die Amplicons in pCR-Topo kloniert (siehe Abschnitt 4.4.4). Die Transformations-Ansätze wurden getrennt auf YT-Amp-Festmedium mit X-Gal ausgestrichen, pro Ansatz etwa 30 weiße Klone ausgewählt und direkt in sechs 96well-Mikrotiterplatten mit dYT-Flüssigmedium mit Ampicillin angeimpft. Aus diesen Kulturen wurden nach 18 h Inkubation bei 37°C Zellen für Ganz-Zell-PCR mit den Oligonukleotiden OAN104 und OAN105 entnommen, die PCR-Produkte auf 1% TBE-Agarosegelen in Hinsicht auf die Insertgröße analysiert (Abbildung 47B), parallel in 96well-Mikrotiterplatten mit *HinP1I* und *HinI* restringiert und die Reaktionsprodukte auf 2% TBE-Agarosegelen aufgetrennt, um Klone mit den gleichen inserierten DNA-Fragmenten zu identifizieren (Abbildung 47C). In einem ersten Schritt konnten so aus den 576 Anfangsklonen 192 Klone eliminiert werden, die entweder kein

Insert, ein zu kleines oder zu großes Insert oder ein mehrfach vorkommendes Insert enthielten. Die übrigen Klone wurden in frische 96well-Mikrotiterplatten mit YT-Amp-Flüssigmedium überimpft und wieder 18 h bei 37°C kultiviert. In einem zweiten, identischen Schritt wurden anschließend weitere 96 Klone entfernt, so dass am Ende 288 Klone übrig blieben, deren PCR-Produkte zur Herstellung der Membranen verwendet wurden. Diese Membranen wurden bisher unter anderem zur Untersuchung der regulatorischen Funktion von Rum1 benutzt (Quadbeck-Seeger *et al.*, 2000).

Die Sequenzierung von 276 der 288 Klone durch die Firma Lion (Heidelberg) ergab bei 220 ESTs Ähnlichkeiten zu bekannten Genen, hauptsächlich aus dem Primärstoffwechsel. Von diesen 220 Klonen waren 172 (78%) unabhängig, maximal 6 Klone waren identisch. Diese Klone stammen wahrscheinlich von 134 (61%) unterschiedlichen Genen, maximal 8 Klone stammen von dem gleichen Gen. Das würde bedeuten, dass die 288 ESTs wahrscheinlich Fragmente aus 175 verschiedenen Genen enthielten. Im Durchschnitt waren die ESTs 713 bp lang, wobei 10% (29 von 276) kleiner als 600 bp und 17% (46 von 276) größer als 800 bp waren.

Zusammengefasst bedeutet das, dass 73% der Klone die geforderte Größe hatten und mindestens 78% der Klone unabhängig waren, diese Methode der Erzeugung von zufälligen, wenig redundanten ESTs bei vertretbarem Aufwand also sehr gut funktioniert hat.

## 6.14 *nar1* als gegenselektionierbarer Marker in *U. maydis*

Der *nar1*-Locus ist nicht nur wegen des regulierbaren *nar1*-Promotors interessant (siehe Abschnitt 6.2), sondern auch wegen der Möglichkeit, *nar1* selber als Auxotrophiemarker zu verwenden. Nitratreduktase-Gene werden in einer Vielzahl von Pilzen als Selektionsmarker verwendet, zum Teil auch in heterologen Ansätzen (Daboussi *et al.*, 1989; Malardier *et al.*, 1989; Unkles, 1989). Ein besonderer Vorteil dieses Systems besteht darin, dass nitratreduktasedefiziente Stämme gleichzeitig eine Resistenz gegenüber  $\text{ClO}_3^-$ -Ionen im Medium aufweisen. Chlorat ist als solches nicht toxisch, wird aber von der Nitratreduktase in das toxische Chlorit umgewandelt. Damit kann *nar1* als gegenselektionierbarer Marker verwendet werden, d. h. es kann sowohl auf Anwesenheit als auch auf Abwesenheit des Gens selektiert werden. In *U. maydis* wurden schon eine Reihe von Mutanten beschrieben, die Chlorat-Resistenz aufweisen (Lewis und Fincham, 1970).

