

Charakterisierung apathogener REMI-Mutanten
in *Ustilago maydis*

Dissertation

der Fakultät für Biologie
der Ludwigs-Maximilians-Universität München

Heidi Ulrike Böhnert
München, 2000

Diese Dissertation wurde am 15. November 2000 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 Herrn Prof. Dr. Jürgen Ebel (zweiter Gutachter). Die Prüfung fand am 2. Mai 2001 statt.

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|-----------|
| 1. Einleitung | 1 |
| 1.1. Der Lebenszyklus von <i>Ustilago maydis</i> | 1 |
| 1.2. Die Paarungstyploci <i>a</i> und <i>b</i> regulieren die sexuelle Entwicklung und Pathogenität von <i>U. maydis</i> | 3 |
| 1.3. Der solopathogene haploide Stamm CL13 | 4 |
| 1.4. Strategien zur Identifizierung von pilzlichen Pathogenitätsfaktoren | 4 |
| 1.4.1. <i>a priori</i> -Ansätze | 4 |
| 1.4.2. Differentielle Ansätze zur Isolierung von Pathogenitätsgenen | 7 |
| 1.4.3. Mutagenese-Ansätze zur Identifizierung von Pathogenitätsfaktoren | 9 |
| 1.5. Isolierung apathogener REMI-Mutanten in <i>U. maydis</i> | 11 |
| 1.6. Zielsetzung der vorliegenden Arbeit | 13 |
| | |
| 2. Ergebnisse | 14 |
| 2.1 Teiluntersuchungen von 12 apathogenen REMI-Mutanten | 14 |
| 2.1.1. Sequenzanalyse des Integrationsortes | 14 |
| 2.1.2. Auswahl der zu charakterisierenden Stämme | 15 |
| 2.1.3. Nachweis der Kopplung zwischen Plasmidinsertion und Verlust der Pathogenität | 15 |
| 2.2. Charakterisierung der Mutante CL13pat2997 | 17 |
| 2.2.1. Charakterisierung des in CL13pat2997 betroffenen Gens mittels Northern Analyse | 17 |
| 2.2.2. Deletion von <i>rpl38</i> in CL13, FB1 und FB2 | 20 |
| 2.3. Charakterisierung der Mutante CL13pat2563 | 21 |
| 2.3.1. Nachweis der Kopplung zwischen Insertion und Pathogenitätsverlust mittels Komplementation | 21 |
| 2.3.2. Identifizierung des in CL13pat2563 betroffenen Gens mittels Komplementationsanalyse | 23 |
| 2.4. Charakterisierung der Mutante CL13pat3050 | 26 |
| 2.4.1. Nachweis der Kopplung zwischen Insertion und Pathogenitätsverlust mittels Komplementation | 26 |
| 2.4.2. Identifizierung des in CL13pat3050 betroffenen Gens | 26 |
| 2.4.3. Deletion von <i>pat3050</i> in FB1 und FB2 | 28 |
| 2.5. Charakterisierung der Mutante CL13pat4285 | 30 |
| 2.5.1. Genomisches Rearrangement in CL13pat4285 | 30 |
| 2.5.2. Bestätigung der Kopplung zwischen Plasmidinsertion in CL13pat4285 und Verlust der Pathogenität | 31 |
| 2.5.3. Sequenzanalyse des Gens <i>ckb1</i> | 34 |
| 2.5.4. Wachstum und Zellmorphologie der <i>ckb1</i> -Mutanten | 36 |
| 2.5.5. Pheromonstimulation der <i>ckb1</i> -Mutanten | 37 |
| 2.5.6. Koloniemorphologie von CL13pat4285 und CL13ckb1::hyg | 39 |
| 2.6. Charakterisierung der Mutante CL13pat4339 | 40 |
| 2.6.1. Identifizierung des in CL13pat4339 betroffenen Gens, <i>gas1</i> | 40 |
| 2.6.2. Deletion von <i>gas1</i> in FB1 und FB2 durch Einbringen des <i>eGFP</i> -Reportergens | 44 |
| 2.6.3. Expressionsanalyse von <i>gas1</i> | 49 |
| 2.6.4. Mikroskopische Analyse des frühen Infektionsverlaufs der <i>gas1</i> -Nullstämme | 50 |
| 2.6.5. Versuche zur Lokalisierung von Gas1 | 55 |
| 2.6.6. Überexpression von <i>gas1</i> | 56 |
| 2.7. Mikroskopische Analyse des Infektionsverlaufs verschiedener apathogener Stämme | 59 |
| 2.7.1. Entwicklung auf der Blattoberfläche und Appressorienbildung | 60 |
| 2.7.2. Penetration und invasives Wachstum | 62 |

| | |
|---|-----------|
| 3. Diskussion | 65 |
| 3.1. Die Isolierung und Analyse apathogener REMI-Mutanten in <i>U. maydis</i> | 65 |
| 3.2. Das <i>pat2563</i> Gen | 66 |
| 3.2.1. <i>pat2563</i> - ein stadienspezifisch reguliertes Gen? | 67 |
| 3.2.2. Pat2563 - ein kleiner, Cystein-reicher Pathogenitätsfaktor | 68 |
| 3.3. Ckb1, eine regulatorische Untereinheit der Proteinkinase CKII | 71 |
| 3.3.1. Die <i>ckb1</i> -Allele der Stämme CL13pat4285 und CL13ckb1::hyg besitzen unterschiedliche Aktivität | 72 |
| 3.3.2. Der Effekt der <i>ckb1</i> -Disruption auf Wachstum und Zellmorphologie | 73 |
| 3.3.3. Kreuzungsdefekt und Pathogenität von <i>ckb1</i> -Mutanten | 73 |
| 3.4. Der Pathogenitätsfaktor Gas1 | 74 |
| 3.4.1. Gas1 - eine alpha-Glucosidase des Endoplasmatischen Retikulums? | 74 |
| 3.4.2. Hinweise auf eine entwicklungsspezifische Funktion von <i>gas1</i> in der Infektionshyphe | 76 |
| 3.4.3. <i>gas1</i> -Deletionsstämme und induzierte Pflanzenabwehr | 76 |
| 3.5. Frühe Stadien der pathogenen Entwicklung von <i>U. maydis</i> | 77 |
| 3.5.1. Die Erkennung der Wirtspflanze | 78 |
| 3.6. Klassifizierung der untersuchten Mutanten | 78 |
| 4. Zusammenfassung | 81 |
| 5. Material und Methoden | 82 |
| 5.1. Chemikalien und Enzyme | 82 |
| 5.2. Stämme und Kultivationsbedingungen | 83 |
| 5.3. Genomische und cDNA Banken | 83 |
| 5.3.1. Cosmidbank des Stammes FBD11 (Schauwecker et al, 1995) | 83 |
| 5.3.2. λ ZAPII-Bank des Stammes FB1 (Hartmann, 1997) | 83 |
| 5.4. Plasmide und Plasmidkonstruktionen | 83 |
| 5.4.1. Allgemeine Vektoren | 83 |
| 5.4.2. Aus den REMI-Mutantenstämmen re-isolierte Plasmide | 84 |
| 5.4.3. Genomische Subklone | 84 |
| 5.4.4. cDNA-Klone | 84 |
| 5.4.5. Komplementationskonstrukte | 84 |
| 5.4.6. Deletions- und Disruptionskonstrukte | 85 |
| 5.4.7. Konstrukte zur Markierung von Gas1 mit dem Hexa-Myc Epitop | 86 |
| 5.4.8. Oligonukleotide | 86 |
| 5.5. Mikrobiologische und genetische Methoden | 87 |
| 5.5.1. Infektion von Maispflanzen mit <i>U. maydis</i> | 87 |
| 5.5.2. Mikroskopische Analyse infizierter Pflanzen | 87 |
| 5.5.3. Konfrontationstest von <i>U. maydis</i> (Snetselaar et al, 1996) | 87 |
| 5.5.4. Transformation von <i>E. coli</i> und <i>U. maydis</i> | 88 |
| 5.6. Molekularbiologische Standardtechniken | 88 |
| 5.7. Isolierung von Nukleinsäuren | 88 |
| 5.7.1. Plasmidpräparation aus <i>E. coli</i> | 88 |
| 5.7.2. Präparation chromosomaler DNA aus <i>U. maydis</i> | 88 |
| 5.7.3. Präparation von gesamt RNA aus <i>U. maydis</i> | 89 |
| 5.7.4. Aufreinigung von polyA ⁺ RNA | 89 |
| 5.8. Radioaktive Markierung von DNA Fragmenten | 89 |

| | | |
|-----------|--|-----------|
| 5.9. | Transfer und Analyse von Nukleinsäuren auf Nylonmembranen | 89 |
| 5.9.1. | Transfer und Analyse von DNA ("Southern Blot") | 89 |
| 5.9.2. | Transfer und Analyse von RNA ("Northern Blot") | 89 |
| 5.10. | Isolierung von cDNA Klonen | 90 |
| 5.11. | Sequenzanalyse des <i>rpl38</i> -Locus, des <i>pat2563</i> -Locus, und der Gene <i>pat3050</i> , <i>ckb1</i> und <i>gas1</i> | 90 |
| 5.12. | Proteinbiochemische Methoden | 91 |
| 5.12.1. | Gewinnung von Proteinextrakten aus <i>U. maydis</i> | 91 |
| 5.12.2. | Western Blot | 92 |
| 5.12.3. | Immunologischer Nachweis von Proteinen im Western Blot | 92 |
| 6. | Literaturverzeichnis | 93 |

Anhang

1. Einleitung

1.1. Der Lebenszyklus von *Ustilago maydis*

Die zur Klasse der Basidiomyceten zählende Ordnung der Brandpilze (*Ustilaginales*) umfaßt über 1000 Arten, von denen viele Pflanzenpathogene mit strenger Wirtsspezifität sind. Die meisten Wirtspflanzen der Brandpilze finden sich in der Familie der Gräser (Poaceae), darunter wirtschaftlich bedeutende Arten wie Weizen, Hafer und Mais (Fischer and Holton, 1957). Ein Vertreter dieser Ordnung ist der Erreger des Maisbeulenbrandes, *Ustilago maydis*. Dieser Brandpilz befällt neben *Zea mays* (Mais) auch die dazu verwandte Art *Euchlaena mexicana* (Teosinte). Infizierte Pflanzen lassen zunächst ein reduziertes Wachstum, Chlorosen und Anthocyanfärbung an Blättern und Stamm erkennen, und bilden schließlich die charakteristischen Gallen aus, in denen die Brandsporen gebildet werden. Die in Größe und Gestalt variablen Gallen können an allen oberirdischen Pflanzenteilen gebildet werden, und platzen in der Reife auf, um die schwarzen Brandsporen freizusetzen (Christensen, 1963).

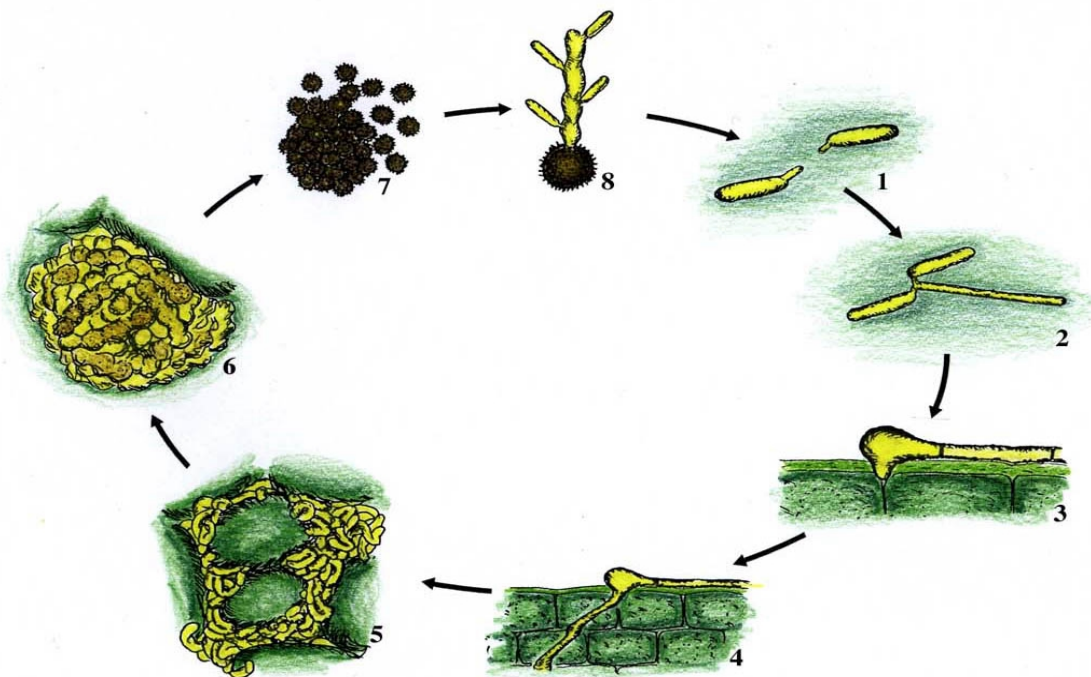


Abb.1: Lebenszyklus von *U. maydis*. 1, zwei kompatible haploide Sporidien bilden Paarungshyphen aus und wachsen aufeinander zu; 2, nach erfolgter Zellfusion entsteht ein filamentöses Dikaryon; 3, auf der Blattoberfläche der Maispflanze wird an geeigneten Stellen ein Appressorium gebildet; 4, die Infektionshypha wächst zunächst intrazellulär; 5, in der entstehenden Galle sind die Pflanzenzellen vom Pilzmycel umgeben; 6, sporogene Hyphen; 7, reife Teliosporen; 8, auskeimende Teliosporen mit Promycel und sich abschnürenden haploiden Sporidien.

Der Lebenszyklus von *U. maydis* läßt sich anhand der Kernphase in eine haploide, eine dikaryontische und eine diploide Phase unterteilen. Die Brandspore stellt das letzte Stadium der diploiden Phase des Lebenszyklus dar (siehe Abb.1). Während der

Sporenkeimung und Meiose entsteht ein septiertes Promycel. Von diesem schnüren sich haploide Basidiosporen ab, die auch als Sporidien bezeichnet werden. Die Sporidien wachsen hefeartig durch Knospung und ernähren sich saprophytisch. Sie lassen sich im Labor leicht auf artifiziellen Medien kultivieren und sind molekularbiologischen Untersuchungen zugänglich. Zwei haploide Stämme, die sich bezüglich der beiden Paarungstyploci *a* und *b* (siehe 1.2) voneinander unterscheiden, sind kompatibel und können fusionieren. Das resultierende Dikaryon ist im Gegensatz zur haploiden Wuchsform filamentös und obligat biotroph. Die pathogene Entwicklung des Pilzes läßt sich verfolgen, wenn junge Maispflanzen mit einer Suspension kompatibler Sporidien infiziert werden. Das filamentöse Dikaryon bildet sich auf der Blattoberfläche. Es zeichnet sich durch rasches Spitzenwachstum aus, bei dem sich das Cytoplasma in der septierten Hyphenspitze voranschleibt und leere Segmente zurückbleiben. Etwa 12 Stunden nach Inokulation bildet das Dikaryon die charakteristische Infektionsstruktur, das Appressorium, und penetriert die Cuticula (Snetselaar and Mims, 1992). Während der ersten 48 Stunden nach Inokulation durchwachsen die Infektionshyphen die Epidermiszellen, bleiben hierbei jedoch von der Zellmembran der Pflanze umgeben. Die Infektionshyphen breiten sich in der Umgebung der Infektionsstelle aus. Hierbei wächst wiederum nur die Hyphenspitze, eine Kernteilung findet nicht statt. Die penetrierten Epidermiszellen lassen in mikroskopischen Untersuchungen keine auffälligen Veränderungen erkennen, die auf eine Schädigung oder Abwehrreaktion hinweisen (Snetselaar and Mims, 1994). Etwa 48 Stunden nach Inokulation erreichen die Infektionshyphen auch die tiefer liegenden Zellschichten des Parenchyms, eine systemische Ausbreitung findet jedoch nicht statt (Snetselaar and Mims, 1994). Nach 4 bis 5 Tagen wachsen die Infektionshyphen vermehrt interzellulär. In dieser Phase wird die Proliferation des Wirtsgewebes induziert. Die Wirtszellen in den von der Infektion betroffenen Regionen beginnen sich zu teilen und zu vergrößern, und eine makroskopisch erkennbare Galle entsteht. Vereinzelt dringen Infektionshyphen in die Pflanzenzellen ein, und lassen dort zum Teil gelappte oder fingerförmige Strukturen erkennen (Snetselaar and Mims, 1994; Banuett and Herskowitz, 1996). 5 bis 7 Tage nach Inokulation beginnt die massive interzelluläre Proliferation des Pilzmaterials. Die Pflanzenzellen in der Galle lassen keinen Gewebeverband mehr erkennen und sind vom Mycelium umgeben. Das Ende der proliferativen Phase der pathogenen Entwicklung etwa 7 bis 10 Tage nach Inokulation wird von der paarweisen Fusion der Zellkerne in den Hyphen begleitet (Snetselaar and Mims, 1994). Die Hyphenwand des diploiden Myceliums beginnt aufzuquellen und zu gelatinieren. Die sporogenen Hyphen lassen perlschnurartige Verdickungen erkennen, in denen die Sporen reifen (Snetselaar and Mims, 1994). Etwa 10 Tage nach Inokulation ist das dunkle Sporenmaterial nur noch von einer dünnen Schicht des Wirtsgewebes umgeben. Im Inneren der Galle sind die kugeligen, melanisierten und mit charakteristischer Ornamentierung besetzten Teliosporen vollständig ausgereift. Mit fortschreitender Austrocknung platzt die Galle auf und gibt das Sporenmaterial frei. Im Feld werden die Brandsporen von Wind und Regen verbreitet und können sofort oder nach Überwinterung einen weiteren Zyklus der pathogenen Entwicklung beginnen.

1.2. Die Paarungstyploci *a* und *b* regulieren die sexuelle Entwicklung und Pathogenität von *U. maydis*

Die Zellfusion, der Wechsel vom hefeartigen zum filamentösen Wachstum, und die nachfolgende pathogene Entwicklung in der Pflanze werden genetisch von den beiden Paarungstyploci *a* und *b* kontrolliert. Durch Experimente mit künstlich erzeugten diploiden Stämmen konnte die jeweilige Bedeutung des *a*- und des *b*-Locus genauer charakterisiert werden (Holliday, 1961a; Puhalla, 1968; Day et al., 1971; Banuett and Herskowitz, 1989): Diploide Stämme, die bezüglich beider Kreuzungstyploci heterozygot sind, lassen sich kultivieren und zeigen auf Aktivkohleplatten filamentöses Wachstum. Solche Stämme sind solopathogen, d.h. sie können die pathogene Entwicklung in der Pflanze durchlaufen ohne mit einem kompatiblen Partner zu fusionieren. Diploide Zellen mit gleichen *a*- und unterschiedlichen *b*-Allelen sind ebenfalls solopathogen, zeigen aber auf aktivkohlehaltigen Platten hefeartiges Wachstum. Ein diploider Stamm, der unterschiedliche *a*-, und identische *b*-Allele trägt, ist apathogen und zeigt auch kein filamentöses Wachstum. Er kann jedoch, obwohl er einen diploiden Kern besitzt, mit haploiden Stämmen beider *a*-Spezifitäten fusionieren ("double mater", Holliday, 1961b). Aus diesen Beobachtungen ließ sich ableiten, daß der *a*-Locus die Zellfusion kontrolliert, während die pathogene Entwicklung allein vom *b*-Locus abhängt. Das filamentöse Wachstum auf künstlichen Nährmedien ist jedoch ein Merkmal, an dem sowohl *a* als auch *b* beteiligt sind.

Der *a*-Locus, für den zwei verschiedene Allele, *a1* und *a2*, bekannt sind, codiert für die Komponenten eines pheromonvermittelten Zell-Zell-Erkennungssystems. Am *a1*-Locus befinden sich die Gene *mfa1* und *pra1*, die für die Vorstufe eines Lipopeptidpheromons, bzw. eines Pheromonrezeptors codieren (Bölker et al, 1992). Der *a2*-Locus beinhaltet neben den Allelen *mfa2* und *pra2* zusätzlich drei weitere Leserahmen, von denen einer einem kryptischen Pheromogen entspricht, während die beiden Leserahmen *lga2* und *rga2* für Proteine unbekannter Funktion codieren (Urban et al, 1996). Das von einem Kreuzungspartner sekretierte Pheromon wird durch den Rezeptor des kompatiblen Partners gebunden. In Folge dieser gegenseitigen Erkennung kommt es zur Ausbildung von Konjugationshyphen und zur Zellfusion. Für die weitere Entwicklung des resultierenden Dikaryons ist es notwendig, daß die beiden Zellkerne unterschiedliche *b*-Allele tragen (Rowell, 1955; Banuett and Herskowitz, 1989).

Der *b*-Locus, für den 33 verschiedene Allele beschrieben wurden (Rowell and DeVay, 1954; DeVay, zitiert in Wong and Wells, 1985), beinhaltet zwei divergent transkribierte Gene, die mit *bEast* (*bE*) und *bWest* (*bW*) bezeichnet werden (Gillisen et al, 1992). Die von diesen beiden Genen codierten Proteine besitzen im N-terminalen Bereich allelspezifische Variabilität, während der C-terminale Bereich konstant ist und ein Homeodomänen-DNA-Bindungsmotiv aufweist (Schulz et al, 1990; Kronstad et al, 1990; Gillisen et al, 1992). Die *bE*- und *bW*-Proteine können über ihre variablen Domänen miteinander dimerisieren, wenn sie von unterschiedlichen Allelen stammen (Kämper et al, 1995). Das resultierende Heterodimer stellt den zentralen Regulator der weiteren pathogenen Entwicklung des Dikaryons dar.

1.3. Der solopathogene haploide Stamm CL13

Durch Kreuzung verschiedener Stämme, bei denen jeweils eines der beiden *b*-Gene deletiert worden war, und durch Konstruktion von chimären *b*-Loci wurde gezeigt, daß die pathogene Entwicklung immer dann erfolgen kann, wenn ein *bW*-Gen mit dem *bE*-Gen eines unterschiedlichen Allels kombiniert wird, d.h. wenn ein *bE/bW* Heterodimer gebildet werden kann (Gillissen et al., 1992; Yee and Kronstad, 1993). Daraus ließ sich unmittelbar folgern, daß ein solopathogener haploider Stamm entstehen sollte, wenn der *b*-Locus eines haploiden Ausgangsstammes durch einen chimären *b*-Locus ersetzt wird, der für ein aktives *b*-Heterodimer codiert. Daß diese Annahme richtig war, wurde durch die Konstruktion des Stammes CL13 bewiesen. Hierfür wurde im haploiden Stamm FB1 das native *bI*-Allel durch ein chimäres *b*-Allel ersetzt, das ein *bW2*- und ein *bE1*-Gen enthält (Bölker et al., 1995a). Dieser Stamm wächst auf Aktivkohleplatten hefeartig, da er nur ein *a*-Allel trägt, ist jedoch in der Lage, die vollständige pathogene Entwicklung in der Pflanze zu durchlaufen. Die Konstruktion dieses haploiden solopathogenen Stammes war eine wesentliche Voraussetzung für die genetische Analyse der pathogenen Entwicklung von *U. maydis* (siehe 1.4.3).

1.4. Strategien zur Identifizierung von pilzlichen Pathogenitätsfaktoren

Als Pathogenitätsfaktoren *sensu stricto* werden jene Genprodukte bezeichnet, deren Funktion spezifisch nur für die pathogene Entwicklung des Pilzes essentiell sind (Oliver and Osbourn, 1995; Schäfer, 1994). Dies bedeutet, daß die Deletion eines Pathogenitätsgens zum Verlust der Pathogenität des betreffenden Stammes führen sollte, ohne weitere phänotypische Veränderungen, etwa der Fähigkeit des Wachstums auf artifiziellen Medien, oder der Zellmorphologie zu verursachen. Jene Genprodukte, deren Ausfall nicht zum völligen Verlust der Pathogenität, jedoch zur verminderten Ausbildung von Pathogenitätssymptomen führt, werden als Virulenzfaktoren bezeichnet (Schäfer, 1994). Um die molekularen Grundlagen der pathogenen Entwicklung verschiedener phytopathogener Pilze zu analysieren, wurde eine Reihe unterschiedlicher Strategien verfolgt.

1.4.1. *A priori*-Ansätze

A priori-Ansätze beruhen auf der Annahme, daß eine bestimmte Genfunktion für die pathogene Entwicklung des Pilzes notwendig ist. Diese Annahme wird durch gezielte Mutation des betreffenden Gens und nachfolgende Analyse der pathogenen Entwicklung der Mutanten überprüft.

Diese Strategie wurde in phytopathogenen Pilzen verfolgt, um die Bedeutung verschiedener Enzyme für die pathogene Entwicklung zu untersuchen. So wurden zum Beispiel Gene, die für sekretierte Enzyme codieren, die am Abbau pflanzlicher Zellwände beteiligt sein könnten, wie Cutinasen, Xylanasen und Proteasen, in diversen phytopathogenen Pilzen deletiert. Die betreffenden Mutantenstämme ließen jedoch in keinem Fall eine Beeinträchtigung der pathogenen Entwicklung erkennen (siehe Tab.1). In den meisten Fällen ließ sich in den Disruptantenstämmen eine Restaktivität der betreffenden Enzymfunktion detektieren (Tab.1). Dies beruht wahrscheinlich darauf, daß diese Enzymfunktionen häufig von Genfamilien codiert werden. Die Disruption eines einzelnen Gens führt daher nicht zum völligen Verlust der Funktion. Einen

besonderen Fall der Redundanz machte die Disruption zweier Gene in *Magnaporthe grisea* deutlich, die für Xylanasen codieren. In der *xyl1/xyl2* Doppelmutante ließen sich 4 weitere Xylanase-Aktivitäten nachweisen, von denen drei weder im Wildtyp, noch in der *xyl1* Einzelmutante detektierbar waren (Wu et al, 1997). Dies bedeutet, daß sich im Mutantenstamm das Expressionsmuster weiterer Gene mit ähnlicher Funktion so verändern kann, daß der Defekt teilweise aufgehoben wird.

In weiteren *a priori*-Ansätzen konnte gezeigt werden, daß die Funktionen spezifischer Enzyme, die an der Detoxifizierung pflanzlicher antimikrobieller Produkte (Osbourn et al, 1994; Wasmann and van Etten, 1996), an der Synthese bekannter pilzlicher Phytotoxine (Panaccione et al, 1992; Lu et al, 1994; Yoder, 1998), oder an der Melaninsynthese beteiligt sind (Kubo et al, 1996; Takano et al, 1995; Perpetua et al, 1996), eine Bedeutung in der pathogenen Entwicklung des jeweiligen Pilzes besitzen (Tab.1).

In jüngerer Vergangenheit konzentrierten sich *a priori*-Ansätze auf die Überprüfung der Rolle von regulatorischen Genprodukten und Signaltransduktionskomponenten in der pathogenen Entwicklung phytopathogener Pilze (Tab.2). So ließ sich zum Beispiel in *M. grisea*, *Colletotrichum trifolii* und *U. maydis* zeigen, daß der katalytischen Untereinheit der cAMP-abhängigen Proteinkinase in der pathogenen Entwicklung eine zentrale Rolle zukommt (Mitchell and Dean, 1995; Xu et al, 1997; Yang and Dickman, 1999; Dürrenberger et al, 1998). Darüberhinaus wurde in *M. grisea* für die Adenylatcyclase Mac1 und die Proteinkinasen Pmk1 und Mps1 (Xu and Hamer, 1996; Xu et al, 1998), sowie in *U. maydis* für die Proteinkinase Ukc1 (Dürrenberger and Kronstad, 1999) eine Rolle in der Pathogenität demonstriert. Im Gegensatz dazu führte die Disruption des *uka1*-Gens von *U. maydis*, das für eine weitere katalytische Untereinheit einer cAMP-abhängigen Proteinkinase codiert, zu keinem veränderten Pathogenitätsphänotyp (Dürrenberger et al, 1998).

Allerdings lassen viele der in diesen Ansätzen erzeugten Mutanten neben dem Pathogenitätsphänotyp Defekte z.B. in der Zellmorphologie oder der Konidienbildung erkennen (siehe Tab.2). Die betreffenden Gene können somit den Pathogenitätsfaktoren *sensu stricto* nicht zugeordnet werden.

Tabelle 1: Enzyme als angenommene pilzliche Pathogenitätsfaktoren

| Funktion der Enzyme | Enzymklasse | Organismus | Genname | Pathogenität der Disruptanten | Referenz |
|--|------------------------------|--------------------------------------|---|-------------------------------------|--|
| Abbau pflanzlicher Gewebe | Cutinasen | <i>Nectria haematococca</i> | | unverändert | Stahl and Schäfer, 1992 |
| | | <i>Magnaporthe grisea</i> | | unverändert | Sweigard et al, 1992 |
| | | <i>Botrytis cinerea</i> | | unverändert | van Kan et al, 1997 |
| | Xylanasen | <i>Cochliobolus carbonum</i> | <i>xyl1</i> <i>xyl2</i> <i>xyl3</i> | 3-fach Deletion: unverändert | Apel et al, 1993; Apel-Birkhold and Walton, 1996 |
| | | <i>Magnaporthe grisea</i> | <i>xyl1</i> <i>xyl2</i> | doppel-Deletion: unverändert | Wu et al, 1997 |
| Protease | <i>Cochliobolus carbonum</i> | <i>alp1</i> | unverändert | Murphy and Walton, 1996 | |
| Detoxifizierung pflanzlicher antimikrobieller Produkte | Avenacinase | <i>G. graminis</i> var <i>avenae</i> | | apathogen auf Hafer | Osborn et al, 1994 |
| | Cyanid Hydratase | <i>G. sorghi</i> | | unverändert | van Etten et al, 1994 |
| | Pisatin Demethylase | <i>Nectria haematococca</i> | | reduziert | Wasmann and van Etten 1996 |
| Synthese pilzlicher Toxine | T-Toxin Synthetase | <i>Cochleobolus heterostrophus</i> | <i>PKS1</i> | reduziert | Lu et al, 1994 |
| | HC-Toxin Synthetase | <i>Cochleobolus carbonum</i> | <i>HTS1</i> | apathogen auf Hm-Mais | Panaccione et al, 1992 |
| | PM-Toxin Synthetasen | <i>Mycosphaerella zea-maydis</i> | <i>Mz-PKS1</i> <i>Mz-RED1</i> | apathogen apathogen | Yoder, 1998 |
| Melanin-synthese | (spontane Mutanten) | <i>M. grisea</i> | <i>alb</i> <i>rs</i> <i>buf</i> | apathogen apathogen apathogen | Chumley and Valent, 1990 |
| | Scytalone Dehydratase | <i>Colletotrichum lagenarium</i> | <i>SCD1</i> | apathogen | Kubo et al, 1996 |
| | Polyketid-synthase | <i>C. lagenarium</i> | <i>PKS1</i> | apathogen | Takano et al, 1995 |
| | 1,3,8 THN-Reduktase | <i>C. lagenarium</i> | <i>THR1</i> | apathogen | Perpetua et al, 1996 |

Tabelle 2: Regulatorische Genprodukte und Signaltransduktionskomponenten als angenommene pilzliche Pathogenitätsfaktoren

| Funktion | Organismus | Genname | Pathogenität der Disruptanten (weitere Phänotypen) | Referenz |
|--|------------------|----------------------------|--|--------------------------------|
| Regulation des Stickstoff-Metabolismus | <i>M. grisea</i> | <i>nut1</i> | unverändert | Froelinger and Carpenter, 1996 |
| | <i>M. grisea</i> | <i>npr1</i> <i>npr2</i> | reduziert reduziert | Lau and Hamer, 1996 |
| Adenylatzyklase | <i>M. grisea</i> | <i>mac1</i> | stark reduziert (Wachstum, Conidienbildung, Fruchtbarkeit) | Choi and Dean, 1997 |

| | | | | |
|---|--------------------|----------------------------|---|--|
| katalytische Untereinheit der cAMP-abhängigen Proteinkinase | <i>M. grisea</i> | <i>cpkA</i> | stark reduziert | Mitchell and Dean, 1995; Xu et al, 1997 Yang and Dickmann, 1999 |
| | <i>C. trifolii</i> | <i>Ct-pkaC</i> | apathogen (Wachstum, Conidienbildung) | |
| | <i>U. maydis</i> | <i>adr1</i> <i>uka1</i> | apathogen (Zellmorphologie) unverändert | Dürrenberger et al, 1998 |
| MAP-kinase | <i>M. grisea</i> | <i>pmk1</i> | apathogen | Xu and Hamer, 1996 Xu et al, 1998 |
| | | <i>mps1</i> | apathogen (Wachstum, Conidienbildung) | |
| Protein Kinase | <i>U. maydis</i> | <i>ukc1</i> | apathogen (Zellmorphologie) | Dürrenberger and Kronstad, 1999 |

1.4.2. Differentielle Ansätze zur Isolierung von Pathogenitätsgenen

Die differentiellen Ansätze basieren auf der Annahme, daß die Expression von Pathogenitätsgenen während der pathogenen Entwicklung induziert ist. Potentielle Pathogenitätsfaktoren werden aufgrund ihrer verstärkten Expression während des Wachstums in der Pflanze oder in einem für die Pathogenität relevanten Entwicklungsstadium außerhalb der Pflanze (z.B. filamentöses Wachstum oder Appressorienbildung) identifiziert. Auf diese Art werden auch funktionell redundante Gene identifiziert, deren Expression pathogenitätsspezifisch reguliert ist. In Systemen, die der molekulargenetischen Analyse zugänglich sind, kann über die Klonierung und Disruption der differentiell exprimierten Gene eine Aussage über die Bedeutung dieser Gene für die pathogene Entwicklung getroffen werden.

Die Methoden zur Identifizierung differentiell exprimierter Gene basieren auf dem differentiellen Screening von cDNA-Banken (z.B. Talbot et al, 1993, Hahn and Mendgen, 1997), subtraktiver cDNA-Hybridisierung (Timberlake, 1986; Schauwecker et al, 1995) der vergleichenden Darstellung von Transkriptpopulationen des pathogenen und des nicht-pathogenen Stadiums mittels Differential Display (Liang and Pardee, 1992; Bohlmann, 1996; Regenfelder et al, 1997), oder der direkten Isolierung von pilzlichen extrazellulären Proteinen, die nur in infizierten Pflanzen vorhanden sind (Joosten and De Wit, 1988; Van den Ackerwecken et al, 1993).

Unter den bislang identifizierten pathogenitätsspezifisch exprimierten Genen konnte lediglich für *mpg1* aus *M. grisea*, das für ein Hydrophobin codiert (Talbot et al, 1993), und die Gene *ecp1* und *ecp2* aus *C. fulvum*, die für kleine sekretierte Proteine unbekannter Funktion codieren (Joosten and De Wit, 1988; Van den Ackerwecken et al, 1993; Wubben et al, 1994 Laugé et al, 1997), eine Bedeutung in der pathogenen Entwicklung nachgewiesen werden (Tab.3). In *U. maydis* wurde die filamentspezifisch exprimierte Zellulase Egl1 mittels subtraktiver cDNA-Hybridisierung identifiziert (Schauwecker et al, 1995). Darüber hinaus wurden in Differential-Display-Ansätzen ein filamentspezifisch exprimiertes Hydrophobin, Hum2 (Bohlmann, 1996), eine Pflanzenspezifisch exprimierte G α -Untereinheit, Gpa4 (Regenfelder et al, 1997), sowie zwei Gene unbekannter Funktion, *dik1* und *dik6* (Bohlmann, 1996) isoliert. Keines dieser Gene ist jedoch für die pathogene Entwicklung von *U. maydis* essentiell.

Obwohl mittels differentieller Methoden ein wertvoller Einblick in das Expressionsprofil während der pathogenen Entwicklung gewonnen wird, führten diese Ansätze offensichtlich nur in wenigen Fällen zur Identifizierung essentieller Pathogenitätsfaktoren. Wahrscheinlich ist die differentielle Regulation einiger Gene eine Konsequenz der veränderten Wachstumssituation (z.B. Nährstoffmangel) des Pilzes in der Pflanze. Möglicherweise sind auch nicht alle Pathogenitätsgene während der pathogenen Entwicklung induziert, oder überhaupt differentiell reguliert. Die Effizienz der differentiellen Methoden für die Identifizierung von Pathogenitätsfaktoren wäre dadurch stark eingeschränkt.

Tabelle 3: Angenommene pilzliche Pathogenitätsfaktoren, isoliert in differentiellen Ansätzen, und ihre Rolle in der Pathogenität.

| Ansatz | Organismus | Genname | Ähnlichkeit | Pathogenität der Disruptanten | Referenz |
|--------|---------------------------------------|--|--|--------------------------------------|--|
| a | <i>Phytophthora infestans</i> | <i>ubi3R</i> <i>calA</i> <i>ipiB</i> <i>ipiO</i> | Ubiquitin Calmodulin (Zellwandprotein?) (sekretiert?) | n.t. n.t. n.t. n.t. | Pieterse et al, 1991 Pieterse et al, 1993 Pieterse et al, 1994 van West et al, 1998 |
| a | <i>Uromyces appendiculatus</i> | <i>inf56</i> | Cytokeratin, Fibronectin | n.t | Xuei et al, 1993 |
| a | <i>Magnaporthe grisea</i> | <i>mpg1</i> <i>uep1</i> | Hydrophobin Ubiquitin Extension Protein | stark reduziert n.t | Talbot et al, 1993 McCafferty and Talbot, 1998 |
| a | <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> | <i>cap20</i> , <i>cap22</i> <i>cap3</i> , <i>cap5</i> | Appressorien- Zellwandproteine Metallothionine | n.t. n.t. | Hwang et al, 1995 |
| b | <i>Ustilago maydis</i> | <i>egl1</i> | Zellulase | kein Effekt | Schauwecker et al, 1995 |
| a | <i>Uromyces fabae</i> | <i>pig1,4</i> <i>pig8</i> <i>pig16</i> <i>pig18</i> <i>pig28</i> <i>pig2,27</i> | Enzyme der Thiaminsynthese Dehydrogenase Cytochrom P450 Chitinase Peptidyl-Prolyl- Isomerase aa-Transporter | n.t. n.t. n.t. n.t. n.t. | Hahn and Mendgen, 1997 Hahn et al, 1997 |
| c | <i>Cladosporium fulvum</i> | <i>ecp1</i> <i>ecp2</i> | (kleine, sekretierte Proteine) | reduziert | Joosten and de Wit, 1988; Laugé et al, 1997; Wubben et al, 1994; |
| d | <i>Ustilago maydis</i> | <i>hum2</i> <i>dik1</i> <i>dik6</i> | Hydrophobin (sekretiert?) (sekretiert?) | kein Effekt | Bohlmann, 1996 |
| d | <i>Ustilago maydis</i> | <i>gpa4</i> | G α -Untereinheit | kein Effekt | Regenfelder et al, 1997 |
| d | <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> | <i>chip1</i> | Ubiquitin- konjugierendes Enzym | n.t. | Liu and Kolattakudy, 1998 |

Ansätze: **a:** differentielles Screening; **b:** subtraktive cDNA-Hybridisierung; **c:** Isolierung *in planta*-produzierter extrazellulärer Proteine; **d:** Differential Display
n.t.: nicht getestet.

1.4.3. Mutagenese-Ansätze zur Identifizierung von Pathogenitätsfaktoren

Mutagenese-Methoden zur Identifizierung von Pathogenitätsfaktoren bieten gegenüber den eingangs erwähnten Ansätzen einige entscheidende Vorteile: Es wird keine *a priori* Annahme über die Rolle bereits bekannter Funktionen benötigt, die Identifizierung von neuen Pathogenitätsfaktoren erfolgt ohne vorformulierte Hypothese. Es können auch schwach oder kurzzeitig exprimierte Gene isoliert werden. Darüber hinaus werden potentielle Pathogenitätsgene ausgehend vom Phänotyp der Disruptanten analysiert, während bei den eingangs aufgeführten Ansätzen der Effekt der Gendisruption erst nach der relativ arbeitsaufwendigen Identifizierung und Isolierung der Kandidaten-Gene analysiert werden kann. Der entscheidende Nachteil dieser Methode ist, daß Gene, für die funktionelle Redundanz besteht, nicht isoliert werden können.

Wichtigste Voraussetzung für die Durchführung eines Mutagenese-Ansatzes zur Identifizierung von Pathogenitätsfaktoren ist, daß der untersuchte Organismus zumindest während der pathogenen Entwicklung haploid ist, da sich nur in diesem Fall auch rezessive Mutationen identifizieren lassen. Für *U. maydis* wurde diese Voraussetzung durch die Konstruktion des haploiden solopathogenen Stammes CL13 erfüllt (siehe 1.3).

Um potentielle Pathogenitätsgene zu identifizieren, wird der Ausgangsstamm mutagenisiert, und die resultierenden Mutantenstämme werden auf ihre Pathogenität überprüft. Jene Stämme, die sich als apathogen erweisen, sind möglicherweise in einem Pathogenitätsgen mutiert. Die weiteren Analysen dienen der Identifizierung des betroffenen Gens und Bestätigung des Phänotyps. Die einzuschlagende Vorgehensweise richtet sich nach der Art der angewandten Mutagenese. Mutanten, die aus einer UV- oder chemischen Mutagenese hervorgegangen sind, werden in der Regel durch genetische Komplementation, z.B. mit einer genomischen Bank analysiert. Diese Analyse ist relativ arbeitsintensiv und zeitaufwendig, da eine große Anzahl an Transformanten erzeugt werden muß, die im Pflanzentest auf Wiederherstellung der Pathogenität zu überprüfen sind. Im Vergleich hierzu kann die Analyse von Mutanten, die aus einer Insertionsmutagenese hervorgegangen sind, erheblich schneller erfolgen, da bei dieser Methode die inserierte Fremd-DNA als Markierung für die genomische Lokalisierung der Mutation dient. Voraussetzung für eine Insertionsmutagenese ist eine effiziente Methode, um Transformanten mit Einzelinsertionen an verschiedenen genomischen Stellen zu erzeugen.

Eine natürlich vorkommende Insertionsmutagenese beruht auf der Aktivität von Transposons. Natürlich vorkommende Transposons können dahingehend modifiziert werden, daß sie stabile Einzelintegrationen an verschiedenen Stellen des Wirtsgenoms erzeugen, und sich somit für eine zufällig angelegte Insertionsmutagenese eignen. Dieser Ansatz wurde in einer Vielzahl von Tier- und Pflanzensystemen verfolgt (Übersicht in Plasterk et al, 1999; Voelker and Dybvig, 1998; Hehl, 1994). In der jüngeren Vergangenheit konnten auch in einigen phytopathogenen Pilzen Transposonmutagenese-Systeme etabliert werden, z.B. in *Fusarium oxysporum* (Langin et al, 1995; Hua-Van et al, 1999), *M. grisea* (Villalba et al, 1999) und *Tolyocladium inflatum* (Kempken et al, 1999). Eine weitere Art der Insertionsmutagenese, die auf einem in der Natur vorkommenden Mechanismus beruht, ist der Transfer von T-DNA

durch *Agrobacterium tumefaciens*. Diese Transformationsmethode wurde zunächst für eine Reihe von pflanzlichen Systemen etabliert (De Block, 1993; Hiei et al, 1994; Ishida et al, 1996), und konnte kürzlich auch für die Transformation einiger filamentöser Pilze verwendet werden (de Groot et al, 1998). Da die Integration der transformierenden DNA in das Zielgenom zufällig erfolgt, lassen sich auf diesem Wege auch Insertionsmutagenesen durchführen (de Groot et al, 1998). *U. maydis* zählt zu jenen Pilzen, in denen bislang keine aktiven transponierbaren Elemente identifiziert werden konnten, bzw. heterologe Ansätze bislang nicht erfolgreich waren (Ladendorf, pers. Mitteilung). Die Möglichkeit der Transformation mittels *A. tumefaciens* ist in diesem System bislang noch nicht getestet worden.

In einigen Pilzen führt die Transformation mit heterologer Plasmid-DNA ebenfalls zur zufälligen Integration in das Genom. Dieser Effekt ließ sich in *Aspergillus nidulans*, *Neurospora crassa*, *Magnaporthe grisea* und *Colletotrichum lindemuthianum* für Insertionsmutagenesen nutzen (Diallinas and Scazzocchio, 1989; Tilburn et al, 1990; Kang and Metzenberg, 1993; Sweigart et al, 1998; Dufresne et al, 1998). In *U. maydis* wird linearisierte Plasmid-DNA an ektopischen Stellen zumeist in mehreren Kopien hintereinander oder an mehreren Orten in das Genom integriert (Wang et al, 1988; Kronstad et al, 1989; Fotheringham and Holloman, 1990). Diese Tendenz zu Mehrfachintegrationen bleibt auch dann bestehen, wenn zirkuläre Plasmid-DNA transformiert wird (Bölker et al, 1995b).

In *S. cerevisiae* wurde eine neue Art der Insertionsmutagenese entwickelt. Hierbei wird ein Restriktionsenzym zum Transformationsansatz gegeben und dies führt zur Integration der transformierenden Plasmid-DNA an entsprechenden genomischen Restriktionsschnittstellen (Schiestl and Petes, 1991; siehe Abb.3). Der molekulare Mechanismus, der diesem Vorgang zugrunde liegt, ist nicht bekannt. Wahrscheinlich gelangt das Restriktionsenzym zusammen mit der transformierenden Plasmid-DNA in den Zellkern und schneidet die genomische DNA an den entsprechenden Restriktionsstellen. Durch Reparaturenzyme werden die komplementären Enden des ebenfalls durch das Enzym geschnittenen Plasmids und der genomischen DNA ligiert, und dadurch die heterologe Integration der Plasmid-DNA herbeigeführt (Riggle and Kumamoto, 1998). In *Dictyostelium discoideum* wurde dieses Phänomen genutzt, um eine Enzym-vermittelte Insertionsmutagenese zu etablieren (Kuspa and Loomis, 1992). Die Technik erhielt den Namen REMI für "Restriction Enzyme-Mediated Integration". Mutagenese-Ansätze zur Identifizierung pilzlicher Pathogenitätsfaktoren wurden in verschiedenen Systemen verfolgt (u.a. *Colletotrichum lindemuthianum*, Dufresne et al, 1998; *Cochliobolus heterostrophus*, Lu et al, 1994; *Mycosphaerella zea-maydis*, Yun et al, 1998). Die umfangreichste Charakterisierung von Pathogenitätsmutanten, die durch Insertions- und REMI-Mutagenese erzeugt wurden, fand im Reis-pathogenen Ascomyceten *M. grisea* statt (siehe Tab.4). Unter den in diesen Ansätzen identifizierten Virulenz- und Pathogenitätsfaktoren finden sich neben regulatorischen Proteinen (Acr1, Pth1, Pth4 und Pth12 in *M. grisea*, Clk1 in *Colletotrichum lindemuthianum*; Tab.4) und Enzymen (Acyl-Transferase Pth2 und neutrale Trehalase Pth9 in *M. grisea*) auch der Membran-Transporter Abc1, ebenfalls in *M. grisea*.

Tabelle 4: Pilzliche Pathogenitäts- und Virulenzfaktoren, identifiziert mittels Insertions- und REMI-Mutagenese

| Ansatz | Organismus | Genname | Ähnlichkeit | Pathogenität der Disruptanten | Referenz | |
|----------------------|--------------------------------------|--------------|--|-------------------------------|----------------------|-----------------------|
| Insertionsmutagenese | <i>M. grisea</i> | <i>acr1</i> | (Transkriptionsfaktor?) | apathogen | Lau and Hamer, 1998 | |
| | | <i>abc1</i> | Membrantransporter | apathogen | Urban et al, 1999 | |
| | <i>Colletotrichum lindemuthianum</i> | <i>clk1</i> | Ser/Threo-Protein-kinase | reduziert | Dufresne et al, 1998 | |
| REMI | <i>M. grisea</i> | <i>pth1</i> | regulator. Protein (GRR1-Homolog, Glukoserepression) | reduziert | Sweigart et al, 1998 | |
| | | <i>pth2</i> | Acyl-Transferase | apathogen | | |
| | | <i>pth4</i> | cPKA | reduziert | | |
| | | <i>pth8</i> | hypothet. Hefeprot. | reduziert | | |
| | | <i>pth9</i> | neutrale Trehalase | reduziert | | |
| | | <i>pth12</i> | Transkriptions-faktor | reduziert | | |
| | | <i>pth11</i> | Membranprotein | reduziert | | DeZwaan et al, 1999 |
| | | <i>pde1</i> | (n.t.) | reduziert | | Balhadère et al, 1999 |
| | | <i>pde2</i> | (n.t.) | reduziert | | |
| | | <i>igd1</i> | (n.t.) | reduziert | | |
| | | <i>gde1</i> | (n.t.) | reduziert | | |
| | | <i>pls1</i> | Tetraspanin | apathogen | Clergeot et al, 2000 | |

n.t.: nicht getestet

1.5. Isolierung apathogener REMI-Mutanten in *U. maydis*

Für die Insertionsmutagenese in *U. maydis* wurde das Plasmid pSMUT konstruiert (Bölker et al, 1995a; siehe Abb.2). Dieses Plasmid trägt keine aus dem *U. maydis* Genom stammenden Sequenzen und kann daher ausschließlich heterolog integriert werden. Für die REMI-Mutagenese wird pSMUT in Anwesenheit des Restriktionsenzym BamHI in den haploiden solopathogenen Stamm CL13 transformiert (Abb.3). pSMUT trägt eine BamHI-Restriktionsschnittstelle und kann somit durch dieses Enzym linearisiert werden (Abb2).

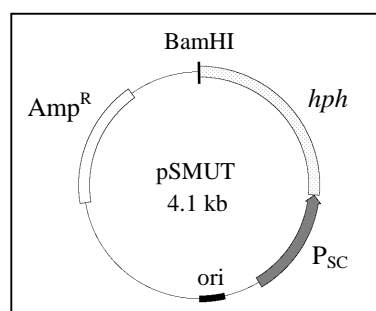


Abb.2: Mutagenese-Plasmid pSMUT. Der bakterielle Replikationsursprung (ori) und die Ampicillin-Resistenzkassette (Amp^r) sind als schwarzes, bzw. offenes Segment dargestellt. Das Hygromycin-Phosphotransferase-Gen (*hph*) wird durch ein schattiertes Segment symbolisiert, das aus *S.cerevisiae* isolierte Fragment mit Promotor-Aktivität in *U. maydis*, das die Expression des *hph*-Gens steuert (P_{sc}), durch einen dunklen Pfeil. Die für die REMI-Mutagenese verwendete BamHI-Schnittstelle ist eingezeichnet.

Durch die Anwesenheit des Restriktionsenzym während der Transformation werden zumeist Einzelintegrationsereignisse herbeigeführt, und in vielen Fällen werden darüber hinaus auf beiden Seiten des integrierten Plasmids die BamHI-Schnittstellen regeneriert (Bölker et al, 1995b). Der Insertionsort von REMI-Mutanten läßt sich mittels Plasmid-Reisolierung ("Plasmid Rescue") klonieren (Abb.3). Hierfür wird genomische DNA der

Mutante z.B. mit dem Restriktionsenzym MluI verdaut, für das pSMUT keine Schnittstelle trägt. Durch nachfolgende Religation und Transformation der DNA-Moleküle in *E. coli* wird das Plasmid isoliert, das pSMUT nebst angrenzender genomischer Bereiche trägt. Für die Bestätigung der Kopplung zwischen Insertionsereignis und Verlust der Pathogenität wird das linearisierte Plasmid in den Ausgangsstamm transformiert. Durch ein doppeltes homologes Rekombinationsereignis entsteht ein Stamm, der die ursprüngliche Insertion von pSMUT im Genom trägt, jedoch keine der eventuell während der REMI-Mutagenese durch die Anwesenheit des Restriktionsenzym verursachten Mutationen (Abb.3). Wenn dieser Stamm im Pflanzentest apathogen ist, belegt dies die Kopplung zwischen Plasmidinsertion und Verlust der Pathogenität.

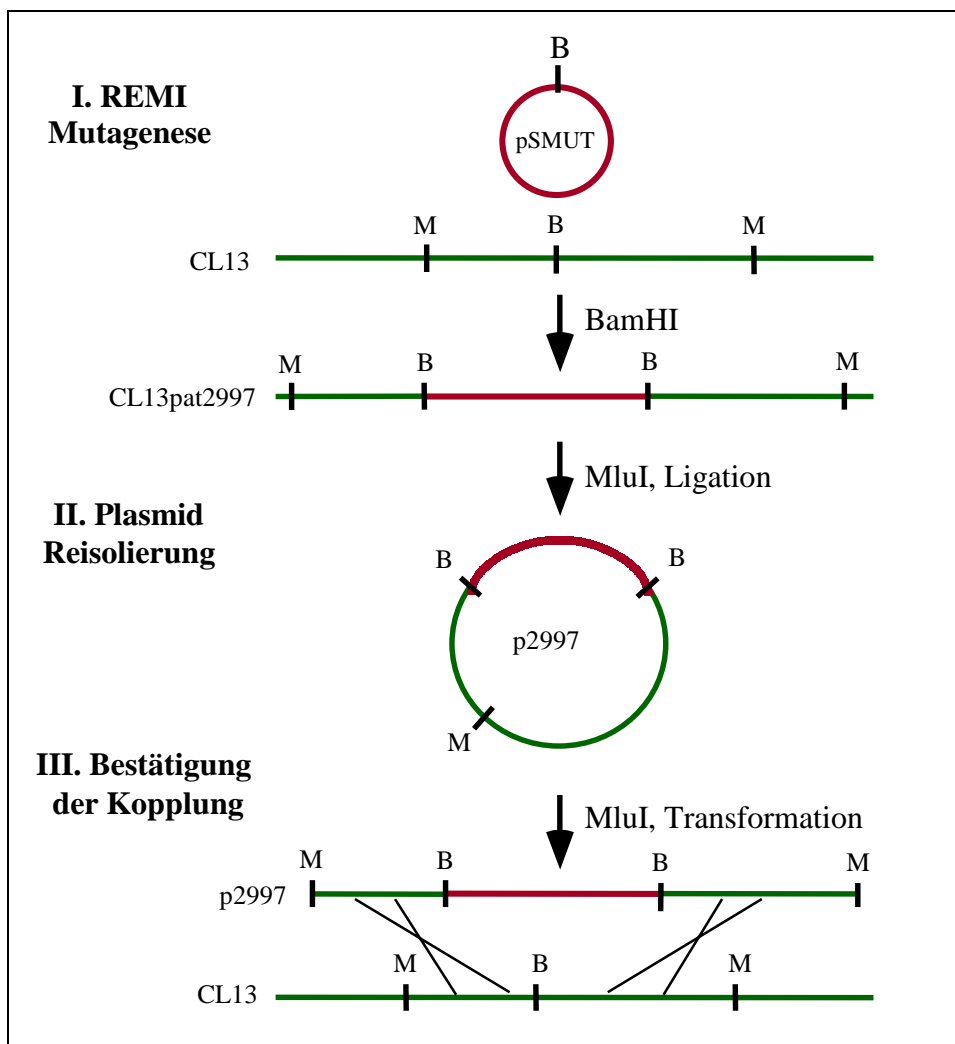


Abb.3: Schematische Darstellung der REMI-Mutagenese und nachfolgender Schritte. **I.** Mutagenese: pSMUT (rot), wird unter Vermittlung des Restriktionsenzym BamHI an einer genomischen BamHI-Schnittstelle des transformierten Stammes CL13 (grün) inseriert. **II.** Plasmid Reisolierung: genomische DNA der Mutante wird mit MluI geschnitten, ligiert und in *E. coli* transformiert. In p2997 sind die an den Insertionsort angrenzenden genomischen Bereiche kloniert. **III.** Bestätigung der Kopplung: p2997 wird mit MluI linearisiert und in CL13 transformiert. Durch homologe Integration wird pSMUT an der gleichen genomischen Stelle wie in CL13pat2997 integriert. Der resultierende Stamm wird auf seine Pathogenität überprüft. Die BamHI- und MluI-Schnittstellen sind durch B, bzw. M symbolisiert.

1.6. Zielsetzung der vorliegenden Arbeit

Mittels REMI-Mutagenese sind in *U. maydis* apathogene Insertionsmutanten des haploiden, solopathogenen Stammes CL13 erzeugt worden. Die Identifizierung und Charakterisierung der in diesen Stämmen betroffenen Gene stellt einen entscheidenden Schritt zum besseren Verständnis der pathogenen Entwicklung dieses phytopathogenen Basidiomyceten dar. Ziel der vorliegenden Arbeit war daher die molekulare Charakterisierung von apathogenen REMI-Mutanten in *U. maydis*. Dies beinhaltet zunächst die Untersuchung der Kopplung zwischen Plasmidinsertion und Pathogenitätsphänotyp. Weiterhin sollte die Analyse der an den Insertionsort angrenzenden genomischen Regionen zur Identifizierung des im jeweiligen Mutantenstamm betroffenen Gens führen. Schließlich sollten über Sequenzvergleiche mit bekannten Genen in der Datenbank, Expressionsanalysen und die lichtmikroskopische Untersuchung des Infektionsverlaufs der Mutantenstämme Anhaltspunkte für die Rolle der jeweiligen betroffenen Genfunktion in der pathogenen Entwicklung des Pilzes gewonnen werden.

2. Ergebnisse

2.1 Teiluntersuchungen von 12 apathogenen REMI-Mutanten

Für die vorgelegte Arbeit wurden 12 Plasmide zur Verfügung gestellt, die aus apathogenen REMI-Mutantenstämmen in CL13 re-isoliert worden waren und die neben dem Plasmid pSMUT die an den Integrationsort angrenzenden Bereiche tragen sollten (K.H. Braun, J.Görl, R.Kahmann, nicht publiziert).

Ziel der zunächst durchgeführten Untersuchungen war es, aus der Sequenzanalyse der an den Integrationsort angrenzenden Bereiche Anhaltspunkte auf das durch die Insertion betroffene Gen zu erhalten. Darüber hinaus wurde für die zu bearbeitenden Mutantenstämme überprüft, ob die Insertion von pSMUT an der jeweiligen genomischen Stelle für den Verlust der Pathogenität verantwortlich ist.

2.1.1. Sequenzanalyse des Integrationsortes

Für die Sequenzanalyse wurden zwei Primer verwendet, mit deren Hilfe die in pSMUT klonierten flankierenden Bereiche gelesen werden können (siehe Abb.4, Methoden). Die ermittelten Sequenzen wurden zunächst im Programm DNA Strider analysiert, um potentielle Leserahmen am Integrationsort zu identifizieren (siehe Methoden). Im Programm Blast (Altschul et al, 1997) wurden die Sequenzen mit in der Datenbank befindlichen DNA- und Proteinsequenzen verglichen, um Ähnlichkeiten zu bekannten Genen zu ermitteln.

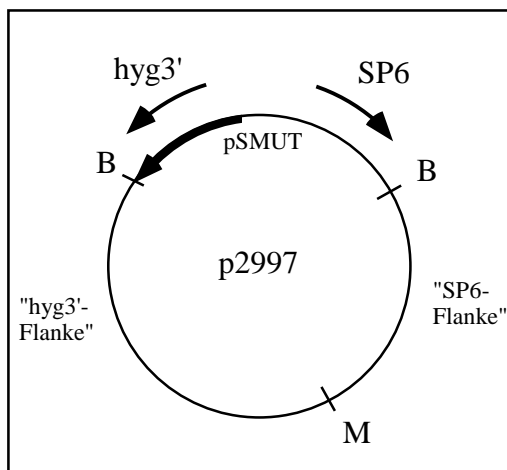


Abb. 4: Schematische Darstellung des aus der REMI-Mutante CL13pat2997 re-isolierten Plasmids mit den flankierenden Bereichen. Die Restriktionsschnittstellen für BamHI (B) und MluI (M) sind eingezeichnet. Das Plasmid wurde durch MluI-Verdau der genomischen DNA des Mutantenstammes, und Ligation der MluI-Enden der beiden Flanken isoliert. Der pSMUT-Anteil befindet sich zwischen den beiden BamHI-Schnittstellen. Die Hygromycin-Resistenzkassette wird durch einen schwarzen Pfeil symbolisiert, Transkriptionsrichtung ist in Pfeilrichtung. Pfeile symbolisieren die Sequenzprimer SP6 und hyg3', mit denen die klonierten Flanken ansequenziert werden können. Die an den Insertionsort angrenzenden genomischen Fragmente, die durch die Re-isolation des Plasmids kloniert wurden, sind als hyg3'-Flanke, bzw. SP6-Flanke bezeichnet.

Die Sequenzanalyse der 12 zur Verfügung gestellten Plasmide ergab für fünf eine signifikante Homologie zu bekannten Genen in der Datenbank, und für sieben ließen sich potentielle Leserahmen (ORFs) erkennen (Tabelle 5). Die Sequenzen sind im Anhang aufgeführt.

Tabelle 5: Zusammenfassung der Ergebnisse der Sequenzanalyse von 12 apathogenen REMI-Mutanten

| Mutante | sequenzierte Länge ¹ | Hinweise auf ORF | Homologien in Datenbank | Kopplung ³ |
|-------------|---------------------------------|-------------------------|---|-----------------------|
| CL13pat2997 | 858bp | ORF über 400bp | keine | bestätigt |
| CL13pat2563 | 572bp | kleine ORFs (100-200bp) | keine | bestätigt |
| CL13pat3050 | 649bp | ORF über 300bp | BimC, <i>Aspergillus nidulans</i> | bestätigt |
| CL13pat3141 | 771bp | durchgehender ORF | keine | bestätigt |
| CL13pat3817 | 863bp | ORF über 300bp | putativer integraler Membrantransporter (<i>Homo sapiens</i>) | bestätigt |
| CL13pat3977 | 663bp | ORF über 550bp | keine | keine Kopplung |
| CL13pat4220 | 587bp | durchgehender ORF | keine | n.t. |
| CL13pat4255 | 398bp ² | kleiner ORF (200bp) | keine | n.t. |
| CL13pat4285 | 1307bp | durchgehender ORF | Casein Kinase II beta Untereinheit | bestätigt |
| CL13pat4339 | 804bp | durchgehender ORF | alpha-Glucosidase | bestätigt |
| CL13pat4366 | 382bp ² | durchgehender ORF | Fettsäure-CoA Ligase | keine Kopplung |
| CL13pat6077 | 645bp | durchgehender ORF | keine | bestätigt |

¹ Beide Flanken sequenziert, sofern nicht gegenteilig angegeben.

² Nur die mit dem Hyg3'-Primer erhaltene Sequenz konnte ausgewertet werden.

³ Bestätigung der Kopplung zwischen Insertion von pSMUT und Verlust der Pathogenität

n.t.: nicht getestet

2.1.2. Auswahl der zu charakterisierenden Stämme

Für die weitere Analyse wurden zunächst die Mutantenstämme CL13pat2997, CL13pat2563 sowie CL13pat3050 ausgewählt, für die zu Beginn dieser Arbeit die Plasmid-Re-isolierung bereits durchgeführt worden war. Die Stämme CL13pat4285, CL13pat4339 und CL13pat4366 wurden aufgrund der Ergebnisse der Sequenzanalyse ausgewählt, da die in diesen Mutanten betroffenen genomischen Bereiche signifikante Ähnlichkeit zu bekannten Genen in der Datenbank aufwiesen, und somit erste Hinweise auf die Funktion der möglicherweise betroffenen Gene bestanden. Der Datenbankeintrag des Membrantransporters aus *Homo sapiens*, der signifikante Ähnlichkeit zu einem Teil der in p3817 klonierten Sequenz besitzt, lag zu Beginn der Arbeit noch nicht vor. Diese Mutante wurde daher zu diesem Zeitpunkt nicht für die nähere Charakterisierung ausgewählt.

2.1.3. Nachweis der Kopplung zwischen Plasmidinsertion und Verlust der Pathogenität

Für den Stamm CL13pat4339 wurde der Nachweis, daß die Plasmidinsertion für den Verlust der Pathogenität verantwortlich ist, mittels Transformation des MluI-linearisierten Plasmids p4339 in CL13 erbracht. Durch ein zweifaches homologes Rekombinationsereignis kann dabei das Mutageneseplasmid pSMUT an derselben genomischen Stelle inseriert werden, wie in der Originalmutante. Um die Integration des Plasmids p4339 am homologen Genort zu überprüfen, wurde die genomische DNA

der Transformanden mit den Restriktionsenzymen NotI und NruI geschnitten und im Southern Blot mit einem 377bp BamHI-NruI-Fragment, das direkt an den pSMUT-Insertionsort angrenzt, hybridisiert. Im Falle des Austausches wurde anstatt der 462bp NotI-NruI-Bande des Ausgangsstammes eine 4,5kb NotI-NruI-Bande, die auch in der Originalmutante CL13pat4339 nachgewiesen wurde, detektiert (Abb.5). Von 15 überprüften Transformanden wiesen 7 die homologe Integration des Plasmids p4339 auf. Im Pflanzentest zeigten die entsprechenden Stämme CL13pat4339R#1, 5, 8, 10, 11, 12, 14 keinerlei Symptome, während alle Transformanden, die p4339 ektopisch inseriert hatten, und daher im Southern Blot die Wildtypbande aufwiesen, voll pathogen waren (nicht gezeigt). Dieses Ergebnis belegte die Kopplung zwischen der Insertion von pSMUT in CL13pat4339 und dem Verlust der Pathogenität dieses Stammes.

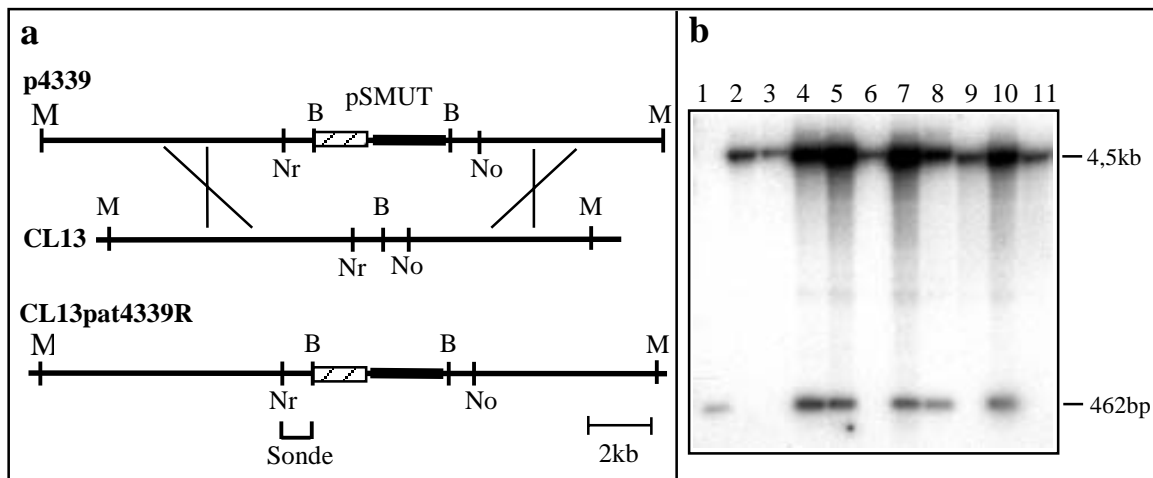


Abb. 5: Erstellen der CL13pat4339R-Stämme für den Nachweis der Kopplung zwischen Plasmidinsertion und Pathogenitätsverlust. **a:** Transformation des linearisierten Plasmids p4339 in CL13. Der pSMUT-Anteil in p4339 ist eingezeichnet, der schraffierte Anteil symbolisiert die Hygromycin-Resistenzkassette. Darunter der entsprechende genomische Locus in CL13. Bereiche, über die eine homologe Rekombination stattfinden kann, sind durch Kreuze symbolisiert. Die Restriktionsstellen für BamHI (B), MluI (M), NotI (No) und NruI (Nr) sind eingezeichnet. Unten die genomische Organisation des resultierenden Stammes CL13pat4339R. Die in der Southern Analyse der Transformanden verwendete Sonde ist eingezeichnet. **b:** Southern Analyse der Transformanden. Spur1: CL13. Spur2: CL13pat4339. Spuren 3-11: Transformanden#1,2,4,5,6,7,8,9,10. Für Transformanden#1,5,8,10,11,12 und 14 (Spuren 3,4,7,10,12-14 und 16) wird anstelle der 462bp-NotI-NruI-Bande die 4,5kb Bande des Fragmentes mit pSMUT-Insertion detektiert.