Zum Aufbau eines Transformationssystems wurde der gesamte *nar1*-Locus von *U. maydis* sequenziert (siehe Abschnitt 4.1.5) und ein *nar1*-Deletionskonstrukt hergestellt (siehe Abschnitt 4.1.3). Parallel dazu wurden geeignete Selektionsbedingungen ermittelt. Eine Konzentration von 250 mM  $\text{KClO}_3$  reicht aus, damit Wildtyp-Stämme auf Nitrat-Minimalmedium nicht mehr wachsen können (nicht gezeigt). Allerdings führt eine Zugabe von nur 0,5 mM  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  zu chlorathaltigem Medium dazu, dass Wildtyp-Stämme wieder wachsen können.

Dies ist wahrscheinlich durch die vollständige Repression von *nar1* in Gegenwart von Ammonium-Ionen zurückzuführen, ein Indiz für die sehr stringente Regulation von *nar1*. Es wurden mehrere potentielle Stickstoffquellen darauf getestet, ob sie von *U. maydis* verwertet werden können und gleichzeitig zu einer Derepression des *nar1*-Promotors und damit Chlorat-Sensitivität führen. Als am geeignetsten hat sich eine Zugabe von 10 mM Prolin oder 10 mM Alanin zum Medium erwiesen. In der Folge wurde mit chlorathaltigem Prolin-Minimalmedium gearbeitet.

Durch Transformation des Deletionskonstrukts in die Wildtyp-Stämme FB1 (*a1 b1*) und FB2 (*a2 b2*) und Selektion auf chlorathaltigem Festmedium konnten die Mutanten ES1 (*a1 b1 Δnar1*) und ES2 (*a2 b2 Δnar1*) erhalten werden. Ein Problem bei der Selektion der Transformanten besteht in der relativ hohen spontanen Mutationsrate von *U. maydis* bei Selektion auf Chlorat-Resistenz von etwa  $5 \times 10^{-5}$  (O. Ladendorf, pers. Mitteilung). Diese ist zum Teil dadurch bedingt, dass nicht nur Mutationen in *nar1* zu Chlorat-Resistenz führen. Mutationen, welche die Biosynthese des Molybdopterin-Cofaktors, die Nitritreduktase, die Nitrat-Permease oder Regulatoren betreffen, können ebenfalls eine Resistenz zur Folge haben (Marzluf, 1997). Ein Großteil dieser unerwünschten Mutanten konnte durch Wachstumsversuche auf Minimalmedien, die 10 mM Nitrit bzw. 10 mM Hypoxanthin als einzige Stickstoffquelle besitzen, eliminiert werden. Während *nar1*-Deletionsmutanten beide Stickstoffquellen nutzen können, können *nir1*-Mutanten auf Nitrit-Minimalmedium und Mutanten im Molybdopterin-Biosyntheseweg auf Hypoxanthin-Minimalmedium nicht mehr wachsen (Marzluf, 1997). Von den 207 untersuchten Transformanten waren 10 durch homologe Integration des Deletionskonstrukts entstanden. 131 wiesen spontane Mutationen auf, welche die Molybdopterin-Biosynthese betrafen, 9 waren spontane *nir1*-Mutanten, 62 spontane *nar1*-Mutanten und 4 hatten unbekannt spontane Mutationen.

Der *nar1*-Locus ist in einigen Systemen auch zur Identifikation von transponierbaren Elementen verwendet worden (Miller *et al.*, 1993; Fernandez *et al.*, 1998). Dabei wurden spontane Mutanten in *nar1* auf die Insertion eines Transposons hin untersucht. Die relativ hohe Rate an spontanen Mutationen in *U. maydis* erschwert einen derartigen Ansatzes, trotzdem wäre er prinzipiell denkbar. Die Möglichkeit der schnellen gleichzeitigen Untersuchung vieler Mutanten mittels Ganz-Zell-PCR könnte die Analyse deutlich vereinfachen.

Die erzeugten Deletionsmutanten konnten mit einem Plasmid, das eine UARS und *nar1* unter der Kontrolle des *sc*-Promotors besitzt, nicht komplementiert werden. Bei Verwendung des starken *o2tef*-Promotors ist dies aber möglich (O. Ladendorf, pers. Mitteilung). Der Versuch deutet darauf hin, dass zur Komplementation eine stärkere Promotoraktivität notwendig ist. Damit könnte *nar1* ein ideales Reportergen bei der Suche nach Transkriptions-Regulatoren darstellen, wenn der zu untersuchende Promotor ein gewisses basales Transkriptions-Niveau aufweist. Aus diesem Grund wurde das *nar1*-Gen isoliert und durch gerichtete PCR-Mutagenese eine *NdeI*-Schnittstelle am Translations-Startpunkt und eine *AscI*-Schnittstelle hinter dem Stoppkodon erzeugt. Damit kann *nar1* in den *nar1*-Deletionsstämmen als Repor-

tergen verwendet werden. Ein entsprechender Stamm zur Identifizierung von Regulatoren der *dik6*-Expression wurde durch Austausch des *dik6*-Gens durch das *nar1*-Gen im Stamm ES1 (*al b1 Δnar1*) hergestellt. Das oben beschriebene Plasmid, in dem *nar1* unter der Kontrolle des *o2tef*-Promotors exprimiert wird, wurde schon erfolgreich als Expressionsplasmid für die Tc1-Transposase aus *Caenorhabditis elegans* in *nar1*-Deletionsmutanten eingesetzt (O. Ladendorf, pers. Mitteilung). Dabei kann durch Wachstum auf Minimalmedium mit Nitrat als einziger Stickstoffquelle auf Anwesenheit des Plasmids, und durch Wachstum auf chlorathaltigen Medien gegen das Plasmid selektiert werden (O. Ladendorf, pers. Mitteilung).

Eine besonders elegante Möglichkeit der Erzeugung von Stämmen, in denen eine regulierte Expression eines bestimmten Gens vorgenommen werden kann, besteht im direkten Einbringen dieses Gens in den *nar1*-Locus. Dafür bietet sich der Vektor p $\Delta$ nar1pro an, ein Vorläuferplasmid des Deletionskonstrukts. In diesen Vektor, der 5'- und 3'-Flanken aus dem *nar1*-Locus besitzt, kann ein beliebiges Gen als *NdeI/NotI*-Fragment inseriert und damit im Genom *nar1* gegen dieses Gen ausgetauscht werden. Die Selektion verläuft wie oben beschrieben durch die Verwendung von chlorathaltigen Medien, für die Induktion der Genexpression können Medien verwendet werden, die Prolin und Nitrat als Stickstoffquellen enthalten.

**PM-Chlorat Festmedium:**

10 mM Prolin  
250 mM KClO<sub>3</sub>  
62,5 ml Salz-Lösung  
2% (w/v) Bacto-Agar  
mit H<sub>2</sub>O auf 980 ml aufgefüllt,  
mit NaOH auf pH 7,0 eingest-  
ellt und autoklaviert, nach  
dem Autoklavieren 20 ml 50%  
(w/v) Glucose-Lösung zuge-  
setzt (f. c. 1%)

**PM-Chlorat Regenerationsagar:**

a) Top-Agar:  
10 mM Prolin  
62,5 ml Salz-Lösung  
1 M Sorbitol  
1,5% (w/v) Bacto-Agar  
mit H<sub>2</sub>O auf 960 ml aufgefüllt,  
mit NaOH auf pH 7,0 eingest-  
ellt und autoklaviert, nach  
dem Autoklavieren 40 ml 50%  
(w/v) Glucose-Lösung zuge-  
setzt (f. c. 2%)  
b) Bottom-Agar:  
wie a), zusätzlich 500 mM  
KClO<sub>3</sub>