Auf dem gleichen Weg ließ sich für CL13pat2997 die Kopplung zwischen Plasmidinsertion und Verlust der Pathogenität bestätigen. Dieser Nachweis wurde von K.H.Braun und J.Görl durchgeführt. Der nach der Transformation des linearisierten Plasmids p2997 in CL13 durch homologe Rekombination gewonnene Stamm CL13pat2997R (nicht gezeigt), der das Insertionsereignis des ursprünglichen Mutantenstammes trägt, zeigte im Pathogenitätstest keinerlei Symptome (K.H. Braun, J. Görl, R. Kahmann, pers. Mitteilung), dh.h. auch hier liegt Kopplung vor.

Für die Stämme CL13pat3141, CL13pat3817, CL13pat5133, CL13pat6077, sowie CL13pat7635, die im Rahmen dieser Arbeit nicht näher analysiert wurden, erbrachten K.H. Braun und J. Görl den Nachweis der Kopplung zwischen Insertionsereignis und Verlust der Pathogenität ebenfalls durch Rück-Transformation des linearisierten Plasmids der jeweiligen Mutante in CL13 und nachfolgende Bestätigung des

apathogenen Phänotyps. Im Gegensatz dazu zeigte der nach Transformation des linearisierten Plasmids p4366 in CL13 durch homologe Rekombination gewonnene Stamm CL13pat4366R (nicht gezeigt) im Pflanzentest Tumorentwicklung und Anthocyanfärbung (nicht gezeigt). Dies deutet darauf hin, daß ein weiteres Mutationsereignis im Stamm CL13pat4366 erfolgt sein muß, das von der Plasmidintegration unabhängig für den Verlust der Pathogenität verantwortlich ist. Dieser Stamm wurde daher nicht weiter bearbeitet.

Für die Stämme CL13pat2563 und CL13pat3050 konnten nach Transformation der linearisierten Plasmide p2563, bzw. p3050 in CL13 keine Transformanten identifiziert werden, die in der Southern Analyse das Hybridisierungsmuster der Ausgangsmutante aufwiesen (nicht gezeigt). Für diese Mutantenstämme wurde daher Kopplung zwischen Insertion und Pathogenitätsverlust mittels Komplementation erbracht (2.3. bzw. 2.4.).

Für den Stamm CL13pat4285 wurde der Nachweis, daß das in der Sequenzanalyse identifizierte Gen für die pathogene Entwicklung essentiell ist, durch Insertion der Hygromycin-Resistenzkassette in einen konservierten Bereich des Gens erbracht (2.5.).

2.2. Charakterisierung der Mutante CL13pat2997

Basierend auf den in den Anfangsuntersuchungen gewonnenen Sequenzinformationen der in p2997 klonierten flankierenden Bereiche sollte zunächst das in CL13pat2997 betroffene Gen identifiziert werden.

2.2.1 Charakterisierung des in CL13pat2997 betroffenen Gens mittels Northern Analyse

Da die Sequenzanalyse des unmittelbaren Integrationsortes des Stammes CL13pat2997 einen potentiell durch die Insertion betroffenen Leserahmen von etwa 450bp Länge erkennen ließ, sollte mittels Northern Analyse überprüft werden, ob dieser vermutete Leserahmen für ein Transkript kodiert. Zu diesem Zweck wurde zunächst ein in diesem Leserahmen gelegenes 300bp BamHI-HindIII Fragment radioaktiv markiert und im Northern Blot als Sonde eingesetzt. Hierbei wurde die RNA des Ausgangsstammes CL13 mit der aus CL13pat2997 isolierten verglichen (Sonde 2997-1, Abb.6). Für die RNA-Isolation wurden die Stämme 48h auf CM-Aktivkohle-Platten kultiviert (siehe Methoden). Die Sonde 2997-1 ergab kein deutliches Hybridisierungssignal, d.h. es gab keinen Hinweis auf ein im Stamm CL13p2997 betroffenes Transkript (nicht gezeigt). Dieses Ergebnis könnte bedeuten, daß das entsprechende Gen auf CM-Aktivkohle-Platten nicht exprimiert wird. Alternativ bestand die Möglichkeit, daß sich das durch die Insertion betroffene Gen an einer anderen Stelle in diesem genomischen Bereich befand. Um letztere Möglichkeit zu überprüfen, wurde ein 690bp XhoI Fragment aus der anderen Flanke gewählt (Sonde 2997-2, Abb.6). Das Fragment 2997-2 hybridisierte mit einem stark exprimierten Transkript in CL13, das in CL13pat2997 fehlte (Abb.7). Offensichtlich liegt diese Sonde innerhalb des transkribierten Bereichs des in CL13pat2997 durch die Insertion betroffenen Gens.

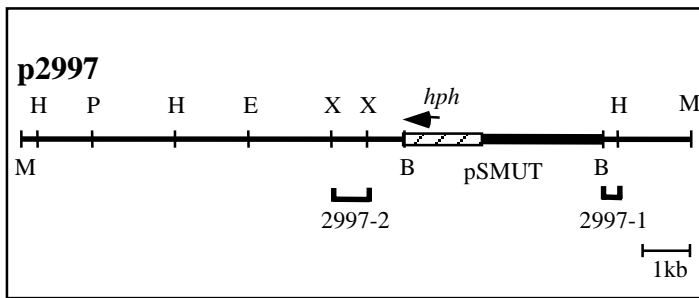


Abb. 6: Restriktionskarte von p2997. Die Restriktionsschnittstellen für BamHI(B), EcoRI(E), HindIII(H) MluI (M), PstI(P), XhoI(X) sind eingezeichnet. Das REMI-Plasmid pSMUT sind als schwarzer Balken, bzw. schraffiertes Rechteck dargestellt. Die in der Northern Analyse verwendeten Sonden sind eingezeichnet.

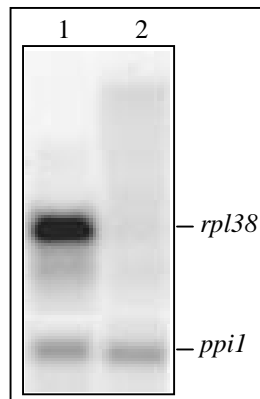


Abb. 7: Northern Analyse von CL13 und CL13pat2997. Die Stämme wurden vor der RNA-Extraktion auf dCM-Aktivkohle-Platten kultiviert. Als Sonde wurde das Fragment 2997-2 (siehe Abb.6) verwendet. In CL13 hybridisiert dieses Fragment an ein stark exprimiertes Transkript, das in CL13pat2997 fehlt. Die Hybridisierung mit dem konstitutiv exprimierten Gen der Peptidyl Prolyl Isomerase (*ppiI*) dient als Kontrolle der aufgetragenen RNA-Mengen.

Um den durch die Insertion betroffenen genomischen Bereich zu isolieren, wurde eine Cosmidbank des Stammes FBD11 durchmustert. Hierfür wurde das 10kb-große BamHI-Fragment des Plasmids p2997, das den gesamten in diesem Plasmid klonierten flankierenden Bereich beinhaltet, als Sonde verwendet. Dadurch wurden die Cosmidklone 9F11 und 27A8 identifiziert. Beide Klone enthalten das 10kb-große MluI-Fragment, das den in p2997 klonierten Flanken der Insertionsstelle entspricht (nicht gezeigt). Dieses MluI-Fragment wurde aus dem Cosmid 27A8 isoliert und im Plasmid pPat1#8 kloniert (siehe Material und Methoden). Die Sequenzanalyse des genomischen Bereichs, der das als Sonde verwendete Fragment 2997-2 umfaßt, führte zur Identifizierung des durch die Plasmidinsertion betroffenen Leserahmens (Abb.8). Die Distanz zwischen der Insertionsstelle und dem identifizierten Leserahmen, der nicht mit einem Methionin beginnt, betrug 821bp. Wie in Abb.8 ersichtlich, hat das REMI-Insertionsereignis in CL13pat2997 im Promotor des betroffenen Gens, 79bp vom eigentlichen Translationsstart entfernt, stattgefunden. Zwischen dem Translationsstart und dem restlichen Leserahmen des Gens befindet sich jedoch ein Intron von 739bp Länge, das aufgrund der bekannten konservierten Konsensussequenzen für Introndonor- und -akzeptorstellen filamentöser Pilze identifiziert werden konnte (Ballance, 1990). Der Leserahmen ist 246bp lang und codiert für 82 Aminosäuren (Abb.8). Der entsprechende cDNA-Klon, prpl38c-8, konnte aus einer λ ZAPII-Bank des Stammes FB1 isoliert werden (Hartmann, 1997). Die Sequenzanalyse des Plasmids prpl38c-8 bestätigte die anhand der genomischen Sequenz vorhergesagten Introndonor- und -akzeptorstellen. Die Länge der cDNA ist in Abb.8 durch Pfeilspitzen über der Sequenz angegeben.

| | |
|---|------|
| GGAAAAAGAGTGCATCACAAAGCTCTATTTCGCGAGGCAGCGTTTCAGTTGAAACTGCGGGCACTGCTTCAGAAGAGTTGACA | 80 |
| GCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGAGTGTAAATTGTTGGCAAGGAAAGCTGACAGGAGAAACCGCGAGAGACAGGTCGGGGAC | 160 |
| BamHI | |
| GGCAGCTGGTTTTGCGCGGATCCAGTGAGTACAGCTCGTCGACATCAATCTCTCCTTCCATCTCTACAGGAACACCTCACC | 240 |
| ACACAAAGAGATCCGTC AAGATGGTAAGCATCAGCATCGACAACAGCATAACGTAATACAGTACAGCACACCGGATTCGGT | 320 |
| M | |
| ATTCGATACTCCGGCTCAGCATTGCACGACGTCCACGAGTCAAAAAGAGAAGCAGAGAGGAGAGGACATTTTCGTAAAC | 400 |
| ATTTCGATATCTTGAAGAGCCCGACTTTGATGAGAACGCATGTATGACGAAACACCTTCAGCGATTTATGACCGTCCGTCCA | 480 |
| TTACCGTGTCAAAGGCAGAACGCTACAGCACAGTTCGAAGCAACCTCGACTCGGTTGATACTTGGTAGATAAGAGAAGCT | 560 |
| ACGCAGTTTGGGCTCTCTGGACGCAATATGGAAGCAAAGGTGTTTCGCCATCGTCACAATCCTAGTTGGCAAAGTCAAAGGC | 640 |
| CGGTATCTCGGATGGACGACGAGTGGGCACGATAGTTTCATATTAAGTGATCACATGTGGGGATGCGGTGTTCTCATGAA | 720 |
| TCGCTTCGACATGGTATCGCCAACACTCGGATCACAACAGAGCAGGGATAATGCGTACCCGCCTGCGAGCGAAATGTTT | 800 |
| AGACTGCGGAGGTGACGCATCCTCTGGAAGCTAGCTTGGATTGGATCGGTTCCGCACCTCTCGGCAATGTCTCACAAAATG | 880 |
| CACCCCTTTGCTTCTCTCGACACCGCTACTTGGCGTTGCTTTGCCAAGCTGCACTGTTATGCATTTACGAAACAGCTCAT | 960 |
| TCTGACCTATCTGTTGCTCTCGCATTGACCAACTTCCCAACAGCCTCAGCAGATTACCGACATCAAGAAATTCCTCGAGA | 1040 |
| P Q Q I T D I K K F L E I | 14 |
| TTGCTCGCAGAAAGGACGCTTCGGCGGCCCGCTCAAGAGCACCACCGTGCTGACGGCAAGCAGGTACCAAGTTCAAG | 1120 |
| A R R K D A S A A R V K S T T R A D G K Q V T K F K | 40 |
| ATCCGATGCTCGCGCTTCTCTACACCCTCTCGGTCGACGACAAGCAGAAGGCTGAGAAGCTCAAGCAGTTCGCTTCCCC | 1200 |
| I R C S R F L Y T L S V D D K Q K A E K L K Q S L P P | 67 |
| TGGTCTCAACGTTGTTGAGATCGGCAAGCCCGTCAAGGGCCGCAAGTAAATACCTTGCAGCTGCCGATCCTCGACACAAC | 1280 |
| G L N V V E I G K P V K G R K * | 82 |
| CTTGTAACAACAACCAGCATCACCCAATATGACATCCTTCATTTCCACCAACGCCTGGCCTTTGCCTCGAATACGCATC | 1360 |
| AGTCTTGCAATCAAGACAATGACTCTTGATTGGCACAGCATCGCAGCCTAGCCCATCGGATCAGCACCTGTTTCGCGTTTT | 1440 |
| TTCATCCTTAACCCAAAAGCCCACTCATCATGGGTAACCAAGGGGTTCATCATCAACCCGTTGTATAATTTCTCCATTGGC | 1520 |
| TCACAACCTCGCACACCCTGCACCCTTGATCAAGGTGTTCAAATTTGATCATTCGTAAGCACAGTTGCCAAAACCTGGC | 1600 |
| GGTCCAGTTGAGTCGCTGCGGGGATGCGCGGTAGAGTGTGTCTGAGAAGTCGGATTCCGAGTTTGAAAAGGCATAGGAC | 1680 |
| ACGAGTATAGCAAACGACCTCGTCGACAGAGACACAGGGGCTCGAGCGGGATGTTACGACTTCGGACAACGAAACTCG | 1760 |

Abb. 8: DNA Sequenz und abgeleitete Aminosäuresequenz des *rpl38* Gens und der flankierenden Bereiche. Beginn und Ende der cDNA sind durch Pfeile symbolisiert. Die Aminosäuresequenz des potentiell translatierten Bereichs ist angegeben, die BamHI-Insertionsstelle des REMI-Plasmids ist unterstrichen.

Die Homologiesuche in der Datenbank ergab für die ermittelte Aminosäuresequenz 64% Identität und 80% Ähnlichkeit zu dem ribosomalen Protein L38 aus der *Schizosaccharomyces pombe*. Das in der Mutante CL13pat2997 betroffene Gen wurde mit *rpl38* (für ribosomales Protein L 38) bezeichnet. Die Sequenzanalyse der weiteren genomischen Umgebung des *rpl38*-Gens ließ einen benachbarten potentiellen Leserahmen erkennen (Abb. 9): Der 3' von *rpl38* befindliche Leserahmen wurde teilweise sequenziert. Die von 700bp ermittelter Sequenz abgeleitete Aminosäuresequenz weist 35% Identität und 51% Ähnlichkeit zur Ribonuklease M aus *Aspergillus phoenicis* auf (Sequenz im Anhang). Dieses putative Gen wurde mit *rse11* (für Ribonuklease) bezeichnet.

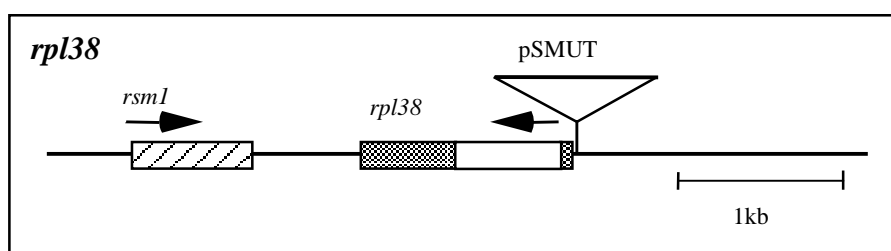


Abb. 9: Schematische Darstellung der Gene im *rpl38* Locus. Die identifizierten Leserahmen sind als Rechtecke dargestellt. Das in *rpl38* befindliche Intron wird durch den offenen Teil des Rechtecks symbolisiert. Der Insertionsort von pSMUT in CL13pat2997 ist angedeutet. Der 3' von *rpl38* identifizierte ORF besitzt Ähnlichkeit zur Ribonuklease M aus *Aspergillus phoenicis* und wurde *rse11* bezeichnet.

2.2.2. Deletion von *rpl38* in CL13, FB1 und FB2

Da die Insertion in CL13pat2997 offensichtlich im Promotor des *rpl38*-Gens erfolgt war, und somit möglicherweise nicht zum kompletten Ausfall der Genfunktion führte, sollte nun die Auswirkung einer vollständigen Deletion des Gens auf Wachstum und pathogene Entwicklung analysiert werden. Null-Mutanten wurden in CL13, sowie den haploiden Stämmen FB1 (*a1b1*) und FB2 (*a2b2*) hergestellt.

Zu diesem Zweck wurde das Plasmid p $\Delta rpl38$ konstruiert, bei dem der Leserahmen von Aminosäure 12 bis 68 durch eine Hygromycin-Resistenzkassette ersetzt wurde (siehe Methoden und Abb.10a). Das Plasmid wurde mit HpaI im Vektoranteil linearisiert und in CL13, FB1 und FB2 transformiert. Durch ein zweifaches Rekombinationsereignis kann dabei das genomische *rpl38*-Gen durch das veränderte Allel ersetzt werden. Um den homologen Austausch des Gens durch das $\Delta rpl38$ -Allel zu überprüfen, wurde die genomische DNA der Transformanden mit dem Restriktionsenzym XhoI geschnitten und in der Southern Analyse mit einem 547bp Sall-Fragment, das einen Teil des *rpl38*-Gens und dessen 3' Bereich enthält, hybridisiert. Im Falle des Austausches wurde anstatt der 687bp XhoI-Bande des intakten Gens eine ca. 6kb XhoI-Bande detektiert (Abb.10b).

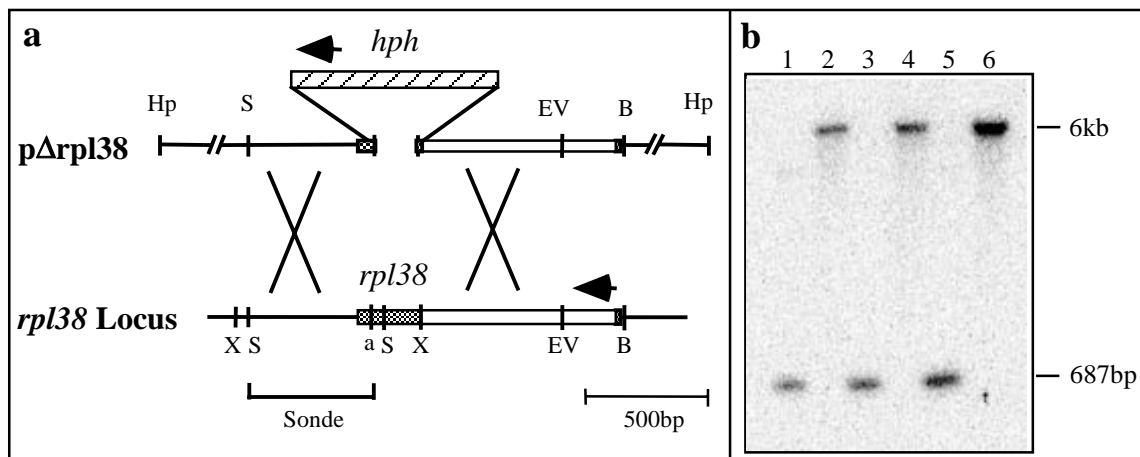


Abb. 10: Konstruktion der *rpl38* Nullmutanten. **a:** In dem Deletionskonstrukt p $\Delta rpl38$ (oben) wurde der Leserahmen von Aminosäure 12 bis 68 durch die Hygromycin-Resistenzkassette ersetzt. Darunter ist die genomische Organisation des *rpl38* Gens dargestellt. Der offene Teil des Rechtecks symbolisiert das Intron. Die Bereiche, über die homologe Rekombination erfolgen kann, sind durch Kreuze angedeutet. Die Schnittstellen der Restriktionsenzyme BamHI(B), BsaI(a), EcoRV(V), HpaI(Hp), Sall(S) und XhoI(X) sind eingezeichnet. Die unterbrochene Linie stellt den Klonierungsvektor dar. Die in der Southern Hybridisierung verwendete Sonde ist eingezeichnet. **b:** Southern Analyse der *rpl38* Nullstämmen. p $\Delta rpl38$ wurde mit HpaI linearisiert und in die Stämme CL13, FB1 und FB2 transformiert. Aus den Ausgangsstämmen (FB1, Spur1; FB2, Spur3; CL13, Spur5), sowie den Nullstämmen (FB1 $\Delta rpl38$: Spur2, FB2 $\Delta rpl38$: Spur4 CL13 $\Delta rpl38$: Spur6) wurde genomische DNA isoliert, mit XhoI geschnitten und auf einem 1% Agarosegel aufgetrennt. Nach dem Transfer der DNA-Fragmente auf eine Nylonmembran wurde der Filter mit dem 547bp Sall-Fragment (Abb.5) hybridisiert. In den Nullstämmen hybridisiert anstelle des 687bp XhoI-Fragmentes ein 6kb Fragment.

Das *rpl38*-Gen konnte in allen drei verwendeten Stämmen ersetzt werden. Für FB1 ließ sich unter 10 überprüften Transformanden einer identifizieren, der die Integration des Nullallels am homologen Genort aufwies, für FB2 waren es drei unter 26, und für CL13 einer unter 15. *rpl38* ist somit nicht essentiell für das Überleben von *U. maydis*. Um

festzustellen, ob der Verlust der *rpl38*-Funktion das Wachstum entsprechender Stämme beeinträchtigt, wurden für CL13 und CL13 Δ *rpl38* die Generationszeiten in Minimalmedium bestimmt. Hierbei ergab sich für CL13 Δ *rpl38* mit 3.6h eine deutlich langsamere Wachstumsgeschwindigkeit als für CL13, der nur 3h pro Verdoppelung benötigt.

Die Nullstämme wurden anschließend auf ihre Pathogenität überprüft. Hierbei zeigte sich, daß der Stamm CL13 Δ *rpl38* apathogen war, d.h. die komplette Deletion des Gens führte wieder zum gleichen Pathogenitätsphänotyp wie die Promotorinsertion in der REMI-Mutante CL13pat2997. Im Gegensatz dazu wurde nach Kreuzung der beiden Stämme FB1 Δ *rpl38* und FB2 Δ *rpl38* eine im Vergleich zu den Wildtyp-Stämmen reduzierte Pathogenität beobachtet. Die *rpl38*-Nullstämme induzierten in den infizierten Pflanzen weniger Tumore (Tab.6), die sich in der Größe jedoch nicht signifikant von den Wildtyp-Tumoren unterschieden.

Tabelle 6: Pathogenitätstest der *rpl38*-Mutantenstämme

| Inokulum | n | % Tumore |
|---|----|----------|
| CL13 | 19 | 73 |
| CL13pat2997 | 20 | 0 |
| CL13 Δ <i>rpl38</i> | 20 | 0 |
| FB1 x FB2 | 51 | 96 |
| FB1 Δ <i>rpl38</i> x FB2 Δ <i>rpl38</i> | 60 | 28 |

n = Anzahl infizierter Pflanzen

Dies zeigt, daß der Ausfall der *rpl38*-Genfunktion, der im Stamm CL13 Δ *rpl38* zum völligen Verlust der Pathogenität führt, in dem aus der Fusion der beiden Stämme FB1 Δ *rpl38* und FB2 Δ *rpl38* hervorgegangenen Dikaryon nur die Häufigkeit, mit der Tumore an infizierten Pflanzen entstehen, reduziert.

2.3. Charakterisierung der Mutante CL13pat2563

Da bei Rücktransformation des Plasmids p2563 in CL13 unter 12 überprüften Transformanten keine identifiziert werden konnte, in der ein homologes Rekombinationsereignis erfolgt war (nicht gezeigt), sollte der Beweis, daß die Plasmidinsertion an dieser Stelle im Genom mit dem Verlust der Pathogenität gekoppelt war, mittels Komplementationsanalyse erbracht werden.

2.3.1. Nachweis der Kopplung zwischen Insertion und Pathogenitätsverlust mittels Komplementation

Zu diesem Zweck wurden zunächst aus der Cosmidbank die Cosmide isoliert, die den in der Mutante CL13pat2563 durch die Insertion betroffenen Bereich trugen. Das Plasmid p2563, mit dem die flankierenden Fragmente kloniert worden waren, wies nur eine der beiden BamHI-Schnittstellen auf, die bei der Integration des Vektors in das Genom regeneriert werden können (siehe Sequenz im Anhang). Da dies ein Anzeichen für ein genomisches Deletionsereignis gekoppelt mit Reparatursynthese sein kann, wurden für die Hybridisierung der Cosmidbank zwei Fragmente als Sonden gewählt, von denen eines von der *hyg3'*-Seite des inserierten pSMUT, und das andere von der SP6-Seite des Plasmides stammten. Als Sonden dienten ein ca. 600bp MluI-PstI-Fragment, das etwa

730bp von der Insertionsstelle entfernt auf der SP6-Seite von pSMUT lag, und ein 400bp MluI-PstI-Fragment, das etwa 800bp von der Insertionsstelle auf der hyg3'-Seite von pSMUT lag (Fragmente 2563-1 und 2563-2, Abb.11).

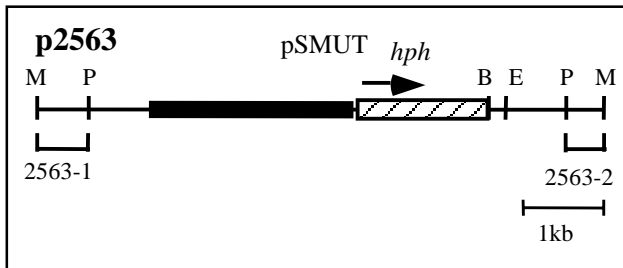


Abb. 11: Restriktionskarte von p2563. Die Schnittstellen der Restriktionsenzyme BamHI(B), EcoRI(E), MluI(M) und PstI(P) sind eingezeichnet. Das REMI-Plasmid pSMUT sowie die darauf befindliche Hygromycin-Resistenzkassette sind als schwarzer Balken, bzw. schraffiertes Rechteck dargestellt.

Die getrennte Hybridisierung der Fragmente 2563-1 und 2563-2 gegen die Cosmidbank führte zur Identifizierung von fünf Cosmiden, die den genomischen Bereich des Insertionsortes beinhalten. Jeder der fünf identifizierten Cosmid-Klone 5B5, 7D5, 14F1, 14G9 und 14H10 zeigte im Southern Blot ein Signal mit beiden verwendeten Sonden (nicht gezeigt), somit war eine größere genomische Deletion auszuschließen. Wie die spätere Analyse der genomischen Sequenz am Insertionsort ergab, war bei der Erzeugung der Mutante CL13pat2563 keine Deletion erfolgt. Die BamHI-Schnittstelle an der SP6-Flanke war nicht regeneriert worden, da es zur Deletion eines Guanin in der BamHI Erkennungssequenz GGATCC gekommen war (siehe Anhang). Vermutlich wurde diese Base am überhängenden Ende der BamHI-geschnittenen genomischen DNA abgebaut, bevor das linearisierte pSMUT an dieser Stelle integriert werden konnte.

Für die Bestätigung der Kopplung zwischen Plasmidinsertion und Pathogenitätsverlust wurden die fünf Cosmid-DNAs in die Originalmutante pat2563 transformiert und die erhaltenen Transformanden auf ihre Pathogenität überprüft (Tab.7).

Tabelle 7: Komplementationsanalyse des Stammes CL13pat2563 mit Cosmiden und Subklonen

| in CL13pat2563 transformiertes Cosmid bzw. Plasmid | getestete Transformanden* | pathogene Transformanden |
|--|---------------------------|--------------------------|
| 5B5 | 5 | keine |
| 7D5 | 3 | 2 |
| 14F1 | 11 | 10 |
| 14G9 | 11 | 8 |
| 14H10 | 4 | 1 |
| pCompEV | 3 | 3 |
| pCompB | 5 | keine |
| pCompC | 4 | 2 |
| pCompD | 5 | 3 |
| pComp878 | 5 | 2 |
| pComp442B | 3 | 3 |
| pComp800R | 8 | 5 |

*Cosmid-Transformanden: je 4 Pflanzen infiziert;

pComp-Transformanden: je 20 Pflanzen infiziert

Die in den oberen fünf Spalten von Tabelle 7 zusammengefaßten Daten belegen, daß der Pathogenitätsdefekt des Stammes CL13pat2563 durch die Cosmide 7D5, 14F1 und

14G9, die den durch die Plasmidinsertion betroffenen genomischen Bereich beinhalten, komplementiert werden kann. Dieses Ergebnis bestätigt, daß die Insertion in dieser REMI-Mutante mit dem Verlust der Pathogenität gekoppelt ist.

Das Cosmid 5B5 war nicht in der Lage, den Pathogenitätsdefekt zu komplementieren. Offensichtlich beinhaltet der in diesem Cosmid enthaltenen Bereich nicht die vollständige, für die Wiederherstellung der Pathogenität benötigte Sequenz.

Da die anfänglich durchgeführte Sequenzanalyse des Plasmids p2563 keine Hinweise auf einen in der Mutante betroffenen Leserahmen erbracht hatte (siehe Tab.7 und Anhang), war zunächst der in der Analyse der Mutante CL13pat2997 aufschlußreiche Ansatz verfolgt worden, mittels Northern Hybridisierung einen Anhaltspunkt auf das in der Mutante betroffene Transkript zu erhalten. Zu diesem Zweck wurden die Fragmente 2563-1 und 2563-2 als Sonden in Northern Analysen eingesetzt, in denen die aus CL13 isolierte RNA mit der aus CL13pat2563 isolierten RNA verglichen wurde. In dieser Analyse ließ sich jedoch kein hybridisierendes Transkript detektieren (nicht gezeigt).

2.3.2. Identifizierung des in CL13pat2563 betroffenen Gens mittels Komplementationsanalyse

Nachdem weder die Sequenzanalyse, noch die Northern Analyse Hinweise auf das in CL13pat2563 betroffene Gen erbracht hatten, wurde die Komplementationsanalyse mit kleineren Subklonen, die aus dem Cosmid 14F1 isoliert wurden, weitergeführt, um den komplementierenden Bereich einzugrenzen.

Durch Southern Analyse des Cosmids 14F1 mit den Fragmenten 2563-1 und 2563-2 als Sonden wurde das 5,5kb EcoRV-Fragment ermittelt, das den Insertionsort enthielt (nicht gezeigt). Dieses 5,5kb EcoRV-Fragment wurde isoliert und in den Vektor pCX2 kloniert, der eine Carboxin-Resistenzkassette trägt. Das resultierende Konstrukt, pCompEV, wurde in den Stamm CL13pat2563 transformiert und komplementierte den Pathogenitätsdefekt (siehe Tab.7). Die Sequenzanalyse des gesamten in pCompEV klonierten Bereichs ergab zunächst keinen Hinweis auf ein in CL13pat2563 durch die Insertion betroffenes Gen (Sequenz siehe Anhang). Bereiche des EcoRV-Fragments wurden daraufhin im Vektor pCX2 subkloniert, und in die Mutante CL13pat2563 transformiert (Abb.12). Der Pathogenitätstest zeigte, daß auch diese Subklone pCompC und pCompD den Pathogenitätsdefekt komplementieren konnten. Da diese beiden Fragmente in einem 878bp (EcoRI-HindIII)-Bereich überlappten, wurde dieses Teilstück kloniert und auf seine Fähigkeit zur Komplementation überprüft. Erwartungsgemäß konnte das resultierende Konstrukt, pComp878, die Pathogenität wiederherstellen (Abb.12, Tab.7). Die DNA-Sequenz des komplementierenden Fragmentes ließ einen potentiellen Leserahmen von 270bp Länge erkennen (Abb.13). Daher wurde in pComp442B dieser Bereich kloniert, von der genomischen EcoRI-Schnittstelle, die sich 164bp stromaufwärts des putativen Translationsstarts befindet, bis zur BsaI-Schnittstelle die sich unmittelbar hinter dem Stop-Codon des potentiellen Leserahmens befindet (Abb.12). Der im Plasmid pComp800R klonierte Bereich beinhaltet ebenfalls den potentiellen Leserahmen, allerdings wurde der Bereich 3' vom potentiellen Leserahmen auf 86bp verkürzt, bis zu einer genomischen EheI-Schnittstelle

(Abb.12). Die beiden Plasmide haben somit nur das Fragment gemeinsam, auf dem sich der potentielle Leserahmen befindet (Abb.12 und 13).

Der Pathogenitätstest der mit diesen Plasmiden erzeugten Transformanten zeigte, daß beide Konstrukte in der Lage sind, den Pathogenitätsdefekt in CL13pat2563 zu komplementieren. Der putative Leserahmen, der sich auf dem überlappenden Bereich der Plasmide pComp442B und pComp800R befindet, wurde daher mit *pat2563* bezeichnet.

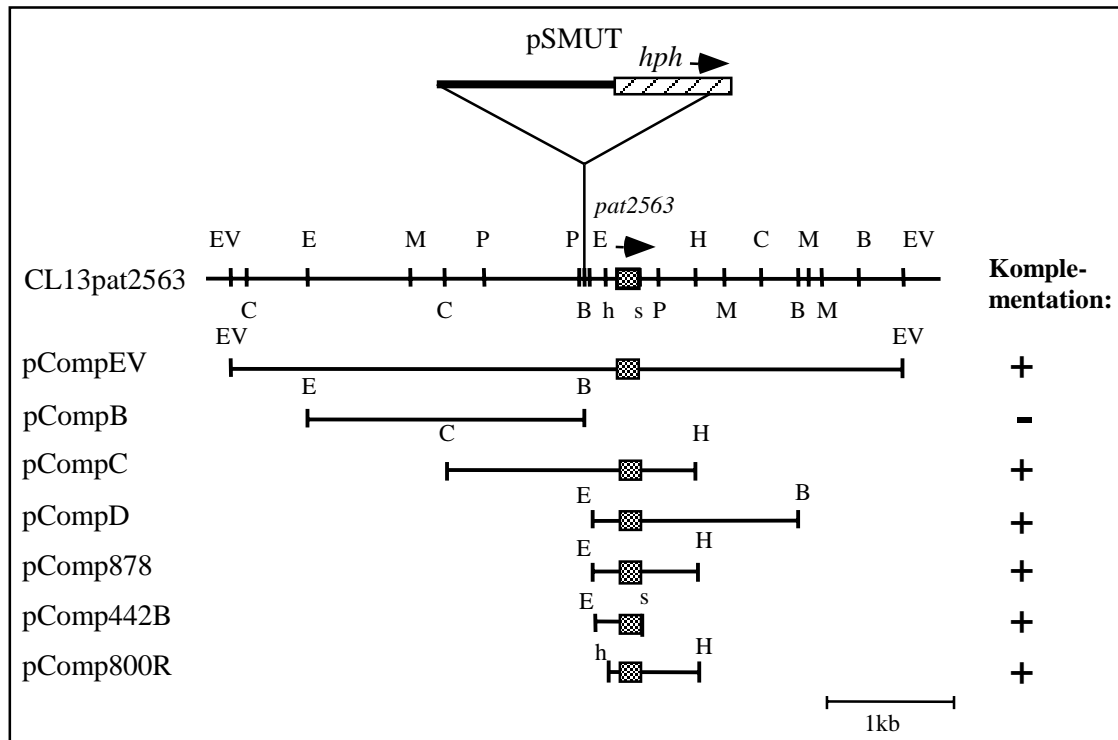


Abb.12: Schematische Darstellung des *pat2563*-Locus sowie der für die Komplementationsanalyse des Stammes CL13pat2563 verwendeten Subklone. Die Schnittstellen der Restriktionsenzyme BamHI(B), BsaI (s), ClaI(C), EcoRI(E), EcoRV(V), EheI (h) HindIII(H), MluI(M) und PstI(P) sind eingezeichnet. Die Insertionsstelle von pSMUT in CL13pat2563 ist angedeutet. Der mit *pat2563* bezeichnete Leserahmen ist durch ein schattiertes Rechteck symbolisiert. Erfolgreiche Komplementation ist durch ein +, nicht erfolgte Komplementation durch ein - angedeutet.

Um die Expression des in der Komplementationsanalyse ermittelten Gens *pat2563* zu analysieren, wurde das in pComp442B klonierte Fragment, das den *pat2563* - Leserahmen enthält, radioaktiv markiert und als Sonde in Northern Analysen verwendet. Hierfür wurde die RNA aus einer CM-Flüssigkultur des Stammes FB1, filamentös wachsendem Dikaryon, einer FB1xFB2-Kreuzung, jungem Tumorgewebe 4 Tage nach Inokulation mit der FB1xFB2-Kreuzung, sowie aus sporulierendem Tumorgewebe 7 Tage nach Inokulation eingesetzt. Eine Expression des Gens ließ sich jedoch unter keiner der getesteten Bedingungen detektieren (nicht gezeigt). Dieses Ergebnis läßt die Möglichkeit einer stadienspezifischen Expression von *pat2563*, zum Beispiel zu einem frühen Zeitpunkt während der pathogenen Entwicklung von *U. maydis*, zu. Da dieses Stadium aufgrund der geringen Biomasse des Pilzes auf der Pflanze einer Northernanalyse nicht zugänglich ist, müßte die Expression zum Beispiel mit Hilfe eines Reporter-gen-Konstruktes untersucht werden.

| | | | |
|-------|---------|---|-----|
| BamHI | EcoRI | | |
| | | <u>GGATCCCGAATTCGCACA</u> ACTGAACCACCTCTCGTGTCTCTTTTCTGGGGACAGCTGTTGCAACCAGTCATCGAGACGTG | 80 |
| | EheI | | |
| | | GCGCTGGCC <u>GCCTGTTTCGTTGGTCACTTGATGCCTTTTGGCGTACTGCAATCATGAATCCTCTGTGCTTC</u> | 148 |
| | | <u>ATTTCTGCTCGCGTCTTGATGGCTTGATGCCCGCGCCCTTCTGTTCCCACTCTTCCTCATCCTCATC</u> | 215 |
| | | M P A P F C S H S S S S S S S | 14 |
| | | CTCATCCTCATCCTCATCCTCATCCCCCTCCCCATCCCTATCCCTATCCCTGTCTTGTTCATCTCTT | 282 |
| | | S S S S S S S S S P S P S L S L S L S C S S L | 36 |
| | | <u>ATTTCTTGTTCGTTTCGATTCTTTTGTTCACCCTCTTGTTCACGCCTCGTCCTTTCCACCATCAACTG</u> | 349 |
| | | I S L F V D F F C S P S C S R L V L S P S T A | 59 |
| | | <u>CTTTGCTCCTTCCCTACTCCCATCTCGACCATCAATCAGCCTGCCAATACCTTGCTTCTTCCCAAGA</u> | 416 |
| | | L L L P Y <u>S H L D H Q S A C Q Y L A S S Q D</u> | 81 |
| | BsaI | | |
| | | <u>TCGACGTC</u> CGCTATTCTGTGCAACGTTCTGAT <u>CGGTCTCA</u> TCTTCTCTCTTCTCTGACGCTTACGCACGACA | 489 |
| | | R R P L F C A T F * | 90 |
| | | TACACGCAACTGTGACGCTGACGACAAGAACATATCCCCCTTACAACACCGCAGAGTTGACAACCTCTTTTCGGCCCATCT | 570 |
| | | GCGTTTGCCAATCCGAATCGTTACATTTGCTCTGCAGTATCCGTCGACGCTCTCGAGTTGGCTGTCCCGCTGTCCGTACTGC | 651 |
| | | TTATTCTGCTTTTGTCTTCTCCTCATCGCAATCTCGTAGGCTGTCTCTCTTCTGAGAGCATTGTGTTCAACGTCACCATAC | 732 |
| | | GTTTCGCATCGACCACGACATCGACCTTAAGCTCATCGACGCTACGCAACGTCGTCGAATCATCTCAAAAATTCCTCAA | 813 |
| | | ACACCGTTTTGCTTCTTTCGCGCGTACCACCAAGATCAGCTCGAACGGGCATGAAACGGTAGCAGTCCCTTCAAGCTT | 891 |
| | HindIII | | |

Abb. 13: Genomische Sequenz und abgeleitete Aminosäuresequenz von *pat2563*. Der überlappende Bereich der kleinsten komplementierenden Fragmente ist fett gedruckt. Die Schnittstellen der Enzyme BsaI, EcoRI, EheI, und HindIII sind unterstrichen. Die Aminosäuresequenz des potentiell translatierten Bereichs ist angegeben. Die putativen CkII-Phosphorylierungsstellen, die dem Konsensus SXXD entsprechen, sind unterstrichen.

Das abgeleitete Genprodukt von *pat2563* weist eine Länge von 90 Aminosäuren auf. Sechs Cysteine befinden sich an den Positionen 5, 32, 44, 48, 72 und 86 und sind somit relativ gleichmäßig über die gesamte Länge des Proteins verteilt. Die N-terminale Region von Pat2563 ist reich an Serin-Resten.

Sowohl die DNA- als auch die abgeleitete Aminosäuresequenz wurden mit den Programmen BLASTN bzw. BLASTP 2.0.5 (Altschul et al, 1997) des National Center for Biotechnology Information (NCBI) mit bekannten Sequenzen verglichen. Signifikante Ähnlichkeiten zu bekannten Protein- oder DNA-Sequenzen in der Datenbank ließen sich nicht detektieren. Die Sequenz von Pat2563 wurde mit Hilfe des Programms PSORT II (Nakai and Kanehisa, 1992) des Institute for Molecular Biology, Osaka University, Japan, auf mögliche Signalsequenzen untersucht. Aus dieser Analyse ergaben sich keine Hinweise auf eine Sekretion oder spezifische zelluläre Lokalisierung von Pat2563. Die Suche nach bekannten Motiven mit Hilfe des Programms PROSITE15.0 (Bairoch et al, 1997) des Swiss Institute of Bioinformatics ergab Hinweise auf zwei mögliche Casein Kinase II-Phosphorylierungsstellen an den Positionen 65, bzw. 78 der Aminosäuresequenz (unterstrichen in Abb.13). Darüber hinaus ist die Aminosäuresequenz von Position 57 - 65 (STALLLPYS) einer Myc-typischen Helix-Loop-Helix Dimerisierungs-Domäne ähnlich. Ob diese Motive in der Funktion von Pat2563 eine Rolle spielen, konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht analysiert werden.

Das putative *pat2563* -Genprodukt stellt somit ein neuartiges Protein dar, über dessen Funktion in der pathogenen Entwicklung von *U. maydis* bislang noch keine Aussagen getroffen werden können.

2.4. Charakterisierung der Mutante CL13pat3050

Die Rücktransformation des aus der Originalmutante CL13pat3050 isolierten Plasmids p3050 in CL13 erbrachte unter 12 überprüften Transformanden keine, in denen ein homologes Rekombinationsereignis erfolgt war. Daher sollte der Beweis, daß die Plasmidinsertion an dieser Stelle im Genom mit dem Verlust der Pathogenität gekoppelt war, ebenfalls mittels Komplementationsanalyse erbracht werden.

2.4.1. Nachweis der Kopplung zwischen Insertion und Pathogenitätsverlust mittels Komplementation

Um die Cosmide zu isolieren, die den in der Mutante CL13pat3050 durch die Insertion betroffenen Bereich trugen, wurde die Cosmidbank mit einem unmittelbar an die Insertionsstelle angrenzenden 2,65kb BamHI-Fragment aus p3050 durchmustert (Fragment 3050-1, Abb.14). Durch Hybridisierung ließen sich zwei Cosmide identifizieren, 23D5 und 23G8, die den genomischen Bereich des Insertionsortes beinhalten. Um sicherzustellen, daß die Plasmidinsertion in CL13pat3050 mit dem Verlust der Pathogenität gekoppelt ist, wurden die beiden Cosmide 23D5 und 23G8 in den Stamm CL13pat3050 transformiert. Die resultierenden Transformanden wurden auf ihre Pathogenität überprüft (Tab.8).

Tabelle 8: Komplementationsanalyse des Stammes CL13pat3050 mit Cosmiden

| Cosmid | getestete Transformanden* | pathogene Transformanden |
|--------|---------------------------|--------------------------|
| 23D5 | 6 | 6 |
| 23G8 | 4 | 4 |

* je 12-20 Pflanzen infiziert

Die in Tabelle 8 zusammengefaßten Daten belegen, daß der Pathogenitätsdefekt des Stammes CL13pat3050 durch die Cosmide 23D5 und 23G8, die den durch die Plasmidinsertion betroffenen genomischen Bereich beinhalten, komplementiert wird. Somit war für die Mutante CL13pat3050 die Kopplung zwischen Plasmidinsertion und Pathogenitätsverlust bewiesen.

2.4.2. Identifizierung des in CL13pat3050 betroffenen Gens

Die Sequenzanalyse des aus CL13pat3050 isolierten Plasmids p3050 ließ einen Bereich mit signifikanter Ähnlichkeit zum Motorprotein BimC aus *Aspergillus nidulans* erkennen (Sequenz siehe Anhang). Dieses putative Gen wurde *bim1* benannt. Der betreffende Sequenzabschnitt befand sich jenseits einer MluI-Schnittstelle auf der mit dem Primer hyg3' sequenzierten Flanke (siehe Anhang). Es stellte sich heraus, daß die DNA-Flanke von *U. maydis* auf dieser Seite nur 70bp betrug, und deshalb bei der Sequenzierung des zirkulären Plasmids die auf der anderen Seite angrenzende SP6-Flanke weitersequenziert wurde. Im genomischen Kontext befindet sich *bim1* in 6,5 kb Entfernung vom Integrationsort des REMI-Plasmides, und die Transkriptionsrichtung läuft auf den Insertionsort zu (Abb.14).

Die mit dem SP6-Primer ermittelte, direkt an die Insertionsstelle angrenzende Sequenz ließ einen putativen Leserahmen von etwa 300bp Länge erkennen, der jedoch beim

Vergleich mit bekannten Sequenzen in der Datenbank keine Ähnlichkeiten aufwies. Um zu ermitteln, ob dieser Bereich zu dem in der Mutante durch die Insertion betroffenen Gen gehört, wurde das unmittelbar an die Insertionsstelle angrenzende 2,65kb BamHI-Fragment isoliert, radioaktiv markiert und in einer Northern Hybridisierung als Sonde eingesetzt, in der das Expressionsmuster der Mutante mit dem des Ausgangsstammes verglichen wurde (Fragment 3050-1, Abb.14). Hierbei zeigte sich, daß das Fragment 3050-1 im Ausgangsstamm CL13 an zwei Transkripte unterschiedlicher Größe hybridisierte. In der Mutante CL13pat3050 hybridisierte das Fragment 3050-1 nur an das größere der beiden Transkripte, das kleinere Hybridisierungssignal fehlte (Abb.15a). Das Fragment 3050-1 ließ sich durch Restriktion mit XhoI in zwei Teilstücke zerlegen, von denen das der Insertionsstelle näher gelegene Fragment 3050-1a an das Transkript hybridisierte, das in *pat3050* fehlte (Abb.15b).

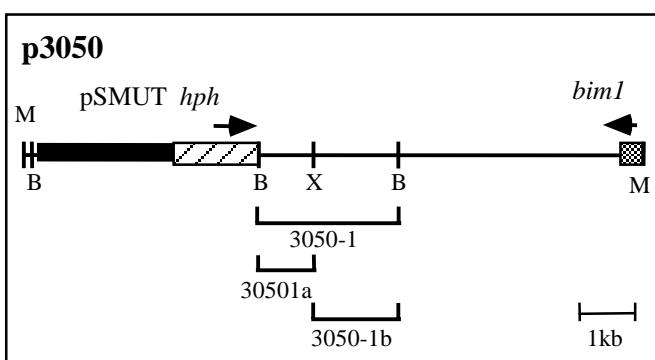


Abb. 14: Restriktionskarte von p3050. Die Schnittstellen der Restriktionsenzyme BamHI(B), MluI(M) und XhoI(X) sind eingezeichnet. Das REMI-Plasmid pSMUT sowie die darauf befindliche Hygromycin-Resistenzkassette sind als schwarzer Balken, bzw. schraffiertes Rechteck dargestellt. *bim1* ist als schattiertes Rechteck symbolisiert. Die in der Northern-Analyse verwendeten Sonden sind eingezeichnet.

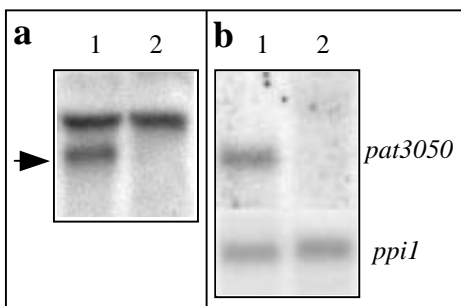


Abb. 15: Northern Analysen von CL13 (Spur1) und CL13pat3050 (Spur2). Die Stämme wurden vor der RNA-Extraktion auf dCM-Aktivkohle-Platten kultiviert. **a:** Als Sonde wurde das Fragment 3050-1 (Abb.14) verwendet. Dieses hybridisiert an 2 Transkripte, von denen das kleinere in *pat3050* fehlt (Pfeil). **b:** Als Sonde wurde das Fragment 3050-1a verwendet. Dieses hybridisiert an das Transkript, das in CL13pat3050 fehlt. Die Hybridisierung mit dem konstitutiv exprimierten Gen der Peptidyl Prolyl Isomerase (*ppi1*) dient als Kontrolle der aufgetragenen RNA-Mengen.

Die Durchmusterung einer λ ZAPII cDNA-Bank des Stammes FB1 (Hartmann, 1997) mit dem Fragment 3050-1a führte zur Isolierung der korrespondierenden cDNA, die im Plasmid pPat3050c-3 kloniert wurde (siehe Methoden).

Um den genomischen Bereich des Insertionsortes zu klonieren, wurden aus dem Cosmid 23D5 ein 4,7kb XhoI- und ein 1,4kb EcoRI-Fragment isoliert, die mit der Sonde 3050-1 hybridisieren. Die resultierenden genomischen Klone tragen die Bezeichnung pPat3050-X und pPat3050-E. Die Sequenzanalyse von pPat3050-X, pPat3050-E und pPat3050c-3 ließ einen offenen Leserahmen erkennen, der für 152 Aminosäuren kodiert und durch zwei Introns unterbrochen wird (Abb.16). Der Vergleich der ermittelten Sequenz mit bekannten Genen in der Datenbank ergab keine signifikante Ähnlichkeit zu anderen Genprodukten. Das in der Mutante CL13pat3050 betroffene Gen wurde mit *pat3050* bezeichnet.

| | |
|--|------|
| CCTCTTCCGAATCCCGTTGAATCACGAATCGTGAATCGTGAATGTGAACGCCAACAGCAAACAAGATTCGCTGATTCGC | 80 |
| TGATTCCCTCAACATGCCTTGTTCGTTTCGTGATGGCCATCTCGCAAACCTCAGCCCCTGTGATCATAGCTCAGCTGACCAA | 160 |
| ➔ | |
| TGCATACGAATCGCGCATAGGCTTCAGATTACGATCGGATTCACCGCCTCGACAACGACGCTTGCAGACTGACGCTTTG | 240 |
| GCTACCACATCTCGACAGGGCGCAACTCGGGATTCGACAATCCCAAGCATCGCACCCGCAACGTAACACACAGACA | 320 |
| GCTTGGCACCTCAAACCATGTGGCACACGAAATGGGCCGTGACCGTTCGTACAGGGGCATGATCGAAGACGAGGATGCT | 400 |
| M S A H E M G R D R R H R G M I E D E D A | 21 |
| GCGATCGGTAAACTTGGATCAGGTGCGTTTGTCTCTGTGCGACCTGTGCTCTGCGCTAATTCGGTCTCGGTTGCTGACAGG | 480 |
| A I G K L G S | 28 |
| CGCTTTGAAACTTTGTACGGCTTGTCTCTGCTCCTGCGTACCGATGGATGTTTGTATCCGACAGAATTCGACGACATTGG | 560 |
| E F D D I G | 34 |
| TCCTGTCTGCTCATTTTCGAGGTCGAGCTCGTTTTTTTCACAGCCTGACCAGCTCGGCTCGATGGCGAACCCAGCCGGAGCTGG | 640 |
| P V C S F R G R A R F S Q P D Q L G S M A N Q P E L V | 61 |
| TGGCAGGGACGAAGTTGACCTGCGTGAGTGGATGCTCTTGTGTGAATCGTGTACCAGCCTTGACGCAATGCTGACGTT | 720 |
| A G T K L T C V S G C S C C N R V P A L H A N A D V | 87 |
| TTCCCAAGCGTATCGTTCTGACTTGGCTGGTGAACAGGGTATTTCTCCAAGACCAAAGACTACGTCTCCGAGTTTFTA | 800 |
| F P K R I V L T C A G R T G Y S P R P K T T S P S F Y | 114 |
| BamHI | |
| CGACGTTACAAGGATCCAAACACGATCCCGTGAGATCCGAGAGTAAGTGCATCTCATCTGCAACGCCGCGTCTTGCTCACG | 880 |
| D V T R I Q T R S V R S E | 127 |
| CCCCAAATCGTGCCTTCTGACATCCTTCCAACCCCTCCCCCCCCCGGGGGGCTCTGGTTTTGCGCGCAGACTGTTAC | 960 |
| TCAAAACACGCCAAGCTCGACGACAGGCAGATCGACGAAGACGGCAACGAGCTCCCCGAAGACGAAGCCAACGCCGCGGT | 1040 |
| S S T T G R S T K T A T S S P K T K P T P P V | 150 |
| CTGCAGTTGACCCAGTTTGAATGGCCCAACTTGCCAACCTCTGTATCACCGAAGTCGACGAGGCCAAAGCGTTGATCCC | 1120 |
| C S * | 152 |
| GACCTTGGCGACCAGGGACGATGCGCTACTCGACAGCCTCTTGCAGGAGTTGGATAACATTCGAAGGTTCTCTGACACG | 1200 |
| ← | |
| CCTGAGCGGTGACGAACTGAATGAAATGTACTTTTACAACGTGAAAAAA | 1250 |

Abb. 16: DNA Sequenz des *pat3050* Gens und der flankierenden Bereiche. Die abgeleitete Aminosäuresequenz des potentiell translatierten Bereichs ist angegeben, die BamHI-Insertionsstelle des REMI-Plasmids ist unterstrichen. Beginn und Ende der cDNA sind durch Pfeile symbolisiert.

2.4.3. Deletion von *pat3050* in FB1 und FB2

Um die Auswirkung einer Deletion des Gens *pat3050* auf die Pathogenität zu überprüfen, wurden Null-Mutanten in den Stämmen FB1 und FB2 erzeugt. Dazu wurde das Plasmid p Δ *pat3050* konstruiert, bei dem der Leserahmen von Aminosäure 35 bis 150 durch eine Hygromycin-Resistenzkassette ersetzt wurde (siehe Methoden und Abb.17). Das Plasmid wurde im Vektoranteil mit SspI linearisiert und in FB1 und FB2 transformiert. Durch ein zweifaches Rekombinationsereignis kann dabei das genomische *pat3050*-Gen durch das veränderte Allel ersetzt werden. Um den homologen Austausch des Gens durch das Δ *pat3050*-Allel zu überprüfen, wurde die genomische DNA der Transformanten mit den Restriktionsenzymen EcoRI und BamHI geschnitten und im Southern Blot mit einem 1,3kb EcoRI-Fragment, das einen Teil des *pat3050*-Gens und dessen 3' Bereich enthält, hybridisiert. Im Falle des Austausches wurde anstatt der 1,3kb EcoRI-Bande des intakten Gens eine 800bp EcoRI-BamHI-Bande detektiert (Abb.17).

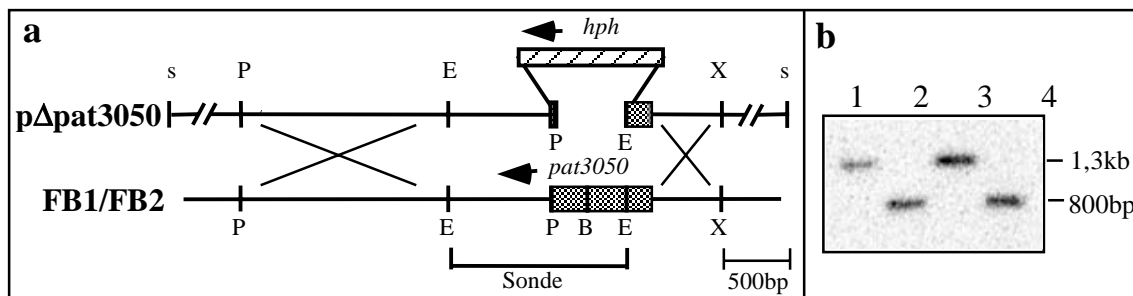


Abb. 17: Konstruktion der *pat3050* Nullmutanten. **a:** In dem Deletionskonstrukt *pΔpat3050* (oben) wurde der Bereich des Leserahmens, der für Aminosäure 35 bis 150 codiert, durch die Hygromycin-Resistenzkassette ersetzt. Darunter ist die genomische Organisation des *pat3050* Gens dargestellt. Bereiche, über die homologe Rekombination erfolgen kann, sind durch Kreuze angedeutet. Die Restriktionsschnittstellen BamHI(B), EcoRI(E), PstI(P), SspI(s) und XhoI(X) sind eingezeichnet. Die unterbrochene Linie stellt den Klonierungsvektor dar. Die in der Southern Hybridisierung verwendete Sonde ist eingezeichnet. **b:** Southern Analyse der *pat3050* Nullstämme. Das Plasmid *pΔpat3050* wurde mit HpaI linearisiert und in die Stämme FB1 und FB2 transformiert. Aus den Ausgangsstämmen (FB1, Spur1; FB2, Spur3), sowie den Nullstämmen (FB1 Δ *pat3050* Spur2 FB2 Δ *pat3050*: Spur4) wurde die genomische DNA isoliert, mit EcoRI und BamHI geschnitten und auf einem 1% Agarosegel aufgetrennt. Nach dem Transfer der DNA-Fragmente auf eine Nylonmembran wurde der Filter mit dem 1,3kb EcoRI-Fragment (Abb.16a) hybridisiert. Bei den Nullstämmen hybridisiert anstatt des 1,3 kb EcoRI-Fragmentes ein 800bp EcoRI-BamHI Fragment.

Für FB1 ließ sich unter 9 überprüften Transformanten einer identifizieren, der die Integration des Nullallels am homologen Genort aufwies, für FB2 waren es 3 unter 31. Dies zeigt, dass dieses Gen nicht essentiell für das Überleben des Pilzes ist. Um festzustellen, ob der Verlust der *pat3050*-Funktion das Wachstum entsprechender Stämme beeinträchtigt, wurden für FB1 und FB1 Δ *pat3050* die Generationszeiten in Minimalmedium bestimmt. Hierbei ergab sich für FB1 Δ *pat3050* mit 3,2h eine etwas langsamere Wachstumsgeschwindigkeit als für FB1, der nur 3h pro Verdoppelung benötigt. Dies bedeutet, daß der Stamm FB1 Δ *pat3050* einen leichten Wachstumsdefekt besitzt. Die Nullstämme wurden anschließend gekreuzt und auf ihre Pathogenität überprüft (Tab.9).

Tab.9: Pathogenitätstest der *pat3050*-Mutanten

| Inokulum | n | % Tumore |
|---|----|----------|
| CL13 | 19 | 73 |
| CL13 <i>pat3050</i> | 20 | 0 |
| FB1 x FB2 | 51 | 96 |
| FB1 Δ <i>pat3050</i> x FB2 Δ <i>pat3050</i> | 62 | 13 |

Die in Tabelle9 zusammengefaßten Daten belegen, daß die Kreuzung der beiden Stämme FB1 Δ *pat3050* und FB2 Δ *pat3050* pathogen ist, d.h. im Gegensatz zu dem haploiden Stamm CL13*pat3050* kann das aus der Kreuzung resultierende Dikaryon auch ohne die *pat3050*-Genfunktion die pathogene Entwicklung in der Pflanze durchlaufen. Die Häufigkeit der Symptombildung ist in den Infektionen mit den *pat3050*-Nullstämmen allerdings deutlich geringer als bei der Infektion mit den Wildtyp-Stämmen. Der Ausfall der *pat3050*-Genfunktion, der im Stamm CL13 zum

völligen Verlust der Pathogenität führt, verursacht im Dikaryon demnach nur reduzierte Pathogenität.

2.5. Charakterisierung der Mutante CL13pat4285

Die anfängliche Sequenzanalyse des in p4285 klonierten Bereichs hatte auf der *hyg3'*-Flanke einen durchgehenden Leserahmen erkennen lassen, der für 103 Aminosäuren kodiert, und auf einem Bereich von 70 Aminosäuren 54% Identität, bzw. 70% Ähnlichkeit zum 3'-Ende der regulatorischen beta Untereinheit der Casein Kinase TypII aus *Schizosaccharomyces pombe* aufwies. Aufgrund dieser Ähnlichkeit wurde das diesem Leserahmen entsprechende putative Gen mit *ckb1* (für Casein Kinase II beta Untereinheit) bezeichnet. Die Sequenz der SP6-Flanke ließ ebenfalls einen durchgehenden Leserahmen erkennen, der jedoch keine signifikanten Ähnlichkeiten zu bekannten Genen in der Datenbank aufwies (siehe Tab.5 und Anhang).

Um die Kopplung zwischen Plasmidinsertion und Verlust der Pathogenität zu bestätigen, war das linearisierte Plasmid p4285 in CL13 zurücktransformiert worden. Aus dieser Transformation gingen zunächst sechs Transformanden hervor. Keiner dieser Transformanden zeigte in der Southern Analyse dasselbe Restriktionsmuster wie die Ausgangsmutante, d.h. ein Genaustausch durch homologe Rekombination war nicht erfolgt (nicht gezeigt).

Um den genomischen Bereich des Insertionsortes zu isolieren, wurde die Cosmidbank mit den beiden Sonden 4285-1 und 4285-2 durchmustert (siehe Abb.18). Hierbei ließen sich die beiden Cosmidklone 21A10 und 25A6 identifizieren, die jeweils mit beiden verwendeten Sonden hybridisieren, und somit den in p4285 klonierten genomischen Bereich enthalten. Die Hybridisierung des Fragmentes 4285-2 an die λ ZAPII- cDNA-Bank des Stammes FB1 (Hartmann, 1997) führte zur Isolierung des cDNA-Klons *pckb1-1*.

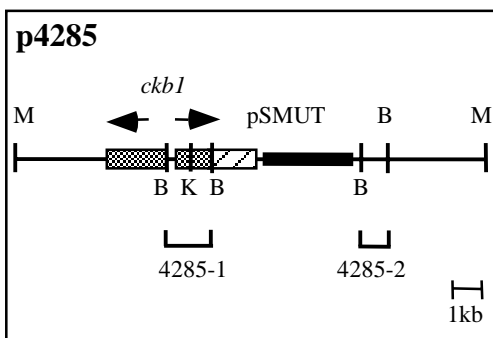


Abb. 18: Restriktionskarte von p4285. Die Restriktionsschnittstellen MluI(M), und BamHI(B) KpnI(K), soweit bekannt, sind eingezeichnet. pSMUT und die darauf befindliche Hygromycin-Resistenzkassette sind als schwarzer Balken, bzw. schraffiertes Rechteck dargestellt. Der als *ckb1* bezeichnete Leserahmen ist als schattiertes Rechteck dargestellt. Dieser Leserahmen ist nicht durchgehend und läßt unterschiedliche Transkriptionsrichtungen erkennen, die durch Pfeilspitzen angedeutet sind. Die in den Southern Analysen verwendeten Sonden 4285-1 und 4285-2 sind eingezeichnet.

2.5.1 Genomisches Rearrangement in CL13pat4285

Mit Hilfe von Sequenzierung, Restriktionsanalyse und Southern Analyse (nicht gezeigt) wurde nachgewiesen, daß die Insertion des REMI-Plasmids in CL13pat4285 an der BamHI-Schnittstelle zwischen den beiden BamHI-Fragmenten 4285-1 und 4285-2 erfolgte (siehe Abb.19). Darüberhinaus wurde das Fragment 4285-1 invertiert. Zusätzlich fand an einer entfernteren genomischen Stelle die Deletion eines Bereichs statt, auf dem sich ein 2,7kb MluI-Fragment befand. Diese Deletion wurde in der Southern Analyse mit dem Plasmid p4285, bzw. dem Fragment 4285-2 als Sonde

detektiert, weil der deletierte Bereich mit dem Fragment 4285-2 kreuzhybridisiert (nicht gezeigt). Der in der Mutante deletierte kreuzhybridisierende Bereich ist auf dem Cosmid 25A6 enthalten, nicht jedoch auf dem Cosmid 21A10. Da auf diesem Cosmid auch die MluI-Schnittstelle, die sich in 4kb Entfernung vom Insertionsort befindet, nicht mehr enthalten ist, muß der kreuzhybridisierende Bereich über 4kb vom Insertionsort entfernt liegen.

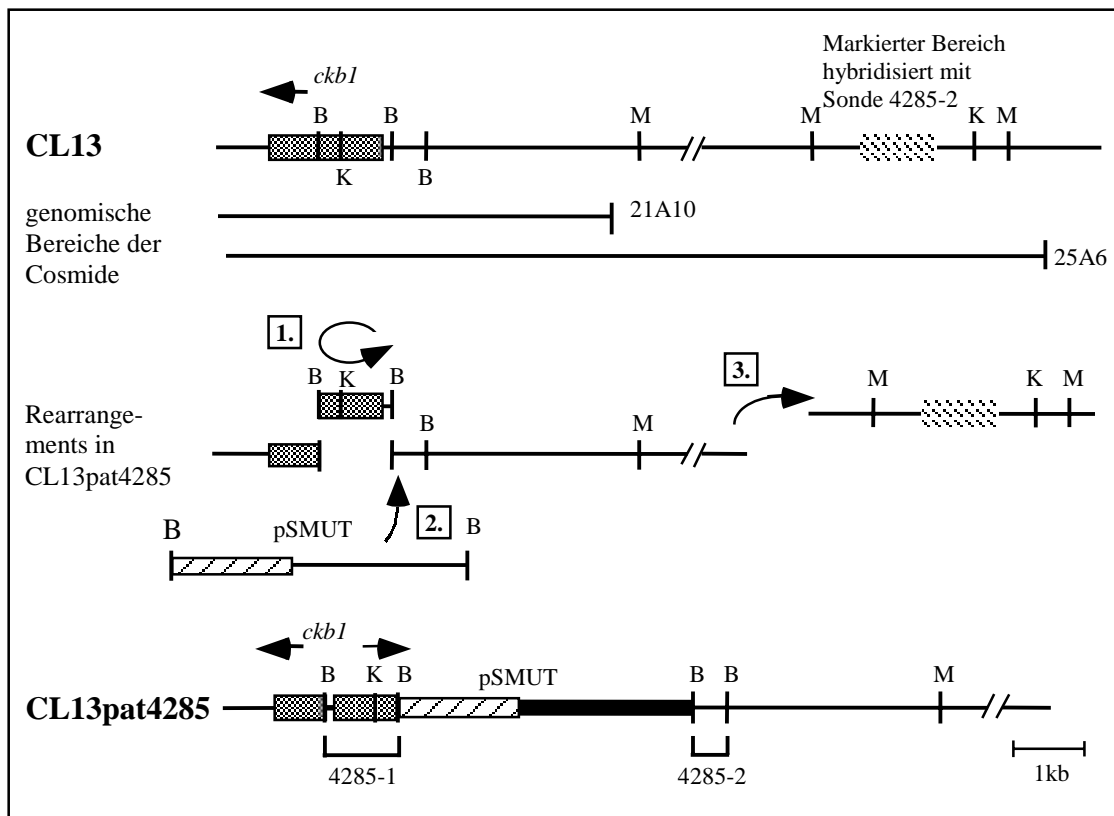


Abb. 19: Schematische Darstellung des *ckb1*-Locus in CL13. Oben ist die abgeleitete Karte des *ckb1* Locus in CL13 angegeben. Darunter befinden sich die genomischen Bereiche der Cosmide, die *ckb1* enthalten. In der Mitte sind die Mutationsereignisse angedeutet, die im Stamm CL13pat4285 identifiziert wurden, sowie der resultierende *ckb1*-Locus dieses Mutantenstammes (unten). Die in den Southern Analysen verwendeten Sonden sind unten eingezeichnet. Das *ckb1*-Gen ist als schattiertes Rechteck dargestellt, die Pfeilspitze gibt die Transkriptionsrichtung an. Der kreuzhybridisierende Bereich ist in unterbrochener Schraffierung angedeutet. pSMUT und die darauf befindliche Hygromycin-Resistenzkassette sind als verstärkte Linie, bzw. schraffiertes Rechteck dargestellt. Die bekannten Restriktionsstellen für BamHI (B), KpnI (K) und MluI (M) sind eingezeichnet. Folgende Mutationsereignisse wurden identifiziert: 1. Inversion des BamHI-Fragments auf dem sich der 5'-Teil des *ckb1*-Gens befindet; 2. Insertion von pSMUT; 3. Deletion eines MluI-Fragments, das mit Sonde 4285-2 kreuzhybridisiert. Die Distanz der MluI Schnittstellen, die durch zwei Schrägstrichen unterbrochen sind, wurde nicht bestimmt.