**NiM Festmedium:**

10 mM KNO<sub>3</sub>  
62,5 ml Salz-Lösung  
2% (w/v) Bacto-Agar  
mit H<sub>2</sub>O auf 980 ml aufgefüllt,  
mit NaOH auf pH 7,0 eingest-  
ellt und autoklaviert, nach  
dem Autoklavieren 20 ml 50%  
(w/v) Glucose-Lösung zuge-  
setzt (f. c. 1%)

**HM Festmedium:**

10 mM Hypoxanthin  
62,5 ml Salz-Lösung  
2% (w/v) Bacto-Agar  
mit H<sub>2</sub>O auf 980 ml aufgefüllt,  
mit NaOH auf pH 7,0 eingest-  
ellt und autoklaviert, nach  
dem Autoklavieren 20 ml 50%  
(w/v) Glucose-Lösung zuge-  
setzt (f. c. 1%)

## 6.15 *pyr6* als gegenselektionierbarer Marker in *U. maydis*

Parallel zu *nar1* wurde mit *pyr6*, dem Gen für die Ornitin-5'-phosphat Decarboxylase, ein zweites gegenselektionierbares Markersystem etabliert. *pyr6* ist das Homolog zu *URA3* in *S. cerevisiae*; *ura3*-Deletionsmutanten sind in der Uracil-Biosynthese defizient, weisen aber gleichzeitig eine Resistenz gegenüber 5-Fluor-Orotsäure (5FOA) auf (Boeke *et al.*, 1984). Ausgehend von der bekannten Sequenz des *pyr6*-Gens (Kronstad *et al.*, 1989) wurde ein Cosmid und aus diesem ein 4,0 kb langer *PstI*-Subklon isoliert, der das gesamte *pyr6*-Gen mit etwa 1,6 kb 5'-Fanke und 1,7 kb 3'-Flanke enthält. Die Sequenzanalyse ergab, dass *pyr6* ein 99 bp langes Intron von Position 299 bis 397 besitzt. Durch gerichtete PCR-Mutagenese wurden Plasmide hergestellt, die den ORF von *pyr6* als *NdeI/AscI*- bzw. als *NcoI/AscI*-Fragment enthalten (pNEB-*pyr6* *NdeI-AscI* bzw. pNEB-*pyr6* *NcoI-AscI*) und zusätzlich das Konstrukt

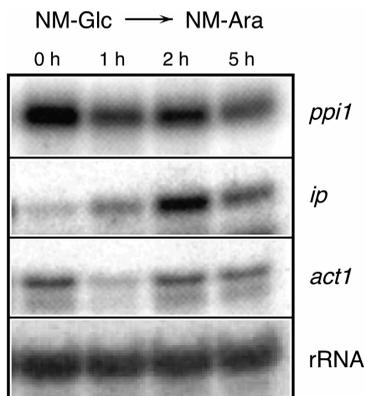
pΔpyr6, mit dem der gesamte ORF von *pyr6* entfernt werden kann (siehe Abschnitt 4.1.4). Durch Transformation dieses Deletionskonstrukts in die Wildtyp-Stämme FB1 (*a1 b1*) und FB2 (*a2 b2*) und Selektion auf 5FOA-haltigem Medium konnten die Mutanten CH1 (*a1 b1* Δ*pyr6*) und CH2 (*a2 b2* Δ*pyr6*) erzeugt werden. Ein großes Problem stellte dabei die Etablierung der geeigneten Medienbedingungen dar, da *pyr6*-Mutanten auf Vollmedium überhaupt nicht wachsen und selbst bei Zugabe von 100 µg/ml Uracil ein deutlicher Wachstumsnachteil beobachtet werden kann (nicht gezeigt). Das gleiche Ergebnis zeigte sich bei Zugabe von 100 µg/ml Uridin oder RNA-Hydrolysat zum Medium (nicht gezeigt). Nur die Supplementierung des Mediums mit 100 µg/ml Cytidin führte wieder zu ausreichendem Wachstum der Mutanten, allerdings immer noch schlechter als das der vergleichbaren Wildtyp-Stämme.

Die Deletionsmutanten konnten mit einem Plasmid, das eine UARS und *pyr6* unter der Kontrolle des *sc*-Promotors besitzt, komplementiert werden (nicht gezeigt und G. Weinzierl, pers. Mitteilung). Der Versuch deutet darauf hin, dass zur Komplementation schon eine schwache Promotoraktivität ausreicht. Damit ist *pyr6* ein ideales und sehr sensitives Reportergen bei der Suche nach Transkriptions-Regulatoren, wenn der zu untersuchende Promotor kein basales Transkriptions-Niveau aufweist. Ein entsprechender Stamm zur Identifizierung von Regulatoren der *dik6*-Expression wurde durch Austausch des *dik6*-Gens durch das *pyr6*-Gen im Stamm CH1 (*a1 b1* Δ*pyr6*) hergestellt. Dieser Stamm wurde bereits erfolgreich für Mutagenese- und Komplementations-Experimente eingesetzt (G. Weinzierl, pers. Mitteilung).

Der ursprüngliche Nachteil dieses Selektionssystems in *U. maydis*, dass die Mutanten nicht in der Lage sind, auf Vollmedium zu wachsen, kann als Vorteil genutzt werden. So kann nach Transformation frei replizierender Plasmide, die eine *pyr6*-Kassette tragen, auf eine weitere Selektion verzichtet werden. In allen getesteten Medien behält *U. maydis* die Plasmide, selbst innerhalb der Pflanze (nicht gezeigt und G. Weinzierl, pers. Mitteilung). Durch Wachstum auf 5FOA-haltigem Medium konnte zusätzlich erfolgreich auf Zellen selektioniert werden, die das Plasmid verloren haben (nicht gezeigt und G. Weinzierl, pers. Mitteilung).

NM-Cytidin Festmedium: 3 gKNO <sub>3</sub> 62,5 ml Salz-Lösung 2% (w/v) Bacto-Agar mit H <sub>2</sub> O auf 970 ml aufgefüllt, mit NaOH auf pH 7,0 eingestell- tet und autoklaviert, nach dem Autoklavieren 20 ml 50% (w/v) Glucose-Lösung (f. c. 1%) und 10 ml Cytidin-Lö- sung (10 mg/ml, f. c. 100 µg/ ml) zugesetzt	NM-Cytidin-5FOA Festmedium: 3 gKNO <sub>3</sub> 750 mg 5FOA 100 mM Tris-Cl 62,5 ml Salz-Lösung 2% (w/v) Bacto-Agar mit H <sub>2</sub> O auf 970 ml aufgefüllt, mit NaOH auf pH 8,0 eingestell- tet und autoklaviert, nach dem Autoklavieren 20 ml 50% (w/v) Glucose-Lösung (f. c. 1%) und 10 ml Cytidin-Lö- sung (10 mg/ml, f. c. 100 µg/ ml) zugesetzt	NM-Cytidin-5FOA Regenerationsagar: a) Top-Agar: 3 g KNO <sub>3</sub> 100 mM Tris-Cl 62,5 ml Salz-Lösung 1 M Sorbitol 1,5% (w/v) Bacto-Agar mit H <sub>2</sub> O auf 950 ml aufgefüllt, mit NaOH auf pH 8,0 eingestell- tet und autoklaviert, nach dem Autoklavieren 40 ml 50% (w/v) Glucose-Lösung (f. c. 2%) und 10 ml Cytidin-Lö-	sung (10 mg/ml, f. c. 100 µg/ ml) zugesetzt b) Bottom-Agar: wie a), zusätzlich 500 µg/ml 5FOA
--	--	--	---