2.5.2. Bestätigung der Kopplung zwischen Plasmidinsertion in CL13pat4285 und Verlust der Pathogenität

Da in CL13pat4285 offensichtlich neben der Plasmidinsertion mindestens zwei weitere Mutationsereignisse erfolgt sind, war das vorrangige Ziel der weiteren Untersuchungen, festzustellen, ob die Mutation des potentiellen Leserahmens mit Ähnlichkeit zur Casein Kinase II Untereinheit für den Verlust der Pathogenität verantwortlich ist.

Zunächst sollte überprüft werden, ob das putative *ckb1*-Gen für ein Transkript kodiert, welches in CL13pat4285 verändert vorliegt. Zu diesem Zweck wurde eine Northern

Analyse durchgeführt, in der das Expressionsmuster von CL13 mit dem des Stammes CL13pat4285 verglichen wurde. Das Fragment 4285-1, das auf der *hyg3'*-Flanke in dem identifizierten potentiellen Leserahmen liegt, wurde als Sonde verwendet (siehe Abb.18). Hierbei zeigte sich in CL13 ein Hybridisierungssignal, während in CL13pat4285 zwei größere Signale zu erkennen waren (Abb.20). Der am Insertionsort erkennbare Leserahmen entspricht demnach einem exprimierten Gen, das in CL13pat4285 verändert ist.

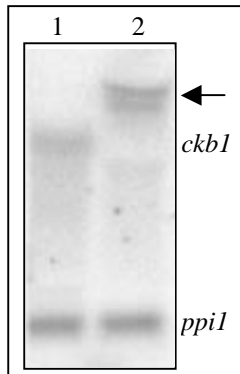


Abb. 20: Northern Analyse CL13pat4285. Die Stämme wurden vor der RNA-Extraktion 48h auf CM-Aktivkohle-Platten kultiviert. Als Sonde wurde das Fragment 4285-1 (Abb.18) verwendet. Dieses detektiert in CL13 ein schwach exprimiertes Transkript (*ckb1*), während in CL13pat4285 zwei größere Transkripte sichtbar werden (Pfeil). Die Hybridisierung mit dem konstitutiv exprimierten Gen der Peptidyl-Prolyl-Isomerase (*ppi1*) dient als Kontrolle der aufgetragenen RNA-Mengen.

Da die REMI-Insertion in CL13pat4285 offensichtlich das *ckb1*-Gen betrifft, aber daneben noch andere Sequenzbereiche rearrangiert sind, wurde überprüft, ob die Mutation in *ckb1* auch für den Verlust der Pathogenität verantwortlich ist. Da zu diesem Zeitpunkt noch nicht der gesamte Leserahmen des Gens sequenziert war, wurde eine Insertion in den bereits bekannten Sequenzbereich eingebracht.

Der Vergleich des in p4285 ansequenzierten Bereichs mit bekannten Casein Kinase II beta Untereinheit-Genen in der Datenbank ließ eine Region erkennen, die zwischen *S. pombe*, Maus und Mensch konserviert ist. Diese Domäne beinhaltet ein potentielles Metallbinde-Motiv und ist vermutlich für die Funktion des Genproduktes wichtig. Dieser Teil des Gens befindet sich auf dem 1kb BamHI-Fragment 4285-1 an der Position, an der eine KpnI-Schnittstelle liegt (siehe Abb.23). Diese KpnI-Schnittstelle kann somit genutzt werden, um die *ckb1*-Genfunktion durch Insertion zu inaktivieren.

Zu diesem Zweck wurde das Plasmid *pckb1::hyg* konstruiert, bei dem die Hygromycin-Resistenzkassette in dem BamHI-Fragment 4285-1 an der KpnI-Schnittstelle inseriert wird. Oberhalb und unterhalb der Hygromycin-Kassette stehen somit 700bp, bzw 300bp genomischer Sequenz für die homologe Integration des Konstruktes zur Verfügung. Das 1kb BamHI-Fragment vergrößert sich durch die Insertion der 3kb Hygromycin-Resistenzkassette auf 4kb. Das Plasmid *pckb1::hyg* wurde mit BamHI geschnitten, das 4kb-Fragment wurde isoliert und in die Stämme FB1, FB2, sowie CL13, transformiert. Durch ein zweifaches homologes Rekombinationsereignis kann dabei die Hygromycin-Resistenzkassette in das genomische *ckb1*-Gen inseriert werden (Abb.21a). Um den homologen Austausch des Wildtyp-Gens durch das *ckb1::hyg*-Allel zu überprüfen, wurde die genomische DNA der Transformanten mit BamHI geschnitten und im Southern Blot mit dem BamHI-Fragment 4285-1 hybridisiert. Im Falle des Austausches wurde anstatt des 1kb großen DNA-Fragments das vergrößerte 4kb Fragment detektiert (Abb.21b).

Aus dem mit allen REMI-Mutanten durchgeführten Pheromontest (siehe Einleitung) war für die Originalmutante CL13pat4285 bereits bekannt, daß sie in Kombination mit dem Stamm RK1726 (*a2bnull*) auf PD Aktivkohle-Platten nicht filamentös wächst, d.h. nicht Pheromon-stimulierbar ist (K.H.Braun, persönl. Mitteilung). Dieser leicht zu überprüfende Phänotyp wurde zur Vorselektion der Transformanden herangezogen, da zu erwarten war, daß aufgrund der kurzen Flanken homologe Rekombination nur selten auftreten wird. Unter 100 überprüften FB1-Transformanden ließ sich eine identifizieren, die in Kombination mit FB2 nicht pheromonstimulierbar war und den Genaustausch am *ckb1*-Lokus aufwies (nicht gezeigt). Dieser Stamm wurde FB1*ckb1::hyg* bezeichnet. Für FB2 konnten unter 120 überprüften Transformanden vier identifiziert werden, die in Kombination mit FB1 kein filamentöses Wachstum erkennen ließen und aus einem homologen Rekombinationsereignis hervorgegangen waren (Abb.21b). Von diesen vier Stämmen wurde Transformande #33 mit FB2*ckb1::hyg* bezeichnet. Ebenso ließ sich unter 53 überprüften CL13-Transformanden eine identifizieren, die den Genaustausch am *ckb1*-Lokus aufwies (nicht gezeigt). Dieser Stamm wurde mit CL13*ckb1::hyg* bezeichnet. Der erfolgreiche Genaustausch in allen drei Stämmen belegt, daß die an der KpnI-Stelle eingeführte Insertion in *ckb1* nicht letal ist.

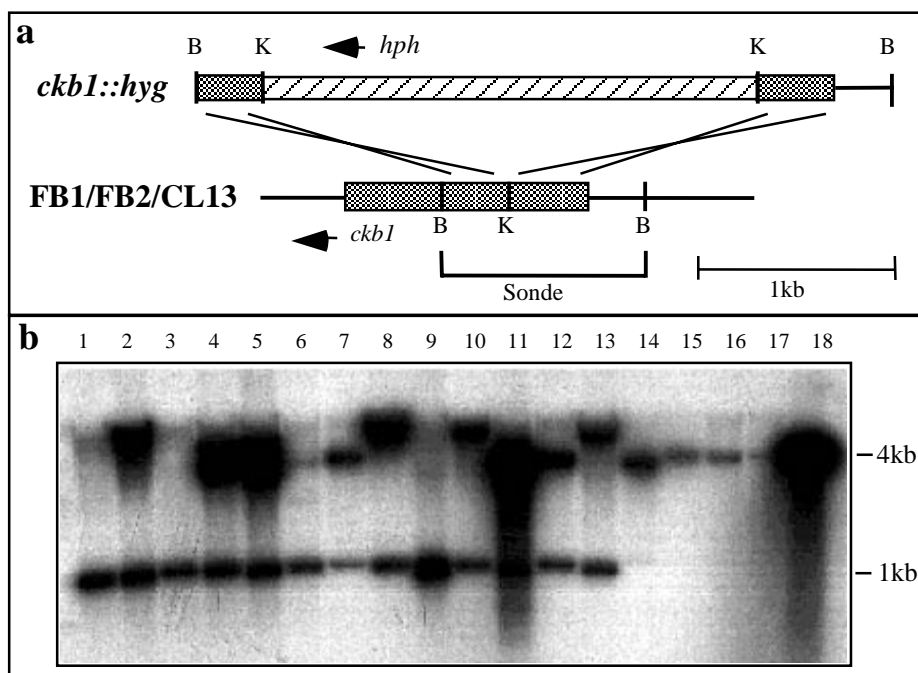


Abb. 21: Konstruktion des *ckb1::hyg*-Allels. **a:** Die Hygromycin-Kassette wurde nach Aminosäure 155 eingefügt. Darunter ist die genomische Organisation des *ckb1*-Gens dargestellt. Bereiche, über die eine homologe Rekombination erfolgen kann, sind durch Kreuze angedeutet. Die Schnittstellen der Restriktionsenzyme BamHI(B) und KpnI(K) sind eingezeichnet. Die in der Southern Analyse verwendete Sonde ist eingezeichnet. **b:** Southern Analyse von FB2 (Spur1) und 16 FB2*ckb1::hyg*-Transformanden (Spuren 2-17). Das die Insertion tragende BamHI-Fragment wurde isoliert und in FB2 transformiert. Spur18: Größe des transformierten BamHI-Fragmentes als Kontrolle: 4kb. Die DNA des Ausgangsstammes und der Transformanden wurden mit BamHI geschnitten, in einem 1% Agarosegel aufgetrennt und auf eine Nylonmembran transferiert. Der Filter wurde mit dem Fragment 4285-1 (Abb.18) hybridisiert. Der Genaustausch von *ckb1* gegen *ckb1::hyg* ließ sich in den Transformanden #32, 33, 35 und 37 nachweisen (Spuren 17, 15, 14, 16), da anstelle der Wildtyp-Bande von 1kb die 4kb-Bande des *ckb1::hyg*-Allels hybridisiert. Transformande #33 (Spur 15) wurde mit FB2*ckb1::hyg* bezeichnet.

Um zu ermitteln, ob die Insertion in *ckb1* zum Pathogenitätsverlust führt, wurden die Stämme FB1*ckb1::hyg* und FB2*ckb1::hyg* miteinander und jeweils mit dem kompatiblen Wildtyp-Stamm kombiniert und in junge Maispflanzen injiziert. CL13*ckb1::hyg* wurde ebenfalls auf seine Pathogenität überprüft (Tab.10).

Tabelle 10: Pathogenitätstest der Stämme CL13pat4285 und CL13*ckb1::hyg*

| Inokulum | n | % Tumore |
|---|----|----------|
| FB1 x FB2 | 20 | 90 |
| FB1 <i>ckb1::hyg</i> x FB2 <i>ckb1::hyg</i> | 56 | 0 |
| FB1 x FB2 <i>ckb1::hyg</i> | 8 | 37 |
| FB1 <i>ckb1::hyg</i> x FB2 | 12 | 67 |
| CL13 | 30 | 93 |
| CL13pat4285 | 42 | 0 |
| CL13 <i>ckb1::hyg</i> | 42 | 0 |

n = Anzahl infizierter Pflanzen

Die in Tabelle 10 zusammengefaßten Ergebnisse belegen, daß die Kombination der beiden kompatiblen *ckb1*-Disruptanten der Stämme FB1 und FB2 völlig apathogen ist. Die Kombinationen der *ckb1*-Disruptanten der Stämme FB1 und FB2 mit dem jeweiligen kompatiblen Wildtyp-Stamm weisen reduzierte Pathogenität auf. Dies zeigt, daß die *ckb1*-Disruptanten nicht völlig fusionsdefekt sind, und daß in Folge der Zellfusion das Wildtyp-Allel des *ckb1*-Gens den Defekt des *ckb1::hyg*-Allels teilweise komplementiert. Da FB1*ckb1::hyg* und FB2*ckb1::hyg* nicht pheromonstimulierbar sind, und es bei der Mischung der beiden Stämme vermutlich nicht zur Zellfusion und nachfolgenden Ausbildung eines Dikaryons kommt (siehe 2.5.5.), läßt die Infektion mit dieser Stammkombination keine Aussage über eine direkte Rolle der *ckb1*-Funktion in der Pathogenität zu. Aus diesem Grund wurde auch der Stamm CL13*ckb1::hyg* auf seine Pathogenität überprüft. Wie aus Tabelle 10 ersichtlich, ist dieser Stamm ebenfalls völlig apathogen.

2.5.3. Sequenzanalyse des Gens *ckb1*

Die Sequenzanalyse des *ckb1*-Lokus und des korrespondierenden cDNA-Klons pckb1c-1.2 ließ einen Leserahmen von 1206bp erkennen, der keine Introns aufweist und für 402 Aminosäuren kodiert (Abb.22). Die abgeleitete Aminosäuresequenz weist 61% Identität, bzw. 74% Ähnlichkeit zur Casein Kinase II Beta Untereinheit von *S. pombe* auf (Abb.23).

| | |
|---|-----|
| CATTTCTCGGACATCATCGATTCAAGCCTCTGTGATCAATCAGAGCTTCCCTCACAGAAGCACAAAGTGAACAAGGGCGAA | 80 |
| ACCGCAGTCTAGTCATCGATACAAACAGGAGCAGCTGATCCACTCCCATCGCAACTCGCGCTTGTCTCAGCGCTAGCGACG | 160 |
| TGCAAGCGCATTCTGCCTTCCAGAACACCTATTCTCTCGCTCTCAGCATCTTTCTGCCTCGATCATCCTGTACACAC | 240 |
| ACGCAGCAGCATCGACACGGCTTGCAAGCTATATCTGGAAAGATGATGGACGATCTCACCGAAGCGAGCAGCGACTACGC | 320 |
| M M D D L T E A S S D Y A | 13 |
| AGCCAACCTCGTGGGTACCTGGTTCTCTCGACAAAGGGCAACGAGTACTTTTGGGAGGTCGACGAAGACTACATCCTCG | 400 |
| A N S W V T W F L S T K G N E Y F C E V D E D Y I L D | 40 |
| ACCGCTTCAACCTCAGGTCTCAATGCTGAAGTGCAGCACTACCCACATGCGCTTGATCTCATCACCAGCTCGCTGGAA | 480 |
| R F N L T G L N A E V Q H Y P H A L D L I T D S L E | 66 |
| GGCGATCTCTCGGAATCGATTTCGCGACTCGGTGCAAGCGCAGGCAAAGCTGCTCTACGGCCTCGTACATGCACGCTACAT | 560 |
| G D L S E S I R D S V E A Q A K L L Y G L V H A R Y I | 93 |
| CATCACCCTCGCGGCTTGCCAAAGATGCTCGAAAAGTACAAGCGCGCCGACTTTGGCCGTTGCCCTCGCGTGTCTGTCT | 640 |
| I T T R G L A K M L E K Y K R A D F G R C P R V L C Y | 120 |

| | |
|---|------|
| ATCAACAACCTTTGCTTCCCCTCGGTCTCAGCGACAATCCTTTCCAAAAGGCCGTCAAGCTCTTCTGTCCACGATGCGAG | 720 |
| Q Q P L L P V G L S D N P F Q K A V K L F C P R C E | 146 |
| KpnI | |
| GACATCTACTCGCCAAAGAGTAGCCGTACGGTACCATTGACGGCGCCTTTTTCGGCAGCACCTTCCCACATGCTCTT | 800 |
| D I Y S P K S S R H G T I D G A F F G S T F P H M L F | 173 |
| CATGGTCTATCCCAACGTCTTGCTTCCAAATCGCCACCGCGCAATCGCCCTTTTTGCTCACTTCCTCCTTACACCACC | 880 |
| M V Y P N V L P S K S P T A Q S P F L L T S S L H H R | 200 |
| GACTCGATGCACGCTCGCACGCCGAACACGCAGATGTTGACGACTCGATCATGTCCGTCCCAAGCGGTGCAGGCGGTACA | 960 |
| L D A R S H A E H A D V D D S I M S V P S G A G G T | 226 |
| GGCGGTGTAGCCAACGGCTCATCGCTTTCCGGAGTTGCCTCGTCGTCGTCGGCAGTGGCCGGTGAAGCGCCAGTGCCGC | 1040 |
| G G V A N G S S L S G V A S S S S A V A G A S A S A A | 253 |
| BamHI | |
| CGCTGGCGCTCCC <u>GATCCA</u> ATGCTGCACCCGCCAATTC AACAGCCGCTGCTGCCGCCAAGGTGGAACGCTACCGACCGC | 1120 |
| A G A P G S N A A P A N S T A A A A A K V E R Y R P R | 280 |
| GCATCTTTGGCTTCCCCTGACGAGACGAGCAAACCTGCAGAAATGGCAGGACAAGATGCGCGACCAGCAAATCGAGCGT | 1200 |
| I F G F P V H E T S K L Q K W Q D K M R D Q Q I E R | 306 |
| CTAGAAAAAGTGAAGCTGCCGGTGGCATTGCTACACCCGGTGCAGCTGCCTTTTTTCAGGAGAGCAGCGCCAGTGCCGAC | 1280 |
| L E K V E A A G G I A T P G A A A F F R R A A P V P T | 333 |
| AACAGCTTCGGCAGAGCCAACATCGGGCCAGCGCCAGCACCAGCAGCAGCACCAGCCCCACCAACATCAGCACTAGCTC | 1360 |
| T A S A E P T S A P A P A P A A A P A P P T T S A L A P | 362 |
| CAGCACCGTGTACCAACATCAACATCCACAGCATCACCTCAGACAGCAGCGTCCAAGTCCATGTCGGCATCGGCA | 1440 |
| A P V V P T S T S T A S S P Q T A A S K S M S A S A | 386 |
| GTCACCACCAGCACTCCATTGCAATCTGTTCCACCAGTGCACGGTTTTGATGCGCTGCGGAGCTCAATTTCTGTTTGCA | 1520 |
| V T T S T P L Q S V P T S A R F * | 402 |
| TTTCATAGCCACAGCTCGCCACACTTTCAACCTAACTTGACCTCGTGTATACCATGTTTTGTTTCTGTCGAGTCACAA | 1600 |
| ← | |
| TGCGCATGCTACAGCTG | 1617 |

Abb. 22: Genomische DNA- und abgeleitete Aminosäuresequenz von *ckb1*. Die BamHI-Insertionsstelle und die KpnI-Schnittstelle, die für die Erzeugung des *ckb1::hyg*-Allels verwendet wurden, sind unterstrichen. Beginn und Ende der cDNA sind durch Pfeile angedeutet.

Der Vergleich der abgeleiteten Aminosäuresequenz von Ckb1 mit den Casein Kinase II beta-Untereinheiten aus *S. pombe*, Mensch, Rind, Drosophila und *C. elegans* zeigt, daß das *U. maydis* Protein mit 402 Aminosäuren erheblich größer ist als die Casein Kinase II beta-Untereinheiten (CKIIb) der anderen Organismen, die zwischen 209 Aminosäuren in Rind, und 249 Aminosäuren in *C. elegans* umfassen (Abb.23). Die zwischen den anderen Organismen stark konservierten Bereiche, zu denen der N-terminale Bereich mit zwei potentiellen Metallbinde-Domänen zählt, lassen sich jedoch auch in Ckb1 aus *U. maydis* identifizieren (Reed et al, 1994). Ebenso, wie bei den Proteinen aus *S. pombe*, Mensch, Drosophila und *C. elegans* läßt sich bei Ckb1 eine potentielle Autophosphorylierungsstelle identifizieren, hier jedoch an einer anderen Stelle des Proteins (unterstrichen in Abb. 23; Meggio et al, 1989).

| | |
|------------|---|
| U.maydis | MDDLTEASSDYAANSVWTFWFLSTKGNFYFCEVDEDEYILD ^U DRFNL ^U TGLNAEV ^U QHYPHALDL ^U ITDSLEGLDLS |
| S.pombe | -MQLYSSESESDDSQYWVDWFLGLKGNFFCEVDEDFIQDRFNL ^S TGLSHEVPHYSQSLDL ^S ILDVLD ^S PDLP |
| H.sapiens | ---MSSEEV ^H S-----WISWFCGLRGNEFFCEVDEDEYIQDKFNL ^H TGLNEQVPHYRQALDMI ^H LDLEPDEEL |
| Rind | -----SEVS-----WISWFCGLRGNEFFCEVDEDEYIQDKFNL ^R TGLNEQVPHYRQALDMI ^R LDLEPDEEL |
| Drosophila | ---MSSEEV ^D S-----WVWFCGLRGNEFFCEVDEDEYIQDKFNL ^D TGLNEQVPNYRQALDMI ^D LDLEPEDEL |
| C.elegans | ---MSSEEV ^C S-----WITWFCGLRGNEFFCEVDEEYIQDRFNL ^C TGLNEQVPKYRQALDMI ^C LDLEP-DDI |
| ESIR | ---DSVEAQAKLLYGLVHARYIITRGLAKMLEKYKRADFGRCPRVLCYQQPLL ^U PVGLSDNPFQKAVKLF ^U CPRCED |
| EEVQ | ---DEVEASARHLYGLIHARYILTAQGLYKMLEKYKCDFGHCPRVLCNGQPML ^U PVGLSDIAHAKSVKLY ^U CPRCED |
| EDNPNQSD | LEQAEMLYGLIHARYILTNRGIAQMLEKYQQGDFGYCPRVYCENQPML ^U PIGLSDIPGEAMVKLY ^U CPKCMD |
| EDNPNQSD | LEQAEMLYGLIHARYILTNRGIAQMLEKYQQGDFGYCPRVYCENQPML ^U PIGLSDIPGEAMVKLY ^U CPKCMD |
| EDNPLQSD | MTEQAEMLYGLIHARYILTNRGIAQMI ^U EKYQTGDFGHCPRVYCESQPML ^U PLGLSDIPGEAMVKTY ^U CPKCID |
| EDNATNTDL | VEQAEMLYGLIHARYILTNRGISQMV ^U EKWRDHDHFGVCPRVYCENQPML ^U PIGLSDVPEAMVKLY ^U CPRCNM |

| | |
|---|------------------------------------|
| KpnI | |
| IYSPKSSRHGTIDGAFFGSTFPHMLFMVYPNVLPSKSPTAQSPFLLTSSLHHRDLAR <u>SHA</u> EHADVDDSIMSVPSGAGGTG | |
| VYTPKSSQRHASIDGAYFGTSPHMLFQVYPELAVPKS----- | |
| VYTPKSSRHHHTDGAYFGTGFPHMLFMVHPEYRPKRP----- | |
| VYTPKSSRHHHTDGAYFGTGFPHMLFMVHPEYRPKRP----- | |
| VYTPKSSRHHHTDGAYFGTGFPHMLFMVHPEYRPKRP----- | |
| VFVPRSSRHQHTDGSYFGTGFPHMLFFVHPDLRPRRP----- | |
| BamHI | |
| GVANGSSLSGVASSSSAVAGASASAAAAGAPGSNAAPANSTAAAAKVERYRPRIFGFPVHETSK-LQKWQDKMRDQQIER | |
| -----QERYIPRIFGFKVHSYSA-TFKKQDVYKEKQKKR | |
| -----ANQFVPRLYGFKIHPMAYQLQ----- | |
| -----ANQFVPRLYGFKIHPMAYQLQ----- | |
| -----TNQFVPRLYGFKIHSLAYQIQ----- | |
| -----VTQFVPRLYGFKIHPVAYGGQEGNSGGNTANNVA | |
| LEKVEAAGGIATPGAAFFRRAAPVPTTASAEPTSAPAPAPAAAPAPPTSALAPAPVPTSTSTASSPQTAASKSMSASA | |
| -----LQ-GAEAESKNKL | |
| -----LQ-AASNFKSPVK | |
| -----LQ-AASNFKSPVK | |
| -----LQ-AAANFKMPLR | |
| AAQNNTTPAGQQSGGFNNYGL-----LQ-AASNFKSPVK | |
| VTTSTPLQSVPTSARF* | 402 aa. Ckb1 <i>U.maydis</i> |
| AIT*----- | 231 aa. CKIIb <i>S.pombe</i> |
| TIR*----- | 215 aa. CKIIb <i>H.sapiens</i> |
| T*----- | 209 aa. CKIIb Rind |
| AKN*----- | 215 aa. stellate <i>Drosophila</i> |
| TIR*----- | 249 aa. CKIIb <i>C.elegans</i> |

Abb. 23: Vergleich der Aminosäuresequenzen von CKIIb-Untereinheiten aus *U. maydis*, *S. pombe* (GenPept Accession T40159), Mensch (GenPept Acc. AAA52123), Rind (GenPept Acc. A25828), *Drosophila* (GenPept Acc. P08182) und *C. elegans* (GenPept Acc. P28548). Die N-terminalen potentiellen Autophosphorylierungsstellen, die bei *S. pombe*, Mensch, *Drosophila* und *C. elegans* identifiziert wurden, und dem Konsensus (S/T-X-D/E) (Pinna et al, 1990) entsprechen, sowie eine mögliche Autophosphorylierungsstelle in Ckb1 von *U. maydis* sind unterstrichen. Die konservierten Metallbinde-Domänen sind fett gedruckt.

2.5.4. Wachstum und Zellmorphologie der *ckb1*-Mutanten

Um zu überprüfen, ob die Disruption des *ckb1*-Gens das Wachstum der entsprechenden Stämme auf artifiziellen Medien beeinträchtigt, wurden für CL13, CL13pat4285, sowie CL13*ckb1::hyg* die Generationszeiten in Minimalmedium ermittelt. Hierbei ergab sich für CL13pat4285 mit 4,4h eine deutlich langsamere Wachstumsgeschwindigkeit als für CL13, der 3h pro Verdoppelung benötigt. CL13*ckb1::hyg* benötigt pro Verdoppelung der Zelldichte 5,1h. Dies verdeutlicht, daß der Defekt in der *ckb1*-Genfunktion die Wachstumsgeschwindigkeit auf Minimalmedium stark verlangsamt. Bemerkenswert ist, daß die Insertionsmutante CL13*ckb1::hyg* in ihrem Wachstum stärker beeinträchtigt ist, als die Originalmutante CL13pat4285. Auch die Zellmorphologie der *ckb1*-Mutantenstämme ist gegenüber dem Wildtypstamm deutlich verändert. In Flüssigkulturen der Mutantenstämme ist zu erkennen, daß sich die Zellen nicht normal teilen, sondern Tochterzellen mit der Mutterzelle verbunden bleiben und vermutlich vereinzelt abbrechen. Die Mutterzelle bleibt größer als die Tochterzellen und weist häufig unregelmäßige Verdickungen auf (Abb.24). Diese charakteristische

Zellmorphologie ließ sich sowohl in der Originalmutante CL13pat4285, als auch in den drei Insertionsmutantenstämmen beobachten (nicht gezeigt).

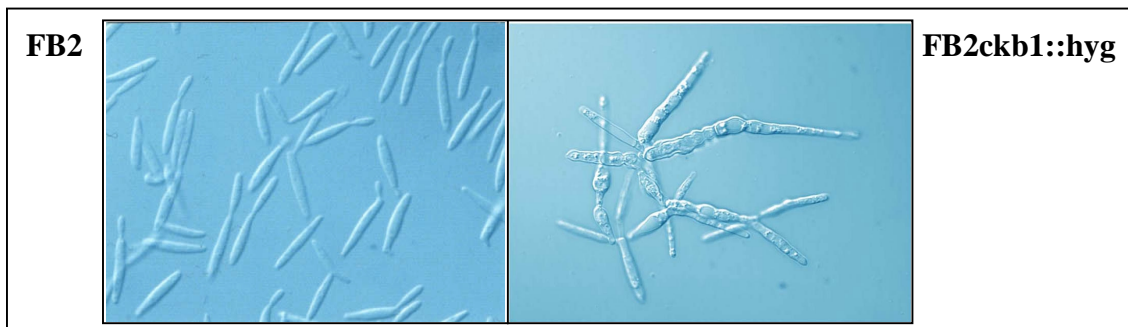


Abb. 24: Lichtmikroskopische Aufnahme von FB2 und FB2*ckb1::hyg* Flüssigkulturen. Die Stämme wurden in YEPS-Flüssigmedium für 18h inkubiert, und bei einer OD₆₀₀ von 0,8 mikroskopiert. Die Aufnahmen entstanden im Interferenzkontrast mit 400-facher Vergrößerung

2.5.5. Pheromonstimulation der *ckb1*-Mutanten

Auf Aktivkohle-haltigen Agarplatten kann nach 48-stündiger Inkubation für die Kombination der beiden Wildtyp-Stämme das Fusionsprodukt, ein kräftiges weißes dikaryotisches Luftmycel, beobachtet werden (Fuz⁺-Reaktion, Abb.25). Im Gegensatz dazu lassen die Kombinationen jeweils einer Mutante mit dem kompatiblen Wildtyp-Stamm nur schwache Fuz⁺-Reaktionen erkennen (Abb.25). Deutlicher ist die Reaktion der Mutantenstämmen mit dem jeweils kompatiblen diploiden "Pheromon-Tester"-Stamm FBD11-7 (*a1a1b1b2*), bzw. FBD12-17 (*a2a2b1b2*); diese diploiden Stämme benötigen zur Bildung des weißen Luftmycels nur den Pheromonstimulus eines kompatiblen Stammes, nicht jedoch die Zellfusion mit diesem. Die *ckb1*-Mutantenstämmen sind offensichtlich in der Lage, diesen Stimulus beizubringen. Bei Kombination der beiden *ckb1*-Mutanten miteinander wird kein weißes Luftmycel gebildet (Abb.25).

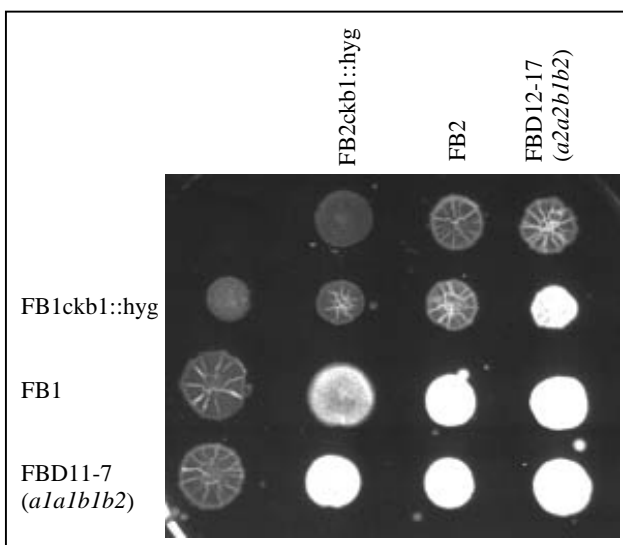


Abb. 25: Koloniemorphologie der *ckb1*-Mutantenstämmen in Kombination mit kompatiblen Wildtyp-Stämmen auf CM-Aktivkohleplatten. Die angegebenen Stämme wurden gemischt und für 48h auf CM-Aktivkohleplatten inkubiert. Folgende Stämme wurden verwendet: FB1 (*a1b1*), FB2 (*a2b2*), FB1*ckb1::hyg*, FB2*ckb1::hyg*, FBD11-7 (*a1a1b1b2*), und FBD12-17 (*a2a2b1b2*).

Das Paarungsverhalten der *ckb1*-Mutantenstämmen und kompatibler Wildtypstämmen wurde im Konfrontationsassay untersucht (Snetselaar et al, 1996). Hierbei werden Zellen kompatibler Stämme in unmittelbarer Nähe zueinander auf Wasseragar aufgebracht und mit Paraffinöl überschichtet. Im Fall der Konfrontation der beiden

Wildtyp-Stämme FB1 und FB2 diffundiert das Pheromon jeweils eines Partners zum kompatiblen Fusionspartner und löst dort die Pheromonantwort aus, wobei mikroskopisch die Ausbildung von Konjugationsschläuchen erkennbar ist (Abb.26). Die Reaktion des Stamms FB2 ist hierbei typischerweise etwas schneller als die des Stamms FB1, was dazu führt, daß nach 7h Inkubation die von FB2 gebildeten Konjugationsschläuche bereits deutlich länger sind, als die von FB1. Zum gleichen Zeitpunkt läßt der mit dem Stamm FB1 *ckb1::hyg* konfrontierte FB2 nur wenige kurze Konjugationsschläuche erkennen, während der mit FB2 *ckb1::hyg* konfrontierte FB1 noch keine derartige Entwicklung aufweist (Abb.26). Die beiden Mutantenstämme bilden weder in der Kombination miteinander, noch in der Kombination mit dem jeweiligen kompatiblen Wildtyp-Partner Konjugationsschläuche aus (Abb.26).

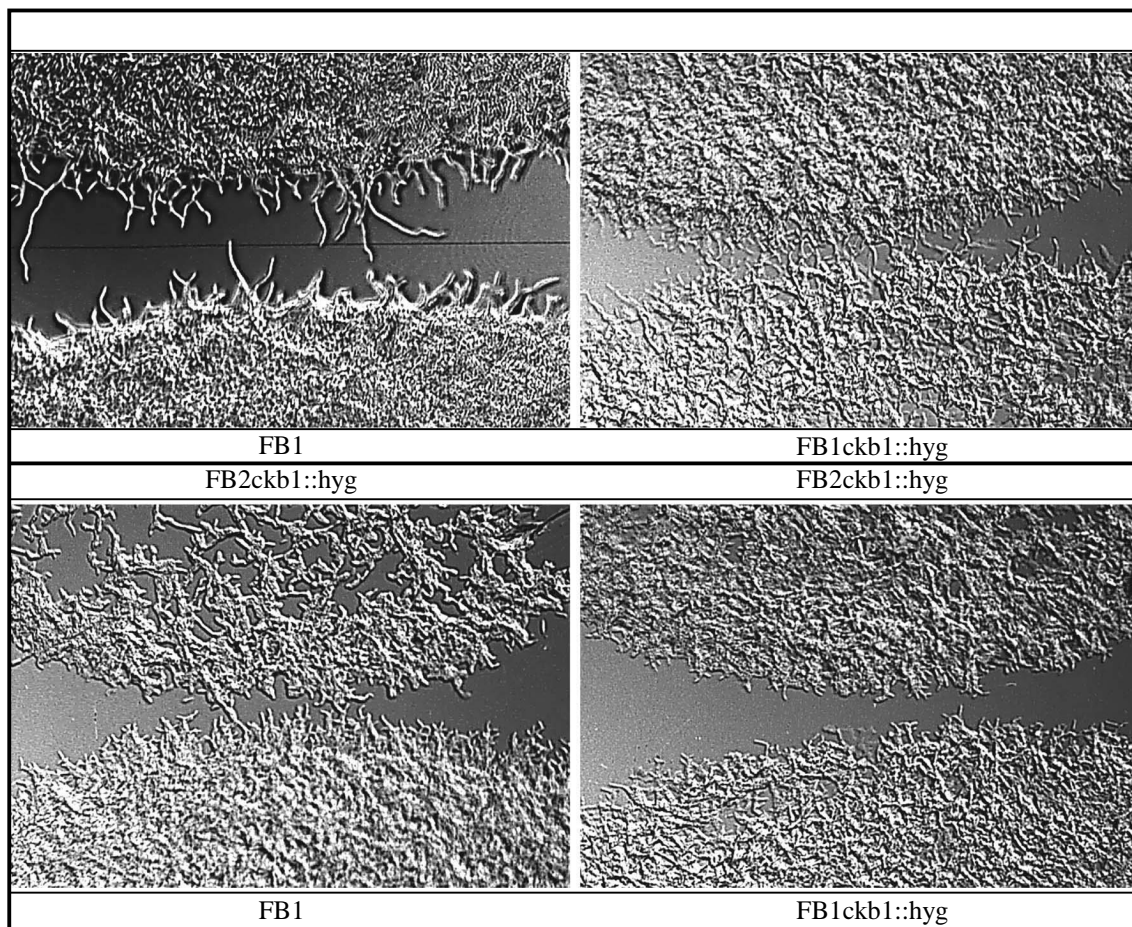


Abb.26: Konfrontationsassay (Snetselaar et al, 1996) der *ckb1*-Mutantenstämme und der Wildtypstämme FB1 und FB2. Zellsuspensionstropfen wurden in einem Abstand von maximal 50µm auf einen mit Wasseragar beschichteten Objektträger aufgebracht, mit Paraffin abgedeckt und 7h bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer inkubiert. Die Kreuzungsreaktionen wurden im Lichtmikroskop beobachtet und mit einem Zeiss Axiophot photographiert.

Um zu untersuchen, auf welcher Ebene der Zellfusionsdefekt der *ckb1*-Mutanten, auftritt, wurden Northern Analysen durchgeführt. Die Stämme FB1ckb1::hyg und FB2ckb1::hyg wurden miteinander und jeweils mit den kompatiblen Wildtypstämmen gekreuzt und auf CM-Aktivkohle-Platten kultiviert. Nach 48h Inkubation wurde RNA isoliert und in Northern Analysen mit einer genomischen *mfa1*-Sonde hybridisiert (Abb.27). Das *mfa1*-Transkript wird im Wildtyp FB1-Stamm auf basalem Niveau

exprimiert. Eine vergleichbare Expressionsstärke läßt sich auch in CL13 und CL13pat4285 detektieren (Abb.27 Spuren 1-3). In der Kreuzung mit FB2 verstärkt sich die *mfaI*-Expression in FB1 deutlich (Abb.27 Spur7). Eine vergleichbare Zunahme der Expressionsstärke läßt sich auch in der Kreuzung von FB1 mit FB2*ckb1::hyg* erkennen (Abb.27 Spur6). Dies zeigt, daß *ckb1*-Insertionsmutanten in der Lage sind, das Pheromon auf basalem Niveau zu exprimieren und einen kompatiblen Wildtyp-Partner zu stimulieren. Im Gegensatz hierzu läßt der Stamm FB1*ckb1::hyg* weder in der Kreuzung mit FB2*ckb1::hyg* noch in der Kreuzung mit FB2 ein *mfaI*-Expressionsmaß erkennen, das über das basale Niveau hinausgeht (Spuren 4 und 5). *ckb1*-Mutanten sind somit nicht in der Lage, auf die Pheromonstimulation eines kompatiblen Partners mit erhöhter Expression des eigenen Pheromons zu reagieren.

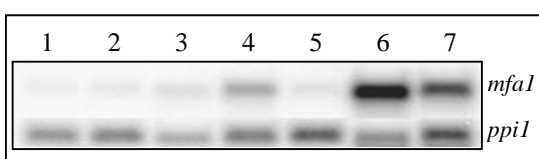


Abb. 27: Expression von *mfaI* in Wildtyp- und *ckb1*-Mutantenstämmen. Spur1: CL13; Spur2: CL13pat4285; Spur3: FB1; Spur4: FB1*ckb1::hyg* x FB2*ckb1::hyg*; Spur5: FB1*ckb1::hyg* x FB2; Spur6: FB1 x FB2*ckb1::hyg*; Spur7: FB1 x FB2. Die Hybridisierung mit *ppiI* dient als Kontrolle der aufgetragenen RNA-Mengen.

Die Ergebnisse der in Abb.27 dargestellten Northern Analyse und des Konfrontationsassays der *ckb1*-Mutanten- und Wildtypstämme (Abb.26) zeigen, daß die *ckb1*-Mutantenstämme das Pheromonsignal aussenden, und daher einen kompatiblen Wildtypstamm zu verstärkter Transkription der Pheromons und Ausbildung von Konjugationsschläuchen anregen können. Sie sind jedoch nicht in der Lage, auf das Pheromonsignal eines kompatiblen Kreuzungspartners durch Verstärkung des eigenen Pheromonsignals und Ausbildung von Konjugationsschläuchen zu reagieren. In der Kreuzung zweier kompatibler *ckb1*-Mutantenstämme bleibt die Zellfusion und nachfolgende Bildung des dikaryotischen Filamentes daher aus (Abb.25). Die Kreuzung eines *ckb1*-Mutantenstammes mit dem kompatiblen Wildtyp-Stamm führt zur Ausbildung des filamentösen Dikaryons, wenngleich in reduziertem Maße (Abb.27).

2.5.6. Koloniemorphologie von CL13pat4285 und CL13*ckb1::hyg*

Bei Wachstum der Stämme CL13pat4285 und CL13*ckb1::hyg* auf CM-Agarplatten wird ein signifikanter Unterschied zwischen beiden Stämmen beobachtet. Während CL13pat4285 hell gefärbte Kolonien aufweist, zeigen die CL13*ckb1::hyg*-Kolonien starke Dunkelfärbung und reduzierte Koloniegröße (Abb.28a). Mit einer Häufigkeit von etwa 0,1 bis 1% traten unter den dunklen kleinen Kolonien des Stammes CL13*ckb1::hyg* einzelne, hellere oder noch dunklere Kolonien auf, die besser wuchsen (Abb.30b). Diese Kolonien sind offensichtlich das Resultat von spontanen Suppressormutationen. Die nähere Analyse dieser Mutanten konnte jedoch aus zeitlichen Gründen nicht durchgeführt werden.

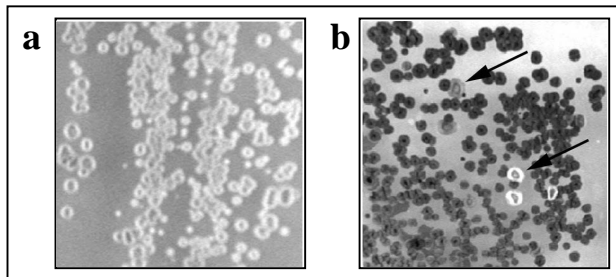


Abb. 28: Koloniemorphologie der *ckb1*-Mutantenstämme im CL13-Hintergrund. Die Stämme wurden 15h in YEPS-Flüssigmedium inkubiert, die Zellsuspensionen auf CM-Agarplatten aufgetroft. Nach 5d Inkubation bei 28°C wurden die Platten fotografiert. **a:** CL13pat4285, helle Einzelkolonien. **b:** CL13*ckb1::hyg*, dunkle Einzelkolonien. Zwei größere Kolonien, vermutlich das Resultat spontaner Supressormutationen, sind durch Pfeile hervorgehoben.

Der Ausfall der *ckb1*-Genfunktion führt in den entsprechenden Mutantenstämmen zu pleiotropen Effekten, die Morphologie und Genexpression betreffen. *ckb1*-Mutantenstämme sind nicht nur apathogen, sie weisen darüber hinaus auch eine veränderte Zellmorphologie, verzögertes Wachstum und den Verlust der Pheromonstimulierbarkeit auf.

2.6. Charakterisierung der Mutante CL13pat4339

Die Sequenzanalyse des in p4339 klonierten Bereichs hatte auf beiden Flanken einen potentiellen durchgehenden Leserahmen erkennen lassen, der für 268 Aminosäuren kodiert, und 33% Identität, bzw. 46% Ähnlichkeit zu dem Gen aus *Dictyostelium discoideum* aufwies, das für die alpha-Glucosidase ModA codiert (Abb.31).

Die Bestätigung der Kopplung zwischen der Plasmidinsertion und dem Pathogenitätsverlust in dieser Mutante konnte durch Rücktransformation des linearisierten Plasmids p4339 in CL13 erbracht werden. Die Stämme CL13pat4339R#1, 5, 8, 10, 11, 12 und 14, die durch ein zweifaches homologes Rekombinationsereignis pSMUT an derselben Stelle im Genom integriert hatten, wie CL13pat4339, waren im Pflanzentest apathogen (siehe 2.1.3)

2.6.1. Identifizierung des in CL13pat4339 betroffenen Gens, *gas1*

Da die Kopplung zwischen der Insertion in dem identifizierten potentiellen Leserahmen und dem Verlust der Pathogenität bewiesen war, sollte nun der gesamte transkribierte Bereich des in CL13pat4339 mutierten Gens isoliert und sequenziert werden.

Zu diesem Zweck wurde zunächst ein in diesem potentiellen Leserahmen gelegenes 337bp BamHI-NruI Fragment aus p4339 isoliert, radioaktiv markiert und als Sonde für die Durchmusterung der cDNA-Bank und der Cosmid-Bank verwendet (Sonde 4339-1, Abb.29). Dies führte zur Identifizierung des Cosmidklons 15B6, der den genomischen Bereich des Insertionsortes beinhaltet. Aus dem Cosmid 15B6 wurde ein 11kb MluI-Fragment isoliert und in pUC19 kloniert. Das resultierende Konstrukt wurde mit pGasM11 bezeichnet. Die Sequenzanalyse ergab, daß das klonierte Fragment den gesamten Leserahmen beinhaltet, der an der Insertionsstelle identifiziert worden war. Bei der Durchmusterung einer λ ZapII cDNA-Bank des Stammes FB1 (Hartmann, 1997) konnten mehrere Klone isoliert werden, die sich in der Restriktions- und Sequenzanalyse als verschieden große partielle cDNA-Klone des identifizierten Leserahmens erwiesen. Der cDNA-Klon p4339c14, der mit einer Fragmentgröße von 2,8kb den größten der identifizierten Klone darstellte, beinhaltete das 3'-Ende der

cDNA, jedoch nicht deren 5'-Ende. Durch abermalige Durchmusterung der cDNA-Bank mit dem 5'-Ende des Klons p4339c14 ließ sich schließlich das Plasmid p4339c8-2 isolieren, das das 5'-Ende des identifizierten Leserahmens enthält. Die beiden Plasmide p4339c8-2 und p4339c14 haben 1074bp des Leserahmens gemeinsam (siehe Abb.30).

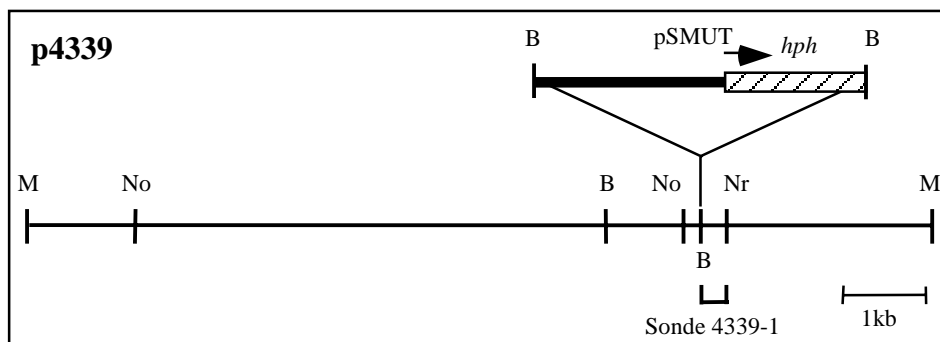


Abb. 29: Restriktionskarte von p4339. Die Schnittstellen der Restriktionsenzyme BamHI(B), MluI(M), NotI(No), und NruI(Nr) sind eingezeichnet. Der pSMUT-Anteil von p4339 ist als Insertion dargestellt. Die zur cDNA- und Cosmid-Hybridisierung verwendete Sonde ist eingezeichnet.

Die Sequenzanalyse von genomischer und cDNA ergab keine Hinweise auf Introns. Der identifizierte Leserahmen kodiert für ein Protein von 1061 Aminosäuren (siehe Abb.30), das signifikante Ähnlichkeit zur Enzymklasse der alpha-Glucosidasen aufweist. Aufgrund dieser Ähnlichkeit wurde das in CL13pat4339 betroffene Gen mit *gas1* (für alpha-Glucosidase) bezeichnet. Die REMI-Insertion der Mutante CL13pat4339 ist im Leserahmen erfolgt, an der Position, die Aminosäure 882 entspricht (Abb.30).

| | |
|--|------|
| TGACTGCGATGTGTAGCTGAGTGGATGAGCCCAGCAGCAAGTCGAGATCATTGAGCACAGGTCCAACCACTAACCAACCA | 80 |
| ATCAAGTAACTTATCCACGAACGTTGAAATTTGATGCATTCACCTTGTGACTGATTTCGTGATTCCAGATGGACGATTTCTT | 160 |
| CCAGTTTGTTCCTTCTAAATCTGAAATTTTCAGCTTGTGATGGCCGAAATCCGATTTGAGTCACTAGTCGGAGCGTA | 240 |
| AGCCGTGCGAGAGGAGACTCACGACCAGTTCACCAACAGCAGCGACCCTCAGATCAGTAAGACTTGTGAATCTTGTAC | 320 |
| ➔ | |
| GCGGCTTGTTCATTTGGCACTCGATCACCGTTTGAACCGCTTTGCCAGAGTCAGTGTAGATCTCAGCATATACGTCAAT | 400 |
| ATGATCAGCAAGCATCGCTGGTCATGCACCTTTGCTTTGTAGCTGCCTCTTGGTTGTTGGCGCTTTGTTCCGCTCGACCTGC | 480 |
| M I S K H R W S C T L L C S C L L V V G A L F A R P A | 27 |
| CGAGGCAGTACGAGAACACGACTTCAAAAAGTGCCGTGATTCGCTCTTGTGTCGAGGATTCGAAGACAGTCAGAGTACG | 560 |
| E A V R E H D F K K C R D S S F C R R I R R Q S E Y V | 54 |
| TCGAGCAATGGCAGCACGACCATAAAGAATCTTTCACATCGCCTACTACATTCATCTCCCGCACCAACTTTGTGCAC | 640 |
| E Q W Q H D H K E S F T S P Y I P S P A P N F V H | 80 |
| AGCAACGCTAGCATCAGCTTCCCTTGTTCATCTGCACCTTCATCTGATATCCAATTCGAGCTCTCTCTCACCTTTTTCAG | 720 |
| S N A S I S F P L S S A L H P D I Q F E L S L T F F R | 107 |
| AGATGGCACTGCTCGTGTTCGCGCAGATCAAGTAGGTGAGAGATACGGCGACTGGAAACGCTACGACGAAGCTGCAAT | 800 |
| D G T A R V R A D Q V G Q R Y G D W K R Y D E A A V W | 134 |
| GGGCCATCGAACAGCTCCCTGAGCTGGCTTTCAGCACCTTCTGACACCCGCATCCAGACTACCACGGACGGCTTCCAGGTT | 880 |
| A I E Q L P E L A S A P S D T R I Q T T T D G F Q V | 160 |
| GACTTCGGACCGCAGCTCTCTCGCTCGGTCAAACCTCAATTAATTCGCGCTCAAGATCGAAATACTCCGGGATGGAGAGAC | 960 |
| D F G P Q L S R S V K L N Y S P L K I E I L R D G E T | 187 |
| GCAGGTCAATCTCAATGACCGTGGCCTCATGCACATGGAGCATTATCGTAAGAAACCAGAGCCCTTCCCGACGGTCAAGC | 1040 |
| Q V I L N D R G L M H M E H Y R K K P E P F P T V K Q | 214 |
| AAGAAGTACAGGAAGTGCACAGCTCGTCTTCCAACGCAAAAAGAGCTATCCTCGGCTTCTCTCTGCATCTCGCTTC | 1120 |
| E D Q E V S Q L V F Q R N K R A I L G S S A S R F | 240 |
| AGTGAATCGCTCGTCTCGCAATGGGCTGGCTTCGAGCAGGAGGATCAAGGCGAATGGGAAGAGAGCTGGGCTTCTCGTCC | 1200 |
| S E S L V S Q W A G F E Q E D Q G E W E E T W A S R R | 267 |
| TGATAGCAAGCCTAAGGCCAGAAAGCTTTGGCTTAGACATGACCTTCCCGGATATTCGCACCTCTTGGTCTTCCCG | 1280 |
| D S K P K G P E A L A L D M T F P G Y S H L F G L P E | 294 |
| AGCATGCTCTCTCTTCTTGGCTCAACAAGGGCTCTGTGGCTCGATGCGGCTCAAGACGAGAAAGATCGCTTC | 1360 |
| H A S P L S L R S T R A P V G L D A A Q D E K D R F | 320 |
| GACGAGCCATATCGACTCATGAACACCGACGTTTTTCGAGTACGATTACAATTTCCCATGAGCCTCTACGGTAGCGTTCC | 1440 |
| D E P Y R L M N T D V F E Y D Y N S P M S L Y G S V P | 347 |

| | |
|---|------|
| TGTTTTGCACGCCAGAGCAAAGACCGCGCCGTCTTCTGGCTCAATGGTGCAGAAACCTGGATTGATCTGCACA | 1520 |
| V L H A Q S K D R A V S V F W L N G A E T W I D L H K | 374 |
| AGTCCAAGTCGTGCAACTCCAAGTCAATCCAGCGTTGACTGCTACTCACACTTCTTCTCCGAGTCAGGTATTCTTGACCTA | 1600 |
| S K S S N S K S S S V D S Y S H F F S E S G I L D L | 400 |
| TTCATCTTCACTTCTGCTGATGCCAGACCAACATGGCCCACTTACCAGGATGGTGGTCCGACCGTTTTGCGCAATA | 1680 |
| F I F T S A D A Q T N M A H F T R M V G R T V L P Q Y | 427 |
| CTTTGCCATTGGCTATCACCAGTGTGATGGAACCTCACTGACTCGGACGTCAAGGACGTGAGTCAACGATTCGACG | 1760 |
| F A I G Y H Q C R W N Y L T D S D V K D V S Q R F D D | 454 |
| ATGAAGACATTCATGGATGTCTGTGGCTCGATATCGAGTACAGCAAGGATCACATGTACGGCTCTGGGATGAAAAG | 1840 |
| E D I P M D V M W L D I E Y S K D H M Y G V W D E K | 480 |
| GCATTCAAGGATCCCGAAGCCATGGTCAAGGCGCTCGACGACAAAGGACGCAAGCTCGTCATCATCATCGATCCCCACCT | 1920 |
| A F K D P E A M V K A L D D K G R K L V I I I D P H L | 507 |
| GAAGCGCACTCGAGACTACTGGCTCTACGCTGAAGCTCAGGACAAAAAGTTGCTTGTCAAGGACTCGGACCGCGACGGCG | 2000 |
| K R T R D Y W L Y A E A Q D K K L L V K D S D R D G E | 534 |
| AGTTCGAAGGCTGGTCTGGAGCGCATGCCAGTGGCTCGACATGTTGAGCCTGCCAGTTGGCAGTGGTGGGCTGAT | 2080 |
| F E G W C W S G S A S W L D M F F E P A S W Q W W A D | 560 |
| | ◀ |
| CAGTTCAGCCTCGTGGGCAACAAGCTTGTGGCAAAATACGTGCCAATGCCCGCAACGTGTTCTGCTGGAACGACATGAA | 2160 |
| Q F S L V G N K L A G K I R A N A R N V F V W N D M N | 587 |
| TGAGCCAGCATCTTCAATGGTCTGAGGTCACCTCGCCCAAGGATGTATCCACGCCGGCGTTGGGAGCATAGAGATC | 2240 |
| E P A I F N G P E V T S P K D V I H A G G W E H R D L | 614 |
| TGCACAACATCAACGGCGTCTTTTCCACAATCAAACCGCACGGGGCTTCGCGATCGAGAGCTTTTGGTGGCCGCTCG | 2320 |
| H N I N G V L F H N Q T A R G L R D R E L L V P A S | 640 |
| TTGGGAGCGGCAACCGCTCGACCCCTTGTCCCTTCCCGCGCTGGTGGGTGGGAACCCAAAAGTACGGCGCCATCTG | 2400 |
| L G G G K P R R P F V L S R A W W V G T Q K Y G A I W | 667 |
| GACGGGTGACAATCTGGGACATGGGACACCTCGCAGTCAAGGTCAGCGTCCCATGATTTCTGGCCAACAATATCGGCGGCATGA | 2480 |
| T G D N L G T W E H L A V S V P M I L A N N I G G M S | 694 |
| GCTTTTGTGGTGTGATATAGGTGGTTTCTTTGGCAACCCGACTCCGACATGCTTGTGCGCTGGTACCAGGCGGGCATC | 2560 |
| F C G A D I G G F F G N P T P D M L V R W Y Q A G I | 720 |
| TTTGAACCTTCTTCCGAGCGCAGCTCATATCGACACCAAGAGAAGAGAGCCCTACCTTCTGGAGGAACCGCTTCAAG | 2640 |
| F E P F F R A H A H I D T K R R E P Y L L E E P L R S | 747 |
| TGCCGTTAGGACCTCATCAAGCTGCGGTACCAGATGCTTCTATGTGGTACACGGCCTTCAAAGACAACGCAGTAACAG | 2720 |
| A V R D L I K L R Y Q M L P M W Y T A F K D N A V T G | 774 |
| GTATGCCTGTGTGCGACCTCAATCTTGTATGTTCCCAACGATCCTGAGGGTTTCGACATCGACACGCAATATTATATC | 2800 |
| M P V L R P Q F L M F P N D P E G F D I D T Q Y Y I | 800 |
| GGCGACTCGGGCTTGTGGTGCCTGCTGCGGTAGACAAAGACGTTGACTCGGTCCAAGTGTATTTGGCCGAAGACCGACC | 2880 |
| G D S G L L V R P A V D K D V D S V Q V Y L A E D R P | 827 |
| GTACTACAATTTTACGCACCAATCTACCAAGGCTTGAACGCGCCGAGTGTGACGGTGGCGGCGCGCTTGACCG | 2960 |
| Y Y N Y F T H Q I Y Q G S E R G R S V T V P A P L T E | 854 |
| AGCAGCTGCCGTTGCTCCACCGTGGTGGATCGATCCTTCCGTTGCGAGAGCGCGCCAGACGCGCTGCCGAGTTGGGCCGT | 3040 |
| Q L P L L H R G G S I L P L R E R A R R A A E L G R | 880 |
| BamHI | |
| <u>TCCGATCCCTT</u> CACGCTGGTCAATTGCCCTGGACAAGCAAGAGCGTACAGGGAAGAGCGGCTCGAAAGACGTTCTTGCCGA | 3120 |
| S D P F T L V I A L D K Q E R T G K S G S K D V L A E | 907 |
| GGGAAGCTTGTATCTGGATGATGGCCAGACATGACTTTGAGGAGGGTCAATTTGTATGGCGTCCGCTTTCGAGTGGACTC | 3200 |
| G S L Y L D D G Q T Y D F E E G Q F V W R R F E W T R | 934 |
| GAAACAGTGAACAGGCATGCATTCGTTGCGAAGCATGGATGAGGCTAGCGTCAAGATGGCCGATACTCACTTGGTGCTG | 3280 |
| N S A T G M H S L R S M D E A S V K M A D T H L V L | 960 |
| GGAGACAGCAAACAGTTGCTTCCCTTACCAAGAGAAGAATGCTTTCGCGCAATCGATCAAAAGCGTTTCGCGTGTGCAAGCT | 3360 |
| G D S K Q L L P Y Q E K N A F A E S I K S V R V S K L | 987 |
| CGTCTACTGGGCTTGGATCGCGAACCAAAAGCTGTTTCAATCGACGGCAATCGCGTCAAGTGGCCCAACCCAGACTACTG | 3440 |
| V V L G L D R E P K A V R I D G N R V S G P T Q T T A | 1014 |
| CGATCGAGTGGGATTGGAAGAGTGGCTCAAGCTCGTCAAGGCGCTGCCTTCGGTTTGGGTTTCGAGCACAGCATCT | 3520 |
| I E W D W K S G S S S S S K G A A F G L G S S T A S | 1040 |
| GAGCTGATCATCAAAGATCCAGCTGTTGCCATTATTTCCGACTGGACATCGAGTTCGAGTTCGATACATTTATTCACA | 3600 |
| E L I I K D P A V A I I S D W T I E F E F * | 1061 |
| | ↔ |
| CCACCTTCAGATCTATCATTGCGAAATCGGATAGCGCATCTTCTGTGATCGGTATCAAACAAAAGACACCACAGCCTT | 3680 |
| CCAATGAGAATGATTGTGCAGCTCAACTGGCCGATGTGTGGGCCCTCCGTCAGGTAATTTGTGACTATCATAACT | 3760 |
| CGATCCCACCGAAGTTTTGCGTGTTCGTCAAAATTCGCGTAGCGCTCTCGCCTTAATGAGCCAGTGAAGTGTGGAGGT | 3840 |
| GTTGGAGATGCATGAAGCAAACGAAAGTGCAGCAAAACAGGATTTTGGGAATTCAGCTGTGAGGACTGCCACAAATCC | 3920 |
| TTCTGCCCTCCAACATCCAAGCCGATTCGATAACGACACGCTAAATGGCTTTGCTGGCTTCGTCAGATGCTTGAAT | 4000 |
| CCTCAATGCCAGGCTGGACTTTCGCGGCAATGATGAGCGCTCAAGAACTCTGCATTCCCACATGCATGCTTTTGTAGA | 4080 |
| GCAGTCCAAGGCGTTGCGTGGTTCCGTTAG | 4110 |

Abb. 30: DNA und abgeleitete Aminosäuresequenz von *gas1*. Die BamHI-Insertionsstelle ist unterstrichen. Beginn und Ende der partiellen cDNA p4339c8-2 sind durch schwarze Pfeile symbolisiert, Beginn und Ende der partiellen cDNA p4339c14 durch offene Pfeile.