## 6.16 Mengenabschätzung bei Northern-Analysen in *U. maydis*



**Abbildung 48: Mengenabschätzung bei Northern-Analysen in *U. maydis*.** Der Stamm AB32 (*a2 P<sub>crig</sub>:bW2,bE2*) wurde in NM-Glc bis zu  $OD_{600} \approx 0,5$  kultiviert und anschließend durch Wachstum in NM-Ara induziert. Vor Induktion und zu den angegebenen Zeitpunkten danach wurden Aliquots entnommen. Pro Spur wurde etwa 9  $\mu$ g RNA geladen. Vergleiche mit Abbildung 5.

Für die Mengenabschätzung bei Northern-Analysen in *U. maydis* wurden in der Vergangenheit in den meisten Fällen Kontroll-Hybridisierungen mit Sonden durchgeführt, die spezifisch für *ppil*, dem Gen für Peptidyl-Prolyl-Isomerase (Bohlmann, 1996) oder für *ip*, dem Gen für die Eisen-Schwefel-Untereinheit der Sukzinat-Dehydrogenase (Keon *et al.*, 1991; Broomfield und Hargreaves, 1992) sind. Bei beiden Genen wurde davon ausgegangen, dass die Expression mehr oder weniger konstitutiv sein sollte. Bei den Experimenten zur induzierten Expression von b zeigten sich allerdings vor allem kurz nach Medienwechsel deutliche Schwankungen in der Signalstärke (Abbildung 48). Auch bei Verwendung einer *act1*-spezifischen Sonde, die Transkripte des Aktin-Gens (Hartmann, 1997) erkennt, konnte ein unterschiedliches Expressionsniveau zu verschiedenen Zeiten nach Medienwechsel beobachtet werden (Abbildung 48). Ähnliche Effekte zeigten sich bei allen drei Genen auch nach Wechsel von AM- zu NM-Flüssigmedium (nicht gezeigt).

Aus diesem Grund wurden Mengenabschätzungen in Northern-Analysen, bei denen unterschiedliche Medienbedingungen oder Medienwechsel vorkamen, generell mit einer 18S rRNA-spezifischen Sonde durchgeführt. Sonden für *ppil* oder *ip* wurden ausschließlich dann verwendet, wenn die Medienbedingungen zwischen den zu vergleichenden Proben identisch waren.

## 6.17 Sequenzdaten

# Danksagung

Als erstes möchte ich meinen Eltern, Rainer, Carrie, Christoph und Evelin für die Unterstützung während all der Jahre danken. Dass ich mir der Liebe, des Interesses, des Verständnisses und des Rückhalts sicher sein konnte, war eine grosse Hilfe und Motivation.

Regine Kahmann gilt mein Dank für die Möglichkeit, dieses für mich immer noch ungemein spannende Thema zu bearbeiten, und vor allem für die Freiheit, meinen Interessen folgen zu können, wann immer ich das wollte, und für das Vertrauen, dass ich sie sinnvoll nutze. Ganz besonders möchte ich mich für die Hilfe während dem Ende meiner Doktorarbeit, für die Unterstützung bei der Suche nach meiner nächsten Aufgabe und für die Geduld mit dieser doch etwas umfangreicheren Arbeit bedanken. In diesem Zusammenhang geht mein Dank auch an Dirk Eick für die freundliche Übernahme des Zweitgutachtens und an alle weiteren Mitglieder der Promotionskommission für ihre Mühen.

Ein ganz besonders herzlicher Dank gilt meinen beiden Freunden Gerhard und Michael, ohne die ich das alles sicher nie so geschafft hätte und die mir durch ihre ständige Diskussions- und Gesprächsbereitschaft und ihren Witz den Alltag so angenehm gestaltet haben, dass ich mir schwer eine schönere Zusammenarbeit vorstellen kann. Beiden auch vielen Dank für ihre vielen Anregungen und für die Hilfe beim Korrekturlesen.