Ergebnisse

| | | |
|------------|-------|--|
| Gas1 | (1) | ----MISKHRWSTLLCSCLLVVGFARPAEAVREHDFKKCRDSSFRCRRIRRQSEYVEQ |
| ModA | (1) | -----MRKLVILILSIV-CSLFIG-SIESVDTSKFKTKKDSHFCKRNR---VSHEV |
| C.elegans | (1) | -----MTAG--SSWIVPIIL-LATPLA-VQMK-RDDFKTCEQSFAFKQHRA--ITVRR |
| M.musculus | (1) | MAAIAAQAARRRRWSLSVLAYLGVCLG-ITLAVDRSNFKTCDESSFCRQR---SIRP |
| Gas1 | (57) | WQHDHKESTSPYYIPSPAPNFVHSNASISFPLSSALHPD--IQFELSLTFFRDGTARVR |
| ModA | (48) | GVMNEMKSKQNFNIVEG-SIKLVKQENTIYFDLQEQNQS--NLLTMKLEIYEGGIVRMR |
| C.elegans | (48) | GSQNHNN----WSLQEPPTYELLADSI THHGAVWTANVRNSQNTLKLINVIGLADSTVRVQ |
| M.musculus | (56) | GLSPYR-----ALLDT--LQLGPDALTVHLIHEVTKV-----LLVLELQGLQKMNTRIR |
| Gas1 | (115) | ADQVQORYGDWKRYDEAAVWATEQLPELASAPSDTRIQTDTDGFOVDFGPGQLRSRVKLVNY |
| ModA | (105) | AQEK-EPLLNKORYQVDV--LLDTIKTVPIQWKQEPSKQNTFSFKHGEKECCYVLVQL |
| C.elegans | (104) | IDEP-ESAI-RKRYVPNPA--LVSLPELEFSSV---ENGQEAKITGGNK-KLKVVVVTY |
| M.musculus | (103) | IDEL-E-PR-RPRYRVPDV--LVADPEPTARLSVS---GRDDNSVELTVAEG-PYKIILTA |
| Gas1 | (175) | SPLKIEILRDGETQVILNDRGLMHMEHYR-----KKPE-P-----FPTVKQEDQEVSQ |
| ModA | (162) | VPFKLDVYIMNELAITNSDNLFHFEPIS-----DKPQ-P-----LPPKEKKSEENK |
| C.elegans | (156) | KPFLVSIFNEFDELVAQLNR-----DGK-----LKVVEFRTKEEGK |
| M.musculus | (154) | QPFRDLLEDRSLLSVNARGLMAFEHQRAPRVPFSDKVSALGVSVDKIKNLFSRQESK |
| Gas1 | (222) | LVFQRNKRAILGSSASRFSLSLWSQWAGFEQEDQEWEEETWASRRDSKPKGPEALALDM |
| ModA | (209) | ---EAN-QEEDNNNNNNNDNNEE--QQ---VSTE-GYWEERFQSGHDSKPNQPMISGMDF |
| C.elegans | (192) | ---E-----YPE-----GFWEERFKGFTDHKQHGSSSVGVDI |
| M.musculus | (214) | DPAEGNGAQPEATPGDGDKEE--TQEKAEKDEP-GAWEETFKTHSDSKPYGPTSVGLDF |
| Gas1 | (282) | TFPGYSHLFLPEHASPLSLRSTRAPVGLDAAQDEKDRFDEPYRLMNTDVFYDYNSPMS |
| ModA | (258) | TFVGSSSHVYGIPEHTRLSLKSTTNG-----INEQPYRLYNLDVFEYEIDKTMA |
| C.elegans | (221) | SFVNFKTAYGLPEHADAFALRNTVGN-----DPYRLYNLDVFEYELNPMMA |
| M.musculus | (271) | SLPGMEHVYGIPEHADSLRLKVTGG-----EPYRLYNLDVFEYELNPMMA |
| Gas1 | (342) | LYGSVPEVLHAQSKDRAVSFWLNGAETWIDLHKSSSNS---K-----SSS--VDSYS |
| ModA | (308) | LYGHVPLMISHDTKTKTVGVFWLNAEFTVDIEDVTPVS-----PSKKT |
| C.elegans | (268) | LYVSIPIYLAAHRANRSVGLWFAAETWVDTQSSVTSKGLFGKMLDKVTGSSDNVPHFDA |
| M.musculus | (317) | LYGSVPEVLLAHSFHRDLGI FWLNAEFTWVDISSNTAGKTLFGKMLDYLQSGGE-TPQTDI |
| Gas1 | (390) | HFESGILDLEIFTSADAQTNMAHFTRMVQRTVLPQYFAIGYHQCRWNYLTDSDVKDVS |
| ModA | (352) | HWISSEGIIDVFYLTGPTPSTIFKQYAYLTGTTALPQMFSLYGHQCKWNYKSEDDVKQVD |
| C.elegans | (328) | HFISSEGLVDVFFVFGPTVKDQVRQNSKLTGVTPLPPLFSIGYHQCRWNYNDEQDVATVN |
| M.musculus | (376) | RWMSSEGIIDVFLMLGPSVFDVFRQYASLTGTQALPPLFSLGYHQSRWNYRDEADVLEVD |
| Gas1 | (450) | QRFDDEDIPMDVMWLDIEYSKDHMGVWDEKAFKDEPAMVKALDDKGRKLVIIIDPHLKR |
| ModA | (412) | NGFDENHIFVDVWLDIEHTDGKRYFTWDNNFPPTADMQNIIGAKHRKMTIVDPHIKR |
| C.elegans | (388) | QGFDDHMPMDVWLDIEHTDGKKYFTWDKHKFPPTNDMVDKVAACKGRKMTIVDPHIKK |
| M.musculus | (436) | QGFDDHNMPCDVIWLDIEHADGKRYFTWDPTRFPQLNMLEHLASRRKLVAVIDPHIKV |
| Gas1 | (510) | TRDYWLYAEAQDKLLVKDSRDRG-EFEGWCWGSASWLDMFEFASWQWWADQFSLVGNK |
| ModA | (472) | DNNAVHSEATSKGYYIKN--KDGNDYDGCWPGSSSYLDFTNPEIRKWWATQFGY--DK |
| C.elegans | (448) | DDGYVYKDAKDKGLFVKR--VDGSDFEHGCWPGSSEYLDFWHPDTRSYWKDQFAF--DR |
| M.musculus | (496) | DSGYRVHEELRNHGLYVKT--RDGSDYEGWCWPGSASYPDFTNPRMRAWWSNMFSF--DN |
| Gas1 | (569) | LACKIRANARNVFWNDMNEPAIFNGPEVTSKDVITHAGGWEHRDLHNNINVLVFNQATAR |
| ModA | (528) | YKG----STPNLYIWNMNEPSVFNNGPEVSMHKDAKHGGFEHRDVHNLGYYYHMASAD |
| C.elegans | (504) | YTC----SSNLHIWNMNEPSVFSGPEITMDKESITHYGGIEHREITHNMYGMYTSATFD |
| M.musculus | (552) | YEG----SAPNLYVNDMNEPSVFNNGPEVTMLKDAVHYGGWEHRDIHNIYGLYVHMATAD |
| Gas1 | (629) | GLRDRPELLVPASLGGGKPRPFVLSRAWVVGTKYGAIWTDGNLGTWEHLAVSVPMILAN |
| ModA | (584) | GLVQR-----NADQNDRPFVLSRAFYAGSQRIGAIWTDGNSAQWHSLEISNPMLLSM |
| C.elegans | (560) | GMIAR-----TGGK-ERPFLLSRAGFIGTQRTAAIWTDGNTADWGHLEIAAPMTLSL |
| M.musculus | (608) | GLIQR-----SGGI-ERPFVLSRAFFSQRFGAVVTGDNTAEWDHLKISIPMCLSL |
| Gas1 | (689) | NIGGMSFCGADIGGFFGNPTDMLVRWYQAGIFEPFFRAHAHIDTKRREPYLEEPLRSA |
| ModA | (636) | NLAGITFSGADVGGFFGNPDAELLTRWYQAGAFQPFPRGHALDSRRREPWLFEPEYTTI |
| C.elegans | (611) | SIAGVPFVGADVGGFFGNPDEQLLSRWYQTAAPQPFPRRAHAHIDTRRREPWLFESEQTQOI |
| M.musculus | (659) | ALVGLSFCGADVGGFFKNPEPELLVRWYQMGAYQPFPRRAHAHLDTGRREPWLASQYQDA |
| Gas1 | (749) | VRDLIKLRYQMLPMWYTAFKDNAVTGMPVLRPQFLMFPNDPEGFIDITQYYIGDSGLLVR |
| ModA | (696) | IREAIVKRYSYLPLWYTTFYQNTLNGAPVMRPLWVQYKPEANLFDVDDHYLIGD-SLLVK |
| C.elegans | (671) | IREALRTRYALLPYWYTLFQOHTENGVPMPRPLFYEFENDDLLLEQKQWVMSG-GILAR |
| M.musculus | (719) | IRDALFQRYSLLPFWYTLFYQAHKEGFPVMRPLWVQYPEDMSTFSEDQFMLGD-ALLIH |

| | | |
|--------------------|--------|---|
| Gas1 | (809) | PAVDKDVDSVQVYLA---EDRPYNYFTHQIYQGSERGRSVTPAPLTEQLPLLRGGS |
| ModA | (755) | PVTQQSCKTMKVLPLP-GQSVNEIWDVDTEKPINA----GVTEIDTPLEK-IPVYQRGGS |
| <i>C. elegans</i> | (730) | PVVEKDTFNVOVKLPRGEHKTERWFVWVSGNEVVRG---ESIYVDAPITF-TPIYQRGGT |
| <i>M. musculus</i> | (778) | PVSDAGAHGVQVYLP-G--QEVEWYDIQSYQKHHGP---QTLYLPVTLSS-IPVFQRGGT |
| Gas1 | (865) | TLPLREFARRAAELGRSDPFLLVIALDKQERTGKSGSKDVLAEGLSLYLDGQTYDFEE-G |
| ModA | (809) | IISKKEVRRSTYQMRDDPYTIRIALDSSK----S-----AQCQLYIDDEHSFDYKK-G |
| <i>C. elegans</i> | (785) | IIPWQRIRRSATLMKDDPIITLFVALDSNE---N-----SNGEILYLDGNTHDYQS-G |
| <i>M. musculus</i> | (831) | IIVPRWVRVRRSSDCMKDDPIITLFVALSPQG---T-----AQGELFLDDGHTFNQYQTRH |
| Gas1 | (924) | QFVWRRFEWTRNSATGMHSLRSMDEASVKMADTHLVLGDSKQLLPVQEKNFAESIKSVR |
| ModA | (858) | KFLYRQFTFKD-----NVLSEFSDASNKS---STS-----YK-----PNVT |
| <i>C. elegans</i> | (834) | QFVKASFKYT-----TLSKNSAMLEGE--HLDG-----KYA-----AKNW |
| <i>M. musculus</i> | (881) | EELLRRFSFSG-----STLVSSADPKG--HLE-----TPIW |
| Gas1 | (984) | VSKLVVLGLDREPKAVRIDGNRVSGPTQTATAIEWDWKSGSSSSSKGAAFGLGSSTASELI |
| ModA | (890) | IEKIVILGVQ-KPHSITC--NITG--KEKLSFEYDS-----TLSKLT |
| <i>C. elegans</i> | (867) | IERVVVRGVESSEPKVET--TRVSDPVQSLEFSYDH-----DSKVLV |
| <i>M. musculus</i> | (911) | IERVVIMGAG-KPAAVVL--QTKGSPESRSLFQHP-----ETSVLI |
| Gas1 | (1044) | IKDPAVAIISDWTIEFEF |
| ModA | (927) | IRKPDLLVDTFI IKLN- |
| <i>C. elegans</i> | (907) | IRKPEALLTSSFKVHIEF |
| <i>M. musculus</i> | (950) | LRKPGVSVASDWSIHLR- |

Abb. 31: Sequenzvergleich von Gas1 aus *U. maydis*, ModA aus *Dictyostelium discoideum* (EMBL, Accession Z70753) und den ER-alpha-Glucosidasen aus *Caenorhabditis elegans* (Genbank, Accession AF026208) und *Mus musculus* (Genbank, Accession U92793). Aminosäuren, die in allen vier Sequenzen identisch sind, sind dunkelgrau hinterlegt, ähnliche Aminosäuren, sowie Aminosäuren, die in drei der verglichenen Sequenzen identisch sind, hellgrau.

In Abb.31 ist der Vergleich der Aminosäuresequenz von Gas1 mit den Sequenzen der alpha-Glucosidasen ModA aus *Dictyostelium discoideum*, der alpha-Glucosidase II aus *Mus musculus* und der alpha-Glucosidase II aus *Caenorhabditis elegans* gezeigt. Eine deutliche Ähnlichkeit zwischen den Sequenzen erstreckt sich über weite Bereiche der Proteine (Abb.31). Zwischen Gas1 und ModA bestehen 36% Identität, bzw. 54% Ähnlichkeit. Die katalytische Konsensus-Sequenz (G/F)-(L/I/V/M)-W-X-D-M-N-E der Glycosyl-Hydrolasen, zu denen auch die alpha-Glucosidasen gezählt werden (Henrissat, 1991), läßt sich auch in Gas1 zwischen Aminosäure 585 und 590 identifizieren.

Nachdem die REMI-Insertion in der Mutante CL13pat4339 hinter dem angenommenen katalytischen Zentrum von Gas1 stattgefunden hatte, ließ sich eine mögliche Restaktivität des Enzyms in diesem Stamm nicht ausschließen. Aus diesem Grund wurden in den Stämmen FB1 und FB2 Nullmutanten erzeugt, in denen der *gas1*-Leserahmen vollständig deletiert ist.

2.6.2. Deletion von *gas1* in FB1 und FB2 durch Einbringen des *eGFP*-Reportergens

Um neben der Deletion von *gas1* zugleich die Möglichkeit zu schaffen, die Expression des Gens zu analysieren, sollte der Leserahmen durch das *eGFP*-Reportergen ersetzt werden. Die Expression des *GFP*-Gens läßt sich *in vivo* anhand der grünen Fluoreszenz des Genproduktes nach Anregung mit Blaulicht nachweisen (Cubitt et al, 1995). Das *eGFP*-Gen stellt eine durch Punktmutation im Chromophor veränderte Version des GFP dar, die ein 35-fach verstärktes Fluoreszenz-Signal emittiert (Cormack et al, 1996). Das Plasmid p Δ *gas1:eGFP* enthält einen Teil des *gas1*-Promotorbereichs, der transkriptionell mit dem *eGFP*-Leserahmen fusioniert wurde. Der gesamte *gas1*-Leserahmen wurde hierbei deletiert. In dem Konstrukt wurde die Hygromycin-Resistenzkassette 3' vom *eGFP*-Gen eingefügt (siehe Abb.32a und Methoden). Das

Plasmid *pΔgas1:eGFP* wurde mit KpnI im Vektoranteil linearisiert und in die Stämme FB1 und FB2 transformiert. Durch ein zweifaches homologes Rekombinationsereignis kann dabei das genomische *gas1*-Gen durch das *eGFP*-Nullallel ersetzt werden (Abb.32a). Um den homologen Austausch des Wildtyp-Gens durch das Nullallel zu überprüfen, wurde die genomische DNA der Transformanden mit NcoI geschnitten und im Southern Blot mit dem genomischen NcoI-Fragment (Sonde 4339-2, Abb.32a) hybridisiert. Im Falle des Austausches sollte anstelle der endogenen 3,8kb-Bande die verkleinerte 2,8kb-Bande des Nullallels detektiert werden (Abb.32b). In den aus einem doppelten homologen Rekombinationsereignis hervorgegangenen Transformanden steht die Expression des *eGFP*-Gens somit unter der Kontrolle des *gas1*-Promotors. Für FB1 ließ sich unter 5 überprüften Transformanden eine identifizieren, in der das Nullallel am homologen Genort integriert war (FB1Δ*gas1*:*eGFP*#5), für FB2 war es eine unter sechs Transformanden (FB2Δ*gas1*:*eGFP*#5). Das *gas1*-Gen ist somit offensichtlich nicht essentiell für das Wachstum von *U. maydis* auf artifiziellen Medien.

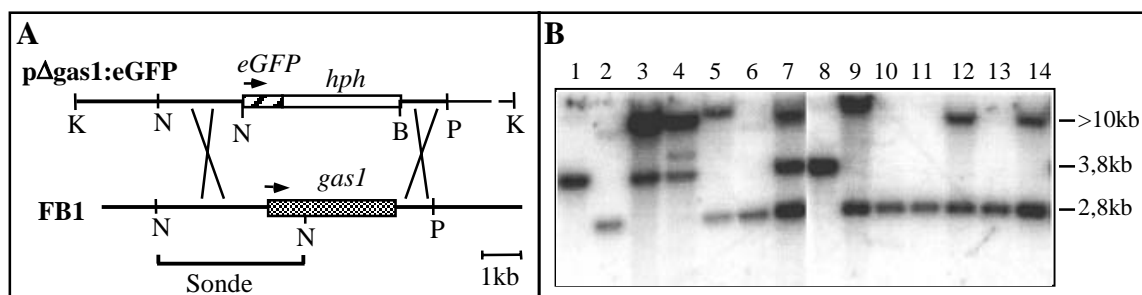


Abb. 32: Konstruktion der *gas1* Nullstämme FB1Δ*gas1*:*eGFP* und FB2Δ*gas1*:*eGFP*, in denen das *gas1*-Gen durch das Reportergen *eGFP* ersetzt wird. **a:** In dem Deletionskonstrukt *pΔgas1:eGFP* wurde der *gas1*-Leserahmen vollständig durch das *eGFP* Reportergen, sowie die Hygromycin-Resistenzkassette ersetzt. Am 5'-Ende des *gas1*-Gens wurde mittels PCR eine NcoI-Schnittstelle eingeführt, und am 3'-Ende des Gens eine BamHI-Schnittstelle. Darunter ist die genomische Organisation des *gas1*-Gens in FB1 dargestellt. Die Bereiche, über die eine homologe Rekombination stattfinden kann, sind durch Kreuze angedeutet. Die Restriktionsstellen der Enzyme BamHI(B), KpnI(K), NcoI(N) und PstI(P) sind eingezeichnet. Die mittels PCR eingeführten Schnittstellen sind unterstrichen. **b:** Southern Analyse von FB1 (Spur1) und 6 FB1-Transformanden (Spuren 2-7), sowie FB2 (Spur8) und 6 FB2-Transformanden (Spuren 9-14). Das Plasmid *pΔgas1:eGFP* wurde mit KpnI linearisiert und in FB1 und FB2 transformiert. Aus den Stämmen wurde die genomische DNA isoliert, mit NcoI geschnitten, und auf einem 1% Agarosegel aufgetrennt. Nach dem Transfer der Fragmente auf eine Nylonmembran wurde der Filter mit dem 3.8kb NcoI-Fragment hybridisiert. In den Ausgangsstämmen FB1 und FB2 (Spuren 1,8) hybridisiert die 3.8kb Wildtyp-Bande, in den FB1-Transformanden #1 und #5 (Spuren 2,6) sowie den FB2-Transformanden #2, #3 und #5 (Spuren 10,11,13) ist diese durch die 2.8kb-Bande des Δ*gas1*:*eGFP*-Allels ersetzt. Die Stämme FB1#5 und FB2#5 (Spuren 6,13) wurden mit FB1Δ*gas1*:*eGFP*#5, bzw. FB2Δ*gas1*:*eGFP*#5 bezeichnet.

Zunächst wurde überprüft, ob die beiden Stämme FB1Δ*gas1*:*eGFP*#5 und FB2Δ*gas1*:*eGFP* #5 auf aktivkohlehaltigem Festmedium miteinander fusionieren können (siehe Methoden). Hierbei zeigte sich, daß die Kreuzung der beiden Stämme nach 48h Inkubation das charakteristische weiße Filament des Dikaryons gebildet hatte. Die Fähigkeit, mit dem kompatiblen Kreuzungspartner zu fusionieren, ist in den Δ*gas1*:*eGFP* Stämmen demnach nicht beeinträchtigt (nicht gezeigt). Daraufhin wurde die Kombination der *gas1*-Nullstämme FB1Δ*gas1*:*eGFP* #5 und FB2Δ*gas1*:*eGFP* #5 auf ihre Pathogenität überprüft (Tab.11).

Tabelle 11: Pathogenitätstest der Kreuzungen FB1xFB2 und FB1 Δ *gas1:eGFP*#5 x FB2 Δ *gas1:eGFP* #5

| Inokulum | n | % Tumore |
|---|----|----------|
| FB1 x FB2 | 27 | 93 |
| FB1 x FB2 Δ <i>gas1:eGFP</i> #5 | 33 | 82 |
| FB1 Δ <i>gas1:eGFP</i> #5 x FB2 | 37 | 70 |
| FB1 Δ <i>gas1:eGFP</i> #5 x FB2 Δ <i>gas1:eGFP</i> #5 | 48 | 0 |

n = Anzahl infizierter Pflanzen

Das in Tabelle 11 zusammengefaßte Ergebnis belegt, daß die *gas1*-Genaktivität nicht nur im haploiden Stamm CL13, sondern auch in dem aus einer Kreuzung zweier kompatibler haploider Stämme hervorgegangenen Dikaryon essentiell für die pathogene Entwicklung ist. Die Kreuzung eines haploiden *gas1*-Nullstammes mit dem kompatiblen Wildtyp-Stamm ruft normale Pathogenitätssymptome hervor, d.h. die Zellfusion kann nicht gestört sein. Danach kann das *gas1*-Allel des Wildtyp-Kreuzungspartners den *gas1*-Verlust des Nullstammes in der Kreuzung komplementieren. Nachdem sich die Kreuzung der *gas1*-Nullstämme auf der Maisvarietät Golden Bantam als apathogen erwiesen hatte, wurde mit diesen Stämmen auch eine Tropfinfektion der besonders sensiblen Maisvarietät Gaspar Flint durchgeführt (siehe Methoden). Hierbei zeigten sich ca. 3 Tage nach Inokulation in der Δ *gas1*-Infektion wie in der Wildtyp-Infektion leichte Chlorosen und nekrotische Bereiche an jenen Stellen des Blattes, auf denen sich das Inokulum befunden hatte (Abb.33a und b). Auch zu späteren Zeitpunkten wurde in keinem Fall Tumorbildung beobachtet (Abb.33d).

Um zu überprüfen, ob *gas1*-Mutanten in ihrem Wachstum beeinträchtigt sind, wurden die Generationszeiten der beiden Stämme FB1 und FB1 Δ *gas1:eGFP*#5 in Minimalmedium bestimmt. Hierbei unterschied sich FB1 Δ *gas1:eGFP*#5 mit einer Generationszeit von 3h nicht von FB1. Darüberhinaus wurden beide Stämme auf verschiedenen Kohlenstoffquellen kultiviert. Als Kohlenstoffquellen wurden potentielle Substrate der alpha-Glucosidasen verwendet: die Disaccharide Maltose und Trehalose, das Polysaccharid Maisstärke, sowie ein Maisextrakt mit der Bezeichnung "Corn Steep Solids"(Difco). Als Kontrolle diente das Wachstum auf Glucose. Die verschiedenen Kohlenhydrate wurden einem Minimal-Festmedium zugesetzt, und die beiden Stämme FB1 und FB1 Δ *gas1:eGFP* #5 wurden auf diesen Platten ausgestrichen, so daß Einzelkolonien heranwachsen konnten. Die Koloniegrößen wurden verglichen (Abb.34).

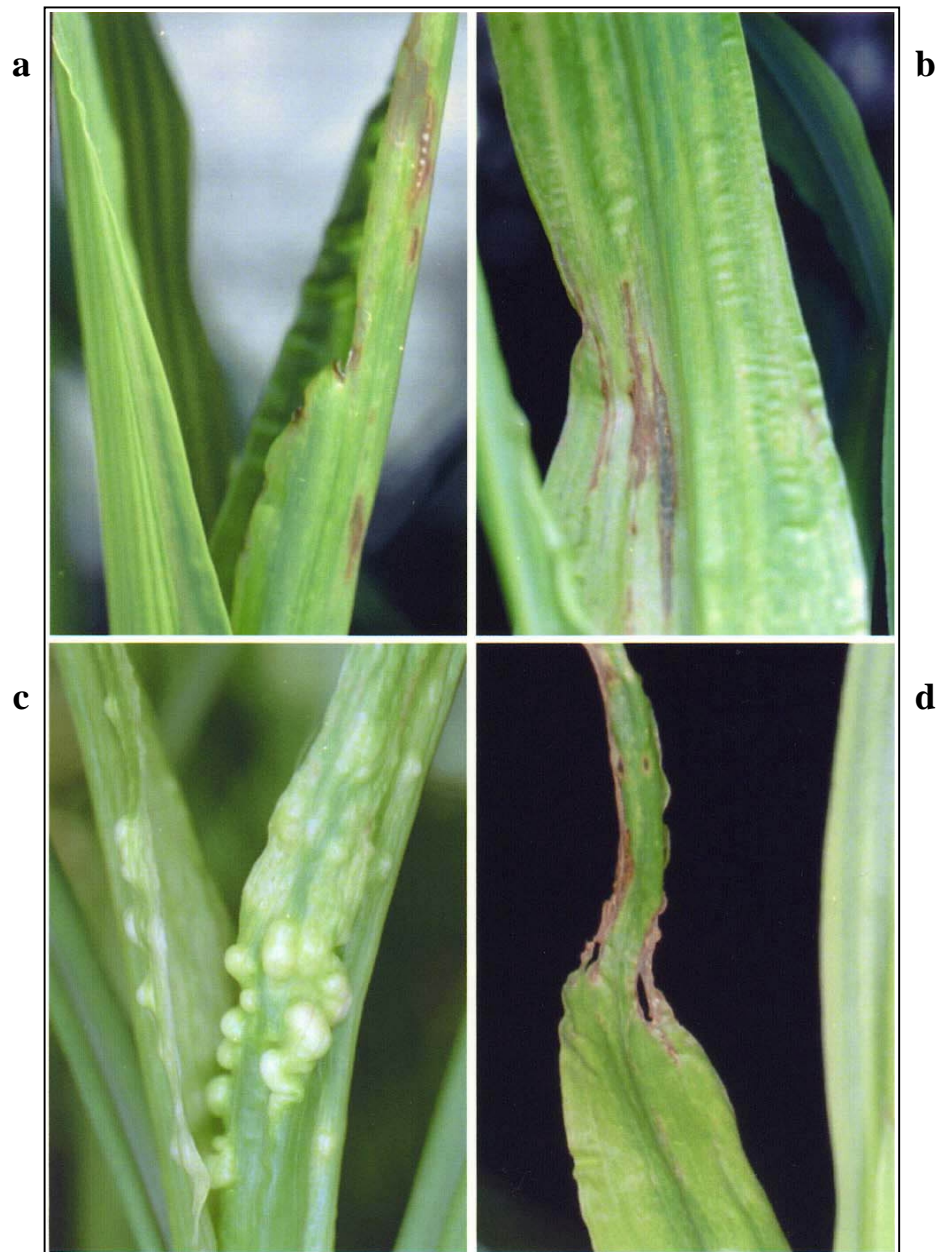


Abb. 33: Tropfinfektionen mit der Kreuzung FB1 x FB2, bzw. FB1 Δ gas1:eGFP#5 x FB2 Δ gas1:eGFP#5. Pathogenitätssymptome nach 3 und 10 Tagen. **a:** Wildtyp-Infektion nach 3d, Chlorosen und Nekrosen. **b:** Δ gas1 -Infektion nach 3d: Chlorosen und Nekrosen. **c:** Wildtyp-Infektion nach 10d, Tumorentwicklung. **d:** Δ gas1 -Infektion nach 10d, keine weiteren Symptome.

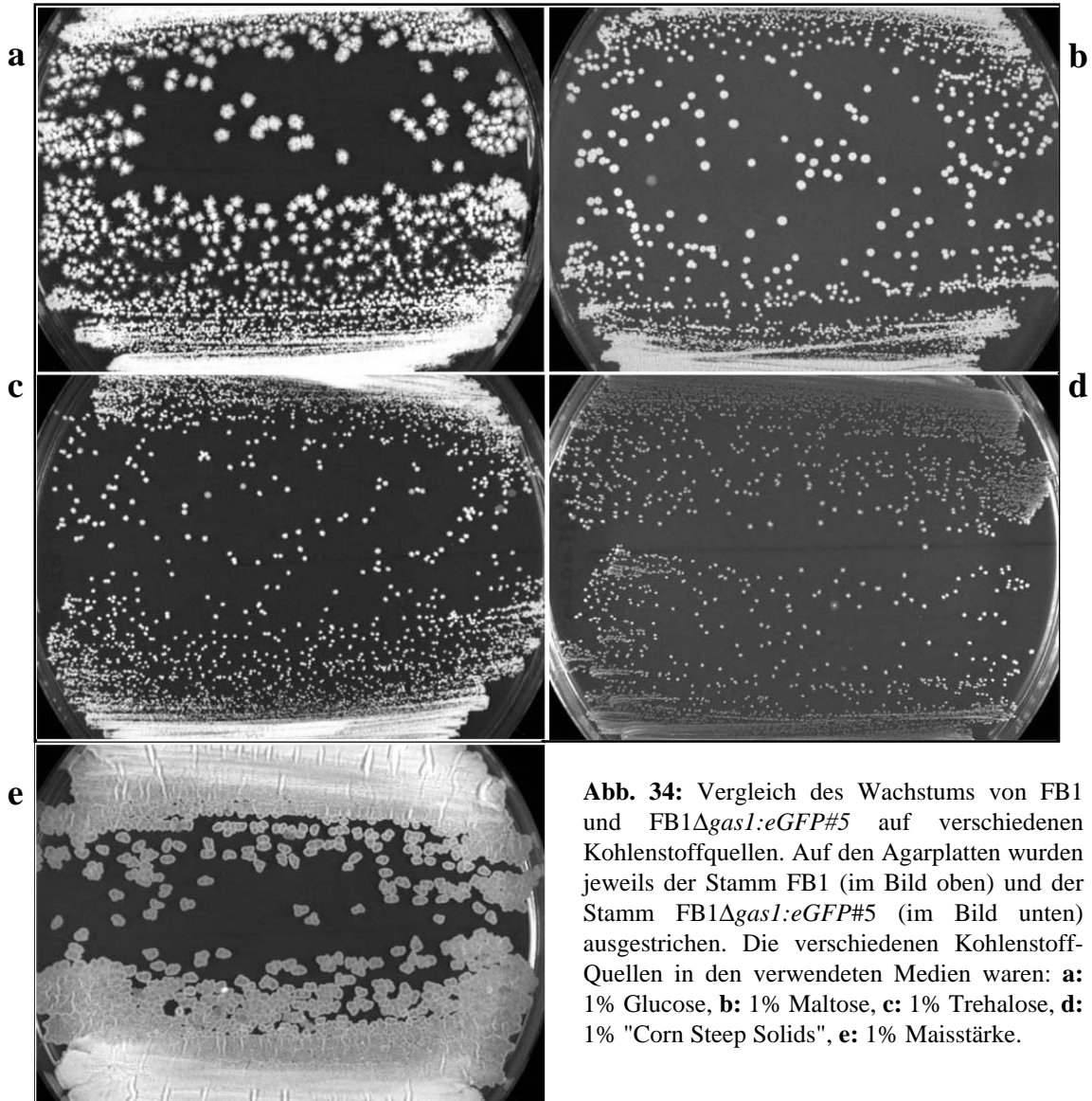


Abb. 34: Vergleich des Wachstums von FB1 und FB1 Δ gas1:eGFP#5 auf verschiedenen Kohlenstoffquellen. Auf den Agarplatten wurden jeweils der Stamm FB1 (im Bild oben) und der Stamm FB1 Δ gas1:eGFP#5 (im Bild unten) ausgestrichen. Die verschiedenen Kohlenstoff-Quellen in den verwendeten Medien waren: **a:** 1% Glucose, **b:** 1% Maltose, **c:** 1% Trehalose, **d:** 1% "Corn Steep Solids", **e:** 1% Maisstärke.

Auch die Fähigkeit des Stammes FB1 Δ gas1:eGFP#5, auf den getesteten Kohlenstoffquellen zu wachsen, unterscheidet sich nicht von der des Stammes FB1. Weder der Ausgangsstamm, noch der *gas1*-Nullstamm können Maisstärke effizient als einzige Kohlenstoffquelle nutzen. Auf den Kohlenstoff-Quellen Glucose, Maltose, Trehalose oder "Corn Steep Solids" bilden beide Stämme Kolonien vergleichbarer Größe. Diese Ergebnisse belegen, daß *gas1*-Mutanten in ihrem Wachstum außerhalb der Pflanze nicht beeinträchtigt sind. Eine Funktion von Gas1 im Kohlenhydratstoffwechsel von *U. maydis* ist somit unwahrscheinlich.

2.6.3. Expressionsanalyse von *gas1*

Mit Hilfe der in 3.6.2. beschriebenen Stämme FB1 Δ *gas1:eGFP#5*, bzw. FB2 Δ *gas1:eGFP#5*, in denen der *gas1*-Promotor die Expression des *eGFP*-Reportergens steuert, sollte auch analysiert werden, unter welchen Wachstumsbedingungen *gas1* exprimiert wird. Hierfür wurde die *eGFP*-Expression auf den unter 2.6.2. aufgeführten Festmedien, in Flüssigmedien derselben Zusammensetzung, und im aus einer Kreuzung der Stämme FB1 Δ *gas1:eGFP#5* und FB2 Δ *gas1:eGFP#5* auf CM-Charcoal Platten resultierenden filamentösen Dikaryon auf *eGFP*-Expression untersucht. Als Kontrollen dienten Kulturen der Stämme FB1 und FB2, die unter denselben Bedingungen kultiviert wurden. Hierbei zeigte sich in den Stämmen, die das *gas1*-Promotor-*eGFP* Reporterkonstrukt trugen, nach 15h Inkubation eine sehr schwache Fluoreszenz, die vom verwendeten Medium unabhängig in allen getesteten Kulturen auftrat und in Wildtyp-Kontrollstämmen nicht zu sehen war. Dies deutet auf eine schwache basale Expression des *eGFP*-Gens unter der Kontrolle der *gas1*-Promotors hin. Unter den getesteten Wachstumsbedingungen kommt es nicht zu einer Induktion der *gas1*-Expression. Die Expression von *gas1* im jungen und reifen Tumorgewebe einer infizierten Maispflanze wurde mittels Northern Analyse untersucht. Das *gas1*-Transkript liegt mit 3,2kb Länge im Northern Gel etwa auf derselben Höhe, wie die ribosomale RNA. Die Northern Analyse wurde daher mit PolyA⁺-RNA aus den Stämmen CL13 und CL13pat4339, sowie aus jungem und reifem Tumorgewebe einer FBD12-infizierten Maispflanze durchgeführt (Abb.35).

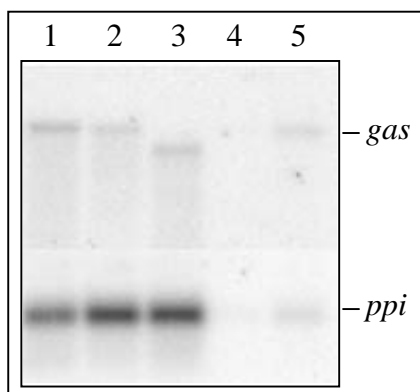


Abb. 35: Expression von *gas1*. Northern Analyse von polyA⁺-RNA des Stamms CL13(Spur1) nach 48h Kultivierung auf CM-Aktivkohle-Platte, der Stämme CL13(Spur2) und CL13pat4339(Spur3) aus CM-Flüssigkultur, sowie aus jungem (6d nach Infektion, Spur4) und reifem (12d nach Infektion, Spur5) Tumorgewebe einer FBD12-infizierten Maispflanze. Als Sonde diente das interne PstI-NotI-Fragment des *gas1*-Gens. Zur Kontrolle der *U. maydis* RNA-Menge wurde ein internes Fragment des konstitutiv exprimierten *ppi1*-Gens verwendet. Die *U. maydis* RNA-Mengen im Tumorgewebe sind geringer als die RNA-Mengen aus den kultivierten Stämmen, da ein großer Teil pflanzlicher RNA mitpräpariert wird.

In der Northern Analyse der polyA⁺-RNAs läßt sich das basale Expressionsniveau von *gas1* auf CM-Aktivkohleplatten und in CM-Flüssigmedium gut erkennen. Darüberhinaus wird in dieser Analyse auch der Effekt der REMI-Insertion im Stamm CL13pat4339 deutlich: das *gas1*-Transkript dieses Stammes ist verkürzt, die Expressionsstärke oder Stabilität des Transkriptes sind jedoch nicht beeinträchtigt. Da die aus Tumorgewebe isolierte RNA nur zum Teil pilzlicher Herkunft ist, sind die *U. maydis* RNA-Mengen dieser Proben generell gering. In jungem Tumorgewebe, das nur einen sehr geringen Anteil an pilzlicher RNA enthält, konnte kein *gas1*-Signal detektiert werden. Im reifen, sporulierenden Tumorgewebe läßt sich *gas1*-Expression feststellen. Während die Signalstärken auf CM-Aktivkohleplatten und in CM-Flüssigmedium nicht signifikant voneinander abweichen, läßt die *gas1*-Signalstärke im reifen Tumorgewebe

eine etwa vierfach erhöhte Expression des Gens erkennen. Die Ergebnisse der Northern Analyse lieferten somit einen Hinweis in Bezug auf eine pflanzeninduzierte Expression von *gas1*.

2.6.4. Mikroskopische Analyse des frühen Infektionsverlaufs der *gas1*-Nullstämme

Die mikroskopische Analyse des frühen Infektionsverlaufs der Kreuzung der Stämme FB1 Δ *gas1:eGFP#5* und FB2 Δ *gas1:eGFP#5* auf der Maispflanze sollte die nähere Charakterisierung des Pathogenitätsdefektes der Nullstämme ermöglichen. Darüber hinaus sollte sie Aufschluß darüber geben, wie sich die Expression des *eGFP*-Reportergens unter der Kontrolle des *gas1*-Promotors im frühen Infektionsverlauf, der nicht mittels Northern Analyse erfaßt werden kann, verhält. Zu diesem Zweck wurden Sporidien der Stämme FB1 Δ *gas1:eGFP#5* und FB2 Δ *gas1:eGFP#5* in Wasser miteinander vermischt und in junge Maispflanzen injiziert (siehe Methoden). 20-24h nach Infektion wurde aus den Maispflanzen das jeweils dritte Blatt isoliert, und der Bereich unterhalb der Einstichstelle auf diesem Blatt mit Calcofluor-Lösung angefärbt, und mikroskopiert (siehe Methoden). Sporidien der Stämme FB1 Δ *gas1:eGFP#5* und FB2 Δ *gas1:eGFP#5* hatten zu diesem Zeitpunkt bereits fusioniert, und das daraus resultierende Dikaryon war als septiertes Filament auf der Oberfläche des Maisblattes zu erkennen. An einigen Stellen ließen sich die charakteristischen, verdickten Infektionsstrukturen identifizieren, die in der Calcofluor-Färbung durch intensive weiße Fluoreszenz hervortreten, und als Appressorien bezeichnet werden (Abb.36). Im zeitlichen Verlauf unterscheidet sich diese frühe Entwicklung der Infektion mit den *gas1*-Nullstämmen nicht von der Entwicklung der entsprechenden Wildtyp-Stämme (siehe Abschnitt 2.7.). Ein bemerkenswerter Unterschied läßt sich jedoch in der Morphologie der Calcofluor-gefärbten Infektionshyphe erkennen. Die Hyphe des Wildtyp-Dikaryons weist im letzten Abschnitt, der unmittelbar vor der Differenzierung des Appressoriums gebildet wurde, einen verringerten Abstand zwischen den Septen auf. Direkt an der Basis des Appressoriums befindet sich das letzte Septum (Abb.37a). Die Infektionshyphe des Dikaryons, das aus der Kreuzung zweier *gas1*-Nullstämme hervorgegangen ist, zeigt in dem Abschnitt, in dem der verkürzte Septenabstand erkennbar sein sollte, unregelmäßige Verdickungen der Hyphenwand. Septen lassen sich in diesem Bereich nicht erkennen. An der Position des letzten Septums, das den Appressorienkopf von der Hyphe separiert, befindet sich eine charakteristische kragenartige Verdickung der Hyphenwand, die in der Calcofluor-Färbung deutlich zu sehen ist (Abb.37b).

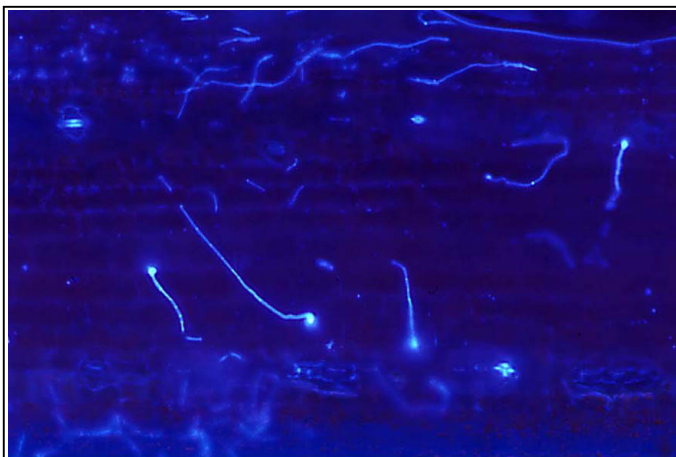


Abb. 36: Blattoberfläche einer Maispflanze, die mit einer Kreuzung der Stämme FB1 Δ *gas1:eGFP* #5 und FB2 Δ *gas1:eGFP*#5 infiziert wurde. Calcofluor-gefärbtes Präparat, 24h nach Inokulation, betrachtet unter UV-Licht. Dikaryotische Hyphen und Appressorien sind erkennbar.

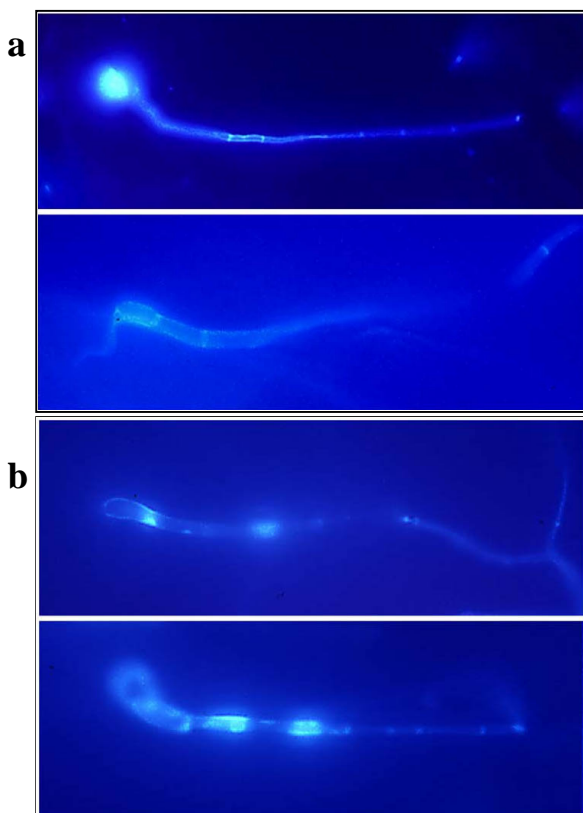


Abb. 37: Vergleich der Appressorien des Wildtyp-Dikaryons mit denen des Δ *gas1*-Dikaryons. **a:** zwei Wildtyp-Appressorien. Im oberen Bild sind die Septen der Hyphe zu erkennen; im unteren Bild sind die beiden Septen am Appressorienkopf besonders deutlich. **b:** zwei Δ *gas1*-Appressorien. Im oberen Bild ist die kragenartige Verdickung anstelle des Septums, das den Appressorienkopf abgrenzt, besonders gut sichtbar; im unteren Bild wird deutlich, daß der weiter vom Appressorienkopf entfernte Teil der Hyphe normale Septen besitzt, während der dem Appressorium unmittelbar benachbarte Abschnitt die hellen Verdickungen der Hyphenwand aufweist.

Etwa 24-30h nach der Infektion haben die meisten Infektionshyphen des Wildtyp-Dikaryons, die ein Appressorium gebildet haben, die Blattoberfläche penetriert und man kann dem Verlauf der Infektionshyphen in der oberen epidermalen Zellschicht mikroskopisch folgen (Abb.38a). Die Infektionshyphen des Dikaryons der *gas1*-Nullstämme sind ebenfalls in der Lage, die Blattoberfläche zu penetrieren. Unterhalb des Appressoriums ist ca. 24-30h nach Inokulation eine kurze Penetrationshyphe in der epidermalen Zelle sichtbar (Abb.38b). Die Entwicklung der Penetrationshyphe ließ sich jedoch in etwa 50 unabhängigen Infektionen nur bis zu dieser ersten epidermalen Zelle des Blattes verfolgen. Ein weiteres Wachstum der Infektionshyphe durch die Epidermis ließ sich auch 3-5 Tage nach Infektion nicht beobachten. Zu diesem Zeitpunkt hatte das Wildtyp-Dikaryon bereits die tieferliegenden Schichten des Parenchyms erreicht (Abb.38c). Δ *gas1*-Infektionshyphen ließen sich im Parenchym auch zu späteren Zeiten

nicht finden (nicht gezeigt). Die pathogene Entwicklung des $\Delta gas1$ -Dikaryons arretiert demnach in diesem frühen Infektionsstadium direkt nach erfolgter Penetration der Blattoberfläche. Die Spitze der $\Delta gas1$ -Penetrationshyphes hatte in etwa 30% der untersuchten Infektionen eine atypische, aufgeschwollene Morphologie (Abb.38c). In 70% der Infektionen ließen sich Ablagerungen erkennen, die arretierte Infektionshyphen in der Epidermiszelle umgaben (Abb.38d). Darüber hinaus ließ sich in ca. 20% der untersuchten $\Delta gas1$ -Infektionen beobachten, daß die Epidermiszellen an der Penetrationsstelle kollabiert erschienen und ihr Cytoplasma unter UV-Licht Autofluoreszenz aufwies (Abb.39). Diese Veränderungen in den Wirtszellen an der Penetrationsstelle sind potentielle Anzeichen einer Abwehrreaktion der Pflanze. Derartige Reaktionen ließen sich in keiner der untersuchten Wildtyp-Infektionen erkennen (nicht gezeigt).

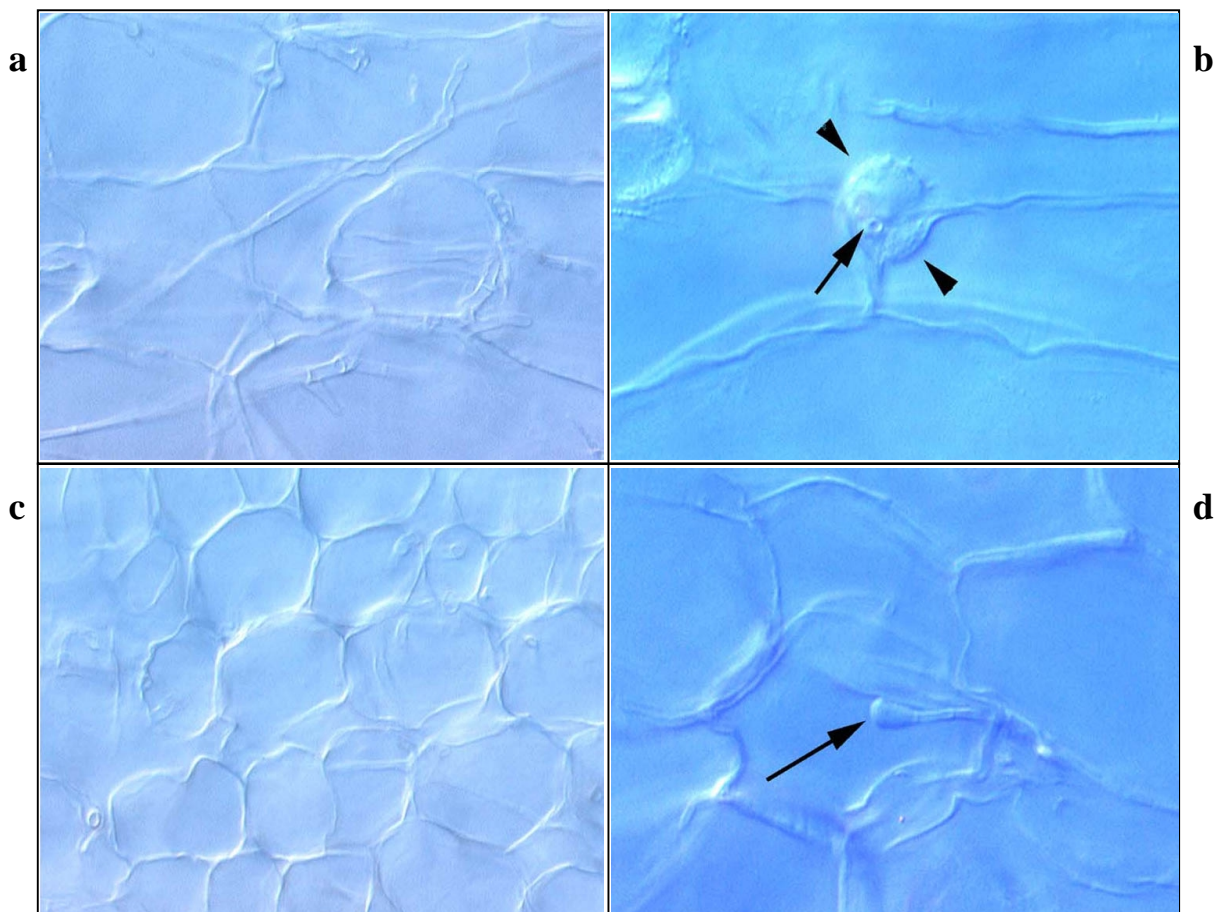


Abb. 38: Wachstum der Penetrationshyphen im Inneren des Blattes. Vergleich der Wildtyp-Infektion mit der $\Delta gas1$ -Infektion. Aufhellungspräparate, angefertigt 3d nach Inokulation, betrachtet im Interferenzkontrast. **a:** Wildtyp-Infektion. Die Epidermiszellen sind von einer Vielzahl von Infektionshyphen durchzogen. **b:** $\Delta gas1$ -Infektion. Diese Penetrationshyphes (Pfeil) ist ebenfalls nur bis in die epidermale Zellschicht vorgedrungen und hat dort ihre Entwicklung beendet. Sie ist von Ablagerungen umgeben (Pfeilspitzen). **c:** Wildtyp-Infektion. Die Infektionshyphen sind bereits bis in das Parenchym vorgedrungen. **d:** $\Delta gas1$ -Infektion. Eine Penetrationshyphes hat das Innere der Epidermiszelle erreicht (Pfeil). Ihre Spitze ist verdickt. (Aufnahmen: K.Snetselaar.)

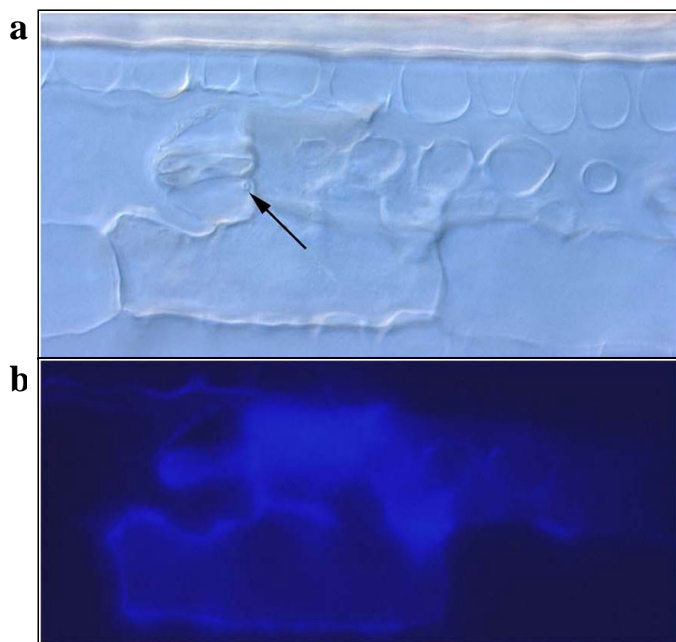


Abb. 39: $\Delta gas1$ -Penetrationshyphe in der Epidermis 48h nach Inokulation. Nativpräparat, betrachtet unter DIC-Optik und UV-Licht. **a:** Die Penetrationshyphe hat die Blattoberfläche direkt neben einem Stoma penetriert (Pfeil). Die im Bild darunter befindliche Epidermiszelle erscheint kollabiert. **b:** Dieselbe Blattstelle unter UV-Licht betrachtet. Die Epidermiszellen an der Penetrationsstelle weisen Autofluoreszenz auf. (Aufnahmen: K.Snetselaar.)

Die frühen Infektionsstadien der Kreuzung der Stämme FB1 $\Delta gas1:eGFP\#5$ und FB2 $\Delta gas1:eGFP\#5$ wurden auch hinsichtlich des Auftretens der grünen Fluoreszenz des Reportergens unter UV-Licht untersucht. In den Sporidien auf der Blattoberfläche ließ sich nur das schwache basale eGFP-Signal erkennen.

Auch in den Paarungshyphen und dem dikaryotischen Filament wurde keine

Veränderung in der Intensität deutlich (Abb.40). Im Gegensatz dazu zeigen Appressorien eine deutlich verstärkte Fluoreszenz (Abb.41). In den Infektionshyphen des $\Delta gas1$ -Dikaryons, deren Entwicklung nach der Penetration in der Epidermiszelle arretiert, läßt sich keine starke Fluoreszenz mehr detektieren (nicht gezeigt).

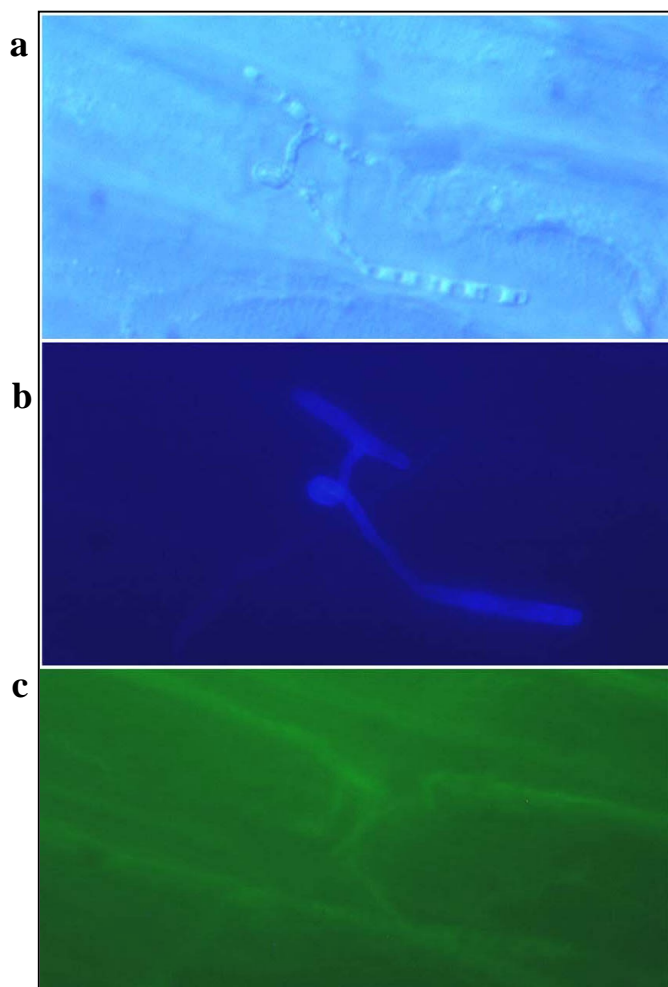


Abb. 40: Expression des GFP-Reportergens während der Fusion zweier kompatibler Sporidien der Stämme FB1 $\Delta gas1:eGFP\#5$ und FB2 $\Delta gas1:eGFP\#5$ auf der Blattoberfläche 12h nach Inokulation. Calcofluor gefärbtes Präparat, betrachtet im Interferenzkontrast und unter UV-Licht. **a:** Die beiden Sporidien haben über Konjugationsschläuche fusioniert. **b:** Die Sporidien und Paarungshyphen sind deutlich zu erkennen. **c:** Dieselbe Stelle wie in a und b: die schwache GFP-Fluoreszenz des basal exprimierten Reportergens ist auf der Blattoberfläche gerade noch erkennbar. (Aufnahmen: K.Snetselaar.)

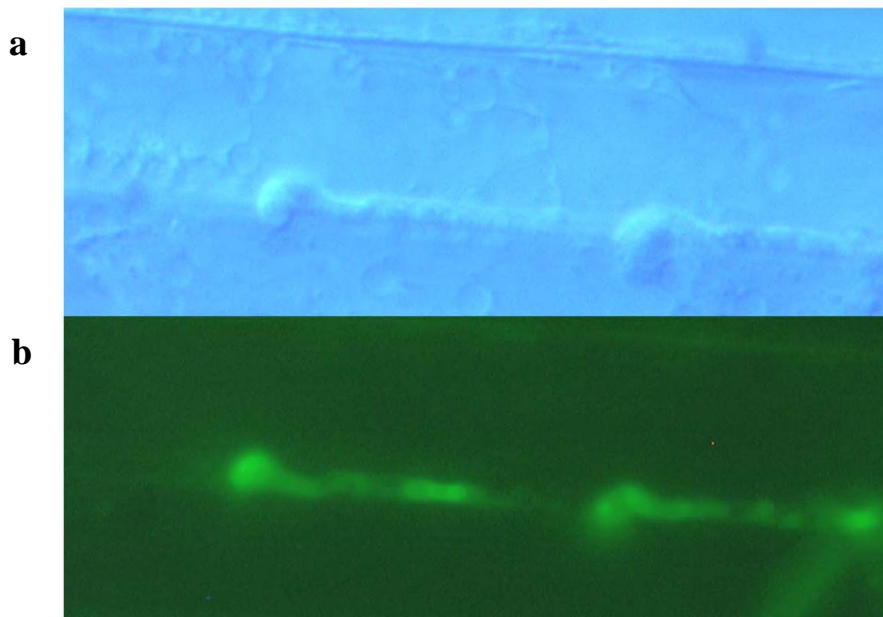


Abb. 41: Infektion der weiblichen Organe einer Maispflanze mit einer Kreuzung der Stämme FB1 Δ *gas1:eGFP#5* und FB2 Δ *gas1:eGFP#5*: Expression des *GFP*-Reportergens während der Penetration. Nativpräparat, betrachtet im Interferenzkontrast und unter UV-Licht. **a:** zwei Appressorien befinden sich direkt hintereinander. **b:** unter UV-Licht ist die starke Fluoreszenz des *GFP*-Reportergens in der Infektionshyphne und dem Appressorienkopf erkennbar. (Aufnahmen: K.Snetselaar.)

Diese Analysen zeigen, daß offensichtlich im Appressorium unmittelbar vor und während der Penetration eine verstärkte Expression von *gas1* induziert wird. Um zu verfolgen, wie sich die *GFP*-Expression in der weiteren Entwicklung der Penetrationshyphne in der Pflanze verhält, wurden auch Infektionen von Kreuzungen eines Wildtyp-Stammes mit dem kompatiblen Δ *gas1:eGFP* Stamm mikroskopisch untersucht. Die aus diesen Kreuzungen hervorgegangenen Dikaryen sind vollständig pathogen und unterscheiden sich in ihrer Entwicklung auf und in der Pflanze nicht vom Wildtyp. In diesen Infektionen war weder in den Penetrationshyphen noch im reifen Tumor Fluoreszenz erkennbar (nicht gezeigt). Da in der Northern Analyse schwache *gas1*-Expression in reifem Tumorgewebe festgestellt werden konnte (2.6.3.) ist es wahrscheinlich, daß die Signalstärke des *eGFP*-Reportergens in den untersuchten Kreuzungen lediglich zu schwach ist, um vor dem Hintergrund der Pflanze erkannt zu werden.

Die beschriebenen Versuche zeigen, daß *gas1* in der pathogenen Entwicklung von *U. maydis* während der Penetration der Blattoberfläche verstärkt exprimiert wird. Der Verlust von Gas1 führt in der Infektionshyphne im letzten Abschnitt, der unmittelbar vor der Differenzierung des Appressoriums gebildet wird, zu morphologischen Veränderungen. Die Entwicklung der Δ *gas1*-Penetrationshyphne arretiert in der obersten epidermalen Zellschicht, und dies ist mit Anzeichen einer Abwehr-Reaktion der Pflanze verbunden.

2.6.5. Versuche zur Lokalisierung von Gas1

Da alpha-Glucosidasen in der eukaryotischen Zelle als sekretiertes Enzym, in den Lysosomen/Vakuolen, oder im ER grundsätzlich verschiedene Aufgaben erfüllen können, sollte die Lokalisierung von Gas1 in *U. maydis* einen direkten Hinweis auf die wahrscheinliche Funktion dieses Enzyms in der pathogenen Entwicklung des Pilzes liefern. Hierfür wurde das Plasmid pgas1M konstruiert, in dem der *gas1*-Leserahmen am 3'-Ende mit dem Leserahmen fusioniert wurde, der für das Hexa-Myc-Epitop kodiert. Stromabwärts des *gas1M*-Gens wurde die Hygromycin-Resistenzkassette kloniert, gefolgt von einem genomischen 1kb-Fragment aus dem 3' flankierenden Bereich des *gas1*-Gens. Durch ein zweifaches Rekombinationsereignis im *gas1*-Leserahmen und im genomischen Fragment des 3' flankierenden Bereichs kann dabei das genomische *gas1*-Allel durch die *gas1M*-Version ersetzt werden (Abb.42a). Die Expression von *gas1M* steht somit unter der Kontrolle des *gas1*-Promotors. Das Plasmid pgas1M wurde mit DraI im Vektoranteil linearisiert, und in die Stämme FB1 und FB2 transformiert. Um den homologen Austausch des Gens durch das veränderte Allel zu überprüfen, wurde die genomische DNA der Transformanten mit den Restriktionsenzymen NotI und MluI geschnitten und im Southern Blot mit dem NotI-PstI-Fragment hybridisiert, das das 3'-Ende des *gas1*-Leserahmens, und einen Teil der 3'-Flanke des Gens enthält (siehe Abb.42a). Im Falle des Austausches wurden anstelle des endogenen 3kb NotI-MluI-Fragmentes die beiden 900bp und 2,3kb großen NotI-bzw. NotI-MluI-Fragmente detektiert, die dem *gas1M*-Allels mit der benachbarten Hygromycin-Resistenzkassette entsprechen (Abb.42b). Für FB1 ließ sich unter sieben überprüften Transformanten einer identifizieren, der das *gas1M*-Allel am homologen Genort integriert hatte, für FB2 war es ebenfalls einer unter 7 überprüften Transformanten. Die resultierenden Stämme wurden als FB1gas1M sowie FB2gas1M bezeichnet.

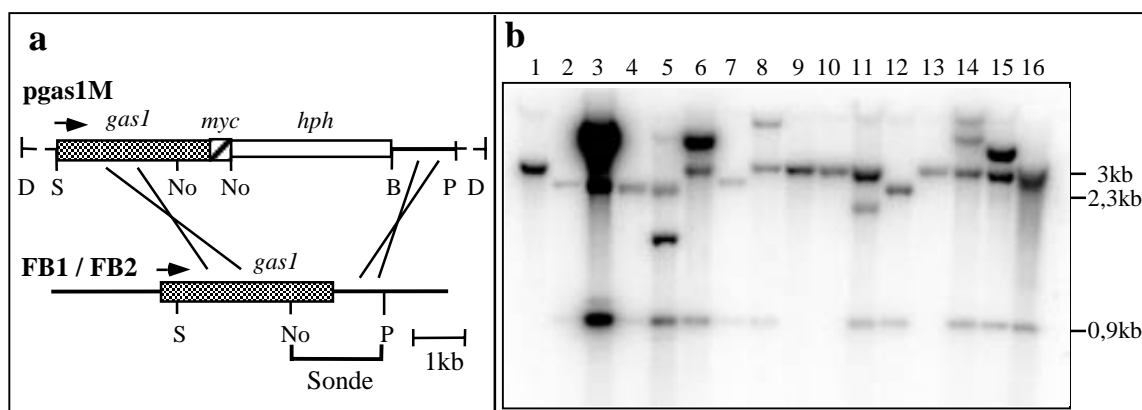


Abb. 42: Konstruktion der Stämme FB1gas1M und FB2gas1M. **a:** Im Konstrukt pgas1M wurde der *gas1*-Leserahmen (schattiertes Rechteck) am 3'-Ende mit dem 5'-Ende des *c-myc*-Leserahmens (schraffiertes Quadrat) fusioniert. Dahinter befindet sich die Hygromycin-Resistenzkassette (offenes Rechteck). Die genomische Organisation des *gas1*-Gens ist unterhalb des pgas1M dargestellt. Die Bereiche, über die eine homologe Rekombination stattfinden kann, sind durch Kreuze angedeutet. Die Schnittstellen der Restriktionsenzyme BamHI(B), DraI(D), KpnI(K), MluI(M), NotI(No) und SacI(S) sind eingezeichnet. Die dünne Linie stellt den Klonierungsvektor dar. Die in der Southern Hybridisierung verwendete Sonde ist eingezeichnet. **b:** Southern Analyse der FB1 und FB2 Transformanten. Das Plasmid pgas1M wurde mit DraI linearisiert und in die Stämme FB1 (Spur1) und FB2 (Spur9) transformiert. Aus den Ausgangsstämmen sowie jeweils 7 Transformanten (FB2-Transformanten #8, #9,

#11, #12, #13, #15, #24: Spuren 2-8; FB1-Transformanden #1, #5, #6, #9, #11, #16, #17: Spuren 10-16) wurde die genomische DNA isoliert, mit NotI und MluI geschnitten und auf einem 1% Agarosegel aufgetrennt. Nach dem Transfer der DNA-Fragmente auf eine Nylonmembran wurde der Filter mit dem genomischen NotI-PstI-Fragment (Abb.42a) hybridisiert. Für die Transformanden FB1#11 (Spur4) und FB2#6 (Spur12) ließen sich anstelle des 3kb Wildtyp-Fragments die beiden 900bp und 2,3kb-Fragmente des *gas1M*-Allels detektieren. Die entsprechenden Stämme wurden mit FB1gas1M und FB2gas1M bezeichnet.

Um die Funktionalität des veränderten *gas1*-Allels zu prüfen wurden die Stämme FB1gas1M und FB2gas1M zunächst gekreuzt und auf ihre Pathogenität überprüft. Es zeigte sich, daß die Stämme in ihrer Pathogenität nicht beeinträchtigt sind (Tab.13), d.h. das *gas1M*-Allel ist offensichtlich funktionell.

Tabelle 13: Pathogenitätstest der *gas1M*-Stämme

| Inokulum | n | % Tumore |
|-------------------|----|----------|
| FB1xFB2 | 7 | 71 |
| FB1gas1MxFB2gas1M | 18 | 72 |

n: Anzahl der infizierten Pflanzen.

Der immunologische Nachweis des Gas1M-Fusionsproteins sollte zunächst im Western-Blot durchgeführt werden. Hierfür wurden aus CM-Flüssig-Kulturen der beiden Stämme FB1gas1M und FB2gas1M, sowie der Stämme FB1 und FB2 Proteinextrakte gewonnen. Die Proteine in den Kulturüberständen wurden mittels Aceton-Fällung konzentriert (siehe Methoden). Die Proteinextrakte wurden durch Zentrifugation in deren lösliche und unlösliche Bestandteile fraktioniert, und jeweils beide Fraktionen, sowie der Kulturüberstand wurden auf einem 10% Acrylamid-Proteingel aufgetrennt. Nach dem Transfer der Proteine auf eine Nitrocellulose-Membran erfolgte der Nachweis der cMyc-markierten Proteine mit Hilfe des primären anti-Myc Antikörpers 9E10 und des NEB-Bioluminescence Kits (siehe Methoden). Als Positiv-Kontrolle diente der Proteinextrakt des Stammes RK2174, der konstitutiv eine cMyc-markierte Version der Endoglucanase Egl1 exprimiert (Schauwecker et al, 1995). Leider gelang es nicht, das Gas1M Fusionsprotein in dieser Western-Blot-Analyse nachzuweisen. Das Egl1-cMyc-Fusionsprotein der Positivkontrolle ließ sich jedoch detektieren (nicht gezeigt). Offensichtlich reicht die Sensitivität dieses Nachweises nicht aus, um die geringen Mengen an Gas1M zu detektieren, die unter der basalen Aktivität des *gas1*-Promotors gebildet werden.

2.6.6. Überexpression von *gas1*

Da *gas1* auf artifiziellen Medien nur im geringen Maß exprimiert wird, und nur während der Penetrationsphase eine starke Expression aufweist, sollte überprüft werden, welchen Effekt eine erhöhte Expression des Gens auf die Pathogenität des Pilzes hat. Hierfür wurde eine transkriptionelle Fusion des Gens mit dem Promotor des konstitutiv exprimierten *tefl*-Gens hergestellt. Aus den Untersuchungen zur Pathogenität der Kreuzung der Stämme FB1gas1M und FB2gas1M war deutlich geworden, daß die Fusion des cMyc-Motivs an den C-Terminus von Gas1 die Funktion der alpha-Glucosidase offensichtlich nicht beeinträchtigt (siehe 2.6.5.). Daher bot es sich an, dieses funktionelle Fusionsprotein zu überexprimieren, um zugleich die Möglichkeit zu

schaffen, das Gas1M-Protein im Western-Blot nachweisen zu können. Zu diesem Zweck wurde eine transkriptionelle Fusion des *gas1M*-Leserahmens mit dem *tef1*-Promotor hergestellt. Das resultierende Konstrukt wurde als *potef-gas1M* bezeichnet (Abb.43 und Methoden).

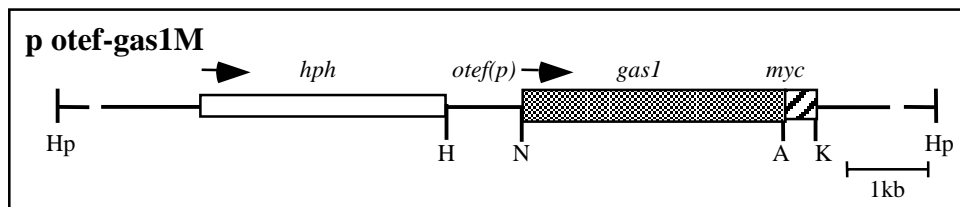


Abb. 43: Das Plasmid *potefgas1M*. Es enthält den gesamten *gas1*-Leserahmen, dargestellt durch einen offenen Balken, der am 3'-Ende mit dem *myc*-Gen, dargestellt durch einen kleinen Balken fusioniert ist. Das resultierende *gas1M*-Gen steht unter der Kontrolle des *otef*-Promotors. 5' vom Promotor befindet sich die Hygromycin-Resistenzkassette, dargestellt durch einen schraffierten Balken. Die Pfeilspitzen geben die Transkriptionsrichtungen an. Die Schnittstellen der Restriktionsenzyme AgeI(A), HindIII(H), HpaI(Hp), sowie NotI(N) sind eingezeichnet. Dieses Konstrukt wurde wie dargestellt durch Restriktion mit HpaI linearisiert und in die Stämme CL13 Δ *gas1*, CL13, FB1 und FB2 transformiert, um durch ektopische Integration Stämme zu erhalten, die das *gas1M*-Gen konstitutiv exprimieren.

Um die Funktionalität des Konstruktes zu überprüfen, wurde *potef-gas1M* mit HpaI im Vektoranteil linearisiert, und in den apathogenen Stamm CL13 Δ *gas1* transformiert, in dem der *gas1*-Leserahmen durch die Phleomycin-Resistenzkassette ersetzt worden war (siehe Methoden). Da das Konstrukt ektopisch und zufällig in das Genom des transformierten Stammes integriert, wurden sechs unabhängige Transformanten auf die Komplementation des Pathogenitätsdefektes überprüft. Für vier der sechs Transformanten konnte die Wiederherstellung der Pathogenität beobachtet werden (Tab14).

Tabelle 14: Pathogenitätstest der CL13 Δ *gas1*:*potef-gas1M*- Transformanten

| Inokulum | n | % Tumore |
|---|----|----------|
| CL13 | 11 | 45 |
| CL13 Δ <i>gas1</i> | 12 | 0 |
| CL13 Δ <i>gas1</i> : <i>potef-gas1M</i> #1 | 11 | 0 |
| CL13 Δ <i>gas1</i> : <i>potef-gas1M</i> #2 | 11 | 9 |
| CL13 Δ <i>gas1</i> : <i>potef-gas1M</i> #3 | 11 | 27 |
| CL13 Δ <i>gas1</i> : <i>potef-gas1M</i> #4 | 12 | 17 |
| CL13 Δ <i>gas1</i> : <i>potef-gas1M</i> #5 | 11 | 0 |
| CL13 Δ <i>gas1</i> : <i>potef-gas1M</i> #6 | 11 | 9 |

n = Anzahl infizierter Pflanzen

Um Gas1M-überexprimierende Stämme zu erhalten, wurde *potef-gas1M* mit HpaI im Vektoranteil linearisiert und in CL13, FB1 und FB2 transformiert. Die resultierenden Stämme tragen somit mindestens eine Kopie des zufällig in das Genom integrierten Plasmids *potef-gas1M*, besitzen aber darüber hinaus auch das Wildtyp *gas1*-Allel.