Ebenfalls ein herzlicher Dank an Siegi für ihre ständige Sorge um mein Wohlergehen und die schönen Essen, die ich sehr vermissen werde, und an Philip für Diskussionen, Gelaber, Spaß und Fußball. Vielen Dank auch Jörg für ein gutes Ende, Olli für seine Hilfe, wann immer ich sie brauchte, beiden für das Ertragen meiner Launen, Alex dafür, dass man ihn einfach mögen muss, Tina für die guten Tipps, Mic für die wunderschöne Zeit der nebeneinander Arbeitens und die geteilte Begeisterung, Angelika für ihr Sonnenschein-Lächeln, Janka für die gute Stimmung, Annemarie für ihr Vorbild an Energie und Optimismus, Karo für das *b*-Familiengefühl, Tobi und Andreas für den Einblick in die Champions-League, Jörg für die Badminton-Vormittage und das SZ-Rätseln, und Zalán, Cosima, Elena und Anne für die gute Zusammenarbeit und alles das, was ich durch sie lernen konnte. Ein besonderer Dank geht an Georgi für die tollen Gespräche und die mentale Unterstützung, die immer genau dann kam, wenn ich sie am nötigsten hatte. Vielen Dank auch Robert, auf den ich mich immer verlassen konnte, Andrea für ihre wunderbaren Zeichnungen und ihre Hilfsbereitschaft, Katharina und Annette für die ersten Laborerfahrungen, William für die immer gute Laune, Karl-Heinz vor allem für die schöne Zeit als letzte Kahmänner, Tilman für seine Herzlichkeit und den schönen Wiesn-Tag, Johannes für seinen Humor der spezifisch fränkischen Art, Christine für ihre Lebenslust, Michael für seinen Sportsgeist bayerischer Prägung, Marc für die guten schweizer Geschichten, Christian für seinen hervorragend hinter sinnigen Humor und vor allem auch Wolfi für 'we will survive', die geteilten Interessen und Erlebnisse und die kurze, aber ereignisreiche Zeit in Leipzig. Gabriel und Nathalie möchte ich für die nette Aufnahme und die schönen Abende danken, Ralph und Heidi für ihre Herzlichkeit und dafür, dass ich so nette Menschen kennen darf, Joaquín für die souveräne Abwehrleistung, Karin und Claudia für die Unterhaltung am Mittagstisch, Julia für die netten Billardabende und ihre Loyalität, Christian für alles das, was wir gemeinsam durchgemacht haben, Christoph für die entscheidende Idee, den ganzen 'Alten', Tilman, Han, Martin, Arnaud und Andreas, für ihre wertvolle Hilfe in der Anfangszeit, Roland für seine Diskussionsbereitschaft und -freude, Lúbcia für 'ved je to len hra', Gero, Anne und Irene für ihre große Hilfe bei der lästigen Mikroskopierarbeit, Ruth und Francesca für die schönen Kaffeekränzchen, Lutz für seinen guten Humor, Herrn Haid für die netten Plaudereien, und Reinhard, George, Pepe, Michael und Christian für die vielen interessanten und hilfreichen Gespräche und Diskussionen. Ein Dank auch an die Diplomanten Jutta, Alexandra, Helga, Steffi, Stefan, Christina, Marianne, Schubi, Angela, Michael, Helge und Rüdiger dafür, dass sie alle in der einen oder anderen, aber immer ganz individuellen Art dafür gesorgt haben, dass Leben ins Labor kam. Und schließlich noch ein ganz dicker Dank an alle, die in der Werkstatt, in den Sekretariaten und in der Spülküche so hervorragend und freundlich dafür gesorgt haben, dass immer alles rund lief. Und wenn ich jetzt niemanden vergessen habe, dann wäre das ein Wunder, also nicht böse sein.