Für jeden der transformierten Stämme wurden jeweils drei unabhängige Transformanten ausgewählt, um deren Pathogenität zu überprüfen. Die Stämme CL13*otef-gas1M*#1, #11 und #16, FB1*otef-gas1M*#7, #20 und #23, sowie FB2*otef-gas1M*#6, #29 und #33 wurden für die Infektionen verwendet. Während die Stämme im

CL13-Hintergrund jeweils einzeln in die Maispflanzen injiziert wurden, wurde jeweils ein Stamm des FB1-Hintergrunds mit einem des FB2-Hintergrunds vermischt, um die Fusion zu ermöglichen.

Überraschenderweise zeigte sich, daß alle getesteten Stämme und Kreuzungen in ihrer Pathogenität im Vergleich zu den Ausgangsstämmen reduziert waren (Tab.15 und Abb.44).

Tab.15: Pathogenitätstest der potef-gas1M-Transformanten der Stämme CL13, FB1 und FB2

| Inokulum | n | % Tumore |
|---------------------------------------|----|----------|
| FB1xFB2 | 39 | 95 |
| FB1otef-gas1M#7x FB2otef-gas1M#6 | 40 | 42 |
| FB1otef-gas1M#20x FB2otef-gas1M#29 | 40 | 62 |
| FB1otef-gas1M#23x FB2otef-gas1M#33 | 36 | 47 |
| CL13 | 49 | 90 |
| CL13otef-gas1M#1 | 49 | 27 |
| CL13otef-gas1M#11 | 49 | 35 |
| CL13otef-gas1M#16 | 49 | 53 |

n = Anzahl infizierter Pflanzen



Abb. 44: Überexpression des *gas1M*-Allels in den Stämmen FB1 und FB2: Einfluß auf die Pathogenität. Die in Tab. 15 ausgewerteten Infektionen wurden hier im Gewächshaus photographiert. Rechts im Bild sind die Pflanzen der Wildtyp-Infektion zu sehen: der Pilzbefall hat die Entwicklung der Maispflanzen völlig gestört. Nur drei von 39 infizierten Pflanzen konnten eine erkennbare Größe erreichen. Die drei Infektionsreihen im Bild links und mitte wurden mit den potef-gas1M-Transformanten der Stämme FB1 und FB2 durchgeführt. In dieser Gegenüberstellung wird besonders deutlich, daß die mit den überexprimierenden Stämmen infizierten Pflanzen nicht nur weniger Tumore entwickelten, sondern daß sie auch generell kräftiger wachsen konnten als die mit den Wildtyp-Stämmen infizierten Pflanzen.

In einer Northern Analyse wurde überprüft, in welchem Maß das *gas1M*-Gen in jenen Stämmen exprimiert wird, die im Pflanzentest den stärksten Effekt auf die Pathogenität erkennen lassen. Aus diesem Grund wurde für die Stämme CL13otef-*gas1M*#1, FB1otef-*gas1M*#7 und FB2otef-*gas1M*#6 die polyA⁺-RNA isoliert und in der Northern Analyse mit einem internen Fragment des *gas1*-Gens als Sonde hybridisiert (Abb.45).

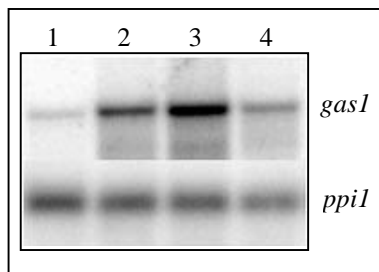


Abb. 45: Expression von *gas1* und *gas1M* in den potef-*gas1M*-Transformanden. Die Stämme FB2 (Spur1), CL13otef-*gas1M*#1 (Spur2), FB1otef-*gas1M*#7 (Spur3) und FB2otef-*gas1M*#6 (Spur4) wurden in CM-Flüssigmedium angezogen, und die polyA⁺-RNA wurde präpariert (siehe Methoden). Die RNAs wurden auf einem 1% Agarosegel aufgetrennt und auf eine Nylonmembran transferiert. Der Filter wurde mit dem internen PstI-NotI-Fragment des *gas1*-Gens hybridisiert. Zur Kontrolle der RNA-Menge wurde ein internes Fragment des konstitutiv exprimierten *ppil*-Gens verwendet.

Die Northern Analyse läßt für die Stämme CL13otef-*gas1M*#1 und FB1otef-*gas1M*#7 (Abb.45, Spuren 2 und 3) eine etwa vierfach, bzw. zehnfach stärkere Expression des *gas1M*-Gens im Vergleich zum *gas1*-Signal im Wildtyp-Stamm erkennen. Im Stamm FB2otef-*gas1M*#6 ist die Expression des *gas1M*-Transkripts nur etwa doppelt so stark wie die *gas1*-Expression im Wildtyp-Stamm. Die unterschiedlichen Expressionsstärken in den getesteten Transformanden könnten auf eine unterschiedliche Anzahl an integrierten Plasmidkopien im Genom, bzw. auf unterschiedlichen Integrationsorten beruhen. Die Transformanden wurden diesbezüglich jedoch nicht näher untersucht.

Die Analyse der Stämme FB1*gas1M* und FB2*gas1M* hat gezeigt, daß die C-terminale Fusion des cMyc-Tags an Gas1 keinen Einfluß auf die Pathogenität des Dikaryons der beiden Stämme hat (siehe 2.6.5). Daher kann gefolgert werden, daß die beobachtete Reduktion der Pathogenität des Stammes CL13otef-*gas1M*#1, und der Kreuzung der Stämme FB1otef-*gas1M*#7 und FB2otef-*gas1M*#6 auf die verstärkte *gas1*-Expression oder auf den Insertionsort des Konstruktes im Genom zurückzuführen ist.

2.7. Mikroskopische Analyse des Infektionsverlaufs verschiedener apathogener Stämme

Die mikroskopische Analyse des frühen Infektionsverlaufs der im Rahmen dieser Arbeit charakterisierten apathogenen Stämme wurde durchgeführt, um das Stadium der pathogenen Entwicklung zu ermitteln, in dem sich jeweils der Mutationseffekt auswirkt. Diese Beobachtungen können neben den molekulargenetischen Analysen weitere Anhaltspunkte für die in diesen Mutanten betroffenen Genfunktionen liefern.

Daß Methionin- und Arginin-Auxotrophievarianten von *U. maydis* völlig apathogen sind, war bereits beschrieben worden (Holliday, 1962; Miller, 1949). Bis zu diesem Zeitpunkt wurde jedoch nie untersucht, in welchem Stadium der pathogenen Entwicklung derartige Mutanten arretieren. Daher wurden die beiden Stämme CL13pat7635 und CL13pat5133, die im Rahmen des REMI-Screens isoliert worden waren und nicht in der Lage sind, Methionin bzw. Arginin zu synthetisieren (K.H.Braun, J.Görl und R.Kahmann, nicht publiziert), in die mikroskopischen Analysen des Infektionsverlaufs mit einbezogen

2.7.1 Entwicklung auf der Blattoberfläche und Appressorienbildung

Aus der mikroskopischen Untersuchung von Pflanzen, die mit dem Stamm CL13 infiziert worden waren, wurde deutlich, daß sich das Inokulum auf dem dritten Blatt nicht an allen Stellen gleichartig verhält. In einigen Regionen lagen nach 24h nach Inokulation weiterhin Sporidien vor (Abb.46a), während an anderer Stelle auf demselben Blatt filamentöses Wachstum zu erkennen war (Abb.46b). An diesen Stellen waren septierte Hyphen erkennbar, die unverzweigt über die Blattoberfläche wuchsen (Abb.46b, 47a, 47b). Appressorienbildung ließ sich 20 bis 24h nach Inokulation in stark begrenzten Regionen von 2 bis 4 mm² Durchmesser beobachten (Abb.47a). An diesen Stellen hatten 10-20% der Filamente Appressorien gebildet (nicht gezeigt). Pro untersuchtem Blattstück fanden sich maximal 10 bis 15 Appressorien. Etwa 3 Tage nach Inokulation konnten keine Appressorien mehr beobachtet werden. Die Appressorienzelle wird durch ein Septum von der Hyphe abgegrenzt (erkennbar in Abb.47a, besonders deutlich in Abb.47c). Das Appressorium kann sich am Ende einer langen Hyphe (nicht gezeigt), oder an der Spitze einer relativ kurzen Hyphe nahe der ursprünglichen Sporidie (Abb.47a) befinden. Vereinzelt ließen sich Verdickungen an septierten Hyphen beobachten, die Infektionsstrukturen ähnlich sehen (Abb.47b). Hierbei könnte es sich um abortive Infektionsstrukturen handeln. Für alle im Rahmen dieser Arbeit charakterisierten apathogenen Stämme wurde zunächst untersucht, ob sie in der Lage sind, auf der Blattoberfläche filamentöses Wachstum zu initiieren und Appressorien zu bilden. Hierbei konnten in Infektionen mit den Stämmen CL13pat2997, CL13pat2563 und CL13pat3050, sowie der Methionin-Auxotrophiemutante CL13pat7635 und der Arginin-Auxotrophiemutante CL13pat5133 jeweils Regionen identifiziert werden, in denen filamentöses Wachstum erkennbar war. Das filamentöse Wachstum war von dem des Stammes CL13 nicht zu unterscheiden (nicht gezeigt). Im Gegensatz dazu unterschied sich die Entwicklung des Stammes CL13pat4285 auf der Blattoberfläche deutlich von der des Stammes CL13. Für diesen Mutantenstamm, der bereits in axenischer Kultur einen Wachstumsdefekt gezeigt hatte, konnten keine Regionen identifiziert werden, an denen das Inokulum filamentöses Wachstum initiiert hatte. Die Stämme CL13pat2997, CL13pat2563 und CL13pat3050, sowie die auxotrophen Stämme CL13pat7635 und CL13pat5133 waren in der Lage, Appressorien zu bilden (Abb.47c-g). Die Häufigkeit der Appressorienbildung, sowie die Morphologie der Infektionsstrukturen unterschieden sich nicht signifikant vom Stamm CL13 (nicht gezeigt). Für CL13pat4285 ließen sich keine Appressorien beobachten (nicht gezeigt). Für diesen Stamm ist die pathogene Entwicklung demnach bereits in der frühesten Phase, der Initiation des filamentösen Wachstums auf der Blattoberfläche, gestört. Die von den Mutantenstämmen gebildeten Appressorien wurden mit denen des Ausgangsstammes CL13 verglichen (Abb.47c-g).

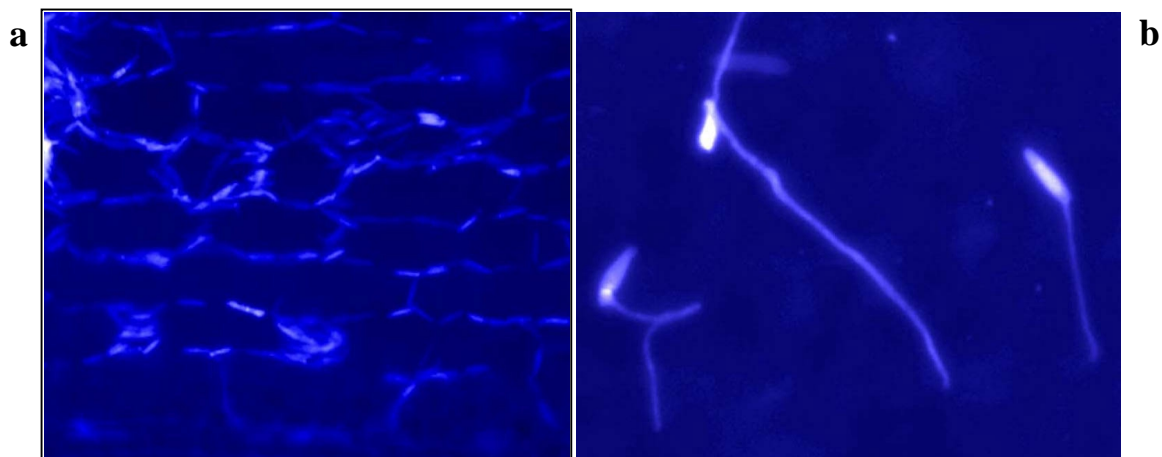


Abb.46: Stamm CL13. Inokulation eines sechs Tage alten Maissämlings. Entwicklung des Inokulums auf der Blattoberfläche 24h nach Inokulation. Native Blattstücke, angefärbt mit Calcofluor, unter UV-Licht betrachtet. **a:** CL13 Sporidien auf der Blattoberfläche 24h nach Inokulation. 100-fache Vergrößerung. An der gezeigten Stelle sind die Sporidien nicht ausgekeimt, es läßt sich kein filamentöses Wachstum erkennen. Die Verteilung des Inokulums folgt der Topographie der Blattoberfläche: die Sporidien befinden sich größtenteils über den Zellwänden der Epidermiszellen, da die Blattoberfläche dort Vertiefungen aufweist. **b:** Dieselbe Inokulation wie in a, ebenfalls nach 24h, an einer anderen Blattstelle, 50-fache Vergrößerung. In dieser Region sind die Sporidien ausgekeimt und filamentöses Wachstum auf der Blattoberfläche wurde initiiert.

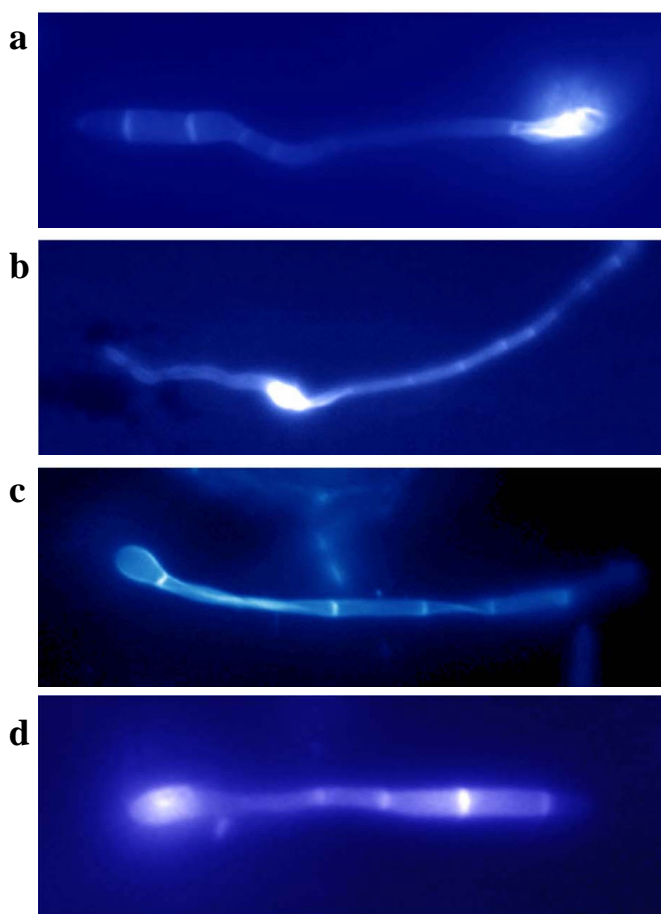
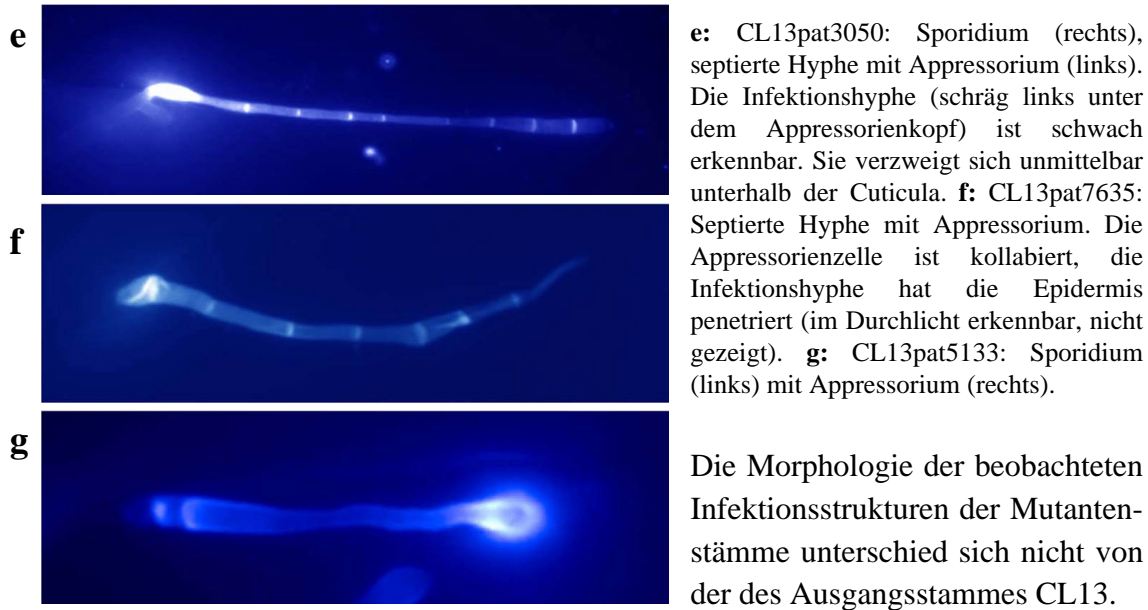


Abb. 47: Appressorien auf der Blattoberfläche 24 bis 28h nach Inokulation von sechs Tage alten Maissämlingen. Calcofluor-gefärbte Blattstücke, unter UV-Licht betrachtet, 1000-fache Vergrößerungen (48e: 500-fach vergrößert). **a:** CL13: ausgekeimte Sporidie mit Appressorium. In der Sporidienhülle (links) sind zwei Septen erkennbar. Die Hyphe ist z.T. außerhalb der Fokussierungsebene, daher sind in diesem Bereich die Septen nicht zu erkennen. Der Appressorienkopf (rechts) ist kollabiert, die Infektionshyphe hat bereits die Epidermiszelle penetriert (im Durchlicht erkennbar, nicht gezeigt). **b:** CL13: Penetrationsversuch. Die von oben rechts kommende septierte Hyphe hat Appressorienbildung initiiert (helle Verdickung), dann jedoch das Wachstum auf der Blattoberfläche fortgesetzt. **c:** CL13pat2997: septierte Hyphe mit Appressorium. Ein Septum trennt Appressorienzelle und Hyphe. Die leeren Hyphensegmente erscheinen z.T. kollabiert. **d:** CL13pat2563: Sporidium (links) mit Appressorium (rechts). In der Sporidienhülle sind zwei Septen erkennbar. (e, f, g: nächste Seite)



Die Appressorienbildung ist demnach in keinem dieser Stämme signifikant beeinträchtigt.

2.7.2. Penetration und invasives Wachstum

In den Epidermiszellen unterhalb der Appressorien der Stämme CL13pat2997, CL13pat2563, CL13pat3050, CL13pat7635 und CL13pat5133 ließen sich im Interferenzkontrast intrazelluläre Infektionshyphen erkennen (nicht gezeigt).

Die beobachteten Infektionsstrukturen sind somit funktionell.

Der weitere Verlauf des invasiven Wachstums dieser Stämme im Inneren des Blattes ist in Abb.48 bis 53 dokumentiert. In Aufhellungspräparaten konnten für jeden der untersuchten Stämme Infektionshyphen in der Epidermis und im tiefer gelegenen Parenchymgewebe beobachtet werden. Das beobachtete invasive Wachstum unterschied sich nicht signifikant von dem des Stammes CL13 (48a,b).

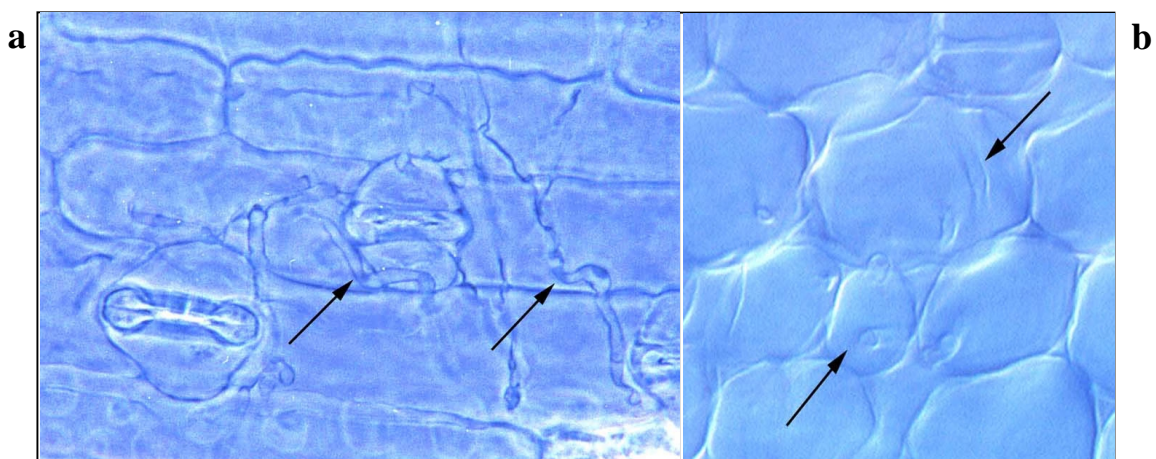


Abb. 48: Invasives Wachstum von CL13 drei Tage nach Inokulation. Aufhellungspräparate, betrachtet im Interferenzkontrast. 1500-fache (a), bzw 1000-fache (b) Vergrößerung **a:** Infektionshyphen des Stammes CL13 in Epidermiszellen (Pfeile). Das z.T. stark kollabierte Erscheinungsbild der Hyphen in diesem Präparat ist vermutlich auf die Intensität der NaOH-Behandlung bei der Erstellung dieses Aufhellungspräparates zurückzuführen. **b:** Infektionshyphen des Stammes CL13 im Parenchymgewebe.

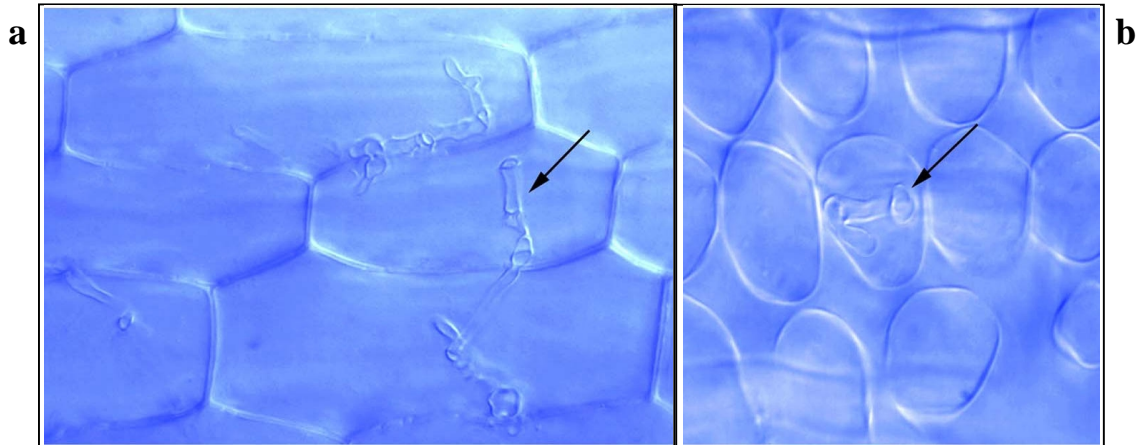


Abb. 49: Invasives Wachstum von CL13pat2997 drei Tage nach Inokulation. Aufhellungspräparate, betrachtet im Interferenzkontrast. 1000-fache Vergrößerung **a:** Infektionshyphen im Epidermisgewebe. Z.T. läßt sich verzweigtes Wachstum erkennen. **b:** Infektionshyphe des Stammes CL13pat2997 in Parenchymzelle (Pfeil).

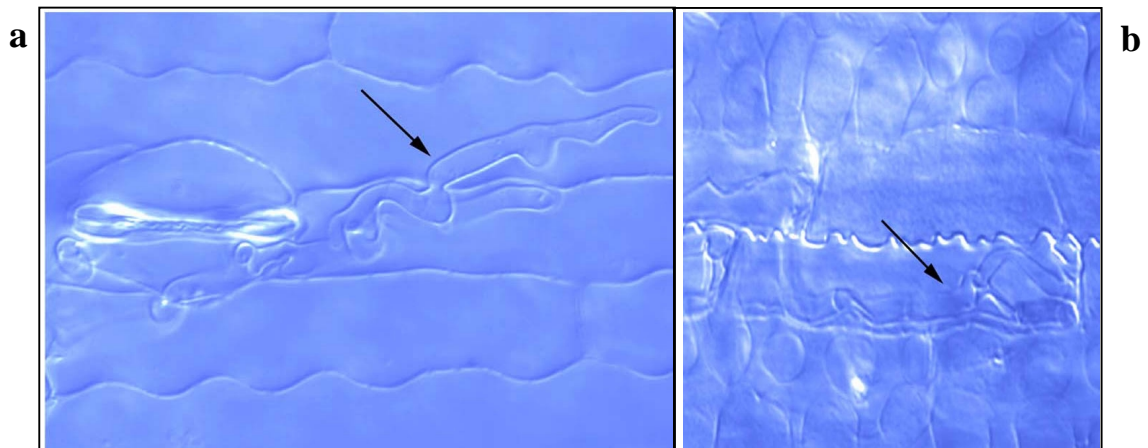


Abb. 50: Invasives Wachstum von CL13pat3050 drei Tage nach Inokulation. Aufhellungspräparate, betrachtet im Durchlicht unter DIC-Optik. 1000-fache Vergrößerung **a:** Die Spitze einer Infektionshyphe in Epidermiszellen. Die deutliche Verdickung nahe der Hyphenspitze könnte eine beginnende Verzweigung der Hyphe darstellen. **b:** Verzweigte Infektionshyphe des Stammes CL13pat3050 im Parenchym.

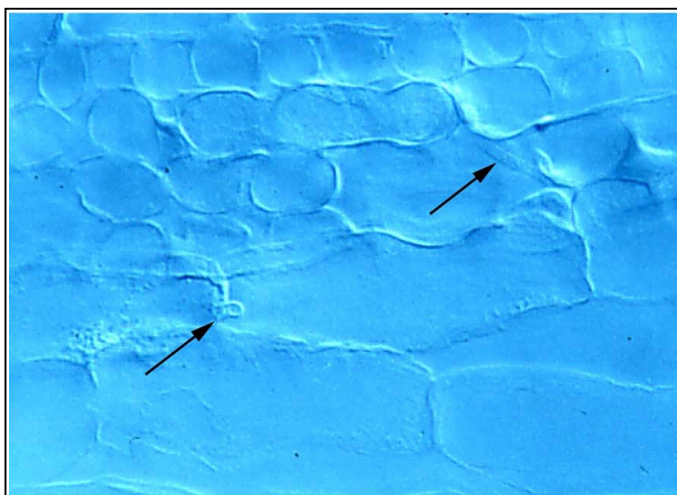


Abb. 51: Infektionshyphen des Stammes CL13pat2563 am Übergang vom Epidermis- zum Parenchymgewebe. Aufhellungspräparate, betrachtet im Interferenzkontrast. 1000-fache Vergrößerung.

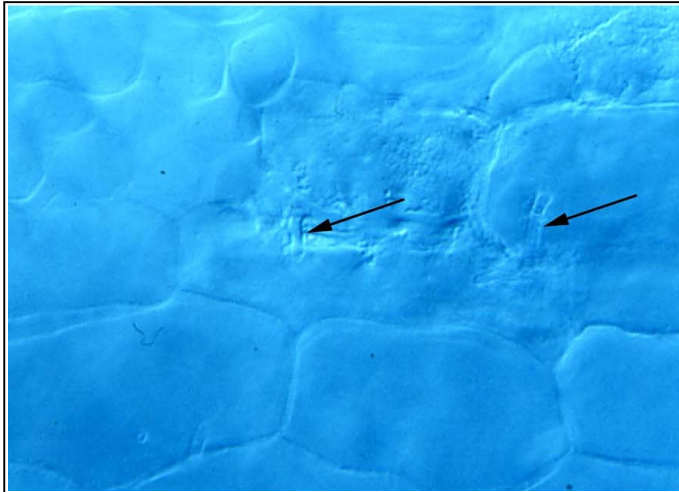


Abb. 52: Infektionshyphen des Methionin-auxotrophen Stammes CL13pat7635 in Epidermiszellen (Pfeile). Aufhellungspräparate, betrachtet im Interferenzkontrast. 1000-fache Vergrößerung.

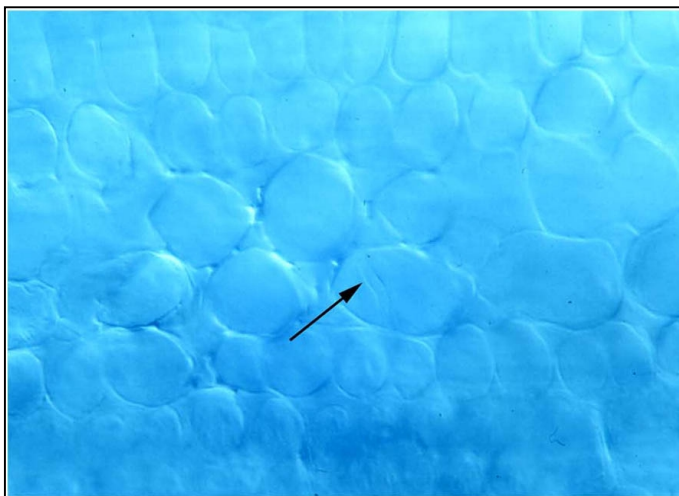


Abb. 53: Arginin-Auxotrophiemutante CL13pat5133: verzweigte Infektionshyphe im Parenchym (Pfeil). Aufhellungspräparate, betrachtet im Interferenzkontrast. 1000-fache Vergrößerung.

Diese Untersuchungen belegen, daß die apathogenen Stämme CL13pat2997, CL13pat2563, CL13pat3050, CL13pat7635, und CL13pat5133 in der Lage sind,

sich durch intrazelluläres Wachstum in der Pflanze auszubreiten. Hinweise auf einen abrupten Stop der invasiven Entwicklung ergaben sich aus diesen Beobachtungen nicht. Da sich in der invasiven Phase der pathogenen Entwicklung nur relativ wenig pilzliches Material in den Blättern befindet, ist eine Quantifizierung des invasiven Wachstums von CL13 und der einzelnen Mutantenstämme nicht möglich. Somit läßt sich keine Aussage darüber treffen, ob für die Mutantenstämme in diesem Stadium quantitative Unterschiede auftraten. Ab dem vierten bis fünften Tag nach Inokulation beginnt CL13 intrazellulär zu wachsen und massiv zu proliferieren. Zum gleichen Zeitpunkt weisen die infizierten Pflanzen erste Anzeichen der Tumorentwicklung auf (nicht gezeigt). Für keinen der hier untersuchten Mutantenstämme ließ sich intrazelluläres Wachstum oder Proliferation des Pilzmaterials beobachten. Etwa eine Woche nach Inokulation ließen sich die pilzlichen Infektionshyphen der Stämme in der Pflanze nicht mehr detektieren (nicht gezeigt). Der Abbruch der pathogenen Entwicklung wird in keinem dieser Stämme von auffälligen morphologischen Veränderungen in den Infektionshyphen oder den betroffenen Pflanzenzellen markiert. Quantitative Unterschiede in der invasiven Entwicklung zwischen den einzelnen Mutantenstämmen und CL13 lassen sich nicht ausschließen, konnten jedoch in diesen Untersuchungen nicht ermittelt werden.

3. Diskussion

In dieser Arbeit wurde die Charakterisierung von fünf apathogenen *Ustilago maydis*-Mutanten beschrieben, die im solopathogenen haploiden Stamm CL13 durch REMI-Mutagenese erzeugt wurden. Im Stamm CL13pat2997 wurde durch die Insertion das Gen *rpl38* betroffen, das für ein ribosomales Protein codiert, in den Stämmen CL13pat2563 und CL13pat3050 die Gene *pat2563* bzw. *pat3050*, zwei Gene ohne Ähnlichkeit zu bekannten Genen in der Datenbank. Im Stamm CL13pat4285 liegt das Gen *ckb1* mutiert vor, das für die regulatorische Untereinheit der Proteinkinase CKII codiert, und im Stamm CL13pat4339 *gas1*, das für eine alpha-Glucosidase codiert. Mittels mikroskopischer Analyse wurde eine Klassifizierung der Mutanten anhand des Entwicklungsstadiums, in dem die pathogene Entwicklung arretiert, vorgenommen. *ckb1*- und *gas1*-Mutanten sind bereits zu Beginn der pathogenen Entwicklung gestört, während *rpl38*-, *pat2563*- und *pat3050*-Mutanten erst in einer späteren Phase des Wachstums in der Pflanze arretieren. Für die *gas1*-Mutanten ist das Ende der pathogenen Entwicklung mit Anzeichen einer pflanzlichen Abwehrreaktion verbunden.

3.1. Die Isolierung und Analyse apathogener REMI-Mutanten in *U. maydis*

In der Natur ist *U. maydis* nur als Dikaryon pathogen. Haploide Sporidien müssen durch Fusion mit einem kompatiblen Partner die Bildung des Dikaryons herbeiführen, das dann in der Lage ist, die Maispflanze zu infizieren. Um in *U. maydis* apathogene Mutanten zu isolieren, war es daher notwendig, mit einem artifiziell hergestellten solopathogenen haploiden Stamm (CL13) zu arbeiten (Bölker et al, 1995a). Sporidien dieses Stammes müssen nicht mit einem kompatiblen Partner fusionieren, um die pathogene Entwicklung durchlaufen zu können. Im Bezug auf die Geschwindigkeit, mit der Pathogenitätssymptome auftreten, und die Größe der gebildeten Tumore sind CL13-Infektionen jedoch in der Regel schwächer als Infektionen mit der Kreuzung der beiden Wildtyp-Stämme FB1 und FB2. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte die Tatsache sein, daß CL13 nur den einfachen Chromosomensatz trägt, während das Dikaryon den doppelten Satz zur Verfügung hat. Dadurch könnten Genprodukte, die für die pathogene Entwicklung benötigt werden, von CL13 in geringeren Mengen gebildet werden als vom Dikaryon.

In dieser Arbeit wurde erstmals gezeigt, daß nicht alle Mutationen, die in CL13 zum Pathogenitätsverlust führen, auch den vollständigen Pathogenitätsverlust bewirken, wenn sie in kompatible haploide Stämme eingeführt werden. Die Gene *rpl38* und *pat3050*, die für die pathogene Entwicklung des Stammes CL13 essentiell sind, sind im Dikaryon lediglich Virulenzfaktoren. Dieses Ergebnis könnte eine Konsequenz des in der Mutagenese verwendeten Stammes sein und möglicherweise zu dem ungewöhnlich hohen Anteil apathogener Stämme unter den REMI-Transformanten in CL13 beitragen: Unter 6000 getesteten Transformanten waren 2,8% nicht in der Lage, Pathogenitätssymptome an der infizierten Pflanze hervorzurufen (Kahmann and Basse, 1999). Im Gegensatz hierzu sind aus der REMI-Mutagenese in *M. grisea* nur 0,1% apathogene Transformanten hervorgegangen (Sweigard et al, 1998).

Eine besondere Gefahr der REMI-Methode liegt in der Möglichkeit weiterer Mutationsereignisse unabhängig von der Insertion des Plasmids. Die Aktivität des Restriktionsenzym kann genomische Deletionen oder Rearrangements hervorrufen. Diese Mutationen können auch für den Verlust der Pathogenität verantwortlich sein, und in solchen Fällen ist die Plasmidinsertion nicht mit dem apathogenen Phänotyp gekoppelt. Unter den im Rahmen dieser Arbeit untersuchten apathogenen Stämmen ließ sich in vier von fünf Fällen die Kopplung zwischen Plasmidinsertion und Verlust der Pathogenität bestätigen (siehe 2.1). Dieser außergewöhnlich hohe Anteil ist jedoch nicht repräsentativ, nachdem sich für alle bislang getesteten apathogenen REMI-Mutanten in *U. maydis* eine Kopplungsrate von etwa 50% ergab (Kahmann and Basse, 1999).

Eine entscheidende Anforderung an die REMI-Mutagenese ist die möglichst zufällige Integration des Mutageneseplasmids in das Genom. Unter 42 REMI-Mutanten, für die gegen Ende dieser Arbeit Sequenzinformation des Insertionsortes vorlag, wurde das Gen *fall*, das für eine Fettsäure-CoA-Ligase kodiert, in zwei unabhängigen Mutanten identifiziert (C.Basse, pers. Mitteilung und diese Arbeit.). Für *U. maydis* werden etwa 8000 Gene angenommen, bei einer Genomgröße von etwa 20Mb. Analog der für *N.crassa* aufgestellten Rechnung, nach der sich das 47Mb-große Genom dieses Pilzes mit $10,8 \times 10^4$ Transformanden mit einer 99%igen Wahrscheinlichkeit abdecken läßt (Kang and Metzberg, 1993) wären für *U. maydis* $4,5 \times 10^4$ Transformanden nötig, um eine Sättigungsmutagenese zu erreichen. Da zum Zeitpunkt der doppelten Isolierung des Gens *fall* erst 4035 REMI-Transformanden vorlagen, deutet dies darauf hin, daß die REMI-Insertionsereignisse möglicherweise nicht völlig zufällig über das gesamte Genom verteilt sind. Auch bei der REMI-Mutagenese von *M. grisea* wurden einige Gene noch vor Erreichen der Sättigungsmutagenese mehrfach isoliert (Sweigard et al, 1998). In beiden Systemen scheint die Tendenz zur bevorzugten Integration des Mutageneseplasmids an bestimmten Genorten jedoch ausreichend schwach zu sein, um den Erfolg dieser Methode zur Isolierung neuer Pathogenitätsgene nicht generell in Frage zu stellen. Für jede neue Mutante sollten daher zunächst die flankierenden Bereiche des reisolierten Plasmids analysiert werden um sicherzustellen, daß sie nicht in einem bereits identifizierten Gen betroffen ist.

3.2. Das *pat2563* Gen

Das in CL13pat2563 betroffene Gen wurde mittels Komplementationsanalyse identifiziert. Das kleinste komplementierende Konstrukt, pComp800R, enthält neben dem *pat2563*-Leserahmen nur 89bp der Promotor-Region des Gens. Ein putatives Promotorelement, die CAAT-Box, befindet sich 49bp stromaufwärts vom Startcodon (siehe Abb.54). Offensichtlich enthält die in pComp800R klonierte Region von 89bp Länge den Minimalpromotor, und ist daher ausreichend um eine Expression des *pat2563*-Gens zu ermöglichen. Erstaunlich ist, daß die REMI-Insertion, die 174bp stromaufwärts vom Startcodon des *pat2563*-Leserahmens erfolgt ist, und somit außerhalb des putativen Minimalpromotors liegt, zum Verlust der Pathogenität führt. Möglicherweise verändert die Insertion des 4kb-großen REMI-Plasmids die Struktur der DNA in der Promotorregion und behindert dadurch die Bindung von Transkriptionsfaktoren oder der RNA-Polymerase. Die Komplementation könnte dann

auf dem Einbringen einer ektopischen Kopie des *pat2563*-Gens, die der Transkription zugänglich ist, beruhen.

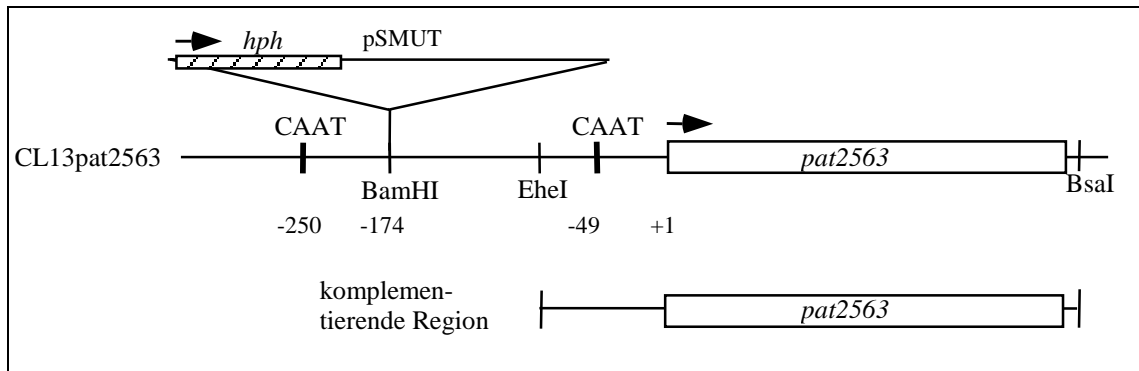


Abb. 54: Schematische Darstellung des *pat2563*-Locus der Mutante CL13pat2563, sowie der komplementierenden Region. Die identifizierten CAAT-Boxen im Promotorbereich des Gens sind eingezeichnet. Die Positionen der identifizierten Elemente und der BamHI-Insertionsstelle relativ zum Translationsstart des *pat2563*-Gens sind angegeben.

pat2563-Nullstämme konnten im Rahmen dieser Arbeit aus zeitlichen Gründen nicht hergestellt werden. Die vollständige Deletion des *pat2563*-Leserahmens in den Stämmen FB1 und FB2 erscheint nach den Erfahrungen mit den *rpl38*- und *pat3050*-Deletionsstämmen in FB1 und FB2 notwendig, um sicherstellen zu können, daß der Ausfall der *pat2563*-Genfunktion auch im Dikaryon, das aus einer Kreuzung der Stämme FB1 und FB2 hervorgeht, zum Verlust der Pathogenität führt.

3.2.1. *pat2563* - ein stadienspezifisch reguliertes Gen?

Die Expression von *pat2563* ließ sich mittels Northern Analyse weder in axenischer Kultur, noch im Tumorgewebe infizierter Maispflanzen unmittelbar vor und nach der Sporenreife nachweisen (siehe 2.3). Möglicherweise wird *pat2563* nur während der frühen Phase der pathogenen Entwicklung exprimiert. Die pathogene Entwicklung, die diesem Stadium vorausgeht, ist der Analyse auf Northern-Ebene nicht zugänglich, da der Anteil an pilzlichem Material im infizierten Pflanzengewebe zu gering ist.

Die Ergebnisse der mikroskopischen Analyse des Infektionsverlaufs der Mutante CL13pat2563 sprechen dafür, daß die Funktion von Pat2563 in der pathogenen Entwicklung vor dem Proliferationsstadium benötigt wird. Die Appressorienbildung, und -funktion in der Mutante ist offensichtlich nicht beeinträchtigt, ebensowenig wie das invasive intrazelluläre Wachstum während des frühen Infektionsverlaufs (siehe 2.7). Das interzelluläre Wachstum im Parenchym der Maispflanze, das in Infektionen mit Wildtyp-Stämmen ab 72h nach Inokulation zu beobachten ist, ließ sich in Infektionen mit CL13pat2563 jedoch weder nach 72h noch zu einem späteren Zeitpunkt erkennen. Dieser Wechsel vom intra- zum interzellulären Wachstum geht in Wildtyp-Infektionen dem proliferativen Stadium und somit der Bildung von makroskopisch erkennbaren Tumoren unmittelbar voraus. Aus diesen Beobachtungen läßt sich schließen, daß die Funktion von *pat2563* während dieser Phase der pathogenen Entwicklung benötigt wird. Da *pat2563* offensichtlich nicht konstitutiv exprimiert wird, ist es wahrscheinlich daß die Expression zu dem Zeitpunkt erfolgt, zu dem sich in der pathogenen Entwicklung der Mutante CL13pat2563 der Pathogenitätsdefekt äußert. Für die

Überprüfung dieser Schlußfolgerung bietet sich die Verwendung eines Reporterkonstruktes an, zum Beispiel die Fusion des *eGFP*-Gens mit dem *pat2563*-Promotor.

3.2.2. Pat2563 - ein kleiner, Cystein-reicher Pathogenitätsfaktor

Der *pat2563*-Leserahmen codiert für ein Protein von 90 Aminosäuren Länge, das sechs Cystein-Reste enthält. Hinweise auf eine mögliche Sekretion des Proteins ergaben sich aus der Sequenzanalyse nicht. Das abgeleitete Genprodukt läßt sich der Gruppe der kleinen (bis zu etwa 100 Aminosäuren Länge), Cystein-reichen (mit 6 bis 10 Cysteinen) Proteine zuordnen, die eine Funktion in der Spezifität und Pathogenität von pilzlichen Pflanzenpathogenen besitzen (Templeton et al, 1994). In dieser Gruppe sind unter anderem die Elicitine (Pernollet et al, 1993; Pernollet, 1994) und die Avirulenz-Gen-Produkte NIP1 aus *Rhynchosporium secalis*, sowie Avr4 und Avr9 aus *Cladosporium fulvum* zu finden (Rohe et al, 1995; De Wit, 1995). Auch die Hydrophobine, von denen einige in der Interaktion zwischen Pilz und Pflanze eine Rolle spielen (Talbot et al, 1996; Kazmierczak et al, 1996), lassen sich mit einer Länge von 90-150 Aminosäuren und 8 Cysteinresten noch dieser Gruppe zuordnen (Templeton et al, 1994, Kershaw and Talbot, 1998).

Elicitine sind eine Gruppe von strukturell verwandten Proteinen, die von *Phytophthora* und *Pythium* spp. sekretiert werden, und aufgrund ihrer Eigenschaft isoliert wurden, in bestimmten Pflanzen, insbesondere *Nicotiana* spp., Nekrosen und erworbene Resistenz hervorzurufen (Ricci et al, 1989; Nespoulous, 1992; Übersichten in Ebel and Scheel, 1992 und Yu, 1995). Die in *Phytophthora* spp. charakterisierten Elicitine bestehen aus 98 Aminosäuren, darunter sechs Cysteine, von denen auch in dieser Proteinfamilie jedes an der Bildung von intramolekularen Disulfidbrücken beteiligt ist (Nespoulous et al, 1992). Die Sekundärstruktur des Elicitins Capsicein, sowie die Positionen der Cystein-Paarungen ließen sich mittels NMR-Spektroskopie klären (Bouaziz et al, 1994). Die Sekundärstruktur dieses Elicitins weist fünf alpha-helikale Bereiche sowie ein antiparalleles beta-Faltblatt auf. Die intramolekularen Cystinbrücken verbinden diese Struktureinheiten zu einer kompakten Tertiärstruktur, die sich durch eine große Stabilität auszeichnet (Bouaziz et al, 1994). Diese Struktur ist für diese Proteinfamilie exemplarisch, da sämtliche bislang charakterisierten Elicitine in ihrer Primär- und Sekundärstruktur eine starke Konservierung erkennen lassen (Nespoulous et al, 1992; Huet et al, 1992). Zur Funktion der Elicitine liegen bereits einige Anhaltspunkte vor. Sie werden von *Phytophthora* spp. sekretiert und besitzen die Fähigkeit, spezifisch an Sterol zu binden (Mikes et al, 1997). Da *Phytophthora* spp. wie alle Oomyceten nicht in der Lage sind, Sterole zu synthetisieren, wird angenommen, daß die Funktion der Elicitine in der Aufnahme von Phytosterol liegt (Mikes et al, 1997 and Mikes et al, 1998).

Das Avirulenzgenprodukt Avr9 des Tomaten-pathogens *Cladosporium fulvum* ist ebenfalls ein kleines Cystein-reiches Protein. *C.fulvum*-Stämme, die das Avr-9 Avirulenzgen tragen, sind auf Tomatenpflanzen, die das Cf-9-Resistenzgen tragen, avirulent. Es handelt sich also um eine Gen-für-Gen Interaktion zwischen diesem Pathogen und seiner Wirtspflanze (Flor, 1971). Während der Infektion sekretieren

C. fulvum Stämme, die das Avr-9-Avirulenzgen tragen, diesen Elicitor in großen Mengen in den Apoplasten. Er ließ sich aus interzellulärer Waschflüssigkeit *C. fulvum*-infizierter Tomatenpflanzen aufgrund seiner Eigenschaft, Nekrosen in Tomatenpflanzen hervorzurufen, die das Cf-9 Resistenzgen tragen, isolieren (De Wit and Spikman, 1982). Die sechs Cysteine von AVR9 bilden ebenfalls intramolekulare Disulfidbrücken aus. Mit einer Länge von 28 Aminosäuren ist das prozessierte Protein erheblich kleiner als die Elicitine (Van den Ackerwecken et al, 1993). Die Sekundärstruktur des Proteins weist ein dreisträngiges antiparalleles β -Faltblatt auf (Verwoort et al, 1997). Dieses Strukturelement, sowie die Positionen der drei Cystinbrücken, die das Polypeptid zu einer Art Knoten verbinden, sind charakteristisch für die kleinste stabile globuläre Struktur, die in Proteinen erkannt wurde, den "Cystine Knot" (Isaacs, 1995; Verwoort et al, 1997). Dieses Strukturmotiv wurde in einer Reihe von offensichtlich unverwandten Proteinen identifiziert, die in ihrer Primärstruktur keine Ähnlichkeit untereinander aufweisen, und diverse biologische Aktivitäten erkennen lassen. So werden einige Toxine (ω -Conotoxin, Ω -Antracotoxin) und Inhibitorproteine, die die Funktion größerer Proteinrezeptoren wie Ionenkanäle oder Proteasen blockieren (Insekten Protease-Inhibitoren PMP-C, PMP-D2, Pflanzenpeptid KalataB1), Wachstumsfaktoren (PDGF, TGF- β 2), Hormone (Gonadotropin alpha-Untereinheit) sowie Mucine (bovine sumaxillary mucin BSM, menschliches Mucin MUC5B) den "Cystine Knot"-Proteinen zugerechnet (Pallaghy et al, 1994; Isaacs, 1995). Das "Cystine Knot"-Motiv liefert in diesen Proteinen die Basis für eine stabile, kompakte Struktur, wobei die jeweilige physiologische Funktion des Proteins von der Natur der exponierten Peptidschlaufen abhängt (Isaacs, 1995; Kooman-Gersmann et al, 1997). Eine Funktion von Avr9 in der pathogenen Entwicklung von *Cladosporium fulvum* ist bislang noch nicht erwiesen, sie könnte jedoch in Analogie zu den inhibitorischen "Cystine Knot"-Proteinen in der Interaktion mit pflanzlichen Ionenkanälen oder Nährstoff-Transportern liegen (Kooman-Gersmann et al, 1997).

Hydrophobine sind sekretierte Proteine, die an der Oberfläche von pilzlichen Strukturen wie Hyphen, Fruchtkörpern oder Sporen einen hydrophoben Film ausbilden (Wessels et al, 1991; Wösten et al, 1993). Hydrophobe Aminosäuren tendieren in globulären Proteinen gewöhnlich dazu, sich in einer energetisch günstigeren Konformation im Inneren des Proteins anzuordnen. Die acht Cysteine dieser Proteinklasse bilden untereinander Disulfidbrücken aus, die eine Sekundärstruktur stabilisieren, bei der hydrophobe Aminosäuren exponiert gehalten werden (de Vries et al, 1993, Yaguchi et al, 1993, Kershaw and Talbot, 1998).

Eine grundlegende Gemeinsamkeit aller kleiner Cystein-reicher Proteine ist die besondere Rolle, die den Cystein-Resten in der Ausbildung und Stabilisierung der Sekundär- und Tertiär-Struktur zukommt (Templeton et al, 1994). Darüber hinaus werden diese Proteine zumeist sekretiert (Templeton et al, 1994). Der Anteil an hydrophoben Aminosäuren in der Pat2563-Sequenz läßt eine cytoplasmatische Lokalisierung mit einer Wahrscheinlichkeit von nur 4,3% zu (PROSITE 15.0, Swiss Institute of Bioinformatics, Genf, Bairoch et al, 1997). Demnach müßte Pat2563 in einem Zellkompartiment oder extrazellulär vorliegen. In der Aminosäuresequenz von Pat2563 läßt sich jedoch kein typisches Sekretionssignal oder Signalpeptid erkennen

(PROSITE 15.0). Daher sollte die Lokalisierung von Pat2563 mit Hilfe einer Fusion des *pat2563*-Leserahmens mit einer Epitopsequenz oder dem GFP-Reporter gen untersucht werden. Der Vorteil der letzteren Möglichkeit liegt darin, daß mit einem derartigen Konstrukt zugleich auch die Expression des *pat2563*-Gens untersucht werden könnte. Ebenso wie die Elicidine und Avr9 besitzt das abgeleitete Genprodukt Pat2563 sechs Cystein-Reste, die sich relativ gleichmäßig über die gesamte Länge des Polypeptids verteilen (Abb.55). Für die dreidimensionale Struktur dieses Proteins könnte dies bedeuten, daß die Ausbildung von intramolekularen Disulfidbrücken in Pat2563 zu einer ähnlich kompakten und stabilen Struktur führen kann, wie sie in den Elicidinen und AVR9 beobachtet wurde. Für die Elicitor-Funktion der Elicidine und des AVR9-Proteins sind diese Disulfidbrücken essentiell. Einzelne Aminosäure-Austausche, die eines oder mehrere der sechs Cystein-Reste betreffen, führen in beiden Proteinen zum Verlust der Elicitor-Aktivität (Bouaziz et al, 1994; Kooman-Gersman et al, 1997). Falls den Cystein-Resten in Pat2563 im Bezug auf die Struktur und Funktion des Proteins eine ähnliche Bedeutung zukommt, wie sie für die Elicidine und AVR9 gezeigt wurde, so sollten Aminosäure-Austausche an der Position der Cysteine auch hier die Genfunktion beeinträchtigen, und somit zu verringerter Pathogenität oder zum vollständigen Verlust der Pathogenität führen.

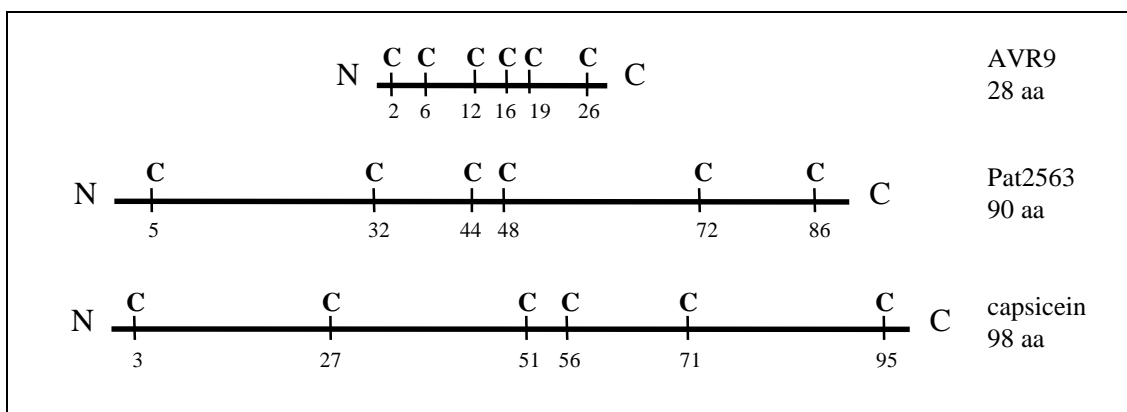


Abb. 55: Schematische Darstellung der Positionen der Cystein-Reste in den Proteinen Avr9 aus *C.fulvum* (Genbank Accession X60284; prozessiertes Protein), Capsicein aus *Phytophthora capsici* (GenPept Accession S42360; prozessiertes Protein) und dem abgeleiteten Genprodukt Pat2563 aus *U. maydis*. Die relative Verteilung der sechs Cystein-Reste über die gesamte Länge des Proteins ist in diesen drei Proteinen ähnlich.

Die von der Aminosäuresequenz abgeleitete Sekundärstruktur von Pat2563 läßt zwei α -helicale Bereiche und einen β -Strang erkennen (Programm PREDATOR des EMBL-Heidelberg, Abb.56). Die Zuverlässigkeit dieser Vorhersage ist jedoch offensichtlich nur gering, da eine derartige auf der Primärstruktur basierende Vorhersage für die Proteine Capsicein und AVR9 nur sehr begrenzt mit der in NMR-Studien ermittelten tatsächlichen Sekundärstruktur übereinstimmt. Gesicherte Aussagen zur Sekundär- und Tertiärstruktur von Pat2563 lassen sich nur mittels NMR-Spektroskopie des gereinigten Proteins treffen.

| Pat2563 | | |
|----------------|---|----|
| 1 | MPAPFCSHSSSSSSSSSSSSSSSSPSPSLSLSLSCSSLIISLFVDFFCSPSCS | 50 |
| | _____HHHHHHHHH_____E | |
| 51 | RLVLSPTALLLPYSHLDHQACQYLASSQDRRPLFCATF | 90 |
| | EEEE_____HHHHHHH_____ | |

Abb. 56: Vorhersage der Sekundärstruktur des abgeleiteten Genproduktes Pat2563 mit dem Programm PREDATOR des EMBL Heidelberg. HH deutet potentielle alpha-helikale Bereiche an, EE steht für potentielle beta-Stränge.

Einen Anhaltspunkt für die tatsächliche Struktur von Pat2563 könnte die Position der möglichen Myc-typischen Helix-Loop-Helix-Dimerisierungsdomäne liefern (siehe 2.3.2.). Um als Dimerisierungsdomäne funktionell zu sein, muß dieses Sequenzmotiv exponiert liegen. Dies wäre gegeben, wenn man für Pat2563 eine ähnliche Struktur wie für AVR9 annimmt, nicht jedoch, im Falle einer Elicitin-artigen Struktur. Da die AVR9-Sequenz keine derartige Dimerisierungsdomäne erkennen läßt, sollte eine gezielte Mutagenese von Pat2563 Hinweis darauf liefern, ob diese Domäne tatsächlich für die Funktion des Proteins von Bedeutung ist.

Sollte sich mit *pat2563*-Nullmutanten der Stämme FB1 und FB2 eine Rolle dieses Gens in der pathogenen Entwicklung von *U. maydis* bestätigen lassen, so stellt der angenommene Pathogenitätsfaktor Pat2563 neben dem Hydrophobin Mpg1 aus *Magnaporthe grisea* und dem Avirulenzgenprodukt Nip1 aus *Rhynchosporium secalis*, deren Ausfall jeweils zu einer reduzierten Pathogenität führt (Talbot et al, 1996; Beckerman et al, 1996; Rohe et al, 1995), ein weiteres Mitglied der Gruppe kleiner, Cystein-reicher Proteine mit Funktion in der Pathogenität dar.

3.3. Ckb1, eine regulatorische Untereinheit der Proteinkinase CKII

Das in CL13pat4285 mutierte Gen *ckb1* ist für den Verlust der Pathogenität in diesem Stamm verantwortlich. Aufgrund signifikanter Sequenzähnlichkeit ließ sich Ckb1 als regulatorische β -Untereinheit der Proteinkinase CKII identifizieren.

Die Proteinkinase CKII ist eine ubiquitär vorkommende, stark konservierte Serin/Threonin-Kinase, die an der Regulation fundamentaler zellulärer Prozesse, wie Transkription, Translation, Wachstum, Morphogenese und der Zell-Zyklus-Regulation beteiligt ist. Zu den Substraten von CKII zählen unter anderem „TATA-Binding Protein“ (Maldonado and Allende, 1999), Topoisomerase II (Ackerman et al, 1985, Leroy et al, 1999a), der Tumorsuppressor p53 (Schuster et al, 1999, Götz et al, 1999), HMG-Proteine (Inoue et al, 1980, Walton et al, 1983) sowie Calmodulin (Meggio et al, 1987) und die regulatorische Untereinheit der cAMP-abhängigen Proteinkinase (Carmichael et al, 1982).

Das CKII Holoenzym ist ein Tetramer, das aus zwei katalytischen α -Untereinheiten und zwei regulatorischen β -Untereinheiten besteht. Deletions- und Überexpressionsstudien in *S. pombe* ergaben, daß die α -Untereinheit nur in Anwesenheit der β -Untereinheit katalytische Aktivität besitzt (Roussou and Draetta, 1994). Die β -Untereinheit ist für die

Oligomerisierung und die Stabilisierung des Tetramers zuständig, reguliert die katalytische Aktivität des Holoenzym, interagiert mit den Zielproteinen, und bestimmt die Substratspezifität (Pinna, 1990; Dobrowolska et al, 1999). In Säugetierzellen wurde gezeigt, daß CKII β unabhängig vom Holoenzym regulatorische Aktivität besitzen kann. So bindet die β -Untereinheit auch eigenständig an den Zellzyklusregulator p53 und übt dadurch Zelltyp-abhängig eine zusätzliche Regulation auf dessen DNA-Bindungsaktivität aus (Schuster et al, 1999).

Für die β -Untereinheit wurde eine moduläre Struktur postuliert, in der sich diese unterschiedlichen Funktionen individuellen Domänen zuordnen lassen (Leroy et al, 1999b). In Mutationsanalysen ließen sich die für die Aktivierung des Holoenzym durch Substratmoleküle verantwortliche Polyamin-Bindedomäne, die für die Aktivierung der α -Untereinheit verantwortliche Domäne, die Oligomerisierungsdomäne, sowie eine Domäne, die für die Lokalisierung des Holoenzym an der Zellmembran verantwortlich ist, identifizieren (Leroy et al, 1999b). Die Domänenstruktur konnte durch Deletionsanalysen und in "Two-Hybrid"-Interaktionsstudien bestätigt werden (Kusk et al, 1999). CKII β -Untereinheiten anderer phytopathogener Pilze sind bislang noch nicht isoliert worden. Unter den derzeit bekannten β -Untereinheiten ist Ckb1 aus *S. pombe* dem Protein Ckb1 aus *U. maydis* am ähnlichsten (3.5.3.). Im Sequenzvergleich von Ckb1 und den CKII β -Untereinheiten aus *S. pombe*, Mensch, Rind, *Drosophila* und *C. elegans* wurde deutlich, daß sich Ckb1 aus *U. maydis* von den anderen β -Untereinheiten durch zwei zusätzliche Sequenzabschnitte unterscheidet, die in keiner der bislang identifizierten β -Untereinheiten vorkommen. Diese *U. maydis*-spezifischen Domänen separieren die stark konservierte N-terminale Hälfte des Proteins, die spezifische Interaktionsfunktionen innerhalb des Holoenzym besitzt (Kusk et al, 1999; Krehan and Pyerin, 1999), von zwei weiteren, erheblich kürzeren Regionen starker Konservierung in der C-terminalen Hälfte (Abb.23, 3.5.3.).

3.3.1. Die *ckb1*-Allele der Stämme CL13pat4285 und CL13*ckb1::hyg* besitzen unterschiedliche Aktivität

Das *ckb1*-Allel des Stammes CL13pat4285 beinhaltet die gesamte stark konservierte N-terminale Domäne des Proteins (W17 bis S183, Abb.23), während das *ckb1::hyg*-Allel die Insertion innerhalb dieser Domäne an Aminosäureposition 157 trägt. Der Vergleich der Koloniemorphologie und der Wachstumsrate der beiden Stämme CL13pat4285 und CL13*ckb1::hyg* zeigt, daß CL13pat4285 im Wachstum weniger stark beeinträchtigt ist, obwohl er neben der Mutation am *ckb1*-Locus mindestens ein weiteres, davon unabhängiges Mutationsereignis trägt (3.5.1.). Die Ursache für die beobachteten Unterschiede zwischen den beiden Mutantenstämmen liegt wahrscheinlich darin, daß das *ckb1*-Allel der Mutante CL13pat4285 eine Restaktivität besitzt, die im *ckb1::hyg*-Allel nicht vorhanden ist. Obwohl sich nicht ausschließen läßt, daß auch das *ckb1::hyg*-Allel kein vollständiges *ckb1*-Null-Allel ist, deutet dieses Ergebnis darauf hin, daß sich durch das Einbringen verschiedener Mutationen in *ckb1*-Allele unterschiedlicher Aktivität herstellen lassen.

3.3.2. Der Effekt der *ckb1*-Disruption auf Wachstum und Zellmorphologie

Neben Wachstumsdefekten und Melanisierung zeigen Zellen der *ckb1*-Insertionsmutante eine unregelmäßige Form, sind verdickt und trennen sich nach der Knospung nicht voneinander. Dieser Effekt der Mutation des *ckb1*-Gens in *U. maydis* ist dem Phänotyp der Deletion der β -Untereinheit von CKII in *S. pombe* sehr ähnlich (Roussou and Draetta, 1994). In beiden Organismen wird die Funktion der β -Untereinheit von CKII demnach in der Regulation des Wachstums und der Zellmorphologie benötigt. Wie eingangs erwähnt, zählt zu den von CKII phosphorylierten Substraten die Topoisomerase II. In *S. cerevisiae* wurde gezeigt, daß durch Mutation oder Deletion der CKII-Phosphorylierungsstellen in TopoII nicht-phosphorylierbare, jedoch katalytisch aktive Varianten des Enzyms erzeugt werden können. Diese nicht durch CKII regulierbaren Varianten bewirken eine Verlängerung der Dopplungsrate in *S. cerevisiae* (Leroy et al, 1999a). Das verlangsamte Wachstum der *ckb1*-Mutanten könnte demnach auf den Ausfall der regulatorischen Funktion des CKII-Holoenzym auf die Topoisomerase II zurückzuführen sein.

3.3.3. Kreuzungsdefekt und Pathogenität von *ckb1*-Mutanten

In *S. cerevisiae* wurde gezeigt, daß der Verlust der β -Untereinheit von CKII zu keiner Beeinträchtigung des Kreuzungsverhaltens führt. Entsprechende Experimente in *S. pombe* sind bislang nicht durchgeführt worden. *ckb1*-Insertionsmutanten in *U. maydis* weisen unter Pheromon-Stimulierung nicht die erhöhte Expression der Pheromongene des Wildtyps auf, bilden keine Paarungshyphen, und fusionieren nicht miteinander (3.5.5.).

Die Weiterleitung des Pheromonsignals in *U. maydis* erfolgt vermutlich über eine MAP-Kinasekaskade und wird auch durch den cAMP-Signalweg beeinflusst. Bislang sind 3 potentielle Komponenten von MAP-Kinasekaskaden in *U. maydis* isoliert worden: Die MAPKK Kinase Ubc4 (Andrews et al, 2000), die MAPK Kinase Ubc5 (Andrews et al, 2000), sowie die MAP Kinase Kpp2 (Müller et al, 1999), die auch als Ubc3 bezeichnet wurde (Mayorga and Gold, 1999). Es wird angenommen, daß Kpp2 den Transkriptionsfaktor Prf1 phosphoryliert, der an cis-regulatorische Sequenzmotive (pheromon-responsive elements, PREs) bindet, die im 5'- oder 3'-Bereich aller bislang bekannten Pheromon-regulierten Gene identifiziert wurden (Urban et al, 1996; Hartmann et al, 1996; Müller et al, 1999). Prf1 stellt den zentralen Regulator der pathogenen Entwicklung dar. Neben der post-transkriptionellen Regulation wird die Aktivität dieses HMG-Proteins auch von der zellulären cAMP-Konzentration beeinflusst (Hartmann et al, 1996). Diese Regulation findet wahrscheinlich über die cAMP-abhängige Proteinkinase (PKA) statt, und wird an die Pheromon-regulierten Gene weitergeleitet (Krüger et al, 1998; Hartmann et al, 1999). PKA, die aus der katalytischen Untereinheit Adr1 und der regulatorischen Untereinheit Ubc1 besteht, ist darüber hinaus auch an der Regulation von Zellmorphologie und Cytokinese beteiligt (Orth et al, 1995; Gold et al, 1994, 1997).

Aus Untersuchungen an Säugetierzellen ist bekannt, daß zu den potentiellen Substraten der Proteinkinase CKII HMG-Proteine und die regulatorische Untereinheit der PKA zählen, obwohl nicht sicher geklärt wurde, welchen Effekt diese Phosphorylierung auf

die Aktivität der Interaktionspartner hat (Carmichael et al, 1982; Pinna, 1990). Sowohl in der Proteinsequenz von Prf1 als auch in der Sequenz von Ubc1 lassen sich mehrere potentielle CKII-Phosphorylierungsstellen (S/T-X-D/E) erkennen (Hartmann, 1997; Gold et al, 1994). Somit besteht die Möglichkeit, daß CKII zur Regulation der Aktivität dieser beiden Proteine beiträgt. Dies könnte den Kreuzungsdefekt der *ckb1*-Mutanten, sowie den in diesen Stämmen beobachteten Cytokinesedefekt erklären. Da sich in Δ *prf1*-Mutanten die pathogene Entwicklung durch die Überexpression des funktionellen b Heterodimers wiederherstellen läßt (Hartmann et al, 1996), dies aber für den Stamm CL13pat4285 nicht der Fall ist (K.H.Braun, J.Görl, R.Kahmann, pers. Mitteilung), kann der Pathogenitätsverlust der *ckb1*-Mutanten nicht durch die regulatorische Funktion von CKII auf Prf1 erklärt werden. Um den Pathogenitätsverlust zu erklären, müßte postuliert werden, daß die Proteinkinase CKII ein weiteres Protein reguliert, das in der Pathogenitäts-Signaltransduktionskaskade unterhalb des b-Heterodimers einzuordnen ist.

Somit lassen sich aufgrund des pleiotropen Phänotyps der *ckb1*-Mutation eine Reihe spezifischer regulatorischer Funktionen für CKII in *U. maydis* postulieren. Als mögliche Interaktionspartner von Ckb1 ergeben sich Topoisomerase II, Ubc1, Prf1 und ein postuliertes Protein, dessen Aktivität für die pathogene Entwicklung von *U. maydis* essentiell ist. In Anbetracht der Domänenstruktur der β -Untereinheit besteht die interessante Möglichkeit, daß die beiden *U. maydis*-spezifischen Domänen die Funktion von Ckb1 in der pathogenen Entwicklung des Pilzes vermitteln. Da sich sowohl die vollständige β -Untereinheit, als auch verkürzte Versionen davon im "Two-Hybrid-System" als Köder eignen, um die durch diese Untereinheit oder das Holoenzym CKII regulierten Interaktionspartner zu isolieren (Kusk et al, 1999), sollten sich die postulierten Zielproteine auf diesem Weg identifizieren lassen.

3.4. Der Pathogenitätsfaktor Gas1

Das im Mutantenstamm CL13pat4339 durch die REMI-Insertion betroffene Gen *gas1* ist für die pathogene Entwicklung von *U. maydis* essentiell. *gas1*-Deletionsstämme lassen außerhalb der Pflanze im Wachstum und der Entwicklung keinen Defekt erkennen. Gas1 ist somit der erste Pathogenitätsfaktor, der in *U. maydis* identifiziert wurde.

3.4.1. Gas1 - eine alpha-Glucosidase des Endoplasmatischen Retikulums?

Der Vergleich der Proteinsequenz von Gas1 mit bekannten Proteinen in der Datenbank ergab signifikante Ähnlichkeit zur Enzymklasse der alpha-Glucosidasen (siehe 2.7.). Diese Enzyme katalysieren die Abspaltung eines alpha-Glycosyl-Restes von dem nicht-reduzierenden Ende des Substrates, wobei ein alpha-Glucose-Molekül freigesetzt wird. Alpha-Glucosidasen sind bei Mikroorganismen, Pflanzen und Tieren weit verbreitet. Sie können am Abbau extrazellulärer Kohlenstoffquellen, am lysosomalen Abbau des Speicherstoffs Glycogen, und an der endoplasmatischen Prozessierung der Kohlenhydratreste von N-glycosylierten Glycoproteinen beteiligt sein. Aufgrund der stärkeren Sequenzähnlichkeit zu den ER-Glucosidasen II läßt sich Gas1 wahrscheinlich dieser Gruppe von Enzymen zuordnen.

Die ER-Glucosidasen II kommen in allen eukaryontischen Zellen vor und weisen ein hohes Maß an Konservierung auf. Der direkte Sequenzvergleich zwischen Gas1 und den ER-Glucosidasen II aus *Dictyostelium discoideum*, *Mus musculus* und *Caenorhabditis elegans* verdeutlicht die große Ähnlichkeit zwischen den Proteinen (Abschnitt 2.6., Abb.31). Obwohl die alpha-Glucosidasen II im ER lokalisiert sind (Lucocq et al, 1986), besitzt keiner der bislang analysierten Vertreter dieser Enzymklasse ein K(H)DEL-Retentionssignal. Deshalb war lange unklar, auf welche Art diese Enzyme im ER zurückgehalten wurden. Durch Aufreinigung des Enzyms aus Säugerzellen konnte gezeigt werden, daß die Glucosidase II ein Heterooligomer ist, das aus der katalytischen α - und einer nicht-katalytischen β -Untereinheit besteht. Die β -Untereinheit besitzt das ER-Retentionssignal und ist offensichtlich für die ER-Lokalisierung des Holoenzym verantwortlich (Trombetta et al, 1996; Arendt and Ostergaard, 1997).

Da Gas1 kein eigenes ER-Retentionssignal besitzt, könnte dessen Lokalisierung im ER ebenfalls über die Dimerisierung mit einer weiteren Untereinheit vermittelt werden. Als angenommene katalytische Untereinheit der ER-Glucosidase II von *U. maydis* ist Gas1 wahrscheinlich an der Prozessierung und Reifung N-glycosylierter Glycoproteine im ER beteiligt.

Die N-Glycosylierung verläuft bei allen Eukaryonten in gleicher Weise. Der erste Schritt in diesem Prozess ist der Transfer eines vorgefertigten Oligosaccharids an einen Asparaginrest im Kontext (Asn-X-Ser/Thre) des neu gebildeten Polypeptids. Unmittelbar nach dem Transfer beginnt die Prozessierung dieses Kern-Oligosaccharids, das aus 2 N-Acetyl-Glucosamin-, 9 Mannose- und 3 Glucoseresten besteht (GlcNAc₂Man₉Glc₃) (Übersicht in Hubbard und Ivatt, 1981; Kornfeld and Kornfeld, 1985; Elbein, 1991). Zunächst wird der terminale α -1,2-verbundene Glucoserest von der ER-Glucosidase I entfernt. Glucosidase II katalysiert die Abspaltung der beiden nachfolgenden α -1,3-Glucose-Einheiten, wobei der Abspaltung der ersten dieser beiden Einheiten eine besondere Bedeutung zukommt: Dieser Reaktionsschritt dient als Signal für die Chaperon-katalysierte Faltung des entstehenden Glycopeptids (Hammond et al, 1994; Simons et al, 1998). Die Abspaltung der zweiten α -1,3-verbundenen Glucose-Einheit durch Glucosidase II reguliert die Dissoziation des Proteins von den Chaperonen (Hebert et al, 1995). Die ER alpha-Glucosidase II ist somit nicht nur an der Prozessierung des N-verbundenen Kern-Oligosaccharids beteiligt, sondern fördert auch die korrekte Faltung des Glycoproteins (Helenius et al, 1997).

In allen bislang untersuchten Systemen wird die katalytische Untereinheit der ER-Glucosidase II von einem einzigen Gen kodiert (Trombetta et al, 1996; Freeze et al, 1997; Simons et al, 1998). In Anbetracht der zentralen Funktion dieses Enzyms bei der Prozessierung und Reifung der N-Glycosylierten Glycoproteine wäre zu erwarten, daß der Verlust der Glucosidase II-Aktivität zu schwerwiegenden generellen Wachstumsdefekten führt, da keine korrekt prozessierten N-glycosylierten Produkte gebildet werden können. Erstaunlicherweise traten in *D. discoideum* und *S. cerevisiae* Stämmen, in denen das Gen für die ER-Glucosidase II deletiert wurde, keine generellen Wachstumsdefekte auf. *modA*-Mutanten von *D. discoideum* bilden jedoch veränderte Fruchtkörper mit kurzem, verdicktem Stiel (Freeze et al, 1997). Die Funktion der ER

Glucosidase ModA ist demnach in diesem System nur während der Fruchtkörperbildung essentiell. Die *Gls2*-Mutanten von *S. cerevisiae* lassen ausschließlich Zellwandveränderungen mit verringertem Gehalt an 1,6- β -Glucan und variabler Dicke der Zellwand erkennen. Ein genereller Effekt auf die Faltung und Prozessierung von nicht an der Zellwandsynthese beteiligten N-Glycosylierten Glycoproteinen, wie dem Pro- α -Faktor oder den Enzymen Invertase und CarboxypeptidaseY wurde in den *gls2*-Mutanten nicht beobachtet. Daher wird angenommen, daß in *S. cerevisiae* die Funktion der ER-Glucosidase GlsII ausschließlich für die Prozessierung intrazellulär synthetisierter Zellwandbestandteile wichtig ist (Simons et al, 1998).

Der Nachweis, daß es sich bei Gas1 um eine alpha-Glucosidase des ER handelt, sollte mittels Immunolokalisierung oder zum Beispiel unter Verwendung einer Gas1-GFP Fusion erbracht werden. Eine weitere Möglichkeit, indirekt eine Funktion von *gas1* im ER nachzuweisen wäre die Expressionsanalyse bekannter ER-Chaperone. Im Fall einer Akkumulation von inkorrekt gefalteten Proteinen im ER kommt es im Rahmen des "Unfolded Protein Response" (UPR) zur verstärkten Transkription von ER-Chaperonen, wie z.B. *KAR2* in *S. cerevisiae* (Zimmer et al, 1999; Welihinda et al, 1999). Da die enzymatische Aktivität der ER-Glucosidasen II mit dem ER-Qualitätskontrollmechanismus verbunden ist, der die korrekte Faltung der N-Glycosylierten Proteine im ER sicherstellt (Ellgaard et al, 1999), wäre anzunehmen, daß der Ausfall der Gas1-Funktion eine Akkumulation inkorrekt gefalteter Glycoproteine im ER nach sich zieht. Diese Akkumulation würde den UPR auslösen und somit die verstärkte Transkription der ER-Chaperonen bewirken.

3.4.2. Hinweise auf eine entwicklungspezifische Funktion von *gas1* in der Infektionshyphe

Das Gen *gas1* wird während der Kultivierung außerhalb der Pflanze, der Zellfusion und im dikaryotischen Filament nur schwach basal exprimiert (2.7.). *gas1*-Deletionsstämme lassen unter diesen Bedingungen keine Beeinträchtigung des Wachstums oder der Entwicklung erkennen. Während der pathogenen Entwicklung findet unmittelbar vor der Penetration der Blattoberfläche eine deutliche Zunahme der Expressionsstärke statt. In dieser Phase der pathogenen Entwicklung lassen *gas1*-Deletionsstämme eine vom Wildtyp abweichende Morphologie erkennen: die Hyphenwand weist im Abschnitt, der unmittelbar vor der Differenzierung des Appressoriums gebildet wurde, charakteristische unregelmäßige Verdickungen auf. Diese Befunde lassen auf eine entwicklungspezifische Funktion von Gas1 während der Penetration der Blattoberfläche schließen. Dies wäre mit der Situation in *D. discoideum* vergleichbar, in der die Mutation von *modA* ebenfalls entwicklungspezifische Defekte herbeiführt (Freeze et al, 1997). Die morphologischen Veränderungen der Hyphenwand in *gas1*-Deletionsstämmen finden eine Parallele im Phänotyp der *gls2*-Mutanten in *S. cerevisiae* (Simons et al, 1998). Es besteht die Möglichkeit, daß die Funktion von *gas1* in *U. maydis* ähnlich der von *gls2* in *S. cerevisiae* für die Synthese bestimmter Zellwandkomponenten benötigt wird.

3.4.3. *gas1*-Deletionsstämme und induzierte Pflanzenabwehr

Die Infektionshyphae der *gas1*-Deletionsstämme ist trotz der morphologischen Veränderungen in der Hyphenwand in der Lage, ein funktionelles Appressorium zu bilden, und die Blattoberfläche zu penetrieren. Die pathogene Entwicklung dieser Stämme endet jedoch unmittelbar nach der Penetration in der ersten epidermalen Zelle. An der Penetrationsstelle lassen sich zumeist charakteristische Veränderungen in den Epidermiszellen erkennen. Die arretierte Infektionshyphae kann von Papillen-artigen Ablagerungen umgeben sein, die Wirtszellen kollabieren und lassen unter UV-Licht Autofluoreszenz erkennen, ein Hinweis auf die Akkumulation phenolischer Verbindungen. Dies sind charakteristische Anzeichen für eine induzierte Pflanzenabwehr (deWit, 1977; Dixon and Lamb, 1990; Metraux and Raskin, 1993; Dixon et al, 1994).

Hinweise auf stadienspezifische Veränderungen in der Zusammensetzung der Hyphenwand konnten bei verschiedenen phytopathogenen Pilzen gewonnen werden. Bei *M. grisea* (Howard et al, 1991), *C. lindemuthianum* (O'Connell and Bailey, 1991) und diversen Rostpilzen (Deising et al, 1996) zeigte sich jeweils im Vergleich zum Keimschlauch eine deutliche Reduktion der Lektin-Affinität der Infektionshyphae (Übersicht in Mendgen et al, 1996). Bei *C. lindemuthianum* befinden sich auf den Keimschläuchen und auf der Oberfläche der Infektionsstrukturen jeweils spezifische Glycoproteine, die sich mit monoklonalen Antikörpern unterscheiden lassen (Pain et al, 1996). Die Keimschläuche von *Puccinia graminis* tragen einen Glycoprotein-Elicitor, der im Weizen HR hervorruft (Kogel et al, 1988). Mit Hilfe monoklonaler Antikörper konnte gezeigt werden, daß dieses Glycoprotein auf der Oberfläche der Infektionshyphen und substomatalen Vesikel nicht vorhanden ist oder nicht erkannt wird (Hippe-Sanwald, 1995). Bislang wurde in keinem dieser Systeme ein für die beobachteten Modifikationen verantwortliches Gen identifiziert, und es konnte daher noch nicht gezeigt werden, daß diese Veränderungen der Zellwand für die pathogene Entwicklung essentiell sind.

Der Pathogenitätsfaktor Gas1 aus *U. maydis* ist als angenommene ER-Glucosidase II möglicherweise ebenfalls daran beteiligt, die Komposition der Hyphenwand der Infektionsstruktur des Pilzes so zu verändern, daß diese nicht von der Wirtspflanze erkannt werden kann. Sollte sich diese Annahme bestätigen lassen, wäre dies ein erster Beweis dafür, daß eine Modifikation der Hyphenwand notwendig ist, um der Erkennung durch den Wirt zu entgehen.

3.5. Frühe Stadien der pathogenen Entwicklung von *U. maydis*

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte mikroskopische Analyse der pathogenen Entwicklung von *U. maydis* konzentrierte sich auf die frühe Infektionsphase, die vor der Bildung erkennbarer Krankheitssymptome an der Maispflanze liegt. Da die untersuchten Mutantenstämme aus dem haploiden solopathogenen Stamm CL13 hervorgegangen sind, wurde ein Großteil der mikroskopischen Untersuchungen an CL13-infizierten Pflanzen durchgeführt. Der Vergleich der pathogenen Entwicklung dieses Stammes mit der einer Kreuzung der beiden Wildtyp-Stämme FB1 und FB2

ergab keinen signifikanten Unterschied im Bezug auf die Morphologie der beobachteten Strukturen (nicht gezeigt).

3.5.1. Die Erkennung der Wirtspflanze

Der haploide solopathogene Stamm CL13 wächst außerhalb der Pflanze überwiegend hefeartig (Bölker et al, 1995). Filamentöses Wachstum auf Aktivkohle-haltigem Medium kann jedoch durch Pheromonstimulierung induziert werden (siehe 1.2.).

An vielen Stellen auf der Blattoberfläche läßt CL13 filamentöses Wachstum erkennen. Daran wird deutlich, daß der Stamm an diesen Stellen auf der Oberfläche der Pflanze ein Signal erkennt, das filamentöses Wachstum in Abwesenheit einer Pheromonstimulierung auslöst. Wie in 2.6.2. beschrieben, führt filamentöses Wachstum auf der Blattoberfläche jedoch nicht zwangsläufig auch zur Appressorienbildung. Diese Entwicklung ließ sich nur in lokal begrenzten Regionen beobachten und dort fanden sich auch stets mehrere Appressorien. Möglicherweise zeichnen sich diese Regionen durch weitere Signale aus, die Appressorienbildung stimulieren. Derartige Signale können physikalischer Natur sein, wie die Topographie der Blattoberfläche, die für *Uromyces appendiculatus* oder *U. viciae-fabae* ausschlaggebend ist (Staples et al, 1985; Read et al, 1992), oder ihre Härte und Hydrophobizität, die bei *M. grisea* Appressorienbildung induzieren (Jelitto et al, 1994; Lee and Dean, 1994; Übersicht in Dean, 1997). Auch chemische Signale wie Ethylen oder Bestandteile der Cuticula der Wirtspflanze können eine Rolle spielen, und regen bei *Colletotrichum gloeosporioides* bzw. *M. grisea* (Flaishman and Kolattukudy, 1994) die Differenzierung von Appressorien an (Podila et al, 1993; Uchiyama and Okuyama, 1990). Da sich *U. maydis*-Appressorien bevorzugt über der Verbindung antiklinaler Zellwände auf jungen, sich im Längenwachstum befindlichen Maisblättern identifizieren lassen (K.Snetselaar, pers. Mitteilung), besteht die Möglichkeit, daß sowohl physikalische (Einfurchung der Blattoberfläche), als auch chemische (pflanzliche Metabolite des jungen Gewebes) Signale an der Auslösung der Appressorienbildung beteiligt sein könnten.

3.6. Klassifizierung der untersuchten Mutanten

Die pathogene Entwicklung von *U. maydis* läßt sich ausgehend vom Dikaryon oder einem solopathogenen Stamm in folgende Phasen untergliedern (Tab.16).

Tabelle 16: Phasen der pathogenen Entwicklung von *U. maydis*, ausgehend vom Dikaryon oder solopathogenen Stamm.

| Phase | Ereignis | Ort | gekennzeichnet durch |
|-------|--|------------------------------------|--|
| 1 | a) Erkennung der Wirtspflanze | Blatt- oberfläche | a) filamentöses Wachstum |
| | b) Erkennung des Penetrationsortes | | b) Differenzierung des Appressoriums |
| 2 | Penetration der Blattoberfläche | Blatt- oberfläche/ Epidermis | intrazelluläre Penetrationshyphen in Epidermiszelle unter dem Appressorium |
| 3 | invasives Wachstum | Epidermis/ Parenchym | intrazelluläre Infektionshyphen |
| 4 | proliferatives Wachstum und Tumorinduktion | Parenchym | interzelluläre Hyphen, massive Zunahme an Pilzmaterial und Proliferation des Pflanzengewebes |

| | | | |
|---|---------------|-------|--|
| 5 | Sporenreifung | Tumor | Pilzhyphen verdicken sich ("sporogene" Hyphen), Sporenwand ornamentiert und melanisiert |
| 6 | Sporulation | Tumor | dunkle Färbung der Sporen erkennbar, Tumor trocknet aus, platzt auf, Freisetzen der Sporen |

Als apathogene Mutanten wurden jene Stämme klassifiziert, die keine Pathogenitätssymptome erkennen lassen, d.h. die Phase der Tumorinduktion wird von diesen Stämmen nicht erreicht. Die Arretierung der pathogenen Entwicklung könnte in jeder der Phasen 1 bis 3 erfolgen.

Unter diesen Mutantenstämmen sollten sich neben Stämmen, die das filamentöse Wachstum auf der Blattoberfläche nicht initiieren können (Tab.16, Phase 1a), auch solche identifizieren lassen, die zwar auf der Blattoberfläche filamentös wachsen, jedoch keine Appressorien bilden (Phase 1b). Durch die Identifizierung der in diesen Mutanten betroffenen Gene könnten unter anderem Hinweise über die Wahrnehmung und Weiterleitung der Pflanzensignale, die während dieser frühen Phase der pathogenen Entwicklung eine Rolle spielen, gewonnen werden. Von den im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Mutanten läßt sich CL13pat4285 der Klasse von Mutanten zuordnen, die in Phase 1a gestört sind. Für die in dieser Mutante betroffene Genfunktion, die regulatorische Untereinheit der Proteinkinase CKII, Ckb1, kann eine Rolle in der Pathogenitäts-Signaltransduktionskaskade postuliert werden.

Keine der untersuchten Mutanten zeigte einen Defekt in der Differenzierung von Appressorien oder der Penetration der Blattoberfläche. Vermutlich müßte eine größere Anzahl an Stämmen analysiert werden, um Mutanten zu identifizieren, die diesen Klassen zuzuordnen wären.

Der Stamm CL13pat4339 läßt sich der Mutantenklasse zuordnen, die im invasiven Wachstum (Phase 3 der pathogenen Entwicklung) gestört ist. Für die in dieser Mutante fehlende Genfunktion, die alpha-Glucosidase Gas1, kann angenommen werden, daß sie daran beteiligt ist, die Erkennung durch die Wirtspflanze zu vermeiden.

Besonders auffällig ist, daß die restlichen drei charakterisierten Mutanten, sowie zwei auxotrophe Stämme am Übergang von der invasiven zur proliferativen Phase arretieren. Diese fünf Stämme sind in völlig verschiedenen Genfunktionen betroffen. In der Mutante CL13pat2563 ist möglicherweise ein spezifischer Pathogenitätsfaktor betroffen (siehe 2.3). Die Stämme CL13pat2997 und CL13pat3050, die ebenfalls am Übergang vom invasiven zum proliferativen Wachstum arretieren, sind in *rpl38*, das für ein ribosomales Protein codiert, bzw. dem unbekanntem Gen *pat3050* betroffen und in ihrem Wachstum beeinträchtigt. Dieselben Mutationen führen im dikaryotischen Hintergrund lediglich zu einer reduzierten Pathogenität. Diese Genfunktionen sind somit für die pathogene Entwicklung von *U. maydis* nicht essentiell, und können als Virulenzfaktoren bezeichnet werden. Schließlich arretieren auch die auxotrophen Stämme CL13pat7635 und CL13pat5133 vor Beginn der proliferativen Phase. Die in diesen Stämmen betroffenen Genfunktionen sind ebenfalls für die pathogene Entwicklung nicht spezifisch, sondern dem generellen Metabolismus von *U. maydis* zuzuordnen.

Nachdem der Verlust diverser Genfunktionen, darunter solche, die die generelle Fitness der Stämme beeinträchtigen, dazu führt, daß der Übergang vom invasiven zum proliferativen Wachstum von diesen Mutantenstämmen nicht mehr vollzogen werden

kann, scheint dies auf eine besonders kritische Phase der pathogenen Entwicklung hinzudeuten. Wodurch ist diese Phase der pathogenen Entwicklung charakterisiert?

Zunächst könnte in dieser Phase der Einfluß der Anzuchtbedingungen eine Rolle spielen. Da die Stämme vor der Infektion in Vollmedium kultiviert werden, besitzen sie Nährstoffreserven, die möglicherweise für die frühe Phase der pathogenen Entwicklung ausreichen, zumal in dieser Phase ein Spitzenwachstum zu beobachten ist, bei dem der Cytoplasmagehalt nicht zunimmt und alte Hyphenteile kollabieren (Snetselaar and Mims, 1992). Nachdem diese Reserven aufgebraucht sind, ist der Pilz auf die Nährstoffe angewiesen, die ihm die Pflanze zur Verfügung stellt. Der Pilz hat jedoch in keiner Phase seiner pathogenen Entwicklung unmittelbaren Kontakt zum Cytoplasma der Wirtspflanze, da er auch während des intrazellulären Wachstums von der pflanzlichen Zellmembran umgeben bleibt. Haustorien oder vergleichbare Strukturen sind bei *U. maydis* während dieser Phase der pathogenen Entwicklung nicht beobachtet worden (Snetselaar and Mims, 1992, 1993, 1994). In der Literatur existiert zwar eine einzige Beschreibung einer "gelappten" Struktur, die sich eventuell als Haustorium interpretieren ließe, diese Strukturen wurden jedoch erst in der späten Phase der pathogenen Entwicklung beobachtet, nach Tumorinduktion, und hätten somit während des invasiven und proliferativen Stadiums keine Bedeutung (Banuett and Herskowitz, 1996). *U. maydis* ist somit während seiner Entwicklung in der Maispflanze mit der Nährstoffsituation des Apoplasten konfrontiert, dessen Zucker- und Aminosäuregehalt einer starken Regulation unterliegt, und generell sehr gering ist (Lohaus et al, 1995; Winter et al, 1992). Beim Übergang von der invasiven zur proliferativen Wachstumsphase beeinflusst *U. maydis* vermutlich lokal den Metabolismus des Wirtsgewebes, um die Zucker- und Aminosäurekonzentration im Apoplasten zu erhöhen. Das infizierte Gewebe verwandelt sich hierbei von einem "Source"- in ein "Sink"-Organ (Billett and Burnett, 1978). Um diese Umstellung zu erreichen, werden wahrscheinlich eine Reihe spezifischer Pathogenitätsfunktionen benötigt, die die Signale für die Wirtspflanze bilden. Darüber hinaus muß der Pilz seinen eigenen Metabolismus an die in der Pflanze verfügbaren Stickstoff- und Kohlenstoffquellen anpassen. In diesem Stadium können Beeinträchtigungen der Fitneß und die Unfähigkeit, bestimmte Aminosäuren selber zu synthetisieren, den Stop der pathogenen Entwicklung bewirken.

4. Zusammenfassung

In dieser Arbeit wird die Auswahl und Charakterisierung von fünf apathogenen *Ustilago maydis* Mutanten beschrieben. Die Mutanten wurden im haploiden solopathogenen Stamm CL13 durch REMI-Mutagenese erzeugt. Für jede der fünf Mutanten ist es gelungen, das durch die Insertion betroffene Gen zu identifizieren. Drei der identifizierten Gene zeigten Ähnlichkeit zu bekannten Sequenzen in der Datenbank: *rpl38* zu Genen, die für ribosomale Proteine codieren, *ckb1* zu Genen, die für die regulatorische beta-Untereinheit der Proteinkinase CKII codieren, und *gas1* zu alpha-Glucosidase-Genen. Die beiden Gene *pat2563* und *pat3050* codieren für bislang noch nicht beschriebene Genprodukte. *ckb1*-Mutanten weisen einen pleiotropen Phänotyp auf, der neben dem Verlust der Pathogenität auch Störungen der Zellmorphologie und der Pheromonstimulierbarkeit beinhaltet.

Die Deletion von *rpl38* und *pat3050* in den haploiden Wildtyp-Stämmen FB1 und FB2 führte zu dem Ergebnis, daß diese Mutationen, die im Stamm CL13 zum Verlust der Pathogenität führen, im Dikaryon des Wildtyps lediglich eine reduzierte Pathogenität bewirken. Im Gegensatz dazu führt die Deletion von *gas1* auch im Wildtyp-Dikaryon zum völligen Verlust der pathogenen Entwicklung.

Die vergleichende mikroskopische Analyse des Infektionsverlaufs der Mutanten erlaubte eine Klassifizierung anhand des jeweiligen Infektionsstadiums, in dem sich der Pathogenitätsdefekt zeigt. Die *ckb1*-Mutante im CL13-Hintergrund ist nicht in der Lage, Appressorien auszubilden, und die Maispflanze zu penetrieren. Die pathogene Entwicklung der in *rpl38*, bzw. *pat3050* betroffenen CL13-Stämme, sowie einer Arginin- und einer Methionin-Auxotrophiemutante arretiert im Gegensatz dazu erst in einem fortgeschrittenen Stadium der Invasion des Pflanzengewebes. Für den Infektionsverlauf der *gas1*-Nullstämme ließ sich ein früher Stop der pathogenen Entwicklung, bereits unmittelbar nach erfolgter Penetration des Blattes, definieren. Die Arretierung des Pathogenitätsverlaufs dieser Mutante ist begleitet von Anzeichen induzierter Pflanzenabwehr.

Hinsichtlich der Bearbeitung weiterer apathogener Mutanten wäre aufgrund der in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse eine Strategie empfehlenswert, die nach der Reisolierung des Plasmids und der Sequenzanalyse des Integrationsortes zunächst die Untersuchung des Pathogenitätsphänotyps im Wildtyp-Dikaryon vorsieht, gefolgt von der mikroskopischen Untersuchung der Entwicklung der Mutantenstämme auf der Pflanze. Aus der umfassenden Klassifizierung der Mutanten anhand des Entwicklungsstadiums, in dem der Pathogenitätsdefekt auftritt, könnten sich Hinweise auf das Zusammenspiel neu identifizierter Genfunktionen in der pathogenen Entwicklung von *Ustilago maydis* ergeben.

5. Material und Methoden

5.1. Chemikalien und Enzyme

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien wurden bei folgenden Firmen bezogen: Amersham, Baker, BioRad, Boehringer, BRL, Difco, Mallinrodt (Phenol), Merck, Pharmacia, Riedel-de Haën, Roth, SeaKem (Agarose), Serva und Sigma. Enzyme und bioaktive Substanzen stammten von Boehringer, New England Biolabs und Pharmacia.

5.2. Stämme und Kultivationsbedingungen

Zur Kultivierung von *E. coli* wurden die gebräuchlichen Medien wie LB, YT und dYT verwendet (Miller, 1972). Medienzusätze wurden in folgenden Konzentrationen eingesetzt: Ampicillin (100µg/ml), Chloramphenicol (25µg/ml), Kanamycin (40µg/ml), Tetracyclin (25µg/ml) und X-Gal (40µg/ml).

U. maydis Stämme wurden bei 28°C inkubiert. Als Nährmedien dienten YEPS (Tsukuda et al, 1988), Potato Dextrose Medium (PDA und PDB, Difco), Vollmedium (CM) und Minimalmedium (MM) mit 1% Glucose (Holliday, 1974). Zur Selektion wurden Hygromycin (100-200µg/ml) oder Carboxin (2µg/ml) verwendet. Die Zelldichte von Flüssigkulturen wurde photometrisch mittels LKB-Novaspec Photometer bei 600nm gemessen. 1 OD₆₀₀ entspricht einer Zelldichte von ca. 5x10⁷ (*U. maydis*), bzw. 1x10⁹ (*E. coli*) Zellen/ml. Exakte Zellzahlbestimmungen wurden in einer Neubauer-Zählkammer durchgeführt.

Tabelle 17: *E. coli* Stämme

| Stamm | genetische Marker | Referenz |
|----------|---|-----------|
| DH5α | F ⁻ , φ80dlacZΔM15, Δ(lacZYA-argF), U169, recA1, hsdR17(rK ⁻ , mK ⁺), supE44, λ ⁻ , thi-1, gyrA, relA1 | GIBCO BRL |
| SOLR | e14-(mcrA), Δ(mcrCB-hsdSMR-mrr), 171, sbcC, Stratagene | |
| XL1-Blue | recB, umuC::Tn5, uvrC, lac, gyrA96, relA1, recJ, thi-1, supE44 Stratagene lac, [F', proAB, lacI ^q ZΔM15, TN10] | |

Tabelle 18: *U. maydis* Stämme

| Stamm | Genotyp | Referenz |
|--------------|------------------------|-------------------------------|
| FB1 | a1b1 | Banuett and Herskowitz, 1989 |
| FB2 | a2b2 | Banuett and Herskowitz, 1989 |
| CL13 | a1bE1bW2 | Bölker et al, 1995a |
| CL13pat2563 | a1bE1bW2pat2563::pSMUT | Mutantensammlung ¹ |
| CL13pat2997 | a1bE1bW2rpl38::pSMUT | Mutantensammlung ¹ |
| CL13pat3050 | a1bE1bW2pat3050::pSMUT | Mutantensammlung ¹ |
| CL13pat4285 | a1bE1bW2ckb1::pSMUT | Mutantensammlung ¹ |
| CL13pat4339 | a1bE1bW2gas1::pSMUT | Mutantensammlung ¹ |
| CL13pat5133 | a1bE1bW2 ² | Mutantensammlung ¹ |
| CL13pat7635 | a1bE1bW2met1::pSMUT | Mutantensammlung ¹ |
| FB1Δrpl38 | a1b1Δrpl38 | diese Arbeit |
| FB2Δrpl38 | a2b2Δrpl38 | diese Arbeit |
| CL13Δrpl38 | a1bE1bW2Δrpl38 | diese Arbeit |
| FB1Δpat3050 | a1b1Δpat3050 | diese Arbeit |
| FB2Δpat3050 | a2b2Δpat3050 | diese Arbeit |
| FB1ckb1::hyg | a1b1ckb1::hyg | diese Arbeit |

| | | |
|------------------|-------------------------------|-------------------------|
| FB2ckb1::hyg | <i>a2b2ckb1::hyg</i> | diese Arbeit |
| CL13ckb1::hyg | <i>a1bE1bW2ckb1::hph</i> | diese Arbeit |
| FB1Δgas1::eGFP#5 | <i>a1b1Δgas1::eGFP-hph</i> | diese Arbeit |
| FB2Δgas1::eGFP#5 | <i>a2b2Δgas1::eGFP-hph</i> | diese Arbeit |
| CL13Δgas1 | <i>a1bE1bW2Δgas1::ble</i> | diese Arbeit |
| FB1gas1M | <i>a1b1Δgas1::gas1M</i> | diese Arbeit |
| FB2gas1M | <i>a2b2Δgas1::gas1M</i> | diese Arbeit |
| FB1otef-gas1M#7 | <i>a1b1 / potef-gas1M</i> | diese Arbeit |
| FB2otef-gas1M#6 | <i>a2b2 / potef-gas1M</i> | diese Arbeit |
| CL13otef-gas1M#1 | <i>a1bE1bW2 / potef-gas1M</i> | diese Arbeit |
| RK2174 | <i>a2b2 / pSS2EGm</i> | Schauwecker et al, 1995 |

¹ K.H. Braun, J. Görl, R. Kahmann, nicht publiziert

² Insertionsort nicht charakterisiert

5.3. Genomische und cDNA Banken

5.3.1. Cosmidbank des Stammes FBD11 (Schauwecker et al, 1995)

DNA des *U. maydis* Stammes FBD11 wurde mit dem Restriktionsenzym MboI partiell verdaut und in die BamHI Schnittstelle des Vektors pUMcos (ein Derivat von pScos1 (Stratagene), in dem das BglII-HindIII Fragment (Neomycin-Resistenz) durch ein EcoRV-SmaI Fragment aus pCBX122 ausgetauscht wurde (Carboxin-Resistenz)) ligiert. Nach Transformation in *E. coli* wurden DNA dot blot Filter angelegt, die die gesamtDNA aus 29 Poolfiltern enthielten. Jeder der 29 Poolfilter besteht aus 96 vereinzelt Cosmidklonen. Weitere nicht vereinzelt Cosmidklone wurden zu 8 Pools zusammengefaßt.

5.3.2. λZAPII-Bank des Stammes FB1 (Hartmann, 1997)

Die RNA wurde aus *U. maydis* Stamm FB1 isoliert, der in YEPS Flüssigmedium zu einer OD₆₀₀ von 0,8 herangezogen worden war. Für die cDNA-Synthese unter Verwendung des λZAPII cDNA Synthese Kits (Stratagene) wurde zunächst die polyA⁺ RNA angereichert. Die reverse Transkription erfolgte mit einem oligo dT-Primer, der die Erkennungssequenz des Restriktionsenzym XhoI enthält. Die cDNA Syntheseprodukte wurden mit EcoRI-Linkern versehen und Größenfraktioniert. cDNAs der Größen von 0,8-2,8kb wurden als EcoRI-XhoI-Fragmente in die λ Arme des Vektors Uni-ZAPII XR kloniert und mittels des Stratagene Gigapack Gold II System in λ Phagen verpackt.

5.4. Plasmide und Plasmidkonstruktionen

5.4.1. Allgemeine Vektoren

pBlueskript II SK+ (pBS; Stratagene), **pSP72** (Promega), **pSL1180** (Pharmacia) und **pUC19** (NEB) dienen zur Klonierung und Sequenzierung.

pBSKIIIHM: Ein pBlueskript II SK Derivat, das die sechsfache Wiederholung der Sequenz trägt, die für das cmc-epitop codiert (Laborsammlung).

pCM54: Das pUC12 Derivat pHL1 (Wang et al., 1988) besteht aus einem 3,3kb HindIII Insert, welches die Aminoglycosid Phosphotransferase (*hph*) aus *Streptomyces hygroscopicus* (Gritz and Davis, 1983) mittels einer transkriptionellen Fusion mit dem *U. maydis hsp70* Promotor exprimiert. In die SspI Stelle des pUC12 Rückgrats wurde ein 383bp SspI Fragment inseriert, das eine autonom replizierende Sequenz aus *U. maydis* trägt.

pCX2: Ein pSP72-Derivat, das die Hygromycin-Resistenzkassette aus pCBX122 (Keon et al, 1991) trägt (A.Bottin, nicht publiziert).

pEGFP-N1: (Clontech) Trägt eine Variante des Widtyp *GFP*-Gens, die für stärkere Expression und Fluoreszenz in Säugerzellen optimiert wurde.

pNEBHyg+: Ein pSL1180 Derivat, das die Hygromycin-Resistenzkassette trägt (A.Brachmann, nicht publiziert).

pSGFPB1: (auch: blue-SGFP-TYG-nos KS) Ein BlueskriptKS Derivat. *sGFP* (700bp) ist durch die Restriktionsschnittstellen NotI und PstI vom Nos-Terminator (300bp) getrennt.

pSMUT: Dieses Plasmid wurde für die REMI-Mutagenese verwendet. Ein pSP72 Derivat, das die Hygromycin-Resistenzkassette aus pCM54 unter der Kontrolle eines 600bp RsaI-Fragmentes trägt, das

aus *S.cerevisiae* genomischer DNA aufgrund seiner Promotoraktivität in *U. maydis* isoliert wurde (Bölker et al, 1995b).

pTZhygR: Ein pTZ18R (Pharmacia) -Derivat, welches eine mit BamHI-Adaptoren versehene Hygromycinkassette trägt (Schauwecker et al, 1995).

p123: (auch: pOTEF-eGFP-cbx) ist ein pSP72-Derivat welches das *eGFP*-Gen (incl. Nos-Terminator) unter der Kontrolle des *otef*-Promotors trägt. In das Plasmid pSP72 wurde die Carboxin-Resistenzkassette inseriert (Spellig et al, 1996).

5.4.2. Aus den REMI-Mutantenstämmen re-isolierte Plasmide

Die Plasmide p2563, p2997, p3050, p3141, p3817, p3977, p4220, p4255, p4285, p4339, p4366 und p6077 sind von K.H. Braun und J. Görl isoliert worden. Hierfür wurden 3µg genomischer DNA des jeweiligen Mutantenstammes (z.B. CL13pat2997 im Falle von p2997) mit MluI geschnitten (Ausnahme: p4366 wurde mit KpnI isoliert), religiert (in einem Volumen von 100µl, um die Zirkularisierung einzelner Fragmente zu favorisieren) und mittels Elektrottransformation in *E. coli* transformiert.

5.4.3. Genomische Subklone

pPat1#8: Das 10kb große MluI-Fragment des Cosmids 27A8, das mit dem in p2997 klonierten genomischen Bereich hybridisiert, wurde in die MluI-Schnittstelle von pSL1180 kloniert.

pPat1-EV: Das 2,5kb große EcoRV-Fragment, das den genomischen Insertionsort der Mutante CL13pat2997 beinhaltet, wurde aus pPat1#8 isoliert und in die EcoRV-Schnittstelle von pBS kloniert.

pPat2563-EV: Das 5,5kb große EcoRV-Fragment des Cosmids 14F1, das mit dem in p2563 klonierten genomischen Bereich hybridisiert, wurde in die EcoRV-Schnittstelle von pBS kloniert.

pPat3050-X: Das 4,7kb große XhoI-Fragment des Cosmids 23D5, das mit dem in p3050 klonierten genomischen Bereich hybridisiert, wurde in die XhoI-Schnittstelle von pBS kloniert.

pPat3050-E: Das 1,4kb große EcoRI-Fragment, das den genomischen Insertionsort der Mutante CL13pat3050 beinhaltet, wurde aus pPat3050-X isoliert und in die EcoRI-Schnittstelle von pBS kloniert.

pgasM11: Das 11kb große MluI-Fragment des Cosmids 15B6, das mit dem in p4339 klonierten genomischen Bereich hybridisiert, wurde isoliert, die überhängenden Enden wurden durch Klenow Enzym aufgefüllt, und das resultierende Fragment wurde in die ebenfalls Klenow-behandelte BamHI-Schnittstelle des Vektors pUC19 kloniert.

pckbM8: Das 8,3kb große MluI-Fragment des Cosmids 25A6, das mit der Sonde 4285-2 hybridisiert, wurde isoliert, die überhängenden Enden wurden durch Klenow Enzym aufgefüllt, und das resultierende Fragment wurde in die EcoRV-Schnittstelle des Vektors pBS kloniert.

5.4.4. cDNA-Klone

Alle cDNAs wurden aus der λ ZAPII cDNA-Bank des Stammes FB1 isoliert (5.3.2). Nach "*in vivo-excision*" liegt der jeweils isolierte cDNA-Klon als pBlueskript-Derivat vor (5.10).

prpl38c-8: Der vollständige cDNA-Klon des Gens *rpl38*. Das klonierte Insert beträgt 1323 bp.

ppat3050c-3: Der vollständige cDNA-Klon des Gens *pat3050*. Das klonierte Insert beträgt 1082 bp.

pckb1c-1.2: Der vollständige cDNA-Klon des Gens *ckb1*. Das klonierte Insert beträgt 1582 bp.

p4339c8-2: Unvollständiger cDNA-Klon des Gens *gas1*. Das klonierte 1941bp Fragment beinhaltet das 5'-Ende des Gens. **p4339c14:** Unvollständiger cDNA-Klon des Gens *gas1*. Das klonierte 2585bp Fragment beinhaltet das 3'-Ende des Gens. Die beiden partiellen cDNA-Klone überlappen in einem Bereich von 1074bp.

5.4.5. Komplementationskonstrukte

pCompEV: Das 5,5kb große EcoRV-Fragment des Cosmids 14F1, das mit dem in p2563 klonierten genomischen Bereich hybridisiert, wurde in die EcoRV-Schnittstelle von pCX2 kloniert.

pCompB: Das 2,1kb große EcoRI-BamHI-Fragment aus pPat2563-EV, das die "SP6-Flanke" des in p2563 klonierten genomischen Bereichs enthält, wurde in die entsprechenden Schnittstellen von pCX2 kloniert.

pCompC: Das 2kb große ClaI-HindIII-Fragment aus pPat2563-EV, das den REMI-Insertionsort der Mutante CL13pat2563 enthält, wurde in die entsprechenden Schnittstellen von pCX2 kloniert.

pCompD: Das 2kb große EcoRI-BamHI-Fragment aus pPat2563-EV, das einen Teil der "hyg3'-Flanke" des in p2563 klonierten genomischen Bereichs enthält, wurde in die entsprechenden Schnittstellen von pCX2 kloniert.

pComp878: pCompD wurde mit HindIII geschnitten und religiert; dadurch wurde der 878bp große Bereich, in dem pCompC und pCompD überlappen, kloniert.

pComp 442B: pComp878 wurde mit BsaI und HindIII geschnitten, die überhängenden Enden wurden durch Klenow-Enzym aufgefüllt, und das Produkt wurde religiert. Dadurch wurde das 442bp EcoRI-BsaI-Fragment, das den mit pat2563 bezeichneten Leserahmen enthält, kloniert.

pComp800R: pComp878 wurde mit EcoRV und EheI geschnitten und religiert; dadurch wurde das 800bp EheI-HindIII-Fragment, das den mit pat2563 bezeichneten Leserahmen enthält, kloniert.

5.4.6. Deletions- und Disruptionskonstrukte

pΔrpl38: pPat1-EV wurde mit XhoI geschnitten, die überhängenden Enden wurden aufgefüllt, und das Produkt wurde mit BamHI-nachgeschnitten. Das resultierende 630bp-Fragment, das einen Teil der Intronsequenz des *rpl38*-Gens enthält und als 5'-Flanke für die homologe Integration des Deletionskonstruktes dienen sollte, wurde in die EcoRV- und BglII-Schnittstellen von pSMUT kloniert. Das resultierende Konstrukt wurde mit **pEB7** bezeichnet. Als 3'-Flanke für die homologe Integration des Deletionskonstruktes wurde aus pPat1-EV das 400bp BsaI-SalI-Fragment isoliert, wobei die BsaI-Enden aufgefüllt wurden. Dieses Fragment wurde in pEB7 kloniert, der zuvor mit BamHI geschnitten, die Überhänge aufgefüllt, und danach mit SalI nachgeschnitten wurde. Im resultierenden Konstrukt, pΔrpl38 (Größe: 5,1kb), ist somit das 220bp BsaI-XhoI-Fragment des *rpl38*-Leserahmens, das für AA12 bis AA68 des 82AA-Proteins codiert, durch die Hygromycinkassette ersetzt.

pΔpat3050: Als 5'-Flanke für die homologe Integration des Deletionskonstruktes wurde aus pPat3050-X das 690bp EcoRI-Fragment isoliert, das die ersten 208bp des *pat3050*-Gens, sowie 482bp des Promotorbereichs bis zur genomischen XhoI-Schnittstelle enthält. Dieses Fragment wurde in die EcoRI-Schnittstelle von pSP72 kloniert, das resultierende Konstrukt wurde mit **pΔ3i1** bezeichnet. Das 3kb PstI-Fragment aus pPat3050-X, welches den 3'-flankierenden Bereich des *pat3050*-Gens beinhaltet, wurde in die PstI-Schnittstelle von pΔ3i1 kloniert. Das Konstrukt mit der korrekten Orientierung wurde mit **pΔ3i2** bezeichnet. In das BamHI-SacI-geschnittene Plasmid pΔ3i2 wurde schließlich die Hygromycinkassette aus pSMUT als BamHI-SacI-Fragment eingebracht, um pΔpat3050 (Größe: 8,1kb) zu erhalten. In diesem Konstrukt ist somit das 600bp EcoRI-PstI-Fragment des *pat3050*-Gens, das für AA29 bis AA151 des 152AA-Proteins codiert, durch die Hygromycinkassette ersetzt.

pckb1::hyg: Aus p4285 wurde das 1kb BamHI-Fragment, das auf der "hyg3'-Flanke" gelegen ist und einen Teil des *ckb1*-Leserahmens enthält, isoliert und in die entsprechende Schnittstelle von pBS kloniert, bei dem zuvor die KpnI-Schnittstelle der MCS durch Auffüllen zerstört worden war. Das resultierende Plasmid, pBSckb1, wurde mit KpnI linearisiert und die überhängenden Enden mit Klenow Enzym aufgefüllt. Durch Einbringen der Hygromycin-Resistenzkassette aus pCM54 als 3kb PvuII-Fragment entstand das Konstrukt pckb1::hyg (Größe: 7kb), bei dem die Resistenzkassette an der Stelle des *ckb1*-Leserahmens inseriert ist, die für A.s. 157 codiert.

pΔgas1::eGFP: Der genomische Bereich, der das *gas1*-Gen enthält wurde zunächst subkloniert: aus pgasM11 wurden das 3,8kb NcoI-Fragment, und das 3kb NcoI-PstI-Fragment isoliert, und die überhängenden Enden der NcoI-Schnittstellen durch Inkubation mit dem Kornberg-Fragment der DNA Polymerase I abgedaut. Die beiden Produkte wurden gleichzeitig in pUC19 ligiert, der zuvor BamHI-geschnitten, aufgefüllt, und danach PstI-geschnitten worden war. Unter den resultierenden Plasmiden wurde jenes, welches das NcoI-Fragment in der korrekten Orientierung enthielt, mit **pKOP7** bezeichnet. pKOP7 diente als Template für eine PCR-Reaktion, bei der mittels der Primer gas5'NcoI und gas3'N-B (siehe 5.4.8.) eine NcoI-Schnittstelle am Startcodon des *gas1*-Gens, und eine NcoI-, sowie eine BamHI-Schnittstelle an den Positionen bp3110, bzw. 3120 des Gens eingeführt wurden. In der PCR-Reaktion (Reaktionsansatz und Zyklus: siehe unten) wurden der 2kb Promotorbereich von *gas1*, die letzten 60bp des Gens und 1kb der 3' UTR zusammen mit dem pUC19 Rückgrat des pKOP7-Konstruktes amplifiziert. Das PCR-Produkt wurde mit NcoI geschnitten und religiert um das Plasmid **pΔgas-w/o** (Größe: 6kb) zu erhalten. Um die sGFP-Kassette zwischen den *gas1*-Promotor und den 3'-Bereich des Gens zu klonieren, wurde pΔgas-w/o mit NcoI und BamHI geschnitten und mit dem 1kb NcoI-BamHI Fragment aus dem Plasmid psGFPB1 ligiert (*sGFP*-Gen plus *Nos*-Terminator). Das resultierende Konstrukt wurde mit **pΔgas-sGFP** bezeichnet. In dieses Plasmid wurde nun an der BamHI-Schnittstelle die Hygromycin-Resistenzkassette aus pTZhyg^R als BamHI-Fragment eingebracht, um **pΔgas::sGFP** zu erhalten. Nachdem die verbesserte eGFP-Version des Reportergens zur Verfügung stand, wurde in pΔgas::sGFP das 720bp NcoI-NotI sGFP-Fragment durch das gleichgroße NcoI-NotI eGFP-Fragment aus pEGFP-N1 ersetzt. Das resultierende Konstrukt wurde **pΔgas::eGFP** bezeichnet (Größe: 10kb).

pΔgas1: pΔgas-w/o wurde mit BamHI und NcoI geschnitten und mit dem BamHI-BspHI Fragment aus pNEBBle+, das die Phleomycin-Resistenzkassette trägt, ligiert.

5.4.7. Konstrukte zur Markierung von Gas1 mit dem Hexa-Myc Epitop

pgas1M: Zunächst wurde aus pgasM11 das 2,2kb SacI-NotI-Fragment isoliert, welches die 5'-Hälfte von *gas1* enthält, und in die entsprechenden Schnittstellen von pBS kloniert um **pgas5'** zu erhalten. Die PstI-Schnittstelle, die sich auf dem klonierten Fragment 100bp neben der SacI-Schnittstelle befindet, wurde durch Auffüllen zerstört. Das resultierende Plasmid wurde mit **pgas5'ΔPstI** bezeichnet. Die 3'-Hälfte von *gas1* wurde aus dem partiellen cDNA-Klon p4339c14 amplifiziert, mittels der beiden Primer gas3' N-B (bindet an der NotI-Schnittstelle des Gens) und gas3' AgeI (führt vor dem Stopcodon des Gens eine AgeI-Schnittstelle ein). Das resultierende PCR-Produkt (Größe: 700bp) (Reaktionsansatz und Zyklus: siehe unten) wurde mit NotI und AgeI verdaut und in die XmaI- und NotI-Schnittstellen von pBSKIIHM ligiert um **p3'gasmyc** zu erhalten. Der 3'-flankierende Bereich von *gas1* wurde als 1kb BglII-PstI Fragment aus pgasM11 isoliert, und die Resistenzkassette als 2,9kb KpnI-BamHI Fragment aus pNEBHyg+. Diese beiden Fragmente wurden zusammen mit dem 930bp KpnI-NotI Fragment aus p3'gasmyc in den NotI-PstI geschnittenen pgas5'ΔPstI Vektor ligiert um pgas1M (9,9kb) zu erhalten.

potef-gas1M: Das 5'-Ende von *gas1* wurde aus p4339c8-2 amplifiziert mittels der Primer gas5'NcoI (führt eine NcoI-Schnittstelle am Startcodon ein) und gasNco (bindet an bp1370 des *gas1*-Leserahmens, auf Höhe der NcoI-Schnittstelle)(Reaktionsansatz und Zyklus: siehe unten). Das 1,4kb große PCR-Produkt wurde NcoI-AatII geschnitten und zusammen mit dem 900bp HindIII-NotI Fragment aus p123, das den ofef-Promotor enthält, in **pSL1180ΔAatII** ligiert, ein pSL1180, bei dem durch EcoRI-Verdau, Auffüllen, EcoRV-Verdau und Religation die AatII-Schnittstelle in der MCS eliminiert worden war. Das resultierende Konstrukt wurde **pST3** (5,2kb) bezeichnet. Das 3'-Ende von *gas1* wurde aus p4339c14 mittels der Primer gas3'MluI (führt MluI-Schnittstelle hinter dem Stopcodon ein) und gasNot (bindet an bp2525) amplifiziert und NotI-MluI nachgeschnitten. Dieses Fragment wurde zusammen mit dem 1,2kb AatII-NotI Fragment aus pgas1c14, das dem mittleren Teil von *gas1* entspricht, in pSL1180ΔAatII ligiert um **pM3LG** (4,9kb) zu erhalten. Das 2,2kb HindIII-AatII Fragment aus pST3 und das 1,8kb AatII-StuI Fragment aus pM3LG wurden zusammen in die HindIII- und PvuII-Schnittstellen von pSMUT ligiert. Das resultierende Konstrukt, **pUX23** (8kb), beinhaltet somit das vollständige *gas1*-Gen in transkriptioneller Fusion mit dem ofef-Promotor. pUX23 wurde mit SspI geschnitten und das größere 6,7kb Fragment mit dem 2,3kb SspI-Fragment aus pgas3'myc fusioniert um **potef-gas1M** (9kb) zu erhalten.

5.4.8. Oligonukleotide

Die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide wurden von MWG Biotech GmbH oder TOP LAB mbH synthetisiert.

Tabelle 19: Verwendete Oligonukleotide.

| Name | Sequenz (5'→3') | Verwendung |
|-------------|---|------------------------------|
| M13-Reverse | AAC AGC TAT GAC CAT G | Sequenzierung |
| SP6 | ATT TAG GTG ACA CTA TAG | Sequenzierung |
| T7 | TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG | Sequenzierung |
| Universal | GTA AAA CGA CGG CCA GT | Sequenzierung |
| Hyg3' | TGT AGA AGT ACT CGC CG | Sequenzierung |
| PSMUTyp | TCG AAG TGG GCG AGC TCG | Sequenzierung |
| Pat2:1 | GGA CGT CGA TCT TGG G | Sequenzierung <i>pat2563</i> |
| Pat2:2 | CCC CTA CGC GTC CCT ATC CCT ATC CCT GTC TG | Sequenzierung <i>pat2563</i> |
| Ckb:1 | GTC GTC AAT GGT ACC GTG | Sequenzierung <i>ckb1</i> |
| cCkb:5' | CGA TTC CCG ACT CGG TCG | Sequenzierung <i>ckb1</i> |
| cCkb:3' | CGG GAA GCG CCC ACC G | Sequenzierung <i>ckb1</i> |
| ckb-ins1 | GGC ACT TGA TCC TGC TGG TCG TTC | Sequenzierung <i>ckb1</i> |
| ckb-ins5 | CCT TCC CGC ACA TGC TCT TCA TGG | Sequenzierung <i>ckb1</i> |
| ckb-down | GAA CGA CCA GCA GGA TCA AGT GCC | Sequenzierung <i>ckb1</i> |
| ckb-up | CCA TGA AGA GCA TGT GCG GGA AGG | Sequenzierung <i>ckb1</i> |
| casCD1.5 | CAT CAC CGA CTC GCT GGG AAG GCG | Sequenzierung <i>ckb1</i> |
| casCD.3 | GCG GGT GCA CGC ATT GGA TCC GGG | Sequenzierung <i>ckb1</i> |
| gas:3 | GCG GGT GTC AGA AGG TGC TGA AGC | Sequenzierung <i>gas1</i> |
| gas:5 | AGC CCG CGT GCG GTT TGA TTG TGG | Sequenzierung <i>gas1</i> |

| | | |
|-----------|---|---|
| gas:6 | CAC ATA GGA AGC ATC TGG TAC CGC | Sequenzierung <i>gasI</i> |
| gas:7 | GTT GGG CCA CTG ACG CGA TTG TTG | Sequenzierung <i>gasI</i> |
| gas-4 | CCG CAT CGA GCC CAA CAG GAG CCC | Sequenzierung <i>gasI</i> |
| gas3'N-B | AGT TGC CAT GGC TTG GGA TCC TGA TCA TCA AAG ATC CAG CTG TTG CCA TTA | Klonierung p Δ gas1::eGFP(5.4.6.) |
| gas5'NcoI | CAT GCC ATG GTG ACG TAT ATG CTG AGA TCT ACA CTG | Klonierung p Δ gas1::eGFP |
| gas3'AgeI | CAG AAC TCG AAC TCG AAG TCG ATG GTC CAG TCC G | Klonierung pgas1M |
| gas3'MluI | CTG AAG GTG ACG CGT GAA TAA ATG TAT CAG AAC TCG | Klonierung potef-gas1M |
| gasNco | CCA CAT GAC ATC CAT GGG | Klonierung potef-gas1M |
| gasNot | CCA AGG CTC TGA ACG CGG | Klonierung potef-gas1M und pgas1M |

5.5. Mikrobiologische und genetische Methoden

5.5.1. Infektion von Maispflanzen mit *U. maydis*

Maispflanzen wurden im Gewächshaus unter weitgehend definierten Bedingungen angezogen (Tageslicht /14h 20 000 lux, 27°C; 10h Dunkelperiode, 16°C). Die Zeit von der Aussaat bis zur Inokulation beträgt bei Varietät Gaspar Flint 17 Tage, bei Early Golden Bantam etwa 7 Tage.

Die *U. maydis* Stämme werden über Nacht in YEPS- oder PD-Flüssigmedium bis zur stationären Phase herangezogen, die Zellen pelletiert (RT, 3000Upm Heraeus Varifuge 3.0R), in sterilem H₂O resuspendiert und zur gewünschten Zelldichte verdünnt. Soweit zutreffend werden kompatible haploide Stämme miteinander vermischt. Das Inokulum wird bis zur Infektion auf Eis gehalten.

Tropfinfektion der Varietät Gaspar Flint: Die Zelldichte wird auf eine OD₆₀₀ von 1,0 eingestellt. Pro Pflanze werden 0,5ml der Zellsuspension in den Blattwirtel getropft.

Infektion der Varietät Early Golden Bantam: Pathogenitätstest: Die Zelldichte wird auf 10⁷-10⁸ Sporidien/ml eingestellt und mittels einer Diabetikerspritze direkt in den Bereich des ersten Blattknotens injiziert. Für die spätere mikroskopische Analyse des Infektionsverlaufs wird das Inokulum mit einer Zelldichte von etwa 10⁶ Sporidien/ml verwendet. Dadurch wird vermieden, daß sich auf der Blattoberfläche eine zu große Menge von Pilzmaterial befindet, die das Auffinden spezifischer Strukturen erschweren kann.

5.5.2. Mikroskopische Analyse infizierter Pflanzen

Unter den in dieser Arbeit verwendeten Infektionsbedingungen ließen sich in der Regel auf dem dritten Blatt der jungen Maispflanze (Keimblatt nicht mitgerechnet) am zuverlässigsten Infektionsstrukturen beobachten (K.Snetselaar, pers. Mitteilung). Daher wurde für die Untersuchung früher Infektionsstadien etwa 24h nach Inokulation das dritte Blatt aus dem Inneren des Wirtels isoliert, in Stücke von etwa 7-10mm Länge zerschnitten und das zentrale Leitgefäß wurde entfernt. Die Blattstücke wurden 1min. in Calcofluor-Lösung (0,1mg/ml Calcofluor in 0,2M TrisCl pH 8,0) geschwenkt, kurz in H₂O gespült und mit einem Tropfen 50%igem Glycerin auf den Objektträger gebracht. Calcofluor färbt Zellulose an. Aufgrund der intakten Cutikula der Blattoberfläche wurden die pflanzlichen Zellwände nicht angefärbt. Die Zellwände der auf der Blattoberfläche befindlichen Sporidien, Pilzhyphen und Apressorien hingegen wurden angefärbt und konnten unter UV-Beleuchtung (254nm) als hellblau leuchtende Strukturen sichtbar gemacht werden. Penetrationshyphen ließen sich in den oberen Zellschichten der Epidermis mittels DIC (Differential Interference Contrast)-Optik erkennen. Sämtliche Beobachtungen wurden mit dem Zeiss Axiophot Mikroskop durchgeführt. Für die Betrachtung Calcofluor-gefärbter Präparate und der eGFP-Fluoreszenz wurde der Zeiss Fluorescein Isothiocyanat Filtersatz verwendet (für Calcofluor: BP365, FT395, LP397; für eGFP: BP450-490, FT510, LP520).

5.5.3. Konfrontationstest von *U. maydis* (Snetselaar et al, 1996)

CM-Übernachtskulturen der zu testenden Stämme wurden geerntet (10min, 3000Upm), und in Wasser resuspendiert (etwa 1×10^5 Zellen/ml). Jeweils 0,5µl jedes Stammes wurden auf einem mit 2% Wasseragar beschichteten Objektträger eng nebeneinander aufgebracht (etwa 0,2mm Abstand). Nach dem Eintrocknen der Zellsuspensionen wurde die Konfrontationslinie der beiden nebeneinanderliegenden Tropfen mit 1,5µl Paraffinöl überschichtet. Nach 4-8h Inkubation bei RT (in einer feuchten Kammer) kann zwischen kompatiblen Stämmen die Ausbildung von Konjugationsschläuchen beobachtet werden.

5.5.4. Transformation von *E. coli* und *U. maydis*

Die Transformation von *E. coli* erfolgte in der Regel mit Hilfe der CaCl_2 Methode von Cohen et al, 1972. Die Transformation von *U. maydis* wurde wie in Schulz et al (1990) beschrieben durchgeführt. 50ml einer exponentiellen Kultur ($\text{OD}_{600}=0,8-1,0$) wurden geerntet (10min, 3000Upm), mit 25ml SCS gewaschen und in 2ml SCS, 12,5mg/ml Novozym 234 (Novo Nordis) resuspendiert. Die Protoplastierung erfolgte für 10-20min bei RT und wurde mikroskopisch verfolgt. Nach vollständiger Protoplastierung wurden 10ml SCS zugegeben und die Protoplasten pelletiert (10min, 2000Upm). Dieser Waschgang wurde zwei mal wiederholt, anschließend wurde das Pellet in 0,5ml STC aufgenommen. Die Protoplasten wurden sofort für die Transformation verwendet oder aliquotiert und bei -80°C gelagert. Zur Transformation wurden 50µl der Protoplastensuspension mit ca. 5µg DNA und 1µl Heparin (15mg/ml) versetzt und für 10min auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 0,5ml STC/PEG und einer weiteren Inkubation von 15min auf Eis wurde der gesamte Ansatz auf Regenerationsmedium ausgebracht und 3-5 Tage bei 28°C inkubiert.

SCS: 20mM Na-citrat, 1M Sorbitol

STC: 10mM Tris-Cl (pH 7,5), 100mM CaCl_2 , 1M Sorbitol

STC/PEG: STC, 40% (w/v) PEG3500

Regenerationsmedium: YEPS, 1,5% Agar, 1M Sorbitol

5.6. Molekularbiologische Standardtechniken

Standardtechniken wie die elektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten oder die Reinigung und Präzipitation von Nukleinsäuren wurden wie in Sambrook et al (1989) beschrieben durchgeführt (Elektrophoresepuffer: TAE (1x) oder TBE (0,5x)). Bei der Verwendung von Restriktions- und DNA-modifizierenden Enzymen wurden die Protokolle der Hersteller befolgt. Standard-PCR-Ansätze enthielten ca. 10ng Template, je 50pmol Primer und 2U Taq-Polymerase in PCR-Puffer (10mM Tris-Cl pH 8,3, 1,5mM MgCl_2 , 50mM KCl, 0,1mM dNTPs). Die Amplifikation erfolgte in der Regel in 30 Zyklen [Denaturierung: 1min 94°C , Annealing: 1min, Temperatur in Abhängigkeit der verwendeten Primer, Elongation: Dauer in Abhängigkeit der erwarteten Produktgröße, 72°C]. Zur Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen wurde das Jetsoorb DNA Extraction Kit (GENOMED) verwendet. Die Konzentration von Nukleinsäuren wurde photometrisch mit einem Perkin Elmer LambdaBio-Spektrophotometer bestimmt. Bei einer Wellenlänge von 260nm und einem Weg von 1cm entspricht der Absorptionswert 1 der Konzentration 50µg/ml dsDNA bzw. 40 µg/ml RNA. Der Quotient aus den Absorptionen bei 260nm und 280nm gibt Aufschluß über die Reinheit der Nukleinsäurelösung und sollte idealerweise 1,8 betragen.

Zur DNA Sequenzierung wurde der T7 DNA Sequencing Kit (Pharmacia) verwendet. Die Reaktionen wurden auf einem denaturierenden 6% Polyacrylamidgel (0,3% Bisacrylamid, 6M Harnstoff, 0,5x TBE) aufgetragen (Sequenzgel). Der Auftragspuffer enthielt 0,25% Bromphenolblau, 0,25% Xylencyanol, 10mM EDTA pH 8,0 in deionisiertem Formamid). Als Elektrophoresepuffer wurde TBE (1x) verwendet.

TAE (1x): 40mM Tris-acetat, 2mM EDTA

TBE (1x): 100mM Tris-borat pH 7,9; 2mM EDTA

5.7. Isolierung von Nukleinsäuren

5.7.1. Plasmidpräparation aus *E. coli*

Die Isolierung von Plasmid DNA aus *E. coli* erfolgte in der Regel nach der "Boiling" Methode (Sambrook et al, 1989). Zur Präparation größerer Mengen wurden QIAGEN Säulen (Diagen) oder der JETSTAR Kit (Genomed) verwendet.

5.7.2. Präparation chromosomaler DNA aus *U. maydis*

Die Isolation chromosomaler DNA aus *U. maydis* erfolgte nach der Methode von Hoffman und Winston (1987). 15ml einer Übernachtskultur in YEPS Flüssigmedium wurden geerntet und das Zellpellet in 200µl Lysepuffer resuspendiert. 400µl Phenol/Chloroform und 0,3g Glasperlen wurden zugesetzt und die Probe für 3,5min auf dem VORTEX Schüttler durchmischt. Nach Zugabe von 200µl TE wurde zur Phasentrennung 10min zentrifugiert (14000Upm in einer Eppendorf Zentrifuge). Vom Überstand wurden maximal 500µl in ein Eppendorfgefäß überführt und die Nukleinsäuren durch Zugabe von 1ml Ethanol präzipitiert (5min, 14000Upm). Das Pellet wurde 5min bei RT getrocknet und in 400µl TE, 75µg/ml RNaseA resuspendiert. Nach 30min Inkubation bei 37°C wurde die Lösung Phenol/Chloroform-extrahiert und die gereinigte DNA mit 5,5µl 7,5M NH₄-Acetat und 1ml Ethanol erneut präzipitiert. Das Pellet wurde mit 70% Ethanol gewaschen, bei RT getrocknet und in 50µl TE gelöst (30min bei 37°C oder über Nacht bei 4°C). Die DNA-Konzentration wurde auf einem 1% Agarosegel abgeschätzt oder spektrophotometrisch bestimmt.