Meinen Freunden und Mitbewohnern möchte ich ganz herzlich für ihre Hilfe, ihr Verständnis und vor allem für ihre Geduld mit mir während der letzten Jahre und all die schönen Sachen, die ich mit ihnen erleben durfte, danken. Und schließlich gilt mein Dank Lisbeth, die diese Arbeit so wunderschön eingerahmt hat und mir gezeigt hat, dass es immer nochmal eine zweite Chance gibt.

# Lebenslauf

<b>PERSONALIEN</b>	Andreas Markus Brachmann Geboren am 18. Oktober 1968 in Kaufbeuren, Bayern
<b>SCHULBILDUNG</b>	1974-1978 Konradin-Grundschule in Kaufbeuren 1978-1987 Staatliches Gymnasium in Kaufbeuren Abschluss: Abitur mit der Gesamtnote 1,0
<b>ZIVILDIENTST</b>	1987-1989 Zivildienst als Rettungssanitäter beim Bayerischen Roten Kreuz, Kaufbeuren
<b>STUDIUM</b>	1989-1991 Grundstudium an der Fakultät für Biologie der Ludwig-Maximilians-Universität München Abschluss: Vordiplom der Biologie mit der Gesamtnote 1,4 1991-1995 Hauptstudium an der Fakultät für Biologie der Ludwig-Maximilians-Universität München Hauptfach: Genetik; Nebenfächer: Zoologie, systematische Botanik, Biochemie Abschluss: Diplom in Biologie mit der Gesamtnote 1,2 1/95-10/95 Diplomarbeit am Institut für Genetik und Mikrobiologie der Ludwig-Maximilians-Universität München zum Thema "Suche nach frühen b-regulierten Genen in <i>Ustilago maydis</i> mit Hilfe der Methode des Differential Display" Betreuer: Prof. Dr. R. Kahmann
<b>PROMOTION</b>	1996-2001 Doktorarbeit am Institut für Genetik und Mikrobiologie der Ludwig-Maximilians-Universität München zum Thema "Genregulation durch das bW/bE-Heterodimer während der frühen Infektionsphase von <i>Ustilago maydis</i> " Betreuer: Prof. Dr. R. Kahmann
<b>SONSTIGES</b>	1989-1995 "Stipendium für Hochbegabte" des Bayerischen Kultusministeriums 1992-1994 Studentischer Fachbereichsvertreter der Fakultät für Biologie der Ludwig-Maximilians-Universität München 4/94-6/94 Arbeit im Labor von Prof. Dr. P. Dittrich im Institut für Botanik der Ludwig-Maximilians-Universität München zum Thema "Lichtabhängige Expression von Serin/Threonin-Kinasen in <i>Arabidopsis thaliana</i> " 7/94-10/94 Arbeit im Labor von Prof. Dr. J. Boeke im Department of Molecular Biology and Genetics der Johns Hopkins University School of Medicine in Baltimore zum Thema "Studies on the first priming event during reverse transcription of the retrotransposon Ty1 in <i>Saccharomyces cerevisiae</i> " 1996-2001 Strahlenschutzbeauftragter am Institut für Genetik der Ludwig-Maximilians-Universität München

## WEITERE VERÖFFENTLICHUNGEN

Trost, M., Brachmann, A. und Dumpitak, C. (1996) *Studienführer Biologie*. VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim. ISBN 3-527-30077-5.

Trost, M. und Brachmann, A. (1997) *Berufseinstieg und Berufssituation von Biologen in Deutschland: Ergebnisse einer Umfrage des Verbandes Deutscher Biologen*. VDBiol, München. ISBN 3-00-001505-1.

Trost, M., Leopold, A., Roller, C., Brachmann, A. und Dumpitak, C. (1999) *Studienführer Biologie*. G. Fischer Verlag, Stuttgart. ISBN 3-437-35550-3.