Lysepuffer: 10mM Tris-Cl pH7,5, 100mM NaCl, 1mM EDTA, 1%(w/v) SDS, 2%(v/v) Triton X-100

TE: 10mM Tris-Cl pH 8,0, 1mM EDTA

5.7.3. Präparation von gesamt RNA aus *U. maydis*

Extraktion von RNA aus Mycel von Agarplatten: Hierbei wurde das Protokoll von Timberlake et al (1986) befolgt. Das Mycel von zwei großen CM-Aktivkohle-Agarplatten wurde abgekratzt, in flüssigem Stickstoff gefroren, und zu feinem Pulver gemörsert. Das trockene Pulver wurde in 20ml RNA-Lysepuffer und 10ml TE-gesättigtes Phenol überführt und sofort vermischt. Nach Zugabe von 7ml Glasperlen (150µ) wurde die Probe 10x je 10sec auf dem VORTEX geschüttelt und dann 10ml Chloroform zugesetzt. Nach der Zentrifugation (15min, 10000Upm, 10°C in einer Beckmann Avanti™30) wurde die wäßrige Phase 3x mit je 20ml Phenol/Chloroform extrahiert. Die RNA wurde anschließend durch Zugabe von 1/3 Vol. 8M LiCl für 2-24h auf Eis präzipitiert, pelletiert (20min, % Ethanol gewaschen, bei RT getrocknet und in 0,5ml TE, 0,1% SDS gelöst. Die Qualität der RNA wurde auf einem 1% TBE-Agarosegel überprüft, die genaue RNA-Konzentration wurde photometrisch bestimmt.

RNA-Lysepuffer: 40ml Lösung 2 werden langsam in 40ml Lösung 3 gegeben, dann 20ml Lösung 1 hinzugefügt und mit NaOH auf pH 8,9 eingestellt (Niederschlagbildung). Vor Gebrauch kann der Puffer filtriert werden.

Lösung 1: 250mM EGTA, 1,25M NaCl, 1M Tris-HCl pH 8,5

Lösung 2: 12% (w/v) Natrium-p-Aminosalicylsäure

Lösung 3: 2% (w/v) tri-iso-Propyl-naphtalensulfonat

5.7.4. Aufreinigung von polyA⁺ RNA

Die polyA⁺ RNA wurde mittels Dynabeads™ (DYNAL) nach Vorschrift des Herstellers aufgereinigt.

5.8. Radioaktive Markierung von DNA Fragmenten

DNA Sonden wurden nach der Random Prime Methode unter Verwendung von α-[³²P]dCTP (spezifische Aktivität 3000Ci/mmol) mit dem Megaprime™ DNA Labelling System von Amersham hergestellt. Die Abtrennung freier Nukleotide vom markierten DNA-Fragment erfolgte über Elutip-d Säulen (Schleicher & Schuell) oder durch Zentrifugation des Ansatzes in MicroSpin S300 Säulen (MoBiTec), bzw. SpinColumns (Pharmacia) nach Vorschrift des Herstellers.

5.9. Transfer und Analyse von Nukleinsäuren auf Nylonmembranen

5.9.1. Transfer und Analyse von DNA ("Southern Blot")

Der Transfer der DNA durch ein Saugblotverfahren (Southern, 1975) auf eine Nylonmembran (Biodyne B 0,45µm PALL) wurde gemäß dem Protokoll von Sambrook et al (1989) vorgenommen. Der Transfer wurde nach 5-18h beendet, die Membran in 0,2M Tris-HCl (pH 7,5), 2x SSC gewaschen und getrocknet. Um die vollständige Bindung der DNA an die Membran zu gewährleisten wurde nachfolgend eine UV-Bestrahlung vorgenommen (280nm, 2min). Hybridisierung der Membran mit einer α-[³²P]dCTP-markierten Sonde erfolgte in Hybridisierungspuffer bei 65°C im Rollofen für 5-18h. Anschließend wurde die radioaktive Sonde entfernt, die Membran bei 65°C mindestens 2x je 15min mit Waschpuffer gewaschen, bis keine Radioaktivität mehr im Waschpuffer festgestellt wurde.

Hybridisierungspuffer: 0,5M Na₂HPO₄ pH 7,0; 7% SDS
 Waschpuffer: 0,1M Na₂HPO₄ pH 7,0; 1% SDS

5.9.2. Transfer und Analyse von RNA ("Northern Blot")

Formaldehyd-Formamid Methode (Sambrook et al, 1989): Die RNA Proben wurden in 1x MOPS Puffer, 6,7% (v/v) Formaldehyd und 50% (v/v) Formamid versetzt und 15min bei 65°C denaturiert. Anschließend wurden den Proben 1/10 Vol. Auftragspuffer und Ethidiumbromid zugegeben bevor sie auf einem 1% Agarosegel (6,7% Formaldehyd, 1x MOPS) aufgetrennt wurden (Feldstärke 5V/cm, Laufzeit 2,5h). Nach dem Lauf wurde das Gel 40min in 20x SSPE gespült.

Anschließend wurde die RNA im Kapillarblotverfahren mit 20x SSPE auf eine Nylonmembran (BiodyneB, 0,45µm, PALL) transferiert. Die Membran wurde wie oben beschrieben mit UV-Licht bestrahlt. Die Hybridisierung wurde mit RNA-Hybridisierungspuffer (Virca et al, 1990) bei 60°C über Nacht durchgeführt. Die Membranen wurden dann bei gleicher Temperatur mit Northern-Waschpuffer gewaschen.

10x MOPS: 200mM MOPS pH 7,0; 80mM Na-Acetat, 10mM EDTA
 20x SSPE: 180mM NaH₂PO₄ pH 7,4; 3M NaCl, 20mM EDTA
 20x SSC: 400mM Na-Citrat pH 7,0; 3M NaCl
 Northern-Hybridisierungspuffer: 50mM PIPES pH6,5
 Northern-Waschpuffer: 1x SSC, 5% (w/v) SDS

5.10. Isolierung von cDNA Klonen

Die cDNA Klone der in dieser Arbeit analysierten Gene wurden aus der λZAPII cDNA Bank des Stammes FB1 isoliert (5.3.2). Mit dem *E. coli* Wirtsstamm XL1-Blue wurde in LB, 0,2% Maltose zunächst eine Vorkultur bis zur stationären Phase angezogen, die dann 1:50 verdünnt und abermals bis zur OD₆₀₀ von 0,5 bei 37°C inkubiert wurde. Um Phagen-kompetenz zu erlangen, wurden die Zellen geerntet und in 1/5 Vol. 10mM MgSO₄ (0°C) resuspendiert. Eine geeignete Verdünnung der Phagen-Bank wurde mit 0,2ml der Zellen für 15min bei 37°C inkubiert und anschließend mit 2,5ml Top-Agar (45°C) auf einer LB-Agar Platte verteilt. Die Platten wurden 6-8h bei 37°C inkubiert, bis die Plaques sichtbar waren. Anschließend wurde eine Nylonmembran (Hybond N⁺, Amersham) für 2min auf die Platte gelegt, abgezogen, umgedreht und 10-15min denaturiert, 5min renaturiert und kurz in 20x SSC gewaschen. Nach dem Trocknen wurden die Membranen wie oben beschrieben mit UV-Licht bestrahlt. Die Hybridisierung erfolgte wie für die Southern Analysen beschrieben.

Aus den λZAPII Klonen lassen sich durch *in vivo*-Excision pBlueskript-Derivate herstellen. Hierfür werden Phagen aus einem Einzelplaque mit einem Zahnstocher in 200µl Phagen-kompetenter XL1-Blue Zellen überführt und resuspendiert. Anschließend wurde 1µl des Helfer-Phagen ExAssistTM (Stratagene; >1x10⁶ pfu/ml) infiziert und in 3ml YT-Medium für 2,5h bei 37°C lysiert. Durch 20min Erhitzen auf 70°C wurden überlebende Zellen abgetötet, und das f1-Lysat wurde durch Abzentrifugieren der Zellreste (15min, 4000g) im Überstand gewonnen. 200µl einer *E. coli* SOLR-Kultur wurden anschließend mit 1, bzw. 50µl des Lysates infiziert und auf YT-Amp Platten ausgebracht.

Top-Agar: 0,8% Bacto-Agar in LB
 Denaturierungslösung: 0,5M NaOH, 1,5M NaCl
 Renaturierungslösung: 0,5M Tris-HCl pH 7,2; 1,5M NaCl

5.11. Sequenzanalyse des *rpl38*-Locus, des *pat2563*-Locus, und der Gene *pat3050*, *ckb1* und *gas1*

Die Sequenzanalyse des *rpl38*-Locus, des *pat2563*-Locus, sowie des *pat3050*-Gens erfolgte mit Hilfe des T7 DNA Sequencing Kit (Pharmacia) nach Angabe des Herstellers. Die Gene *ckb1* und *gas1* wurden mit Hilfe des ABI 377 Sequenzierautomaten (Perkin Elmer) unter Betreuung durch J. Görl sequenziert.

Für die Sequenzierung des *rpl38*-Locus wurden 35 Subklone des Plasmids pPat1#8 in pBS erstellt und mit den Primern Universal und M13-Reverse sequenziert. Ein Schema der Sequenzierung ist in Abb.57 dargestellt.

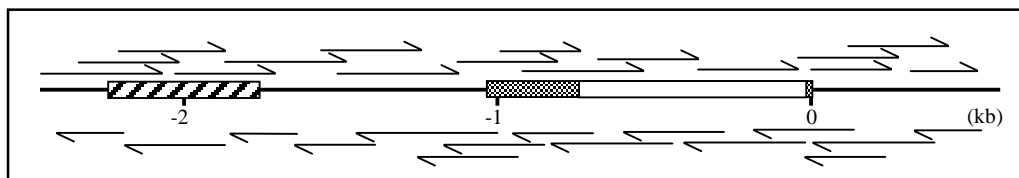


Abb. 57: Sequenzierung des *rpl38*-Locus. Die genomische Sequenz von 2,9kb DNA wurde durch Sequenzierung verschiedener Subklone bestimmt. Der *rpl38*-Leserahmen ist als schattiertes Rechteck dargestellt, der offene Teil symbolisiert das Intron. Ein benachbarter Leserahmen, *rsmI* ist als schraffiertes Rechteck dargestellt. Die Pfeile geben Bereiche an, die durchgehend gelesen werden konnten.

Für die Sequenzierung des *pat2563*-Locus wurden 13 Subklone des Plasmids pPat2563-EV in pBS erstellt und mit den Primern Universal und M13-Reverse sequenziert. Ein Schema der Sequenzierung ist in Abb.58 dargestellt.

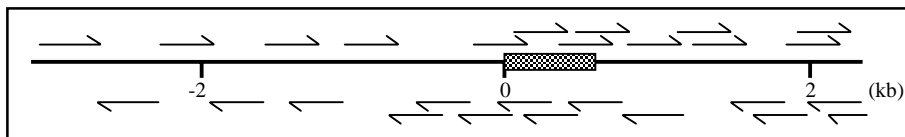


Abb. 58: Sequenzierung des *pat2563*-Locus. Die genomische Sequenz von 5,4kb DNA wurde durch Sequenzierung verschiedener Subklone bestimmt. Der *pat2563*-Leserahmen ist als schattiertes Rechteck dargestellt. Die Pfeile geben Bereiche an, die durchgehend gelesen werden konnten. Doppelsträngig wurde das 884bp EcoRI-HindIII-Fragment sequenziert, das den *pat2563*-Leserahmen beinhaltet.

Für die Sequenzierung von *pat3050* wurden die Plasmide pPat3050-X und pPat3050-E, sowie Derivate dieser Plasmide, bei denen Teile des genomischen Inserts deletiert worden waren, mit den Primern Universal und M13-Reverse sequenziert. Ein Schema der Sequenzierung ist in Abb.59 dargestellt.

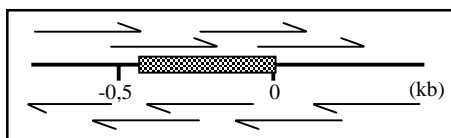


Abb. 59: Sequenzierung von *pat3050*. Die genomische Sequenz von 1,3kb DNA wurde durch Sequenzierung verschiedener Subklone bestimmt. Der *pat3050*-Leserahmen ist als schattiertes Rechteck dargestellt. Die Pfeile geben Bereiche an, die durchgehend gelesen werden konnten.

Für die Sequenzierung von *ckb1* wurde pckbM8 mit den Primern cCkb:5', cCkb:3', ckb-ins1, ckb-ins5, ckb-down, ckb-up, casCD1.5 und casCD.3 (siehe 5.4.8) sequenziert. Ein Schema der Sequenzierung ist in Abb.60 dargestellt.

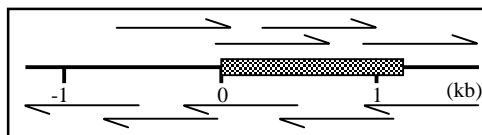


Abb. 60: Sequenzierung von *ckb1*. Die genomische Sequenz von 2,9kb DNA wurde unter Verwendung von Primern mit dem Sequenzierautomaten ermittelt. Der *ckb1*-Leserahmen ist als schattiertes Rechteck dargestellt. Die Pfeile geben Bereiche an, die durchgehend gelesen werden konnten.

Für die Sequenzierung von *gas1* wurden Subklone des Plasmids pgasM11 in pBS erstellt und mit den Primern T7, M13-Reverse, gas:3, gas:5, gas:6, gas:7 sowie gas-4 (siehe 5.4.8) sequenziert. Ein Schema der Sequenzierung ist in Abb.61 dargestellt.

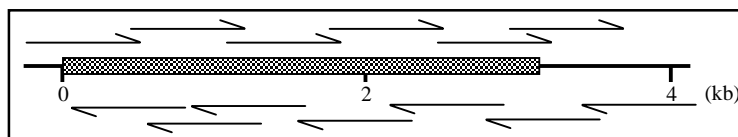


Abb. 61: Sequenzierung von *gas1*. Die genomische Sequenz von 4,1kb DNA wurde durch Sequenzierung verschiedener Subklone und unter Verwendung von Primern mit dem Sequenzierautomaten ermittelt. Der *gas1*-Leserahmen ist als schattiertes Rechteck dargestellt. Die Pfeile geben Bereiche an, die durchgehend gelesen werden konnten.

5.12. Proteinbiochemische Methoden

Zur Auftrennung von Proteinen wurden SDS-haltige Polyacrylamid-Gele und ein diskontinuierliches Puffersystem verwendet. Die Anfärbung der Proteine im Gel erfolgte mit Coomassie Brilliant Blue (Sigma). Diese Standardmethoden folgten den Protokollen von Sambrook et al (1989).

5.12.1. Gewinnung von Proteinextrakten aus *U. maydis*

Zur Gewinnung von Gesamt-Zellextrakten aus *U. maydis* wurden 200ml einer exponentiell wachsenden Kultur geerntet, einmal in 20mM Tris-Cl, pH7,5 gewaschen und in 3ml (50mM Tris-Cl pH7,5; 5mM EDTA; 0,3M NaCl; 5mM DTT; 0,5mM Pefabloc) aufgenommen. Alle folgenden Schritte wurden auf Eis durchgeführt. Der Zellaufschluß erfolgte durch 2- bis 3-malige Passage in der French Press (1100 psi; Mini-Zelle). Anschließend wurden die unlöslichen Bestandteile durch zwei Zentrifugationen (15min; 39000g) vom Überstand abgetrennt. Die Proteinextrakte wurden bei -80°C gelagert.

5.12.2. Western Blot

Der Transfer von Proteinen aus einem Polyacrylamid-Gel auf eine PVDF-Membran erfolgte im "Semi-dry" Verfahren mit Hilfe einer Elektroblot Apparatur (CarboGlas, Schleicher & Schüll). Auf die Anode wurden zwei mit Puffer A1 getränkte Filterpapiere (Whatman GB004) gelegt. Darauf wurde ein in Puffer A2 getränktes Filterpapier, die in A2 getränkte PVDF-Membran, und das in Puffer K getränkte Gel gelegt. Den Kontakt zur Kathode bildeten drei Filterpapiere, die in K getränkt waren. Der Transfer erfolgte bei 4°C über eine Stunde bei $0,8\text{ mA/cm}^2$. Anschließend konnte der Filter mit PonceauS (Sigma) reversibel gefärbt werden.

Puffer A1: 300mM Tris, pH 10,4; 10% Methanol

Puffer A2: 25mM Tris, pH 10,4; 10% Methanol

Puffer K: 25mM Tris; 40mM 6-aminohexansäure, pH 9,4; 20% Methanol

5.12.3. Immunologischer Nachweis von Proteinen im Western Blot

Der Nachweis von myc-Epitop-markierten Proteinen erfolgte mit Hilfe des BM Chemiluminescence Western Blotting Kit (Boehringer). Die Proteine wurden nach der Elektrophorese auf eine PVDF-Membran (Immobilon P, $0,45\mu\text{m}$, Millipore)geblottet (s.o.). Die Membran wurde für 1h bei RT mit der Blockier-Lösung abgesättigt und anschließend in 0,5x Blockier-Lösung über Nacht bei 4°C mit dem c-myc Antikörper inkubiert ($1\mu\text{g/ml}$ 9E10 monoklonaler IgG-Antikörper aus Maus; Dianova). Nach zweimaligem Waschen in TBST (je 10min) wurde die Membran in 0,5x Blockier-Lösung transferiert und für 90min bei RT mit dem zweiten Antikörper inkubiert (10mU/ml Anti-Maus IgG-POD; Boehringer). Anschließend wurde viermal für je 15min mit TBST gewaschen. Die Chemilumineszenz-Reaktion wurde gemäß dem Herstellerprotokoll durchgeführt (Boehringer).

Blockier-Lösung: 3% Magermilchpulver; 2% BSA (Fraktion V, Sigma)

TBST: 50mM Tris-Cl, pH 7,5; 150mM NaCl; 0,1% Tween 20

6. Literaturverzeichnis

- Ackerman, P., Glover, C.V.C., Osheroff, N. (1985)** Phosphorylation of DNA topoisomerase II by casein kinase II: modulation of eukaryotic topoisomerase activity *in vitro*. *Proc.Natl.Sci.USA* **82**, 3164-68.
- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schaffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., Lipman, D.J. (1997)** Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucl.Acids Res.* **25**, 3389-3402.
- Andrews, D.L., Egan, J.D., Mayorga, M.E., Gold, S.E. (2000)** The *Ustilago maydis* *ubc4* and *ubc5* genes encode members of a MAP kinase cascade required for filamentous growth. *Molec.Plant-Microbe Interact.* **13**, 781-86.
- Apel, P.C., Panaccione, D.G., Holden, F.R., Walton, J.D. (1993)** Cloning and targeted gene disruption of *XYL1*, a β 1,4-xylanase gene from the maize pathogen *Cochliobolus carbonum*. *Molec.Plant-Microbe Interact.* **6**, 467-73.
- Apel-Birkhold, P.C. and Walton, J.D. (1996)** Cloning, disruption and expression of two *endo*- β -1,4-xylanase genes, *XYL2* and *XYL3*, from *Cochliobolus carbonum*. *Appl.Environ.Microbiol.* **62**, 4129-35.
- Arendt, C.W. and Ostergaard, H.L. (1997)** Identification of the CD45-associated 116-kDa and 80-kDa proteins as the α - and β -subunits of α -Glucosidase II. *J.Biol.Chem.* **272**, 13117-25.
- Bairoch, A., Bucher, P., Hofman, K. (1997)** The PROSITE Database, its status in 1997. *Nucl.Acids Res.* **24**, 217-221.
- Balhadere, P.V., Foster, A.J., Talbot, N.J. (1999)** Identification of pathogenicity mutants of the rice blast fungus *Magnaporthe grisea* by insertional mutagenesis. *Molec.Plant-Microbe Interact.* **12**, 129-42.
- Ballance, J. D. (1990)**: Transformation systems for filamentous fungi and an overview of fungal gene structure. In Leong, S. A. and Berka, R. M. (eds), *Molecular industrial mycology*. Marcel Dekker, New York, pp. 1-29.
- Banuett, F. (1991)**. Identification of genes governing filamentous growth and tumor induction by the plant pathogen *Ustilago maydis*. *Proc.Natl.Sci.USA* **88**: 3922-3926.
- 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. *Ann. Rev. Genet.* **29**: 179-208.
- Banuett, F. and Herskowitz, I. (1988)**: *Ustilago maydis*, smut of maize. In *Genetics of Plant Pathogenic Fungi: Advances in Plant Pathology*, Volume 6, G. S. Sidhu, ed. (London: Academic Press) : pp427-455.
- Banuett, F. and 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. and Herskowitz, I. (1994)**: Morphological transitions in the life cycle of *Ustilago maydis* and their genetic control by the *a* and *b* loci. *Exp. Mycol.* **18**: 247-266.
- Banuett, F. and Herskowitz, I. (1996)**: Discrete developmental stages during teliospore formation in the corn smut fungus, *Ustilago maydis*. *Development* **122**: 2965-2976.
- Beckerman, J.L. and Ebbole, D.J. (1996)** *MPG1*, a gene encoding a fungal hydrophobin of *Magnaporthe grisea*, is involved in surface recognition. *Molec.Plant-Microbe Interact.* **9**, 450-456.
- Bijvoet, A.G., van de Kamp, E.H., Kroos, M.A., Ding, J.H., Yang, B.Z., Visser, P., Bakker, C.E., Verbeet, M.P., Oostra, B.A., Reuser, A.J. and van der ploeng, A.T. (1998)** Generalized glycogen storage and cardiomegaly in a knockout mouse model of Pompe disease. *Hum.Mol.Genet.* **7**, 53-62.
- Billett, E.E. and Burnett, J.H. (1978)** The host-parasite physiology of the maize smut fungus, *Ustilago maydis* – II. Translocation of ¹⁴C-labelled assimilates in smutted maize plants. *Phys.Plant Pathol.* **12**, 103-12.
- Bölker, M., Urban, M. and Kahmann, R. (1992)**. The *a* mating type locus of *Ustilago maydis* specifies cell signaling components. *Cell* **68**: 441-450.
- Bölker, M., Genin, S., Lehmler, C. and Kahmann, R. (1995a)**: Genetic regulation of mating and dimorphism in *Ustilago maydis*. *Can. J. Bot.* **73**: 320-325.

- Bölker, M., Böhnert, H. U., Braun, K. H., Görl, J. and Kahmann, R. (1995b):** Tagging pathogenicity genes in *Ustilago maydis* by restriction enzyme-mediated integration (REMI). *Mol. Gen. Genet.* **248**, 547-552.
- Bohlmann, R. (1997):** Isolierung und Charakterisierung von filamentspezifisch exprimierten Genen aus *Ustilago maydis*. Thesis, LMU München.
- Bouaziz, S., Van Heijenoort, C., Guittet, E., Huet, J.C. and Pernollet, J.C. (1994)** Resonance assignment, cystein-pairing elucidation and secondary-structure determination of capsicein, an α -elicitin, by three-dimensional ^1H NMR. *Eur. J. Biochem.* **220**, 427-438.
- Carmichael, D.F., Geahlen, R.L., Allen, S.M., Krebs, E.G. (1982)** Type II regulatory subunit of cAMP-dependent protein kinase. *J.Biol.Chem.* **257**, 10440-45.
- Christensen, J.J. (1963)** Corn smut caused by *Ustilago maydis*. Published by The American Phytopathological Society, Monograph no. **2**: 1-41.
- Choi, W. and Dean, R.A. (1997)** The adenylate cyclase gene MAC1 of *Magnaporthe grisea* controls Appressorium formation and other aspects of growth development. *Plant Cell* **9**, 1973-83.
- Chumley, F.G. and Valent, B. (1990)** Genetic analysis of melanin-deficient, non-pathogenic mutants of *Magnaporthe grisea*. *Molec.Plant-Microbe Interact.* **3**, 135-43.
- Clergeot, P.H., Latorse, M.P., Laurans, F., Pepin, R., Tharreau, D., Notteghem, J.L. and Lebrun, M.H. (2000)** *PLS1*, a gene encoding a tetraspanin-like protein, is required for penetration of rice leaf by the fungal pathogen *Magnaporthe grisea*. (submitted)
- Cohen, S., Chang, A. C. Y. and Hse, C. (1972):** Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *E. coli* R-factor DNA. *Proc. Natl.Acad. Sci.USA* **69**, 2110 - 2114.
- Cormack, B.P., Valdivia, R.H. and Falcow, S. (1996)** FACS-optimized mutants of the Green Fluorescent Protein (GFP). *Gene* **173**, 33-38.
- Cubitt, A.B., Heim, R., Adams, S.R., Boyd, A.E., Gross, L.A. and Tsien, R.Y. (1995)** Understanding, improving and using green fluorescent proteins. *TIBS* **20**, 448-455.
- De Block, M. (1993)** The cell biology of plant transformation: current state, problems, prospects and the implications for plant breeding. *Euphitica*, **71**,1-14.
- De Groot, M.J.A., Bundock, P., Hooykaas, P.J.J., Beijersbergen, A.G.M. (1998)** *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of filamentous fungi. *Nature Biotechnology* **16**, 839-42.
- de Vries, O.M.H., Fekkes, M.P., Wösten, H.A.B. and Wessels, J.G.H. (1993)** Insoluble hydrophobin complexes in the walls of *Schizophyllum commune* and other filamentous fungi. *Arch. Microbiol.* **159**, 330-335.
- De Wit, P.J.G.M. (1977)** A light and scanning-electron microscopic study of infection of tomato plants by virulent and avirulent races of *Cladosporium fulvum*. *Neth.J.Plant Pathol.* **83**, 109-22
- De Wit, P.J.G.M. (1995)** Fungal avirulence genes and plant resistance genes: Unraveling the molecular basis of gene-for-gene interactions. *Adv. Bot. Res.* **21**, 147-185.
- DeZwaan, T.M., Carroll, A.M., Valent, B., Sweigard, J.A. (1999)** *Magnaporthe grisea* Pth11p is a novel plasma membrane protein that mediates Appressorium differentiation in response to inductive surface cues. *Plant Cell* **11**, 2013-30.
- Dean, R.A. (1997)** Signal pathways and Appressorium morphogenesis. *Ann.Rev.Phytopathol.* **35**, 211-34.
- Deising, H., Heiler, S., Rauscher, M., Xu, H., Mendgen, K. (1996)** Cellular aspects of rust infection structure differentiation: spore adhesion and fungal morphogenesis. *Histology, Ultrastructure and molecular cytology of plant-microorganism interactions.* (Nicole, M., Gianninazzi-Pearson, V., eds. Kluwer, Dordrecht). 135-56.
- Diallinas, G. and Scazzocchio, C. (1998)** A gene coding for the uric acid-xanthine permease of *Aspergillus nidulans*: Inactivational cloning, characterization and sequence of a *cis*-acting mutation. *Genetics* **122**, 341-50.
- Dixon, R.A. and Lamb, C.J. (1990)** Molecular communication in interactions between plants and microbial pathogens. *Ann.Rev.Plant Physiol Plant Mol.Biol.* **41**, 339-67.

- Dixon, R.A., Harrison, M.J. and Lamb, C.J. (1994)** Early events in the activation of plant defense responses. *Ann.Rev.Plant Phytopathol.* **32**, 479-501.
- Dobrowolska, G., Lozeman, F.J., Li, D., Krebs, E.G. (1999)** CK2, a protein kinase of the next millennium. *Mol.Cell.Biochem* **191**, 3-12.
- Dohmen, R.J., Strasser, A.W.M., Dahlems, U.M. and Hollenberg, C.P. (1990)** Cloning of the *Schwanniomyces occidentalis* glucoamylase gene (GAM1) and its expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* **95**, 111-121.
- Dürrenberger, F., Wong, K., Kronstad, J. (1998)** The *ukc1* gene encodes a protein kinase involved in morphogenesis, pathogenicity and pigment formation in *Ustilago maydis*. *Mol.Gen.Genet.* **261**, 281-89.
- Dürrenberger, F. and Kronstad, J. (1999)** Identification of a PKA catalytic subunit required for virulence and morphogenesis in *Ustilago maydis*. *Proc.Natl.Sci.USA* **95**, 5684-89.
- Dufresne, M., Langin, T. (1998)** *clk1*, a serine/threonine protein kinase-encoding gene, is involved in pathogenicity of *Colletotrichum lindemuthianum* on common bean. *Molec.Plant-Microbe Interact.* **11**, 99-108.
- Elbein, A.D. (1991)** Glucosidase inhibitors: inhibitors of N-linked oligosaccharide processing. *FASEB J.* **5**, 3055-63.
- Ellgaard, L., Molinari, M. and Helenius, A. (1998)** Setting the Standards: Quality Control in the Secretory Pathway. *Science.* **286**, 1882-87.
- Fischer and Holton (1957)** Biology and control of the smut fungi. Ronald Press, New York.
- Flaishman, M.A., Kolattukudy, P.E. (1994)** Timing of fungal invasion using host's ripening hormone as a signal. *Proc.Natl.Sci.USA* **91**, 6579-83.
- Flor, H.H. (1971)** Current status of the gene-for-gene concept. *Annu. Review Phytopathol.* **9**, 275-296.
- Fotheringham, S. and Holloman, W.K. (1990)** Pathways of transformation in *Ustilago maydis* determined by DNA conformation. *Genetics* **124**, 833-43.
- Freeze, H.H., Lammertz, M., Iranfar, N., Fuller, D., Panneerselvam, K., Loomis, W.F. (1997)** Consequences of disrupting the gene that encodes α -glucosidase II in the N-linked oligosaccharide biosynthesis pathway of *Dictyostelium discoideum*. *Dev.Genet.* **21**, 177-86.
- Gillissen, B., Bergemann, J., Sandmann, C., Schroeer, B., Bölker, M. and Kahmann, R. (1992):** A two-component regulatory system for self/non-self recognition in *Ustilago maydis*. *Cell* **68**: 647-657.
- Gold, S., Duncan, G., Barrett, K., Kronstad, J. (1994)** cAMP regulates morphogenesis in the fungal pathogen *Ustilago maydis*. *Genes.Dev.* **8**, 1805-16.
- Gold, S., Brogdon, S.M., Mayorga, M.E., Kronstad, J. (1997)** The *Ustilago maydis* regulatory subunit of a cAMP-dependent protein kinase is required for gall formation in maize. *Plant Cell.* **9**, 1585-94.
- Götz, C., Scholtes, P., Prowald, A., Schuster, N., Nastainczyk, W., Montenarh, M. (1999)** Protein Kinase CK2 interacts with a multi-protein binding domain of p53. *Mol.Cell.Biochem* **191**, 111-20.
- Gritz, L and Davies, J. (1983)** Plasmid encoded hygromycin B resistance: the sequence of Hygromycin B phosphotransferase gene and its expression in *Escherichia coli*. *Gene*, **25**, 267-72.
- Hahn, M. and Mendgen, K. (1997)** Characterization of *in planta*-induced rust genes isolated from a haustorium-specific cDNA library. *Molec.Plant-Microbe Interact.* **10**, 427-37.
- Hahn, M., Neef, U., Struck, C., Göttfert, M. and Mendgen, K. (1997)** A putative amino acid transporter is specifically expressed in haustoria in the rust fungus *Uromyces fabae*. *Molec.Plant-Microbe Interact.* **10**, 438-445.
- Hammond, C., Braakman, I., Helenius, A. (1994)** Role of N-linked oligosaccharides, glucose trimming and calnexin during glycoprotein folding in the endoplasmic reticulum. *Proc.Natl.Sci.USA*, **91**, 913-17.
- Hartmann, H. A., Kahmann, R. and Bölker, M. (1996):** The pheromone response factor coordinates filamentous growth and pathogenicity in *Ustilago maydis*. *EMBO J.* **15**, 1632-1641.
- Hartmann, H.A. (1997):** Die Pheromonantwort in *Ustilago maydis*: Kontrolle von Zellfusion und Pathogenität. Thesis LMU München.

- Hebert, D.N., Foellmer, B. and Helenius, A. (1995)** Glucose trimming and reglucosylation determine glycoprotein association with calnexin. *Proc.Natl.Sci.USA*, **81**, 425-433.
- Hehl, R. (1994)** Transposon tagging in heterologous host plants. *Trends Genet.* **10**, 385-86.
- Helenius, A., Trombetta, E.S., Hebert, D.N. and Simons, J.F. (1997)** Calnexin, calreticulin and the folding of glycoproteins. *Trends Cell Biol.* **7**, 193-200.
- Henrissat, B. (1991)** A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *Biochem J.* **280**, 309-16.
- Hermans, M.M.P., Kroos, M.A., van Beeumen, J., Oostra, B.A. and Reuser, A.J.J. (1991)** Human Lysosomal alpha-Glucosidase Characterization of the Catalytic Site. *J.Biol.Chem.* **266**, 13507-13512.
- Hessing, J.G.M., van Rotterdam, C., Verbakel, J.M.A., Roza, M., Maat, J., van Gorcom, R.F.M. and van den Hondel, C.A.M.J.J. (1994)** Isolation and Characterization of the Gene of 1,4-beta-Endoxylanase of *A.wamori*. *Curr.Genet.* **26**, 228-232.
- Hiei, Y., Ohta, S., Komari, T., Kumashiro, T. (1994)** Efficient transformation of rice (*Oryza sativa*) mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of the boundaries of the t-DNA. *Plant J.* **6**, 271-82.
- Hippe-Sanwald, S., Marticke, K.H., Kieliszewski, M.J., Somerville, S.C. (1994)** Immunogold localization of THRGP-like epitopes in the haustorial interface of obligate, biotrophic fungi on monocots. *Protoplasma* **178**, 138-55.
- Hoffmann, C. S. and Winston, F. (1987)**: A ten-minute DNA preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformation in *E. coli*. *Gene* **57**, 267-272.
- Holliday, R. (1961a)**: The genetics of *Ustilago maydis*. *Genet. Res. Camb.* **2**: 204-230.
- Holliday, R. (1961b)**: Induced mitotic crossing-over in *Ustilago maydis*. *Genet. Res. Camb.* **2**: 231-248.
- Holliday, R. (1965a)**: Radiation sensitive Mutants of *Ustilago maydis*. *Mutat. Res.* **2**: 557-559.
- Holliday, R. (1965b)**: Induced mitotic crossing-over in relation to genetic replication in synchronously dividing cells of *Ustilago maydis*. *Genet. Res. Camb.* **6**: 104-120.
- Holliday, R. (1967)**: Altered recombination frequencies in radiation-sensitive strains of *Ustilago*. *Mutat. Res.* **4**: 275-288
- Holliday, R. (1974)**: *Ustilago maydis*. In King, R. C. (ed), Handbook of Genetics. Vol.1, Plenum, New York, pp 575-595.
- Howard, R.J., Bourett, T.M., Ferrari, M.A. (1991)** Infection by *Magnaporthe*: an in vitro analysis. *Electron microscopy of plant pathogens. (Mendgen, K., Lesemann, D.E.eds. Springer, Berlin)* 251-64.
- Hua-Van, A., Pamphile, J., Gerlinger, C., Langin, T., Daboussi, M.J. (2000)** Development of a two-component transposon system using the *impala* element from *Fusarium oxysporum* and application to a heterologous species. *Mol. Gen. Genet.* (in press).
- Hubbard, S.C. and Ivatt, R.J. (1981)** Synthesis and processing of asparagin-linked oligosaccharides. *Ann.Rev.Biochem.* **50**, 555-84.
- Huet, J.C., Nespoulous, C. and Pernollet, J.C. (1992)** Structures of elicitor isoforms secreted by *Phytophthora drechsleri*. *Phytochemistry* **31**, 1471-1476.
- Hwang, C.S., Flaishman, M.A. and Kolattukudy, P.E. (1995)** Cloning of a gene expressed during Appressorium formation by *Colletotrichum gloeosporoides* and a marked decrease in virulence by disruption of this gene. *Plant Cell* **7**, 183-93.
- Inoue, A., Tei, Y., Hasuma, T., Yukioka, M., Morisawa, S. (1980)** Phosphorylation of HMG 17 by protein kinase NII from rat liver cell nuclei. *FEBS Lett.* **117**, 68-72.
- Isaacs, N.W. (1995)** Cystine knots. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **5**, 391-395.
- Ishida, Y., Saito, H., Ohta, S., Hiei, Y., Kumari, T., Kumashiro, T. (1996)** High efficiency transformation of maize (*Zea mays* L.) mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Nat.Biotechnol.* **14**, 745-50.
- Jelitto, T.C., Page, H.A., Read, N.D. (1994)** Role of external signals in regulating the pre-penetration phase of infection by the rice blast fungus, *Magnaporthe grisea*. *Planta*, **194**, 471-77.

- Joosten, M.H.A.J. and De Wit, P.J.G.M. (1988)** Isolation, purification and preliminary characterization of a protein specific for compatible *Cladosporium fulvum* (syn. *Fulvia fulva*)-tomato interactions. *Physiol.Mol.Plant Pathol.* **33**, 241-253.
- Joosten, M.H.A.J., Cozijnsen, T.J. and De Wit, P.J.G.M. (1994)** Host resistance to a fungal tomato pathogen lost by a single base pair change in an avirulence gene. *Nature* **367**, 384-386.
- Kämper, J., Reichmann, M., Romeis, T., Bölker, M. and Kahmann, R. (1995)**: Multiallelic recognition: nonself-dependent dimerization of the bE and bW homeodomain proteins in *Ustilago maydis*. *Cell* **81**: 73-83.
- Kahmann, R. and 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**, 221-29.
- Kang, S. and Metzberg, R.L. (1993)** Insertional mutagenesis in *Neurospora crassa*: cloning and molecular analysis of the *preg+* gene controlling the activity of the transcriptional activator *NUC-1*. *Genetics* **133**, 193-202.
- Kazmierczak, P., Pfeiffer, P., Zhang, L. and Van Alfen, N.K. (1996)** Transcriptional repression of specific host genes by the mycovirus *Cryphonectria-hypovirus-1*. *J. Virol.* **70**, 1137-1142.
- Keon, J.P.R., White, G.A., 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**, 475-81.
- Kershaw, M.J. and Talbot, N.J. (1998)** Hydrophobins and Repellents: Proteins with fundamental Roles in Fungal Morphogenesis. *Fungal Genet. and Biol.* **23**, 18-33.
- Knogge, W. (1996)** Fungal Infection of Plants. *The Plant Cell* **8**, 1711-1722.
- Kogel, G.; Beissman, B., Reisener, H.J. and Kogel, K. (1988)** A single glycoprotein from *Puccinia graminis* f.sp. *tritici* cell walls elicits the hypersensitive lignification reaction in wheat. *Physiol.Mol.Plant Pathol.* **33**, 173-85.
- Kooman-Gersman, M., Vogelsang, R., Hoogendijk, E.C.M., De Wit, P.J.G.M. (1997)** Assignment of Amino Acid Residues of the AVR9 Peptide of *Cladosporium fulvum* that determine Elicitor Activity. *Molec.Plant-Microbe Interact.* **10**, 821-829.
- Kornfeld, R. and Kornfeld, S. (1985)** Assembly of asparagine-linked oligosaccharides. *Ann.Rev.Biochem.* **54**, 631-64.
- Krehan, A. and Pyerin, W. (1999)** Intermolecular contact sites in protein kinase CK2. *Mol.Cell.Biochem* **191**, 21-28.
- Kronstad, J. W. and Leong, S. A. (1989)**. Isolation of two alleles of the *b* locus of *Ustilago maydis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**: 978-982.
- Kronstad, J. W. and Leong, S. A. (1990)**: The *b* mating-type locus of *Ustilago maydis* contains variable and constant regions. *Genes Dev.* **4**: 1384-1395.
- Krüger, J, Loubradou, G., Regenfelder, E., Hartmann, A., Kahmann, R. (1998)** Crosstalk between cAMP and pheromone signalling pathways in *Ustilago maydis*. *Mol.Gen.Genet.* **260**, 193-98.
- Kubo, Y., Takano, Y., Furusawa, I (1996)** Molecular genetic analysis of melanin biosynthetic genes of *Colletotrichum lagenarium*. *Colletotrichum Newsl.* **II**, 5-10.
- Kusk, M., Ahmed, R., Thomsen, C., Bendixen, C., Issinger, O.G., Boldyreff, B. (1999)** Interactions of protein kinase CK2 β subunit within the holoenzyme and with other proteins. *Mol.Cell.Biochem* **191**, 51-58.
- Kuspa, A. and Loomis, W.F. (1992)** Tagging developmental genes in *Dictyostelium* by restriction enzyme-mediated integration of Plasmid DNA. *Proc.Natl.Sci.USA* **89**, 8803-07.
- Langin, T., Cappy, P., Daboussi, M.J. (1995)** The transposable element *impala*, a fungal member of the *Tc1-mariner* superfamily. *Mol.Gen.Genet.* **246**, 19-28.
- Lau, G. and Hamer, J.E. (1996)** Genetic identification of two regulatory loci controlling metabolism and pathogenicity gene expression in the rice blast fungus. *Plant Cell* **8**, 771-781.

- Lau, G. and Hamer, J.E. (1998)** Acropetal: a genetic locus required for conidiophore architecture and pathogenicity in the rice blast fungus. *Fungal Genet. Biol.* **24**, 228-239.
- Laugé, R., Joosten, M.H.A.J., Van den Ackerwecken, G.F.J.M., Van den Broek, H.W.J. and De Wit, P.J.G.M. (1998)** The *in planta*-produced extracellular proteins ECP1 and ECP2 of *Cladosporium fulvum* are virulence factors. *Molec. Plant-Microbe Interact.* **10**, 725-734.
- Laugé, R. and De Wit, P.J.G.M. (1998)** Fungal Avirulence Genes: Structure and Possible Functions. *Fungal Genet. Biol.* **24**, 285-297.
- Lee, Y.H. and Dean, R.A. (1993)** cAMP regulates infection structure formation in the plant pathogenic fungus *Magnaporthe grisea*. *Plant Cell* **5**, 693-700.
- Lee, Y.H. and Dean, R.A. (1994)** Hydrophobicity of contact surface induces Appressorium formation of *Magnaporthe grisea*. *FEMS Microbiol. Lett.* **115**, 71-76.
- Leroy, D., Alghisi, G.C., Roberts, E., Filhol-Cochet, O., Gasser, S.M. (1999a)** Mutations in the C-terminal domain of topoisomerase II affect meiotic function and interaction with the casein kinase 2 beta subunit. *Mol. Cell. Biochem* **191**, 85-95.
- Leroy, D., Filhol, O., Quintaine, N., Sarrouilhe, D., Loue-Mackenbach, P. Chambaz, E.M., Cochet, C. (1999b)** Dissecting subdomains involved in multiple functions of the CK2 beta subunit. *Mol. Cell. Biochem* **191**, 43-50.
- Liu, Z.M. and Kollatukudy, P.E. (1999)** Early expression of the calmodulin gene, which precedes appressorium formation in *Magnaporthe grisea*, is inhibited by self-inhibitors and requires surface-attachment. *Journal Bacteriol.* **181**, 3571-77.
- Lohaus, G., Winter, H., Riens, B., Heldt, H.W. (1995)** Further studies of the phloem loading process in leaves of barley and spinach. The comparison of metabolite concentrations in the apoplasmic compartment with those in the cytosolic compartment and in the sieve tubes. *Bot. Acta* **108**, 270-75.
- Lu, S.W., Lyngholm, L., Yang, G., Bronson, C., Yoder, O.C., Turgeon, B.G. (1994)** Tagged mutations at the *Tox1* locus of *Cochliobolus heterostrophus* using restriction enzyme-mediated integration. *Proc. Natl. Sci. USA* **91**, 12649-53.
- Lucocq, J.M., Brada, D., Roth, J. (1986)** Immunolocalization of the oligosaccharide trimming enzyme glucosidase II. *J. Cell Biol.* **102**, 2137-46.
- Maldonado, E. and Allende, J.E. (1999)** Phosphorylation of yeast TBP by protein kinase CK2 reduces its specific binding to DNA. *FEBS Lett.* **443**, 256-60.
- Mayorga, M.E. and Gold, S.E. (1999)** A MAP kinase encoded by the *ubc3* gene of *Ustilago maydis* is required for filamentous growth and full virulence. *Molec. Microbiol.* **34**, 485-97.
- McCafferty, H.R. and Talbot, N.J. (1998)** Identification of three ubiquitin genes of the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*, one of which is highly expressed during initial stages of plant colonization. *Curr. Genet.* **33**, 352-61.
- Meggio, F., Brunati, A.M., Pinna, L.A. (1987)** Polycation-dependent, Ca²⁺-antagonized phosphorylation of calmodulin by casein kinase-2 and a spleen tyrosine protein kinase. *FEBS Lett.* **215**, 241-46.
- Meggio, Perich, J.W., Meyer, H.E., Hoffman-Posorske, E., Lennon, D.P.W., Johns, R.B., Pinna, L.A. (1989)** *Eur. J. Biochem.* **186**, 459-64.
- Mendgen, K., Hahn, M., Deising, H. (1996)** Morphogenesis and mechanisms of penetration by plant pathogenic fungi. *Ann. Rev. Phytopathol.* **34**, 367-86.
- Metraux, J.P. and Raskin, I. (1993)** Role of phenolics in plant disease resistance. *Biotechnology in plant disease control.* Wiley-Liss, Inc., New York. 191-209.
- Mikes, V., Milat, M.L., Ponchet, M., Ricci, P. and Blein, J.P. (1997)** The fungal elicitor cryptogein is a sterol carrier protein. *FEBS Lett.* **416**, 190-192.
- Mikes, V., Milat, M.L., Ponchet, M., Panabieres, F., Ricci, P. and Blein, J.P. (1998)** Elicitins, proteinaceous elicitors of plant defense, are a new class of sterol carrier proteins. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **245**, 133-139.
- Mitchell, T.K. and Dean, R.A. (1995)** The cAMP-dependent protein kinase catalytic subunit is required for appressorium formation and pathogenesis by the rice blast pathogen *Magnaporthe grisea*. *Plant Cell* **7**, 1869-78.

- Müller, P., Aichinger, C., Feldbrügge, M., Kahmann, R. (1999)** The MAP kinase Kpp2 regulates mating and pathogenic development in *Ustilago maydis*. *Molec.Microbiol.* **34**, 1007-17.
- Murphy, J.M. and Walton, J.D. (1996)** Three extracellular proteases from *Cochliobolus carbonum*: Cloning and targeted disruption of *ALP1*. *Molec.Plant-Microbe Interact.* **9**, 290-97.
- Nespoulous, C., Huet, J.-C. and Pernollet, J.-C. (1992)** Structure-function relationships of a and b elicitors, signal proteins involved in the plant-*Phytophthora* interaction. *Planta* **186**, 551-557.
- O'Connell, R.J. and Bailey, J.A. (1991)** Hemibiotrophy in *Colletotrichum lindemuthianum*. *Electron microscopy of plant pathogens. (Mendgen, K., Lesemann, D.E.eds. Springer, Berlin)* 211-22.
- Oliver, R. and Osbourn, A. (1995)** Molecular dissection of fungal phytopathology. *Micobiology* **141**, 1-9.
- Orth, A.B., Rzhetskaya, M., Pell, E.J., Tien, M. (1995)** A serine (threonine) protein kinase confers fungicide resistance in the phytopathogenic fungus *Ustilago maydis*. *Appl.Environ.Microbiol.* **61**, 2341-45.
- Osbourn, A., Clarke, B.R., Lunness, P., Scott, P.R., Daniels, M.J. (1994)** An oat species lacking avenacin is susceptible to infection by *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*. *Physiol.Mol.Plant Pathol.* **45**, 457-67.
- Pain, N.A., Green, J.R., Jones, G.L., O'Connell, R.J. (1996)** Composition and organization of extracellular matrices around germ tubes and appressoria from *Colletotrichum lindemuthianum*. *Protoplasma* **190**, 119-30.
- Pallaghy, P.K., Nielsen, K.J., Craik, D.J. and Norton, R.S. (1994)** A common structural motif incorporating a cystine knot and a triple-stranded β -sheet in toxic and inhibitory polypeptides. *Prot. Sci.* **3**, 1833-1839.
- Panaccione, D.G., Scott-Craig, J.S., Pocard, J.A., Walton, J.D. (1995)** A cyclic peptide synthetase gene required for pathogenicity of the fungus *Cochliobolus carbonum* on maize. *Proc.Natl.Sci.USA* **89**, 6590-94.
- Pernollet, J.-C., Sallantin, M., Sallé-Tourne, M. and Huet, J.-C. (1993)** Elicitor-isoforms from seven *Phytophthora* species: comparisons of their physico-chemical properties and toxicity in tobacco and other plant species. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **42**, 53-67.
- Pernollet, J.-C. (1994)** Les élicitines, alliées des plantes contre les parasites. *La Recherche* **261**, 82-84.
- Perpetua, N.S., Kubo, Y., Yasuda, Y., Takano, Y., Furusawa, I (1996)** Cloning and characterization of a melanin biosynthetic *THRI* reductase gene essential for appressorial penetration of *Colletotrichum lagenarium*. *Molec.Plant-Microbe Interact.* **9**, 323-29.
- Pieterse, C.M.J., Risseuw, E.P. and Davidse L.C. (1991)** An *in planta* induced gene of *Phytophthora infestans* codes for ubiquitin. *Plant Molec.Biol.* **17**, 799-811.
- Pieterse, C.M.J., Verbakel, H.M., Spaans, J.H., Davidse, L.C. and Govers, F. (1993)** Increased expression of the calmodulin gene of the late blight fungus *Phytophthora infestans* during pathogenesis on potato. *Molec.Plant-Microbe Interact.* **6**, 164-72.
- Pieterse, C.M.J., Derksen, A.M.C.E., Folders, J., Govers, F. (1994)** Expression of the *Phytophthora infestans ipiB* and *ipiO* genes in planta and in vitro. *Mol.Gen.Genet.* **244**, 269-77.
- Pinna, L.A. (1990)** Casein Kinase 2: an 'eminence grise' in cellular regulation? *Biochim.Biophys.Acta* **1054**, 267-84.
- Plasterk, R.H., Izsvak, Z., Ivics, Z. (1999)** Resident aliens: the Tc1/mariner superfamily of transposable elements. *Trends Genet.* **15**, 326-32.
- Podila, G.K., Rogers, L.M., Kolattukudy, P.E. (1993)** Chemical signals from avocado surface waxes trigger germination and Appressorium formation in *Colletotrichum*. *Plant Physiol.* **103**, 267-72.
- Read, N.D., Kellock, L.J., Knight, H., Trewavas, A.J. (1992)** Contact sensing during infection by fungal pathogens. *Perspectives in plant cell recognition. (Callow, J.A., Green, J.R. eds. Cambridge Univ.Press)* 137-72.

- Reed, J.C., Bidwai, A.P., Glover, C.V.C (1994)** Cloning and disruption of *CKB1*, the gene encoding the 32-kDa regulatory β '-subunit of *Saccharomyces cerevisiae* casein kinase II. *J.Biol.Chem* **269**, 18192-200.
- Regenfelder, E., Spellig, T., Hartmann, A., Lauenstein, S., Bölker, M. and Kahmann, R. (1997)** G proteins in *Ustilago maydis*: transmission of multiple signals? *EMBO J.* **16**, 1934-42.
- Riggle, P.J. and Kumamoto, C.A. (1998)** Genetic analysis in fungi using restriction enzyme-mediated integration. *Curr.Opin.Microbiol.* **1**, 395-99
- Rohe, M., Gierlich, A., Hermann, H., Hahn, M., Schmidt, B., Rosahl, S. and Knogge, W. (1995)** The race-specific elicitor, NIP1, from the barley pathogen, *Rhynchosporium secalis*, determines avirulence on host plants of the Rrs1 resistance genotype. *EMBO J.* **14**, 4168-4177.
- Roussou, I. and Draetta, G. (1994)** The *Schizosaccharomyces pombe* casein kinase II α and β subunits: evolutionary conservation and positive role of β subunit. *Mol.Cell.Biol.* **14**, 576-86.
- Rowell, J. B. (1955)**: Functional role of compatibility factors and an in vitro test for sexual compatibility with haploid lines of *Ustilago zaeae*. *Phytopathology* **45**: 370-374.
- Rowell, J. B. and DeVay, J. E. (1954)**: Genetics of *Ustilago zaeae* in relation to basic problems of its pathogenicity. *Phytopathology* **44**: 356-362.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T. (1989)**: Molecular cloning: A laboratory manual. (second edition) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring harbor, New York.
- Schäfer, W. (1994)** Molecular mechanisms of fungal pathogenicity to plants. *Ann.Rev.Phyopathol.* **32**, 461-77
- Schauwecker, F., Wanner, G. and Kahmann, R. (1995)** Filament-Specific Expression of a Cellulase Gene in the Dimorphic Fungus *Ustilago maydis*. *Biol.Chem.Hoppe-Seyler* **376**, 617-625.
- Schiestl, R.H. and Petes, T.D. (1991)** Integration of DNA fragments by illegitimate recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc.Natl.Sci.USA* **88**, 7585-89.
- Schulz, B., Banuett, F., Dahl, M., Schlesinger, R., Schäfer, W., Martin, T., Herskowitz, I. and 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.
- Schuster, N., Prowald, A., Schneider, E., Scheidtmann, K.H., Montenarh, M. (1999)** Regulation of p53 mediated transactivation by the beta-subunit of protein kinase CK2. *FEBS Lett.* **447**, 160-66.
- Simons, J.F., Ebersold, M., Helenius, A. (1998)** Cell wall 1,6- β -glucan synthesis in *Saccharomyces cerevisiae* depends on ER glucosidases I and II, and the molecular chaperone BiP/Kar2p. *EMBO J.* **17**, 396-405.
- Snetselaar, K. M. and Mims, C. W. (1992)** Sporidial fusion and infection of maize seedlings by the smut fungus *Ustilago maydis*. *Mycologia* **84**, 193-203.
- Snetselaar, K. M. (1993)** Microscopic observations of *Ustilago maydis* mating interactions. *Exp. Mycol.* **17**, 345-355.
- Snetselaar, K. M. and Mims, C. W. (1994)** Light and electron microscopy of *Ustilago maydis* hyphae in maize. *Mycol. Res.* **98**, 347-355.
- Snetselaar, K.M., Bölker, M., Kahmann, R. (1996)** *Ustilago maydis* mating hyphae orient their growth toward pheromone sources. *Fungal Genet.Biol.* **20**, 299-312.
- Southern, E. M. (1975)**: Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* **98**, 503-517.
- Spellig, T., Bottin, A. and Kahmann, R. (1996)** Green fluorescent protein (GFP) as a new vital marker in the phytopathogenic fungus *Ustilago maydis*. *Mol. Gen. Genet.* **252**, 503-509.
- Stahl, D.J. and Schäfer, W. (1992)** Cutinase is not required for fungal pathogenicity on pea. *Plant Cell* **4**, 621-29.
- Staples, R., Hoch, H.C., Epstein, L., Lacetti, L., Hassouna, S. (1985)** Recognition of host morphology by rust fungi: responses and mechanisms. *Canad.J.Plant Pathol.* **7**, 314-22.
- Swigard, J.A. (1996)** A REMI primer for filamentous fungi. IS-MPMI-Rep. Spring 1996, 3-5

- Sweigard, J.A., Carroll, A.M., Valent, B. (1998)** Restriction enzyme-mediated integration in the rice blast fungus. Long Ashton Int.Symp., 15th. IACR-Long Ashton Res.Sta., Bristol, England.
- Sweigard, J.A., Carroll, A.M., Farrall, L. Chumley, F.G., Valent, B. (1998)** *Magnaporthe grisea* Pathogenicity genes obtained through insertional mutagenesis. *Molec.Plant-Microbe Interact.* **11**, 404-12.
- Sweigard, J.A., Chumley, F.G., Valent, B. (1992)** Disruption of a *Magnaporthe grisea* cutinase gene. *Mol.Gen.Genet.* **232**, 183-90.
- Takano, Y., Kubo, Y., Shimizu, K., Mise, K., Okuno, T., Furusawa, I. (1995)** Structural analysis of *PKSI*, a polyketide synthase gene involved in melanin biosynthesis in *Colletotrichum lagenarium*. *Mol.Gen.Genet.* **249**, 162-67.
- Talbot, N.J., Ebbole, D.J., Hamer, J.E. (1993)** Identification and characterization of *MPG1*, a gene involved in pathogenicity from the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. *Plant Cell* **5**, 1575-90.
- Talbot, N.J., Kershaw, M.J., Wakley, G.E., de Vries, O.M.H., Wessels, J.G.H. and Hamer, J.E. (1996)** MPG1 encodes a fungal hydrophobin involved in surface interactions during infection-related development by *Magnaporthe grisea*. *Plant Cell* **8**, 985-989.
- Templeton, M.D., Rikkerink, E.H.A. and Beever, R.E. (1994)** Small, Cysteine-Rich Proteins and Recognition in Fungal-Plant Interactions. *Molec.Plant-Microbe Interact.* **7**, 320-325.
- Tilburn, J., Roussel, F., Scazzocchio, C. (1990)** Insertional inactivation and cloning of the *wA* gene of *Aspergillus nidulans*. *Genetics* **126**, 81-90.
- 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*, H1, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, pp. 343-357.
- Trombetta, E.S., Simons, J.F., Helenius, A. (1996)** Endoplasmic Reticulum glucosidase II is composed of a catalytic subunit, conserved from yeast to mammals, and a tightly bound noncatalytic HDEL-containing subunit. *J.Biol.Chem.* **271**, 27509-16.
- Uchiyama, T., Okuyama, K. (1990)** Participation of *Oryza sativa* leaf waxes in appressorium formation by *Pyricularia oryzae*. *Phytochemistry* **29**, 91-92.
- Urban, M., Kahmann, R. and Bölker, M. (1996)**: Identifikation of the pheromone response element in *Ustilago maydis*. *Mol. Gen. Genet.* **251**, 31-37.
- Urban, M., Bhargava, T., Hamer, J.E. (1999)** An ATP-driven efflux pump is a novel pathogenicity factor in rice blast disease. *EMBO J.* **18**, 512-21.
- Van den Ackerwecken, G.F.J.M., Vossen, P. and De Wit, P.J.G.M. (1993)** The AVR9 race-specific elicitor of *Cladosporium fulvum* is processed by endogenous and plant proteases. *Plant Physiol.* **103**, 91-96.
- VanEtten, H., Soby, S., Wasmann, C., McCluskey, K. (1994)** Pathogenicity genes in fungi. *Advances in molecular Genetics of Plant-Microbe Interactions* (M.J.Daniels et al eds. Kluwer Academic Publishers) **3**, 163-70
- van Kan, J.A.L., van't Klooster, J.W., Wagemakers, C.A.M., Dees, D.C.T., van der Vlugt-Bergmans, C.J.B. (1997)** Cutinase A of *Botrytis cinerea* is expressed, but not essential, during penetration of Gerbera and Tomato. *Molec.Plant-Microbe Interact.* **10**, 30-38.
- van West, P., de Jong, A.J., Judelson, H.S. Emons, A.M.C. and Govers, F. (1998)** The *ipiO* gene of *Phytophthora infestans* is highly expressed in invading hyphae during infection. *Fungal Genet.Biol.* **23**, 126-38.
- Vervoort, J., van den Hooven, H., Berg, A., Vossen, P., Vogelsang, R., Joosten, M.H.A.J., De Wit, P.J.G.M. (1997)** The race specific elicitor of the tomato pathogen *Cladosporium fulvum*: a cystine knot protein. *FEBS* **404**, 153-158.1997.
- Villalba, F., Lebrun, M.H., Hua-Van, A., Daboussi, M.J., Grosjean-Cournoyer, M.C. (2000)** Transposon based insertional mutagenesis in the rice blast fungus *Magnaporthe grisea* using *impala*, a *Tc1-mariner* element from *Fusarium oxysporum*. (submitted).
- Virca, G.D., Northemann, W., Shiels, B.R., Widera, G., Broome, S. (1990)** Simplified Northern Blot hybridisation using 5% sodium dodecyl sulfate. *BioTechniques*, **8**, 370-71.

- Voelker, L.L. and Dybvig, K. (1998)** Transposon mutagenesis. *Methods Mol.Biol.* **104**, 235-38.
- Walton, G.M. and Gill, G.N. (1983)** Identity of the *in vivo* phosphorylation site in High Mobility Group protein in HeLa cells with the site phosphorylated by casein kinase *in vitro*. *J.Biol.Chem.* **258**, 4440-46.
- Walton, J.D., Bronson, C.R., Panaccione, D.G., Braun, E.J. and Akimitso, K. (1995)** *Cochliobolus*. In: *Pathogenesis and host specificity in plant diseases. Histological, biochemical, genetic and molecular bases. Eukaryotes*, (Kohmoto, K., Singh, U.S., Singh, R.P eds. Oxford:Elsevier) 2:65-81
- Wang, J., Holden, D. W. and Leong, S.A. (1988)**. Gene transfer system for the phytopathogenic fungus *Ustilago maydis*. *Proc.Natl.Sci.USA* **85**, 865-869.
- Wasmann, C.C. and van Etten H.D. (1996)** Transformation-mediated chromosome loss and disruption of a gene for pisatin demethylase decrease the virulence of *Nectria haematococca* on pea. *Molec.Plant-Microbe Interact.* **9**, 793-803.
- Welihinda, A.A., Tirasophon, W., Kaufman, R.J. (1999)** The cellular response to protein misfolding in the endoplasmic reticulum. *Gene Expr.* **7**, 293-300.
- Wessels, J.G.H. (1996)** Fungal hydrophobins: proteins that function at an interface. *Trends Plant Sci.* **1**, 9-15.
- Wessels, J.G.H. (1997)** Hydrophobins: Proteins that change the nature of the fungal surface. *Adv. Microbial Physiol.* **38**, 1-45.
- Winter, H., Lohaus, G., Heldt, H.W. (1992)** Phloem transport of amino acids in relation to their cytosolic levels in barley leaves. *Plant Physiol.* **99**, 996-1004.
- Wong, G.J. and Wells, K. (1985)** Modified bifactorial incompatibility in *Tremella mesenterica*. *Trans.Br.Mycol.Soc.* **84**, 95-109.
- Wubben, J.P., Joosten, M.H.A.J. and De Wit, P.J.G.M. (1994)** Expression and localization of two *in planta* induced extracellular proteins of the fungal tomato pathogen *Cladosporium fulvum*. *Molec.Plant-Microbe Interact.* **7**, 516-24.
- Wu, S.C., Ham, K.S., Darvill, A.G., Albersheim, P. (1997)** Deletion of two endo- β -1,4-xylanase genes reveals additional isozymes secreted by the rice blast fungus. *Molec.Plant-Microbe Interact.* **10**, 700-08.
- Xu, J.R. and Hamer, J.E. (1996)** MAP kinase and cAMP signalling 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. and 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.Sci.USA* **95**, 12713-18.
- Xuei, X., Bhairi, S., Staples, R.C. and Yoder, O.C. (1993)** INF56 represents a family of differentiation-specific genes from *Uromyces appendiculatus*. *Curr.Genet.* **24**, 84-88.
- Yaguchi, M., Pusztai-Carey, M., Roy, C., Surewicz, W.K., Carey, P.R., Stevenson, K.J., Richards, W.C. and Takai, S. (1993)** Amino acid sequence and spectroscopic studies of Dutch Elm Disease toxin, cerato-ulmin. *Dutch Elm Disease Research, Cellular and Molecular Approaches* (M.B.Sticklen, J.L.Sherald Eds. Springer Verlag, N.Y.) pp.152-170.
- Yang, Z. and Dickman, M.B. (1999)** *Colletotrichum trifolii* mutants disrupted in the catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase are non-pathogenic. *Molec.Plant-Microbe Interact.* **12**, 430-39.
- Yoder, O.C. (1998)** A mechanistic view of the fungal/plant interaction based on host-specific toxin studies. *Molecular Genetics of host-specific Toxins in Plant Disease* (K.Kohmoto and O.C.Yoder Eds. Kluwer Academic Publishers) pp. 3-15.
- Yun, S.H., Turgeon, B.G., Yoder, O.C. (1998)** REMI-induced mutants of *Mycosphaerella zeae-maydis* lacking the polyketide PM-toxin are deficient in pathogenesis to corn. *Physiol.Mol.Plant Pathol.* **52**, 53-66.
- Zimmer, T., Ogura, A., Ohta, A., Takagi, M. (1999)** Misfolded membrane-bound cytochrome P450 activates KAR2 induction through two distinct mechanisms. *J.Biochem.(Tokyo)* **126**, 1080-89.

Anhang

I. Ermittelte Sequenzen des Integrationsortes von 12 apathogenen REMI-Transformanden (siehe 2.1.1.)

Die Sequenzen wurden mit dem Programm DNA Strider 1.2 von Christian Marck, CEA, Frankreich, bearbeitet.

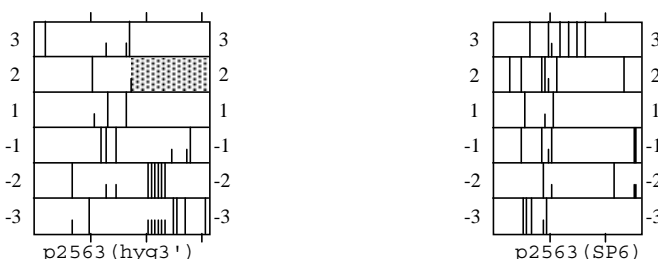
p2563(hyg3') (*pat2563* ist hervorgehoben.)

```
GGATCCCGAATTCGCACAAC TGAACCACCTCTCGTGTCTC TTTTCTGGGGACAGCTGTTG CAACCAGTCATCGAGACGTG 80
GCGCTGGCGTGTTCGTGGTC ACTTGATGCCTTTTGGCGTA CTGCAATCATGAATCCTCTG TGCTTCATTTCTGCTCGCGT 160
CTTGATGGCTTGATGCCCGC GCCCTTCTGTTCCCACTCTT CCTCATCCTCATCCTCATCC TCATCCTCATCCTCATCCCC 240
TCCCATCCCTATCCCTATCC CTGTCTTGTTTTCATCTGTTAT TTCTTTGTTTCGTCGATTCT TTTGTTCAACC 311
```

p2563(SP6)

```
GATCCAATACACCGGTCTGT TGCAGACTTGAAAGCCGCGC GTGTGACCTAAGTTAGAGC TACTGTAGTTACAAGCAAGA 80
ATTGTTAATCATGAATCATG AATCATGAATCCTGAATCCT GAATCCCTGTATCCTGAATC CCTGTATCCTGAATCCAGAC 160
AGAGTGAGAGACAGACAATC CCAGAAAAAACCCGACGAAA CCCCAGCGAGCCCTTCAAAA GACAACCCGCGGTAAACAGC 240
AAGCAAGCTCATATTTGC T 261
```

Mögliche Leserahmen der sequenzierten Bereiche: (*pat2563* ist schattiert.)



Ergebnis des Sequenzvergleichs mittels Blastx (Altschul et al, 1997) für beide Sequenzen:

Keine signifikante Ähnlichkeit zu bekannten Genen.

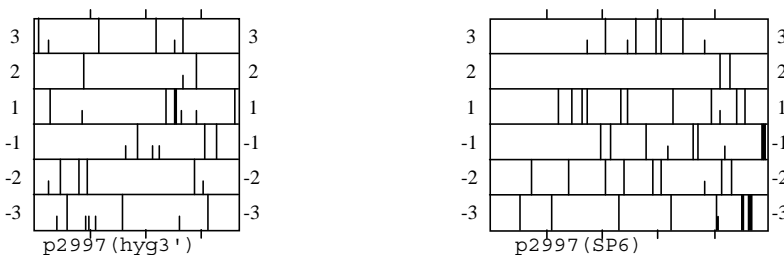
p2997(hyg3')

```
GGATCCAGTGAGTACAGCTC GTCGACATGAATCTCTCCTT CCATCTCTACAGGAACACCT CACCACACAAAGAGATCCGT 80
CAAGATGGTAAGCATCAGCA TCGACAACAGCATACTGAAT ACAGTACAGCACACCCGGATC CGTATTCGATACTCCGGCTC 160
AGCATTGCACGACGTCCACG CAGTCAAAAAGAGAAGCAGA GAGGAGAGGACATTTTCGTA AACATTCGATATCTTGAAGA 240
GCCCGACTTTGATGAGAACG CATGTATGACGAACACCAAC AGCGATTTATGACCGTCCGT CCATTACCGTGTCAAGGCAG 320
AACGCTACAGCACAAGGTCG AAGCAACCTCGCTCGGTTGA TACTT 365
```

p2997(SP6)

```
GGATCCGCGCAAACCAGCTG CCGTCCCGGACCTGTCTCTC GCGGTTTCTCCTGTGAGCTT TCCTTGCCAACAATTACACT 80
CTGCTGCTGCTGCTGCTGCT GCTGCTGCTGTCAACTCTTC TGAAGCAGTGCCCGCAGTTT CAACTGAACGCTGCCTCGCG 160
AATAGAGCTTGTGATGCACT CTTTTTCCAGTCTCGCTATT TCGAATTAACGGTTCAAGCC TCGGCCGAATTTAGTTTCTC 240
ACGTGATGCACAAGGTTTTC TGATTTTGCAGGCACCTCAC CAGTCCCGTTCAATTTTGAA GCTTCTAATTCGGCACATTC 320
GAGTTAGAGGCAGCAGAAGG CACCTGAGACAGAGGAGTTG TCAGTCTTCTCAACAGAGTG TGCATGGAGCAAGTAACAGG 400
AGAGCTACATGATTACGCAT TCGAGACTGATCAGAGAGTA GTGTTGCGACTACTAGGGCT GCTACTACTACTTTTCGAAC 480
CACCTACTACTAC 493
```

Mögliche Leserahmen der sequenzierten Bereiche:



Ergebnis des Sequenzvergleichs mittels Blastx (Altschul et al, 1997) für beide Sequenzen:

Keine signifikante Ähnlichkeit zu bekannten Genen.

p3050(hyg3')

```

GGATCCTTGTAACGCGAAAA CTCGGAGACGCTAGTCTTTGG TCTTGGAGAATACCCTGTTC GACCAGCGCAAGTCAGAACG 80
ATACGCTTGGGGAAAACGTC AGCATTGGCGAGCAAGGCTG GTACAGCATTGCAACAAGAG CATCCACTCACGCGGGTCA 160
ACTTCGTCCTGCCACCAGC TCCGGCTGGTTCGCCATCGA GCCGAGCTGGTCAGGCTGTG AAAAAACGAGCTCGACCTCG 240
GAAATGAGCAGACAGCCAAT GTGTGCAATTCTGTCCGATC 282

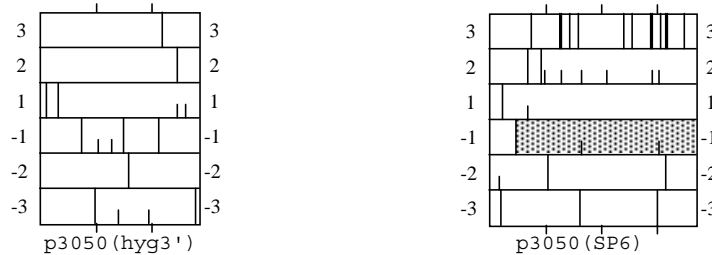
```

p3050(SP6) (*bim1* ist hervorgehoben.)

```

GGATCCTCCTTTTGGCCATC TTAAGCGCCTTTGGAGCGAC ACCCTTCAGGCGCCAACACA GGCCAGATGACGCGTGACGT 80
TGGACTCGCGGTAAGGAATG TGGCTATTCTTCTCCACGAG TCGGTTGATGACACGACCGA GCGTGAGAAAGGCTCTGGTTG 160
ATCATGCCCGCTTCTCTTGC GCGCTTGTCTCGGCGCCGG ATCGACCAATGTTTTCGGAA CCCGCCAAATCGACGAGATT 240
GAGTTTGCCAATCTTGAGCA CGTCTTCGCTCGGGACCCC TTGTCTTTGATGAAGACGGT CATGGTGAAGACGCTAGTAG 320
ATCTGCTCGACTGCTCGTTG CAGTTGGTAGCTGCGATCTG CCTCTTT 367

```

Mögliche Leserahmen der sequenzierten Bereiche: (*bim1* ist schattiert.)**Ergebnis des Sequenzvergleichs mittels Blastx (Altschul et al, 1997) für beide Sequenzen:**

Keine signifikante Ähnlichkeit zu bekannten Genen für p3050(hyg3').

Für p3050(SP6):

```

>sp|P17120|BIMC_EMENI KINESIN-LIKE PROTEIN BIMC
pir|A34795 kinesin-related protein bimC - Emericella nidulans
gb|AAA3298.1| (M32075) kinesin-like protein (bimC) [Aspergillus nidulans]
Length = 1184

```

```

Score = 143 bits (357), Expect = 7e-34
Identities = 74/101 (73%), Positives = 85/101 (83%)
Frame = -1

```

```

Query: 366 KRQIAATNCNEQSSRSTSVFTMTVFIKDKGSRGEDVLIKGLNLVLDLAGSENIGRSGAEN 187
      KRQ+AAT CN+ SRSR +VFT+TV IK GE+ + GKLNLVLDLAGSENIGRSGAEN
Sbjct: 277 KRQVAATKCNLDLSSRSHTVFTITVNIKRTTESGEEYVCPGKLNLDLAGSENIGRSGAEN 336

```

```

Query: 186 KRAREAGMINQSLTLGRVINALVEKNSHIPYRESNVTRHL 64
      KRA EAG+IN+SLLTLGRVINALV+K+ HIPYRES +TR L
Sbjct: 337 KRATEAGLINKSLLTLGRVINALVDKSHIPYRESKLRLL 377

```

p3141(hyg3')

```

GGATCCCGAATCGGACCGAT AGTCAGGTCTCGACTGAAG CGGACACTGTGTCTCCTCGTCG CGCTGCGCTCAATGACGCCA 80
AGCCTTTTTTGGTGGACGAC AAGATGCCTCCGATTGGCGT TTGTGGGTGTGGTGTCTGTG GGTGAGGCATCTGTGTGGTC 160
TCTCGATTCCCTCCTTCCGC TTGTTTATCAGGTGCAGATA TCTCGGCGGTACTATGACCC AGAACATGGTTGAGCCTCTG 240
CCTCGCTGCAACAATCGAGG TGGATGGAAGTCGGGCGCG AACTAACCGTGTGGTGTG CTGCCGACGATAAGCGTTCT 320
TGCGCGGTGAGGAAGCCGGG CTGGAACGTCCGAAATACT GCGGATGGGAGAGACATCAA GCGCCA 386

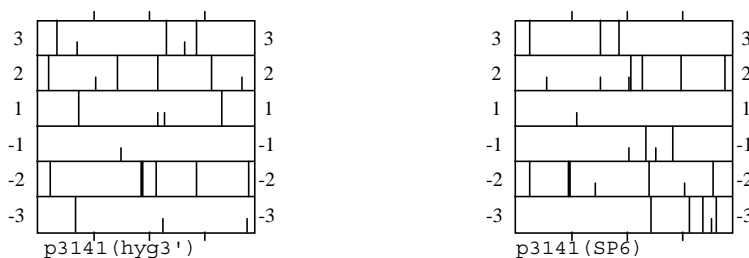
```

p3141(SP6)

```

GGATCCTGGGACGAAACGCA GAGTGTTAAGCCAACGACG GCGACGAGTCTCGAGATGCG GCTGTATCGCGTTTGGTATT 80
GCCGGCAAAGCAGATCACTA TTCCCAGATGTTGGCGACT GCTTCTTTGCCAGTGCACGT GCCATCTGCAAATGAGGAAG 160
AGCAACAAGCGTCGGAATCC AGCGTTGAGAGCGTTGGCGA ACATGTGACAGGACCGCAAT TGCCGGTAGAATCACCTGTC 240
AGTCAACCCGATACACCTGC GTCTCCGTTGGCTTGCCT CAGCGAACAATTCGGTAGCA ACATCTTTTCTCAAAGCGT 320
TCGATTCCTGGAGCTTACA CAGCAACACCCATCAAGAGT TACTCGAGACACTTGATTTC ACCCA 385

```

Mögliche Leserahmen der sequenzierten Bereiche:**Ergebnis des Sequenzvergleichs mittels Blastx (Altschul et al, 1997):**

Keine signifikante Ähnlichkeit zu bekannten Genen.

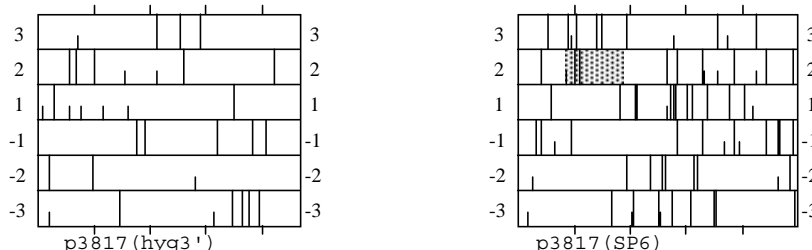
p3817(hyg3')

| | | | | |
|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|-----|
| CCTTGTATGGCTGGTGCAGT | CATTCCGTGAGGAAAGAGCA | CACAAACCACAAAGATGAGG | TTCCAGGTAGTATGGATGGG | 80 |
| TTTTTTGTTCCTCCCGTCTA | TAAACCGGAGTCCAATGCGA | CAACCACTGCAATCCGCGAG | CAAGGCTCAAGCGGATGCGA | 160 |
| TGGCACAGCGTGGCTCAACA | GCAAGTGCCTCAGAGACTTC | CCACAGGCAGTATGATCCTT | TCCCCACTCCGAGAGTCCAC | 240 |
| CCGCCAGCAAGCTGTGAAGT | AGTCGAAGCAACAACAACAC | CATTTCTGTGTGAGGGGCCA | CACGAGCGATCGGACATCTC | 320 |
| ACGTTGCAGGGACAGACAAG | AGAGGAGTTAACCTTGCCT | GCCCCCTACCGTGGGGCTCA | ATTATACCGCTCGGACTATT | 400 |
| GGGACTCACACGTCGCAACC | CTGAGCTGAAATCGTGTTC | GCACACGCGTTCGTGCCCCA | AGCTGT | 466 |

p3817(SP6)

| | | | | |
|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|-----|
| GGATCCGCAAGGTGCACCAT | CGACCGATCCTCACGTCTTT | TAAGTCGTGGATTTGAGTAA | GAGCATACTGTGGGACCC | 80 |
| GAAAGATGGTGAACATGCC | TGAATAGGGTGAAGCCAGAG | GAAACGCTGGTGGAGGCTCG | TAGCGGTTCTGACGTGCAAA | 160 |
| TCGATCGTCAAATTTGGGTA | TAGGGGCGAAAGACTAATCG | AACCATCTAGTAGCTGGTTC | CTGCCGAAGTTTCCCTCAGG | 240 |
| ATAGCAGAACTCACATCAG | TTTTATGAGGTAAAGCGAAT | GATTAGAGGCTTGGGGGAG | TAACTTCCTTAACCTATTCT | 320 |
| CAAACTTTAAATGTGTAAGA | AGCCCTTGTACTTTAGTGA | ACGAGGGCATGCGAATGAGA | GTTTCTAGTGGGCCATTTTT | 400 |
| GGTAACGAGAACTGGCGATG | CGGGATGAACCGAACGTTGG | GTTAAGGTGCCAAAGTATAC | GCTCATCAGATACCAGAAAA | 480 |
| GGTGTATTATTAGTCTA | | | | 496 |

Mögliche Leserahmen der sequenzierten Bereiche: (der Bereich mit Ähnlichkeit zum Transporter ist schattiert)



Ergebnis des Sequenzvergleichs mittels Blastx (Altschul et al, 1997) für beide Sequenzen:

Für 3817(hyg3') keine signifikante Ähnlichkeit zu bekannten Genen.

Für 3817(SP6):

>ref|NP_060877.1| putative integral membrane transporter
 emb|CAB81951.1| (AJ276485) integral membrane transporter protein [Homo sapiens]
 Length = 283

Score = 56.2 bits (133), Expect = 2e-07
 Identities = 26/34 (76%), Positives = 28/34 (81%)
 Frame = +2

Query: 86 MVNYA*IG*SQRKRWRLVAVLTCKSIVKFGYRG 187
 MVNYA G SQRK WWR VAVLTCKS+V+ GYRG
 Sbjct: 1 MVNYAWAGRSQRKLWRSVAVLTCKSVVRPGYRG 34

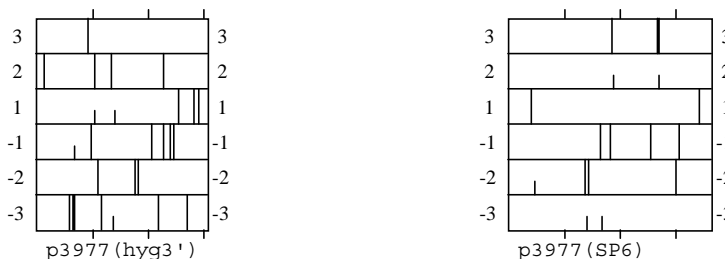
p3977(hyg3')

| | | | | |
|----------------------|-----------------------|----------------------|----------------------|-----|
| GGATCCGGAGCTTTGATCTT | GGCTCTCTCGTGC GGCTTT | GCTCTGCTCTGCTCTGCTCT | CAGTTTCATCACGATTTC | 80 |
| AAAAGACAATTTGGAATCAC | GAATGAGACTCACAACCTCAC | AGACTCGCTCGCGTAGACAT | GTTCCGGTCTCTTCGATTT | 160 |
| TTTTTTGCCGCGCAATCACA | GTCACGAGTCTTCTGTGTC | GTCCTATCGTGTACAAGTC | AAAGTTAGATTTCGAGTTCA | 240 |
| AGTTGATTCGTTGATTTCC | AAAAACCACTCACGACTCGT | GACTTGCCTAGAAGGCTCTG | CCG | 303 |

p3977(SP6)

| | | | | |
|----------------------|----------------------|----------------------|-----------------------|-----|
| GGATCCAAGCCAGTCTGCTG | CCACCGAATCGGTGCTTGCT | GAGCTGCATCCAGCTGTGC | TCCAAGTGTGCGACTCCTTG | 80 |
| TCCGATCGTATCTGCGCCA | ATTCTCCTTTGCGCGAGTC | TCGCTGCTGCCCTCGTTT | CATCAAGCCACGTTGGAAAGT | 160 |
| GCTCAAACATCTTCTCCGCT | TCAGCTGATGCTTCCCAAC | TCCACTTGCCGAGGAACGAA | ACGTACCGGTGCGCGAGCTT | 240 |
| TCCACTGTGGAATCAGCTGC | GGTGGGTGATGAGCGCAGAT | CTTGACCAACCAATCTCTC | AACTCACCCTGCGTCTGCTG | 320 |
| CGACGACGAGCCGAAACGCT | GAGGATCGTGTGCCACTGG | | | 360 |

Mögliche Leserahmen der sequenzierten Bereiche:



Ergebnis des Sequenzvergleichs mittels Blastx (Altschul et al, 1997) für beide Sequenzen:

Keine signifikante Ähnlichkeit zu bekannten Genen.

p4220(hyg3')

```

GTCCCTAGCCTCCCTCCTCCA  CCTGCCCAAATTCTATTGTG  TCCCCTTCTCGTCCGTCTT  TGATCCTTTGCGTGTGTATA  80
AATGGTACCCGCTTCCGCCT  GACCATCTGTCTCTCTGGTT  CTGGCTGCCTATTCTCTGTT  CTCATGCCCATATGCTATG  160
TCCATCCCAGACCCCCACCG  TACCGCTGACACTCCCTGAA  CCGGCTTGTCTGCTCCCGGC  AGTTCGCTCTTGAGGCTGTA  240
ATCCCACTCGGTACCTGGGT  GTGTCTGTGGTCTTCATCTC  CCCCGCCAAACTGGCGAAA  CCAGGAGGCCTCTTAATCCC  320
CCGATGGGTCCCTG  333

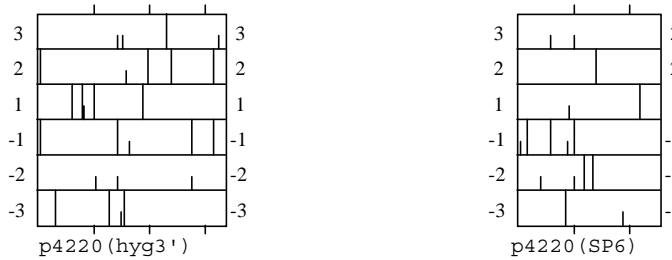
```

p4220(SP6)

```

CTCCATCTGGACCTTCAAG  TGTGTGCCTTCCGCGGGTCG  CATCCTGTGTGCCACCCTA  TGGGTACCCGGCTCCGGTAT  80
TCTGGATCATATGCAATCGT  CATGCGACGCTGTGGCCCTC  ACTTGCGAACGTCTCAATAT  AGACGTTCTGTCGCGGCTCTG  160
GATACAGTTGGGTTCGAGGA  CTTCGAAACATATCCACTCT  GGATCCACAGGTATCCTGAA  ATCTCCGAGATTTCTCGGAC  240
CAAGTTTGCCTCTG  254

```

Mögliche Leserahmen der sequenzierten Bereiche:**Ergebnis des Sequenzvergleichs mittels Blastx (Altschul et al, 1997) für beide Sequenzen:**

Keine signifikante Ähnlichkeit zu bekannten Genen.

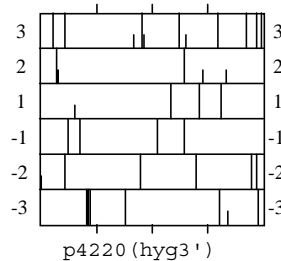
p4255(hyg3')

```

GCATTGCTCCGAGGGCAAAG  GAATAGAGTAGATGCCGATC  GTTCTAGTTCACCTGCTTGG  ATGGGCACTTCACCCGCTCC  80
AGTTCACTACTATCCCCCTCG  ATACTCTGTGTGCGATACGA  ATTGTGGGATTTGTATTGTA  CCTGTGTTCTGTTCTACTCTG  160
GTCCTGATGGGTTCCTCTC  ACTGAATGCAGCGGTGTTCG  GGCGCAATTACACTTGGCCC  CGCCCCGCTTGTGACCTCGG  240
AGGCGCCCTGACGGGCTAGT  ATGCCCGTGGCTTCCCCTTA  TCTGAGAAGATGGGAACGAG  GACGGGAGCTGCGAGTGTAA  320
CTAAGTTTTCGATGCCATCG  TGTCTTTGCGGGATACAACA  AGATCCTCTGACAGACCTAC  GACTCTTAGTCACTGTGA  398

```

p4255(SP6): Sequenz nicht auswertbar.

Mögliche Leserahmen des sequenzierten Bereichs:**Ergebnis des Sequenzvergleichs mittels Blastx (Altschul et al, 1997):**

Keine signifikante Ähnlichkeit zu bekannten Genen.

p4285(hyg3')

```

ACGCGAGCACTCGTCCGAGG  GCAAAGGAATAGAGTAGATG  CCGACCCGGATCCGGGAGCG  CCAGCGGCGGCACTGGCGCT  80
TGACCCGGCCACTGCCGACG  ACGACGAGGCAACTCCGGAA  ACGGATGAGCCGTTGGCTAC  ACCGCCTGTACCGCTGCAC  160
CGTTGGGACGGACATGATC  GAGTCGTCAACATCTGCGTG  TTCGGCGTCCGAGCGTGCAT  CGAGTCGGTGGTGTAAAGGAG  240
GAAGTGACAAAAGGGCGA  TTGCGCGGTGGCGATTGG  AAGGCAAGACGTTGGGATAG  ACCATGAAGAGCATGTCCGG  320
GAAGGTGCTGCCAAAAGG  CGCCGTCAATGGTACCGTGA  CGGCTACTCTTGGGCGAGTA  GATGTCCTCGCATCGTGGAC  400
AGAAGAGCTTGACGGCCTTT  TGGAAAGGATTGTCGCTGAG  A  441

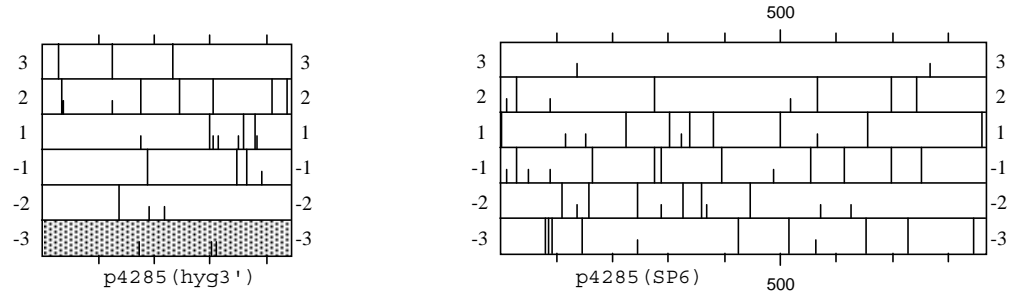
```

p4285(SP6)

```

TGAAGCTTGCATGCCTGCAG  GTCGACTCTAGAGGATCCAA  CGTGTTCGATTTGGAAACG  ATACACTTGGCCAACTCGGC  80
TCAGCGTCATGCTACCCGA  GATTGCACGTCAAGATGCGT  ACGATACTCGGTACGCATG  GGCGCCTCAGATGCTCCTCA  160
ACTCAAGCTGCTCCGCTGC  CAAAGAAGGTGCAAGTGGCC  GACGCGGACGGGTGGCAGGT  GTTGTAGTATCTCGGCGGGCT  240
TGAGTCATTCGCTGGTATG  GTCGAGAGCCAGATTAACGG  GTGGATCATAACAGAGCGTGC  TGAGCACGGGATCCAACACG  320
GATGGTCAGCTTGGCTTGAC  GACGAACGACCAGCAGGATC  AAGTGCCCATCCAGCCGTTG  ATCTCGAGAGCGTTCAGCCA  400
GATTCCTGTACCACTTCGAC  CTGTGTCAACCGCAAGCGT  GGCGATCAAGGCCAAAGCTT  GGTCGAGGTGGTGTGTGGCG  480
CCGATACATCGTACGCTTTG  ACGGCAGGTGGCGATCTATG  GGTCTGGGGCAACTCGGAGT  ACGGACAATCGTTCAGCGGC  560
GTACATGATCGCATCGTTGC  ACCACTTTTCGTCTCGAATC  CGTCCCTTCGCTTACCACC  AATCCCATATCGATTCGAT  640
CGACACCGTCCGCTAAACC  TCGCAAGTTGGTGGCAGGCG  GGTGCTTCGCGCGATCTAG  ACACCCCTTGGTTCGCGTGTGG  720
GTCGCGGCTACGCCTCGT  GGTAAACGTGTCAACGCCGA  CCGCCGATGGGCGTCTGAT  CGTTGGTTCGAGTTCGACCGG  800
ACTGTGTGGTGCAAGAATTG  TTCTGCGCCTCGAGTACCTT  GCGCTTTACCACACAACGTT  ACCAAG  866

```

Mögliche Leserahmen der sequenzierten Bereiche: (*ckb1* ist schattiert)

Ergebnis des Sequenzvergleichs mittels Blastx (Altschul et al, 1997) für p4285(hyg3'):

>[emb|CAB62429.1](#) (AL133361) casein kinase II beta chain [Schizosaccharomyces pombe]
Length = 231

Score = 87.8 bits (214), Expect = **6e-17**
Identities = 38/70 (54%), Positives = 49/70 (69%)
Frame = -3

Query: 440 LSDNPFQKAVKLFPCPCEDIYSPKSSRHGTIDGAFFGSTFPHMLFMVYPNVLPKSPPTAQ 261
LSD K+VKL+CPRCED+Y+PKS RH +IDGA+FG++FPHMLF VYP + KS
Sbjct: 128 LSDIAHTKSVKLYCPCREDVYTPKSORHASIDGAYFGTSPHMLFQVYPELAVPKSQERY 187

Query: 260 SPFLTSSLH 231
P + +H
Sbjct: 188 IPRIFGFKVH 197

Ergebnis des Sequenzvergleichs mittels Blastx (Altschul et al, 1997) für p4285(SP6):

>[gb|AAD43920.1|AF130441.1](#) (AF130441) UVB-resistance protein UVR8 [Arabidopsis thaliana]
Length = 440

Score = 46.5 bits (108), Expect = **4e-04**
Identities = 38/125 (30%), Positives = 52/125 (41%), Gaps = 1/125 (0%)
Frame = +3

Query: 216 QVLSISAGLDHSLVLVESQINGWIIQSVLSTGSNTDQGLGLTNDQQDQVPIQLISRAF 395
+VL ISAG HS+ L+ I V S G DGQLG D +D
Sbjct: 16 KVLIIISAGASHVALLSGDI-----VCSWGRGEDGQLG--HGDAED----- 54

Query: 396 SQIPVPLRPVSTAKRGDQGSLSVEVCGADTSYALTAGG-DLWVWGNSEYQGSFSGVHDR 572
RP T G +V V CGAD + A + G +++ WG ++G+ G
Sbjct: 55 -----RPSPTQLSALDGHQIVSVTCGADHTVAYSQSGMEVYSWGWGDFGRLGHGNSSD 107

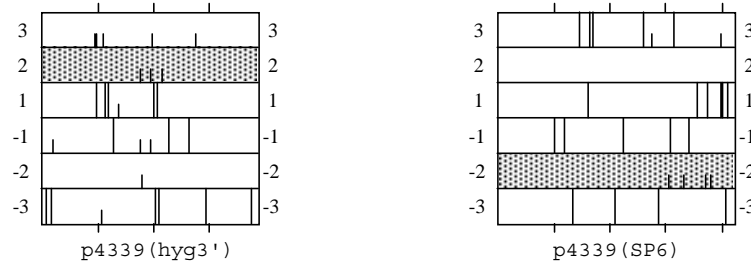
Query: 573 IVAPL 587
+ PL
Sbjct: 108 LFTPL 112

p4339(hyg3')

GGATCCCTTCACGCTGGTCA TTGCCCTGGACAAGCAAGAG CGTACAGGGAAGAGCGGCTC GAAAGACGTTCTTGCCGAGG 80
GAAGCTTGATCTGGATGAT GGCCAGACATATGACTTTGA GGAGGGTCAATTTGTATGGC GTCGCTTCGAGTGGACTCGA 160
AACAGTGCACAGGCATGCA TTCGTTGCGAAGCATGGATG AGGCTAGCGTCAAGATGGCC GATACTCACTGGGTGCTGGG 240
AGACAGCAAACAGTTGCTTC CTTACCAAGAGAAGAATGCT TTCGCCGAATCGATCAAAAG CGTTCGCGTGTGCGAAGCTCG 320
TCGTACTGGGCTTGATCGC GAACCAAAAGCTGTTTCAAT CGACGGCAATCGCGTCAGTG GCCC 384

p4339(SP6)

GGTCGACTCGATCCGAACGG CCAACTCGGCAGCGCTCT GGC GCGCTCTCGCAACGGAA GGATCGATCCACCACGGTGG 80
AGCAACGGCAGCTGCTCGGT CAACGGCGCCGGCACCCTCA CACTGCGGCCGCGTTCAGAG CCTTGGTAGATTTGGTGCCT 160
GAAATAGTTGTAGTACGGTC GGTCTTCGGCCAAATACACT TGGACCGAGTCAACGCTCTT GTCTACCGCAGGACGCCA 240
ACAAGCCCAGTCGCCGATA TAATATGCGTGTGATGTC GAAACCTCAGGATCGTTGG GGAACATCAAGAATTGAGGT 320
CGCAACACAGGCATACCTGT TACTGCGTTGCTTTGAAGG CCGTGTACCACATAGGAAGC ATCTGGTACCGCAGCTTGAT 400
GAGTCCCTAACGGCACTTC 420

Mögliche Leserahmen der sequenzierten Bereiche: (*gas1* ist schattiert)

Ergebnis des Sequenzvergleichs mittels Blastx (Altschul et al, 1997) für p4339(hyg3'):

>[emb|CAB65603.1](#) (AL136078) putative family-31 glucosidase [Schizosaccharomyces pombe]
Length = 923

Score = 46.5 bits (108), Expect = 1e-04
Identities = 34/108 (31%), Positives = 55/108 (50%), Gaps = 1/108 (0%)
Frame = +2

Query: 2 DPFTLVIALDKQERTGKSGSKDVLAEGLSLYLDGQTYDFEEGQFVWRRFEWTRNSATGMH 181
DPFTL IA+ K GK+ S G LYLDG T++++G+++ R F + N M
Sbjct: 808 DPFTLTIAVSK---IGKNAS-----GFLYLDGVTFNKKG EYLI RHFSY-ENGILTMK 857

Query: 182 SLRSMDEASVKMADTHLVLGDSKQLLPYQEKNAFAESI-KSVRVSKLV 322
S S K + S++ L + N + E KS+++ K++
Sbjct: 858 DSHSNPPVSPKYS-----SSQKHLKVERINIYGEQTRKSIKIRKII 898

Ergebnis des Sequenzvergleichs mittels Blastx (Altschul et al, 1997) für p4339(SP6):

>[emb|CAB65603.1](#) (AL136078) putative family-31 glucosidase [Schizosaccharomyces pombe]
Length = 923

Score = 127 bits (315), Expect = 8e-29
Identities = 65/136 (47%), Positives = 89/136 (64%)
Frame = -2

Query: 418 SAVRDLIKLRYQMLPMWYAFKDNVAVTGMPVLRPQFLMFPNDPEGFDIDTQYYIGDSGLL 239
S VR+L+++RY++LP WYTAF ++ G P+L PQFLM P D EGF ID Q+Y+GDSGLL
Sbjct: 677 SLVRELLRIRYRLPTWYAFYNSHTHGFPILYPQFLMHPEDDEEGFAIDDDQFVVGDSGLL 736

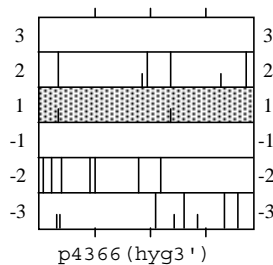
Query: 238 VRPAVDKDVDSVQVYLAEDRPYYNYFTHQIYQGSERGRSVTVPAPLTEQLPLLHRGGSIL 59
V+P +D + +YLA+D Y++ H Y G +G V VPAPL ++P+L RGG+IL
Sbjct: 737 VKPVTHPSIDKITIYLADDEVYFDLHDHTEYAG--KGHQV-VPAPL-GRVPVLLRGGNIL 792

Query: 58 PLXXXXXXXXXELGRSD 11
EL R+D
Sbjct: 793 ITRERIRRAELTRND 808

p4366(hyg3')

```
GGATCCGTC AAGAAGTCCGT CTTCAACGGTGCCATGACCA TCAAGAAGAACAAGTTGCC C TCCTCTCCTCGGTCGTCGA 80
TTCCGGCCGTCTTCAAGCAGG TCAGAGAGCAAACCGGCGGA CGTCTGCGTATCGCACTTC GGGCGGTGCCGCTCTGTCCA 160
AGGAAACCCAGGAGTTCCTC AACAAATGCCCTTGTGACGCT CTTGCAGGGCTACGGCCTCA CCGAATCGTCCGGTATGACC 240
GCCATCCTCCACCCGACTT CTACTCGTACGGCCCTCTG GTGGCATGTACCTGCGATC GAGGCCAACTTCGCGACGT 320
TCGGATGCCGGTACTTTC CCACCAACAATCTCCTCAG GCGGAGGTGCTGATTCCGCG TC 382
```

p4366(SP6) ergab keine auswertbare Sequenz.

Mögliche Leserahmen des Sequenzierten Bereichs:


Ergebnis des Sequenzvergleichs mittels Blastx (Altschul et al, 1997) für p4366(hyg3'):

>[emb|CAB83169.1](#) (AL162692) fatty acid coa ligase [Schizosaccharomyces pombe]
Length = 689

Score = 109 bits (270), Expect = **1e-23**
Identities = 57/130 (43%), Positives = 91/130 (69%), Gaps = 6/130 (4%)
Frame = +1

Query: 10 KKSVMFNAMTIKK---NKLPLLSSVVDSAVFKQVREQTGGRLRIALSGGAALSKETQEF 177
++ VF+G++++K+ LP S+ +D+ VF +V+ TGGRLR +SGGAAL+ TQ F

Sbjct: 369 RQKVFSGSLSLKQYLIERNLPG-SAALDAIVFNKVKAAATGGRLRYCISGGAALAASTQAF 427

Query: 178 LNNALVTLQGYGLTESCGMTAILHPD-FYSYGPSGGI-VPAIEAKLRDVPDAGYFSTNN 351
L++ + +L GYGLTE+C + +L P+ ++ Y + G +P+IE KL D+PD GY++ ++

Sbjct: 428 LSSICPVLPGYGLTETCAGSFVLSPEQWHLANTYVGFPIPSIEFKLVDIPDLGYTDS 487

Query: 352 PPQGEVLIRG 381
PP+GEV IRG

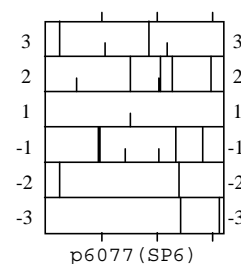
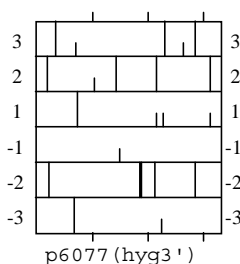
Sbjct: 488 PPRGEVWIRG 497

p6077(hyg3')

GGATCCCGAATCGGACCGAT AGTCAGGTCTCGACTGAAG CGGACACTGTGTCTCTCGTCG CGCTGCGCTCAATGACGCCA 80
AGCCTTTTTTGGTGGACGAC AAGATGCCTCCGATTGGCGT TTGTGGGTGTGGTGTCTGTG GGTGAGGCATCTGTGTGGTC 160
TCTCGATTCCCTCCTTCCGC TTGTTTATCAGGTGCAGATA TCTCGCGGTTACTATGACCC AGAACATGGTTGAGCCTCTG 240
CCTCGCTGCAACAATCGAGG TGGATGGAAGTCGGGCCGCG ACACTAACCGTGTGGTGTCT CTGCCGACGATGAGCGTTCT 320
TGCGCGGTG 329

p6077(SP6)

GGATCTGGGACGAAACGCA GAGTGTTAACGCCAACGACG GCGACGAGTCTCGAGATGCG GCTGTATCGCGTTTGTATTG 80
CCGGCAAAGCAGATCACTAT TCCCGAGATGTTGGCGACTG CTTCTTTGCCAGTGCACGTG CCATCTGCAAATGAAGAAAG 160
AGCAACAAGCGTCGGAATCC AGCGTTGAGAGCGTGGCGCA ACATGTGACAGGACCGCAAT GGCCGGTAGATTCCACCGTCC 240
AGTCAACCGCTTCCACCTGC GTCTCCGGTTGGCTTGCCT CACCGAACAATTCGGTAGCA ACTTCTTTTCTCTCAA 316

Mögliche Leserahmen der sequenzierten Bereiche:**Ergebnis des Sequenzvergleichs mittels Blastx (Altschul et al, 1997) für beide Sequenzen:**

Keine signifikante Ähnlichkeit zu bekannten Genen.

II. Vollständige Sequenz des *rp138*-Locus:

Die Sequenzierung des *rp138* Locus erfolgte mit Hilfe des des T7 DNA Sequencing Kit (Pharmacia) "per Hand" (siehe Methodenteil). Die Sequenz ist über die gesamte Länge doppelsträngig ermittelt worden. Der *rp138* Leserahmen ist fett gedruckt (entgegengesetzte Leserichtung). Das Startcodon ist 735bp vom restlichen Leserahmen entfernt.

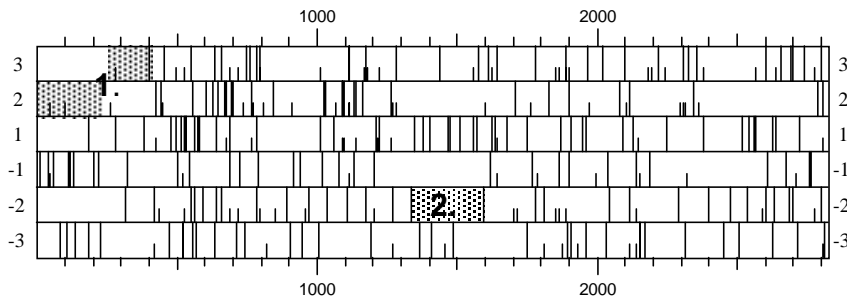
CTTCCTCGCTCACGAGTACA ACAAGCACGGTACCTGCTAC ACCACCATGCGTCTCAGTG CCAGCCACAACCTGCCCTGGA 80
TCAGCCAAGCCGACTTCGCG ATGCTCAACTACTTCCGTCA GATCGCTCACAAGTTCAAG AACGTCCCACGTACAACCTT 160
CTCCAGGCGGCTGGTATCGT GCCTAGCGCCACCCAGAAGT ACACCTTGGCACAGGTTTCAG CAGACTCTCAAGAACGCCCA 240
CGGCAACTCCTTTTCGTCGGA TGCAACAAGAAGGGCGAGAT GAACAGATTTCTGGTACTTTT GGAACGTCCGTGGTCAGGTC 320
AAGTTGGTCTTTTCGAGCC TGTCGAGTCGACCACGAAGT CGACTTGCCTCCCGCCAGCTTG AGGTACCTCCCAAGCCTTG 400
ATTTGGGCGGCCCTTTCTTC ATGTTGAAATCGACACCATT CGTGAATGGTACAAGTGAGG AACTTGTGCACTTCTAAGCA 480
AGCCTCGCACCGTGATGGTC AAGTGCAGACTCCTGAGGTC ATTAAGCATGATAAGTCCAG AACTTACTTAACGTAAGTTA 560
GGTCAAACCTTAGGGATAGA CGACACAGGTCACCTCTGTC GTGACAATCCTCCCGATCGG ATTCGTGATTCGTGATTAG 640
TTATCCTGAAATTTGGTCTT AAGTTGTTGAATCGGATGAC CCAGTTCATGATGAACGTAA CTGGCCCGGCTTATACATGG 720
CTACCAAGCCAACGAGATGC GGCCTATCGTGAGCAGCTCC TTGAAATGAATGGTCCGGTT TGAACTAACCTACCATGTAA 800
CAGCCAAGATGCCGAGCCA TTCGAGTTTCGTTGTCCGAA GTCTTAACATCCGCGCTCGA GCCCTGTGCTCTCTGTCTGA 880
CGAGGTCGTTTGTATACTC GTGTCCTATGCCTTTTCAA CTTCCGAAATCCGACTTCTCAG ACACACTCTACCGCGCATCC 960
CCGACGCACTCAACGTGGA CCGCCAGGTTTGGCAACTG TGCTTACGAATGATCAAA TTTGAACACCTTGATCAAGGG 1040
TGCAGGGTGTGCGAGGTTGT GACGCAATGGAGAATATAC AACGGGTTGATGATGACCCC CTTGGTTACCATGATGAGT 1120
GGGCTTTTGGGTTAAGGATG AAAAAACGCGAACAGGTGCT GATCCGATGGGCTAGGCTGC GATGTGTGCCAATCAAGAG 1200
TCATTGTCTGAATGCAAGA CTGATGCGTATTCGAGGCAA AGGCCAGGCGTTGGTGGAGA ATGAAGGATGTCATATTGG 1280
TGATGCTGGTTGTTGGTACA AGGTTGTGTCGAGGATCGGC AGTCGCAAGGTATTTACTTGG CGGCCCTTGACGGGCTTGCC 1360
GATCTCAACAACGTTGAGAC CAGGGGGAAGCGACTGCTTG AGCTTCTCAGCCTTCTGCTT GTCGTCGACCGAGAGGGTGT 1440
AGAGGAAGCGCGAGCATCGG ATCTTGAACCTGGTGACCTG CTTGCCGTGACGCGGGTGG TGCTCTTGACGCGGGCCGCC 1520

VIII

Anhang

```
GAAGCGTCTTTCTGCGAGC AATCTCGAGGAATTTCTTGA TGTCGGTAATCTGCTGAGGC TGTGGGAAGTTGGTCAATG 1600
CGAGAGCAACAGATAGGTCA GAATGAGCTGTTTCGTAAT GCATAACAGTGCAGCTTGGC AAAGCAACGCCAAGTAGCGG 1680
TGTCGAGAGAAGCAAAGGGG TGCATTTGTGAGGACATTCG CGAGAGTGCGGGAACCGATCC AATCCAAGCTAGCTTCCAGA 1760
GGATGCGTCACCTCCGCGAGT CTAACATTTTCGCTCGCAGG CGGGTACGCATTTATCCCTGC TCTGTTTGTGATCCGAGTGT 1840
TGGCGATACCATGTCGAAGC GATTCATGAGAAACACCGCAT CCCACATGTGATCACCTAA TATGAAACTATCGTGCCAC 1920
TCGTCGTCATCCGAGATAC CGGCCTTTGACTTGCCAACT AGGATTGTGACGATGGCGAA CACCTTTGCTTCCATATTGC 2000
GTCCAGAGAGCCAAACTGC GTAGCTTCTCTTATCTACCA AGTATCAACCGAGTCCGAGGT TGCTTCGACCTGTGCTGTAG 2080
CGTTCTGCCTTTGACACGGT AATGGACGGACGGTGCATAAA TCGCTGAAGGTGTTTCGTCAT ACATGCGTTCTCATCAAAGT 2160
CGGGCTCTCAAGATATCGA ATGTTTACGAAAATGTCCTC TCCTCTCTGCTTCTCTTTT GACTGCGTGGACGTCCGTGA 2240
ATGCTGAGCCGGAGTATCGA ATACGGAATCCGGTGTGCTG TACTGTATTACGTATGCTGT TGTCGATGCTGATGCTTACC 2320
ATCTTGACGGATCTCTTTGT GTGGTGAGGTGTTCTGTAG AGATGGAAGGAGAGATTGAT GTCGACGAGCTGTACTCACT 2400
GGATCCGCGCAAACCAGCTG CCGTCCCAGACCTGTCTCTC GCGGTTTCTCTGTGAGCTT TCCTTGCCAACAATTACTACT 2480
CTGCTGCTGCTGCTGCTGCT GCTGTCAACTCTTCTGAAGC AGTGCCCGCAGTTTCAACTG AACGCTGCCTCGGAATAGA 2560
GCTTGTGATGCACTCTTTT CCAGTCTCGCCATTTTCAAT TAACGGTTCAAGCCTCGGCC GAATTTAGTTTCTCACGTTA 2640
TGACAAGGTTTTTCTGATTT TGCAAGCACTTCACCAGACC CGTTCAATTTTGAAGCTTCT AATTCGGCACATTCGAGTTA 2720
GAGGCAGCAGAAGGCACCTG AGACAGAGAGTGTGTCAGTC TTCTCAACAGAGTGTGCATG GAGCAAAGTACAGGAGAGC 2800
CTAACATGATTCACGATTCC GG 2822
```

Mögliche Leserahmen am *rp138* locus:



Ergebnis des Sequenzvergleichs mittels Blastx (Altschul et al, 1997):

1.

```
>sp|P19791|RNM_ASPSA RIBONUCLEASE M (RNASE M)
pir|JX0127 ribonuclease M (EC 3.1.27.-) - Aspergillus phoenicis
Length = 238
```

```
Score = 55.8 bits (132), Expect(2) = 5e-11
Identities = 28/80 (35%), Positives = 41/80 (51%)
Frame = +2
```

```
Query: 2 FLAHEYNKHGTCYTTMRPQCQPQLPWISQADFAMLNFRQIAHKFKERPTYNFLQAAGIV 181
F HE+NKHGTC T+ P C + +Q + ++F+Q+ FK +Y L AGI
Sbjct: 107 FWEHEWKNKHGTCINTIDPSCYTD--YYAQEEVG--DFEQVVDLFKTLDSYALSDAGIT 162
```

```
Query: 182 PSATQNYTLAQVQOTLKNAH 241
PS Y L+ ++ L H
Sbjct: 163 PSEDATYKLSDIEDALAAIH 182
```

```
Score = 35.6 bits (80), Expect(2) = 5e-11
Identities = 17/50 (34%), Positives = 29/50 (58%), Gaps = 1/50 (2%)
Frame = +3
```

```
Query: 249 PFVGCNKKGEMNEFWYFNVNRGQVNFGLFEPVESTTKSTCPAS-LRYLPK 395
P+VGC + G +++ +Y++NV+G G + E S C S ++Y PK
Sbjct: 187 PYVGC-EDGALSQLYYYFNVKGSIAIGGTYVASERLEDSNCKGSGIKYPPK 235
```

2.

```
>pir|T40546 60s ribosomal protein l38 - fission yeast (Schizosaccharomyces pombe)
emb|CAB54810.1| (AL110506) 60s ribosomal protein l38 [Schizosaccharomyces pombe]
Length = 74
```

```
Score = 98.3 bits (241), Expect = 4e-19
Identities = 48/75 (64%), Positives = 60/75 (80%)
Frame = -2
```

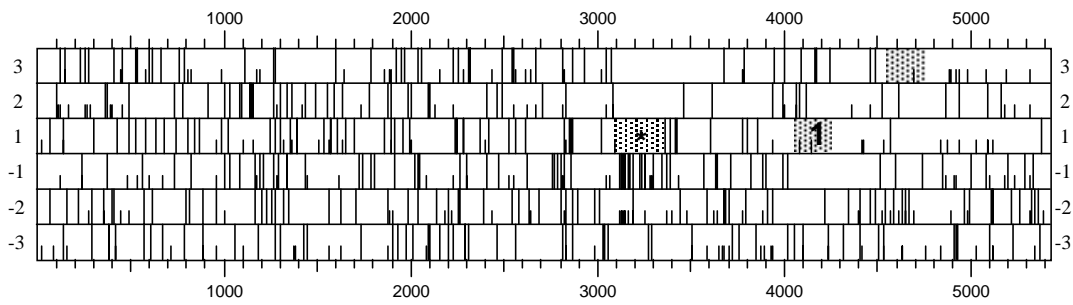
```
Query: 1579 PQQITDIKKFLEIARRKDASAARVKSTTRADGKQVTKFKIRCSRFLYTLVSVDDKQKAEKL 1400
P+QI+DIK+FLEIARRKDA++AR+K T D KFK+RCS++LYTL V D +KAEKL
Sbjct: 2 PRQISDIKQFLEIARRKDATSARIKNTNKD---VKFKLRCSKYLYTLVVADAKKAEKL 57
```

```
Query: 1399 KQSLPPLNVVEIGK 1355
+QSLPP L V E+GK
Sbjct: 58 RQSLPPDLTVTEVGK 72
```

III. Vollständige Sequenz des *pat2563*-Locus:

Die Sequenzierung des *pat2563* Locus erfolgte mit Hilfe des des T7 DNA Sequencing Kit (Pharmacia) "per Hand" (siehe Methodenteil). Die Sequenz ist nur von bp 2921-3804 doppelsträngig ermittelt worden. Der *pat2563* Leserahmen ist fett gedruckt.

| | | | | |
|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|------|
| TCGTCGTCATCCGAGATAC | CGGCCTTTGACTTGCCAACT | AGGATTGTGACGATGGCGAA | CACCTTTGCTTCCATATTGC | 80 |
| GATATCCCGTGGAAGCTCG | TGCCATGCAGGCACAAGACT | GTTTGTCTGTGCCAGGTCG | TGGTGATTCAGAAGACAGCC | |
| TCGACGCATCGAAAGAACCA | GAGTGAATAATCGATGCACAT | GGTAGCCTGCTTGTCTGCTA | AATGGGATGTGAGTCGAGCA | |
| TCAATGCGCCTCCGACAGACA | ACGAGACAGACAGTTGGACA | ATCGACAGACGTTCTGTCCCG | GTCTCACGAAAGGTGAGCAT | |
| TCACGTCTCCAAGCGTATGA | GGACTTGTATGCATTTGACA | ATGGGTGCTTTTTCAGTTAA | AGATACTTCGAGACTGCTTG | 400 |
| GCCTCGTGCAGAAGGTGTCC | GAAAAGTGGAGCCATACTCT | ATAACGAGCCTACAAGTAAG | TCAAGCTCAAAATGGATTCA | |
| CAGATGCTAGCGTTGCCATT | CACCGCCGCTGAGTCTTCTG | TCCATGTGCGTCAATGAGC | GCTGCAAGAAAGCGTGGTGC | |
| CAGCATACATAGTAAGAGT | GTGCTGTGGTGTGCCGTGT | ATTGATTTGAGCATAACCAA | AAGCGCCGACAGAGTCGACCA | |
| GCAATTATACCTCAATCACG | AATGAAAAGCTGTGCCATCGT | AAGCCTCACCGACGCGCTAG | CAAAATTGCGACCGACTGAG | |
| ATCGCCGATTGCGTCCCAAC | TTTGATCGACGTCATTGGCG | ATAGACTTCGCGGCGGCGAG | ACAGACTTGTGCACATTGCG | 800 |
| GGGCTGGGCTTGTATTGAC | GTAGCAATTCGTGCGTTGTG | ACGAGCAGTCTCTGTTGAAT | TCttttTGATTACGACTTCAG | |
| GAAACAATGATCTATCCCGT | CGTTATGGACCGGAACAAGA | TAACTTGTGCCAAATTGGGC | CGAGTAGCAACGAGCGCGCA | |
| CCCCTCACATCAGGGAGTCG | TCTCTGCGGCTCTTGACCAG | AACAGAACTGCCGCGGCGGC | TTTCGCCACGTTTCGCATCTC | |
| ATGCAACGTTCCGGAATTT | GCGATGAAATGGCCGAGT | GATCATTTGACGACACCGGT | CAGTAACTCGTAAAGTTT | |
| GGACCGACTTGGCCGGAGGA | TTACAGATTTCGACTGGCCAA | GCAAGGTTAAACTTGACTTC | CATGCGCCAGCCGATTGATT | 1200 |
| GGATCTTGGCCGAGCTGAAC | CTGAGAAATAGACGAATGAC | GACTATATCATCTCGAAT | GTCACCACACCTCACGATGT | |
| CGCTCAGATttTCACCACA | CTCCGAGGGCGTCAGGAGTC | CAGCGTAGTCTGCAATATCT | ATTGACTTAACTTAAAGTTAG | |
| CTTCCATGTCCGATCACTTT | AGTTGAGTATCTCGTCTGTT | ATGCCAAAAAAGGCCCTACT | AGTCACTGGGACGGGTAGA | |
| TGAAGCTGGACACACATCGGC | ATACAGTAAGGCTGAACGAA | TCTGTTGGAAACAGACGATG | GATACGAAACGCTACCTAACA | |
| CTTGTTCATACCTTGTGGTT | TGTCTGCGGATCGAAAGCGA | AAATTTGTGATCGACCAGCAG | AAAATGGAAAAGGGCGGGCG | 1600 |
| TACGCGGACGAGGTGACGAG | GCGACGAGCAGCTGAAGGGT | TTTATGTAGTGTGAGCGTGGAG | AGGACGCGTGTACTCGTACT | |
| GTTGGTGAGAGGCCCAATTT | CTGCGAATCATGAATCGCGA | ATGCTGTTCTGTGAGACGCCG | GTACTGGGCGTCTCCGTTGT | |
| TCGGTTCTGTCTGTGCTTG | AATCACAGCGCAGTGGAAAC | CAGAGCTATATGTTTCAGGTC | TCAGACAAAAACAGACGAGCC | |
| ACGAGAAAATCCGGGTCTGA | ATCGTGAATCACGAATCGAT | TCACAAATTTTCGGCTTCCAA | ATCCCAAGAACAGAAAAACC | |
| GTTTTCAAGTACGCGAATGA | CTCCCACCTTGTCTCATAGC | AACATGCACGATGAGATGAA | ACACATATTAGCTGTTATAC | 2000 |
| AGTAACCGATCTCACTTGTG | GAACAAGTGTAGATCCCTGAG | TCCGTTGAGAGAAGTACTCAG | AGAGTGATTAAGCTTCGAAA | |
| GATGAGTCTTTCACGCTTGGT | GGTCAACTGGCGCTGTTAGC | TTACTATACGCTTCTGAGCG | AGTCGCAAGTGGTTCTGTG | |
| TGCATACCATAGGTGGCTAT | CACTTGAACACCAAAAGTGT | CTGGTGTGGGAATGTCAGAA | AGTCGGCGTCTCGATATGT | |
| TACGATCTCGAGCTTGTCTG | AGGAGCATCTGCGCCTTGTG | AGCTCAGTGCCCTGCCAGCCA | TTGGCGATTTCATGAATCGTG | |
| ATTGTAGTAACCTAGAAGTA | CTTTACTCACGGTACGGTAA | TGAACAGATTAATATCATCT | TTTACGAGTCTATAATAATA | 2400 |
| AAAAGAAAAAACCACAAA | AAAAAACCAAAAAACAACAAA | AGACGGGTAAAAGAGAAAACC | GAAAACCTTTCAGAAAATGTG | |
| CCTTTAAGCACGACGGTGTG | AATTGTTTTTCGATGTGGGT | CTCGCCTGTGCTTCTGTCCG | CTGAATTACTTATTGCAGAT | |
| CCGAGTGAGTAGACGTTGCT | TCGACGCTTTCGCTTGGTTC | TGACTGCATCGTCTGCTGT | GTCTAGTGTACTGCATGACT | |
| AAAGATGCCACCAGCTCCAA | TTACGACGACAGATCGTTTCG | CTGTGGCTTGCAATGAAGCT | CAAATGCACGCGACTCTACC | |
| CGCAACATGCCGTACGCAATG | CTTGGGCAAGATGAGCTTG | CCTTGGGTGTTTACCGCGGGT | TGCTTTTTGAGGCTTCGCTGG | 2800 |
| GTTTCGTCGGTTTTTTTTCTG | GGATTGTCTGTCTCTCACTC | TGCTGGATTTCAGGATACAG | GGATTTCAGGATACAGGGATT | |
| CAGGATTCAGGATTCATGAT | TCATGATTCATGATTCACAA | TTCTTGCTTGTAACTACAGT | AGCTCTAACTTAGGTTCGACA | |
| CGCGCGGCTTTCAAGTCTGC | AGACCGGTGTATTGGATCCC | GAATTCGCACAATGAACCA | CCTCTCGTGTCTTTTTCTG | |
| GGGACAGCTGTTGCAACAG | TCATCGACAGCTGGCGCTGG | CGCCTGTTTCGTTCACTTG | ATGCCCTTTCAGAAAATGTG | |
| ATCATGAATCCTCTGTGCTT | CATTTCTGCTCGCTTCTGA | TGGCTTGATGCCCGCGCCCT | TCTGTTCCACTCTTCTCTCA | 3200 |
| TCCTCATCCTCATCCTCATC | CTCATCCTCATCCCCTCCC | CATCCCTATCCCTATCCCTG | TCTTGTTCATCTCTTATTTT | |
| TTTGTTCGTCGATTTCTTT | GTTTACCCTCTTGTTCACGC | CTCGCTCTTTCACCATCAAC | TGCTTTGCTCCTTCCCTACT | |
| CCCATCTCGACCATCAATCA | GCCTGCCAATACCTTGCCTT | TTCCCAAGATCGACGTCGCG | TATTTCTGTGCAACCTCTGA | |
| TCGGTCTCATCTTCTCTCTT | TCTCTGACGCTTACGCACGA | CATACACGCAACTGTGACGC | TGACGACAAGAACATATCCC | |
| CCTTACAAACACCGCAGAGT | TGACAACCTCCTTTCGGCCCA | TCTGCGTTTTGCCAATCCGAA | TCGTTTACATTTCTGCTTCGCA | 3600 |
| TATCCGTCGACGCTCTGAGT | TGGCTGTCCCCTGCTCCGTA | CTGCTTATTTCTGCTTTTTG | TTCTCCTCATCGCAATCTCG | |
| TAGCCTGTCTCTCTCTGAG | AGCATTTGTGTTCAACGTCAC | CATACGTTTCGATCGACCCAC | CAGCATACTCGCAATTAAGCT | |
| CATCGACGCTACGCAACGTC | GTCGAATCATCTCAAAAATT | CCTCAAAACACCGTTTTGCTT | CTTTTCGCGGTACCACCAAG | |
| ATCAGCTCGAACGGGCATGA | AACGGTAGCAGTCCCTTCAA | GCTTTGACACCACCGTGTCT | CAACCCTCGCGGTTCCCTGTT | |
| GCCCGTCAAAAGGCTTGACA | GTCTTTGGCAGCGTTCCTCGA | TCCCATCAGCCATTCGGTCA | GCCACTCGAATCACGATTTG | 4000 |
| AGAGTGACCCAGTTCGAAAT | GCCGCTCTGAAAGTTCGCTCT | GGCAACGCGTCGACGCGCGA | GGGCACAAGCGTGTAAAGG | |
| CCAGGTGTTTCGAAGAGGCTT | CAGACTCCTGGCGGCAGTAC | CGAGAACAGCGTGGCTTACC | GATATGTAGCCGTCCAGCAG | |
| ATACTACTTTATGTACGCCA | CATCGAGTACCAATTGACTG | TGCGAGAACAGCCGAAACAG | TCGAGGATGTGCGGTGTTGG | |
| ACACTAGCGGCTCGTGTGTC | CGATCGATCCAGCTCCGACT | GTGCAGCTTCGTGTCTCAC | CCACGACCGTCCCATCCGTC | |
| ACTTGAGTCTCCGCTCGAA | GCTTCCGTTCGCGCCACCCGT | CGAGAGAAGGCCCGGCCAGG | GTGCCCGCCGACCTCAGACA | 4400 |
| AAATCCATCTATTTCGGATCC | GCCCGTACCACCGCCCTTG | GCGATGGCTGGGAGGACAAA | GCCTGGTACCTCGAAAAATCC | |
| GTCGTTTGGCCGAACAAGGTC | TGCTCTGCAACGACAGACACC | GACGAGGAGCTGCACCTGCT | CAATGACGGAAGACAAAGT | |
| ACGAGAGCGACGCTTCCGAC | TCTTGCTCTACCACTCAAG | GACATTTGATGGCTCACATCA | AGGTTTCTTTGTCTTTCCGG | |
| ATGTCGGGCTTCCCATGTC | GGTCTTACCCTCCGCTCAAA | CTGTCTCTTTGAAACCATCG | GCCACTCGGTGCATCAATTG | |
| CTACGATCGAACGCTTCCA | CTTCCACGCTTATACAGCCA | AGCGCTTTCAGGCATGGAA | GAGTCGACGCGTCTCTCAA | 4800 |
| AGGAGGAAGTATTGCGGCTG | TCAAGGTACGCGTTCGCAAG | CATCCTCGCTCGCAGCAAG | AGGCTCCAAGAGGACAAAGG | |
| GCTCGAGAAGACAGGGTGGA | GAGACTCCCCTGCGCGACA | TGTCAGCCCCAAACGTGCCA | GAGCATCTGATGTTTTGCCA | |
| CCGCACACAGATCAGCAGC | GCAGCAATCGCATCAATCAA | GATGCTGCTTCAATGGAT | GATCGCTTCGAACGCGCCGA | |
| ATCGGTTTACCTCCGAGACG | TGGCTCTGCGTACTACGAC | GTCAAAGGCGCTCCTCCAAG | CCGACATGCTCCGTGGGAAG | |
| CACCGCCACTGTCTAAAACG | CGCGAATCGCGCTTGGGA | TCCTATGTATGATGTCCAT | CAGCCCTCTACTCTCATCAT | 5200 |
| | GGATCGTCTCTCCCTCCG | GTGACTTTGCGCAGCGACGC | ACATGGATGGCGACTACCCT | |
| | ATCCTGTTTCGATGATG | CCGCTCGAGCAGGTCTTCA | GAAATTTCCGAACACGTCCG | |
| | CCGTGCGATCAGCTTTGGT | GGTCCACTCACCGTCTCTC | AGCAGCATTCGCGCCACTAC | |
| | | GGTTCGAGGATATC | | 5414 |

Mögliche Leserahmen am *pat2563* locus:

Der *pat2563* Leserahmen ist schattiert und mit einem * markiert.

Ergebnis des Sequenzvergleichs mittels Blastx (Altschul et al, 1997):

1.

```
>gb|AAC26841.1| (U95045) velvet A [Aspergillus nidulans]
gb|AAD42946.1|AF109316.1 (AF109316) VeA protein [Aspergillus nidulans]
Length = 573
```

```
Score = 57.4 bits (136), Expect = 2e-06
Identities = 33/90 (36%), Positives = 44/90 (48%), Gaps = 24/90 (26%)
Frame = +3
```

```
Query: 4542 GFFVFPDLSIRVEGRYRLKLCLEFETIGHSVHHCKS-----I 4649
          G+F+FPDLS+R EG YR LFE I + +
Sbjct: 135 GYFIFPDLSVRNEGSYRFSFHLFEQIKDPKDATEGTQPMPSVVPGKLSPPQEFLEFRLEV 194
```

```
Query: 4650 YSDPFHVYTAKRFPGMEESTRLSKSF AEQG 4739
          S+PF VY+AK+FPG+ ST +S+ AEQG
Sbjct: 195 ISNPFIVYSAKKFPGLTTSTPI SRMIAEQG 224
```

```
Score = 51.2 bits (120), Expect = 1e-04
Identities = 22/55 (40%), Positives = 36/55 (65%), Gaps = 2/55 (3%)
Frame = +1
```

```
Query: 4069 AVQQMTSCRDHIEYQLTVREQPKQSRMCGVGEKA--DRRPIDPAPIVQLRVVTHD 4227
          +V ++T I Y+L + +QPK++R CG G K+ DRRP+DP P+++L + D
Sbjct: 19 SVSRITREGKKITYKLNIMQQPKRARACGQGSKSHDRRPVDP PPPVIELNIFESD 73
```

Das putative *U.maydis* Gen mit Ähnlichkeit zu *veA* aus *Aspergillus nidulans* wurde *uvh1* bezeichnet (M.Klingenhäger, C.Basse, R.Kahmann, pers. Mitteilung).

Danksagung

Ich möchte mich vor allem bei Frau Kahmann bedanken. Sie hat mich in besonderer Weise beim Überwinden einiger bürokratischer Hürden unterstützt, und sich dafür eingesetzt, daß ich diese Arbeit in ihrer Gruppe überhaupt beginnen konnte. In Zeiten privater Schwierigkeiten durfte ich ihre Anteilnahme und ihr Verständnis spüren. Ihre Begeisterung für die Wissenschaft hat mich beeindruckt und angesteckt. In meinem Projekt hatte ich großen Spielraum und viele Freiheiten, aus denen ich sehr viel gelernt habe. Nicht zuletzt danke ich Frau Kahmann auch für die große Geduld, die sie während der Phase des Zusammenschreibens zeigte. Diese Geduld wurde stärker strapaziert, als mir lieb war, und ich danke ihr daher um so mehr für die fortwährende Unterstützung und die hilfreichen Korrekturen des Manuskripts.

Un très grand merci aussi à Marc-Henri Lebrun pour son soutien de diverses façons; le matériel électronique et scientifique mis à ma disposition, son soutien moral, sa bonne humeur et les rappels réguliers ("La thèse! La thèse!"). J'ai suivi son bon exemple de rester à la maison pour rédiger plus efficacement. Encore merci.

I would like to thank Karen Snetselaar not only for her help with the microscopy and for taking these excellent GFP pictures, but also for being a friend and sharing a "down to earth" view of science with me.

Karl Heinz und Johannes, den "Pajés" des a-Labors, habe ich für viel mehr zu danken, als ihre professionelle Hilfe. Sie waren immer zur Stelle, wenn "Not am Mann" war, und taten mir so manchen kleinen, mittelgroßen und großen Gefallen. Auch Wunder wurden erledigt, "die dauern nur etwas länger". Karl Heinz danke ich darüber hinaus für die vielen guten Gespräche. Das kleine Palaver in der Kaffeepause half in allen Lebenslagen! Kerstin Selle danke ich dafür, daß sie mich beim Endsprint im Labor tatkräftig und begeistert unterstützt hat.

Tilmann, Christoph und Arnaud danke ich dafür, daß sie mich in der etwas schwierigen Startphase in ihre Kochgruppe integriert haben. Und Christoph danke ich für die schnelle Erste Hilfe nach der explosiven RNA-Präp. Frau Meister, der "Doña Rosa der Plaza Genetika & Mikrobiologika" danke ich für ihr Herz und die Bonbons.

Ralph, meinem (ehemaligen) Laborbanknachbarn, danke ich für eine ganz besondere Zeit im a-Labor, die wissenschaftlichen Diskussionen und hilfreichen Anregungen und natürlich das Korrekturlesen.

Meiner Familie danke ich für die enorme moralische Unterstützung. Robert (Meister!) hat mir ein besonders gutes Beispiel dafür gegeben, wie man sein Ziel aus eigener Kraft konsequent verfolgt und erreicht. Meine Mutter hat mich darin unterstützt, auch unter großem Druck der eigenen Linie treu zu bleiben.

Tabellarischer Lebenslauf

| | | |
|-------------------------|-----------|---|
| Personalien | | Heidi Ulrike Böhnert Geboren am 28.11.1968 in Berlin Nationalität: deutsch |
| Schulbildung | | |
| | 1974-1978 | Grundschule in Berlin und München |
| | 1978-1980 | Orientierungsstufe des Städt. Werner-von-Siemens-Gymnasiums, München |
| | 1980-1982 | Städt. Heinrich-Heine-Gymnasium, München |
| | 1982-1985 | Städt. Wilhelm-Busch-Realschule, München |
| | 1985 | Realschulabschluß (Durchschnitt: 1,3) |
| Berufsausbildung | | |
| | 1985-1988 | Berufsausbildung zur Biologielaborantin an der GSF, Neuherberg bei München |
| Berufstätigkeit | | |
| | 1988-1989 | Tätigkeit als „Research Technican“ bei Dr. S.L. Kelly, Wolfson Institute of Biotechnology, University of Sheffield |
| Schulbildung | | |
| | 1989-1991 | Berufsoberschule (Fachrichtung Technik), München |
| | 1991 | Abitur (Durchschnitt: 1,3) |
| Studium | | |
| | 1991-1994 | Studium der Biologie an der University of Oxford Student projects: “Overexpression of part of the potato PDH E1 α subunit in <i>E. coli</i> .” im Labor von Prof. C.J. Leaver; und “Site-directed mutagenesis of two homeodomain encoding mating type genes of <i>Coprinus cinereus</i> .” im Labor von Prof. L. Casselton. |
| | 1994 | Bachelor of Arts (B.A.) für Biologie, Gesamtnote 1,0 (First) |
| Promotion | | |
| | 1994-1998 | Arbeit am Institut für Genetik und Mikrobiologie der Ludwig-Maximilians-Universität München. Promotion zum Thema „Charakterisierung apthogener REMI-Mutanten in <i>U. maydis</i> . Betreuung: Prof.Dr. R.Kahmann. |
| Berufstätigkeit | | |
| | Seit 1998 | Tätigkeit im Laboratoire Mixte Aventis CropScience Biotechnologies/CNRS UMR 1932. Im Labor von Dr. Marc-Henri Lebrun. Projekt: Klonierung und Charakterisierung des Avirulenzgens <i>AVR1IRAT7 (ACE1)</i> |

Teile dieser Arbeit wurden in folgendem Artikel veröffentlicht:

Bölker, M., Böhnert, H.U., Braun, K.H., Görl, J. and Kahmann, R. (1995): Tagging pathogenicity genes in *Ustilago maydis* by restriction enzyme-mediated integration (REMI). *Mol. Gen. Genet.* **248**, 547-552.